Università degli Studi della Tuscia di Viterbo

Dipartimento di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile

Corso di Dottorato di Ricerca in “Ecologia Forestale” - XXII ciclo

Titolo della tesi:

Definizione dello *status* di rischio e conservazione di Pteridofite minacciate: *Ophioglossum azoricum* C. Presl., *Ophioglossum vulgatum* L., *Osmunda regalis* L. e *Dryopteris tyrrhena* Fraser-Jenk. & Reichst.

Settore scientifico/disciplinare: BIO/03

Coordinatore: prof. *Paolo DE ANGELIS*

Tutor: prof.ssa *Anna SCOPPOLA*

Dottoranda:

dott.ssa *Sara MAGRINI*

INDICE

Premessa **7**

1. Conservazione della biodiversità in Italia e *Red Listing* **11**
1.1. Conservazione della biodiversità in Italia 12
1.1.1. Conservazione *ex situ* 13
1.1.2. Gli Orti Botanici italiani e la conservazione *in vivo* 14
1.1.3. Le Banche del Germoplasma: conservazione e ricerca 15
1.2. *Red Listing* 18
1.2.1. IUCN – *The World Conservation Union* 19
1.2.2. Categorie e criteri IUCN 20
1994 IUCN *Red List Categories and Criteria, version* 2.3 (p. 22); 2001 IUCN *Red List Categories and Criteria version* 3.1 (p. 22); Caratteristiche dei nuovi criteri (p. 23); Caratteristiche delle categorie di rischio (p. 24)
1.2.3. *Assessment* IUCN 32
1.2.4. La situazione italiana 34
Libro Rosso delle piante d'Italia (p. 35); Liste Rosse Regionali delle Piante d'Italia (p. 35); Lo studio della flora italiana minacciata dal 1997 ad oggi (p. 35)
1.2.5. Il progetto per la redazione di nuove Liste Rosse in Italia 38

2. Le Pteridofite: distribuzione, biologia e conservazione **41**
2.1. Filogenesi e inquadramento tassonomico 41
2.1.1. Felci eusporangiate 43
2.1.2. Felci leptosporangiate 44
2.2. Distribuzione e diversità delle Pteridofite 45
2.3. L'emancipazione dall'ambiente acquatico: evoluzione e adattamenti 47
2.4. Ciclo riproduttivo 49
2.4.1. Lo sporofito 49
2.4.2. La spora 51
2.4.3. Il processo di germinazione 54
2.4.4. Il gametofito 54
2.4.5. Il ciclo riproduttivo delle *Ophioglossaceae* 59
2.4.6. Le vie alternative al normale ciclo riproduttivo 61
Aposporia (p. 61); Gemmazione (p. 61); Apogamia (p. 62)
2.5. Conservazione delle Pteridofite: stato delle conoscenze e criticità 64
2.5.1. Conservazione *ex situ* 65
2.5.2. Conservazione delle spore 66
2.6. La flora pteridologica italiana 67
2.7. Le Pteridofite a rischio in Italia 69

3. Materiali e Metodi **73**
3.1. Le Pteridofite oggetto di studio 73
3.1.1. *Ophioglossum azoricum* 73
3.1.2. *Ophioglossum vulgatum* 80

3.1.3. *Osmunda regalis* 83
3.1.4. *Dryopteris tyrrhena* 87
3.2. Raccolta del materiale oggetto di studio 95
3.2.1. Esemplari *in vivo* 95
3.2.2. Allestimento di campioni d'erbario di riferimento 95
3.2.3. Spore 96
Raccolta da popolazioni *in situ* (p. 96); Raccolta da *exsiccata* (p. 99)
3.2.4. Dati morfometrici 101
3.2.5. Acquisizione immagini 101
3.3. Caratterizzazione micromorfologica 101
3.3.1. Osservazioni allo stereomicroscopio 102
3.3.2. Osservazioni al microscopio elettronico a scansione 102
3.3.3. Studio palinologico 103
3.3.4. Studio epidermologico 104
3.3.5. Studio del *pattern* di nervatura 104
3.4. Studio morfometrico per *Ophioglossum sp. pl.* 105
3.4.1. Morfometria tradizionale 105
Analisi statistica dei dati (p. 107)
3.4.2. Morfometria geometrica 107
Preparazione del materiale (p. 107); Metodo dei *landmark* (p. 108); *Outline analysis* (p. 111)
3.5. Riproduzione *in vitro* 112
3.5.1. Scelta e preparazione dei terreni di coltura 113
Osmunda regalis (p. 113);*Dryopteris tyrrhena* (p. 114); *Ophioglossum vulgatum* (p. 115); Messa a punto di nuovi terreni per *Ophioglossum vulgatum* (p. 117); Preparazione del fungicida (118)
3.5.2. Preparazione delle spore: pulizia e pretrattamenti 118
Pulizia (p. 119); Reidratazione (p. 119); Sterilizzazione superficiale (p. 119); Scarificazione (p. 120)
3.5.3. Semina delle spore 120
3.5.4. Incubazione delle colture 121
3.5.5. Osservazioni periodiche delle colture 121
3.5.6. Trasferimento delle colture 122
3.5.7. Definizione della tipologia di apogamia in *Dryopteris tyrrhena* e prove di induzione 122
3.6. Conservazione delle spore 124
3.6.1. Prove di conservazione delle spore di *Osmunda regalis* 124
3.7. Assessment IUCN di *Dryopteris tyrrhena* 126
3.7.1. Scheda di valutazione IUCN 126
3.7.2. Documentazione dettagliata 128
Classificazione degli habitat (p. 128); Valutazione dei fattori di minaccia (p. 129); Azioni di conservazione (p. 129)
3.7.3. La scheda utilizzata per le nuove Liste Rosse in Italia 129
3.7.4. Aggiornamento della distribuzione 131
Ricerca bibliografica (p. 131); Ricerca d'erbario (p. 132); Verifica di campo delle segnalazioni del passato (p. 136); Realizzazione delle mappe di distribuzione (p. 136)
3.7.5. Valutazione dello *status* di rischio 136
Calcolo dell'*Extent of occurrence*, EOO (p. 137); Calcolo dell'*Area of occupancy*, AOO (p. 137); Sintesi delle linee guida per l'applicazione dei criteri IUCN (p. 138)

4. Risultati 139
4.1. *Ophioglossum azoricum* e *O. vulgatum* 139
4.1.1. Studio palinologico 139
4.1.2. Studio del *pattern* di nervatura 141
4.1.3. Studio morfometrico 143
Morfometria tradizionale (p. 143); Morfometria geometrica - Metodo dei *landmark* (p. 147); *Outline analysis* (p. 149)
4.1.4. Riproduzione *in vitro* 152
4.2. *Osmunda regalis* 153

4.2.1. Studio palinologico 153
4.2.2. Riproduzione *in vitro* da spore fresche 155
4.2.3. Riproduzione *in vitro* da *exsiccata* 157
4.2.4. Conservazione delle spore 157
Sopravvivenza (p. 159); Prove di germinazione (p. 160); Gemmazione (p. 162)
4.3. *Dryopteris tyrrhena* 163
4.3.1. Studio palinologico 163
4.3.2. Studio epidermologico 163
4.3.3. Riproduzione *in vitro* da spore fresche 165
4.3.4. Definizione della tipologia di apogamia e prove di induzione 170
Verifica della tipologia di apogamia (p. 170); Prove di induzione dell'apogamia (p. 170)
4.3.5. Riproduzione *in vitro* da *exsiccata* 174
4.3.6. *Assessment* IUCN 177
Aggiornamento distributivo (p. 177); Areale di distribuzione e superficie occupata (p. 182); Habitat principali (p. 185); Fattori di minaccia presenti (p. 186); Azioni di conservazione presenti o necessarie (p. 186); Nuovo *status* di rischio (p. 188)

5. Discussione 191
5.1. Studio morfologico e morfometrico per la risoluzione di criticità tassonomiche nel genere *Ophioglossum* 191
5.1.1. Applicazione delle moderne tecniche di morfometria geometrica 192
5.1.2. Proposta per una nuova chiave dicotomica 194
5.2. Potenzialità della riproduzione *in vitro* per lo studio del ciclo riproduttivo 195
5.2.1. Studio della biologia riproduttiva e dell'ecologia dei gametofiti 196
5.2.2. Vantaggi ecologici e problematiche legate alle vie alternative al normale ciclo riproduttivo 199
5.2.3. Criticità e potenzialità della riproduzione *in vitro* da *exsiccata* per la conservazione di specie a rischio 201
5.3. Esiti della conservazione *ex situ* delle spore di *Osmunda regalis* 203
5.4. Prospettive e limiti nell'applicazione della procedura di *Assessment* IUCN 205

6. Conclusioni 207

7. Bibliografia 211

Ringraziamenti 241

Negli ultimi anni, la natura e la dimensione dei problemi ambientali hanno condotto gli Orti Botanici ad una revisione degli obiettivi della conservazione ed alla messa a punto di nuove strategie che oggi riguardano non solo le collezioni di piante *in vivo*, ma soprattutto la realizzazione di banche del germoplasma, per la conservazione di semi, spore o tessuti *in vitro*. Tutto questo è sancito da accordi di rilevanza internazionale quali la *Convenzione per la Diversità Biologica* (CBD), il *Piano d'Azione per i Giardini Botanici nell'Unione Europea* (BGCI) e la *Global Strategy for Plant Conservation* (GSPC) che definiscono obiettivi di conservazione specifici per ridurre la perdita di biodiversità, fra cui la prescrizione di assicurare la conservazione *ex situ* del 60% delle specie a rischio, di avviare programmi di moltiplicazione e reintroduzione sul 10% di queste specie entro il 2010 (GSPC, ob. 8) e di creare reti per attività conservazionistiche a livello nazionale, regionale e locale (GSPC, ob. 16).

In linea con queste finalità, nel 2005 nasce la Banca del Germoplasma della Tuscia, sezione del Centro Interdipartimentale dell'Orto Botanico dell'Università degli Studi della Tuscia e socio fondatore di RIBES - *Rete Italiana Banche del germoplasma per la conservazione Ex Situ della flora spontanea italiana,* un'associazione scientifica nata per la promozione e il coordinamento di azioni comuni nel campo della conservazione *ex situ*. La Banca del Germoplasma della Tuscia è, attualmente, l'unica struttura in Italia dedicata prevalentemente allo studio e conservazione di Pteridofite, un gruppo tassonomico che riveste un ruolo importante nel definire l'assetto floristico e vegetazionale del soprassuolo forestale, fornendo indicazioni sullo stato di conservazione dei nostri boschi. Si suppone che nel mondo oltre il 10% delle Pteridofite sia a rischio di estinzione, percentuale che in Italia raggiunge il 20%, e che molte altre siano in declino per l'elevata specificità ecologica della maggior parte delle specie, per la loro sensibilità ai cambiamenti ed alle perturbazioni ambientali e per la tendenza ad essere concentrate in habitat e regioni minacciate. Nonostante questa situazione, ad oggi nessuna Pteridofita italiana è elencata nella *IUCN Red List 2009.2* e, a più di 10 anni dalla redazione delle *Liste Rosse*, solo 5 specie sono state valutate secondo i nuovi criteri IUCN 3.1 del 2001, nell'ambito di un progetto della Società Botanica Italiana, *Flora da conservare. Iniziativa per l'implementazione in Italia delle categorie e dei criteri IUCN (2001) per la redazione di nuove Liste Rosse*.

Risulta, quindi, evidente la necessità e l'urgenza di intraprendere studi volti ad ampliare le conoscenze sulla flora pteridologica italiana, sulla sua distribuzione e sul suo stato di conservazione, così da poter incrementare l'attività di *red listing*, fondamentale per indirizzare azioni mirate di conservazione e gestione del territorio.

In questo contesto si inserisce la presente ricerca, svolta presso la Banca del Germoplasma della Tuscia e finalizzata al raggiungimento di efficaci azioni di protezione di un gruppo eterogeneo di Pteridofite a rischio di estinzione della flora italiana, rappresentative delle diverse criticità del gruppo: *Ophioglossum azoricum* C. Presl., specie rarissima e "a minor rischio" in Italia, *Ophioglossum vulgatum* L., specie "vulnerabile" nel Lazio e a rischio in molte regioni italiane, *Osmunda regalis* L., rarissima nel Lazio e a rischio nella maggior parte delle regioni italiane, caratterizzata dall'avere spore clorofilliane, poco adatte alla conservazione, in quanto perdono la vitalità entro pochi giorni dalla raccolta per la difficoltà di recuperare l'attività fotosintetica dopo il disseccamento, e *Dryopteris tyrrhena* Fraser-Jenk. & Reichst., orofita tirrenica endemica del Mediterraneo occidentale, "vulnerabile" in Italia e "gravemente minacciata" in Spagna, che conta uno scarso numero di piccole popolazioni estremamente frammentate.

Per la ricerca è stato scelto un approccio multidisciplinare che ha affrontato la tematica complessa della conservazione della biodiversità pteridofitica da diversi punti di vista (tassonomia, biologia della riproduzione, ecologia, distribuzione, valutazione dello stato di rischio), così da ottenere un quadro di conoscenze completo e aggiornato delle specie oggetto di studio, indispensabile per l'individuazione delle situazioni critiche e per avviare interventi mirati di conservazione *in situ* ed *ex situ*.

Per tutte le specie scelte è stata prevista la definizione e sperimentazione di protocolli per la riproduzione *in vitro* e per la conservazione a lungo termine delle spore, in particolar modo quelle clorofilliane, e il loro stoccaggio all'interno della Banca del Germoplasma della Tuscia. La riproduzione *in vitro* costituisce una fase importante della ricerca non solo per la produzione di nuove piante da conservare *in vivo* all'Orto Botanico di Viterbo o presso la Banca del Germoplasma della Tuscia ma, soprattutto, per lo studio della biologia riproduttiva, dal processo di germinazione allo sviluppo dei gametofiti, che consente di poter individuare le esigenze ecologiche delle varie fasi del ciclo riproduttivo e di evidenziarne eventuali criticità.

Gli erbari hanno un ruolo importante nella presente ricerca, fondamentali per gli studi di tassonomia e per l'aggiornamento distributivo, presentandosi anche come strutture per la conservazione *in sicco* della diversità vegetale. Infatti, data l'estrema rarità di alcune delle specie oggetto di studio, la ricerca ha previsto il prelievo di spore da *exsiccata* di *Osmunda regalis* e *Dryopteris tyrrhena* da utilizzare per la riproduzione *in vitro*, così da produrre nuove piante per la conservazione *ex situ* o per eventuali reintroduzioni nelle stazioni dove risultano scomparse, utilizzando germoplasma autoctono e senza intaccare le già esigue popolazioni naturali.

Per il genere *Ophioglossum*, per poter definire l'esatta consistenza delle popolazioni delle 3 specie italiane, è stata intrapresa una revisione tassonomica attraverso uno studio integrato che ha previsto anche l'applicazione di un metodo moderno come la morfometria geometrica, ancora poco usato in campo botanico e mai utilizzato prima per le Pteridofite.

Inoltre, per *Dryopteris tyrrhena* la ricerca ha previsto anche l'aggiornamento della distribuzione, oltre ad uno studio biologico, ecologico e conservazionistico, per l'attribuzione di uno *status* di rischio a livello globale e regionale (*sensu* IUCN), applicando la metodologia IUCN versione 3.1. Il completamento della procedura di *assessment* porterà alla proposta di inserimento di questa specie, mai valutata prima, nella *IUCN Red List* e all'aggiornamento del precedente *status* di rischio per l'Italia per l'inserimento nelle nuove Liste Rosse.

Capitolo 1
CONSERVAZIONE DELLA BIODIVERSITÀ IN ITALIA E *RED LISTING*

La biodiversità, determinata da mutazioni, ricombinazione genica e dall'effetto delle pressioni selettive, è il risultato di milioni di anni di evoluzione, è quindi un'eredità naturale che va conservata per le generazioni future. Il principio base della tutela della biodiversità è la protezione e la conservazione *in situ* delle specie e degli habitat, siano questi ultimi naturali, parzialmente disturbati o danneggiati dal continuo e crescente impatto antropico: inquinamento, cambiamenti climatici, industrializzazione, urbanizzazione e conseguente "spreco" di territorio (WORLD WATCH INSTITUTE, 1994). Per questo motivo, a partire dagli anni '80, il concetto di diversità biologica e le problematiche relative alla sua progressiva perdita a causa delle attività umane sono diventati oggetto di numerose convenzioni internazionali. Nel 1992, con la sottoscrizione della Convenzione di Rio sulla Biodiversità, tutti gli stati Membri della Comunità Europea hanno riconosciuto la conservazione *in situ* di specie, ecosistemi e habitat naturali come priorità da perseguire, ponendosi come obiettivo quello di *"anticipare, prevenire e attaccare alla fonte le cause di significativa riduzione o perdita della diversità biologica in considerazione del suo valore intrinseco e dei suoi valori ecologici, genetici, sociali, economici, scientifici, educativi, culturali, ricreativi ed estetici"*. Lo scopo della conservazione *in situ* è permettere alle popolazioni di mantenersi autonomamente all'interno delle comunità di cui fanno parte e nell'ambiente a cui sono adattate, affinché abbiano il potenziale per una continua evoluzione. In particolare, per le specie maggiormente minacciate, l'attività *in situ* prevede la conservazione di popolazioni vitali in aree che devono essere sufficientemente estese da consentire la sopravvivenza di un gran numero di individui per evitare fenomeni di erosione genetica (ZURLINI *et al.,* 2002; KERR, DEGUISE, 2004).

La conservazione *in situ* della biodiversità e delle condizioni necessarie al suo mantenimento si articola in un complesso di misure integrate, volte alla conservazione del patrimonio genetico delle specie e degli ecosistemi, attraverso la tutela e il recupero delle specie minacciate e soprattutto attraverso la regolazione delle attività antropiche perchè non danneggino in modo irreparabile la consistenza delle popolazioni locali. Ad oggi, lo strumento più usato risulta comunque l'istituzione e gestione di aree protette di vario tipo, dove specie ed ecosistemi possano essere liberi di evolversi in condizioni naturali (ARAÙJO, 1999; ABBIT *et al.,* 2000; LAGUNA *et al.,* 2004; LOVEJOY, 2006), e la creazione di reti ecologiche, sistemi di nodi, corridoi ecologici, zone tampone ed aree di riqualificazione ambientale, che colleghino fra loro le aree protette in modo da garantire la sopravvivenza delle comunità biologiche e

dei processi ecologici, minimizzando gli effetti negativi della frammentazione degli habitat (RODRIGUES *et al.,* 1999; 2004; HANSEN, DEFRIES, 2007).

Spesso può diventare necessario intervenire nei processi naturali (per es., dinamismo della vegetazione, concorrenza tra le specie, ecc.), per esempio tramite reintroduzioni o il restauro degli ecosistemi degradati. Le reintroduzioni costituiscono un mezzo potente per incrementare la variabilità e la vitalità delle popolazioni e degli habitat, che però ha anche la potenzialità di causare enormi danni se condotto nel modo sbagliato, fino a cancellare le popolazioni e le comunità esistenti, o creare fenomeni di inquinamento genetico (IUCN, 1987; 1998; GRIFFITH *et al.,* 1989; SEDDON *et al.,* 2007). La comprensione dei meccanismi bio-ecologici che dovrebbero regolare le reintroduzioni di specie, popolazioni e comunità è tuttora in fase di sviluppo e la mancanza di linee guida nazionali e regionali vincolanti per la reintroduzione di piante rare o minacciate, non aiuta le molte attività di conservazione messe in campo negli ultimi anni in Italia. Tuttavia indicazioni in tal senso sono deducibili da diverse fonti a livello internazionale (BGCI, 1995; 2001).

1.1. La conservazione della biodiversità in Italia

L'Italia possiede un patrimonio di biodiversità tra i più significativi nel panorama europeo: la varietà di ambienti presenti, la posizione centro-mediterranea e la vicinanza con il continente africano, la presenza di grandi e piccole isole, la storia geografica, geologica, biogeografica e dell'uso del territorio hanno fatto sì che in Italia si verificassero le condizioni necessarie ad ospitare numeri consistenti di specie animali e vegetali. Nel complesso in Italia è presente oltre un terzo delle specie animali distribuite in Europa e quasi il 50% della flora europea su una superficie che è solo un trentesimo di quella europea (BLASI *et al.,* 2005).

Principale strumento di conservazione *in situ* risulta il sistema dei Parchi e delle Riserve, attualmente composto da 772 aree protette che complessivamente coprono circa il 10% del territorio nazionale (Fig.1.1). Tale sistema, però, è il risultato di un percorso durato diversi decenni e realizzato in modo non pianificato, mentre è completamente diverso il caso della Rete Natura 2000 (Fig.1.1). Si hanno infatti sistemi ambientali, come quello montano, molto ben rappresentati nelle aree protette, e altri sistemi, come quello costiero, decisamente più bisognosi di protezione, ma molto poco rappresentati. È solo disponendo di vaste porzioni di superfici di territorio a determinismo naturale e seminaturale che si può garantire la conservazione delle specie, una conservazione che sia legata alla piena funzionalità dell'habitat e del paesaggio. Sulla scorta di tali considerazioni, con l'art. 3 della Direttiva "Habitat" (Dir. 92/43, CEE), nasce la rete ecologica europea denominata Natura 2000, il primo *network* continentale per la conservazione *in situ* della biodiversità, che in Italia, con i 2.288 Siti di Importanza Comunitaria (SIC) e 597 Zone di Protezione Speciale (ZPS), protegge ad oggi circa il 21% della superficie nazionale.

All'interno dei siti Natura 2000 in Italia sono protetti complessivamente: 132 habitat, 87 specie di flora e 98 specie di fauna ai sensi della Direttiva Habitat (http://www.minambiente.it).

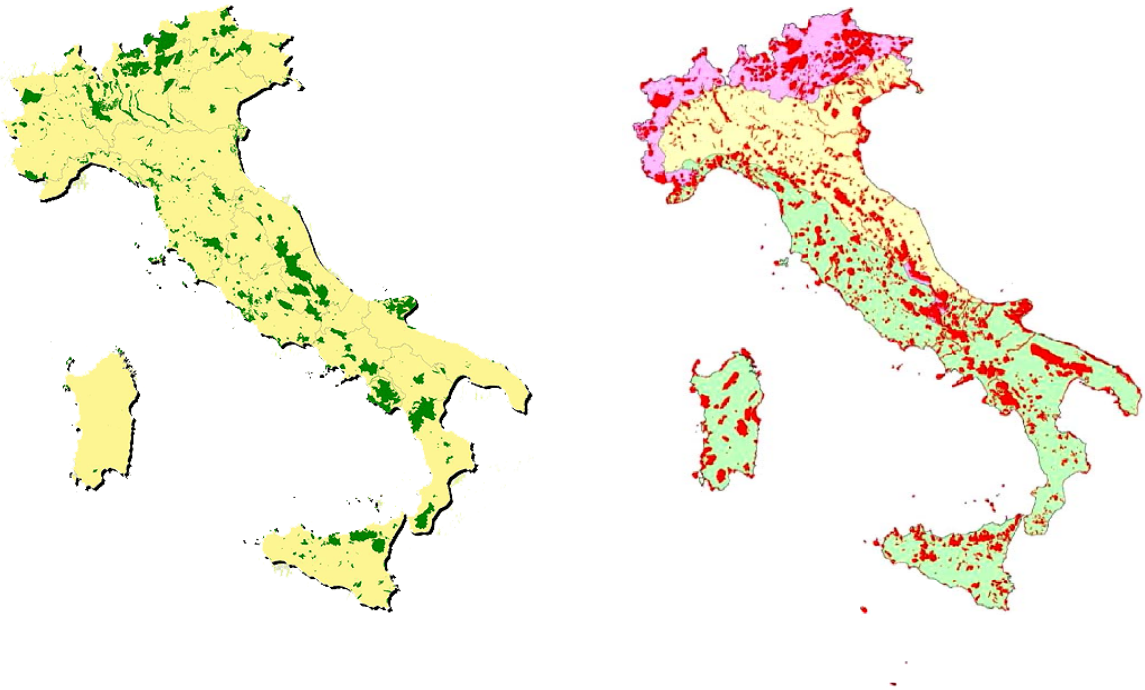


Fig. 1.1 - Distribuzione in Italia delle aree protette (a sinistra) e dei siti, SIC e ZPS, della rete Natura 2000 (a destra) (www.minambiente.it)

1.1.1. Conservazione *ex situ*

Il problema della conservazione della biodiversità è divenuto sempre più pressante e urgente, infatti, anche se la conservazione delle specie vegetali dovrebbe essere primariamente effettuata *in situ*, tuttavia, quando le modificazioni ambientali generano forti alterazioni ai sistemi naturali, tali azioni non sono più sufficienti, l'unica alternativa possibile è quella di agire in anticipo sulla potenziale estinzione locale dei *taxa*, individuando le specie vegetali più a rischio e promuovendo azioni di salvaguardia *ex situ* (SOCIETÀ BOTANICA ITALIANA, 1995; BGCI, 2001). Per questo motivo, la Convenzione sulla Conservazione della Diversità Biologica (CBD) evidenzia la necessità e la complementarietà della conservazione *ex situ* (Art. 9), riconoscendo l'importanza del ruolo di supporto di Orti Botanici e Banche del Germoplasma che forniscono maggiori garanzie riguardo la sopravvivenza delle specie a rischio di estinzione in natura e della loro diversità genetica e assicurano materiale per la loro eventuale reintroduzione in natura (SCOPPOLA, 2005).

Sono molte le specie ormai estinte in natura, oggi presenti solamente negli Orti Botanici, strutture che mantengono in coltura più di 80.000 specie di piante vascolari (circa il 30% della flora mondiale) offrendo un'effettiva opportunità per una conservazione della diversità vegetale (IZCO, 1997). Tuttavia il sistema tradizionale di coltivazione di singoli esemplari o piccoli nuclei, nel tempo, si è dimostrato poco

efficace per una corretta conservazione *ex situ* che ne mantenga anche la diversità genetica. Così, negli ultimi 20-30 anni, la natura e la dimensione degli odierni problemi ambientali hanno condotto gli Orti Botanici a una revisione degli obiettivi della conservazione e alla messa a punto di nuove strategie che oggi riguardano non solo le collezioni di piante vive, ma soprattutto la realizzazione e il controllo di banche del germoplasma, che conservino a lungo termine collezioni di tessuto *in vitro*, pollini, spore o semi (ROSSI *et al.,* 2004). Tutto questo è sancito da accordi di rilevanza internazionale quali la *Convenzione per la Diversità Biologica* (CBD) e il *Piano d'Azione per i Giardini Botanici nell'Unione Europea* (BGCI, 2001) che danno gli indirizzi per garantire la valutazione e la conservazione della biodiversità, sviluppando la gestione delle collezioni *ex situ* (Ob. C2) e divenendo centri di raccolta e di distribuzione delle informazioni più rilevanti sulla diversità vegetale e sulla sua conservazione (Ob. C3). Il Piano d'Azione indirizza, quindi, gli Orti Botanici ad ampliare il ruolo tradizionalmente avuto nella conservazione *ex situ* e ad assicurarsi che la loro conservazione della diversità sia geneticamente controllata e documentata a sufficienza per non compromettere il potenziale evolutivo del materiale conservato.

L'esigenza di uno stretto coordinamento delle misure di conservazione *ex situ* per fronteggiare la perdita di diversità genetica delle specie spontanee è stata riconosciuta da vari Organismi comunitari e nazionali, fra cui Spagna, Unione Europea ed altri, e dal Consiglio d'Europa con la costituzione di *Planta Europa* (applicazione europea di *Plantlife International*), un libero consorzio di organizzazioni europee (governative e non) per la conservazione delle piante spontanee e dei loro ambienti, e con l'elaborazione nel 2002 della *European Plant Conservation Strategy* (EPCS) (SOCIETÀ BOTANICA ITALIANA, 2004) in linea con la decisione VI/9 della CBD, per realizzare e promuovere una Strategia Globale (*Global Strategy for Plant Conservation* - GSPC) (BLASI *et al.,* 2005). Questi due documenti chiave definiscono obiettivi di conservazione specifici per ridurre la perdita di biodiversità; fra questi, la prescrizione di assicurare la conservazione *ex situ* del 60% delle specie a rischio e di avviare programmi di moltiplicazione e reintroduzione sul 10% di queste specie entro il 2010 (GSPC, ob. 8), e di creare reti per attività conservazionistiche a livello nazionale, regionale e locale (GSPC, ob. 16).

1.1.2. Gli Orti Botanici italiani e la conservazione *in vivo*

A partire dalla prima metà del 1500, quando proprio in Italia nascono i primi Orti Botanici del mondo (quello di Pisa tra il 1543 ed il 1544, quello di Firenze e quello di Padova nel 1545), molte altre università si sono dotate di orti botanici, principalmente per lo studio e la coltivazione delle specie officinali e per l'acclimatazione di quelle esotiche, per es. l'Università di Cagliari, di Genova, di Napoli, di Palermo e di Roma. Ad oggi si contano 109 istituzioni che possono essere annoverate come tali (58 si trovano nell'Italia settentrionale, 37 in quella centrale e 14 nel meridione) che comprendono orti botanici,

giardini alpini ed arboreti, sia universitari che appartenenti ad enti pubblici e privati, tutti impegnati a far conoscere e a conservare gli esempi più notevoli della flora locale, spontanea o più direttamente legata alla storia dell'uomo (SOCIETÀ BOTANICA ITALIANA, 2006).

Molti sono gli Orti Botanici che stanno portando avanti programmi mirati a favorire e garantire il mantenimento della biodiversità negli ambienti naturali (BEDINI, 1996; MINUTO, 1996; PERINI *et al.,* 1996; PROFUMO, 1996; CLAUSER *et al.,* 2005; FABRINI, GRATANI, 2005; ZOCCO PISANA *et al.,* 2005; DEL PRETE *et al.,* 2007; PACE *et al.,* 2007) e fra le tante tipologie di azione per la conservazione *ex situ* si citano:

- ✓ progetti di conservazione di specifici gruppi tassonomici: si ricordano le collezioni di orchidee spontanee negli orti botanici di Siena (MACCHERINI *et al.,* 1999), di Roma e di Viterbo (FONCK *et al.,* 2007a; MAGRINI, 2007) e le collezioni di pteridofite spontanee a Napoli (MENALE *et al.,* 1999) e a Viterbo (MAGRINI *et al.,* 2006; FONCK *et al.,* 2009);
- ✓ progetti di conservazione di particolari specie minacciate come *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei e *Zelkova sicula* Di Pasq., Garfì & Quézel a Palermo (SCHICCHI *et al.,* 2004; GARFÌ *et al.,* 2007; SCIALABBA *et al.,* 2007), *Haplophyllum patavinum* (L.) G. Don ed *Erucastrum palustre* (Pirona) Vis. a Padova (CAPPELLETTI *et al.,* 2007), *Senecio paludosus* L. (DALLAI *et al.,* 2008) e *Marsilea quadrifolia* L. (BONAFEDE *et al.,* 1999) a Modena; *Santolina etrusca* (Lacaita) Marchi & D'Amato e *Orchis palustris* Jacq. a Viterbo (FONCK *et al.,* 2007b; MAGRINI *et al.,* 2009b);
- ✓ progetti per la definizione di protocolli e tecniche di coltivazione e riproduzione per eventuali reintroduzione in natura (RINALDI, 1996; ACCOGLI *et al.,* 1999; CAMOLETTO PASIN, QUARANTA, 2007).

Inoltre, da qualche decina di anni, gli Orti Botanici già attivi nella conservazione *in vivo* hanno trovato nuove forme di conservazione *ex situ* e in Italia sono ormai numerose le banche del germoplasma nate con l'intento di conservare i semi e le spore di specie spontanee, soprattutto in ambito locale.

1.1.3. Le Banche del Germoplasma: conservazione e ricerca

Le banche del germoplasma sono uno dei migliori mezzi per prevenire la perdita di biodiversità genetica e garantire quindi un futuro alle specie in pericolo di estinzione. Nascono per contrastare la perdita esponenziale di specie derivante, oltre che dai fenomeni naturali, dalle attività antropiche che distruggono, inquinano e modificano gli ambienti naturali. La loro funzione principale è quella di garantire la conservazione a lungo termine del materiale genetico ereditario, il germoplasma o plasma germinale, sotto forma di semi, spore, pollini o tessuti meristematici, secondo protocolli standard (I.S.T.A., 1985; SMITH *et al.,* 2003; BACCHETTA *et al.,* 2006; 2008a). Create negli Stati Uniti alla fine degli anni '50, all'interno di università o orti botanici, la prima banca del germoplasma è stata quella del

laboratorio nazionale per la conservazione dei semi, costituita nel 1958 all'interno del campus dell'Università Statale del Colorado (HARTMANN, KESTER, 1990). La principale banca del germoplasma su scala mondiale è, oggi, la britannica *Millenium Seed Bank* (MSB) che opera nell'ambito dei *Royal Botanic Gardens* di *Kew* e vanta una lunga esperienza nel settore della conservazione di semi delle specie spontanee, in particolare, delle zone aride del mondo, la cui perdita dovuta alla progressiva desertificazione potrebbe causare danni alla sopravvivenza delle popolazioni locali (SMITH, LININGTON, 1997). La MSB si propone di arrivare entro la fine del 2010 a custodire i semi del 10% della flora presente sulla terra, per un totale di 24.000 specie (LININGTON, 2001). Attualmente i semi conservati per un periodo di tempo maggiore sono quelli della Banca del Germoplasma di Madrid, vitali dopo oltre 40 anni (PÉREZ-GARCÍA *et al.,* 2007), ma la *seed longevity equation*, modello matematico basato su dati sperimentali, prevede che semi, conservati correttamente, possano mantenere la capacità germinativa per centinaia di anni (ELLIS, ROBERTS, 1980; ELLIS, 1988; PÉREZ-GARCÍA *et al.,* 2008).

Fino ad alcuni anni fa l'attività delle banche del germoplasma era incentrata, quasi esclusivamente, sul reperimento e sulla conservazione del maggior numero di entità rappresentanti la flora minacciata e quella rara del territorio di pertinenza (GÓMEZ CAMPO, 2001). 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. L'attività di una banca del germoplasma, 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. Questa tipologia di conservazione *ex situ* risulta uno strumento di grande utilità, indispensabile per coadiuvare gli interventi *in situ* e, in casi estremi quali quelli di estinzione in natura, come unica via possibile per la sua stessa preservazione (RICH at al., 1999; ESTRELLES *et al.,* 2001). 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 (ROSSI *et al.,* 2001; 2005). È 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 tale germoplasma al fine di garantire la conservazione della biodiversità di un dato territorio. Il materiale vegetale conservato *ex situ* deve essere utilizzato quindi per incrementare le conoscenze sulla biologia, ecologia e riproduzione delle entità (GENTILI *et al.,* 2006; BACCHETTA *et al.,* 2008a), per individuare le migliori tecniche di conservazione e moltiplicazione,

evidenziandone i punti di forza ed eventuali criticità. Questo consente di sperimentare e mettere a punto *ex situ* le metodologie e le azioni necessarie all'applicazione di strategie di conservazione *in situ*, come per esempio le reintroduzioni (SMITH, LININGTON, 1997; BGCI, 2001; LININGTON, PRITCHARD, 2001; IUCN, 2002; SMITH *et al.,* 2003; ROSSI *et al.,* 2004).

La prima banca del germoplasma italiana è quella di Lucca, nata circa 30 anni fa dalla collaborazione con l'*Azienda regionale per lo sviluppo e l'innovazione del settore agricolo*, dove vengono conservate essenzialmente specie d'interesse agricolo ed in particolare cultivar e varietà ortive e foraggiere. Ad oggi in Italia si contano più di 20 banche del germoplasma, tra queste le più importanti sono quelle presenti negli orti botanici universitari di Cagliari (BG-SAR) (MATTANA *et al.,* 2005), Catania, Palermo (RAIMONDO, SCIALABBA, 1994), Pavia (*Lombardy Seed Bank* - LSB) (MONDONI *et al.,* 2005; ROSSI *et al.,* 2005), Pisa e Roma (GRATANI, FABRINI, 2004), quella della Provincia Autonoma di Trento (*Trentino Seed Bank* - TSB) (BONOMI *et al.,* 2005) e quella dell'Istituto del Germoplasma di Bari, gestita dal Centro Nazionale per le Ricerche (CNR). 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. Fra le varie strutture possiamo osservare alcune specializzazioni dal punto di vista territoriale o tassonomico. Infatti, la banca di Pisa si occupa soprattutto di conservazione della flora toscana e dell'Arcipelago Toscano (PUGGIONI, BEDINI, 2009), quella di Palermo conserva il germoplasma di specie spontanee e coltivate dell'area mediterranea (SCHICCHI *et al.,* 2004; SCIALABBA *et al.,* 2007), quella di Cagliari ha concentrato gli sforzi sulla conservazione delle specie del Mediterraneo occidentale insulare (BACCHETTA et al. 2009), la *Trentino Seed Bank* di specie alpine (BONOMI *et al.,* 2005) e la Banca del Germoplasma della Tuscia è l'unica struttura in Italia dedicata prevalentemente allo studio e conservazione di Pteridofite della flora italiana (MAGRINI, 2009; MAGRINI *et al.,* 2010b).

Alcune banche partecipano anche ad altre reti europee: la *Trentino Seed Bank*, la *Lombardy Seed Bank* e la Banca del Germoplasma di Pisa, dal 2004 sono partner di ENSCONET - *European Native Seed Conservation Network*, prestigiosa rete tematica di ricerca fra 19 banche del germoplasma europee, avente come scopo la messa a punto delle migliori tecniche di conservazione *ex situ* dei semi delle specie spontanee minacciate della flora europea (ENSCONET, 2009a,b); le banche di Cagliari (BGSar) e di Catania partecipano al progetto GENMEDOC - *Création d'un réseau de Centres de conservation du matériel génétique de la flores des régions méditerranéennes de l'espace MEDOC* (P.I.C. Interreg III B-Méditerranéé Occidentale) che ha lo scopo di raccogliere e conservare germoplasma di *taxa* endemici, rari o minacciati, elaborare protocolli di germinazione e moltiplicazione del materiale prescelto e studiare le popolazioni e la struttura degli habitat prioritari inclusi della Direttiva 92/43/CEE. Nell'ambito

di tale progetto è stato redatto un manuale sulla gestione e conservazione del germoplasma (BACCHETTA *et al.,* 2006).

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. Così, il 3 dicembre 2005 a Trento nasce RIBES - *Rete Italiana Banche del germoplasma per la conservazione Ex Situ della flora spontanea italiana,* un'associazione scientifica, senza scopo di lucro, a cui aderiscono diciotto soci fondatori tra Orti Botanici, Istituti di ricerca, Centri di ricerca, Istituzioni pubbliche, private e onlus (BEDINI *et al.,* 2005; ROSSI *et al.,* 2006). RIBES ha come scopo principale, la conservazione di specie spontanee minacciate di estinzione e utili per la rinaturalizzazione e promuove l'avvio di azioni coordinate nel campo della conservazione *ex situ* (raccolta di germoplasma in natura, trattamento e conservazione in apposite strutture, studio di protocolli di propagazione, mantenimento di documentazione aggiornata e sviluppo di iniziative formative, didattiche e divulgative) relativamente a due ambiti principali che possono essere attuati in maniera indipendente ma coordinata:

- specie della flora spontanea italiana a rischio di estinzione elencate in liste di interesse mondiale, nazionale, regionale e provinciale, o in altri repertori di riconosciuta validità scientifica;
- specie della flora spontanea italiana di rilevante significato biogeografico-ecologico e di potenziale interesse per azioni di rinaturalizzazione quali il restauro, il recupero, il ripristino e la riqualificazione ambientale.

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 (BEDINI *et al.,* 2005). 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 (BACCHETTA *et al.,* 2006).

1.2. *Red listing*

La salvaguardia del patrimonio biologico è una tematica impossibile da affrontare in assenza di adeguate conoscenze sulla sua consistenza e sul suo stato di conservazione. A riguardo, la compilazione e l'aggiornamento di "liste rosse", come auspicato dalla *Global Strategy for Plant Conservation*

(GSPC/CBD) e dalla *European Plant Conservation Strategy* (EPCS), sono di fondamentale importanza e costituiscono uno strumento di comunicazione indispensabile per intervenire sul territorio. I *Red Data Books* e le *Red Lists* editi dall'IUCN - *The World Conservation Union*, in cooperazione con il *World Conservation Monitoring Centre* (WCMC), sono, infatti, universalmente riconosciuti come gli strumenti più efficaci nel monitoraggio e gestione dello stato della biodiversità (RODRIGUES *et al.,* 2006). Le categorie IUCN forniscono un metodo facilmente applicabile su larga scala, per mettere in evidenza le specie a più alto rischio di estinzione, ma anche per focalizzare l'attenzione sulle misure di conservazione già messe in atto o da prevedere per proteggerle.

1.2.1. IUCN - *The World Conservation Union*

Nel 1948 nel corso del Congresso Internazionale per la Protezione della Natura viene istituita l'*International Union for the Protection of Nature* (IUPN), grazie all'esigenza avvertita dagli stati membri delle Nazioni Unite di darsi una base comune sulle tematiche ambientali. Nel 1956 l'IUPN diventa IUCN (*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*) e nel 1990 questa definizione si contrae definitivamente in *The Word Conservation Union*. L'IUCN conta oggi 1.024 membri in più di 150 nazioni, fra Stati, agenzie governative e organizzazioni non governative, ed opera con lo scopo di promuovere la conservazione della natura in diversi settori d'azione attraverso 6 commissioni superiori, fra cui la principale è la *Species Survival Commission* (SSC), con oltre 7.500 componenti.

Negli anni '60 l'IUCN avvia un programma mirato ad individuare le entità a rischio di estinzione mondiale, che culmina con la nascita dell'*IUCN Red List System* e con la stampa, nel 1962, di un prototipo di *Red Data Book* ad uso interno. Nel 1966 viene pubblicato il primo vero *Red Data Book*, due volumi sui mammiferi e uccelli minacciati nel mondo (SIMON, 1966; VINCENT, 1966).

Per quanto riguarda le piante, solo nel 1976 viene proposta la prima lista delle specie minacciate ed endemiche d'Europa, contenente anche una classificazione dei fattori di minaccia gravanti su di esse (LUCAS, WALTERS, 1976). Due anni più tardi si giunge al primo "IUCN *Plant Red Data Book"*, basato su categorie di minaccia codificate di tipo qualitativo (LUCAS, SYNGE, 1978).

Il protocollo IUCN è stato via via migliorato, attraverso l'aggiornamento delle categorie di minaccia (MACE, LANDE, 1991) e la redazione di criteri più oggettivi, essenzialmente tramite la definizione di soglie numeriche per alcuni parametri valutabili quantitativamente, come il numero di individui, l'areale di distribuzione e l'area occupata (MACE *et al.,* 1992; IUCN, 1993, 1994). Grazie a questa continua evoluzione, il sistema IUCN è divenuto il più utilizzato al mondo in ambito scientifico e conservazionistico (DE GRAMMONT, CUARÒN, 2006; MACE *et al.,* 2008). La versione più recente, ed attualmente in uso, dei criteri e delle categorie IUCN risale al 2001 ed è accompagnata da linee guida contenenti precise indicazioni metodologiche su come deve avvenire la valutazione di un taxon (IUCN,

2001; 2006a,b; 2008). Nel 2003 l'IUCN ha proposto e diffuso le linee guida per l'applicazione a livello "regionale" dei criteri, concepiti soprattutto per le Liste Rosse globali (IUCN, 2003), intendendo con questo termine ambiti territoriali più ristretti, come nazioni o regioni amministrative (GÄRDENFORS *et al.,* 2001; KELLER, BOLLMANN 2004; MILNER-GULLAND *et al.,* 2006).

La SSC, in cooperazione con il *World Conservation Monitoring Centre*, è editore di *Red Data Books* e *Red Lists* a scala mondiale che, negli ultimi 40 anni, sono stati presi a modello da molti stati membri dell'IUCN, seppure in tempi e modi diversi, per redigere analoghi repertori su scala nazionale, sub-nazionale e regionale; si stima che nel mondo ne siano stati pubblicati oltre 400 (SCOPPOLA *et al.,* 2005). Fra questi anche l'Italia ha seguito il percorso tracciato dall'IUCN con la pubblicazioni del *Libro Rosso delle piante d'Italia* (CONTI *et al.,* 1992) e delle *Liste rosse Regionali delle piante d'Italia* (CONTI *et al.,* 1997). Oggi gli *assessment* a livello globale sono pubblicati sul sito della IUCN (www.iucnredlist.org), aggiornato ogni anno, nel periodo aprile/maggio, grazie ai continui contributi che ognuno può inviare attraverso un apposito *form* elettronico.

L'implementazione e l'utilizzo del sistema IUCN rende possibile la compilazione e/o integrazione di Liste Rosse globali e regionali, che dovrebbero essere considerate come il punto di partenza per l'individuazione di specie prioritarie da conservare e fornire supporto a iniziative di protezione a livello legislativo, fornendo uno strumento utile per definire le priorità nei programmi di conservazione (IUCN, 2001; 2005).

1.2.2. Categorie e criteri IUCN

Prima del 1994 i criteri perché un organismo fosse dichiarato a rischio di estinzione erano scarsi e molto discutibili, dal momento che venivano equiparate due idee concettualmente indipendenti come rarità e rischio di estinzione e, soprattutto, per la soggettività della valutazione. Le categorie utilizzate erano infatti le seguenti (LUCAS, SYNGE, 1978):

- **EX - Estinta (*Extinct*):** specie non più raccolta, che per la sua particolare ecologia si può considerare effettivamente estinta;
- **E - Minacciata (*Endangered*):** specie in via di estinzione la cui sopravvivenza è compromessa se persistono i fattori che la minacciano. Include quei *taxa* il cui numero si è ridotto fino ad un ivello critico, o i cui habitat si sono così drasticamente ridotti da risultare in immediato pericolo di estinzione.
- **V - Vulnerabile (*Vulnerable*):** specie che, persistendo i fattori che la minacciano, possono passare nella categoria "Minacciata" nel prossimo futuro. Include quei *taxa* di cui la maggior parte o tutte le popolazioni sono in declino a causa di sovrasfruttamento, distruzione degli habitat o altri disturbi

ambientali; *taxa* con popolazioni che sono seriamente impoverite e per cui non è ancora garantita la sicurezza; e *taxa* con popolazioni che sono ancora abbondanti ma a rischio a causa di serie minacce.

- **R – Rara (*Rare*):** specie con piccole popolazioni che al presente non è considerata "Minacciata" o "Vulnerabile", ma risulta a rischio. Queste popolazioni sono generalemente localizzate in aree o habitat ristretti o sono molto frammentate in aree più ampie.
- **I – Indeterminata (*Indeterminate*):** specie sicuramente a rischio (E, V, R) ma per la quale non si dispone di sufficienti informazioni per attribuire la giusta categoria

Queste prime categorie IUCN, fin dall'inizio, sono state ampiamente riconosciute a livello internazionale e sono state usate per quasi trent'anni, con alcune modifiche, in molteplici pubblicazioni ed elenchi prodotti dall'IUCN, ma anche da altre organizzazioni governative e non. Nel 1984 nel simposio della SSC "*The Road to Extinction*" (FITTER, FITTER 1987), vengono esaminati nei dettagli i problemi evidenziati nei primi anni di applicazione, prendendo in considerazione una serie di soluzioni per rivedere il sistema e revisionare le categorie. Ma la vera fase di sviluppo comincia nel 1989 con una richiesta da parte del Comitato Direttivo della SSC di sviluppare un nuovo approccio che fornisse una struttura esplicita e soprattutto oggettiva per la classificazione delle specie secondo il loro rischio di estinzione. Nel periodo seguente si assiste alla produzione di un gran numero di bozze di proposte, risultato di continue nuove stesure, consultazioni e approvazioni. Per evitare che questo potesse causare confusione e per apportare le modifiche come e quando fossero necessarie, venne applicato un sistema per numerare le varie versioni così come riportato nella Tabella 1.1.

VERSIONE	DESCRIZIONE	BIBLIOGRAFIA
Versione 1.0	Il primo lavoro che discute una nuova base per le categorie e presenta criteri numerici particolarmente rilevanti per i grandi vertebrati.	MACE, LANDE, 1991
Versione 2.0	Una sostanziale revisione della versione 1.0 che include criteri numerici adatti a tutti gli organismi e introduce categorie per le specie non minacciate.	MACE *et al.,* 1992
Versione 2.1	A seguito di un lungo processo di consultazioni all'interno della Species Survival Commission, vengono apportati una serie di cambiamenti ai dettagli dei criteri e viene inclusa una spiegazione completa dei principi base. Una struttura più esplicita chiarisce il significato delle categorie delle specie non minacciate.	IUCN, 1993
Versione 2.2	In seguito ad ulteriori commenti e test addizionali per la validazione del metodo, vengono apportati ai criteri alcuni cambiamenti di minore importanza. Inoltre, la categoria "*Susceptible*" presente nelle versioni 2.0 e 2.1 viene ricondotta all'interno della categoria "*Vulnerable*". Viene messa in evidenza la necessità di un'applicazione precauzionale del sistema.	MACE, STUART, 1994
Versione 2.3	L'IUCN Council adotta questa versione che incorpora le modifiche precedenti e i commenti suggeriti dai membri dell'IUCN, nel dicembre 1994.	IUCN, 1994
Versione 3.0	A seguito dei commenti ricevuti, vengono organizzati alcuni workshop sui criteri IUCN e vengono apportati i cambiamenti proposti ai criteri, alla definizione di alcuni termini chiave e al trattamento dell'incertezza.	IUCN/SSC Criteria Review Working Group, 1999
Versione 3.1	L'IUCN Council adotta questa ultima versione che incorpora tutte le modifiche derivate dai commenti di membri dell'IUCN e del SSC e dal meeting finale del *Criteria Review Working Group* (febbraio 2000).	IUCN, 2001

Tab. 1.1 - Evoluzione delle categorie e dei criteri IUCN dal 1991 al 2001 (IUCN, 2001)

1994 IUCN *Red List Categories and Criteria, version* 2.3

Dopo una lunga fase di consultazione, l'IUCN/SSC *Criteria Review Working Group* produce nel 1994 un nuovo sistema di categorie e criteri (versione 2.3) (IUCN, 1994), con l'intento di fornire direttive più chiare per incrementare l'oggettività della valutazione e ottimizzare il confronto tra diverse Liste Rosse.

Le categorie passano ad 8 più 3 sottocategorie: EX (*Extinct*), EW (*Extinct in the Wild*), CR (*Critically endangered*), EN (*Endangered*), VU (*Vulnerable*), LR (*Lower risk*), comprendente: CD (*Conservation dependent*), NT (*Near threatened*) e LC (*Least Concern*), DD (*Data Deficient*), NE (*Not Evaluated*).

In questa versione vengono stabiliti i criteri quantitativi che delimitano le categorie di rischio, che riguardano in modo sintetico: 1. Riduzione della popolazione; 2. Areale o superficie occupata; 3. Numero degli individui maturi + riduzione della popolazione; 4. Numero degli individui maturi; 5. Analisi quantitativa diretta. Benché essi siano sostanzialmente invariabili per le tre categorie CR, EN, VU, l'opzione per una categoria piuttosto che per un'altra dipende dai valori soglia in cui ricade il caso in analisi (IUCN, 1994).

2001 IUCN *Red List Categories and Criteria version* 3.1

Dopo molte fasi di revisione a carattere provvisorio, l'IUNC/SSC il 9 febbraio 2000 ufficializza la nuova versione delle categorie, la 3.1 (IUCN, 2001), con importanti novità rispetto alla versione 2.3. Vengono ridotte le categorie per le specie "A minor rischio" e introdotto l'uso della categoria "EX" a diversi livelli di dettaglio (Fig.1.2). Qualora, infatti, siano pubblicati dati a scala sub-globale, la categoria "EX" è sostituita dalla categoria "RE" (*Regionally Extinct*) (GARDENFORS *et al.,* 2001). Vengono alzati i valori soglia del Criterio A1, portando le percentuali di riduzione della popolazione dall'80 al 90% per assegnare la categoria "CR", dal 50 al 70% per "EN" e dal 20 al 50% per la categoria "VU".

Dal punto di vista applicativo il vantaggio di questo sistema è che fornisce linee guida standard e oggettive grazie alle quali le decisioni sulla conservazione della specie possono essere rivedute e valutate da più studiosi secondo criteri quantitativi e usando tutte le informazioni disponibili (SCOPPOLA *et al.,* 2005).

In accordo con IUCN (2001) e GÄRDENFORS et al. (2001) queste categorie sono: *Extinct* (EX), *Regionally Extinct* (RE), *Extinct In The Wild* (EW), *Critically Endangered* (CR), *Endangered* (EN), *Vulnerable* (VU), *Near Threatened* (NT), *Least Concern* (LC), *Data Deficient* (DD), *Not Evaluated* (NE). L'attribuzione ad una delle categorie presuppone conoscenze quanto più possibile approfondite su modelli e dinamiche distributive e demografiche di ogni specie considerata. Tali informazioni sono quindi utilizzate nell'applicazione di criteri quantitativi; a sostegno di una procedura di valutazione dello status di rischio più oggettiva possibile. La notevole complessità di alcuni aspetti del protocollo IUCN induce spesso ad effettuare valutazioni tutto sommato soggettive, poiché basate su stime intuitive (WEBB, 2008). Benché ciò sia in

alcuni casi necessario e addirittura incoraggiato dalla stessa IUCN (2006a, b; 2008), come regola generale bisognerebbe imporsi una stretta attinenza alle soglie quantitative previste dai criteri per le diverse categorie, con una precisa indicazione degli aspetti su cui si fonda la valutazione (ampiezza dell'areale, superficie occupata, numero di individui, ecc.).

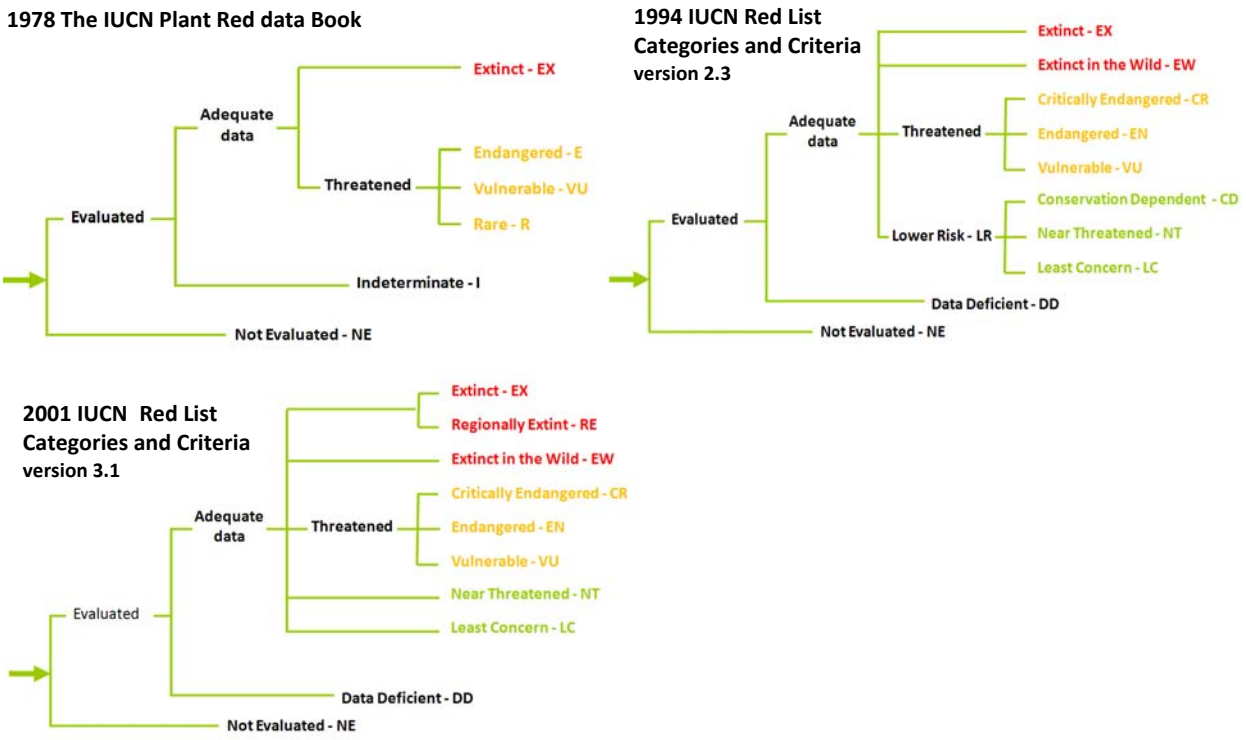


Fig. 1.2– Schema generale dell'evoluzione della procedura di *Red Listing* per l'assegnazione dello *status* di rischio (da IUCN, 1994; 2001 ridisegnato).

Caratteristiche dei nuovi criteri

Il protocollo prevede cinque criteri quantitativi, che possono essere usati per valutare se un taxon è a rischio o meno e, quando a rischio, a quale categoria di rischio può essere assegnato: "CR", "EN" o "VU". I criteri si fondano su indicatori biologici connessi al rischio d'estinzione a carico delle popolazioni, quali processi di rapido declino o presenza di popolazioni di dimensioni ridotte. In sintesi i cinque criteri riguardano i seguenti aspetti:

A. Popolazioni in declino (passato, presente e /o proiettato per il futuro);

B. Ampiezza dell'areale geografico, frammentazione e declino o fluttuazioni a suo carico;

C. Popolazioni di dimensioni ridotte, frammentate, soggette a declino o fluttuazioni;

D. Popolazioni di dimensioni estremamente ridotte o con distribuzione geografica estremamente limitata;

E. Analisi quantitative delle probabilità d'estinzione [es. Population Viability Analysis (PVA)].

La definizione di questi criteri e sottocriteri deriva dall'analisi dei fattori di rischio più significativi per il maggior numero di organismi. Allo stesso modo, le soglie quantitative indicate per le diverse categorie di rischio sono state adottate in quanto giudicate appropriate e coerenti con le conoscenze inerenti la conservazione degli organismi selvatici.

Si riporta di seguito la descrizione dei 5 criteri e delle opzioni che, nel loro insieme, contribuiscono a rafforzare l'assegnazione di un taxon ad una determinata categoria di rischio (IUCN, 2001; CAROTENUTO, PRIMACK, 2003):

A. Declino della popolazione (passato, presente o previsto) Da applicare a *taxa* che hanno avuto un declino nel recente passato: 10 anni o 3 generazioni (fino ad un massimo di 100 anni).

A1: cause del declino reversibili o cessate

A2: cause del declino non cessate, irreversibili o non individuate

A3: fattori di minaccia presenti, proiezione futura

A4: cause del declino non cessate e serie temporale da passato a futuro

B. Distribuzione geografica e frammentazione, declino o fluttuazione (AOO, EOO) Da applicare a *taxa* che hanno distribuzione limitata combinata a

B1: severa frammentazione

B2: declino continuo

B3: fluttuazione estrema.

C. Dimensioni della popolazione e frammentazione, declino o fluttuazione. Da applicare a *taxa* con popolazioni di piccole dimensioni che attualmente sono in declino o se ne prevede il declino nel prossimo futuro. Risulta in parziale sovrapposizione con il criterio A da cui si differenzia perchè valido solo x piccole popolazioni, per la misura del declino su tempi più corti.

D. Popolazioni molto piccole o distribuzione molto limitata. Questo criterio identifica popolazioni molto piccole o limitate ad aree ristrette. Vi ricadono i *taxon* con dimensioni delle popolazioni (individui maturi) al di sotto dei limiti numerici proposti per ogni categoria di minaccia

E. Analisi quantitative sul rischio di estinzione. Questo criterio determina la probabilità di estinzione di un *taxon* su un certo periodo di tempo sulla base di analisi quantitative.

Caratteristiche delle categorie di rischio

Si riporta di seguito la descrizione del sistema di attribuzione delle specie alle categorie IUCN e la loro la definizione da IUCN (2001; 2006a, b; 2008) secondo la traduzione italiana di GARGANO (2008a):

- **EX – Estinta (*Extinct*):** Una specie viene considerata "estinta" se non esistono più dubbi sul fatto che l'ultimo suo individuo è morto. Una specie è supposta "estinta" quando verifiche approfondite, condotte nei periodi più appropriati (del giorno, della stagione o dell'anno), nel suo habitat noto o

presunto e su tutto l'areale storico non hanno fatto registrare la presenza di alcun individuo. Le ricerche devono protrarsi per un arco di tempo adeguato al ciclo vitale ed alla forma biologica della specie. In accordo con GÄRDENFORS et al. (2001) i taxa estinti solo localmente e non su tutta la loro area distributiva vanno assegnati alla categoria **RE - Estinta localmente (*Regionally Extinct*).**

- **EW - Estinta in Natura (*Extinct In The Wild*):** Una specie viene considerata "estinta in natura" quando è noto che sopravvive solo in cattività, in coltivazione o come entità naturalizzata in aree esterne al suo areale di origine. Una specie è supposta "estinta in natura" quando idonee ricerche condotte nei periodi appropriati (del giorno, della stagione e dell'anno), nell'habitat noto o presunto, e su tutto l'areale storico, non hanno portato al rinvenimento di alcun individuo. La durata di tali ricerche deve essere adeguata al ciclo vitale ed alla forma biologica della specie. In accordo con GÄRDENFORS et al. (2001) questa categoria deve essere usata solo per taxa estinti in natura in tutto il loro areale.
- **CR - Gravemente Minacciata (*Critically Endangered*):** Una specie è "gravemente minacciata" quando i migliori dati disponibili dimostrano che soddisfa uno qualsiasi dei criteri A-E, risultando così esposta a un rischio di estinzione in natura estremamente alto:

  A. Riduzione della dimensione della popolazione in accordo con i seguenti criteri:

  1. Riduzione, osservata, stimata, dedotta o sospettata, pari o superiore al 90% durante gli ultimi dieci anni o tre generazioni (in tal caso indipendentemente dalla lunghezza del periodo). Le cause devono essere chiaramente reversibili, ben note e cessate; l'entità della riduzione può essere stimata in base ad una qualsiasi delle seguenti opzioni (da specificare):

  (a) osservazioni dirette;

  (b) un indice di abbondanza appropriato alla specie;

  (c) declino della superficie occupata, dell'areale e/o della qualità dell'habitat;

  (d) livelli di sfruttamento effettivi o potenziali;

  (e) conseguenze generate da introduzione di taxa alieni, ibridazione, patogeni, inquinanti, competitori o parassiti.

  2. Riduzione, osservata, stimata, dedotta o sospettata, pari o superiore all'80% nell'arco degli ultimi dieci anni o tre generazioni (in tal caso indipendentemente dalla lunghezza del periodo). La riduzione, o le cause da cui ha origine, possono non essere cessate, non essere note oppure possono essere irreversibili; la stima dell'entità della riduzione può basarsi su una (da specificare) delle cinque opzioni (a-e) previste dal criterio A1.

  3. Riduzione, prevista o sospettata, pari o superiore all'80% entro i prossimi dieci anni o tre generazioni (in tal caso indipendentemente dalla lunghezza del periodo fino ad un massimo di

100 anni). La riduzione può essere valutata in base ad una (da specificare) delle quattro opzioni (b-e) contemplate dal criterio A1.

4. Riduzione, osservata, stimata, dedotta, prevista o sospettata, pari o superiore all'80% durante dieci anni o tre generazioni (indipendentemente dalla lunghezza del periodo e fino ad un massimo di 100 anni per le previsioni); l'arco temporale considerato deve includere un periodo passato ed uno futuro. La riduzione o le sue cause possono non essere cessate, non essere note oppure possono essere irreversibili; l'entità della riduzione può essere valutata in base ad una (da specificare) delle cinque opzioni (a-e) previste dal criterio A1.

B. Distribuzione geografica congruente con le soglie indicate dai criteri B1 (relativo all'areale), B2 (inerente la superficie occupata) o da entrambi:

1. Areale stimato inferiore a 100 Km^2 e almeno due delle eventualità a-c:

a. Distribuzione estremamente frammentata o presenza accertata in un'unica location.

b. Declino continuo (osservato, dedotto o previsto) a carico di uno dei seguenti parametri:

(i) areale;

(ii) superficie occupata

(iii) superficie, diffusione e/o qualità dell'habitat

(iv) numero di location o sottopopolazioni

(v) numero di individui maturi.

c. Fluttuazioni estreme che interessano uno dei seguenti parametri:

(i) areale

(ii) superficie occupata

(iii) numero di location o sottopopolazioni

(iv) numero di individui maturi.

2. Superficie occupata stimata inferiore a 10 Km^2 e almeno due delle eventualità a-c:

a. Distribuzione estremamente frammentata o presenza accertata in un'unica location.

b. Declino continuo (osservato, dedotto o previsto) a carico di uno dei seguenti parametri:

(i) areale

(ii) superficie occupata

(iii) superficie, diffusione e/o qualità dell'habitat

(iv) numero di location o sottopopolazioni

(v) numero di individui maturi.

c. Fluttuazioni estreme che interessano uno dei seguenti parametri:

(i) areale

(ii) superficie occupata

(iii) numero di location o sottopopolazioni

(iv) numero di individui maturi.

C. Popolazione stimata in meno di 250 individui maturi insieme ad una delle seguenti eventualità:

1. Stime che suggeriscono la possibilità di un declino continuo di almeno il 25% entro 3 anni o una generazione (in tal caso indipendentemente dalla lunghezza del periodo fino a un massimo di 100 anni nel futuro) oppure

2. Declino continuo (osservato, previsto o dedotto) del numero di individui maturi ed almeno una delle seguenti condizioni (a-b):

a. Struttura della popolazione in una delle seguenti forme:

(i) nessuna sottopopolazione costituita da più di 50 individui maturi, oppure

(ii) almeno il 90% degli individui maturi inclusi in una sola sottopopolazione.

b. Fluttuazioni estreme a carico del numero di individui maturi.

D. Popolazione stimata in meno di 50 individui maturi.

E. Analisi quantitative che producono una probabilità d'estinzione in natura di almeno il 50% entro 10 anni o tre generazioni (in tal caso indipendentemente dalla lunghezza del periodo fino a un massimo di 100 anni nel futuro).

- **EN – Minacciata (*Endangered*):** Una specie è "minacciata" quando in base ai migliori dati disponibili soddisfa uno qualsiasi dei seguenti criteri (A-E), risultando esposta a un rischio di estinzione in natura molto alto:

A. Riduzione della dimensione della popolazione congruente con i seguenti criteri:

1. Riduzione, osservata, stimata, dedotta o sospettata, pari o superiore al 70% nell'arco degli ultimi dieci anni o tre generazioni (in tal caso indipendentemente dalla lunghezza del periodo). Le cause devono essere chiaramente reversibili, ben note e cessate; l'entità della riduzione può essere stimata in base ad una delle seguenti opzioni (da specificare):

(a) osservazioni dirette;

(b) un indice di abbondanza appropriato alla specie;

(c) declino della superficie occupata, dell'areale e/o della qualità dell'habitat;

(d) livelli di sfruttamento effettivi o potenziali;

(e) conseguenze legate all'introduzione di taxa alieni, ibridazioni, patogeni, inquinanti, competitori o parassiti.

2. Riduzione, osservata, stimata, dedotta o sospettata, pari o superiore al 50% durante gli ultimi dieci anni o tre generazioni (in tal caso indipendentemente dalla lunghezza del periodo). La

riduzione, o le cause da cui ha origine, possono non essere cessate, non essere note oppure possono essere irreversibili; l'entità della riduzione può essere valutata in base ad una (da specificare) delle cinque opzioni (a-e) previste dal criterio A1.

3. Riduzione, prevista o sospettata, pari o superiore al 50% entro i prossimi dieci anni o tre generazioni (in tal caso indipendentemente dalla lunghezza del periodo fino ad un massimo di 100 anni). L'entità della riduzione può essere stimata in base ad una (da specificare) delle quattro opzioni (b-e) contemplate dal criterio A1.

4. Riduzione, osservata, stimata, dedotta, prevista o sospettata, pari o superiore al 50% durante dieci anni o tre generazioni (indipendentemente dalla lunghezza del periodo fino ad un massimo di 100 anni per le previsioni); la finestra temporale considerata deve includere un periodo passato ed uno futuro. La riduzione o le cause da cui essa dipende possono non essere cessate, non essere note oppure possono essere irreversibili; la entità della riduzione può essere stimata in base ad una (da specificare) delle cinque opzioni (a-e) previste dal criterio A1.

B. Distribuzione geografica congruente con le soglie indicate dai criteri B1 (relativo all'areale), B2 (inerente la superficie occupata) o da entrambi.

1. Areale stimato inferiore a 5.000 Km^2 e almeno due delle eventualità a-c:

a. Distribuzione estremamente frammentata o presenza accertata in non più di 5 location.

b. Declino continuo (osservato, dedotto o previsto) a carico di uno dei seguenti parametri:

(i) areale

(ii) superficie occupata

(iii) superficie, diffusione e/o qualità dell'habitat

(iv) numero di location o sottopopolazioni

(v) numero di individui maturi.

c. Fluttuazioni estreme che interessano uno dei seguenti parametri:

(i) areale

(ii) superficie occupata

(iii) numero di location o sottopopolazioni

(iv) numero di individui maturi.

2. Superficie occupata stimata inferiore a 500 Km^2 e almeno due delle eventualità a-c:

a. Distribuzione estremamente frammentata o presenza accertata in non più di 5 location.

b. Declino continuo (osservato, dedotto o previsto) a carico di uno dei seguenti parametri:

(i) areale

(ii) superficie occupata

(iii) superficie, diffusione e/o qualità dell'habitat

(iv) numero di location o sottopopolazioni

(v) numero di individui maturi.

c. Fluttuazioni estreme che interessano uno dei seguenti parametri:

(i) areale

(ii) superficie occupata

(iii) numero di location o sottopopolazioni

(iv) numero di individui maturi.

C. Popolazione stimata in meno di 2.500 individui maturi insieme ad una delle seguenti eventualità:

1. Stime che suggeriscono la possibilità di un declino continuo di almeno il 20% entro 5 anni o 2 generazioni (in tal caso indipendentemente dalla lunghezza del periodo fino a un massimo di 100 anni nel futuro) oppure

2. Declino continuo (osservato, previsto o dedotto) del numero di individui maturi ed almeno una delle seguenti condizioni (a-b):

a. Struttura della popolazione in una delle seguenti forme:

(i) nessuna sottopopolazione costituita da più di 250 individui maturi, oppure

(ii) almeno il 95% degli individui maturi inclusi in una sola sottopopolazione.

b. Fluttuazioni estreme a carico del numero di individui maturi.

D. Popolazione stimata in meno di 250 individui maturi.

E. Analisi quantitative che producono una probabilità d'estinzione in natura pari ad almeno il 20% entro 20 anni o 5 generazioni (in tal caso indipendentemente dalla lunghezza del periodo fino a un massimo di 100 anni nel futuro).

- **VU – Vulnerabile (*Vulnerable*):** Una specie è "vulnerabile" quando secondo i migliori dati disponibili soddisfa uno qualsiasi dei seguenti criteri (A-E), denotando perciò un alto rischio di estinzione in natura:

A. Riduzione della dimensione della popolazione congruente con i seguenti criteri:

1. Riduzione, osservata, stimata, dedotta o sospettata, pari o superiore al 50% durante gli ultimi dieci anni o tre generazioni (in tal caso indipendentemente dalla lunghezza del periodo). Le cause devono essere chiaramente reversibili, ben note e cessate; l'entità della riduzione può essere stimata in base ad una qualsiasi delle seguenti opzioni (da specificare):

(a) osservazioni dirette;

(b) un indice di abbondanza appropriato alla specie;

(c) declino della superficie occupata, dell'areale e/o della qualità dell'habitat;

(d) livelli di sfruttamento effettivi o potenziali;

(e) conseguenze legate all'introduzione di taxa alieni, ibridazioni, patogeni, inquinanti, competitori o parassiti.

2. Riduzione, osservata, stimata, dedotta o sospettata, pari o superiore al 30% nell'arco degli ultimi dieci anni o tre generazioni (in tal caso indipendentemente dalla lunghezza del periodo). La riduzione, o le cause da cui trae origine, possono non essere cessate, non essere note oppure possono essere irreversibili; la stima dell'entità della riduzione può basarsi su una (da specificare) delle cinque opzioni (a-e) previste dal criterio A1.

3. Riduzione, prevista o sospettata, pari o superiore al 30% entro i prossimi dieci anni o tre generazioni (in tal caso indipendentemente dalla lunghezza del periodo fino ad un massimo di 100 anni). La riduzione può essere valutata in base ad una (da specificare) delle quattro opzioni (b-e) contemplate dal criterio A1.

4. Riduzione, osservata, stimata, dedotta, prevista o sospettata, pari o superiore al 30% durante dieci anni o tre generazioni (indipendentemente dalla lunghezza del periodo fino ad un massimo di 100 anni per le previsioni); l'arco temporale considerato deve includere un periodo passato ed uno futuro. La riduzione o le sue cause possono non essere cessate, non essere note oppure possono essere irreversibili; l'entità della riduzione può essere valutata in base ad una (da specificare) delle cinque opzioni (a-e) previste dal criterio A1.

B. Distribuzione geografica congruente con le soglie indicate dai criteri B1 (relativo all'areale), B2 (inerente la superficie occupata) o da entrambi:

1. Areale stimato inferiore a 20.000 Km^2 e almeno due delle eventualità a-c:

a. Distribuzione estremamente frammentata o presenza accertata in non più di 10 location.

b. Declino continuo (osservato, dedotto o previsto) a carico di uno dei seguenti parametri:

(i) areale

(ii) superficie occupata

(iii) superficie, diffusione e/o qualità dell'habitat

(iv) numero di location o sottopopolazioni

(v) numero di individui maturi.

c. Fluttuazioni estreme che interessano uno dei seguenti aspetti:

(i) areale

(ii) superficie occupata

(iii) numero di location o sottopopolazioni

(iv) numero di individui maturi.

2. Superficie occupata stimata inferiore a 2.000 Km^2 e almeno due delle eventualità a-c:

a. Distribuzione estremamente frammentata o presenza accertata in non più di 10 location.

b. Declino continuo (osservato, dedotto o previsto) a carico di uno seguenti parametri:

(i) areale

(ii) superficie occupata

(iii) superficie, diffusione e/o qualità dell'habitat

(iv) numero di location o sottopopolazioni

(v) numero di individui maturi.

c. Fluttuazioni estreme che interessano uno dei seguenti parametri:

(i) areale

(ii) superficie occupata

(iii) numero di location o sottopopolazioni

(iv) numero di individui maturi.

C. Popolazione stimata in meno di 10.000 individui maturi insieme ad una delle seguenti eventualità:

1. Stime che suggeriscono la possibilità di un declino continuo di almeno il 10% entro 10 anni o 3 generazioni (indipendentemente dalla lunghezza del periodo fino a un massimo di 100 anni nel futuro) oppure

2. Declino continuo (osservato, previsto o dedotto) del numero di individui maturi e almeno una delle seguenti condizioni (a-b):

a. Struttura della popolazione in una delle seguenti forme:

(i) nessuna sottopopolazione costituita da più di 1.000 individui maturi, oppure

(ii) tutti gli individui maturi inclusi in una sola sottopopolazione.

b. Fluttuazioni estreme a carico del numero di individui maturi.

D. Popolazione di dimensioni ridotte in accordo con uno dei seguenti casi:

1. Popolazione stimata inferiore a 1.000 individui maturi.

2. Popolazione caratterizzata da superficie occupata molto ristretta (tipicamente meno di 20 Km^2) o numero ridotto di location (tipicamente 5 o meno); tale da poter diventare in breve tempo ed in maniera imprevedibile "gravemente minacciata" o persino "estinta" in conseguenza di attività umane o eventi stocastici.

E. Analisi quantitative che producono una probabilità d'estinzione in natura di almeno il 10% entro 100 anni.

- **NT - Prossima alla minaccia (*Near Threatened*):** Una specie è considerata "quasi a rischio" se valutata con i criteri illustrati, pur non risultando "gravemente minacciata", "minacciata" o "vulnerabile", appare prossima alle soglie indicate per una delle categoria di rischio o è probabile che divenga a rischio nell'immediato futuro.
- **LC – A basso rischio (*Least Concern*):** Una specie può essere ritenuta "a basso rischio" se, in base ai criteri illustrati, non risulta "gravemente minacciata", "minacciata", "vulnerabile" o "quasi a rischio" e non vi sono dati che indicano la possibilità che lo diventi a breve. Le specie ad ampia diffusione o abbondanti sono di norma incluse in questa categoria.
- **DD - Mancanza di dati (*Data Deficient*):** Una specie è attribuita alla categoria "dati insufficienti" in mancanza di informazioni adeguate per una stima verosimile, diretta o indiretta, del suo rischio di estinzione in natura. La categoria "dati insufficienti" non è una categoria di rischio. Il suo utilizzo esprime la necessità di ulteriori ricerche che, in futuro, potrebbero suggerire l'attribuzione del taxon anche ad una categoria di rischio. Le specie attribuite a questa categoria possono restare escluse da piani di conservazione; ciò impone di prestare grande attenzione nello scegliere tra l'applicazione della categoria DD o l'attribuzione di uno status di rischio. In tal senso è incoraggiato un utilizzo completo di qualsiasi dato disponibile, in modo da limitare al massimo l'uso della categoria "dati insufficienti" (IUCN 2006a, b; 2008). Ad esempio, se si suppone che una specie ha un areale relativamente circoscritto ed è trascorso un considerevole periodo di tempo dall'ultimo rinvenimento, può essere giustificato l'inserimento in una categoria di rischio.
- **NE - Non Valutata (*Not Evaluated*):** Una specie è considerata "non valutata" quando non è ancora stata oggetto di alcuna valutazione tramite i criteri IUCN. In accordo con GÄRDENFORS et al. (2001) questa categoria, oltre che ai *taxa* non ancora valutati, va assegnata a livello regionale anche alle popolazioni per cui non è prevista l'applicazione del protocollo IUCN, in particolare a quelle di specie introdotte o avventizie.

1.2.3. *Assessment* IUCN

Per l'inserimento di una specie nella "*IUCN Red List of the Treathened Species*" (solo *on line* all'indirizzo: http://www.iucnredlist.org/) è necessario intraprendere la procedura di *assessment* attraverso l'applicazione di una metodologia a livello globale e regionale (*sensu* IUCN) standardizzata, oggettiva, ripetibile e trasparente per assegnare uno *status* di minaccia secondo i criteri e le categorie IUCN versione 3.1 (IUCN, 2001). Studi comparativi su diversi metodi di classificazione del rischio d'estinzione (DE GRAMMONT, CUARÓN, 2006) dimostrano che il metodo proposto dalla IUCN può effettivamente portare a valutazioni più affidabili. D'altro canto, nonostante gli sforzi di standardizzazione della

procedura, anche l'applicazione del protocollo IUCN può presentare alcune difficoltà e la possibilità di una cattiva interpretazione. Questo può essere collegato ad alcuni suoi aspetti quali essenzialmente: la complessità di alcune parti, l'adozione di una terminologia che a volte assegna un significato particolare a termini di uso comune in biologia e la necessità di mantenere un margine di flessibilità per compensare con l'esperienza personale l'incompletezza dei dati.

Per tali ragioni la stessa IUCN diffonde dei documenti periodicamente aggiornati (IUCN, 2006a,b; 2008), in cui vengono dettate le linee guida per una corretta applicazione del protocollo, con esempi sui diversi gruppi tassonomici e spiegazioni sulle definizioni ed i termini usati (IUCN, 2006a,b; 2008; GARGANO, 2008a, b). La scala geografica di analisi è principalmente a livello globale, ma è possibile applicare la metodologia anche a livello regionale. A tale scopo, nel 2003 la World Conservation Union ha proposto e diffuso le linee guida per l'applicazione dei nuovi criteri a livello regionale (IUCN, 2003), intendendo con questo termine ambiti territoriali più ristretti, come nazioni o regioni amministrative (GÄRDENFORS, 2001; GÄRDENFORS *et al.,* 2001; KELLER, BOLLMANN 2004; MILNER-GULLAND *et al.,* 2006), e a livello locale, anche se ne viene esplicitamente sconsigliato l'uso per territori molto piccoli, come le province italiane, in quanto potrebbero non essere rappresentativi della biologia delle specie (IUCN, 2003). In particolare, proprio le applicazioni a livello regionale stanno suscitando crescente interesse, quale elemento cardine nelle strategie di conservazione (IUCN, 2005; MILLER *et al.,* 2007). Diversi paesi europei hanno portato a termine la compilazione di Liste Rosse nazionali o regionali aggiornate secondo i criteri più recenti; tra queste la Svizzera (MOSER *et al.,* 2002; SCHNYDER *et al.,* 2004; LAMBELET-HAUETER *et al.,* 2006; SENN-IRLET *et al.,* 2007), la Svezia (KÖPPEL *et al.,* 2003; GÄRDENFORS, 2005), la Gran Bretagna (CHEFFINGS *et al.,* 2005), la Penisola Iberica (CABEZUDO et al, 2005; SÉRGIO *et al.,* 2006; MORENO, 2008) e la Repubblica Ceca (KUCERA, VÁÑA, 2003).

Sebbene un *taxon* dovrebbe essere valutato con tutti i criteri che è possibile applicare in base ai dati a disposizione, per assegnarlo ad una categoria di rischio è sufficiente che risponda ai requisiti previsti anche da uno solo dei criteri (HILTON-TAYLOR, 2001; IUCN, 2006a, b; 2008). In ogni caso, quando possibile, bisognerebbe elencare tutti i criteri applicati nella procedura di valutazione del rischio d'estinzione: per esempio: (CR): A2cd; B1+2de; C2a(i). Se criteri diversi danno responsi differenti va data precedenza a quelli che conducono all'assegnazione nella categoria di rischio più elevato (principio di precauzione). Comunque nella documentazione inerente la procedura di valutazione del rischio di estinzione è possibile includere anche i criteri addizionali che assegnano il *taxon* a categorie di rischio inferiore. Bisogna notare che, rispetto al criterio E, i criteri A, B, C e D permettono una più frequente inclusione dei *taxa* in categorie di rischio. In effetti tali criteri sono stati volutamente formulati in modo da essere più inclusivi; in quanto, essendo basati su informazioni parziali o comunque incomplete, presentano margini di errore più ampi rispetto a rigorose analisi quantitative. Infine, va puntualizzato

che la natura quantitativa dei criteri non implica un'assoluta mancanza di flessibilità del protocollo. Infatti esso prevede l'utilizzo di procedure di inferenza e proiezione che, purché basate su assunzioni valide e documentate, assicurano la possibilità di valutare anche *taxa* su cui esistono scarse informazioni (IUCN, 2008; GARGANO, 2008a). In particolare, va ribadito che la rigorosità del protocollo non dovrebbe essere ricercata tanto nell'accuratezza in senso assoluto delle valutazioni, quanto nella comparabilità tra le stesse (almeno all'interno del medesimo gruppo tassonomico). Come indicato dalla IUCN (2005; 2006a,b; 2008) la procedura non dovrebbe assumere il ruolo di strumento per l'individuazione delle priorità di conservazione né, tanto meno, per la gestione delle popolazioni (es. delimitazione e monitoraggio). Al contrario, le Liste Rosse IUCN dovrebbero rappresentare solo una delle basi del processo volto prima ad identificare le entità prioritarie e poi a definire le linee di azione più efficaci per la loro conservazione. Inoltre, nel sistema IUCN non è precluso lo spazio ad un'ampia flessibilità metodologica e a valutazioni intuitive, in accordo col fatto che la procedura nasce per essere adottata a grande scala (spaziale e tassonomica), su gruppi numerosi di *taxa* ed in tempi brevi. A tal riguardo, HILTON-TAYLOR (2001) ne ribadisce la necessità di speditezza, così come l'importanza dell'esperienza per sopperire all'assenza di dati adeguati per giungere ad analisi rigorose. Ad ulteriore conferma può essere citata la ripetizione con cui, tanto nella descrizione del protocollo (IUCN, 2001) che nella definizione delle linee guida per la sua applicazione (IUCN, 2006a, b; 2008), vengono ribadite le possibilità d'uso di dati indiretti su cui fondare la deduzione o anche solo il sospetto dell'esistenza di una certa condizione di rischio. Va inoltre sottolineato il fatto che gli studiosi di diversi gruppi di organismi possono incontrare diverse difficoltà.

1.2.4. La situazione italiana

In Italia vi è una lunga tradizione di studi per la conservazione della natura (PEDROTTI, 1992; BLASI *et al.,* 2005) e il dibattito per la realizzazione di liste rosse, partito all'inizio del secolo scorso con la redazione del primo elenco di specie rare per la Toscana (PAMPANINI, 1925), si approfondisce soprattutto negli anni '70, quando il Gruppo di Lavoro per la Floristica della Società Botanica Italiana pubblica una prima lista di specie in pericolo di estinzione in Italia (MOGGI *et al.,* 1972). Successivamente, Sebastiano Filipello (Coordinatore del Gruppo di Lavoro per la Floristica della S.B.I.) viene inserito tra i contributori della *List of rare, threatened and endemic plants for the countries of Europe* (LUCAS, WALTERS, 1976), volume che elenca, per l'Italia, una lista di circa 300 specie, di cui 207 endemiche, e contribuisce alla redazione del primo *Plant Red Data Book* (LUCAS, SYNGE, 1978; SARTORI, 1982). Sempre a Filipello, negli anni '80, si deve il primo tentativo di introduzione in Italia del protocollo IUCN (FILIPELLO, 1981). Tra i risultati più importanti derivanti da questa iniziativa va citata la pubblicazione del volume *Flora da proteggere* (GARDINI PECCENINI, 1984), che riporta una lista di 101 specie vegetali italiane valutate secondo il primo protocollo IUCN, a livello europeo, nazionale e regionale.

Il Libro Rosso delle piante d'Italia

Tuttavia solo nel 1992 viene pubblicato il primo *Libro Rosso delle Piante d'Italia* (CONTI *et al.,* 1992), che elenca 458 entità a rischio di estinzione a livello nazionale basandosi sulle prime categorie IUCN (LUCAS, SYNGE, 1978, Par. 1.2.2.): una raccolta di schede monografiche con una sintesi delle notizie biologiche, ecologiche e conservazionistiche disponibili in letteratura relative ad ogni entità, corredate da un'iconografia originale in bianco e nero. Pur non applicando una procedura IUCN basata su criteri oggettivi e fornendo una distribuzione a livello nazionale piuttosto generica e non sempre aggiornata, e risentendo della soggettività dei vari responsabili scientifici regionali il *Libro Rosso* rappresenta comunque un primo buon tentativo di descrivere le entità cercando di motivarne il rischio di estinzione (SCOPPOLA *et al.,* 2005). È da sottolineare il fatto che per la prima volta viene utilizzato un parametro quantitativo per la definizione delle categorie di rischio, relativamente alla scomparsa di popolazioni locali: infatti, viene assegnato lo *status* "E" (minacciata) alle specie non più ritrovate nel 75% delle stazioni segnalate anteriormente al 1950, sono "Vulnerabili" quelle scomparse dal 30-50% e "Rare" quelle specie note per non più di 5 località (CONTI *et al.,* 1992).

Liste Rosse Regionali delle Piante d'Italia

A partire dal 1994, con la redazione da parte dell'IUCN di nuovi criteri e categorie (IUCN, 1994; RIZZOTTO, 1995), si assiste ad un nuovo impulso all'*assessment* delle specie italiane, culminato con la pubblicazione delle *Liste Rosse Regionali delle Piante d'Italia* (CONTI *et al.,* 1997). Alcune sostanziali differenze le distinguono dal *Libro Rosso*: la risoluzione geografica di analisi, rappresentata dalle 20 regioni amministrative, e il numero delle entità incluse nella lista nazionale che passa da 458 a 1.011, e complessivamente a 3.179 a livello regionale. Il risultato è rappresentato da una tabella sinottica con la sola indicazione della categoria IUCN versione 2.3 (IUCN, 1994), per l'Italia e per ognuna delle regioni. Anche se tali categorie prevedono criteri più obiettivi e quantificabili, tuttavia la valutazione dello *status* di rischio risente ancora della soggettività del responsabile scientifico regionale che ha curato la propria lista e risulta difficoltosa la comprensione dei criteri che hanno portato all'aggiornamento dell'elenco nazionale, non essendo riportata l'indicazione di presenza delle entità nelle regioni in cui non sono state considerate a rischio (SCOPPOLA *et al.,* 2005).

Lo studio della flora italiana minacciata dal 1997 ad oggi

La pubblicazione degli ultimi criteri IUCN nel 2001 (GÄRDENFORS *et al.,* 2001; IUCN, 2001) e delle linee guida per l'applicazione degli stessi a livello regionale (IUCN, 2003) dà un'ulteriore spinta alla redazione di liste rosse in Italia. Vengono pubblicati molti lavori sulla distribuzione ed ecologia di specie di particolare interesse che riportano anche la valutazione dello stato di conservazione (GIOVI *et al.,* 2003;

GENTILI *et al.,* 2006; GARGANO *et al.,* 2007; BACCHETTA *et al.,* 2008b; ROSSI, GENTILI, 2008a) e vengono redatte varie liste rosse a livello locale, come per il Trentino, dove però sono stati utilizzati i criteri del 1994 (PROSSER, 2001), la Provincia di Belluno (ARGENTI, LASEN, 2004) e l'Alto Adige (WILHALM, HILPOLD, 2006).

Accanto a queste Liste Rosse vere e proprie, sono stati prodotti altri elenchi di *taxa* importanti per la conservazione della flora italiana Fra questi, le *Liste Rosse e Blu della Flora Italiana* (PIGNATTI *et al.,* 2001), un volume che oltre alla lista rossa di 86 specie scelte fra quelle che la Direttiva 92/43/CEE, e relativi aggiornamenti, riconosce quali entità di interesse ai fini della protezione, mette in evidenza alcuni casi di altre entità con popolazioni in ripresa, le cosiddette liste blu. Con i dati raccolti negli anni 2001-2003 nell'ambito della convenzione CCNB – *Analisi floristica a scala nazionale* (SCOPPOLA, BLASI, 2005), in parte con elaborazioni grafiche e sintesi effettuate negli anni 2004 e 2005 sui dati successivamente aggiornati, viene pubblicato l'*Atlante delle specie a rischio di estinzione* (SCOPPOLA, SPAMPINATO, 2005), con le mappe di distribuzione di 1.020 entità: tutte quelle del *Libro Rosso* (CONTI *et al.,* 1992), dell'elenco nazionale delle *Liste Rosse* (CONTI *et al.,* 1997), tutte quelle dell'Allegato II della Direttiva "Habitat" (due delle quali non incluse nelle *Liste Rosse*) e alcune entità descritte di recente e rivalutate, anch'esse di elevato interesse conservazionistico (SCOPPOLA *et al.,* 2005).

A livello divulgativo, infine, va citato il volume a cura di MARCONI (2007), rassegna fotografica delle piante minacciate di estinzione in Italia.

Sempre nel 2005 vari esperti italiani partecipano alla pubblicazione del volume dell'IUCN *The Top 50 Mediterranean Island Plants: Wild plants at the brink of extinction, and what is needed to save them* (DE MONTMOLLIN, STRAHM, 2005), contenente 15 specie a rischio della flora insulare italiana selezionate essenzialmente in base al livello di rischio secondo i nuovi criteri (IUCN, 2001) e alla loro rappresentatività regionale: *Anchusa crispa* Viv., *Aquilegia barbaricina* Arrigoni & Nardi, *Aquilegia nuragica* Arrigoni & Nardi, *Lamyropsis microcephala* (Moris) Dittrich & Greuter, *Limonium strictissimum* (Salzmann) Arrigoni, *Polygala sinisica* Arrigoni, *Ribes sardoum* Martelli per la Sardegna; *Silene hicesiae* Brullo & Signorello per le Isole Eolie; *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei, *Bupleurum dianthifolium* Guss., *Bupleurum elatum* Guss, *Calendula maritima* Guss., *Hieracium lucidum* Guss., *Petagnaea gussonei* (Sprengel) Rauschert, *Viola ucriana* Erben & Raimondo, *Zelkova sicula* Di Pasquale, Garfì & Quézel per la Sicilia; *Centaurea gymnocarpa* Moris & De Not. per l'Isola di Capraia, nell'Arcipelago Toscano.

A livello globale, ad oggi, sono solo 37 le specie vegetali italiane inserite nella *IUCN Red List of Threatened Species*. *Version 2009.2* (http://www.iucnredlist.org) (Tab. 1.2): 21 specie sono state valutate secondo la versione 3.1 (IUCN, 2001), solo 6 in più rispetto a quelle già riportate nelle *Top 50* (DE MONTMOLLIN, STRAHM, 2005), mentre le altre 16 sono state valutate con la versione 2.3 (IUCN, 1994) e necessitano di un aggiornamento.

TAXA	STATUS		POPULATION TREND
	Version 2.3	Version 3.1	
Abies alba	Lower Risk/least concern	*needs updating*	
Abies nebrodensis		Critically Endangered D	Unknown
Alnus glutinosa		Least Concern	
Anchusa crispa		Critically Endangered B1ab(iv)c(iv)+2ab(iv)c(iv)	Decreasing
Aquilegia barbaricina		Critically Endangered B1ab(ii,iv)+2ab(ii,iv); D	Decreasing
Aquilegia nuragica		Critically Endangered B1ab(v)+2ab(v); D	Decreasing
Bupleurum dianthifolium		Critically Endangered B1ab(iii)+2ab(iii)	Unknown
Bupleurum elatum		Critically Endangered B1ab(iii,v)+2ab(iii,v)	Unknown
Calendula maritima		Critically Endangered B1ab(iii)+2ab(iii)	Unknown
Centaurea gymnocarpa		Endangered D	Unknown
Centranthus amazonum		Critically Endangered B1ab(iii,iv)+2ab(iii,iv); D	Unknown
Cyperus rotundus		Least Concern	Unknown
Hieracium lucidum		Critically Endangered B1ab(i,ii,iii,v)+2ab(i,ii,iii,v)	Unknown
Juniperus communis	Lower Risk/least concern	*needs updating*	
Juniperus oxycedrus	Lower Risk/least concern	*needs updating*	
Juniperus phoenicea	Lower Risk/least concern	*needs updating*	
Juniperus sabina	Lower Risk/least concern	*needs updating*	
Lamyropsis microcephala		Critically Endangered B1ab(iii)+2ab(iii)	Unknown
Larix decidua	Lower Risk/least concern	*needs updating*	
Limonium strictissimum		Critically Endangered B1ab(iii,v)+2ab(iii,v)	Decreasing
Petagnaea gussonei		Endangered B1ab(i,ii,iii,iv,v)+2ab(i,ii,iii,iv,v)	Decreasing
Picea abies	Lower Risk/least concern	*needs updating*	
Pinus cembra	Lower Risk/least concern	*needs updating*	
Pinus halepensis	Lower Risk/least concern	*needs updating*	
Pinus heldreichii	Lower Risk/least concern	*needs updating*	
Pinus mugo	Lower Risk/least concern	*needs updating*	
Pinus nigra	Lower Risk/least concern	*needs updating*	
Pinus pinaster	Lower Risk/least concern	*needs updating*	
Pinus pinea	Lower Risk/least concern	*needs updating*	
Pinus sylvestris	Lower Risk/least concern	*needs updating*	
Polygala sinisica		Critically Endangered B1ab(ii)+2ab(ii)	Unknown
Pycreus flavescens		Least Concern	Unknown
Ribes sardoum		Critically Endangered B1ab(v)+2ab(v)	Decreasing
Silene hicesiae		Critically Endangered B1ab(iv,v)+2ab(iv,v)	Decreasing
Taxus baccata	Lower Risk/least concern	*needs updating*	
Viola ucriana		Critically Endangered B1ab(ii,iii,v)+2ab(ii,iii,v)	Decreasing
Zelkova sicula		Critically Endangered B1ab(i,ii,v)+2ab(i,ii,v); C2a(ii); D	Decreasing

Tab. 1.2 - Elenco delle specie italiane presenti nella *IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.2* (http://www.iucnredlist.org). Le colonne riportano lo *status* secondo la versione 2.3 (IUCN, 1994), secondo la versione 3.1 (IUCN, 2001) e il *trend* della specie.

1.2.5. Il progetto per la redazione di nuove Liste Rosse in Italia

Mentre in Europa si sta profilando la necessità di giungere alla redazione di Liste Rosse su base continentale per poter condurre politiche più coerenti nella conservazione della natura, diversi Paesi hanno già realizzato o stanno lavorando a nuove Liste Rosse a livello nazionale, utilizzando i criteri e le categorie di minaccia IUCN (2001). In questo quadro, l'Italia ha intrapreso un progetto pilota per la redazione di nuove Liste Rosse, un'impresa molto impegnativa, data l'elevata diversità vegetale di questa nazione (BLASI, 2008).

L'iniziativa, proposta dal Gruppo per la Conservazione della Natura della S.B.I. alla fine del 2005, parte nella primavera 2006, con la formazione di un Gruppo di Interesse per le Liste Rosse comprendente floristi, micologi, briologi e lichenologi, la definizione delle specie target da trattare, la scelta dei responsabili dell'*assessment* e la messa a punto di una "scheda tipo" da seguire per la valutazione dei *taxa*. Viene così scelto un campione di 12 *taxa* differenziati sia sul piano tassonomico (funghi, licheni, briofite, pteridofite e spermatofite) che fitogeografico (*taxa* con areali di varia estensione o al limite di areale) ed ecologico (zone umide, coste marine, aree di montagna) così da poter sperimentare l'applicazione del protocollo IUCN evidenziandone problemi e criticità.

Successivamente, nell'ottobre 2006, l'iniziativa è stata resa nota durante un *workshop* tenutosi all'Orto Botanico di Roma sul tema delle nuove liste rosse e in occasione della quinta conferenza di *Planta Europa "Working together for Plants"*, tenutasi nel settembre 2007 in Romania (ROSSI *et al.,* 2007), e dalle 12 specie target di partenza, si è arrivati alle 40 pubblicate nel volume *Flora da conservare. Iniziativa per l'implementazione in Italia delle categorie e dei criteri IUCN (2001) per la redazione di nuove Liste Rosse* (ROSSI *et al.,* 2008b); in questo primo contributo sono 2 le Pteridofite studiate (Tab.1.3).

PTERIDOFITE	STATUS (1997)	STATUS (2008)		AUTORI DELL'ASSESSMENT
		nazionale	globale	
Cheilanthes persica (Bory) Mett. ex Kuhn	VU	EN B1ab(iii)+2ab(iii)	NE	G. ROSSI, R. GENTILI
Woodwardia radicans (L.) Sm.	VU	EN B2ab(i, ii, iii, iv)	NE	G. SPAMPINATO, P. CAMERIERE, A. CRISAFULLI, C. GANGALE, R.M. PICONE, A. SANTANGELO, D. UZUNOV

Tab. 1.3 - Elenco delle Pteridofite valutate nell'ambito del progetto e pubblicate nel volume "*Flora da conservare. Iniziativa per l'implementazione in Italia delle categorie e dei criteri IUCN (2001) per la redazione di nuove Liste Rosse*" (ROSSI *et al.,* 2008b). Per ogni specie è riportato lo *status* precedente (CONTI *et al.,* 1997), il nuovo *status* assegnato con l'indicazione dei criteri utilizzati a livello nazionale e globale (NE = not evaluated), e gli autori dell'*assessment*.

Tra i *taxa* scelti sulla base della loro rappresentatività della flora italiana e delle diverse bioregioni (PEDROTTI, 1996), alcuni hanno distribuzione puntiforme (stenoendemismi come *Primula palinuri* e *Goniolinum italicum*), altri presentano areali decisamente più ampi (*Sarcopoterium spinosum*, *Boletus*

dupainii, *Psathyrella ammophila*), altri, infine, si trovano al limite di areale (*Cheilanthes persica*, *Gagea trinervia*, *Trientalis europaea*, *Senecio incanus* subsp. *incanus*). Dei 40 casi trattati, 18 *taxa* sono stenoendemici, 4 endemici, 13 a più ampia diffusione, 5 si trovano al limite del proprio areale (ROSSI, GENTILI, 2008b).

Il lavoro di gruppo, che ha coinvolto oltre 60 botanici, ha dato la possibilità di scambio di esperienze, di confronto e di ricerca di soluzioni comuni, affrontando insieme difficoltà diverse dovute alle caratteristiche morfologiche, strutturali e fisiologiche di ciascun gruppo sistematico. Inizialmente sono stati affrontati diversi problemi che hanno riguardato, in particolare, le difficoltà di poter leggere e trascrivere un linguaggio comune secondo i criteri dell'IUCN. La discussione poi si è concentrata sulle modalità di applicazione dei criteri in base ai dati tradizionalmente disponibili in Italia: dati d'erbario, letteratura e cartografia floristica, con relativi *database*, frutto dell'esplorazione del territorio, operata da numerosi botanici. I *phyla* esaminati hanno rivelato difficoltà peculiari nella valutazione dello *status* di rischio, evidenziando difficoltà maggiori per i *taxa* di piccola taglia, come le briofite o i licheni, che condividono le medesime strategie di vita, e per i funghi, "visibili" solo in certi, a volte brevi, periodi dell'anno, quando producono gli sporocarpi. La definizione dell'unità di riferimento, cioè l'individuo, risulta problematica per essi ed è complessa anche la stima dell'estensione delle dimensioni delle popolazioni, per l'ecologia particolare o per la peculiarità degli habitat.
Per ogni specie sono state esaminate le condizioni di conservazione attraverso la raccolta diretta di dati principalmente di tipo distributivo e demografico, le condizioni degli habitat e il disturbo diretto o indiretto arrecato dai vari fattori di minaccia individuati. Sulla base di queste informazioni sono stati applicati tutti i possibili criteri di valutazione IUCN, per l'attribuzione della categoria di minaccia.
Questo lavoro ha già portato alla pubblicazione del primo contributo sulla Flora minacciata in Italia secondo i nuovi criteri (ROSSI *et al.,* 2008b). Questo però ha costituito solo la fase iniziale di un progetto più ampio che porterà alla valutazione dello stato di conservazione di tutti i *taxa* (o comunque del maggior numero possibile) della flora italiana per la futura redazione di nuove Liste Rosse (ROSSI *et al.,* 2008a). A questo scopo, a partire dal 2010, sull'Informatore Botanico Italiano, rivista ufficiale della Società Botanica Italiana, sarà dedicata una rubrica alla pubblicazione delle schede di *assessment*, così da poter disporre di una *red list in progress*, aggiornata e ampliata 2 volta all'anno, sull'esempio della *IUCN Red List of Threatened Species*.

2.1. Filogenesi e inquadramento tassonomico

I rapporti filogenetici che coinvolgono i principali gruppi delle attuali piante vascolari, definiti sulla base di indizi morfologici e molecolari, sono espressi nella Fig. 2.1. È ormai comunemente accettata la divergenza ancestrale, che si verificò tra il basso e il medio Devoniano (oltre 400 milioni di anni fa), separando il clado comprendente la linea delle moderne *Lycophytes* (che costituiscono meno dell'1% delle attuali piante vascolari) dal clado delle *Euphyllophytes* che contiene tutte le rimanenti tracheofite (RAUBESON, JANSEN, 1992; KENRICK, CRANE, 1997; DOYLE, 1998; NICKRENT *et al.,* 2000; PRYER *et al.,* 2001; 2004; SMITH *et al*, 2006). Questa divergenza è caratterizzata da alcuni aspetti morfologici. Questa divergenza è caratterizzata da alcuni aspetti morfologici. Un carattere importante è rappresentato dalla presenza di sperma pluriflagellato nelle eufillofite, contrapposto allo sperma biflagellato nelle briofite e licofite, ad eccezione di *Isoëtes* e *Phylloglossum*, nei quali lo sperma pluriflagellato si è evoluto indipendentemente. Dal punto di vista molecolare, una prova convincente è data dalla presenza di un'inversione da 30 kb nel DNA plastidiale delle eufillofite (RAUBESON, JANSEN, 1992), mentre le licofite e le briofite ne sono prive (JUDD *et al.,* 2007).

Le eufillofite sono caratterizzate da eufilli o macrofilli (foglie con meristemi marginali o apicali e una lacuna fogliare associata nel cilindro centrale), ramificazioni laterali che terminano in sporangi e nelle quali si è evoluto un fusto principale e dei rami laterali (accrescimento pseudomonopodiale). Le odierne *Euphyllophytes*, a loro volta, si suddividono in due grandi cladi: le *Spermatophytes* (piante a seme), che comprendono circa 260.000 specie, e le *Monilophytes* che comprendono gli equiseti e tutte le felci eusporangiate e leptosporangiate. Questo nuovo punto di vista dei rapporti filogenetici trova solide basi nelle analisi combinate della morfologia dei geni plastidiali e nucleari (PRYER *et al.,* 2001; JUDD *et al.,* 2007).

Le monilofite sono suddivise in quattro classi, *Equisetopsida*, *Psilotopsida, Marattiopsida*, *Polypodiopsida*, che comprendono 11 ordini e 37 famiglie (SMITH *et al.,* 2006).

Il nome di "felce" o di "pteridofita" è comunemente applicato ai membri di tre classi di monilofite: *Polypodiopsida*, *Marattiopsida*, *Psilotopsida*, linee filetiche che sono di solito suddivise in due gruppi sulla base della struttura e dello sviluppo degli sporangi: felci eusporangiate e felci leptosporangiate (Tab. 2.1). La condizione eusporangiata caratterizza anche la classe *Equisetopsida*, oltre alle licofite.

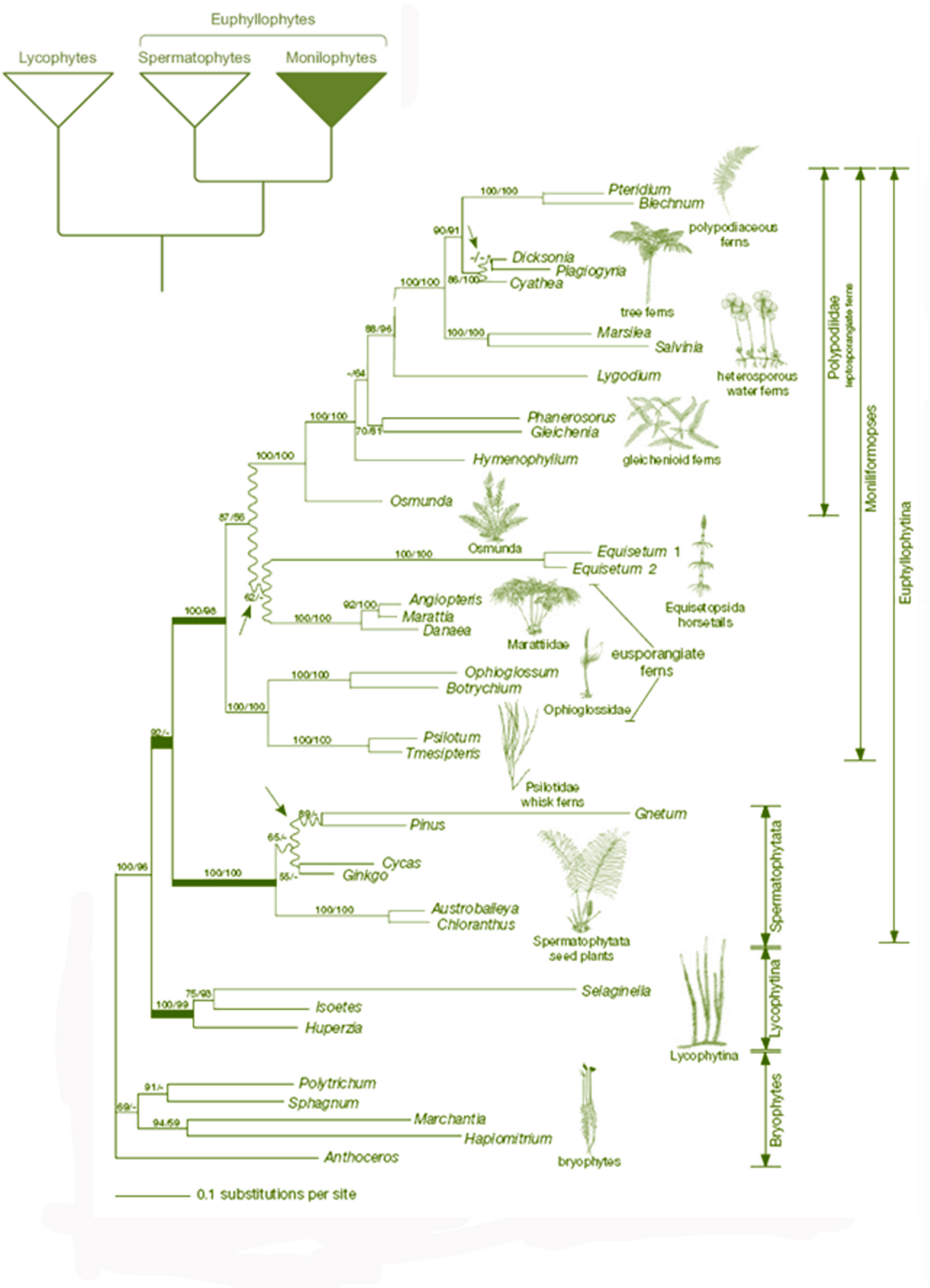


Fig. 2.1 – Rapporti filogenetici che coinvolgono i principali gruppi delle attuali piante vascolari, definiti sulla base di indizi morfologici e molecolari (PRYER *et al.,* 2001; SMITH *et al*, 2006).



EUSPORANGIO	LEPTOSPORANGIO
Relativamente grande	Relativamente piccolo
Pareti spesse, pluristratificate	Pareti sottili, monostratificate
Molte spore, da centinaia a migliaia	Poche spore, generalmente 64
Nessun meccanismo specifico di deiscenza	Deiscenza tramite *anulus*
Sessile	Peduncolato
Formatosi da diverse cellule iniziali	Formatosi da una cellula iniziale



Tab. 2.1 - Principali differenze fra eusporangi e leptosporangi. Ai due lati della tabella: foto al microscopio ottico di una sezione longitudinale di uno sporoforo di *Ophioglossum* sp. con eusporangi contenenti numerose spore (a sinistra) e di un soro di *Polystichum* sp. con indusio peltato, contenente leptosporangi peduncolati con anulus (a destra).

2.1.1. Felci eusporangiate

Marattiopsida e *Psilotopsida* sono dette "felci eusporangiate", perché hanno conservato la condizione ancestrale dello sporangio. L'eusporangio prende origine da diverse cellule iniziali e sviluppa una parete esterna spessa, di spessore variabile da due a più strati di cellule, sebbene durante lo sviluppo gli strati interni possano essere schiacciati. A maturità, è una struttura relativamente grande che produce un gran numero di spore aploidi, da centinaia a migliaia (Tab. 2.1; Fig. 2.2).

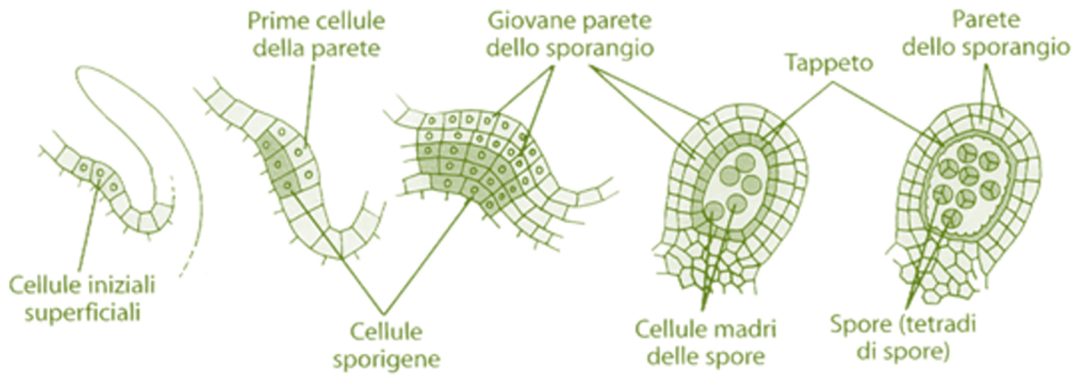


Fig. 2.2 - Sviluppo e struttura di un eusporangio: questo tipo di sporangio si origina da una serie di cellule iniziali superficiali (da RAVEN *et al.,* 2005).

Il clado delle *Psilotopsida* comprende 2 famiglie: *Psilotaceae* e *Ophioglossaceae*.

Le *Ophioglossaceae* comprendono 2 generi principali, *Ophioglossum* e *Botrychium*, per un totale di circa 90 specie. Sono piante terrestri o epifite, con fusti non ramificati, brevi, prevalentemente ipogei. Le fronde (da una a poche per fusto) sono suddivise in una porzione laminare vegetativa sterile e in una parte fertile, lo sporoforo, che porta gli sporangi non raggruppati in sori, ma separati o uniti a formare

sinangi, esposti sui rami dello sporoforo o incorporati in uno sporoforo spiciforme (Tab. 2.1): una disposizione particolare che potrebbe derivare da un sistema a ramificazione dicotomica. Dal punto di vista morfologico questa famiglia è nettamente distinta da tutte le altre monilofite, con l'eccezione delle *Psilotaceae*, con le quali condividono il gametofito tuberiforme, ipogeo e micorrizato, e proprio lo sporoforo, originatosi dalla fusione di due segmenti fogliari basali, rappresenta una probabile sinapomorfia e ne è la caratteristica più inconsueta (JUDD *et al.,* 2007).

2.1.2. Felci leptosporangiate

Le specie appartenenti alla classe *Polypodiopsida* vengono dette "leptosporangiate": un gruppo monofiletico (confermato sia da dati molecolari che morfologici) caratterizzato da una maggiore evoluzione nello sviluppo dello sporangio, che si origina da un'unica cellula ed ha la parete sporangiale costituita da un solo strato cellulare (Tab. 2.1; Fig. 2.3). I leptosporangi sono portati su un peduncolo ben distinto, di 4-6 cellule in sezione trasversale, e, nella maggior parte delle specie, contengono un numero relativamente piccolo e definito di spore aploidi (ad esempio, 16, 32, 64) che vengono espulse grazie ad un meccanismo specifico di deiscenza. Infatti, generalmente, i leptosporangi sono caratterizzati dalla presenza di un *anulus*, cioè un gruppo o una fila di cellule con pareti interne ispessite e pareti esterne sottili che, grazie a movimenti igroscopici, portano alla rottura della parete dello sporangio, proiettando le spore all'esterno (JUDD *et al.,* 2007).

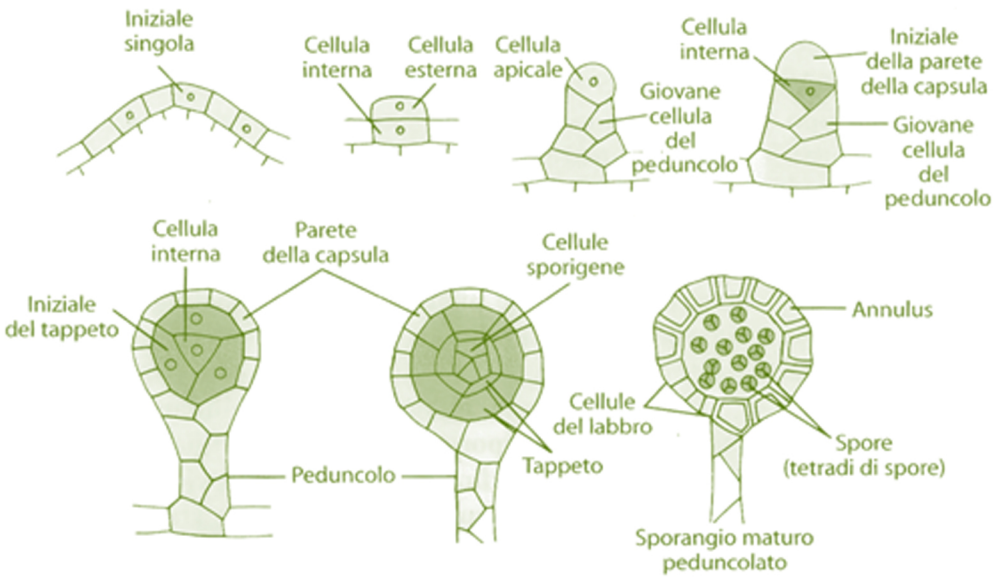


Fig. 2.3 - Sviluppo e struttura di un leptosporangio: questo tipo di sporangio si origina da una singola cellula iniziale, che produce prima un peduncolo e successivamente una capsula (da RAVEN *et al.,* 2005).

Le *Polypodiopsida* sono le monilofite più comuni infatti esistono oltre 12.000 specie viventi appartenenti a questa classe (JUDD *et al.,* 2007). Recenti studi morfologici e molecolari hanno permesso di individuare nel gruppo delle leptosporangiate alcuni cladi importanti (PRYER *et al.,* 1995; WOLF *et al.,* 1998; PRYER

et al., 2001; 2004). Secondo questi studi, le *Osmundaceae* si collocano, rispetto alle altre famiglie, come gruppo *sister* a causa dello sviluppo dello sporangio, una conclusione coerente con la lunga storia fossile della famiglia che risale al Permiano (286-245 milioni di anni fa). Gli sporangi sono portati su porzioni completamene fertili della foglia, o sulla superficie abassiale di parti di foglia relativamente non modificate, separati o in gruppi lassi, non raggruppati in sori, hanno un breve peduncolo multiseriato, un *anulus* rudimentale e contengono numerose spore clorofilliane, da più di cento a qualche migliaio ciascuno. La natura dell'*anulus* è importante per la filogenesi delle felci leptosporangiate e nelle *Osmundaceae* è semplicemente costituito da un gruppo di cellule ispessite su un lato dello sporangio (Fig. 2.4). La famiglia risulta costituita da 18 specie, ripartite nei 3 generi, *Osmunda*, *Leptopteris* e *Todea*.

Le *Polypodiaceae s.l.* sono un gruppo ampio che include almeno 11 famiglie. Contrariamente alle precedenti ipotesi che consideravano questo gruppo così differenziato come polifiletico, gli studi recenti sono orientati a riunire tutti i suoi membri in un unico clado, e la monofilia è suffragata da dati morfologici e molecolari (PRYER *et al.,* 2001; 2004; JUDD *et al.,* 2007). Le sequenze del DNA e i dai morfologici sostengono la monofilia di alcune di queste famiglie, come *Aspleniaceae* (circa 700 specie) e *Thelipteridaceae* (circa 1.000 specie), mentre *Dennstaedtiaceae* (400 specie), *Dryopteridaceae* (3.000) e *Polypodiaceae s.s.* (500) si dimostrano chiaramente para- o polifiletiche.

Questo grande gruppo presenta un'estrema variabilità nel portamento, nelle forme fogliari e nei caratteri riproduttivi, in particolare, variano molto i caratteri di sori e indusio, ma è costante la presenza negli sporangi di un *anulus* ben sviluppato, con orientamento verticale, quindi sullo stesso piano del peduncolo, in corrispondenza del quale si interrompe (Fig. 2.4).



Fig. 2.4 - Varie tipologie di sporangi con *anulus*: a) *Osmundaceae*, chiuso (a sinistra) e aperto (a destra) dove è evidente l'*anulus* rudimentale; b) *Cyatheaceae,* con *anulus* non verticale; c) *Polypodiaceae* s.l., con *anulus* con orientamento verticale (EAMES, 1936).

2.2. Distribuzione e diversità delle Pteridofite

Le Pteridofite sono un gruppo estremamente antico, un'importante componente della flora globale, infatti con circa 13.600 specie descritte (HASSLER, SWALE, 2001; MORAN, 2008) esse rappresentano il secondo gruppo di piante per consistenza numerica e il loro contributo alla biodiversità mondiale è

enorme. Distribuite in tutte le regioni climatiche, tuttavia raggiungono il massimo sviluppo, sia per le dimensioni (felci arboree) che per il numero di specie, nelle regioni tropicali (Fig. 2.5), e in particolar modo sulle isole, dove costituiscono una porzione significativa della flora vascolare (KRAMER, 1993). La loro distribuzione mostra, infatti, un *pattern* dominante, un gradiente latitudinale di diversità (Fig. 2.5): infatti, in entrambi gli emisferi, il numero di specie per unità di area aumenta di circa 30 volte procedendo dai poli fino all'equatore (MORAN, 2008). Questo gradiente è ha alcune eccezioni, principalmente nei generi piccoli: per esempio, nei generi *Phegopteris* (3 specie) e *Gymnocarpium* (8 specie), a distribuzione temperato-settentrionale, che mancano di specie tropicali. Altri generi, invece, come *Huperzia s.s.*, *Equisetum* e *Dryopteris*, hanno specie tropicali, ma mostrano un gradiente latitudinale inverso, essendo maggiormente diversificati nelle zone temperate.

La ricchezza di specie dei tropici è in forte contrasto con la diversità delle regioni temperate: solo per fare qualche esempio, alle circa 2.500 specie delle Ande, oltre 2.000 della Nuova Guinea e 1.165 della Costa Rica, si contrappongono alle 125 specie della Regione Mediterranea (PICHI SERMOLLI, 1991) o alle 72 della Penisola Scandinava (MORAN, 2008). Nell'area tropicale la diversità pteridofitica non è distribuita uniformemente, ma secondo un gradiente altitudinale, con il numero di specie che cresce passando dalle aree di pianura alle montagne, che si inverte verso il limite degli alberi oltre il quale il numero di specie diminuisce drasticamente.

Anche se questo gruppo risulta composto in gran parte da specie ad ampia distribuzione, come *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn o *Lycopodium clavatum* L., molti sono i *taxa* esclusivi di habitat specifici o a distribuzione relittuale e gli endemismi (GIVEN, 2002; PERONI, PERONI, 2004), con una percentuale che segue il *pattern* della ricchezza floristica, essendo massima alle quote medie (800-2000 m s.l.m.) delle zone montane, che offrono una maggiore eterogeneità ambientale (MORAN, 2008).

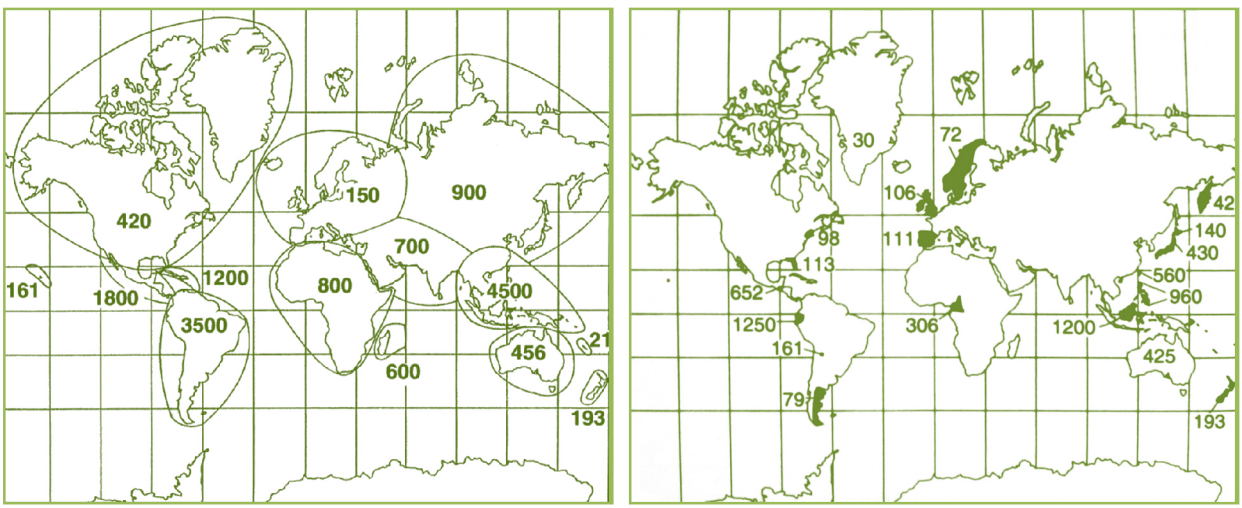


Fig. 2.5 - Distribuzione delle Pteridofite nel mondo: a sinistra, numero di specie nelle varie aree geografiche; a destra, gradiente latitudinale di diversità (MORAN, 2008)

2.3. L'emancipazione dall'ambiente acquatico: evoluzione e adattamenti

Le Pteridofite occupano una posizione intermedia fra le Briofite e le Spermatofite dal punto di vista del livello di emancipazione dall'ambiente acquatico. Infatti, mentre le Briofite hanno conquistato la terra emersa tramite il gametofito e nel far ciò sono rimaste limitate nella loro diffusione a particolari nicchie ecologiche, le Pteridofite e, soprattutto, le Spermatofite hanno svolto un ruolo dominante nella costituzione della vegetazione terrestre con l'evoluzione dello sporofito. L'evoluzione della dominanza della generazione sporofitica rispetto a quella gametofitica ha costituito un grande vantaggio evolutivo consentendo a Pteridofite e Spermatofite di conquistare l'ambiente terrestre. Infatti, anche se i protalli della maggioranza delle felci sono poco resistenti al disseccamento quanto i protonemi delle Briofite, lo sporofito adulto è in grado di regolare il suo bilancio idrico in modo autonomo (Pteridofite omeoidriche), al contrario delle Briofite, il cui bilancio idrico dipende da quello dell'ambiente e che riescono a sopportare il disseccamento. Lo sviluppo delle foglie è stato un momento cruciale nell'evoluzione delle felci e nel processo di emancipazione dagli habitat acquatici, in quanto il loro sviluppo è stato parallelo allo sviluppo di metodi e strutture per limitare la perdita d'acqua e stabilizzare il bilancio idrico. Ecco quindi che in fusti, radici e foglie si sviluppano fasci conduttori ben differenziati, costituiti da una porzione cribrosa e da una vascolare, che nel corso della filogenesi sono comparsi per la prima volta proprio nelle Pteridofite, con presenza di tracheidi come elementi per la conduzione dell'acqua e solo raramente (per es. in *Pteridium*) con trachee. La conduzione dell'acqua a distanza e, al contempo, la resistenza meccanica sono talmente incrementate dalla presenza di tracheidi lignificate che le Pteridofite sono state in grado di svilupparsi in piante terrestri in parte a portamento arboreo, ma l'accrescimento secondario in spessore per attività di un cambio è presente in modo del tutto sporadico nelle famiglie attualmente viventi, anche se caratterizzava alcuni gruppi di Pteridofite fossili (STRASBURGER, 1995). La disposizione più arcaica dei fasci conduttori (*aplostele* o *protostele*) si trova nelle *Psilotopsida* (ma anche in alcune Monilofite). Un'organizzazione tanto semplice dei tessuti conduttori poteva essere sufficiente per far quadrare il bilancio idrico di queste piante primitive prive di foglie e di vere radici, ma la limitata capacità di trasporto di soluzioni ne limitava la vita ad ambienti molto umidi. Al contrario, i fusti dotati di *aplomeristele*, *sifono-eustele* (nelle *Osmundaceae*) o *eustele* (nelle *Ophioglossaceae*) sono diffusi nella maggior parte delle Monilofite viventi con foglie anche molto grandi, consentendone la vita anche in ambienti con meno disponibilità di acqua.

La fase gametofitica risulta quella critica, per cui le Pteridofite rimangono dipendenti dalla presenza dell'acqua (nei gametofiti non sono presenti tracheidi), soprattutto per la fecondazione, perché i gameti maschili sono mobili, flagellati ed hanno bisogno di un mezzo liquido per raggiungere gli archegoni. Ma anche i gametofiti hanno subito un'evoluzione che ha portato a vari adattamenti ecologici: esistono, infatti, varie tipologie di gametofito (Fig. 2.12). I gametofiti cordati sono annuali e a crescita rapida, ben

adattati ad ambienti più o meno disturbati dove le condizioni ambientali idonee hanno una durata breve, anche a causa dell'andamento stagionale. I gametofiti perenni nastriformi hanno una crescita molto più lenta e sono ben adattati ad ambienti stabili dove è sempre presente una copertura vegetale. La loro continua crescita e ramificazione consente di esplorare il territorio alla ricerca di un microsito idoneo per la crescita degli sporofiti e di riuscire a competere, quindi, con le Briofite presenti. La gemmazione in gametofiti di questo tipo, sembra aumentare la loro capacità di esplorazione dell'habitat. Inoltre, proprio la longevità indefinita dei protalli perenni è particolarmente importante per la colonizzazione di nuovi habitat, specialmente per le specie ad esoincrocio obbligato (caratteristica che tende a limitarne enormemente la capacità di dispersione a lunga distanza), consentendo la fecondazione incrociata fra gametofiti sviluppatisi in periodi di tempo diversi (FARRAR *et al.,* 2008).

Analogamente alle Briofite, preferiscono comunque gli habitat umidi, ma parecchie specie peciloidriche di *Selaginella* (*Lycophytes*) e, fra le *Polypodiopsida*, per es. di *Ceterach*, *Notholaena* e *Cheilanthes*, possono vivere anche in ambienti più aridi. Infatti, le loro fronde sempreverdi possono riprendere la loro attività vitale tramite idratazione anche dopo periodi di completa siccità atmosferica e dopo più mesi di disseccamento. Esistono inoltre, fra le *Polypodiopsida*, specie xerofile (anche se in numero relativamente basso), protette dal disseccamento da rivestimenti cerosi, da scaglie e peli (per esempio, nel genere *Cosentinia*), da succulenza del fusto (in *Davallia)* o delle foglie (per es. certe specie del genere *Polypodium*). Inoltre, molte Pteridofite dell'ambiente mediterraneo sono decidue a fogliazione invernale, un adattamento per superare la stagione avversa, l'estate, caratterizzata da forte aridità, e, analogamente, molte specie delle zone temperate e fredde hanno fogliazione estiva per superare la stagione più fredda.

Le Pteridofite possono vivere, quindi, in un ampio spettro di ambienti, dalle aree sub-artiche a quelle equatoriali, mostrando una grande varietà di adattamenti: si passa dalle grandi felci arboree alle specie epifite, rampicanti o alle piccole specie reptanti, dalle specie adattate all'aridità alle specie acquatiche natanti. Infatti, hanno assunto caratteristiche morfologiche e fisiologiche opportune in adattamento alle diverse condizioni della vita terrestre e manifestano le stesse forme biologiche delle Spermatofite: per es., camefite con protalli in parte micotrofi (*Lycopodium*) ed in parte non autonomi (*Selaginella*), emicriptofite con protalli autotrofi a vita breve (per es. *Dryopteris*), geofite con protalli micotrofi (per es. *Ophioglossum*) o autotrofi (per es. *Pteridium*, *Equisetum*), terofite (per es. *Anogramma*) e idrofite (per es. *Salvinia* ed *Azolla*). Le Pteridofite hanno raggiunto nei diversi gruppi tassonomici, in parte già nel Devoniano e nel Carbonifero, la forma arborea grazie al rinforzamento degli assi (solo in parte tramite accrescimento secondario in spessore) ed alla formazione effettiva dei tessuti conduttori. Alle fanerofite appartengono anche specie epifite (*Platycerium* e *Drynaria*) e rampicanti, particolarmente sviluppate nelle regioni tropicali: per es. le *Gliecheniaceae* tropicali (liane con fusti sarmentosi provvisti di organi di

sostegno), specie dei generi *Lygodium* e *Salpichlaena*, sempre con rachide volubile lungo fino a 15 m, ma anche singole specie del genere *Polypodium*, come liane radicanti sui fusti degli alberi nelle regioni tropicali (STRASBURGER, 1995).

Le Pteridofite entrano in competizione soprattutto con individui appartenenti alla stessa forma biologica: felci arboree per es. con gimnosperme, palme o dicotiledoni arboree; gametofiti e *Hymenophyllaceae* con briofite e licheni; gli equiseti con *Juncaceae* e *Cyperaceae*; felci natanti come *Salvinia* o Azolla, con le *Lemnaceae*, ecc. In questa concorrenza, alcune Pteridofite sono molto forti ed in condizioni idonee si presentano in quantità tale da formare comunità vegetali caratteristiche, come per es. *Pteridium aquilinum* ai margini del boschi oppure *Equisetum fluviatile* nella fascia di interramento dei laghi (STRASBURGER, 1995).

2.4. Ciclo riproduttivo

Le Pteridofite sono crittogame vascolari caratterizzate da un'alternanza di generazione: un ciclo metagenetico aplodiplofasico eteromorfo con dominanza della generazione diploide, lo sporofito.

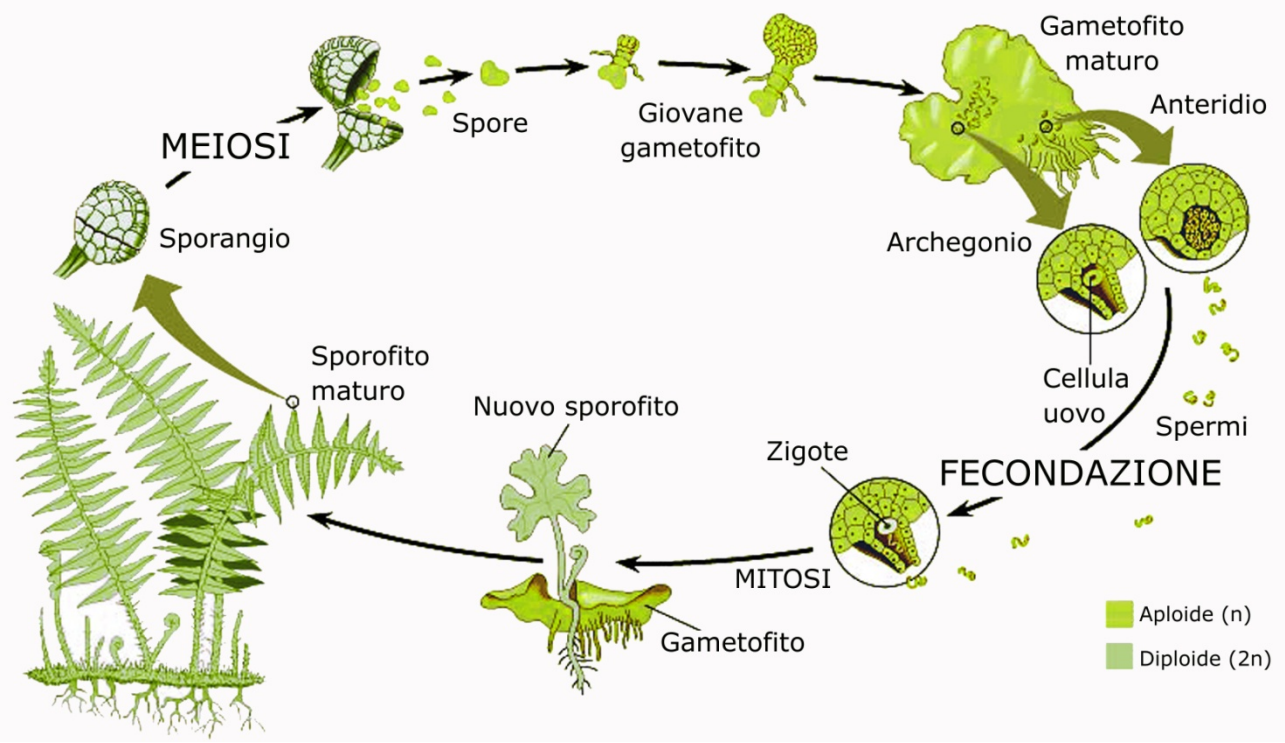


Fig. 2.6 – Ciclo vitale di una felce leptosporangiata

2.4.1. Lo sporofito

Nelle Pteridofite attuali, lo sporofito è un vero e proprio cormo, costituito da radici, fusto e foglie e questi tre organi fondamentali crescono ad opera di cellule apicali.

Il fusto (spesso ipogeo) ha una ramificazione dicotomica o laterale (però mai all'ascella delle fronde) ed è ricco di fronde. L'epidermide delle parti epigee è solitamente provvista di cuticola (premessa importante per la vita terrestre ad una certa altezza dal suolo) e aperture stomatiche, anche se le cellule epidermiche contengono, in genere, ancora cloroplasti.

Le fronde delle Pteridofite, almeno quelle più evolute, hanno una struttura anatomica molto simile a quella delle foglie delle angiosperme, con due strati di epidermide ed un mesofillo clorofilliano all'interno, differenziato in tessuto a palizzata e tessuto spugnoso; possono avere solo la funzione vegetativa di organo fotosintetizzante (trofofillo), soltanto la funzione riproduttiva (sporofillo) o entrambe. Il peduncolo si prolunga in un rachide su cui sono attaccate pinne e pinnule. Le giovani fronde si sviluppano con vernazione conduplicata nelle *Ophioglossaceae* e con vernazione circinnata nella maggior parte delle altre felci, cioè la foglia assume, all'inizio del suo sviluppo e durante la sua distensione, la forma di un pastorale proteggendo il delicato tessuto meristematico fino al suo completo sviluppo. Contrariamente alle Spermatofite, nelle Pteridofite sono presenti due tipologie di foglia, che hanno avuto probabilmente origine diversa: micro- e macrofille. Le microfille presenti nelle *Psilotopsida*, nelle *Lycopodiopsida* e nelle *Equisetopsida*, oltre che in molte altre Pteridofite conosciute allo stato fossile, hanno forma aciculare-squamiforme e presentano una o al massimo due nervature (a volte nessuna). Nelle monilofite, invece, le foglie hanno subito un'evoluzione notevole fino a dare origine, nelle specie attuali, alle macrofille, con una grande varietà di forme e nervature ramificate che formano una lacuna fogliare nel punto in cui si distaccano dai tessuti vascolari del fusto.

La presenza di radici è caratteristica nella maggioranza delle Pteridofite e assicura un sufficiente rifornimento d'acqua che permette la formazione di ampie foglie adibite all'assimilazione. Nelle *Psilotopsida* non esistevano radici, ma già nelle prime licofite queste sono ben differenziate e si sviluppano mediante una cellula apicale che cresce e si divide dicotomicamente. La struttura della stele radicale nella maggior parte delle felci è del tipo actinostele, come nelle Spermatofite. Mentre nelle spermatofite la radice primaria si sviluppa dal "polo radicale", cioè dall'estremità dell'asse della plantula opposta al "polo del germoglio", nelle Pteridofite la vera radice ha un'origine endogena al germoglio, lateralmente all'asse; tale radichetta muore subito dopo e si formano numerose altre radici laterali di origine caulinare (omorrizia primaria). La plantula delle Pteridofite non ha quindi una struttura bipolare come quella delle spermatofite, ma unipolare.

Gli sporangi vengono prodotti sulle fronde, posti sulla superficie abassiale di foglie normali, oppure in porzioni fogliari specializzate o in foglie fertili completamente distinte, solo raramente si presentano sparsi oppure riuniti in sporocarpi. Il valore sistematico e filogenetico degli sporangi è notevole. Nelle Monilofite si passa da forme con sporangi isolati, situati alle estremità delle ramificazioni, a sporangi, sempre isolati, disposti lungo il margine dei macrofilli (Fig. 2.7). Solo in seguito gli sporangi si riuniscono

in gruppi (sori) e cambiano posizione spostandosi sulla pagina inferiore della foglia dapprima in prossimità del suo margine, che spesso è ripiegato per proteggerli, e, in seguito, più ventralmente (Fig. 2.7). Sempre nelle Monilofite si nota il passaggio da forme con gli sporangi privi di protezione, a forme più evolute, nelle quali si differenzia una membrana (indusio) che protegge i sori, a forme ancora più evolute nelle quali la protezione delle spore è ulteriormente accresciuta in seguito al ripiegamento della stessa foglia che porta gli sporangi, con la formazione di strutture paragonabili ad un frutto primordiale, per esempio gli sporocarpi delle felci acquatiche eterosporee.

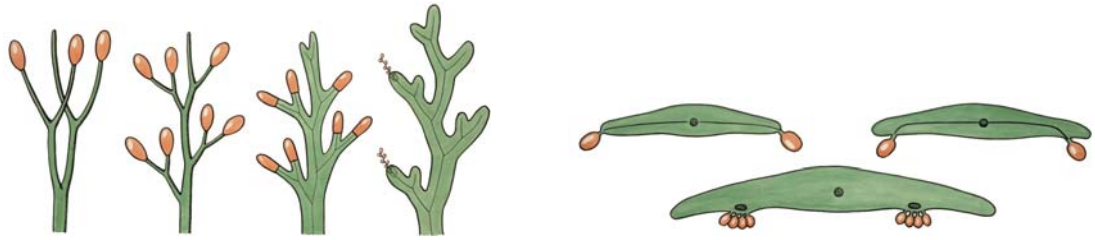


Fig. 2.7 - Evoluzione degli sporangi nella Monilofite (EAMES, 1936)

Gli sporangi racchiudono l'archeosporio con il tessuto sporigeno le cui cellule si arrotolano, si distanziano e costituiscono le cellule madri delle spore (in genere 16), ognuna delle quali origina per meiosi 4 meiospore aploidi, spesso disposte a tetraedro. Nell'ambito del tessuto sporigeno si trovano cellule addossate alla parete dello sporangio, spesso in parecchi strati, che forniscono il nutrimento alle spore e nel loro insieme costituiscono il tappeto. Le cellule di un tappeto di secrezione secernono il loro contenuto attraverso le pareti. Nel tappeto plasmodiale le pareti cellulari si disgregano e vengono liberati i protoplasti che si riuniscono per formare il periplasmodio. Questo migra poi tra le giovani spore e al momento della formazione delle tetradi nutre le giovani spore, partecipa alla formazione delle pareti (perisporio o perina) ed in tal modo viene consumato (RAGHAVAN, 1989).

La maggioranza delle Pteridofite (soprattutto quelle più primitive) è isosporea, cioè tutte le spore nell'ambito di una specie sono della stessa natura e alla germinazione originano un protallo sul quale si formano, in genere, sia anteridi che archegoni. Nei casi più evoluti, i gametofiti però possono anche essere dioici. Questa separazione dei sessi ha portato in alcuni gruppi di Pteridofite come nelle felci acquatiche eterosporee, alla differenziazione di due forme diverse di meiospore: megaspore (o macrospore) ricche di sostanze di riserva, formate in megasporangi (o macrosporangi), che alla germinazione producono protalli femminili relativamente grandi, e microspore prodotte in microsporangi formanti protalli maschili più piccoli (STRASBURGER, 1995).

2.4.2. La spora

La superficie esterna della spora può essere suddivisa in diversi strati. Il più esterno, non sempre presente, è indicato con il termine di perina (perisporio od episporio) (FERRARINI *et al.,* 1986;

RAGHAVAN, 1989). Al di sotto della perina è localizzato un secondo strato l'esina. Questi due strati a volte non sono distinguibili l'uno dall'altro, mentre in alcuni casi non è possibile accertare la presenza della perina. L'esina è ulteriormente suddivisa in sexina, lo strato più esterno sculturato, e nexina, lo strato più interno (FERRARINI *et al.,* 1986). La formazione di queste strutture coinvolge la migrazione di molecole precursore dalle cellule del periplasmodio verso la superficie esterna della spora in maturazione. Sembra che la perina si accresca attraverso continue deposizioni di goccioline di sporopollenina che dal tappeto vanno a costituire lo strato più esterno della parete della spora (RAGHAVAN, 1989). Prima di essere rilasciate dallo sporangio, le spore devono andare incontro ad una serie di cambiamenti citologici e biochimici che sono necessari per la maturazione e per la successiva germinazione e quelle rilasciate prima che si verifichino queste trasformazioni non hanno potere germinativo. I cambiamenti citologici che si verificano consistono nella sintesi e nel riarrangiamento degli organelli all'interno del citoplasma. Le nuove spore sono caratterizzate dall'avere un citoplasma nel quale sono sospesi un nucleo (in posizione centrale) e vacuoli contenenti lipidi, amiloplasti e mitocondri. Spesso la loro liberazione all'interno della cavità dello sporangio è accompagnata dalla formazione di un grosso vacuolo che, oltre ad aumentare le dimensioni della spora, offre uno spazio per la conservazione di sostanze di riserva.

Durante le fasi di maturazione il nucleo assume diverse posizioni all'interno della spora. In un primo momento è localizzato in corrispondenza dell'equatore mentre successivamente migra verso il polo prossimale. A questo stadio di sviluppo la spora presenta proplastidi che circondano il nucleo, come piccoli granuli nel citoplasma; questi seguono una polarità caratteristica e si irradiano verso le altre parti della spora. La sequenza di questi eventi culmina con la formazione di una spora dotata di un numero cospicuo di cloroplasti che circondano il nucleo, tornato in posizione centrale durante la fase finale dello sviluppo. A livello biochimico la maturazione delle spore è probabilmente dovuta alla sintesi endogena di un gran numero di molecole i cui precursori provengono dalla disgregazione delle cellule del tappeto plasmodiale e dagli elementi citoplasmatici delle cellule della parete dello sporangio. La fase di sporogenesi nelle felci può essere dichiarata conclusa con la maturazione delle spore, momento in cui queste sono dotate di tutte le informazioni necessarie per le successive fasi di germinazione e formazione del gametofito (DYER , 1979a; RAGHAVAN, 1989).

La cellula madre delle spore, dividendosi, può dare origine a due diversi tipi di tetrade, tetraedrale o tetragonale, e, quindi, a due diverse tipologie di spore, monolete e trilete (Fig. 2.8). Quando la tetrade ha una disposizione tetragonale, le spore risultano disposte attorno ad una linea centrale, a 90° le une dalle altre, quindi a contatto con due delle altre spore: sono spore a simmetria bilaterale dette monolete, perché la cicatrice tetradica (o lesura) è unica, semplice e indivisa. Quando invece la tetrade ha una disposizione tetraedrale, abbiamo quattro spore a simmetria raggiata, convergenti verso un

centro puntiforme (il polo prossimale), a 120° le une dalle altre, con tre aree di contatto: vengono dette trilete, perchè la lesura è triradiata, cioè divisa in tre raggi detti bracci. Proprio il tipo trilete è il più antico e, infatti, lo troviamo in tutte le licofite, mentre fra le monilofite è più diffuso il tipo monolete.

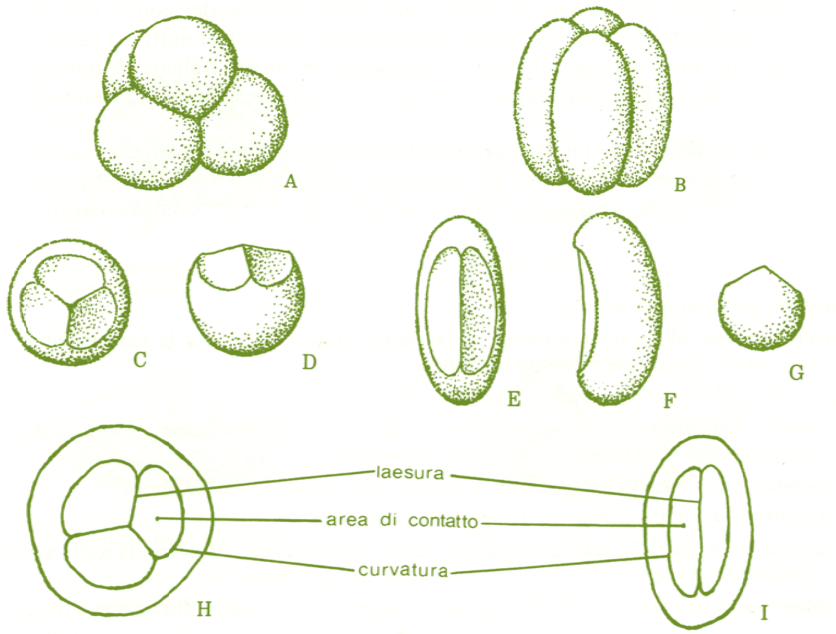


Fig. 2.8 - Tipologie di spore. A) Tetrade tetraedrale; B) Tetrade tetragonale; C) Spora trilete in vista prossimale e D) in vista laterale; E) Spora monolete in vista prossimale, F) in vista laterale e G) in vista laterale trasversa; H) Lesura triradiata, area di contatto e curvatura in una spora trilete; I) Lesura indivisa, area di contatto e curvatura in una spora monolete (FERRARINI *et al.,* 1986).

Nella maggior parte delle felci le spore possono essere resistenti anche a condizioni ambientali estreme, persistendo in uno stato di quiescenza, vitali ma metabolicamente non attive per lunghi periodi di tempo. Esiste però un gruppo di specie appartenenti alle famiglie *Equisetaceae*, *Osmundaceae*, *Gleichenaceae*, *Grammitidaceae* e *Hymenophyllaceae* caratterizzate dalla produzione di spore clorofilliane, che perdono la loro vitalità entro pochi giorni (in media 48) dalla dispersione (LLOYD, KLEKOWSKI, 1970; PAGE, 1979; WHITTIER, 1996; LEBKUECHER, 1997). Dotate di pigmenti fotosinteticamente attivi, le spore verdi tendono a germinare più rapidamente di quelle senza clorofilla (mediamente 1-2 giorni dopo la semina, contro i 9-10 richiesti per le altre), passando alla fase di crescita con relativa facilità quando si trovano in condizioni idonee, mentre nelle spore non clorofilliane è indispensabile l'idrolisi delle sostanze di riserva per ottenere l'energia necessaria per la germinazione (OKADA, 1929; LLOYD, KLEKOWSKI, 1970; RAGHAVAN, 1989). Le spore clorofilliane hanno un maggior contenuto in acqua (fino a circa il 50% negli equiseti) e la disidratazione influisce negativamente sulla loro longevità (OKADA, 1929; RAGHAVAN, 1989), infatti fra queste solo le spore di *Onoclea*, *Onocleopsis* e *Matteuccia*, uniche dotate di perina che ne regolarizza e limita la perdita d'acqua, sono in grado di conservare la vitalità per un tempo più lungo (LLOYD, KLEKOWSKI, 1970; RAGHAVAN, 1989). Anche le

altre possono essere tenute in uno stato vitale per lunghi periodi conservandole però sotto condizioni che ne minimizzino la disidratazione, come a basse temperature (STOKEY, 1951; von ADERKAS, CUTTER, 1983).

Le specie con spore clorofilliane hanno in comune habitat igro-mesofili, dalle foreste pluviali agli ambienti acquatici, ambienti dove è probabile che le spore verdi con la loro germinazione rapida si siano evolute in risposta alla competizione con le briofite. Sembra ragionevole che la presenza di spore clorofilliane sia la condizione primitiva nelle *Equisetaceae* ed *Osmundaceae* (e probabilmente, nelle *Grammitidaceae* e *Hymenophyllaceae*) e che si sia mantenuta in queste famiglie perché nei loro habitat le spore possono trovare le condizioni idonee per la germinazione durante la maggior parte dell'anno, mancano quindi quelle pressioni selettive che hanno portato negli altri gruppi di Pteridofite all'evoluzione di meccanismi di dormienza. Invece, nelle famiglie dove le spore verdi sono presenti solo in pochissime specie, lo stato clorofilliano può essere una condizione derivata. In questo caso, la capacità di rimanere in uno stato metabolicamente attivo può essere stata selezionata positivamente rispetto al dispendio energetico necessario per cadere in dormienza (LLOYD, KLEKOWSKI, 1970).

2.4.3. Il processo di germinazione

La germinazione delle spore nelle felci omosporee, stimolata, generalmente, dall'esposizione alla luce rossa, inizia con una divisione asimmetrica della spora stessa (Fig. 2.9). Questa divisione non è altro che la fase finale di un ciclo cellulare il cui prodotto è la formazione di due cellule figlie a partire da una cellula madre. Queste due cellule successivamente andranno incontro a un processo di differenziazione. Una prima cellula incolore, di dimensioni ridotte e forma allungata darà origine ad una sorta di rizoide iniziale il cui ruolo è l'ancoraggio al substrato e l'assorbimento. Una seconda cellula (protonema iniziale) di dimensioni maggiori, dotata di cloroplasti, rappresenta il precursore del futuro gametofito. Il primo segno visibile dell'avvenuta germinazione è l'allungamento del rizoide iniziale, con la conseguente rottura della parete cellulare e la fuoriuscita dello stesso (RAGHAVAN, 1989; 1992).

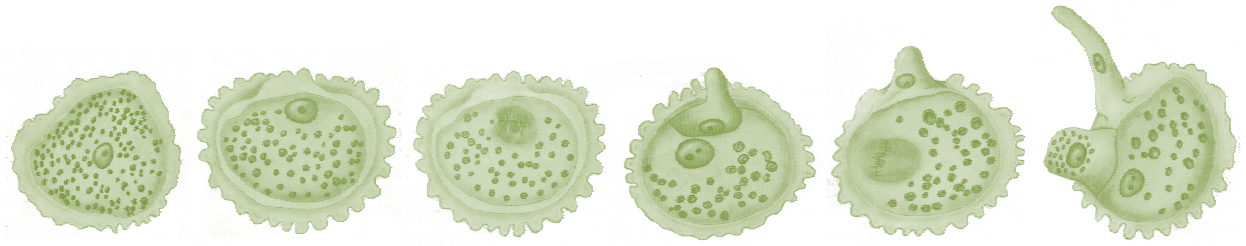


Fig. 2.9 – Fasi della germinazione di una spora (RAGHAVAN, 1992).

2.4.4. Il gametofito

In tutte le felci omosporee, eccetto *Marattiaceae* e *Osmundaceae*, il protonema iniziale genera un filamento allungato costituito da un numero variabile di cellule clorofilliane (fase lineare). Questo ha

origine da una serie di divisioni cellulari che si realizzano secondo piani perpendicolari rispetto al piano di sviluppo del filamento e paralleli tra una cellula e l'altra. Quando il filamento ha raggiunto una data lunghezza le cellule terminali iniziano a dividersi secondo piani obliqui rispetto all'asse di sviluppo determinando un accrescimento del gametofito in due diverse direzioni (fase laminare) (Fig. 2.11). Raramente, come nelle specie del genere *Schizaea* e *Trichomanes*, accade che durante le fasi di sviluppo del gametofito non ci siano variazioni nell'orientamento dei piani di divisione (Fig. 2.10). Queste specie, quindi, sono caratterizzate dall'avere un protonema filamentoso, come pure un gametofito filamentoso, mentre, invece, nella maggior parte delle felci omosporee il protonema filamentoso rappresenta soltanto una fase transitoria dello sviluppo del gametofito che, una volta raggiunta la fase laminare, può assumere forme diverse, strettamente legate alla specie (Fig. 2.12). Nella maggior parte delle specie è cordato-cuoriforme, con uno spessore di una cellula soltanto (tranne la zona meristematica nel seno apicale), in altre è più spesso e massiccio e può essere nastriforme, oppure tuberoso come nelle *Psilotopsida* (ATKINSON, 1973; RAGHAVAN, 1989).

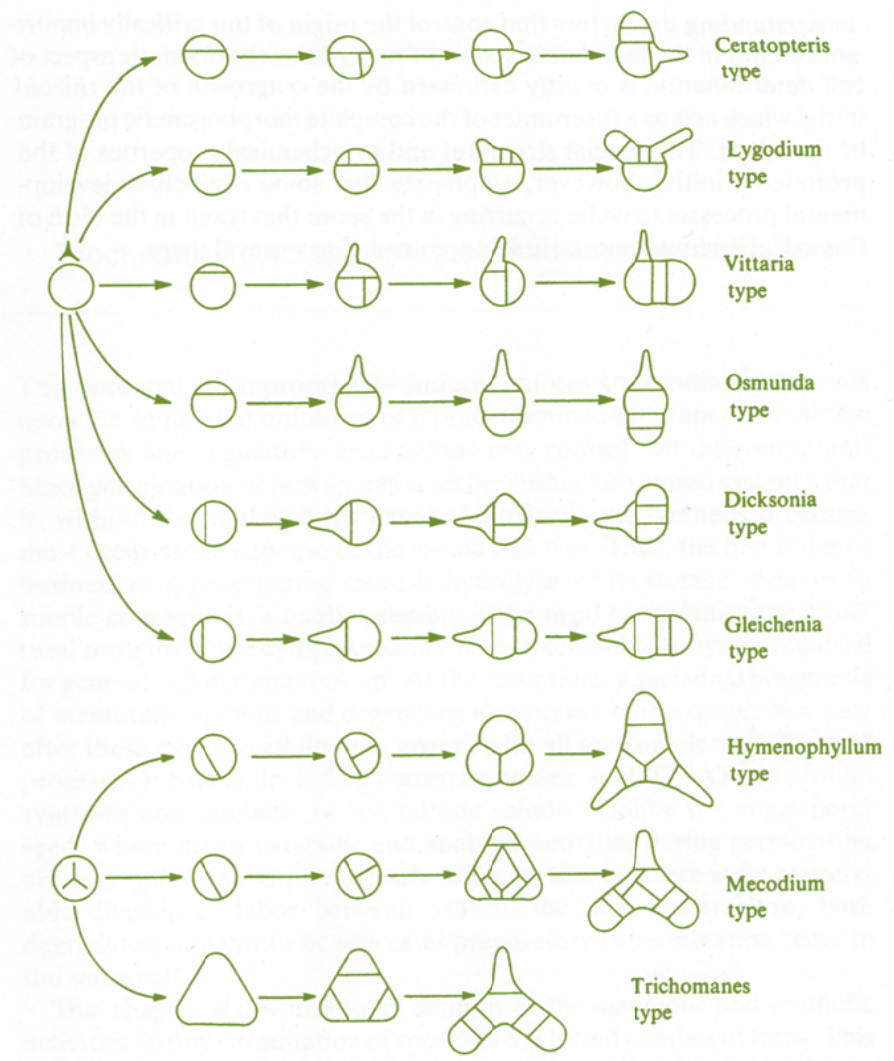


Fig. 2.10 - Diagramma che illustra i diversi schemi di germinazione delle spore nelle felci omosporee. (RAGHAVAN, 1989).

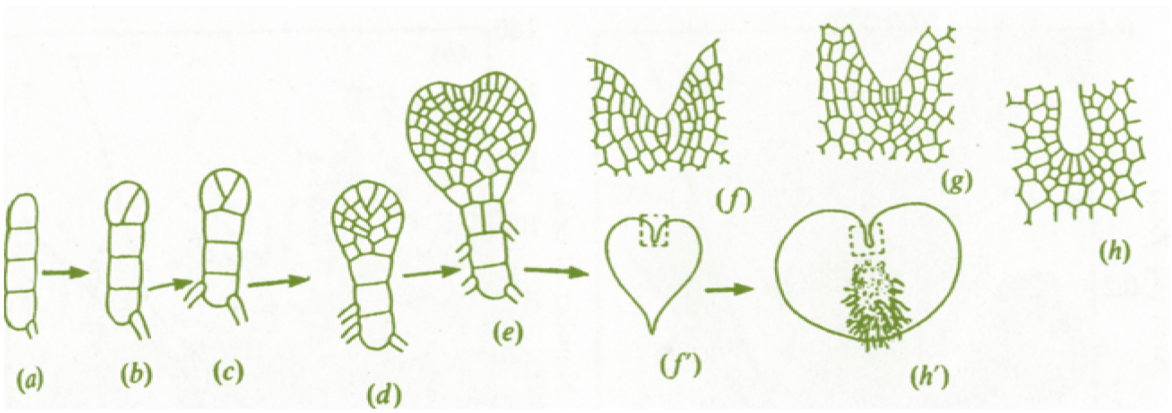


Fig. 2.11 - Rappresentazione schematica dello sviluppo di un gametofito *Adiantum type*. a) filamento germinale o protonema; b) prima divisione longitudinale della cellula terminale del protonema; c) inizio della fase laminare con la formazione di una seconda parete obliqua rispetto alla prima; d) prima fase laminare; e) protallo cordato; f) vista ingrandita del meristema marginale presente nell'insenatura del protallo cuoriforme (f'); g) formazione del meristema pluricellulare; h) insenatura apicale del protallo cuoriforme maturo (h') (RAGHAVAN, 1989).

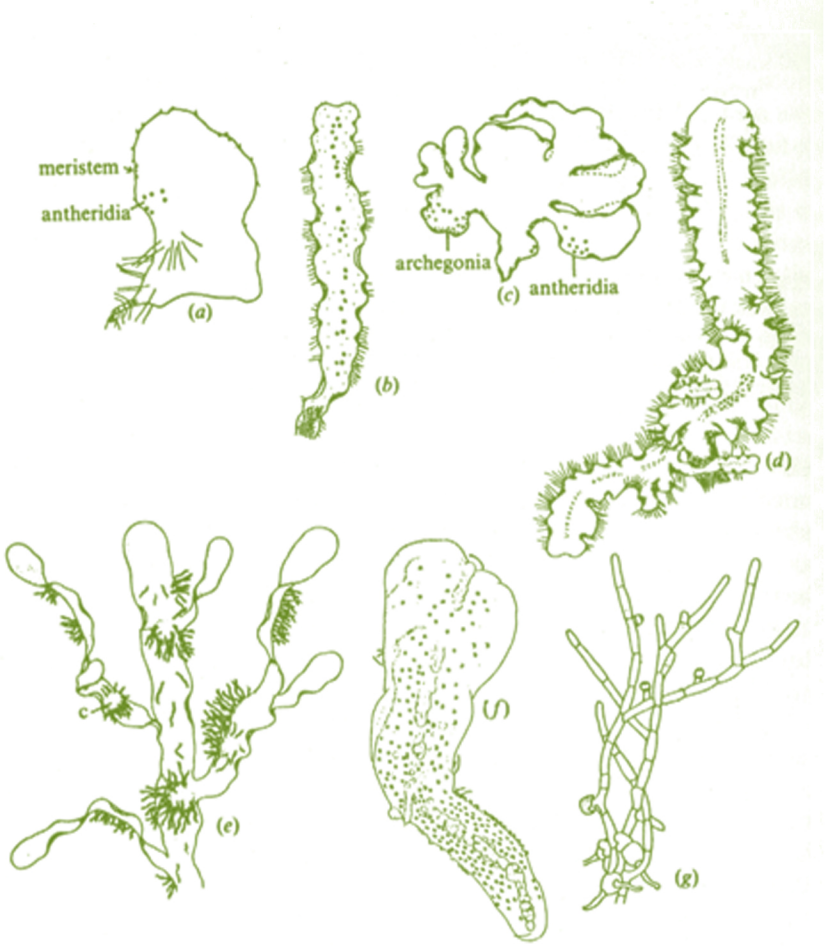


Fig. 2.12 - Variabilità morfologica nei gametofiti delle felci omosporee. a) protallo asimmetrico di *Anemia rotundifolia*; b) protallo cordato-elongato di *Elaphoglossum villosum*; c) protallo cordato-ramificato di *Vittaria elongata*; d) protallo labelliforme di *Rhipidopteris peltata*; e) protallo nastriforme di *Paraleptochilus decurrens*; f) protallo tuberoso di *Botrychium virginianum*; g) protallo filamentoso di *Schizaea pusilla* (RAGHAVAN, 1989).

Lo sviluppo ulteriore del gametofito coincide con la formazione, sulla superficie inferiore, delle strutture riproduttive, anteridi e archegoni; si parla di formazione endogena perché sono già inclusi nel tessuto

del gametofito dagli stadi di sviluppo giovanili. Anteridi e archegoni sono piccoli e costituiti da poche cellule, spesso di struttura più semplice rispetto a quelli grandi e pluricellulari delle Briofite, che sono da considerarsi più primitivi (RAGHAVAN, 1989; STRASBURGER, 1995). Gli anteridi sono più numerosi sulla regione basale del protallo, sparsi fra i rizoidi,e gli archegoni sono localizzati principalmente nell'area immediatamente sottostante il seno apicale (Fig. 2.13).

Nella maggior parte delle felci i gametofiti presentano entrambi gli organi, ma la maturazione avviene in tempi diversi, favorendo così la fecondazione incrociata. Alcune specie, invece, producono gametofiti unisessuali, poiché il primo gametofito che sviluppa archegoni rilascia anteridiogeni per stimolare i gametofiti più giovani a produrre solo anteridi. Può venire fecondata più di una oosfera sullo stesso protallo, ma di norma solo uno degli zigoti si sviluppa in un nuovo sporofito indipendente. L'anteridio maturo è cupoliforme e contiene una guaina di 3 cellule, due delle quali sono toroidali e circondano una cavità contenente numerosi spermatozoidi mobili, avvolti a spirale e pluriflagellati, mentre la terza, la cellula opercolare, ne costituisce un coperchio (Fig. 2.13). L'archegonio è ampollato, costituito da una porzione basale ingrossata, sepolta nel tessuto del gametofito (che è più spesso in quell'area), contenente un'unica grande oosfera e la cellula del canale del ventre alla base del collo che sporge dalla superficie (Fig. 2.13).

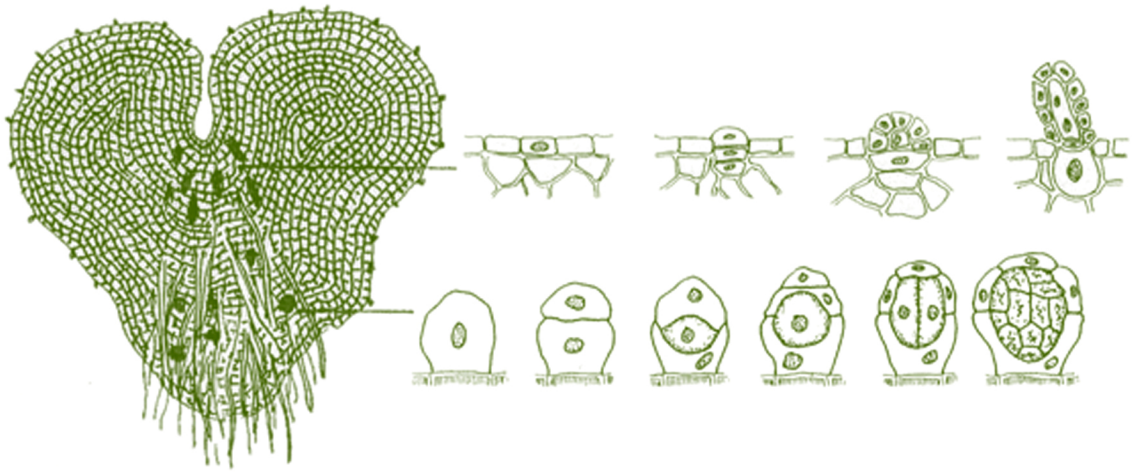


Fig. 2.13 - Stadi dello sviluppo di un archegonio (in alto) e di un anteridio (in basso)(SALVO TIERRA, 1990).

La fecondazione è possibile soltanto in presenza di acqua, quindi con i protalli bagnati. Nell'anteridio, una volta maturo e imbibito di acqua, la cellula opercolare si inclina verso l'alto o si stacca, liberando così gli spermatozoidi (Fig. 2.14). La stessa acqua idrata l'archegonio, liberando il contenuto del canale del collo, cioè l'acido malico che attrae gli spermatozoidi verso la bocca dell'archegonio e attraverso il canale del collo verso l'ovulo. La produzione di spermatozoidi flagellati e la necessità di acqua nella fecondazione sono caratteri antichi che le felci hanno conservato dal loro passato evolutivo.



Fig. 2.14 - Fasi della fecondazione: in presenza di acqua l'anteridio (M), una volta maturo e imbibito, libera gli spermatozoidi. La stessa acqua idrata l'archegonio (F), liberando il contenuto del canale del collo (acido malico) che attrae gli spermatozoidi verso l'ovulo. Dopo la fecondazione si forma uno zigote (Z) (SALVO TIERRA, 1990).

Dopo la fecondazione, all'interno dell'archegonio si sviluppa lo zigote che darà origine alla generazione diploide, lo sporofito (Fig. 2.15). La posizione dell'embrione è per lo più endoscopica (apice del germoglio non rivolto verso il collo dell'archegonio; *Leptosporangiatae*, anche *Lycopodium*, *Selaginella*), più raramente esoscopica (*Eusporangiatae* con eccezione delle *Marattiales*; inoltre *Psilotum*, *Equisetum*, *Isoetes*) (STRASBURGER, 1995).

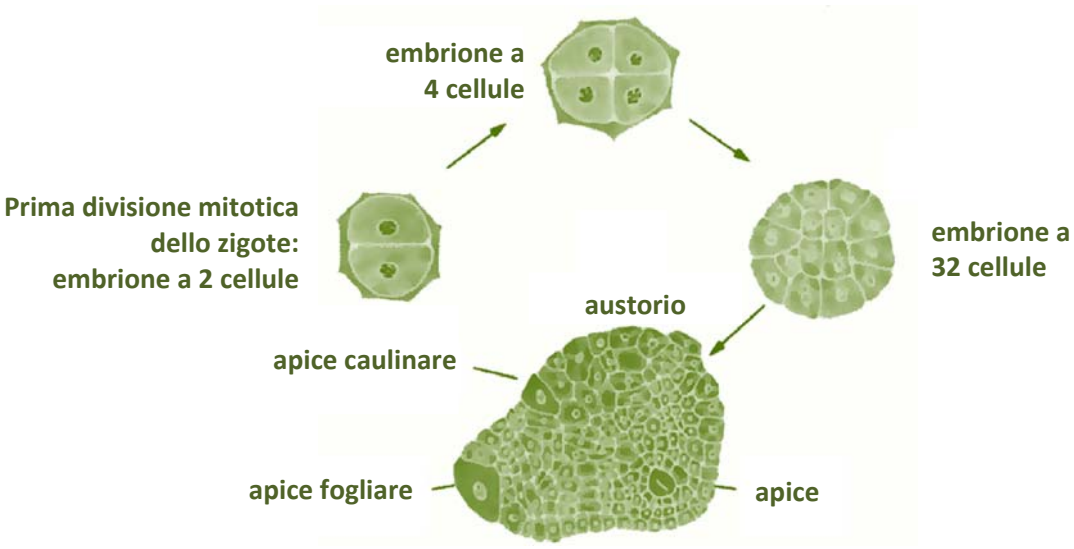


Fig. 2.15 - Stadi di sviluppo della crescita dell'embrione, dalla prima divisione mitotica dello zigote alla differenziazione dell'apice fogliare, radicale e caulinare prima dell'emergenza dall'archegonio.

Nelle Pteridofite attuali, la prima divisione cellulare della oosfera fecondata, avviene in senso trasversale, parallelamente alla lamina del gametofito. Di queste due cellule, la più bassa è detta ipobasale, l'altra epibasale (da ricordare che il collo dell'archegonio è rivolto verso il basso). Dalla cellula ipobasale si forma un austorio (piede) che si accresce tra le cellule del gametofito, da cui si procura il nutrimento e anche la prima radice. La cellula epibasale dà origine all'apice vegetativo, cioè a un fusticino minuto e alla prima foglia (detta cotiledone). La prima foglia e la radice primaria emergono presto dall'archegonio, quindi verso il basso, seguite dall'apice del germoglio. La prima foglia si accresce verso l'alto attraverso il seno apicale del gametofito ed ha tipicamente forma diversa dalle foglie adulte

e vita breve, seguita da una serie di foglie di grandezza e complessità crescente, finché non viene raggiunta la forma adulta. La radice primaria continua ad accrescersi verso il basso, penetrando nel terreno, ma viene presto sostituita da radici avventizie che si originano dal fusto. Il giovane sporofito, così come l'embrione, vive a spese del gametofito, in certo senso parassitandolo, e si rende indipendente dal punto di vista trofico solo quando emette le vere radici. Nella maggior parte delle specie il protallo muore presto, anche se può sopravvivere per un anno se non avviene la fecondazione, mentre sono note alcune specie con gametofiti perenni che si propagano vegetativamente e prive di fase sporofitica RAY *et al.,* 1985).

2.4.5. Il ciclo riproduttivo delle *Ophioglossaceae*

Le *Ophioglossaceae* producono migliaia di spore (WAGNER, 1998), con una capacità di dispersione anemofila di circa 1-3 m (PECK *et al.,* 1990; HOEFFERLE, 1999) che si riduce tipicamente a pochi centimetri quando l'altezza raggiunto dallo sporoforo non supera lo strato erbaceo (PECK *et al.,* 1990; CASSON *et al.,* 1998); spesso gli sporangi possono anche semplicemente cadere e marcire nella terra, in modo da disperdere le loro spore al di sotto della pianta. Nonostante questo limite, alcune spore riescono a raggiungere distanze considerevoli (WAGNER, SMITH, 1993). La natura succulenta della pianta e le pareti molto spesse delle spore, che potrebbero consentire loro di passare indenni attraverso l'apparato digerente di un animale, hanno suggerito che erbivori, come piccoli mammiferi, possano essere coinvolti nella dispersione (WAGNER, 1998; WAGNER *et al.,* 1985; WAGNER, WAGNER, 1993). Dopo la dispersione, le spore si infiltrano nel terreno e per la successiva germinazione (Fig. 2.17) possono passare da 2 settimane fino a 5 anni, a seconda delle specie.



Fig. 2.16 - Fasi della germinazione delle spore delle Ophioglossaceae: 1) apertura delle lesure triradiate; 2) prima divisione cellulare endosporica; 3-5) emergenza del gametofito dalla parete sporale (in basso) e successive divisioni cellulari (WHITTIER, MOYROUD, 1993)

Sebbene la grande maggioranza delle felci omosporee sia caratterizzata da gametofiti fotosintetici ed epigei, nel 2% circa dei generi, comprese tutte le *Ophioglossaceae*, i gametofiti sono tuberosi, micoeterotrofici ed ipogei. La germinazione, quindi, richiede il buio (WHITTIER, 1972; WHITTIER, 1973; WAGNER *et al.,* 1985) dato l'habitat sotterraneo del gametofito e la necessità di entrare in simbiosi con un fungo micorrizico endofitico in un'associazione obbligata (WHITTIER, 1973); dettagli di questa interazione sono descritti in SCHMID e OBERWINKLER (1994) (Fig. 2.17).

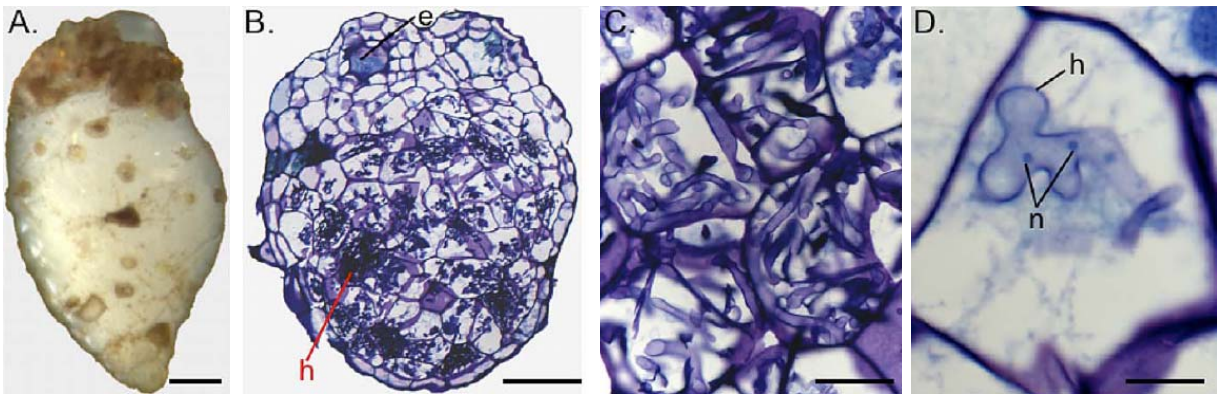


Fig. 2.17 - Micorrize arbuscolari (AM) in gametofiti di *Botrychium crenulatum*: A) gametofito micoeterotrofico (scala grafica = 150 µm); B) sezione longitudinale del gametofito dove sono evidenti le ife (**h**) e l'oosfera (**e**) (s.g. = 125 µm; C) particolare delle ife (s.g. = 50 µm); D) singola ifa (h) multinucleata (n) all'interno di una cellula del gametofito (s.g. = 25 µm) (WINTHER, FRIEDMAN, 2007).

A maturità i gametofiti possono essere cilindrici, sferici, liguliformi o reniformi, in genere lunghi meno di 1 cm, moderatamente pelosi e di colore marrone più o meno chiaro (WAGNER *et al.,* 1985) (Fig. 2.18). Sviluppano anteridi prima di diventare bisessuali, con gametangi adiacenti l'uno all'altro, caratteristica che favorisce l'autofecondazione. Inoltre, lo sviluppo sotterraneo limita notevolmente la mobilità dei gameti maschili, rendendo improbabile l'esoincrocio, tanto che numerosi studi indicano l'*inbreeding* come la norma (TRYON, TRYON, 1982; McCAULEY *et al.,* 1985; SOLTIS, SOLTIS, 1986; WATANO, SAHASHI, 1992; FARRAR, 1998; CAMACHO, LISTON, 2001).

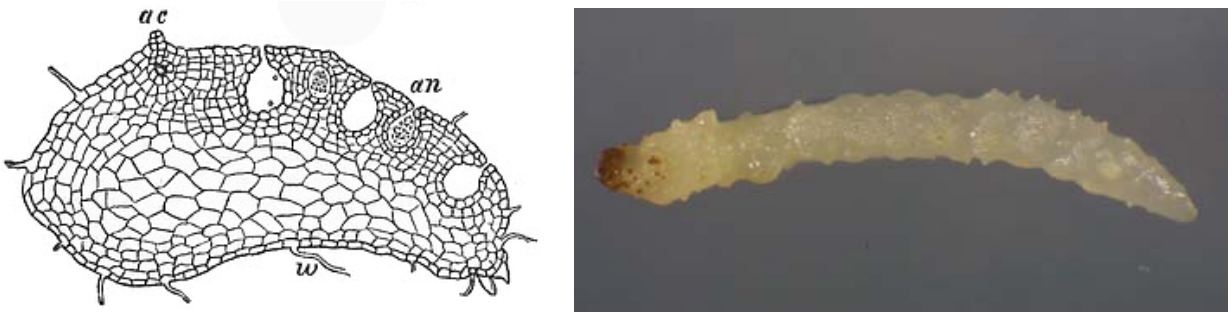


Fig. 2.18 - A sinistra, gametofito ipogeo di *Botrychium lunaria* in sezione longitudinale: ac) archegonio; an) anteridio; w) rizoidi. A destra, gametofito ipogeo di *Ophioglossum engelmannii.*

Sebbene i gametofiti di alcune specie possano maturare in meno di 1 anno dal rilascio delle spore in natura o dalla semina in coltura, altre specie possono richiedere fino a 20 anni per lo sviluppo dell'embrione. Finora, il minor tempo di maturazione del gametofito in coltura è stato registrato per *Ophioglossum crotalophoroides* (WHITTIER, 2000; 2006). Il normale sviluppo embrionale produce una radice che emerge dal gametofito prima della prima foglia, sviluppando uno sporofito ipogeo che rimane attaccato al gametofito fino all'emergenza della prima foglia dal terreno, lo sporofito autotrofo

(WINTHER, FRIEDMAN, 2007) (Fig. 2.19). In alcune specie, dopo la fecondazione, si può verificare un ritardo di 5 o più anni nell'emergenza della foglia al di sopra del suolo, perché si formano diverse radici e foglie rudimentali dal giovane sporofito (WHITTIER, 2000).

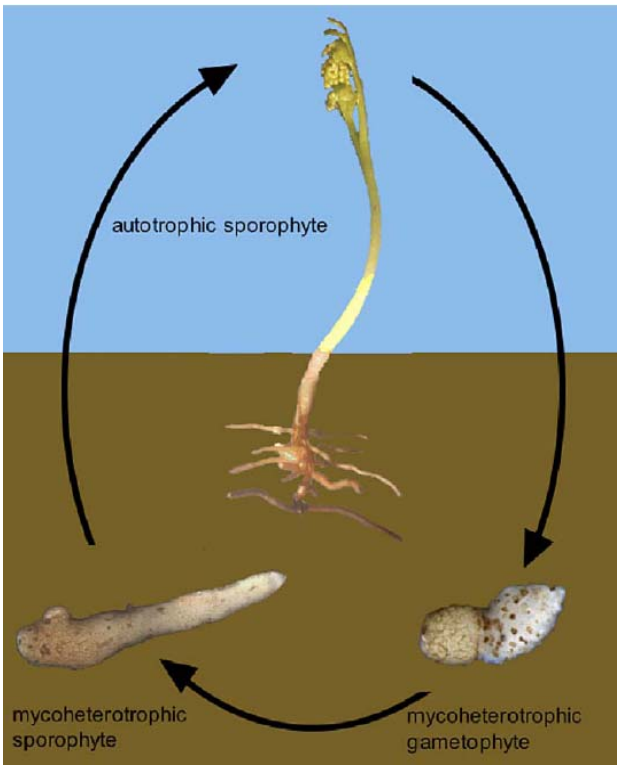


Fig. 2.19 - Ciclo vitale di *Botrychium crenulatum*. Lo sporofito autotrofo produce una foglia all'anno divisa in una parte vegetativa e in una riproduttiva. Le spore aploidi hanno germinazione ipogea sviluppando un gametofito multicellulare micoetrotrofico. Dopo la fecondazione si sviluppa uno sporofito ipogeo, che è micoetrotrofico come il gametofito a cui rimane attaccato, fino all'emergenza della prima foglia dal terreno (WINTHER, FRIEDMAN, 2007).

2.4.6. Le vie alternative al normale ciclo riproduttivo

Nelle felci esistono numerose varianti della normale alternanza di generazioni, per la diversità o mancanza di una o più fasi del ciclo biologico, fra queste le principali sono classificabili come aposporia, gemmazione e apogamia (PARIHAR, 1996).

Aposporia

Si parla di aposporia quando vengono prodotti gametofiti diploidi direttamente a partire dal tessuto dello sporofito, di solito dal tessuto fogliare: questi gametofiti producono gameti diploidi e quindi sporofiti con numero cromosomico doppio rispetto a quello della generazione precedente.

Gemmazione

La gemmazione è una forma di propagazione gametofitica, per cui si formano delle strutture globose nell'area meristematica sul margine della lamina; da queste gemme si sviluppano nuovi gametofiti che

continuano a crescere fino a staccarsi. Questo fenomeno di riproduzione vegetativa è stato descritto in *Psilotum* (HUGHES, 1971), *Botrychium* (FARRAR, JOHSON-GROH, 1990) e nei gametofiti delle *Grammitidaceae* (STOKEY, ATKINSON, 1958; FARRAR, 1967), *Hymenophyllaceae* (STOKEY 1948) e *Vittariaceae* (BRITTON, TAYLOR, 1902; FARRAR, 1974; 1978), ma osservato per la prima volta in *Osmunda regalis* nel 1997, in particolari condizioni colturali (FERNÁNDEZ *et al.,* 1997).

L'aposporia e la gemmazione sono relativamente rari, al contrario circa il 10% circa delle felci si riproduce per via apogama (MENÉNDEZ *et al.,* 2006; SHEFFIELD, 2009).

Apogamia

Per apogamia si intende lo sviluppo di uno sporofito direttamente da cellule vegetative di un gametofito, senza fecondazione, mentre per la produzione di sporofiti da oosfere non fecondate si parla di partenogenesi. Gli sporofiti apogami derivano da cellule somatiche localizzate sotto il meristema apicale, cioè dal tessuto che in genere produce gli archegoni; una o più cellule si accrescono a formare la cosiddetta gemma apogama che in tempi molto brevi organizza gli apici del germoglio e della radice e forma uno sporofito vascolare in continuità istologica con il gametofito e, quindi, con lo stesso numero cromosomico. Negli sporofiti apogami sono osservabili alcune differenze rispetto a quelli sessuali, soprattutto nello sviluppo delle prime foglie che risultano diverse dai cotiledoni prodotti dallo sviluppo di un embrione: infatti, già dalla prima emergenza le foglie sono morfologicamente uguali a quelle adulte, per esempio più o meno pennate, e con vernazione circinnata (Fig. 2.20). L'apogamia come alternativa alla riproduzione sessuale è stata osservata in un ampio gruppo di generi fra cui *Asplenium*, *Cheilanthes*, *Doodia*, *Dryopteris*, *Pellaea*, *Pteris*, *Trichomanes*, *Isoetes* ed altri (SHEFFIELD, 2009).

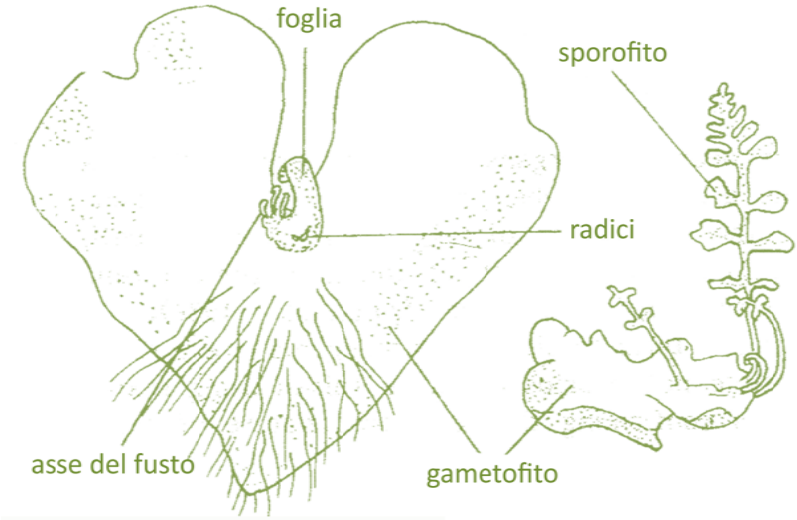


Fig. 2.20 - Stadi di sviluppo di uno sporofito apogamo. A sinistra: emergenza della foglia dalla gemma apogama sulla superficie inferiore di un protallo di *Pteris cretica.* A destra: sporofito apogamo di *Doodia caudata* sviluppato sulla superficie superiore del gametofito (PARIHAR, 1996).

Possiamo distinguere essenzialmente due tipologie di apogamia: obbligata e facoltativa (o indotta) (RAGHAVAN, 1989).

Si parla di apogamia obbligata (o agamosporia) per quei *taxa* che si riproducono solo per via apogama. I 18 generi in cui ricorre sono *Actiniopteris*, *Adiantum*, *Anemia*, *Asplenium*, *Bommeria, Cyrtomium*, *Diplazium*, *Dryopteris, Hemionitis, Pellaea*, *Phegopteris, Polypodiun, Polystichum, Pteris, Trichomanes s.l.* and *Xiphopteris.* Nelle specie apogame il gametofito si sviluppa dalle spore in modo normale, ma non produce gli organi sessuali, oppure solo gli anteridi, e gli archegoni, se presenti, non sono funzionali. Spesso l'apogamia obbligata è associata alla diplosporia, cioè ad un'assenza di meiosi nello sporangio dello sporofito, con la conseguenza che le spore e i gametofiti risultanti sono diploidi o, comunque, presentano lo stesso numero cromosomico delle sporofito (SHEFFIELD, 2009). Ci sono molte prove che collegano l'apogamia obbligata con l'origine ibrida di alcune specie, sia che l'ibridazione coinvolga gameti di specie diverse che di specie a diverso grado di ploidia (MANTON, 1950; TRYON, BRITTON, 1958; MEHRA, BIR, 1960).

Si parla, invece, di apogamia facoltativa per quei *taxa* che generalmente si riproducono per via sessuale, ma che possono essere indotti da particolari condizioni ambientali a sviluppare sporofiti in modo agamico, per esempio dalla mancanza di acqua che è indispensabile per la fecondazione (SHEFFIELD, 2009). Questa tipologia di apogamia può essere facilmente indotta *in vitro* ed è stata oggetto di molte ricerche, anche per la possibilità di utilizzarla come metodo per semplificare e velocizzare la propagazione di alcune felci a scopi commerciali. Sono molti i fattori di induzione che sono stati identificati, oltre alla scarsità di acqua. Fra i principali, le alte concentrazioni di nutrienti o di saccarosio nel substrato o nel terreno di coltura (WHITTIER, STEEVES, 1960; 1962; ELMORE, WHITTIER, 1975; WHITTIER, 1962; 1975; FERNÁNDEZ *et al.,* 1996), anche se in alcune specie, come *Osmunda regalis* e *Pteris ensiformis* (FERNÁNDEZ *et al.,* 1999) o nelle felci eterosporee (MAHLBERG, BALDWIN, 1975), è invece la scarsità di nutrienti e zuccheri che induce apogamia; l'aggiunta di auxina o citochinine (WHITTIER, 1966) e la presenza di etilene (ELMORE, WHITTIER, 1975); un'alta intensità luminosa (WHITTIER, PRATT, 1971); la crescita verticale dei gametofiti (MEHRA, SULKLYAN, 1969); mentre le gibberelline, esogene o endogene, possono avere sia effetto stimolante che inibente dell'apogamia, a seconda della specie o del genere (JIMENEZ *et al.,* 2001).

La riproduzione per via apogama offre alcuni vantaggi rispetto a quella sessuale, primo fra tutti l'adattamento ad habitat aridi. Infatti, le specie apogame possono produrre sporofiti in assenza o quasi di acqua e molto più velocemente: viene ridotta, così, la durata della fase gametofitica, la più sensibile agli stress ambientali. Per questo motivo, le specie apogame hanno, generalmente, una più ampia distribuzione rispetto alle specie a riproduzione sessuale e sono maggiormente adattate all'ambiente in

cui vivono (TRYON, BRITTON, 1958; GASTONY, HAUFLER 1976; RAGHAVAN, 1989; PARIHAR, 1996; SHEFFIELD, 2009).

2.5. Conservazione delle Pteridofite: stato delle conoscenze e criticità

Le Pteridofite possono vivore in un ampio spettro di ambienti, con una grande varietà di adattamenti, presentano però una criticità comune nella fase gametofitica: infatti, il protallo è privo di un'epidermide protettiva differenziata, e di tracheidi (tranne che in *Psilotum*) quindi può vivere soltanto in precise condizioni ecologiche caratterizzate da elevata umidità atmosferica, presenza di un velo d'acqua sul terreno, indispensabile per la fecondazione, e assenza di sbalzi termici. Condizioni ambientali non idonee possono interrompere il ciclo riproduttivo proprio in questa fase, che è la più sensibile e la più importante per la conservazione della diversità genetica. Oltre a questo, le esigenze ecologiche del gametofito condizionano anche l'ambiente di diffusione della specie, dal momento che lo sporofito adulto, ovviamente, si sviluppa là dove era l'archegonio da cui si è originato, cioè nello stesso ambiente umido in cui era cresciuto il gametofito (RAY *et al.,* 1985). Per questo motivo, molte Pteridofite risultano estremamente legate solo a certe tipologie di habitat e sono particolarmente sensibili a fenomeni di inquinamento delle acque o del suolo, o alle variazioni di alcuni paramentri chimico-fisici, soprattutto umidità e pH.

Proprio per l'elevata specificità ecologica della maggior parte delle specie, la diversità pteridofitica è sottoposta a molte minacce legate principalmente alla frammentazione, degrado e distruzione degli habitat naturali e degli ecosistemi che la sostengono (GIVEN, 1993; PAGE, 2002), ma anche alla competizione con specie aliene invasive, un problema di importanza crescente (WILSON, 2002; PALMER, 2003). Fra le altre, la raccolta per fini commerciali, soprattutto di specie epifite o arboree tropicali (UNWIN, HUNT, 1996; POREMBISKI, BIEDINGER, 2001; ZHANG *et al.,* 2002), ma anche di specie come *Osmunda regalis,* i cui apparati radicali sono stati utilizzati fino alla prima metà del '900 come terriccio per la coltivazione delle orchidee; la raccolta per motivi di studio, è una minaccia da non sottovalutare dal momento che va a colpire prevalentemente le popolazioni di specie "interessanti", cioè le specie endemiche, rare o minacciate (BAÑARES *et al.,* 2004). Inoltre, sono noti gli effetti negativi dell'esposizione, cronica o episodica, a fenomeni di inquinamento del suolo o delle acque, che possono causare un'alta incidenza di danni mutazionali post-zigotici (KLEKOWSKI E.J. Jr, KLEKOWSKI E., 1982; ARCAND, RANKER, 2008). Ad oggi, invece, sono ancora molto pochi gli studi sull'effetto dei cambiamenti climatici su felci e licofite (JAYAKUMAR *et al.,* 2002; KELSALL *et al.,* 2004; BJÖRN, 2007). Tali effetti risultano difficilmente prevedibili, perché, se da un lato si suppone che possano adattarsi meglio delle spermatofite alle mutate condizioni ambientali, grazie alla maggiore capacità di dispersione a lunga distanza che garantiscono le spore rispetto ai semi (GIVEN, 1993), dall'altro la sempre minore

disponibilità di habitat che possano tamponare gli effetti delle fluttuazioni climatiche, può limitarne fortemente la distribuzione causandone la scomparsa a livello locale o globale (KELSALL *et al.,* 2004).
La conservazione delle Pteridofite rappresenta quindi una sfida impegnativa, ma questo gruppo è decisamente sottorappresentato nella *Global Red List*. Infatti, dalle 1.650 specie considerate a rischio dall'IUCN nel 1990, delle quali 20 probabilmente estinte, 67 minacciate e 91 vulnerabili (JERMY, 1990; GIVEN, 1993), si passa a 770 specie elencate alla fine degli anni '90 come a rischio a livello globale (WALTER, GILLETT, 1998) e ad oggi sono solo 211 (fra *Lycophytes* e *Monilophytes*) le entità presenti nella "*IUCN Red List of threatened species – 2009.2"* (http://www.iucnredlist.org). Tale numero non è minimamente indicativo dello *status* di rischio di questo gruppo così eterogeneo, ma è piuttosto indice della difficoltà di riuscire a valutare tutte le specie con i nuovi criteri (IUCN, 2001), per la carenza di conoscenze adeguate sulla biologia, distribuzione e *status* di conservazione di molte felci (CHANDRA *et al.,* 2008). Infatti, sebbene le specie valutate dall'IUCN rappresentino solo l'1.6% del totale delle specie descritte (ARCAND, RANKER, 2008), si suppone che oltre il 10% delle specie nel mondo siano a rischio di estinzione (JERMY, 1990) e molte altre siano in declino proprio per la loro sensibilità ai cambiamenti e alle perturbazioni ambientali e per la tendenza ad essere concentrate in habitat e regioni minacciate (GIVEN, 2002).

2.5.1. Conservazione *ex situ*

Anche se l'obiettivo primario nella conservazione delle Pteridofite, come per tutte le specie a rischio, deve rimanere la loro conservazione all'interno degli habitat naturali, per esempio attraverso una corretta gestione delle aree protette (PHILLIPS, 2002), quando non possibile o non sufficiente, esistono altri approcci che possono essere supplementari e complementari alle azioni *in situ*, metodi che sempre più spesso risultano necessari, se non indispensabili, per incrementare le possibilità di sopravvivenza di popolazioni locali o di intere specie (PAGE *et al.,* 1992; PENCE, 2008). Gli Orti Botanici giocano tradizionalmente un ruolo fondamentale nella conservazione *ex situ* di felci e licofite, per la capacità di mantenere in coltivazione specie provenienti da tutto il mondo, di riprodurre specie rare, di conservarne il germoplasma *in vivo* (IUCN-BGCS, WWF, 1989; CHENEY *et al.,* 2000; WYSE JACKSON, SUTHERLAND, 2000; WYSE JACKSON, 2004; GROSSONI, 2006; PENCE, 2008). È frequente l'allestimento di collezioni tematiche, importanti anche per fini didattici, educativi e divulgativi (FONCK *et al.,* 2009) che consentono, inoltre, di avere a disposizione quantità sufficienti di materiale (spore, gametofiti e sporofiti) per analisi morfologiche, cariologiche, filogenetiche, per lo studio della biologia della riproduzione o per la riproduzione *in vitro*, senza intaccare le popolazioni naturali (WARDLAW, 2002b). Un grosso limite a questa tipologia di conservazione è dato però dal basso numero di individui per specie in coltivazione che, inevitabilmente, può rappresentare solo una minima parte del *pool* genico

(GIBBY, DYER, 2002). È necessario quindi ricorrere ad altri approcci che possano fornire un importante supporto alle strategie tradizionali di conservazione *ex situ* e garantire un'effettiva conservazione della diversità genetica delle specie (PENCE, 2002; 2008).

2.5.2. Conservazione delle spore

Sicuramente l'approccio più semplice ed efficace è la conservazione a lungo termine delle spore in banche del germoplasma, ma ad oggi le metodologie non sono ancora ben definite, tanto che solo alla fine del 2008 sono state pubblicate le prime linee guida all'interno di un manuale di gestione e conservazione del germoplasma (BACCHETTA *et al.,* 2008a) e chein Europa sono solo 2 le strutture che si occupano in modo specifico della conservazione delle Pteridofite : la *Banc d'Espores de Pteridòfits* dell'Università di Valencia e la Banca del Germoplasma dell'Università degli Studi della Tuscia.

I vantaggi della conservazione delle spore sono facilmente intuibili, infatti, grazie alle loro dimensioni microscopiche, possono essere stoccate in grandi quantità e in uno spazio relativamente limitato. Inoltre, generalmente, hanno un basso contenuto in acqua, intorno al 5-10% (LLOYD, KLEKOWSKI, 1970), ed è ormai noto che le basse temperature prolungano la vitalità delle spore di molte Pteridofite (DYER, 1979a; BALLESTEROS *et al.,* 2004; 2006), per questo motivo le collezioni sono frequentemente mantenute a basse temperature (-20°C; -80°C; -196°C). La vitalità e la longevità dipendono, però, dal gruppo tassonomico e soprattutto dalla tipologia di spora. Infatti, le spore clorofilliane che germinano più rapidamente delle altre spore, mostrano però una scarsa longevità, misurabile in giorni o settimane piuttosto che in mesi e anni come per le spore dormienti (LLOYD, KLEKOWSKI, 1970; LEBKUECHER, 1997). Molti sono gli studi che hanno cercato di individuare le condizioni di conservazione che mantengano non solo la vitalità delle spore ma anche la loro capacità di sviluppo e integrità genetica, visto che spore conservate disidratate per molto tempo tendono a germinare più lentamente e possono presentare mutazioni cromosomiche (PAGE *et al.,* 1992; BERI, BIR, 1993; CAMLOH, 1999). Recentemente BALLESTEROS e WALTERS (2007a, b) hanno proposto che gli eventuali danni causati dalla disidratazione o dal congelamento possano essere prevenuti attraverso un controllo preciso del contenuto in acqua delle spore che deve rimanere all'interno di un *range* estremamente piccolo. Fattori biochimici e metabolici, l'esaurimento del substrato respiratorio, la perdita di integrità della membrana, l'inattivazione di enzimi e promotori della crescita, le aberrazioni cromosomiche o altre mutazioni genetiche sono citate come possibili cause della perdita di vitalità durante la conservazione delle spore non-verdi (PAGE *et al.,* 1992; BERI, BIR, 1993). Nelle spore clorofilliane, oltre a questi fattori, si aggiungono la mancanza di dormienza e l'alto tasso respiratorio come cause principali dell'estrema rapidità con cui perdono vitalità, oltre alla difficoltà di riprendere l'attività fotosintetica dopo la

deidratazione, fatto che spiega i problemi legati alla loro conservazione a lungo termine (JONES, HOOK, 1970; LLOYD, KLEKOWSKI, 1970; LEBKUECHER, 1997).

Diversi autori hanno studiato un'alternativa alla conservazione tradizionale, cioè la possibilità di conservare spore allo stato idrato e al buio (all'interno di contenitori con terreno agarizzato), analogamente a quello che accade in natura nella banca spore del suolo, così da evitare eventuali danni legati alla disidratazione (LINDSAY *et al.,*1992; SIMABUKURO *et al.,* 1998b; QUINTANILLA *et al.,* 2002; ARAGON, PANGUA, 2004). Questo metodo ha portato a buoni risultati a breve termine, soprattutto per la conservazione di spore destinate alla riproduzione, ma è ancora poco applicato e testato, soprattutto perchè presenta alcuni svantaggi e difficoltà rispetto al metodo tradizionale. Richiede molto più lavoro e spazio per la conservazione delle accessioni, che devono essere suddivise in aliquote non troppo grandi per garantirne l'idratazione. Inoltre, rispetto alla conservazione di spore deidratate, aumenta enormemente il pericolo di perdere alcune repliche a causa di contaminazioni (funghi o batteri), oppure per il disseccamento dell'agar, sia per problemi di non ermeticità del contenitore che per il semplice passare del tempo.

Risulta chiaro che, nonostante le ricerche condotte negli ultimi anni, sono necessari studi specifici che aiutino a comprendere più a fondo la fisiologia delle spore e i loro meccanismi di invecchiamento, allo scopo di determinare la migliore combinazione tra i fattori idratazione-deidratazione e temperatura per la conservazione a lungo termine di spore vitali.

2.6. La flora pteridologica italiana

La flora pteridologica italiana è costituita da 135 entità, suddivise in 43 generi e 26 famiglie (MARCHETTI, 2004; CONTI *et al.,* 2005; 2007; CELESTI-GRAPOW *et al.,* 2009), pari al 75% delle Pteridofite spontanee e naturalizzate presenti in Europa. Una flora molto ricca, così come quella di Francia e Spagna, dovuta all'elevata diversificazione morfologica, ambientale e climatica del territorio italiano, una complessità in grado di rispondere bene alle esigenze ecologiche più diverse.

Più della metà delle specie presenti in Italia ha una vasta distribuzione nei due emisferi, soprattutto in quello settentrionale, ma sono piuttosto numerose anche quelle diffuse in estesi territori in Europa o nel bacino del Mediterraneo. Circa venti specie mostrano una distribuzione limitata, fra queste *Botrychium simplex* E. Hitchc., presente solo in Trentino-Alto Adige (Fig. 2.25), *Ophioglossum azoricum* C. Presl. in Toscana solo sul M. Pisano, e *Diphasiastrum zeilleri* (Rouy) Holub in Piemonte, o molto frammentata, come *Asplenium balearicum* Shivas, presente in Toscana, Lazio, Sicilia e Sardegna con distribuzione limitata alle isole e *Dryopteris tyrrhena* Fraser-Jenk. & Reichst., presente in poche piccole popolazioni in Liguria, Arcipelago Toscano e Sardegna (MARCHETTI, 2004). Un interesse particolare rivestono alcune entità che, pur essendo ben diffuse in altre aree, hanno in Italia una distribuzione relittuale, fra queste

Cheilanthes persica (Bory) Mett. ex Kuhn (Fig. 2.21), specie NE Mediterraneo-Turanica, presente nella Penisola Balcanica (Dalmazia), Isole Egee, Creta, Crimea, Anatolia, Iraq, Iran, Afghanistan, Kashmir e presente in Italia, all'estremo occidentale del suo areale globale (FERRARINI *et al.,* 1986 ; TUTIN *et al.,* 1993; ROSSI, GENTILI, 2008c) e *Cystopteris diaphana* (Bory) Blasdell, specie di regioni temperate e calde in Macaronesia, Europa Occidentale, Africa Settentrionale Centrale, America Centrale e Meridionale, presente in Italia solo presso Campodolcino, in Val S. Giacomo (Sondrio) (MARCHETTI, 2004).

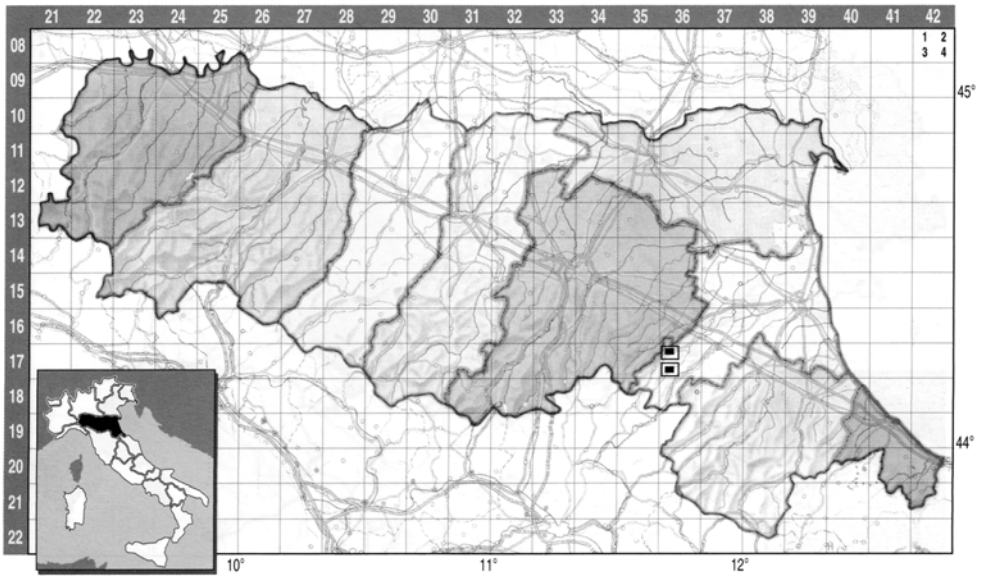


Fig. 2.21 - Mappa di distribuzione di *Chelilanthes persica*, tratta dall'*Atlante delle Pteridofite dell'Emilia-Romagna* (BONAFEDE *et al.,* 2001).

La componente endemica è estremamente limitata, con solo due *taxa*: *Isoëtes malinverniana* Ces. & De Not. (Fig. 2.25), endemica di Piemonte e Lombardia, ed *Asplenium adulterinum* Milde subsp. *presolanense* Mokry, Rasbach & Reichst. (Fig. 2.22), nota solo per il M. Presolana sulle Alpi Orobie in Lombardia, dove per altro vegeta su rocce calcaree ombreggiate con un'unica popolazione formata da poche microstazioni, alcune delle quali molto rarefatte a causa di raccolte eccessive (BONA, 1999; MARCHETTI, 2004).

La componente delle esotiche, con 9 specie, costituisce meno del 7% del totale della flora pteridofitica italiana; la loro distribuzione regionale aggiornata è riportata nel recente CD-ROM *Non-native flora of Italy* (CELESTI-GRAPOW *et al.,* 2009). Nessuna Pteridofita è indicata come "invasiva", ma le 2 specie acquatiche, *Azolla filiculoides* Lam. e *Salvinia molesta* D.S. Mitch., sono state classificate come "*localmente invasive*"; *Cyrtomium falcatum* (L. f.) C. Presl e *Cyrtomium fortunei* J. Sm. come "*naturalizzate*" e le altre 5 specie sono considerate "*casuali*": *Christella dentata* (Forssk.) Brownsey & Jermy, *Lycopodiella cernua* (L.) Pic. Serm., *Nephrolepis cordifolia* C. Presl, *Pteris multifida* Poir. e *Selaginella kraussiana* (Kunze) A. Braun, una specie di recente introduzione in Lombardia, Veneto e Sicilia (MARCHETTI, 2004; CONTI *et al.,* 2005; 2007; CELESTI-GRAPOW *et al.,* 2009).

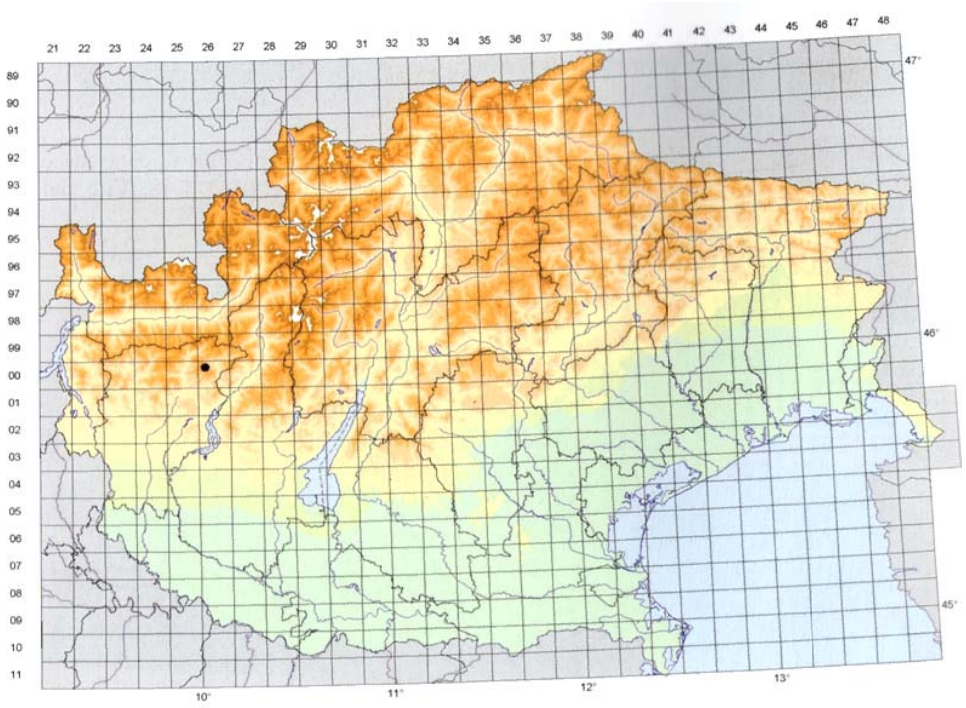


Fig. 2.22 - Mappa di distribuzione di *Asplenium adulterinum* Milde subsp. *presolanense* Mokry, Rasbach & Reichst. tratta dall'*Atlante corologico delle Pteridofite nell'Italia nord-orientale* (BONA *et al.,* 2005).

2.7. Le Pteridofite a rischio in Italia

Circa il 20% della flora pteridologica italiana è considerato a rischio di estinzione a livello nazionale (Tab. 2.2) e l'elenco ha subito pochi cambiamenti dal 1992 al 2005, nonostante l'evoluzione delle categorie e criteri IUCN: si passa, infatti, dalle 24 specie del *Libro Rosso* (CONTI *et al.,* 1992) valutate secondo le prime categorie IUCN del 1978, alle 26 delle *Liste Rosse* (CONTI *et al.,* 1997) valutate secondo le categorie della versione 2.3 (IUCN, 1994), alle 27 dell'*Atlante delle specie a rischio di estinzione* (SCOPPOLA, SPAMPINATO, 2005), che aggiunge una specie, *Botrychium multifidum* (S.G. Gmel.) Rupr., riportata nel Libro Rosso ma che erroneamente non risulta nell'elenco nazionale nelle Liste Rosse.

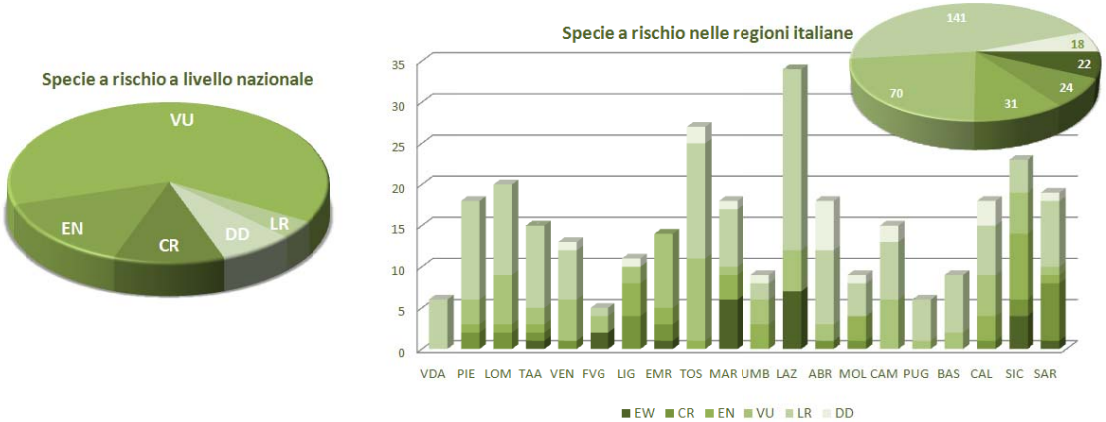


Fig. 2.23 - Le Pteridofite a rischio in Italia: elaborazioni dei dati presenti nelle Liste Rosse (CONTI *et al.,* 1997). A sinistra: le specie a rischio a livello nazionale ripartite fra le varie categorie. A destra: le specie a rischio a livello regionale ripartite fra le varie categorie (in alto, il totale) e loro distribuzione nelle regioni italiane.

TAXA	STATUS DI RISCHIO
Asplenium balearicum Shivas	EN
Asplenium eberlei D.E. Mey.	VU
Asplenium foreziense Legrand ex Magnier	VU
Botrychium lanceolatum (S.G. Gmel.) Ångstr.	VU
Botrychium matricariifolium (A. Braun ex Döll) W.D.J. Koch	VU
Botrychium multifidum (S.G. Gmel.) Rupr.	VU
Botrychium simplex E. Hitchc.	VU
Botrychium virginianum (L.) Sw.	VU
Cheilanthes persica (Bory) Mett. ex Kuhn	EN
Christella dentata (Forssk.) Brownsey & Jermy	DD
Dryopteris tyrrhena Fraser-Jenk. & Reichst.	VU
Hymenophyllum tunbrigense (L.) Sowerby	VU
Isoëtes echinospora Durieu	CR
Isoëtes malinverniana Ces. & De Not.	CR
Isoëtes velata A. Braun subsp. *velata*	VU
Lycopodiella inundata (L.) Holub	VU
Marsilea quadrifolia L.	VU
Marsilea strigosa Willd.	VU
Ophioglossum azoricum C. Presl	LR
Phyllitis sagittata (DC.) Guinea & Heywood	VU
Pilularia globulifera L.	CR
Pilularia minuta Durieu ex A. Braun	VU
Pteris cretica L.	EN
Pteris vittata L.	DD
Salvinia natans (L.) All.	VU
Vandenboschia speciosa (Willd.) G. Kunkel	EN
Woodwardia radicans (L.) Sm.	VU

Tab. 2.2 - Elenco delle Pteridofite a rischio in Italia (CONTI *et al.,* 1992; 1997).

Ad oggi, nessuna Pteridofita italiana è elencata nella *IUCN Red List 2009.2* (Tab. 1.2) e a più di 10 anni dalla redazione delle Liste Rosse, solo 2 specie su 27 sono state valutate secondo i nuovi criteri 3.1 (IUCN, 2001), *Cheilanthes persica* (Bory) Mett. ex Kuhn (Fig. 2.21) (ROSSI, GENTILI, 2008c) e *Woodwardia radicans* (L.) Sm. (SPAMPINATO *et al.,* 2008), nell'ambito del progetto per la redazione di nuove Liste Rosse per l'Italia (vedi Par. 1.2.5 e Tab. 1.3); (ROSSI *et al.,* 2008a,b), anche se altre 4 sono state presentate recentemente nell'ambito di convegni e *workshop* della Società Botanica Italiana e saranno pubblicate nella nuova rubrica dell'Informatore Botanico Italiano "*Flora da conservare. Iniziativa per l'implementazione in Italia delle categorie e dei criteri IUCN (2001) per la redazione di nuove Liste Rosse*": *Isoëtes malinverniana* (SINISCALCO, 2008), *Marsilea quadrifolia* (R. Gentili, Milano), *Ophioglossum azoricum* (L. Peruzzi, A. Carta e B. Pierini, Pisa), oltre a *Dryopteris tyrrhena* (S. Magrini e A. Scoppola, Viterbo), grazie al lavoro svolto nell'ambito del presente Dottorato di Ricerca.

Questo ritardo nell'applicazione dei nuovi criteri è legato essenzialmente alla tipologia degli studi pteridologici in Italia, piuttosto carenti proprio nei campi necessari per la procedura di *assessment*, come la cartografia floristica e la biologia della conservazione.

Negli ultimi 30 anni, infatti, sono stati pubblicati vari testi sulla flora pteridologica italiana, fra cui due atlanti palinologici (FERRARINI *et al.,* 1986; PERONI, PERONI, 2004), un lavoro sulle Pteridofite a rischio (CELLINESE *et al.,* 1996) e alcuni lavori monografici (BONAFEDE *et al.,* 2001; SOSTER, 2001; BERNARDELLO, MARTINI, 2004; MARCHETTI, 2004; BONA *et al.,* 2005), ma esclusivamente 3 di questi forniscono informazioni distributive di dettaglio: CELLINESE et al. (1996) per 9 specie del Libro Rosso (Fig. 2.24), l'*Atlante delle Pteridofite dell'Emilia-Romagna* (BONAFEDE *et al.,* 2001) (Fig. 2.21) e, più recentemente, l'*Atlante corologico delle Pteridofite nell'Italia nord-orientale* (BONA *et al.,* 2005) (Fig. 2.22). Entrambi gli atlanti corologici riportano mappe di distribuzione a livello regionale per ogni specie, utilizzando il reticolo geografico (maglie di 6' di latitudine per 10' di longitudine, suddivise in quadranti di circa 6 x 5 km) del Progetto della Cartografia floristica dell'Europa Centrale (EHRENDORFER, HAMANN, 1965).

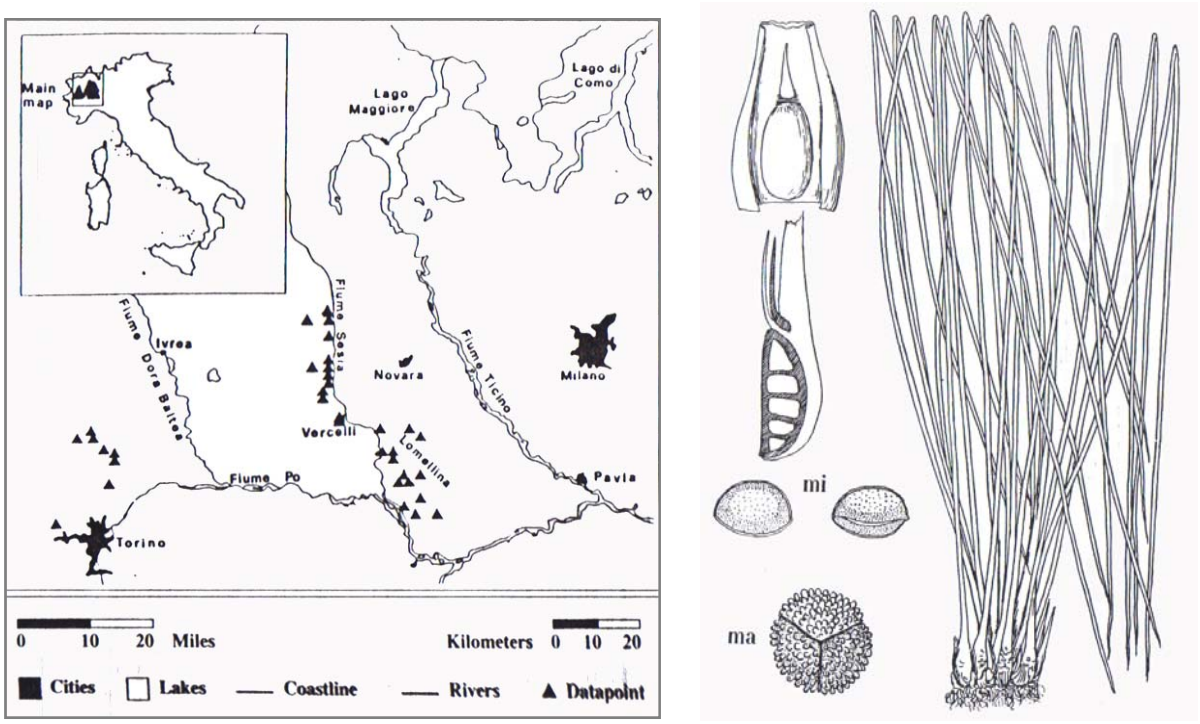


Fig. 2.24 - Mappa di distribuzione e iconografia di *Isoëtes malinverniana* (CELLINESE *et al.,* 1996)

Oltre a questi lavori specifici sulle Pteridofite, troviamo informazioni distributive di dettaglio nell'*Atlante delle specie a rischio di estinzione* (SCOPPOLA, SPAMPINATO, 2005) che fornisce le mappe di distribuzione, su un reticolo di maglia 10 x 10 km, di tutte le specie dell'elenco nazionale delle Liste Rosse (Fig. 2.25). Inoltre, attraverso la *Checklist della flora italiana* ed i suoi aggiornamenti (CONTI *et al.,* 2005; 2007) è possibile delineare un quadro più attuale della distribuzione della flora minacciata in Italia, ma solo a livello regionale.

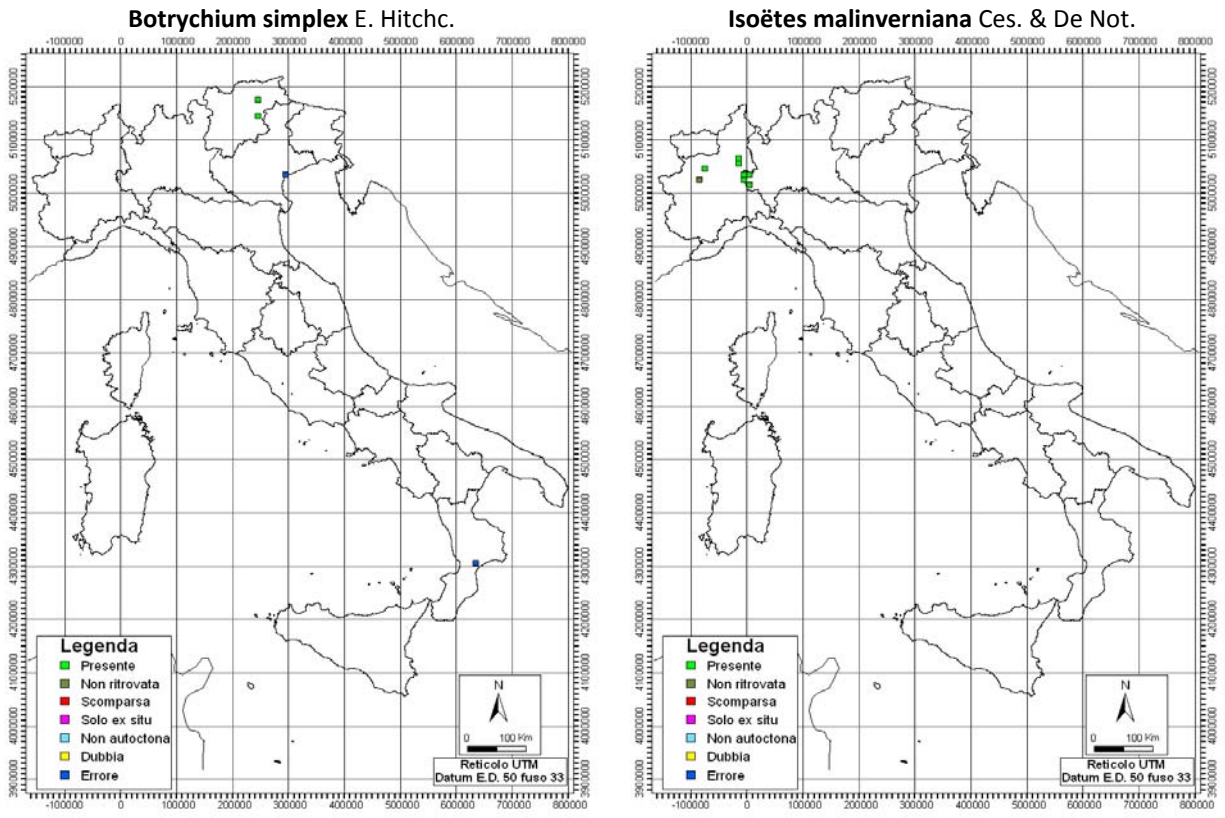


Fig. 2.25 - Mappe di distribuzione in Italia di alcune Pteridofite ad areale ristretto: *Botrychium simplex*, presente solo in Trentino-Alto Adige e *Isoëtes malinverniana*, endemismo W-padano; tratte dall'*Atlante delle specie a rischio* (SCOPPOLA, SPAMPINATO, 2005).

Dal 1997 non è ancora stato fatto alcun aggiornamento né all'elenco delle specie a rischio, né al loro *status*, se non per le specie citate in precedenza (Tab. 1.3), quindi risulta evidente la necessità e l'urgenza di intraprendere studi volti ad ampliare le conoscenze sulla flora pteridologica italiana, sulla sua distribuzione e sul suo stato di conservazione, e di incrementare gli studi di *assessment* secondo i nuovi criteri (IUCN, 2001) per procedere all'aggiornamento delle liste rosse, così da indirizzare azioni di conservazione e gestione del territorio.

3.1. Le Pteridofite oggetto di studio

Di seguito è riportata l'inquadramento tassonomico, informazioni sulla biologia, ecologia, distribuzione e *status* di rischio delle Pteridofite oggetto del presente lavoro:

- *Ophioglossum azoricum* C. Presl
- *Ophioglossum vulgatum* L.
- *Osmunda regalis* L.
- *Dryopteris tyrrhena* Fraser-Jenk. & Reichst.

3.1.1. *Ophioglossum azoricum*

Tassonomia

Classe *Psilotopsida*

Ordine *Ophioglossales*

Famiglia *Ophioglossaceae* C. Presl

Genere *Ophioglossum* L.

Ophioglossum azoricum C. Presl, *Tent. Pterid. Suppl*.: 49. 1845

Sinonimi:

Ophioglossum vulgatum L. subsp. *ambiguum* (Cosson & Germ.) E.F. Warburg

Ophioglossum vulgatum L. subsp. *polyphyllum* auct. plur. europ. et azor., non *O. polyphyllum* A. Braun

Ophioglossum lusitanicum L. var. *britannicum* Le Grand

Ophioglossum vulgatum L. var. *islandicum* A. & D. Löve

Ophioglossum vulgatum L. var. *minus* Ostenf. & Gröntved

Ophioglossum sabulicolum Sauzé & Maillard

Protologo: *"Fronde herbacea sessili elliptico-lanceolata obtusa basi angustata, maculis venarum crebris inaequalibus venulas secundarias liberas continentibus, spica mucronata, sporangiorum valvis brevissimis annuliformibus" - O. lusitanicum Herb. azoric. Un. Itin. N.165.*

Habitat in pratis montanis insulae Terceirae ex insulis Azoricis (C. Hochstetter)

Affinius varietati angustifrondis O. vulgati quam O. lusitanico, sed fronde herbacea transparente et sporangii valvis brevissimis annuliformibus prima fronte distinctum. Ab O. lusitanico longius distat. - Frons pollicaris. Pedunculus fronde longior. Spica pedunculo crassior, apice mucronato-apiculata. (PRESL, 1845).



Fig. 3.1 - *Typus* e *Isotypus* di *Ophioglossum azoricum* conservati nell'erbario di Parigi (P).

Biologia

Specie eusporangiata, probabilmente esaploide (2n=720), intermedia fra *O. lusitanicum* e *O. vulgatum*, di possibile origine allopoliploide (PRELLI, 2001; SOSTER, 2001).

Pianta di 6-16 cm, con radici lassamente fascicolate e rizoma sotterraneo di circa 6 cm per 3 mm di diametro, con guaine sommitali non persistenti. Le nuove piante derivano da gemme avventizie sulle radici. Per ogni rizoma si sviluppano generalmente (1-)2-3 fronde con vernazione conduplicata, suddivise in due parti: una lamina sterile da lanceolata a strettamente ovata, a base più o meno cuneata, di 0,7-2,5 x 2-6,5 cm che si sviluppa al livello del terreno (l'asse comincia più in basso). Nervatura secondaria non anastomosata, libera dentro le maglie dei nervi primari.

Lo sporoforo non ramificato e più o meno mucronato è lungo 10-21 mm e portato da un peduncolo di 2,5-9 cm. È composto da 11-25 eusporangi sessili per lato, a deiscenza trasversale rispetto all'asse dello sporoforo.

Spore trilete, subglobose, reticolato-foveolate, di 43-56 µm di diametro equatoriale (SALVO TIERRA, 1990; PRELLI, 2001; SOSTER, 2001; MARCHETTI, 2004). Periodo di sporificazione da aprile a giugno.

Come in tutte le *Ophioglossaceae* i gametofiti sono ipogei e micoeterotrofi (vedi Par. 2.4.5.).

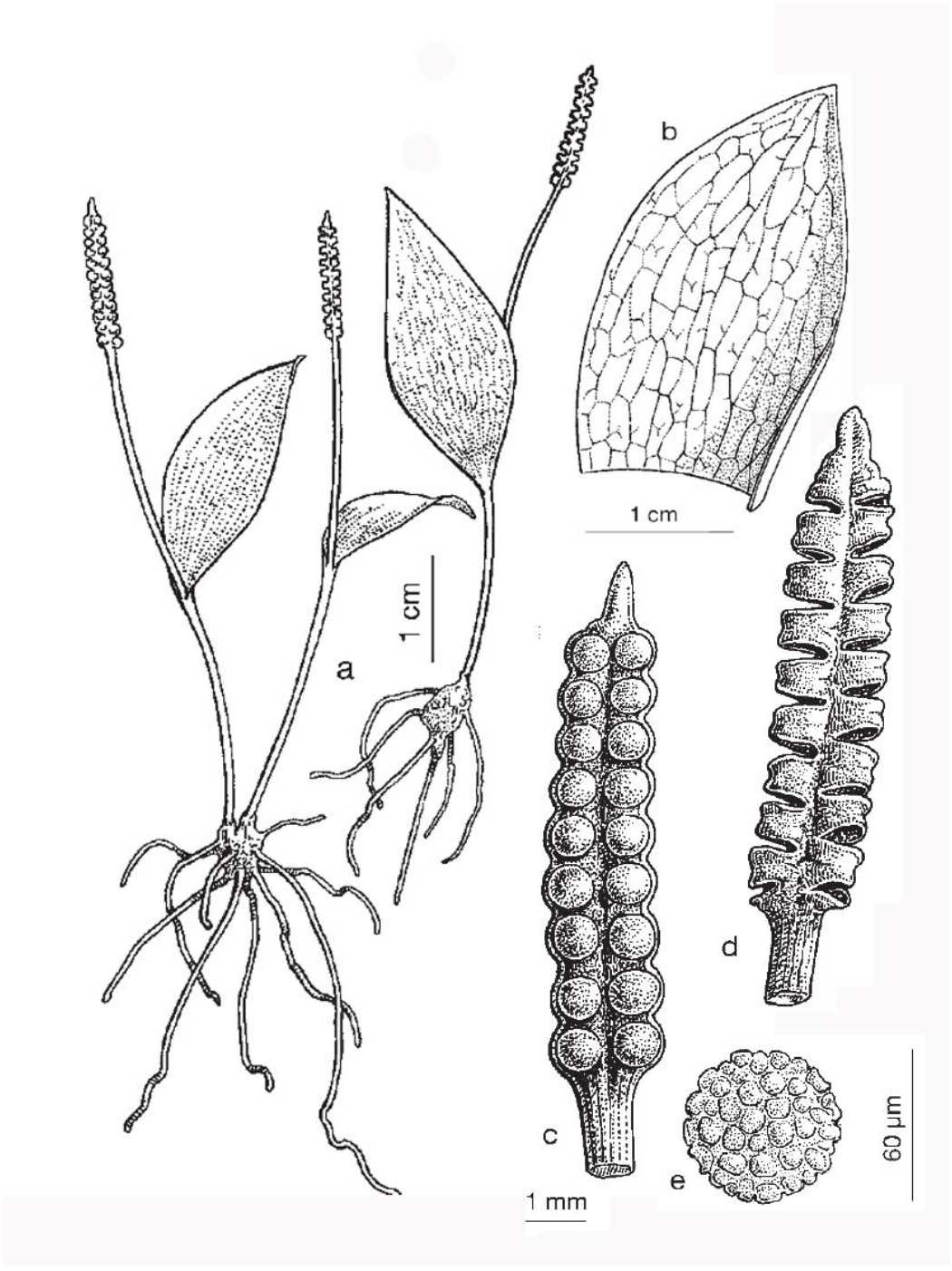


Fig. 3.2 - *Ophioglossum azoricum*: a) *habitus*; b) dettaglio della lamina sterile; c) sporoforo immaturo; d) sporoforo maturo; e) spora (CASTROVIEJO *et al.,* 1986 modificato).

Ecologia

Specie eliofila che vegeta su substrati a granulometria medio-fine, umidi in inverno e inizio primavera, ma raramente per lunghi periodi. Habitat: radure di boschi umidi, prati acidi e bassi erbosi lungo ruscelli a solatio, zolle erbose fra le pietre, da 100 a 540 m s.l.m. (SOSTER, 2001; MARCHETTI, 2004). La sua diffusione sembra essere favorita dagli incendi, che creano spazi nuovi per queste felci che, quindi, si possono diffondere con meno competitori (PRELLI, 2001).

In genere gli *Ophioglossum* si conservano tenacemente negli stessi luoghi, anche se nell'emissione delle fronde una stessa popolazione può dare esiti assai diversi da un anno all'altro. Resta tuttavia il fatto che appaiono in regresso, al di là dei danni provocati genericamente dall'uomo all'ambiente, per una presumibile scarsa competitività. Ciò sicuramente è anche in rapporto con la complessità del ciclo riproduttivo, che è reso possibile solo dalla presenza di un fungo micorrizico e che richiede diversi anni dalla germinazione di una spora fino allo sviluppo di un nuovo sporofito, poiché tale è il tempo che occorre all'embrione per rendersi indipendente dal gametofito che l'ha generato (vedi Par. 2.4.5.). La micoeterotrofia è infatti importante per l'ecologia delle *Ophioglossaceae* in diversi modi. Da una parte l'apporto nutrizionale del fungo simbionte consente a queste felci di resistere a ripetuti danni causati da erbivori, alla dormienza prolungata, o alla crescita anche in condizioni di scarsità di luce (KELLY, 1994; MONTGOMERY, 1990; MULLER, 2000). D'altra parte, è proprio la micoeterotrofia il principale fattore limitante per la loro distribuzione e abbondanza (JOHNSON-GROH, 1999), visto che alle loro esigenze ecologiche si aggiungono quelle del partner fungino. La necessità della simbiosi obbliga i gametofiti ad una vita sotterranea che, se da una parte garantisce loro un ambiente tamponato rispetto alle fluttuazioni climatiche e alle minacce esterne (tagli, calpestio, ecc.), dall'altra è la causa della bassa variabilità genetica della maggior parte delle *Ophioglossaceae* dovuta all'alta frequenza di *inbreeding* (CHADDE, KUDRAY, 2001), come descritto nel Par. 2.4.5. Inoltre, anche i giovani sporofiti hanno crescita ipogea che può durare anni prima dello sviluppo al di sopra della superficie e durante questo periodo la mortalità può essere anche molto elevata (PECK *et al.,* 1990; MULLER, 1993).

Distribuzione

Specie tipicamente W-europeo-atlantica (Fig. 3.3), il suo areale comprende la Macaronesia, le regioni atlantiche di Penisola Iberica, Francia, Gran Bretagna e Islanda, con presenze disgiunte nel Centro Europa e nella regione mediterranea (SALVO TIERRA, 1990).

Specie rarissima in Italia, dove è presente solo in Toscana (Fig. 3.4), conosciuta in passato per alcune stazioni in provincia di Lucca (SOSTER, 2001). Indicata per errore per la parte settentrionale della Sardegna da JALAS e SUOMINEN (1972) e su questa segnalazione si basa la citazione di PICHI SERMOLLI (1979) e forse quella di Dostal (in HEGI, 1984) (SCOPPOLA; SPAMPINATO, 2005).

La sua distribuzione è in forte regressione (Fig. 3.4), infatti, una delle due stazioni note sulle Alpi Apuane risulta distrutta e nell'altra, apparentemente non disturbata, sembra che *O. azoricum* sia scomparso perché non più osservato negli ultimi venti anni (BALDERI, GIOVANNINI, 2003; MARCHETTI, 2004), così come nella stazione dei Sassi Grossi, presso Filettole (PI), popolazione con pochi individui cresciuti fra rocce e pietra su calcare massiccio, dove l'ultima osservazione risale al 1987 (CALBI, 2006). È tuttora presente sul Monte Pisano (LU) presso la Sella di Monte Cotrozzi, sopra S. Maria del Giudice (LU), 210-540 m s.l.m., dove è diffuso su una superficie molto ristretta, anche se la popolazione risulta costituita da numerosi individui che vegetano su un sottile strato di terra fra rocce affioranti, in vicinanza di un sentiero (BALDERI, GIOVANNINI, 2003). Le 2 recenti segnalazioni per il Monte Pisano (stazioni del Monte Pianello e sul versante Nord del Monte Moriglion di Penna) (GIOVANNINI, PIERINI, 2006) sono probabilmente da considerarsi erronee, perché gli individui indicati come *O. azoricum* sono chiaramente diversi per caratteri morfologici e citologici e per certi versi più affini ad *O. vulgatum*, con cui convivono (PERUZZI *et al.,* 2008).

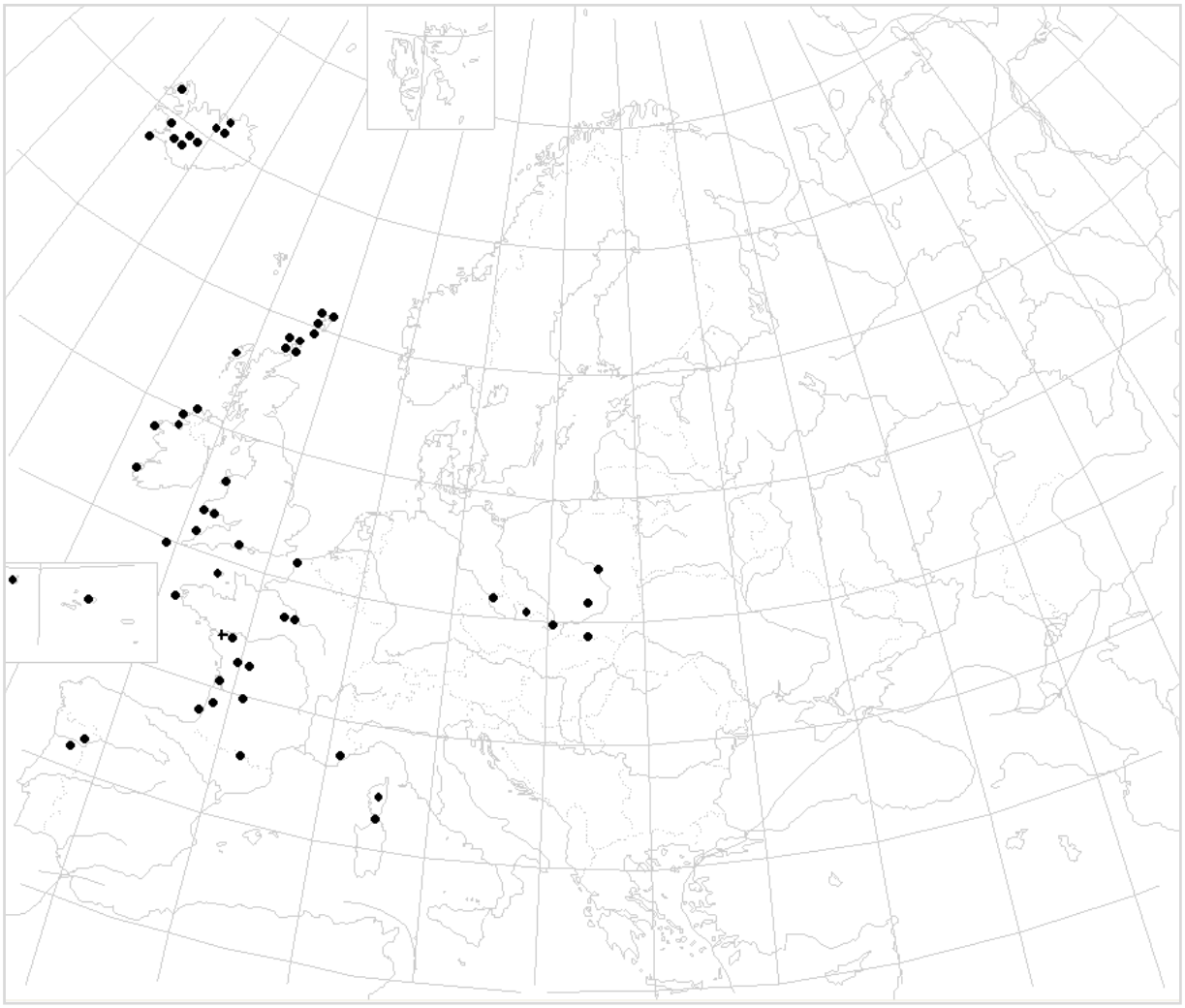


Fig. 3.3 - Distribuzione di *Ophioglossum azoricum* secondo *Atlas Florae Europaeae* (JALAS, SUOMINEN, 1972).

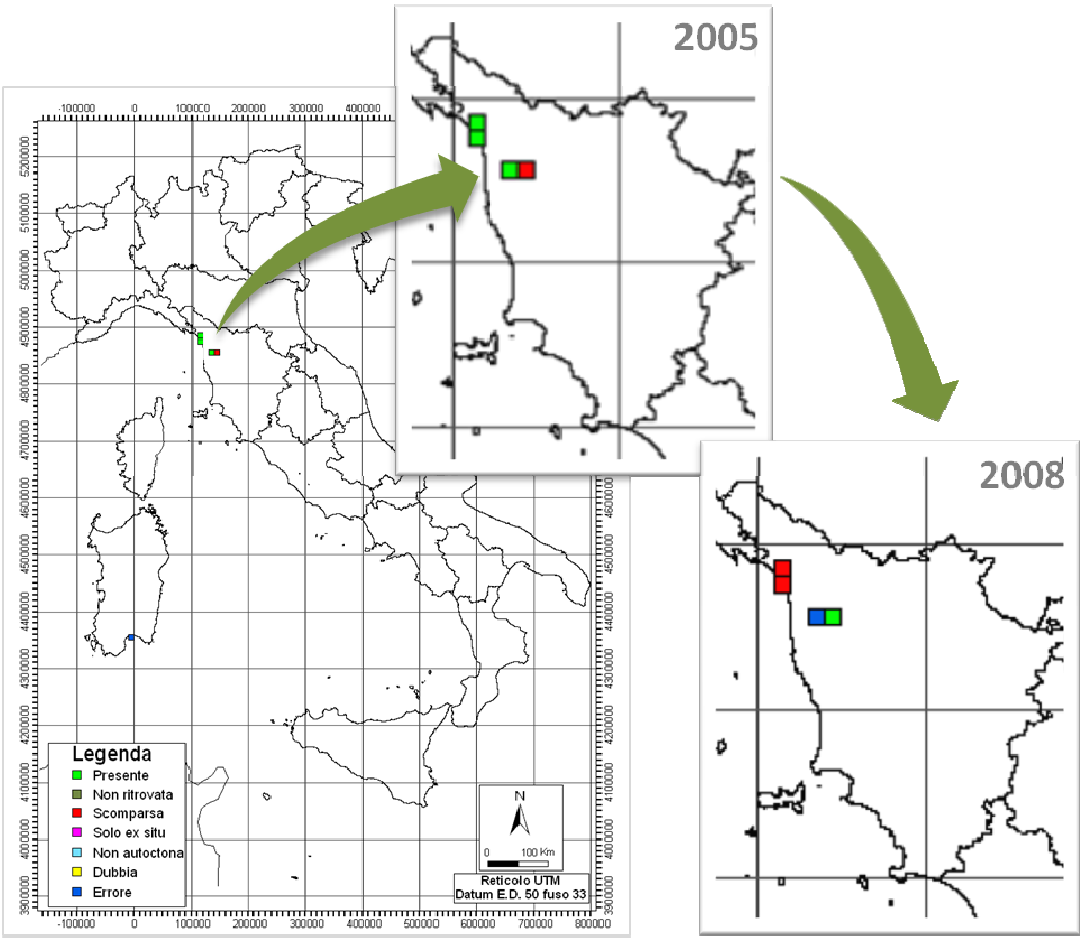


Fig. 3.4 - Distribuzione di *Ophioglossum azoricum* in Italia (SCOPPOLA, SPAMPINATO, 2005 e PERUZZI *et al.,* 2008, modificato).

***Status* di rischio**

Specie rarissima e sicuramente a rischio in Italia, anche se considerata "a minor rischio" nelle Liste Rosse (CONTI *et al.,* 1997). Recentemente *O. azoricum* è stato valutato secondo i criteri IUCN (2001) a livello regionale *sensu* IUCN, risultando "gravemente minacciato" in Italia: CR B2ab(i) (PERUZZI *et al.,* 2008). Infatti, la superficie occupata (AOO) estremamente ridotta, è pari a 4 Km^2 (criterio B2), e la stazione della Sella del M. Cotrozzi è l'unica *location* italiana sulla base della *Minaccia 10.6: Disturbo antropico* (secondo la codifica IUCN-CMP, 2006). La stazione è molto frequentata per operazioni di taglio, accumulo e trasporto di legnami dai boschi circostanti. Per questo motivo il piccolo pianoro dove la specie cresce viene spesso calpestato o parzialmente rovinato. Inoltre la sua distribuzione presenta un declino continuo: era diffusa sino a qualche decennio fa anche sulle Alpi Apuane ed è presente ormai in una sola località, dove risulta minacciata anche dalla lenta ma costante invasione di camefite legnose, soprattutto *Cistus*, e da fattori intrinseci alla specie (gametofiti micorrizzati sotterranei, dispersione per spore a breve distanza a causa delle ridotte dimensioni della pianta), che ne limitano la capacità di dispersione.



Fig. 3.5 - Aggiornamento dello *status* di rischio di *Ophioglossum azoricum* in Italia.

Criticità tassonomiche

Ophioglossum azoricum ha caratteristiche intermedie fra *O. vulgatum* e *O. lusitanicum* L., le altre 2 specie presenti in Italia. Per questo motivo e per l'estrema variabilità dei suoi caratteri morfologici che dipendono anche dall'età della pianta, spesso risulta difficile discriminarlo con sicurezza soprattutto da *O. vulgatum*, tanto che fino al 1845 è stato considerato una sua sottospecie o varietà (subsp. *ambiguum*, subsp. *polyphyllum,* var. *islandicum*, var. *minus*), ma anche dalle forme maggiori di *O. lusitanicum*.



Fig. 3.6 - *Habitus* e forma delle fronde in *Ophioglossum*: a) *O. vulgatum*, b) *O. azoricum*, c) *O. lusitanicum* (PAUL, 1987).

Per esempio, il popolamento del Monte Cotrozzi citato in precedenza, presenta costantemente una sola fronda sterile ed altre caratteristiche peculiari (minori dimensioni delle spore, maggiori quantità di DNA) che la rendono ben distinguibile dal tipico *O. azoricum*, rispetto a quanto riportato dagli specialisti.

Allo stesso modo, una delle 3 popolazioni di *Ophioglossum sp.* rinvenute nel 2006 all'interno della Selva del Lamone (comuni di Farnese e Ischia di Castro, Viterbo) nelle immediate vicinanze della stazione nota di *O. vulgatum* (SCOPPOLA, LATTANZI, 1990; SCOPPOLA *et al.,* 1996), ha mostrato caratteristiche

morfologiche che si differenziano da quelle di *O. vulgatum* e sono riconducibili ad *O. azoricum*, come il numero di sporangi per lato, le piccole dimensioni delle piante e, soprattutto, la presenza di 2 foglie in tutti gli individui. La distanza dall'areale storico di *O. azoricum* e la difficoltà di ottenere risultati univoci e inequivocabili con il classico approccio tassonomico, cioè attraverso l'uso di chiavi dicotomiche, ha portato alla necessità di intraprendere uno studio morfologico integrato per definirne l'esatta determinazione e riuscire a discriminare fra le 3 specie presenti in Italia (Par. 3.4.).



Fig. 3.7 - A sinistra, *Ophioglossum azoricum* sul Monte Pisano (foto di Brunello Pierini, aprile 2007) e, a destra, *Ophioglossum sp.* nella Selva del Lamone (21 aprile 2007).

3.1.2. *Ophioglossum vulgatum*

Tassonomia

Classe *Psilotopsida*

Ordine *Ophioglossales*

Famiglia *Ophioglossaceae* C. Presl

Genere *Ophioglossum* L.

Ophioglossum vulgatum L., Sp. Pl. 2: 1063. 1753.

Sinonimi:

Ophioglossum alpinum Rouy

Ophioglossum pycnostichum (Fern.) A.& D. Love

Ophioglossum vulgatum var. *pycnostichum* Fern.

Ophioglossum mironovii Sumnev.

Ophioglossum ovatum Salisb.

Ophioglossum spicatum Stokes

Protologo: "*Fronda ovata. Habitat in Europae pratis sylvaticis.".*

Biologia

Felce eusporangiata tetraploide, con numero cromosomico: 2n=480 (SALVO TIERRA, 1990), la maggiore e la più diffusa delle tre specie del genere presenti in Italia (SOSTER, 2001).

Pianta di 10-35 cm, con radici lassamente fascicolate e rizoma sotterraneo molto breve, irregolarmente cilindrico-subgloboso, eretto ed afillo. Le nuove piante derivano da gemme avventizie sulle radici. Per ogni rizoma si sviluppa generalmente una fronda (più raramente 2) con vernazione conduplicata, suddivisa in due parti: una lamina sterile, di 2-5 x 3-12 cm, da largamente lanceolata a ovata, a base rotonda o più o meno attenuata, che si sviluppa sopra il livello del terreno. Nervatura secondaria non anastomosata, libera dentro le maglie dei nervi primari.

Lo sporoforo non ramificato e più o meno mucronato è lungo 2-6 cm e portato da un peduncolo che supera largamente la lunghezza della lamina sterile. È composto da 11-50 eusporangi sessili per lato, a deiscenza trasversale rispetto all'asse dello sporoforo. Spore trilete, subglobose, reticolato-verrucose, di (22-)28-35(-38) µm di diametro equatoriale (SALVO TIERRA, 1990; PRELLI, 2001; SOSTER, 2001; MARCHETTI, 2004). Sporifica nel periodo marzo-luglio (PIGNATTI,1982; MARCHETTI, 2004).

Come in tutte le *Ophioglossaceae* i gametofiti sono ipogei e micoeterotrofi (vedi Par. 2.4.5).

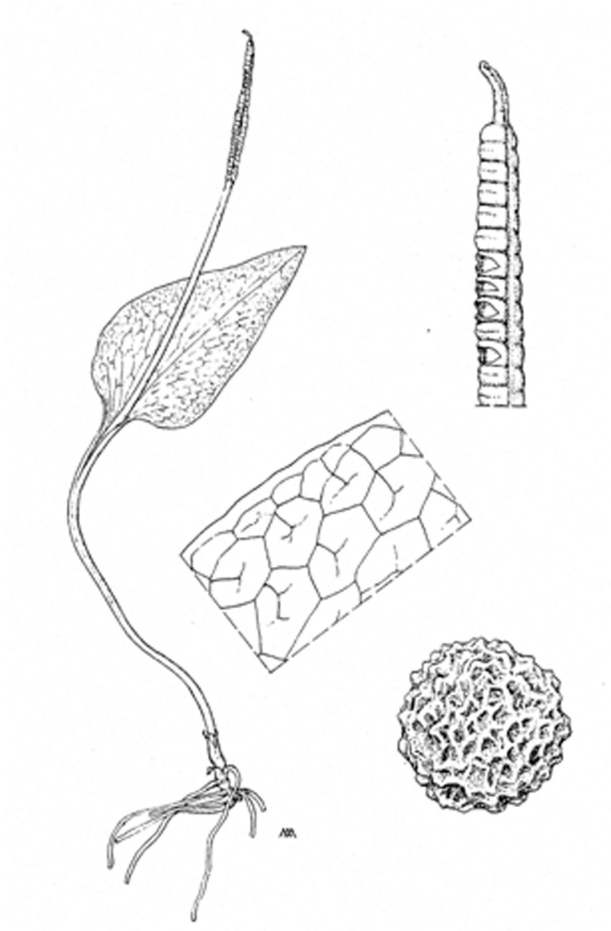


Fig. 3.8 - *Ophioglossum vulgatum*, con lamina sterile e sporoforo; a destra, particolare dello sporoforo, nervatura della lamina e spora (ARRIGONI, 2006).

Ecologia

Specie piuttosto eliofila, che si ritrova in habitat come, prati igrofili e torbosi, acquitrini, bordi di ruscelli, boschi ed arbusteti umidi, dal livello del mare fino a 1700 m s.l.m. (PIGNATTI, 1982; SOSTER, 2001; MARCHETTI, 2004). *O. vulgatum* è considerato generalmente una specie di prati umidi e torbosi caratteristici dell'alleanza *Molinion caeruleae*, che occasionalmente si rinviene in comunità vegetali dell'*Agropyro-Rumicion* o *Arrhenatherion* (BADRÉ, DESCHATRES, 1979; OBERDORFER, 1990; OELLGAARD, 1993; PAGE, 1997). Questa specie è stata segnalata anche in comunità forestali, soprattutto querceti misti e querco-frassineti del *Carpinion* (TALLOWIN, SWINSCOW, 1986; MULLER, 2000), per esempio in Germania (BENKERT, 1982), in Francia (PRELLI, BOUDRIE 1992; MULLER, 2000) e in Italia (SCOPPOLA, LATTANZI, 1990; SOSTER, 2001), che, secondo MULLER (2000), rappresentano l'habitat primario per questa specie.

Appare in regresso per le stesse caratteristiche di scarsa competitività e sensibilità alle fluttuazioni ambientali già descritte per *O. azoricum*.

Distribuzione

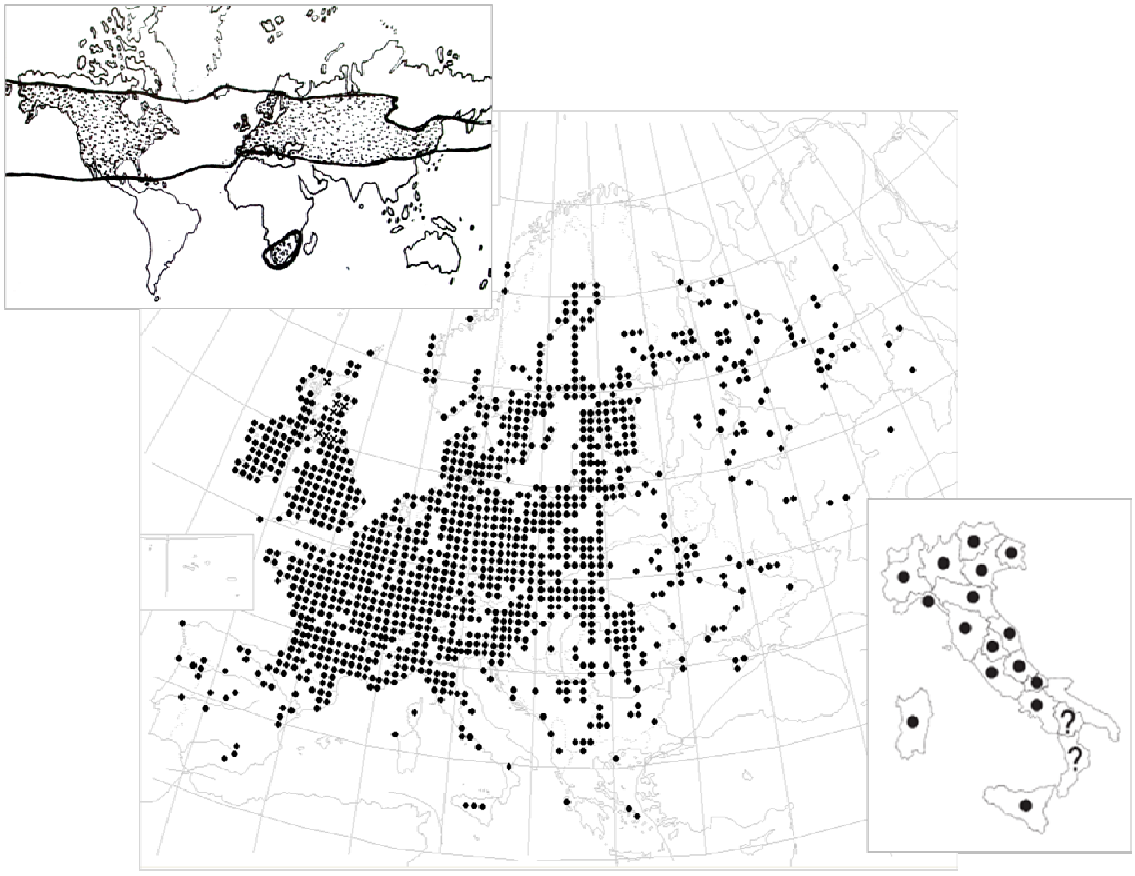


Fig. 3.9 - Distribuzione di *Ophioglossum vulgatum* in Europa secondo *Atlas Florae Europaeae* (JALAS, SUOMINEN, 1972); in alto a sinistra, l'areale globale (SALVO TIERRA, 1990) e, in basso a destra, la distribuzione in Italia (MARCHETTI, 2004, modificato con i dati di CONTI *et al.,* 2005).

Specie circumboreale, il suo areale comprende le regioni temperate e fredde dell'emisfero Boreale in Europa, Asia, Africa e America, con una presenza disgiunta anche nell'Africa Australe. Nelle aree più calde del nostro emisfero, diventa sempre più rara andando verso Sud, tanto che nella regione mediterranea la sua distribuzione è estremamente frammentata.

In Italia è presente in quasi tutte le regioni (tranne Valle d'Aosta, Puglia, Basilicata e Calabria), da comune a rarissima procedendo verso sud (MARCHETTI, 2004; CONTI *et al.,* 2005a).

Status di rischio

In Italia, non è segnalata come minacciata a livello nazionale, ma risulta a rischio nella maggior parte delle regioni: [LR] in Trentino Alto Adige, Veneto e Toscana, [VU] in Abruzzo e Lazio, [EN] in Emilia Romagna, Marche, Umbria, Molise e Sicilia, [CR] in Liguria e Sardegna (CONTI *et al.,* 1997).



Fig. 3.10 - *Status* di rischio di *Ophioglossum vulgatum* nelle varie regioni italiane (dati di CONTI *et al.,* 1997).

3.1.3. *Osmunda regalis*

Tassonomia

Classe *Polypodiopsida*

Ordine *Osmundales*

Famiglia *Osmundaceae*

Genere *Osmunda* L.

Osmunda regalis L., *Sp. Pl.: 1065. 1753.*

Sinonimi:

Osmunda longifolia (C. Presl) A.E. Bobrov

Osmunda regalis L. var. *longifolia* C. Presl

Osmunda regalis L. var. *spectabilis* (Willd.) Gray

Osmunda plumieri Tausch

Ophioglossum osmunda Stokes

Struthiopteris regalis (L.) Bernh.

Protologo: **"***Fronda bipinnata apice racemifera. Scapo paniculato polyphyllo. Osmunda frondibus caulinis simpliciter pinnatis: pinnis lanceolatis. Habitat in Europa, Virginia ad fluvios."*

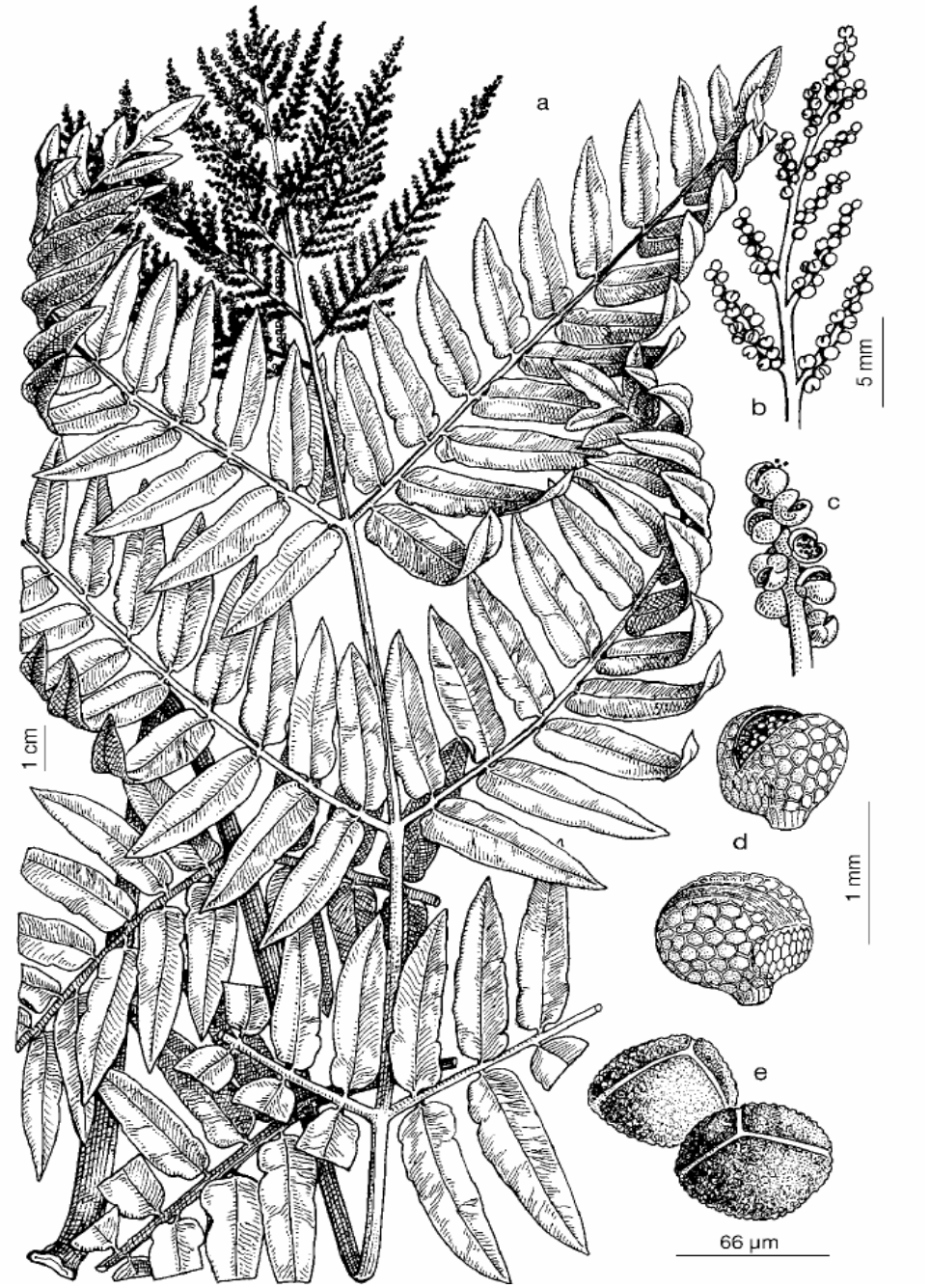


Fig. 3.11 - *Osmunda regalis*: a) fronda fertile; b) apice della fronda fertile; c-d) sporangio; e) spore (CASTROVIEJO *et al.,* 1986).

Biologia

Felce leptosporangiata diploide (2n=44) (SALVO TIERRA, 1990) a riproduzione sessuale.

Rizoma grosso, nerastro, spugnoso-legnoso, con resti di stipiti. Fronde grandi, glabre, prive di palee, della durata di un anno, fascicolate, erette, alte fino a 2,5 m e larghe 20-60 cm. Hanno stipite breve e lamina da oblunga ad ovata, bipinnata, con pinnule picciolate, asimmetriche e un po' falcate, lunghe fino a 9 cm, a margini da interi a seghettati.

Le fronde fertili sono del tutto simili alle sterili tranne che nell'estremità superiore, dove le pinne sono trasformate in pannocchie molto ricche e ramificate, con gli sporangi disposti lungo gli assi delle pinnule ridotti alla sola nervatura. Gli sporangi sono vicini tra loro ma separati, grossi appena peduncolati, con parete poco spessa ed *anulus* rudimentale.

Spore trilete clorofilliane a pareti sottili, molto numerose per ogni sporangio, di 48-60 µm. Sporificazione da maggio a settembre (SALVO TIERRA, 1990; MARCHETTI, 2004).

Ecologia

Specie tipicamente igrofile e sciafila, termofila e calcifuga, che tende a colonizzare substrati a moderata acidità (SALVO TIERRA, 1990; MARCHETTI, 2004). Vive in habitat come torbiere, acquitrini, paludi, ruscelli, luoghi boschivi umidi, da 0 a 1250 m s.l.m. (MARCHETTI, 2004), mentre nel Viterbese è legata a stazioni di forra in prossimità di acque sulfureo-ferrugginose (MAGRINI *et al.,* 2006).

Distribuzione

Specie subcosmopolita con distribuzione mondiale connessa alle zone con clima suboceanico. In Europa assume il significato di relitto terziario in coerenza con l'esistenza di aree rifugio dove si sono mantenute particolari condizioni microclimatiche durante le glaciazioni del Quaternario (PICHI SERMOLLI, 1979; LANDI, ANGIOLINI, 2007). Il suo areale comprende le regioni temperate e calde di Europa, Asia, Africa e America. In particolare, in Europa si distribuisce fondamentalmente nell'area occidentale e nella regione mediterranea (SALVO TIERRA, 1990).

***Status* di rischio**

In Italia è abbastanza comune solo in Toscana e Sardegna, è presente in Piemonte, Lombardia e Veneto dove risulta [LR], in Liguria [EN], in Sicilia [VU], in Emilia Romagna e Calabria dove risulta [CR]. Nel Lazio risulta rarissima e non più ritrovata in 4 regioni: Valle d'Aosta, Friuli-Venezia Giulia, Abruzzo e Campania (CONTI *et al.,* 1997; MARCHETTI, 2004; CONTI *et al.,* 2005). Considerando la frammentazione delle sue popolazioni soprattutto nell'Italia Centrale (LANDI, ANGIOLINI, 2007), possiamo assumere che la sua sopravvivenza sia strettamente legata alla disponibilità di habitat idonei che, anche per l'effetto dei cambiamenti climatici, potranno essere soggetti in futuro ad ulteriore frammentazione, con il

conseguente isolamento di popolazioni e cambiamenti nella distribuzione ed abbondanza della specie (GIVEN, 1993; LESICA, McCUNE, 2004; LANDI, ANGIOLINI, 2008).

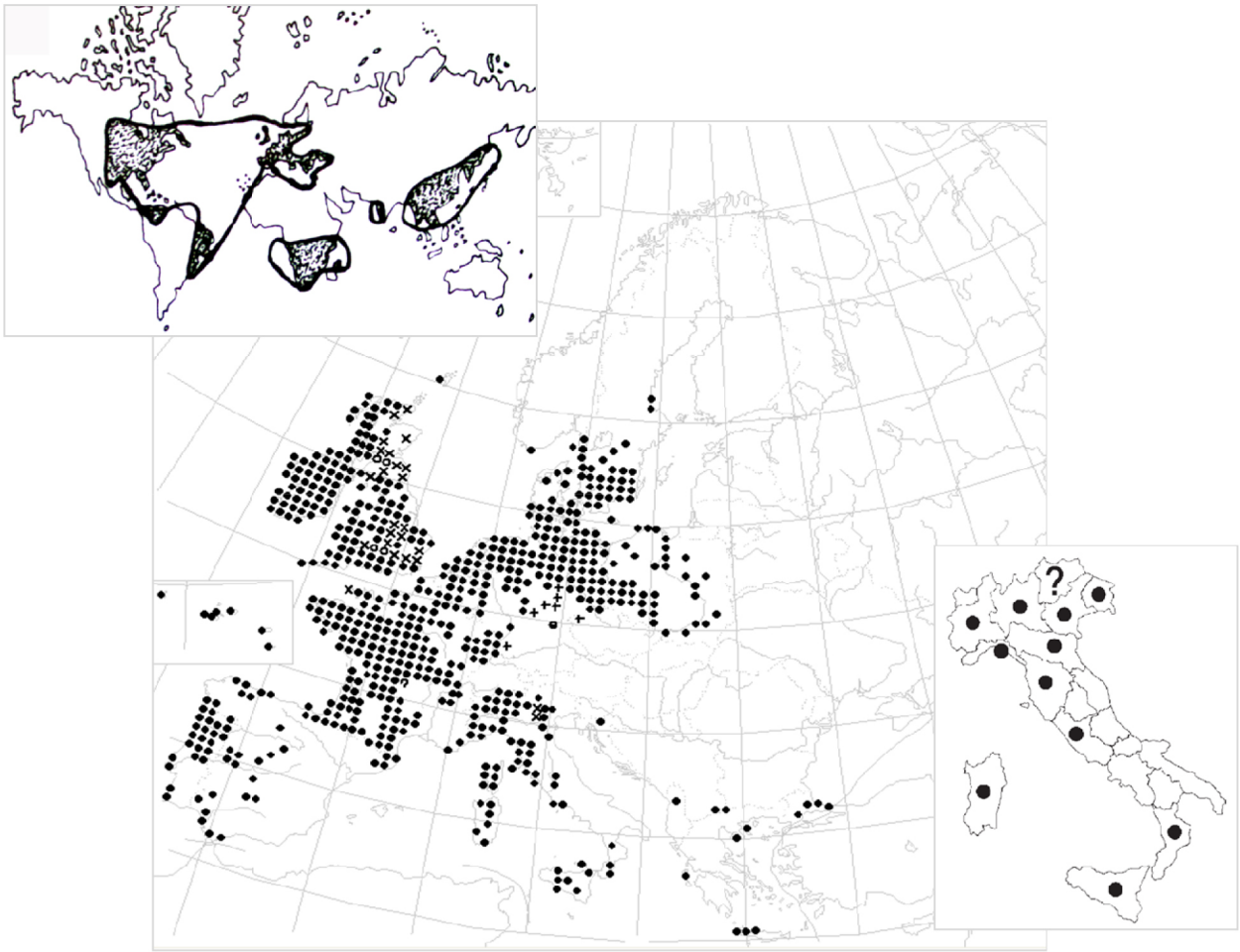


Fig. 3.12 - Distribuzione di *Osmunda regalis* in Europa secondo *Atlas Florae Europaeae* (JALAS, SUOMINEN, 1972); in alto a sinistra, l'areale globale (SALVO TIERRA, 1990) e, in basso a destra, la distribuzione in Italia (MARCHETTI, 2004, modificato con i dati di CONTI *et al.,* 2005).

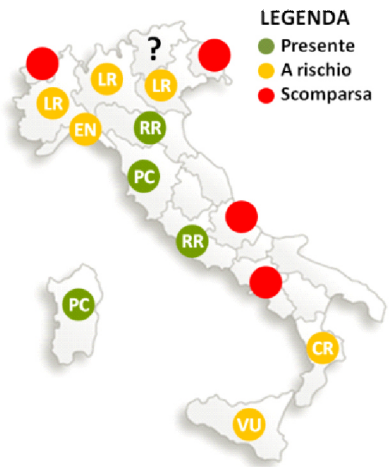


Fig. 3.13 - *Status* di rischio di *Osmunda regalis* (secondo CONTI *et al.,* 1997) e sua distribuzione aggiornata nelle regioni italiane (MARCHETTI, 2004; CONTI *et al.,* 2005).

Criticità

Osmunda regalis produce spore clorofilliane, metabolicamente attive e con un alto contenuto in acqua. Come evidenziato nel Par. 2.2.2., queste spore germinano più rapidamente di quelle dormienti, entro pochi giorni dalla dispersione, passando alla fase di crescita con relativa facilità quando si trovano in condizioni di umidità idonee. La loro longevità, in natura, si può misurare in giorni o settimane e non in mesi o anni come per le spore dormienti, ulteriormente influenzata in modo negativo dalla disidratazione, dal momento che non hanno nessuna difesa dal disseccamento, per la mancanza di perina e per l'esina estremamente sottile. L'autoecologia della specie, tipicamente igrofila e sciafila, garantisce un ambiente idoneo per la germinazione e per le successive fasi del ciclo riproduttivo, ma le esigenze ecologiche delle spore e la loro scarsa longevità non ne consentono una grande diffusione.
Le spore clorofilliane, hanno un contenuto in acqua di circa il 17% (LLOYD, KLEKOWSKI, 1970) e, non tollerando la disidratazione, possono essere definite "recalcitranti" e sono, quindi, difficili da conservare *ex situ*. Ad oggi sono molto pochi i dati disponibili in letteratura (PENCE, 2000; 2002; BALLESTEROS *et al.,* 2004; 2005) e non esiste un protocollo standard applicabile per la loro conservazione.

3.1.4. *Dryopteris tyrrhena*

Tassonomia

Classe *Polypodiopsida*

Ordine *Polypodiales*

Famiglia *Dryopteridaceae*

Genere *Dryopteris* Adans.

Dryopteris tyrrhena Fraser-Jenk. & Reichst., in Fern Gaz. 11: 180

Sinonimi:

≡ *Aspidium nevadense* Boiss., Elench. Pl. Nov. (1838: 93) [nom. subst.], non *D. nevadensis* (Baker) Underw. (1893)

≡ *Aspidium rigidum* "forma pinnatisecta" Milde (1867: 127), *nomen invalidum*

≡ *A. rigidum* var. *nevadense* (Boiss.) Luersen (1889: 408, 410)

≡ *Dryopteris rigida* var. *nevadense* (Boiss.) C. Christensen (1906: 84)

≡ *Nephrodium rigidum* (Sw.) Desv. subsp. *nevadense* (Boiss.) Rouy

≡ *Dryopteris filix-mas* subsp. *rigida* var. *nevadensis* (Boiss.) Litardière (1924: 123)

≡ *D. villarii* var. *nevadensis* (Boiss.) Fiori (1943: 113)

- *Aspidium filix-mas* var. *glandulosum* auct. non Milde (1867: 123)

- *Dryopteris filix-mas* var. *glandulosa* auct. pro parte, non (Milde) Briquet (1910: 10-11)

- *Nephrodium filix-mas* (L.) Rich. race *rigidiformis* auct. parte, non Rouy (1913: 408)

- *Dryopteris litardierei* sensu Rothmaler (1945: 94-95, pro hybr. *D. paleacea x pallida*)

≡ sinonimi omotipici o nomenclaturali: nomi differenti che si riferiscono però allo stesso tipo (un tipo in botanica è l'esemplare sui cui l'autore ha effettuato la descrizione della specie).
= sinonimi eterotipici o tassonomici: sono invece riferiti a tipi differenti e spesso possono essere messi in discussione dalle nuove ricerche tassonomiche o filogenetiche. Derivano molto spesso da differenti criteri di suddivisione all'interno di un genere o di una specie.
- nomi non seguiti

Protologo: Edmond BOISSIER, 1838- Elenchus plantarum novarum minusque cognitarum quas in itinere Hispanico: 93, sub *Aspidium nevadense* "*Stipite paleaceo 1-2-pedali, fronde subbipinnata, rachi paleacea, pinnis triangulari-lanceolatis inferioribus pinnatis superioribus pinnatifidis, pinnulis ovatis argute serratis, subtus eximie punctulato-glandulosis, soris ad basin pinnularum confertis. Hab. in rupibus Sierra Nevada alt. circ. 8000'.*"

Typus: *Aspidium nevadense* Boiss. Sierra Nevada, southern Spain, c. 8000'. *legit* Boissier April, 1837 (G) (Fig. 3.14).



Fig. 3.14 - *Typus* di *Aspidium nevadense* Boiss. conservato in G (immagine tratta da FRASER-JENKINS *et al.,* 1975) e saggio di *D. tyrrhena* in BGBM proveniente dal Monte Spada (NU), *legit* Reichstein, 25/07/1974.

Secondo la corrente nomenclatura *Aspidium nevadense* Boiss. è membro del genere *Dryopteris* Adans., ma in accordo con il codice non è possibile usare la combinazione *Dryopteris nevadensis* perché già utilizzata per una specie americana, *Nephrodium nevadense* Baker trasferito in *Dryopteris nevadensis* (Baker) Unerw. nel 1893. Per questo motivo, Fraser-Jenkins et al. hanno proposto la combinazione nuova: *Dryopteris tyrrhena* Fraser-Jenk. & Reichst., in Fern Gaz. 11: 180.

Diagnosis: *"A D. filix-mas differt: 1. lamina ad basim versus saepissime minus angustata: 2. segmentis secundariis (minoribus ad fines frondis pinnarumque exemptis) ± ovalibus, saepe magis distantibus, basi saepe paulum angustatis minusque confluentibus, apice ± rotundatis 0.5-1 mm longe acute denticulatis; 3. lamina indusiis rachidique inclusis utraque pagina pilis glanduliferis brevibus dense vestita."*



Fig. 3.15 - A sinistra: saggio in FI di *Dryopteris villarii* v. *australis* (Guod.) f. *nevadensis*, *legit* Fiori, 1937, revisionato come *D. tyrrhena*, da Nardi nel 1978, dopo varie revisioni di altri autori. A destra: saggio in BGBM raccolto a Pont-de-Labeaume, *legit* Jessen, 10/08/1993.

Biologia

Dryopteris tyrrhena (*Leptosporangiatae*), specie allotetraploide (2n=164), probabilmente derivata per ibridazione intraspecifica tra le specie diploidi (2n=82), *D. oreades* Fomin e *D. pallida* (Bory) Maire & Petitm., e successiva duplicazione cromosomica.

Felce con fronde più o meno persistenti, odorose e fittamente ghiandolose in ogni parte, lunghe fino a 6 dm. Stipite più corto della lamina, anche di molto, con palee larghe e chiare, abbondanti verso il piede e sempre più rare superiormente e sulla rachide. Lamina lanceolata, raramente fino a 3 volte incompletamente divisa, poco coriacea, di colore verde con sfumatura giallastra o brunastra. Pinne non molto numerose, le inferiori un po' decrescenti o subeguali alle medie, le basali talora un po' asimmetriche. Pinnule di forma variabile, adnate o al più picciolettate nella coppia prossimale delle pinne inferiori, con bordi da distintamente ad abbastanza profondamente lobulati, ad apice rotondato, con denti ben sviluppati, acuti, rivolti verso l'interno. Indusio reniforme spesso, con margine revoluto, grigio-verdastro e ghiandoloso. Spore monolete di (32)40-42(46) µm. Il periodo di sporificazione va da giugno a settembre (FRASER-JENKINS *et al.,* 1975; CASTROVIEJO *et al.,* 1986; SALVO TIERRA, 1990; PRELLI, 2001; SOSTER, 2001; BERNARDELLO, MARTINI, 2004; MARCHETTI, 2004)

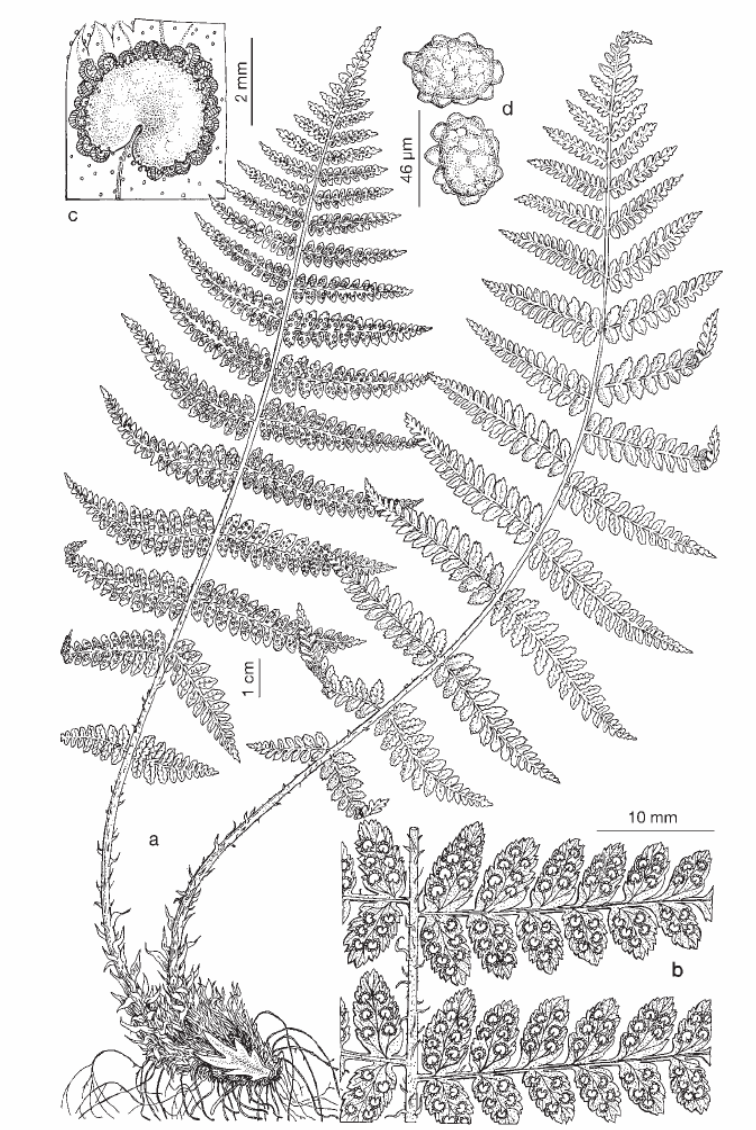


Fig. 3.16 - *Dryopteris tyrrhena*: a) *habitus*; b) dettaglio della parte inferiore della lamina; c) soro con indusio; d) spora. Iconografia tratta da *Flora Iberica* (CASTROVIEJO *et al.,* 1986) disegnata dal saggio MA 172756, Las Lagunillas, Sierra Nevada, Granada.

Ecologia

Habitat: zone boscose e arbustive dove colonizza anfratti e fessure di rocce di natura silicea, dove si accumula un protosuolo umico e umido, ma anche detriti alla base di pareti rocciose e muri a secco. Mostra grande elasticità altitudinale, dal piano basale in Liguria e nell'Arcipelago Toscano, a quello montano, in Sierra Nevada, in Corsica o sul Monte Spada, con un *range* che va dai 25 ai 2500 m s.l.m. (SALVO TIERRA, 1990; SOSTER, 2001; BERNARDELLO, MARTINI, 2004; MARCHETTI, 2004).

È indicata come silicicola (SALVO TIERRA, 1990; SOSTER, 2001; BERNARDELLO, MARTINI, 2004; MARCHETTI, 2004) e calcifuga (PRELLI, BOUDRIE, 1992), vive infatti su micascisti in Sierra Nevada (BAÑARES BAUDET *et al.,* 2004) e le stazioni liguri sono tutte su arenaria (MARCHETTI, 2004), ma la pianta è nota anche per substrati meno acidi, come a Pont-de-Labeaume su rocce basaltiche (PRELLI, BOUDRIE, 1992) e, soprattutto, a Mallorca, unica stazione dove vive su calcare (ROSSELLÓ *et al.,* 1989).

Distribuzione

Orofita tirrenica, endemica del Mediterraneo occidentale con un areale piuttosto disgiunto che conta uno scarso numero di popolazioni frammentate e costituite da pochi esemplari. La sua attuale distribuzione induce ad ipotizzare un'origine ibero-provenzo-tirreniana, mentre la frammentazione dell'areale e le distanze che separano le singole stazioni fanno propendere per una genesi assai antica (BERNARDELLO, MARTINI, 2004).

Il suo areale comprende Spagna, Francia e Italia. In Spagna è presente in Andalucia, sulla Sierra Nevada, Barranco del Dilar (Granada) (CASTROVIEJO *et al.,* 1986; BAÑARES BAUDET *et al.,* 2004;), e sul Puig Major (Mallorca, Baleares) (ROSSELLÓ *et al.,* 1989).

Estremamente rara nella Francia continentale, presente solo in due località, Vallèe de la Roya (Alpes Maritimes) (PRELLI, BOUDRIE, 1992; PRELLI, 2001) e Cévennes, presso Pont-de-Labeaume (Ardeche) (JESSEN *et al.,* 1994), mentre è molto più diffusa in Corsica dove è segnalata sia per le zone costiere, come La Trinite, presso Bonifacio, e Calanche de Piana, che per le aree montuose, M. Renoso, il massiccio di Cinto, Asco, le sommità di Cap Corse, M. Stello e M. Canneto (FRASER-JENKINS *et al.,* 1975; PRELLI, BOUDRIE, 1992; PRELLI, 2001).

In Italia è presente solo in Liguria, Toscana e Sardegna (SOSTER, 2001; MARCHETTI, 2004; SCOPPOLA, SPAMPINATO, 2005). In particolare, la sua distribuzione in Toscana riguarda solo l'Arcipelago Toscano: Isola di Capraia, Vado del Capo, presso Cala della Mortola (FRASER-JENKINS *et al.,* 1975; BERTACCHI *et al.,* 2005a,b); varie località sull'Isola di Montecristo, Collo dei Lecci, nel Vallone di cala Maestra , presso la grotta del Santo e presso il convento (NARDI, 1979); e sull'Isola d'Elba, nei pressi di Marciana Marina, verso Ripa Barata (FRASER-JENKINS *et al.,* 1975; FOSSI INNAMORATI, 1983). In Sardegna è stata segnalata solo per due località (ARRIGONI, 2006) sul Montiferru presso Santulussurgiu (Oristano) (NARDI, 1979) e sul Gennargentu presso la vetta del M. Spada (FRASER-JENKINS *et al.,* 1975), mentre in

Liguria è abbastanza frequente nella provincia di La Spezia, lungo le coste da Deiva Marina a Campiglia, Valle di Vara a Piana Battolla, dove ha chiaro carattere relittuale per la prossimità delle stazioni al limite settentrionale dell'areale complessivo (MARCHETTI, 1984; 1985; BERNARDELLO, MARTINI, 2004; MARCHETTI, 2004).



Fig. 3.17 - Distribuzione nota di *Dryopteris tyrrhena.*

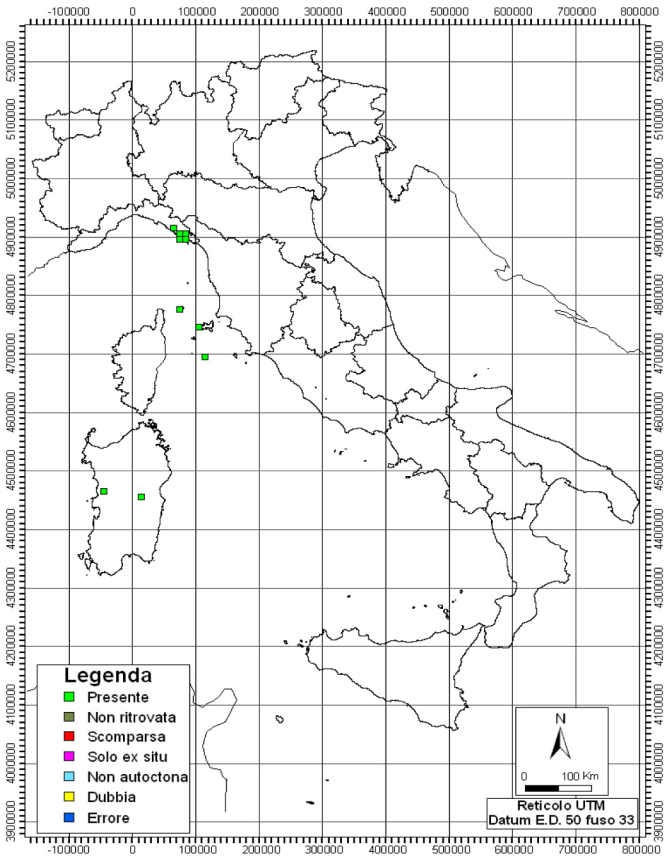


Fig. 3.18 - Mappa di distribuzione di *Dryopteris tyrrhena* in Italia (SCOPPOLA, SPAMPINATO, 2005)

Status di rischio

Risulta gravemente minacciata in Spagna CR B1ab(v)+2ab(v); C2a(i) (BAÑARES BAUDET *et al.,* 2004; MORENO, 2008), in Sierra Nevada VU D2 (BLANCA *et al.,* 2002) e nelle Baleari CR C2 a(i,ii), D (SÁEZ, ROSSELLÓ, 2001).

In Francia è nell'elenco delle specie da proteggere a livello nazionale, presente nell'*Annexe I* dell'*Arrêté du 20 janvier 1982 modifié - Arrêté du 31 août 1995 - relatif à la liste des espèces végétales protégées sur l'ensemble du territoire national*, e protetta anche a livello regionale in Provence-Alpes-Côte d'Azur.

In Italia è specie vulnerabile a livello nazionale, così come a livello regionale in Liguria e Toscana e gravemente minacciata in Sardegna (CONTI *et al.,* 1992; 1997).



Fig. 3.19 - Status di rischio di *Dryopteris tyrrhena*

Criticità tassonomiche

Spesso confusa con altre specie del genere, come *D. villarii, D. pallida, D. filix-mas, D. submontana e D. oreades*, necessita dell'osservazione di caratteri micro- e macromorfologici per una corretta determinazione, che tuttavia, soprattutto in campioni incompleti, può non essere agevole.

Si elencano di seguito alcuni caratteri morfologici che possono aiutare nella discriminazione di *D. tyrrhena* dalle altre specie, così come riportati da FRASER-JENKINS et al. (1975).

CARATTERI	*D. pallida*	*D. tyrrhena*	*D. filix-mas*	*D. oreades*
Dimensioni della fronda	(10-) 30-70 cm	10-50 (-60) cm	30-80 (-120) cm	20-70 (-90) cm
Lunghezza relativa delle pinnule verso la base	Non o scarsamente ridotte	Di solito leggermente ridotte	Di solito distintamente ridotte	Assottigliate marcatamente quanto le mediane
Coppie di pinne più lunghe (contando dalla base)	Numero 1-5	Numero (1-)3-6	Numero(4-)6-14	Numero (6-)8-16
Parte più larga della	Molto al di sotto della	Solo un po' al di sotto	Solo un po' al di sopra	Distintamente sopra la

CARATTERI	*D. pallida*	*D. tyrrhena*	*D. filix-mas*	*D. oreades*
lamina	metà	della metà	della metà	metà
Base delle pinnule della pinna maggiore (nella parte inferiore delle pinne)	Peduncolate, di solito con n peduncolo di 1-2 mm	Il paio inferiore separato da quello vicino, ma non peduncolato; il paio vicino sessile, ma non fuso	Il paio inferiore separato da quello vicino, ma non peduncolato; il paio vicino sessile e più o meno fuso	Il paio inferiore separato da quello vicino, ma non peduncolato; il paio vicino non fuso
Apice delle pinnule	Stretto ± acuto con denti acuti	± circolare con denti acuti spesso incurvati verso l'interno	Di solito stretto ma non acuto spesso arrotondato con denti acuti	Di solito arrotondato ± circolare con denti ottusi
Diametro dei sori	1 (-1,5) mm ca.	1 (-1,5) mm ca.	1,2-2 mm ca.	1 (-1,5) mm ca.
Parte della pinnula coperta da sori	Vicino all'apice	ca. ½-⅔ (-¾) della parte basale	ca. ½-⅔ (-¾) della parte basale	ca. ½-⅔ (-¾) della parte basale
Indusio	Convesso all'inizio, ± piatto dopo, fortemente ghiandolare	Convesso all'inizio, ± piatto dopo, fortemente ghiandolare	Di solito piatto, glabro	Convesso, glabro eccetto per rare ghiandole sul margine
Lunghezza media delle spore	(28-) 30-34 µm	(35-) 38-42 µm	(36-) 40-46 µm	(30-) 32-36 (-40) µm
Ghiandolosità della lamina e del rachide	Di solito forte in entrambe le pagine	Molto forte in entrambe le pagine	Entrambe le pagine più o meno glabre	Più o meno, particolarmente nella pagina inferiore
Palee	Di colore paglierino o bruno rossastre chiare	Di colore paglierino o bruno rossastre chiare	Giallastre o bruno rossastre	Bruno rossastre
Habitat	Rocce calcaree, in posti assolati e cespugliati	Rocce silicee con esposizione Nord, tipicamente fessuricola	Prevalenteente in boschi su suolo fertile, ma anche su rocce	Rocce silicee con esposizione Nord, vicino a corsi d'acqua
Range altitudinale	0-800 m	0-2000 m	0-2000 m	800-2000 m
Ploidia	2n = 82	2n =164	2n =164	2n =82

Tab. 3.1 - Caratteri morfologici che possono aiutare a discriminare fra 4 specie del genere *Dryopteris* (FRASER-JENKINS *et al.,* 1975).

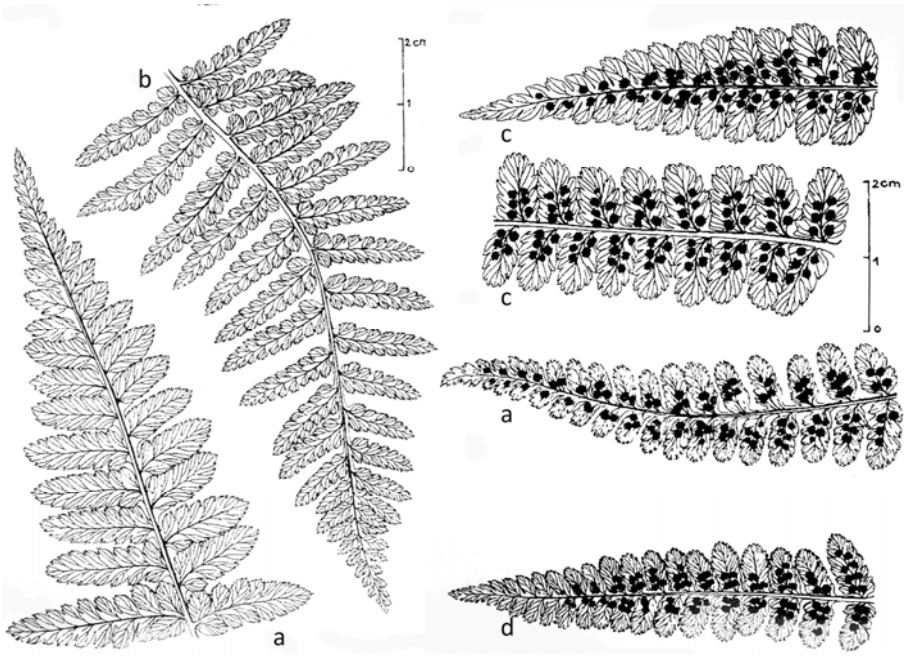


Fig. 3.20 - Confronto fra fronde, in cui è evidente la tipica asimmetria basale di *D. tyrrhena* (a sinistra) e fra le pinne della parte più larga della fronda (a destra) di: a) *D. tyrrhena*; b) *D. pallida*; c) *D. filix mas*; d) *D. oreades* (FRASER-JENKINS *et al.,* 1975).

3.2. Raccolta del materiale oggetto di studio

Per le varie fasi della ricerca, è stato necessario raccogliere materiale di vario tipo dalle specie oggetto di studio. In particolare, durante la fase di campionamento sono state raccolte piante per la coltivazione *ex situ* presso l'Orto Botanico della Tuscia e per l'allestimento di *exsiccata* di riferimento, e spore per la caratterizzazione micromorfologica delle specie oggetto di studio, per la sperimentazione di protocolli di germinazione, conservazione e riproduzione *in vitro*, e spore per la conservazione presso la Banca del Germoplasma delle Tuscia. Inoltre, durante le ricerche in erbario sono state scattate foto di tutti i saggi esaminati, raccolte spore e raccolti dati morfometrici, come specificato di seguito.

3.2.1. Esemplari *in vivo*

La raccolta di piante *in vivo*, utilizzate nelle varie fasi della presente ricerca per studi morfologici o per la produzione di spore, è stata effettuata prelevando pochi esemplari, da 1 a 5 a seconda dei casi, solo quando il prelievo non pregiudicasse o riducesse il potenziale biotico della specie all'interno del singolo popolamento. Le felci sono state raccolte con terra sufficiente per riempire un vaso di dimensioni idonee (10, 20 o 30 cm di diametro) così da evitare stress alla pianta e, contemporaneamente, prelevare una parte della banca delle spore del suolo. Parte delle piante raccolte, attualmente coltivate in vaso, sono conservate *ex situ* presso l'Orto Botanico della Tuscia, dove saranno messe a dimora in un'area adiacente alla "Serra delle felci", area dedicata alle specie autoctone della flora italiana (FONCK *et al.,* 2009).

Specie	Località	Data raccolta	n° piante
Ophioglossum vulgatum	Selva del Lamone, lungo il Sentiero della Murcia Strompia (Viterbo)	28/05/2007	5
Ophioglossum sp.	Selva del Lamone, Pian della Femmina	28/05/2007	5
Ophioglossum vulgatum	Selva del Lamone, lungo il Sentiero della Murcia Strompia (Viterbo)	23/05/2009	5
Osmunda regalis	Canale Monterano (Roma)	21/05/2007	2
Dryopteris tyrrhena	Riomaggiore (La Spezia)	14/07/2007	1
Dryopteris tyrrhena	Riomaggiore (La Spezia)	14/03/2009	2

Tab. 3.2- - Esemplari raccolti nell'ambito della presente ricerca.

3.2.2. Allestimento di campioni d'erbario di riferimento

Per la raccolta e l'allestimento dei campioni d'erbario sono state seguite le indicazioni riportate nel manuale *La conservazione delle piante (Guida alla realizzazione di un erbario)* edito dall'Erbario della Tuscia (SCOPPOLA, SCARICI, 1998) che, dopo la raccolta, prevede le seguenti fasi: essiccazione in pressa, montaggio su fogli di dimensioni standard utilizzando spilli di acciaio, cartellinatura e conservazione. Di seguito sono riportati i saggi allestiti nell'ambito del presente lavoro (Tab. 3.3)

Specie	Località	Data raccolta	*Exsiccatum*
Ophioglossum vulgatum	Selva del Lamone, loc. Pian della Femmina (Ischia di Castro, Viterbo)	11/06/2007	UTV 29453
Ophioglossum sp.	Selva del Lamone, loc. Pian della Femmina (Ischia di Castro, Viterbo)	11/06/2007	UTV 29454
Ophioglossum sp.	Selva del Lamone, loc. Pian della Femmina (Ischia di Castro, Viterbo)	11/06/2007	UTV 29455
Osmunda regalis	Canale Monterano, forra del Fosso Bicione (Roma)	13/07/2006	UTV 25389
Osmunda regalis	Canale Monterano, loc. Diosilla, vicino al Fosso Bicione (Roma)	13/07/2006	UTV 25390
Osmunda regalis	Montiferru, presso Santulussurgiu (Oristano)	18/08/2008	UTV 29477
Dryopteris *tyrrhena*	Isola di Capraia, Vado del Capo presso Cala della Mortola (Livorno)	19/07/2008	UTV 29476
Dryopteris tyrrhena	Riomaggiore (La Spezia)	14/03/2009	UTV 29478

Tab. 3.3 - Saggi d'erbario di riferimento realizzati nell'ambito della presente ricerca e conservati presso l'Erbario della Tuscia (UTV).

3.2.3. Spore

Per la raccolta delle spore sono state seguite due diverse metodologie dettate dalla diversa natura del campionamento stesso: da popolazioni *in situ* o da saggi d'erbario. Le spore di *Ophioglossum azoricum* della stazione di Sella Cotrozzi sul Monte Pisano e di *Ophioglossum sp.* di Monte Pianello e Moriglion di Penna, sempre sul Monte Pisano, sono state richieste all'Università di Pisa, dove è in corso uno studio su tale popolazione.

Raccolta da popolazioni *in situ*

Per un'efficace conservazione *ex situ*, il campionamento delle spore deve essere rappresentativo della popolazione e poterne garantire la conservazione della maggior diversità genetica possibile. La metodologia per ottenere un buon numero di spore nelle migliori condizioni di sviluppo, vitalità e sterilità, è abbastanza consolidata (DYER, 1979; FORD, 1992; AGRAWAL *et al.,* 1993; BERI, BIR, 1993; CONSTANTINO *et al.,* 2000; PENCE, 2000; QUINTANILLA *et al.,* 2000; BALLESTEROS *et al.,* 2006; BACCHETTA *et al.,* 2008).

A seconda della specie, sono state raccolte fronde intere o parti di esse, dopo aver controllato il livello uniforme di maturazione degli sporangi. Il numero di fronde fertili da raccogliere per ogni individuo è stato valutato a seconda della disponibilità delle piante e dello stato di conservazione della popolazione per non alterarne le dinamiche. In caso di popolazione ben conservata, con un buon numero di individui, il protocollo prevede la raccolta di una fronda fertile per individuo, da almeno 20 piante (PANGUA et al, 1994; BALLESTEROS *et al.,* 2006; BACCHETTA *et al.,* 2008). Nel caso di una popolazione molto piccola (meno di 100 individui), caso che si è presentato più volte durante la presente ricerca, la raccolta è stata influenzata di volta in volta dal basso numero di individui, come nel caso della popolazione di *Dryopteris tyrrhena* dell'Isola di Capraia, o dalla scarsità di individui con fronde fertili, per esempio nel caso di *Ophioglossum sp. pl.* o della popolazione di Riomaggiore di *D. tyrrhena*.



Fig. 3.21 - Stazioni di raccolta di: a) *Ophioglossum vulgatum* all'interno della Selva del Lamone (28 maggio 2007); b) *Osmunda regalis* a Canale Monterano (21 maggio 2007); c) *Dryopteris tyrrhena* presso Riomaggiore (a sinistra) (14 settembre 2007) e sull'Isola di Capraia (a destra) (19 luglio 2008).

Dal momento che non esistono in letteratura schede di campo per le Pteridofite, è stata realizzata ed utilizzata nella presente ricerca una scheda per la raccolta delle spore (Fig. 3.22) che riassume le informazioni base contenute in schede analoghe prodotte per le Spermatofite e presenti in SMITH et al. (2003) e BACCHETTA et al. (2006): informazioni tassonomiche, dati stazionali e dati sulla popolazione in esame, demografici, fenologici e conservazionistici.

BGT – Banca del Germoplasma della Tuscia

Scheda di campo – RACCOLTA GERMOPLASMA

ID progressivo:	**Data ingresso:**		**Operatore:**
n°	**Taxon:**		**Flora utilizzata:**
Raccoglitore:		**Ente di appartenza:** **Proprietà del materiale:**	
Progetto:		**Metodo di campionamento:** ☐ Regolarmente distribuito sulla stazione ☐ Al centro della stazione ☐ Lungo una linea trasversale ☐ Lungo una linea di margine ☐ Altro: _____	
Finalità della raccolta: ☐ Banca del germoplasma ____ % ☐ Semina _____ % ☐ Altro _____% specificare _____			
DATI STAZIONALI			
Data e ora di raccolta:	**Località:**		
Comune:	**Provincia:**	**Regione:**	**Stato:**
Strumento utilizzato:	**Coordinate:**		**Grado di precisione:**
Cartografia:		**Altezza media:** (min max)	
Litologia:	**Rocciosità (%):**	**Inclinazione media:** (min max)	
	Pietrosità (%):	**Esposizione media:** (da a)	
Condizioni meteo:	**Temperatura (°C)**	**Umidità Relativa (%)**	**Pressione** (hPa-mbar)
Bioclima:		**Termotipo:**	
Ombrotipo:		**Tipo di vegetazione:**	
Codice CORINE:	**Codice Habitat:**		**Codice SIC:**
DATI POPOLAZIONALI			
Codice pop.:	**Area popolazione:** m²	**Area campionata:** m²	**n° lotti/buste:**
n° individui: ☐1-5 ☐6-10 ☐11-50 ☐51-100 ☐101-250 ☐251-500 ☐501-1000 ☐1001-2500 ☐2501-5000 ☐>5000			
Struttura della popolazione: ☐ Individui isolati ☐ Piccoli gruppi ☐ Gruppi ☐ Colonie ☐ Popolamento	**Stadio fenologico prevalente:** ☐ Fronde giovani non sporificate ☐ Sporangi immaturi ☐ Sporangi maturi ☐ Sporangi secchi **Stato conservazione popolazione:** 1 2 3 4 5	**n° di individui sui quali è stata effettuata la raccolta:** **n° di fronde sporificate per pianta:** **% di popolazione sporificata:** **% piante giovani:** **% piante adulte:** **% piante morte:**	
Materiale prelevato: ☐ Spore ☐ Pinnule ☐ Fronde ☐ Mancata raccolta ☐ Necessaria nuova raccolta	**Rischi e fattori di minaccia:** - attuali: _____ - potenziali: _____	**Causa:** **Condizioni fitosanitarie della popolazione** 1 2 3 4 5 **Pre-trattamenti:**	
Tipo di materiale raccolto: ☐ Campione d'erbario ☐ Pianta in vaso	**Misure di protezione legale:** - attuali: _____ - potenziali: _____	**Note:**	

Fig. 3.22 - Scheda di campo redatta per la raccolta di spore.

Dove possibile, il campionamento è stato randomizzato sulla superficie in esame, il metodo di raccolta più valido per garantire la conservazione della maggior parte del *pool* genico della popolazione.

Le fronde raccolte sono state poste all'interno di fogli di giornale, su fogli di carta bianca patinata del formato A3. Questi sono stati posizionati su una superficie piana e sottoposti ad una leggera pressione

in un ambiente secco e privo di correnti, per favorire la naturale apertura degli sporangi e il rilascio delle spore. Dopo qualche giorno è stato possibile recuperare facilmente dai fogli di carta le spore cadute e versarle nei contenitori (*vials* di vetro da 4 ml con tappo a vite, oppure *Eppendorf* da 1,5 ml) per le fasi successive: studi palinologici, riproduzione *in vitro* e conservazione *ex situ*. In totale sono state raccolte 19 accessioni, come elencate di seguito (Tab. 3.4)

Specie	Località	Data	Codice BGT
Ophioglossum vulgatum	Selva del Lamone, lungo il Sentiero della Murcia Strompia (Viterbo)	21/05/2006	P 01 06
Ophioglossum sp.	Selva del Lamone, Pian della Femmina (Viterbo)	26/06/2006	P 02 06
Ophioglossum vulgatum	Selva del Lamone, lungo il Sentiero della Murcia Strompia (Viterbo)	28/05/2007	P 19 07
Ophioglossum sp.	Selva del Lamone, Pian della Femmina (Viterbo)	11/06/2007	P 24 07
Ophioglossum vulgatum	Selva del Lamone, lungo il Sentiero della Murcia Strompia (Viterbo)	23/05/2009	P 80 09
Ophioglossum vulgatum	Orto Botanico della Tuscia (Viterbo)	25/05/2009	P 81 09
Osmunda regalis	Canale Monterano (Roma)	13/07/2006	P 04 06 P 05 06
Osmunda regalis	Orto Botanico di Genova	11/05/2007	P 16 07
Osmunda regalis	Canale Monterano, loc. Diosilla (Roma)	21/05/2007	P 22 07
Osmunda regalis	Montiferru (Oristano)	18/08/2008	P 72 08 P 73 08
Osmunda regalis	Orto Botanico della Tuscia (Viterbo)	21/05/2009	P 79 09
Dryopteris tyrrhena	Riomaggiore (La Spezia)	14/07/2007	P 44 07 P 45 07
Dryopteris tyrrhena	Riomaggiore, presso il Santuario della Madonna di Montenero (La Spezia)	27/10/2007	P 53 07
Dryopteris tyrrhena	Cala della Mortola, Isola di Capraia (Livorno)	19/07/2008	P 67 08 P 68 08
Dryopteris tyrrhena	Riomaggiore (La Spezia)	14/03/2009	P 76 09

Tab. 3.4 - Elenco accessioni delle spore raccolte nell'ambito della presente ricerca e conservate presso la Banca del Germoplasma della Tuscia.

Raccolta da *exsiccata*

Per raccogliere spore da campioni d'erbario, prima del prelievo le parti sporigene della pianta sono state spolverate delicatamente per liberarle dall'eventuale presenza di materiale estraneo. Successivamente, il saggio è stato inclinato e battuto leggermente così da far scivolare le spore su un foglio di carta patinata posto sul piano di lavoro, per raccoglierle poi all'interno di bustine in pergamino di 4,5 x 9 cm, sulle quali sono stati indicati tutti i dati dell'*exsiccatum*.

Sono state raccolte spore di *Osmunda regalis* da 16 saggi in 4 erbari italiani, come descritto in dettaglio nella tabella seguente:

Erbario e n° saggio	*Legit*	Località	Data saggio	Raccolta spore
UTV 15510	A. Scoppola	Isola del Giglio (Grosseto)	24/05/1989	20/05/2007
UTV 11673	M. Bascietto	Lo. Valle Masca (Genova)	13/08/1997	20/05/2007
UTV 6473	A. Scoppola	Loc. Ferruzzano (Reggio Calabria)	31/05/1999	20/05/2007
UTV 16791	A. Scoppola	M. Capanne, Isola d'Elba (Livorno)	17/05/2001	20/05/2007
CAG 1669-8	Cavara, Pirotta	Riu Maitopis, Sette Fratelli (Cagliari)	---/07/1900	17/06/2007
CAG 1669-3	Martelli	Sotto il Monte Sette Fratelli (Cagliari)	11/06/1916	17/06/2007
FI	U. Martelli	Sibolla (Lucca)	24/05/1891	23/05/2008
FI	R. Corradi	Lago di Sibolla (Lucca)	21/07/1942	23/05/2008
FI	G. Negri, R. Bavazzano	Isola d'Elba, Monte Castello, Vallone di Botro (Livorno)	21/05/1948	23/05/2008
FI	G. Negri, R. Bavazzano	Isola d'Elba, fra Marciana Alta e S. Cerbone (Livorno)	25/05/1948	23/05/2008
FI	F. Fabbri, R. Bavazzano, A. Contardo	Isola d'Elba, Patresi, nei pressi di Zanca, Marciana (Livorno)	03/10/1964	23/05/2008
FI	R.M. Baldini	Isola del Giglio, sopra Cala di Pietrabona (Grosseto)	29/05/1997	23/05/2008
SIENA 2679	D. Marchetti	Canale di Riomagno, Seravezza (Lucca)	01/10/1978	24/04/2009
SIENA 2682	D. Marchetti	Canale del giardino sotto Basati, Seravezza (Lucca)	01/10/1978	24/04/2009
SIENA 2676	D. Marchetti	Lungo il Torrente di Antona, presso Canevara (Massa Carrara)	30/09/1981	24/04/2009
SIENA 2687	D. Morrocchi	Bosco del Belagaio, Monticiano (Siena)	27/06/1995	24/04/2009

Tab. 3.5 - Elenco degli *exsiccata* da cui sono state prelevate spore di *Osmunda regalis*.

Sono state raccolte spore di *Dryopteris tyrrhena* da saggi provenienti dalle Cinque Terre, dalla Corsica, da Montecristo, dall'Isola d'Elba e dalla Sierra Nevada, da 10 saggi in 3 erbari, come descritto nella tabella seguente:

Erbario e n° saggio	*Legit*	Località	Data saggio	Raccolta spore
VAL 83412	M.L.Gil Zúñiga, J.A. Alejandre	Granada: Sierra Nevada, pr. barranco Dilar	13/08/1988	28/06/2007
VAL 83413	J.A Alejandre	Granada: Sierra Nevada, pr. barranco Dilar	20/08/1990	28/06/2007
SIENA 1097	D. Marchetti	Braccio sinistro della Valle di Riomaggiore (Riomaggiore, La Spezia)	05/01/1978	24/04/2009
SIENA 1098	D. Marchetti	Braccio sinistro della Valle di Riomaggiore (Riomaggiore, La Spezia)	05/01/1978	24/04/2009
SIENA 1100	D. Marchetti	Sentiero tra Campiglia e la parte est di Schiara (La Spezia)	10/01/1981	24/04/2009
SIENA 2752	D. Marchetti	Tra Piana Battolla e la Valle Corticchia in Val di Vara (La Spezia)	10/10/1998	24/04/2009
FI	R. Deschatres	FRA. Albertacce (Corsica)	27/07/1974	22/09/2009
FI	S. Sommier	Isola d'Elba, Marciana, tra Ripa Barata e St Anna	07/05/1900	22/09/2009
FI	E. Nardi, M. Tardelli	Isola d'Elba, Marciana presso S. Andrea	30/04/1979	22/09/2009
FI	F. Fabbri, R. Bavazzano, A. Contardo	Isola di Montecristo, Collo dei Lecci	01/06/1965	22/09/2009

Tab. 3.6 - Elenco degli *exsiccata* da cui sono state prelevate spore di *Dryopteris tyrrhena*.

3.2.4. Dati morfometrici

Per tutti i saggi del genere *Ophioglossum* si è proceduto alla raccolta di dati morfometrici. Su ogni individuo esaminato, su lamine sterili e sporofori, sono stati considerati 6 caratteri morfologici e 2 caratteri meristici (caratteri morfologici soggetti ad una variazione numerica), descritti nel Par. 3.4.1., utilizzando una scheda di raccolta dati creata per il presente lavoro (Fig. 3.23).

	Studio morfometrico del genere *Ophioglossum*											
Erbario	EXSICCATA	SPECIE		LAMINA STERILE					SPOROFORO			
			CODICE	n° foglie	lunghezza asse	lunghezza	larghezza max	largh/ lungh	n° sporangi /lato	lunghezza	larghezza max	lunghezza mucrone

Fig. 3.23 - Scheda di raccolta dati morfometrici realizzata ed utilizzata nel presente lavoro.

Per la raccolta di dati morfometrici sono stati consultati 9 erbari: CAG, FI, GE, PI, P, SIENA, UTV, VAL, W, oltre al materiale fresco raccolto nell'ambito della presente ricerca, vedi Tab. 3.2. In totale sono stati analizzati 130 *exsiccata* appartenenti alle 3 specie.

Le misurazioni sono state effettuate allo stereomicroscopio utilizzando un righello millimetrato con risoluzione di 0,5 mm. Tutti i dati raccolti sono stati inseriti in un foglio di lavoro *Excel*, per le successive analisi statistiche (Par. 3.4.1.)

3.2.5. Acquisizione immagini

Tutti gli *exsiccata* delle specie oggetto di studio sono stati fotografati per successive verifiche e confronti. In particolare, per tutti i saggi di *Ophioglossum sp. pl.* esaminati (*O. vulgatum, O. azoricum* e *O. lusitanicum*) si è proceduto a fotografare il dettaglio di ogni individuo presente sul foglio per l'applicazione della morfometria geometrica. Le foto sono state scattate in condizioni standardizzate con una macchina digitale *Nikon Coolpix* 4500, avendo cura di posizionare la macchina fotografica in modo perpendicolare rispetto al piano, così da evitare eventuali errori dovuti alla prospettiva, ed utilizzando la massima risoluzione, dimensione 2272 x 1704 px.

Sono stati fotografati 94 *exsiccata* in 7 erbari (CAG, FI, GE, PI, SIENA, UTV, VAL), per un totale di 296 foto di individui appartenenti alle 3 specie, oltre al materiale fresco raccolto nell'ambito della presente ricerca. Nel caso degli erbari di Parigi (P) e di Vienna (W), dove sono conservati *typus* e *isotypus* di *O. azoricum*, sono state utilizzate le immagini ad alta risoluzione scaricate dai siti internet degli erbari stessi (http://coldb.mnhn.fr e http://131.130.131.9/database/img/imgBrowser.php?name=47756).

3.3. Caratterizzazione micromorfologica

Una parte del materiale vegetale raccolto è stata utilizzata per caratterizzare le specie in esame dal punto di vista micromorfologico, utilizzando il microscopio ottico, lo stereomicroscopio e il microscopio

elettronico a scansione per osservazioni microscopiche, misurazioni e per la realizzazione di microfotografie.

3.3.1. Osservazioni allo stereomicroscopio

Tutte le osservazioni sulla micromorfologia di fronde, indumento, margine di pinne e pinnule, *pattern* di nervature, disposizione e dimensione di sori o degli sporofori, dell'indusio, spesso indispensabili ai fini dell'identificazione delle specie, sono state effettuate attraverso lo stereomicroscopio *Nikon* SMZ 1000. Il tutto è stato documentato attraverso lo scatto di microfotografie utilizzando una macchina fotografica *Nikon Digital Camera* DXM 1200, collegata al microscopio stesso, e il software ACT-1 (versione 2) per l'acquisizione e la gestione delle immagini.

3.3.2. Osservazioni al microscopio elettronico a scansione

Il microscopio elettronico a scansione (SEM) genera un'immagine che, evidenziando le superfici delle strutture analizzate, ne mostra la tridimensionalità e ne fornisce informazioni sull'aspetto, sulla natura e sulle proprietà. Per questo motivo sono state effettuate osservazioni al SEM del materiale vegetale raccolto che hanno consentito di esaminare con una visione tridimensionale le superfici esterne di spore, gametofiti e sporofiti, e quelle caratteristiche, come per esempio le ornamentazioni o le strutture riproduttive, non apprezzabili allo stereomicroscopio, né al microscopio ottico.

Tutti i campioni sono stati preparati e montati per l'osservazione in modo appropriato così da mantenere l'integrità delle superfici esterne. L'osservazione è stata effettuata con il microscopio elettronico a scansione JEOL JSM 5200 presso il CIME, Centro Interdipartimentale di Microscopia Elettronica dell'Università della Tuscia. Durante le osservazioni al SEM, è stato possibile eseguire microfotografie, usando una pellicola *Kodak T-Max* 100 con macchina fotografica *Nikon*.

Allestimento dei campioni

Per l'osservazione al SEM i campioni devono essere anidri, o comunque l'acqua in essi contenuta non deve essere rilasciata nel momento in cui il campione viene portato in vuoto. Per questo motivo i gametofiti e le porzioni di fronda sono stati fissati in una soluzione di 2% paraformaldeide e 2% glutaraldeide in tampone sodio-cacodilato 0.2 M per 24 ore. Dopo un lavaggio in tampone sodio-cacodilato 0.1 M, sono stati disidratati in concentrazioni crescenti di alcol etilico (50%-70%-80%-90%-95%-100%). Successivamente sono stati sottoposti ad essiccazione mediante il *Critical point dryer Balzers Union* CPD 020. Per le spore non è stato necessario procedere a queste operazioni preparatorie, a causa del loro basso contenuto d'acqua.

Tutti i campioni sono stati posti sugli appositi supporti di alluminio (*stub*), sui quali è stato in precedenza fissato uno speciale nastro biadesivo conduttivo, a base di grafite.

Qualora il campione non sia conduttivo per propria natura, deve essere reso conduttivo almeno nel suo strato superficiale, quindi tutti i campioni sono stati metallizzati con un sottile strato di oro-palladio per mezzo del dispositivo *sputtering Balzers Union MED* 010.

3.3.3. Studio palinologico

Lo studio è stato condotto sia su materiale fresco che d'erbario, raccolto secondo le modalità descritte nel Par. 3.2.3., tramite osservazione e misurazione delle spore al microscopio ottico, oltre ad osservazioni e fotografie al SEM, come già detto, così da poterne descrivere la tipologia, trilete o monolete, e, soprattutto, l'ornamentazione dell'esina o della perina, quando presente, che è un importante carattere diagnostico utile per discriminare sia a livello generico che specifico.

Osservazioni e misurazioni al microscopio ottico

Le spore sono state prelevate con uno spillo, raccolte su un vetrino porta-oggetti e fissate in acido lattico. Le osservazioni al microscopio ottico (*Leitz-Aristoplan*) hanno consentito di descrivere le caratteristiche delle spore non osservabili al SEM, come, presenza o meno di clorofilla, presenza/assenza di perina o di ornamentazioni, e le caratteristiche degli sporangi , forma, dimensione e presenza/assenza di *anulus*. Inoltre, le spore prelevate dai saggi d'erbario sono state osservate prima della semina, sia per controllarne l'integrità che per verificare la presenza di cloroplasti al loro interno. Contemporaneamente sono state scattate delle microfotografie utilizzando una macchina fotografica *Nikon Coolpix* 5000 ed il software *Micromax Arkon* (versione 8.12.05) per l'acquisizione e la gestione delle immagini.

La misurazione delle spore è stata effettuata al microscopio ottico, grazie ad un oculare micrometrico. Di ogni entità sono state misurate 10 spore per esemplare. Le dimensioni sono state misurate sulla spora nel secco e si riferiscono al diametro equatoriale nelle spore trilete e alla massima lunghezza dell'esosporio nelle spore monolete, trascurando le dimensioni della perina, quando presente (FERRARINI *et al.,* 1986). Per ogni specie considerata è stato fornito quindi un *range* di misure così definito: lunghezza minima, media e massima, in µm.

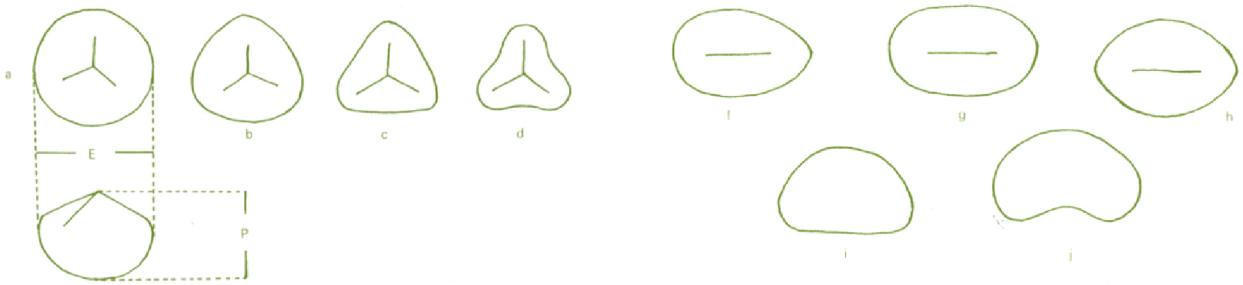


Fig. 3.24 - Spore trilete (a sinistra): a) circolare; b) subtriangolare; c) triangolare con lato concavo; d) triangolare con lati concavi (E: diametro equatoriale; O: diametro polare). Spore monolete (a destra): contorno in vista polare di una spora: f) ovata; g) oblunga; h) ellittica. Vista equatoriale di una spora: i) piano-convessa; j) concavo-convessa (SALVO TIERRA, 1990).

Per la descrizione della tipologia e morfologia sporale sono stati utilizzati due atlanti palinologici, l'*Iconographia Palynologica Pteridophytorum Italiae* (FERRARINI *et al.,* 1986) e l'*Atlante di identificazione delle felci (Filicopsida) presenti in Svizzera e in Italia. Su base palinologica e epidermiologica* (PERONI, PERONI, 2004), oltre al lavoro di PRADA (1990), *El papel de la palinología en los estudios actuales sobre Pteridófitos*.

3.3.4. Studio epidermologico

Nel caso di *Dryopteris tyrrhena* è stato condotto uno studio epidermologico, utilizzando le foto scattate al microscopio elettronico a scansione.

Per la descrizione e i termini utilizzati si è fatto riferimento essenzialmente all'atlante di PERONI e PERONI (2004) utilizzato anche per lo studio palinologico, oltre al lavoro di VIANE (1990), *Epidermology of European ferns*, che fornisce una chiave per le specie del complesso *Dryopteris villarii* utilizzando i caratteri micromorfologici dell'indumento riportati nelle tabelle seguenti. Lo studio dei peli ghiandolari ha seguito la tipificazione di VIANE (1986) che prevede la misura della lunghezza totale (Lt), del diametro dell'apice (dA), del diametro alla base (dB) e della lunghezza del peduncolo (VIANE, 1990). Sono stati misurati 50 peli ghiandolari, 50 stomi e 50 cellule epidermiche della pagina abassiale e fornite le dimensioni minime, medie e massime, in µm, confrontandole con i valori seguenti.

Misure dei peli ghiandolari	*D. pallida*	*D. tyrrhena*	*D. villarii*	*D. oreades*	*D. submontana*
Lt: Lunghezza totale	71±10	90±9	72±9	64±9	73±11
dA: diametro dell'apice	31±5	40±4	34±4	35±5	35±4
dB:diametro alla base	18±2	18±2	18±2	16±3	20±2
Ls: Lunghezza del peduncolo	40±10	50±9	38±9	29±4	38±10
dA/Ls	0.8	0.8	0.9	1.2	0.9
dA/dB	1.7	2.2	1.9	2.2	1.8
Misure degli stomi					
L stom	40±4	50±4	47±4	47±4	53±4

Tab. 3.7 - Distinzione fra le 5 specie in base alle misure dei peli ghiandolari e degli stomi (valori medi in µm) riportate in VIANE (1990).

D. pallida	*D. tyrrhena*	*D. villarii*	*D. oreades*	*D. submontana*
(30-) 33,18 (-39) x (24-) 27,54 (-33) µm	(36-) 44,64 (-54) x (21-) 28,62 (-33) µm	(33-) 40,50 (-51) x (21-) 27,72 (-33) µm	(33-) 39,96 (-48) x (21-) 25,26 (-30) µm	(30-) 36,12 (-42) x (21-) 27,42 (-33) µm

Tab. 3.8 - Distinzione fra le 5 specie in base alle misure degli stomi riportate in PERONI e PERONI (2004).

3.3.5. Studio del *pattern* di nervatura

Per il genere *Ophioglossum* è stato analizzato il *pattern* di nervatura delle lamine sterili. Le immagini realizzate per lo studio morfometrico (vedi Par. 3.2.5.) sono state rielaborate con *Adobe Photoshop 7.0* così da evidenziarne le nervature. Le immagini sono state, poi, analizzate utilizzando alcuni lavori

monografici sulle *Ophioglossaceae* (BHAMBIE, MADAN, 1982; PAUL, 1987), che riportano schemi di *pattern* di nervatura tipici per le varie specie (Fig. 3.25).

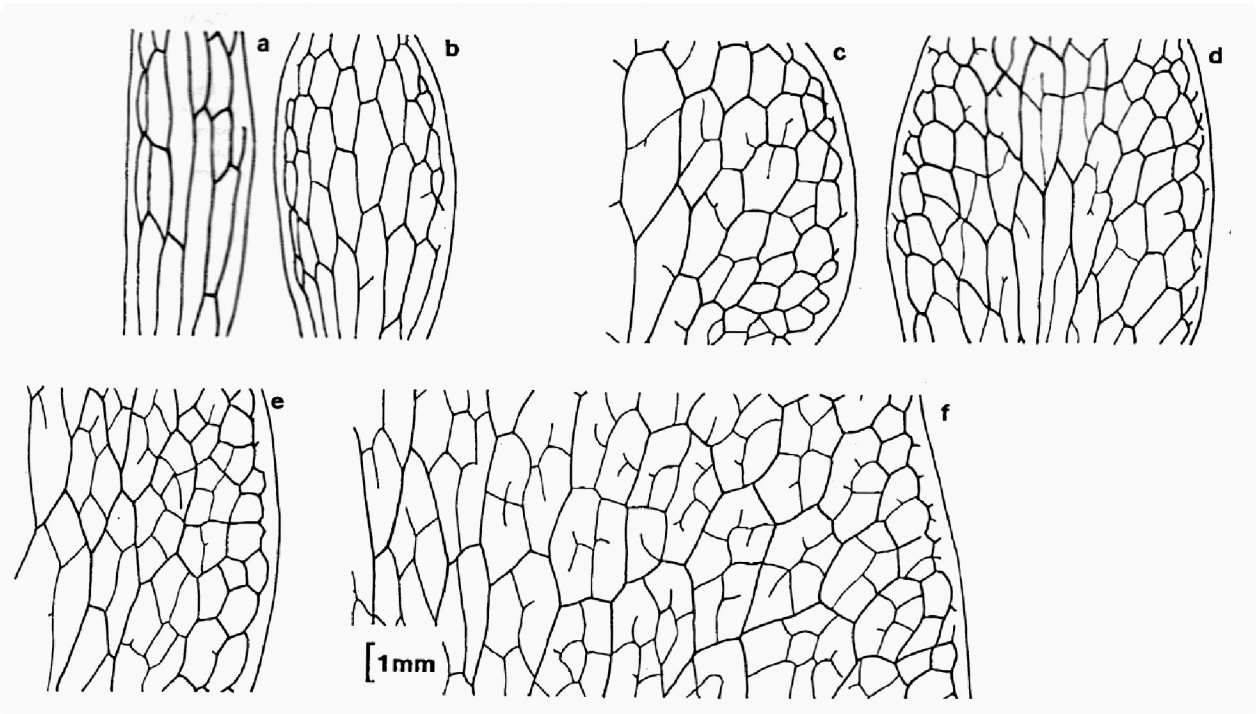


Fig. 3.25 - *Pattern* di nervatura di *Ophioglossum*: a-b) porzione centrale della foglia di *Ophioglossum lusitanicum*; c-d) di *O. azoricum*; e-f) di *O. vulgatum* (PAUL, 1987)

3.4. Studio morfometrico per *Ophioglossum sp. pl.*

Le criticità tassonomiche legate al genere *Ophioglossum* in Italia (Par. 3.1.1.) e la difficoltà di ottenere risultati univoci e inequivocabili con il classico approccio tassonomico, cioè attraverso l'uso di chiavi dicotomiche, ha portato alla necessità di intraprendere uno studio morfologico integrato per poter contribuire a discriminare fra le 3 specie italiane, mediante studi morfometrici, secondo le tecniche tradizionali e applicando analisi di morfometria geometrica, oltre agli studi micromorfologici e palinologici, già descritti nel Par. 3.3.

Per morfometria si intende, in biologia, lo studio quantitativo e comparativo dei caratteri morfologici degli organismi viventi (animali o vegetali) che ha per oggetto le singole strutture, le loro forme e i loro rapporti. Tale studio può essere eseguito con misurazioni dirette sull'individuo (morfometria tradizionale) oppure con l'analisi di *landmark* o *outline* (morfometria geometrica) che utilizza il metodo del TPS (*Thin Plate Spline*) su 2 o 3 dimensioni, applicato a immagini tratte dai soggetti studiati.

3.4.1. Morfometria tradizionale

La morfometria tradizionale studia misure di distanze, angoli ed aree di caratteri morfologici e conteggi di caratteri meristici, cioè di quei caratteri morfologici soggetti ad una variazione numerica, come il numero di foglie, ecc.

Prima di intraprendere lo studio morfometrico, i *taxa* di interesse sono stati indagati in modo approfondito dal punto di vista biologico, morfologico e tassonomico, analizzandone le differenze attraverso le chiavi dicotomiche e le descrizioni presenti in letteratura (PIGNATTI, 1982; CASTROVIEJO *et al.,* 1986; FERRARINI *et al.,* 1986; TUTIN *et al.,* 1993; PRELLI, 2001; SOSTER, 2001; MARCHETTI, 2004), così da individuare un set di caratteri da studiare e da poter utilizzare per discriminare fra le varie specie.

FLORA	LAMINA STERILE						SPOROFORO				SPORE	
	n° foglie	lunghezza asse	lunghezza	larghezza max	Largh./ Lungh.	Nervature	n° sporangi/lato	lunghezza	larghezza max	lunghezza mucrone	dimensione	ornament.
Flora d'Italia (Pignatti, 1982)	C		C	D		D	D	D				C
Le Pteridofite d'Italia (Marchetti, 2004)	C		C	C		D	C	D				D
Identikit delle felci d'Italia. (Soster, 2001)			D	D			D	D				D
Iconographia Palynologica Pteridophytorum Italiae (Ferrarini et al., 1986)											C	C
Flora Europaea (Tutin *et al*., 1993)	C		C	C		C	D					D
Flora Iberica (Castroviejo *et al*., 1986)	D		D	C	C	D	C				D	C
Les Fougères et plantes alliés de France et d'Europe occidentale (Prelli, 2001)	C		C	C			D					

Tab. 3.9 - Tabella sinottica dei caratteri morfologici e meristici analizzati nel presente lavoro e loro presenza in letteratura. Legenda: C = carattere presente nella chiave dicotomica; D = carattere presente nella descrizione delle specie

In particolare, su ogni esemplare sono stati registrati i seguenti caratteri meristici:

- n° delle lamine sterili
- n° sporangi per lato nello sporoforo

Su ogni esemplare sono stati poi misurati i 3 caratteri morfometrici riportati nelle chiavi dicotomiche o nelle descrizioni presenti nella letteratura consultata (Tab. 3.9):

- Lunghezza della foglia
- Larghezza massima della foglia
- Lunghezza dello sporoforo

A questi si aggiungono altri 3 caratteri non presenti nella letteratura consultata (Tab. 3.9):

- Lunghezza dell'asse della lamina sterile;
- Larghezza massima dello sporoforo;
- Lunghezza del mucrone dello sporoforo. Della presenza di un mucrone in *Ophioglossum azoricum* parla PRESL (1845) nel protologo della specie descrivendo la "... *spica mucronata*", ma nessuna delle descrizioni consultate ne fa cenno.

Analisi statistica dei dati

Tutti i dati morfometrici misurati sulla lamina sterile e sullo sporoforo (Par. 3.2.4.) sono stati analizzati con una statistica descrittiva con il software *GraphPad Prism 5.0* per la realizzazione di grafici *boxplot* delle misure effettuate che sintetizzano graficamente le seguenti informazioni: minimo e massimo, mediana e *range* (25%-75% percentile).

Successivamente con il programma *GraphPad Prism 5.0* sono stati eseguiti test di correlazione con il metodo di Pearson e analisi della regressione lineare.

Per la separazione dei gruppi, i dati sono stati analizzati con il programma *XLSTAT 2009.4.06*, tramite Analisi Fattoriale Discriminante (o Analisi delle Variabili Canoniche), con un livello di significatività del 5%, metodo che determina assi non correlati linearmente che massimizzino le varianze fra i gruppi e minimizzino le varianze all'interno dei gruppi (PODANI, 2007). Per ogni funzione lineare discriminante è stato calcolato il Test Lambda di Wilks che ne esprime la significatività.

3.4.2. Morfometria geometrica

La morfometria geometrica è un metodo per l'analisi multivariata della forma (*shape*). Questa analisi consente di preservare l'integrità della forma biologica in due o in tre dimensioni, evitando che essa si riduca ad una serie di misure lineari e angolari che non includono informazioni riguardanti le relazioni geometriche dell'intero oggetto e permette di realizzare un'analisi quantitativa della forma geometrica di un organismo (o dei suoi organi), attraverso reticoli di trasformazione utili per localizzare le aree anatomiche di rimodellamento morfologico.

La sua formulazione teorica si è sviluppata negli ultimi decenni dalla sintesi di metodi di analisi multivariata di matrici di covarianza e metodi per la visualizzazione diretta di cambiamenti nella forma biologica (BOOKSTEIN, 1991; ROHLF, MARCUS, 1993; CORTI *et al.,* 2000; RABELLO *et al.,* 2000). Anche se sono molteplici le sue applicazioni in ambito biomedico, in paleontologia, antropologia e zoologia, al contrario, la morfometria geometrica è stata quasi totalmente assente dalla ricerca botanica fino a pochi anni fa (JENSEN, 1990; PREMOLI, 1996), anche se non mancano esempi recenti: sul genere *Dactylorhiza* (SHIPUNOV, BATEMAN, 2005; ANDERSSON, 2008), sul genere *Quercus* (FORTINI *et al.,* 2005; 2009; VISCOSI, FORTINI, 2009) ed altri (IWATA et al. 2002; 2004). Questo è dovuto in gran parte ai problemi di alta plasticità fenotipica frequenti nelle piante e alla difficoltà di poter individuare in modo univoco i punti omologhi necessari per poter applicare la tecnica.

Preparazione del materiale

Fra tutte le foto degli *exsiccata* di *Ophioglossum sp. pl.* esaminati, sono state scelte le immagini di esemplari con fronde integre, senza pieghe e non sovrapposte. In totale sono state utilizzate 203

immagini, che sono state elaborate con *Adobe Photoshop 7.0*. Come primo passo è stato eliminato dalla foto ogni elemento estraneo, cancellando le altre parti dell'individuo fotografato, isolando così la singola lamina sterile, poi ne è stato aumentato il contrasto rispetto allo sfondo, operazione resa necessaria per tracciare automaticamente l'*outline* con *SHAPE-Chain Coder 1.3*. Utilizzando tale programma non c'è bisogno di agire preventivamente sulle immagini dei campioni per uniformarne la scala, la rotazione o la posizione, perché è il *software* stesso a farlo tramite la GPA (*Generalized Procrustes Allignement*), ma per praticità di visualizzazione tutte le immagini sono state uniformate così da avere stessa dimensione, pari a 800 x 1000 pixel, e risoluzione di 300 dpi.

Metodo dei *landmark*

Lo studio inizia con l'individuazione di punti di riferimento su ogni campione da analizzare, detti *landmark*. *Landmark* ben scelti riflettono punti omologhi, punti significativi dal punto di vista biologico, quindi la loro scelta è fondamentale per la realizzazione di una ricerca accurata e corretta dal punto di vista biologico: i *landmark* selezionati dovranno essere facili da individuare, localizzabili con esattezza e corrispondenti (si parla di omologia topografica) su tutti gli esemplari confrontati. L'insieme delle coordinate cartesiane dei punti selezionati servirà a schematizzare la forma della struttura analizzata così che dal campione reale si otterrà un equivalente campione 'stilizzato', tanto più fedele alla realtà quanto maggiore è il numero di punti scelti. Ci sono tre categorie di *landmark*, qui elencati in ordine decrescente di utilità:

- *Landmark* o *landmark* anatomici: sono punti biologicamente significativi in un organismo, che rappresentano parti omologhe.
- Pseudo-*landmark* o *landmark matematici:* sono punti definiti da posizioni relative in una forma che si trovano in base ad alcune proprietà matematiche o geometriche, per esempio, il punto di massima curvatura, punti di flesso, larghezza massima, ecc.
- Semi-*landmark*: sono punti 'costruiti', definiti rispetto ad altri punti di riferimento, per esempio il punto medio tra 2 *landmark*.

Per la digitalizzazione dei *landmark* e per le successive analisi statistiche sono stati utilizzati i *software* appartenenti al pacchetto TPS - *Thin-Plate Spline*: una serie di applicazioni per la morfometria geometrica ideate da ROHLF (1998) comprendente fra gli altri i programmi, *TpsUtil*, *TpsDig2* e *TpsRelw*.

Nel caso di *Ophioglossum*, non è stato possibile trovare più di 3 punti omologhi, a causa della forma della lamina, del suo margine intero, dell'assenza di nervature evidenti, della mancanza di punti di riferimento omogenei per tutti i campioni. A tale scopo è stata realizzata una griglia di 11 linee orizzontali equidistanti che è stata sovrapposta a tutte le immagini preparate, avendo cura di posizionarla in modo perpendicolare rispetto all'asse longitudinale della fronda e facendo coincidere

l'apice e la base della lamina rispettivamente con la linea superiore e quella inferiore della griglia (Fig. 3.26).

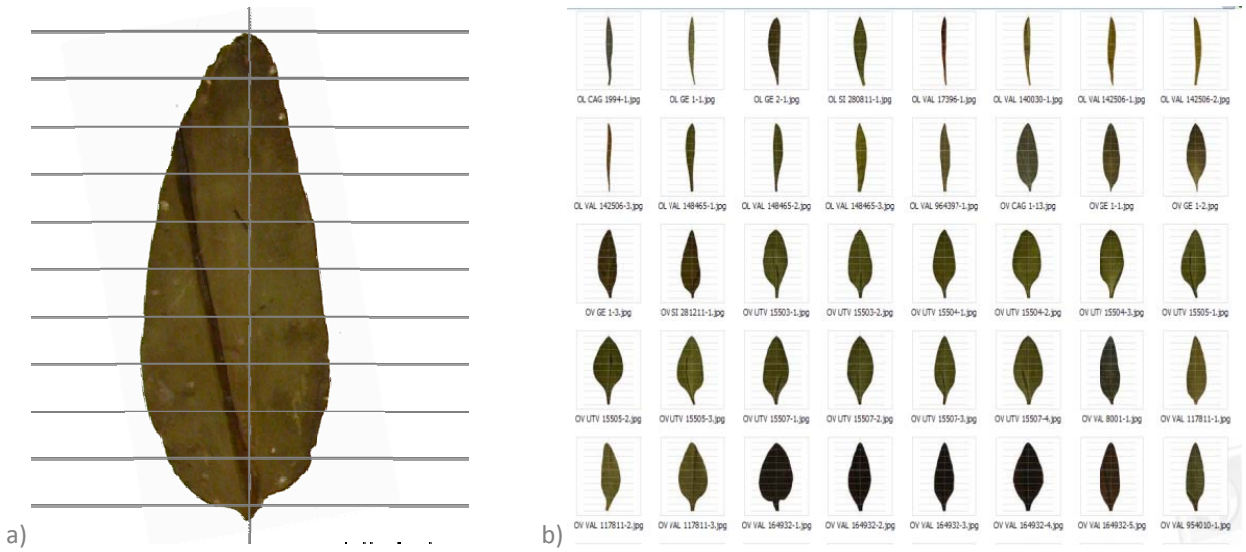


Fig. 3.26 - a) Immagine elaborata di una lamina sterile di *Ophioglossum* a cui è stata sovrapposta la griglia per la digitalizzazione dei semi-*landmark*; b) cartella di immagini elaborate.

Le immagini così elaborate sono state riunite in cartelle e si è proceduto a costruire i file TPS attraverso il software *TpsUtil 1.44*. Questo tipo di file è un formato non standard, necessario per *TpsDig2,* che elenca i nomi dei file immagine all'interno della cartella, il fattore di scala associato ad ognuno, il numero di *landmark* digitalizzati per campione, le coordinate [x,y] associate ai *landmark*, gli *outline* e campi commento.

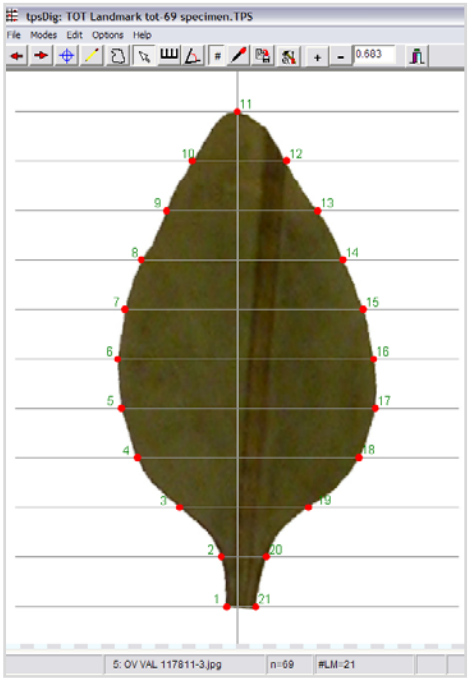
Il file TPS è stato aperto con il programma *TpsDig2 1.2* per la digitalizzazione dei *landmark*, procedendo con l'inserimento manuale dei punti su ogni campione, sempre con lo stesso ordine su tutte le immagini. Sul profilo di ogni fronda, quindi, sono stati localizzati 21 punti: 3 *landmark* significativi dal punto di vista anatomico (2 alla base della lamina e 1 all'apice) e 18 semi-*landmark* (individuati dall'incrocio fra la griglia e il contorno della lamina) (Fig. 3.27). Una volta che su tutti gli esemplari (o meglio sulle loro foto) siano stati digitalizzati i punti di riferimento, le fronde sono descritte dalla matrice di coordinate [x, y] dei rispettivi *landmark* (Fig. 3.27).

Se il punto di partenza dell'analisi geometrica della forma era visuale (le foto delle fronde e la digitalizzazione dei *landmark*), lo è anche quello di arrivo: le fronde stilizzate, di dimensione standard e riallineate, sono raffigurate su reticoli di deformazione in modo da evidenziarne le differenze morfologiche.

Il passaggio successivo prevede l'elaborazione delle matrici delle coordinate dei *landmark*, attraverso il programma *TpsRelw 1.42*. Il programma opera mediante un algoritmo usato in meccanica per descrivere

deformazioni di sottili fogli metallici (*thin plate spline* o TPS) ed eseguendo delle operazioni matriciali, costruisce delle combinazioni lineari delle coordinate dei *landmark* (semplificando, si può dire che gli assi del sistema di riferimento sono ruotati opportunamente, lasciando immutate le posizioni relative dei punti nello spazio). Le nuove variabili prendono il nome di variabili della forma e consentono la realizzazione di reticoli di deformazione che illustrano visivamente il cambiamento di forma tra la media del campione e uno, o l'altro, degli esemplari studiati (Fig. 3.28).

a)



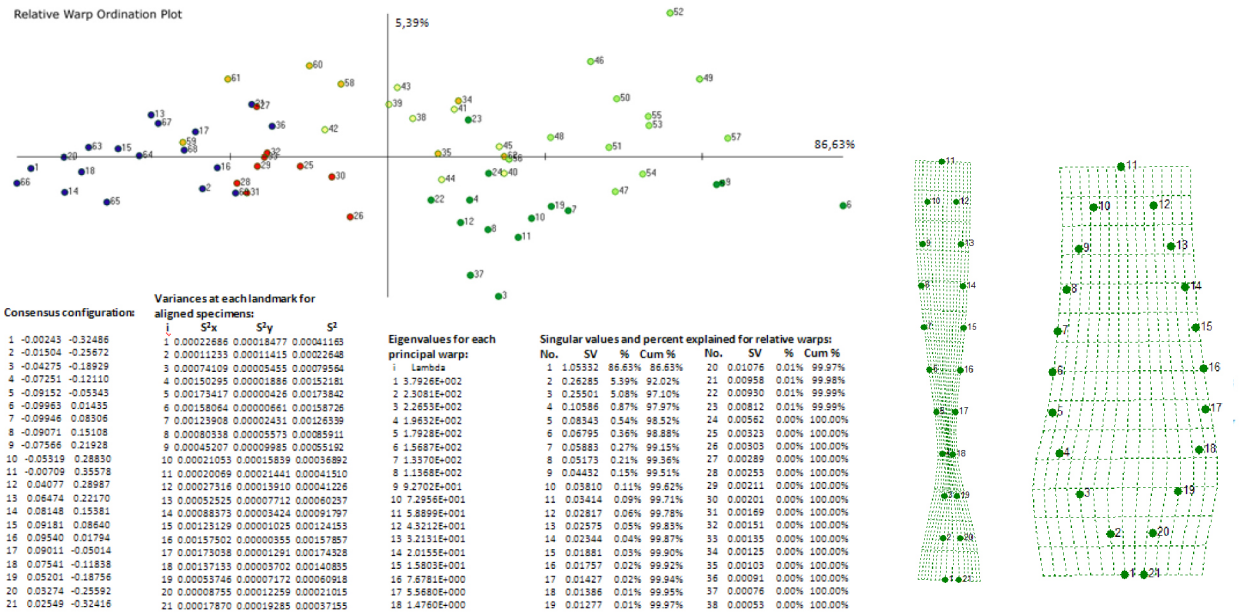
b)

```
LM=21
383.00000 65.00000
383.00000 152.00000
346.00000 238.00000
266.00000 325.00000
229.00000 411.00000
219.00000 497.00000
225.00000 584.00000
241.00000 670.00000
266.00000 756.00000
305.00000 843.00000
393.00000 929.00000
509.00000 843.00000
554.00000 756.00000
579.00000 670.00000
595.00000 584.00000
604.00000 497.00000
582.00000 411.00000
542.00000 325.00000
497.00000 238.00000
454.00000 152.00000
432.00000 67.00000
IMAGE=OV UTV 15504-3.jpg
ID=12
```

Fig. 3.27 - a) Immagine della fronda su cui sono digitalizzati 21 *landmark*; b) esempio di file TPS, con la matrice di coordinate dei *landmark.*

Le variabili della forma prodotte dal TPS si possono suddividere in due tipi: *partial warps*, cioè la componente uniforme (o affine) che descrive cambiamenti di forma omogenei su tutta la superficie della foglia, infatti le maglie del reticolo restano parallele, come accade negli stiramenti o compressioni della griglia di deformazione; *relative warps*, cioè la componente non uniforme che rappresenta, invece, tutte le modificazioni morfologiche locali, ovvero quelle che deformano in modo differente le diverse regioni del reticolo. Componente uniforme e non uniforme possono essere studiate separatamente oppure unite in un'unica matrice che definisce il cambiamento complessivo della forma nel campione analizzato (ZELDITCH *et al.,* 2004). La matrice numerica delle variabili della forma viene adoperata per la verifica statistica delle differenze morfologiche tra gli esemplari e può essere analizzata con le stesse tecniche utilizzate in morfometria tradizionale (analisi della varianza e discriminante, analisi delle componenti principali, *cluster analysis*, ecc.).

Per ogni *dataset* è stata calcolata la forma media (*consensus*), ed effettuate la *Partial Warps* e *la Relative Warps Analysis* sulla matrice di covarianza, corrispondente ad un'Analisi delle Componenti Principali. Dal programma si ottengono vari risultati: i grafici PWA e RWA, un reticolo di deformazione per ogni punto selezionato e un report con le matrici (degli autovalori, di covarianza, ecc.) ed i risultati delle elaborazioni statistiche.



Consensus configuration:

1	-0.00243	-0.32486
2	-0.01504	-0.25672
3	-0.04275	-0.18929
4	-0.07251	-0.12110
5	-0.09152	-0.05343
6	-0.09963	0.01435
7	-0.09946	0.08306
8	-0.09071	0.15108
9	-0.07566	0.21928
10	-0.05319	0.28830
11	-0.00709	0.35578
12	0.04077	0.28987
13	0.06474	0.22170
14	0.08148	0.15381
15	0.09181	0.08640
16	0.09540	0.01794
17	0.09011	-0.05014
18	0.07541	-0.11838
19	0.05201	-0.18756
20	0.03274	-0.25592
21	0.02549	-0.32416

Variances at each landmark for aligned specimens:

i	S^2x	S^2y	S^2
1	0.00022686	0.00018477	0.00041163
2	0.00011233	0.00011415	0.00022648
3	0.00074109	0.00005455	0.00079564
4	0.00150295	0.00001886	0.00152181
5	0.00173417	0.00000426	0.00173842
6	0.00158064	0.00000661	0.00158726
7	0.00123908	0.00002431	0.00126339
8	0.00080338	0.00005573	0.00085911
9	0.00045207	0.00009985	0.00055192
10	0.00021053	0.00015839	0.00036892
11	0.00020069	0.00021441	0.00041510
12	0.00027316	0.00013910	0.00041226
13	0.00052525	0.00007712	0.00060237
14	0.00088373	0.00003424	0.00091797
15	0.00123129	0.00001025	0.00124153
16	0.00157502	0.00000355	0.00157857
17	0.00173038	0.00001291	0.00174328
18	0.00137133	0.00003702	0.00140835
19	0.00053746	0.00007172	0.00060918
20	0.00008755	0.00012259	0.00021015
21	0.00017870	0.00019285	0.00037155

Eigenvalues for each principal warp:

i	Lambda
1	3.7926E+002
2	2.3081E+002
3	2.2653E+002
4	1.9632E+002
5	1.7928E+002
6	1.5687E+002
7	1.3370E+002
8	1.1368E+002
9	9.2702E+001
10	7.2956E+001
11	5.8899E+001
12	4.3212E+001
13	3.2131E+001
14	2.0155E+001
15	1.5803E+001
16	7.6781E+000
17	5.5680E+000
18	1.4760E+000

Singular values and percent explained for relative warps:

No.	SV	%	Cum %	No.	SV	%	Cum %
1	1.05332	86.63%	86.63%	20	0.01076	0.01%	99.97%
2	0.26285	5.39%	92.02%	21	0.00958	0.01%	99.98%
3	0.25501	5.08%	97.10%	22	0.00930	0.01%	99.99%
4	0.10586	0.87%	97.97%	23	0.00812	0.01%	99.99%
5	0.08343	0.54%	98.52%	24	0.00562	0.00%	100.00%
6	0.06795	0.36%	98.88%	25	0.00323	0.00%	100.00%
7	0.05883	0.27%	99.15%	26	0.00303	0.00%	100.00%
8	0.05173	0.21%	99.36%	27	0.00289	0.00%	100.00%
9	0.04432	0.15%	99.51%	28	0.00253	0.00%	100.00%
10	0.03810	0.11%	99.62%	29	0.00211	0.00%	100.00%
11	0.03414	0.09%	99.71%	30	0.00201	0.00%	100.00%
12	0.02817	0.06%	99.78%	31	0.00169	0.00%	100.00%
13	0.02575	0.05%	99.83%	32	0.00151	0.00%	100.00%
14	0.02344	0.04%	99.87%	33	0.00135	0.00%	100.00%
15	0.01881	0.03%	99.90%	34	0.00125	0.00%	100.00%
16	0.01757	0.02%	99.92%	35	0.00103	0.00%	100.00%
17	0.01427	0.02%	99.94%	36	0.00091	0.00%	100.00%
18	0.01386	0.01%	99.95%	37	0.00076	0.00%	100.00%
19	0.01277	0.01%	99.97%	38	0.00053	0.00%	100.00%

Fig. 3.28 - Esempio di RWA (a sinistra) e di reticoli di deformazione (a destra) prodotti dalla *Relative Warps Analysis*. In basso, parte delle matrici di dati ed elaborazioni statistiche elencate nel report

Outline analysis

Quando il campione da analizzare è bidimensionale, l'analisi degli *outline* è spesso considerata un'ottima alternativa da utilizzare soprattutto quando i *landmark* sono troppo difficili da definire o osservare. Entrambe le tecniche dovrebbero essere utilizzate insieme. Sono però da sottolineare alcune carenze della morfometria degli *outline*: innanzitutto, non vengono confrontati punti di origine omologa e tende a semplificare troppo forme anche complesse, limitandosi ad esaminarne il contorno e non i cambiamenti interni (ZELDITCH *et al.,* 2004).

L'analisi dei contorni è stata effettuata con la metodologia dei Descrittori Ellittici di Fourier (KUHL, GIARDINA, 1982), che permette di descrivere in termini di armoniche, ogni tipo di forma con un contorno chiuso bidimensionale. Per questa tipologia di analisi è stato usato il software *SHAPE 1.3* (IWATA, UKAI, 2002), un pacchetto che comprende vari programmi: *Chain Coder*, *Chc2Nef* e *PrinComp*. Dopo aver trasformato le immagini in file .bps a 24bit, formato richiesto dal programma, è stato utilizzato *SHAPE-Chain Coder*, per convertire le immagini a colori in binarie da cui è stato trascritto il contorno in *chain-code* (.chc), un sistema codificato che ne descrive le informazioni geometriche. Successivamente il file .chc è stato trasformato in un *normalized elliptic Fourier file* (.nef) con *SHAPE* -

Chc2Nef, utilizzando 20 armoniche. La matrice dei coefficienti delle armoniche è stata sottoposta ad un processo di normalizzazione dei dati basato sulla prima armonica che acquistano significato di variabili di forma (Fig. 3.29).

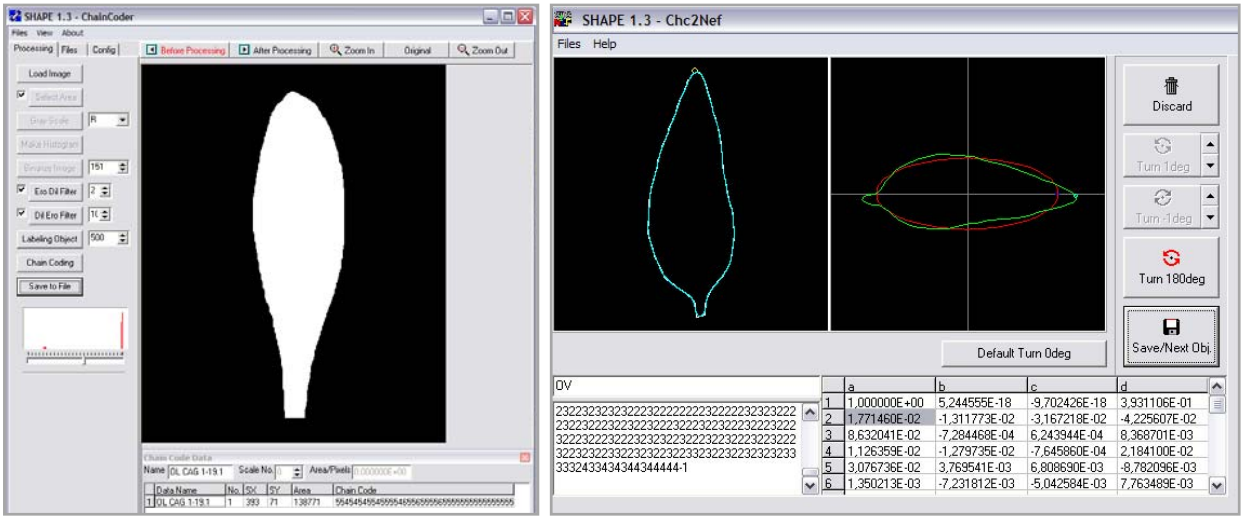


Fig. 3.29 - Esempio di elaborazioni in SHAPE-ChainCoder e Ch2Nef.

Successivamente è stata effettuata l'analisi delle componenti principali sulle matrici di varianza-covarianza dei coefficienti normalizzati (EFDs - *Elliptic Fourier Descriptors*) attraverso *SHAPE-PrinComp*, che restituisce un *output* grafico del numero di componenti principali scelte o significative, mettendo a confronto la forma media e 2 deviazioni standard.

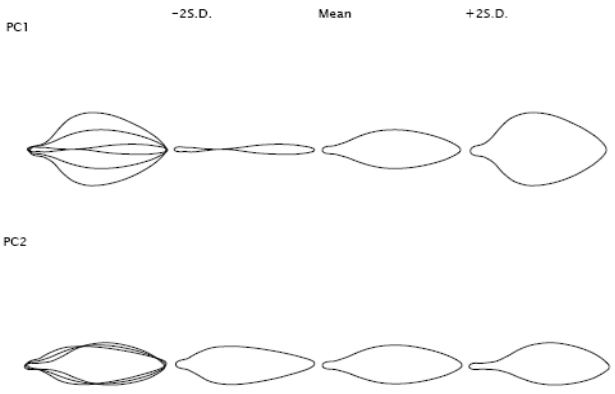


Fig. 3.30 - Esempio di analisi delle prime 2 componenti principali attraverso *SHAPE-PrinComp*. Le immagini si riferiscono alla forma media e 2 deviazioni standard, sia sovrapposte che presentate singolarmente.

3.5. Riproduzione *in vitro*

Nelle banche del germoplasma per ogni accessione di semi o spore sono previste prove che ne testino la vitalità e germinabilità prima della conservazione a lungo termine. Nella presente ricerca, si è preferito non limitarsi a semplici prove di germinazione, ma prolungare le colture fino alla riproduzione *in vitro*.

Questo per due ordini di motivi: prima di tutto, perché ai fini della conservazione delle Pteridofite non è sufficiente valutare la germinabilità delle spore, ma è necessario chiudere il ciclo riproduttivo così da poterne valutare eventuali criticità; in secondo luogo, per non "sprecare" materiale prezioso come le spore e gametofiti delle 3 specie oggetto di studio e cercare di ottenere sporofiti da conservare *in vivo*.
La riproduzione *in vitro* da spore è una tecnica che prevede le varie fasi descritte di seguito, essenzialmente le stesse (a parte la sterilizzazione superficiale) sia per la riproduzione da spore fresche che da spore prelevate da saggi d'erbario: scelta e preparazione dei mezzi di coltura; preparazione e semina delle spore; incubazione e mantenimento delle colture.
È stata intrapresa la riproduzione *in vitro* con le accessioni P 01 06 e P 81 09 di *Ophioglossum vulgatum*, P 22 07 di *Osmunda regalis*, P 44 07 e P 67 08 di *Dryopteris tyrrhena* delle 2 località di campionamento.

3.5.1. Scelta e preparazione dei terreni di coltura

Per la riproduzione *in vitro* sono stati utilizzati diversi substrati di coltura: KNOP (KNOP, 1865), DYER (DYER, 1979) modificato da PANGUA et al. (1994), MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962), KNUDSON C (KNUDSON, 1946) modificato da WHITTIER (1965), MOORE (1903) modificato da WHITTIER e MOYROUD (1993) e BM1 (VAN WAES, 1984), oltre ad un certo numero di varianti degli ultimi due terreni.
I vari terreni sono stati preparati secondo i protocolli riportati di seguito, portando poi al volume finale con acqua distillata. Dopo aver misurato il pH della soluzione si è proceduto al suo aggiustamento ai valori previsti per ogni substrato mediante una soluzione 0,1M di NaOH oppure 1M di HCl a seconda della necessità di correggere l'acidità o l'alcalinità: pH 4.1±0.1 per DYER, pH 5.8±0.1 per KNOP e MS, pH 6.1±0.1 per MOORE e varianti, pH 6.3±0.1 per KNUDSON C, BM1 e varianti.
Lo stato fisico del substrato colturale è importante, perché determina il grado di imbibizione delle spore e il tasso di sopravvivenza dei gametofiti (RAGHAVAN, 1989), quindi, al mezzo liquido è stato aggiunto agar per la coltura dei tessuti vegetali (*Applichem*) in basse quantità, 0,6-1% come indicato dai rispettivi protocolli, per ottenere un terreno non troppo solido. Il substrato così preparato è stato distribuito all'interno di bottiglie e sterilizzato in autoclave a 121°C per 20 minuti.

Osmunda regalis

Per la riproduzione *in vitro* di *Osmunda regalis* è stato utilizzato un terreno minerale specifico, KNOP (KNOP, 1865), sia per la riproduzione da spore fresche (FERNANDEZ *et al.,* 1997b; FERNANDEZ *et al.,* 1999; FERNANDEZ, REVILLA, 2003) che prelevate da saggi d'erbario (MAGRINI *et al.,* 2007; 2010c), preparato secondo il protocollo riportato nella tabella seguente. Il pH è stato aggiustato a 5.8±1 prima dell'aggiunta dello 0,7% di agar. È stato scelto un substrato così povero perché l'autotrofia delle spore rende inutile l'utilizzo di un substrato più ricco in micro- e macroelementi, che, inoltre, aumenterebbe il rischio di contaminazioni da funghi o batteri.

KNOP (1865)		
Componenti	Formula	Quantità (g/L)
Fosfato di potassio	KH_2PO_4	0,25 g
Solfato di magnesio eptaidrato	$MgSO_4*7\ H_2O$	0,25 g
Nitrato di potassio	KNO_3	0,25 g
Nitrato di calcio tetraidrato	$Ca(NO_3)_2*4H_2O$	1 g
Solfato di ferro	$FeSO_4$	0,00126 g

Tab. 3.10 - Protocollo per la preparazione del terreno KNOP (1865)

Dryopteris tyrrhena

Per la riproduzione *in vitro* è stato utilizzato un terreno colturale specifico, MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962), indicato in lavori recenti per altre specie dello stesso genere (MENÉNDEZ *et al.,* 2006; QUINTANILLA, ESCUDERO, 2006) e utilizzato sia per le spore fresche che per spore prelevate da *exsiccata*. Il terreno è stato preparato secondo il protocollo riportato nella tabella seguente, aggiustando il pH a 5.8±1 prima dell'aggiunta dello 0,7% di agar (MAGRINI, SCOPPOLA, 2008; 2009; 2010a).

MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962)		
Componenti	Formula	Quantità (mg/L)
Fosfato di potassio monobasico	KH_2PO_4	170 mg
Solfato di magnesio	$MgSO_4$	180,7 mg
Nitrato di ammonio	NH_4NO_3	1650 mg
Nitrato di potassio	KNO_3	1900 mg
Cloruro di calcio	$CaCl_2$	332,2 mg
Acido borico	H_3BO_3	6,2 mg
Solfato di manganese monoidrato	$MnSO_4 * H_2O$	16,9 mg
Solfato di zinco eptaidrato	$ZnSO_4 * 7\ H_2O$	8,6 mg
Ioduro di potassio	KI	0,83 mg
Molibdato di sodio diidrato	$Na_2MoO_4 * 6\ H_2O$	0,25 mg
Cloruro di rame (II) pentaidrato	$CuSO_4 * 5\ H_2O$	0,025 mg
Cloruro di cobalto (II) esaidrato	$CoCl_2 * 6\ H_2O$	0,025 mg
Solfato di ferro eptaidrato	$FeSO_4 * 7\ H_2O$	27,8 mg
Na_2EDTA	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8*2H_2O$	37,26 mg
Glicina		2,0 mg
Acido nicotinico		0,5 mg
Myo-inositolo		100 mg
Piridoxina HCl		0,5 mg
Tiamina HCl		0,1 mg

Tab. 3.11 - Protocollo per la preparazione del terreno MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962)

Per la prova di induzione di apogamia (vedi Par. 3.5.7.) è stato utilizzato un secondo terreno, DYER (DYER, 1979) come modificato da A.F. Dyer stesso per *Asplenium sp. pl*. in PANGUA et al. (1994). È un terreno minerale molto più semplice rispetto a MS, preparato secondo il protocollo riportato nella tabella seguente. Il pH è stato aggiustato a 4.1±1 prima dell'aggiunta dell'1% di agar, in percentuale maggiore perché a causa della sua acidità tende a gelificare difficilmente.

DYER modificato (PANGUA *et al.,* 1994)		
Componenti	Formula	Quantità (g/L)
Solfato di magnesio eptaidrato	$MgSO_4*7\ H_2O$	0,510 g
Nitrato di potassio	KNO_3	0,120 g
Cloruro ferrico esaidrato	$FeCl_3*6H_2O$	0,017 g
Nitrato di calcio tetraidrato	$Ca(NO_3)_2*4H_2O$	1,440 g
Fosfato di potassio	KH_2PO_4	0,125 g
Fosfato dipotassico	K_2HPO_4	0,125 g

Tab. 3.12 - Protocollo per la preparazione del terreno DYER modificato (PANGUA *et al.,* 1994)

Ophioglossum vulgatum

Per *Ophioglossum vulgatum* sono stati utilizzati diversi terreni di coltura, elencati di seguito, accomunati dalla presenza del 2% di saccarosio. Infatti, come per le orchidee (RASMUSSEN , 1995; SGARBI, 2001) con le quali le *Ophioglossaceae* condividono la micoeterotrofia, per la riproduzione asimbiotica *in vitro* è fondamentale un terreno colturale con la giusta percentuale di zuccheri, che sostituiscono il fungo micorrizico nella sua funzione trofica.

Il primo terreno scelto per la riproduzione *in vitro* è KNUDSON C *Orchid Medium* (KNUDSON, 1946), un terreno per orchidee epifite tropicali, contenente azoto in forma inorganica e molto povero in ferro disponibile (infatti in soluzione si forma fosfato di ferro insolubile), modificato da WHITTIER (1965) con l'aggiunta di Fe-EDTA (SHEAT *et al.,* 1959) (Tab. 3.14) e della soluzione di elementi minori di WHITTIER e STEEVES (1960) (Tab. 3.13), come indicato nell'unico lavoro che fornisce dati di germinazione per *Ophioglossum vulgatum* var. *pseudopodum*, anche se con percentuali estremamente basse (0,7%) WHITTIER (1981).

Elementi minori (WHITTIER, STEEVES, 1960)		
Componenti	Formula	Quantità (g/L)
Cloruro di manganese (II) tetraidrato	$MnCl_2*4H_2O$	2,5 g
Acido borico	H_3BO_3	2,0 g
Solfato di zinco eptaidrato	$ZnSO_4*7H_2O$	0,05 g
Cloruro di cobalto (II) esaidrato	$CoCl_2*6H_2O$	0,03 g
Cloruro di rame (II) diidrato	$CuCl_2*2H_2O$	0,015 g
Molibdato di sodio diidrato	$Na_2MoO_4*2H_2O$	0,025 g
Acido solforico (sp.gr. 1.83)	H_2SO_4	0,5 mL
Acqua distillata	H_2O	Portare a volume (1L)

Tab. 3.13 - Soluzione di elementi minori (WHITTIER, STEEVES, 1960) in acido solforico.

Fe-EDTA (SHEAT *et al.,* 1959)		
Componenti	Formula	Quantità (g/L)
Na_2EDTA (sale da sciogliere in acqua distillata)	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8*2H_2O$	0,8 g
Soluzione al 10% di cloruro ferrico		3,0 mL
Acqua distillata	H_2O	Portare a volume (1L)

Tab. 3.14 - Soluzione di Fe-EDTA (SHEAT *et al.,* 1959)

Soluzione al 10% di cloruro ferrico		
Componenti	Formula	Quantità
Cloruro di ferro (III) esaidrato	$FeCl_3*6H_2O$	0,1666 g
Acqua distillata	H_2O	Portare a volume (10 mL)

Tab. 3.15 - Soluzione al 10% di cloruro ferrico

Il terreno è stato preparato secondo il protocollo riportato nella tabella seguente aggiustando il pH a 6.3±1 prima dell'aggiunta dello 0,6% di agar.

KNUDSON C (1946) modificato (WHITTIER, 1965)		
Componenti	Formula	Quantità (g/L)
Nitrato di calcio tetraidrato	$Ca(NO_3)_2*4H_2O$	1 g
Fosfato di potassio	KH_2PO_4	0,25 g
Solfato di magnesio eptaidrato	$MgSO_4*7H_2O$	0,25 g
Solfato di ammonio	$(NH_4)_2SO_4$	0,5 g
Solfato di ferro eptaidrato	$FeSO_4*7H_2O$	0,025 g
Solfato di manganese tetraidrato	$MnSO_4*4H_2O$	0,0075 g
Soluzione di elementi minori (WHITTIER, STEEVES, 1960)		0,5 mL
Fe-EDTA (SHEAT *et al.,* 1959)		8 mL
Saccarosio		20 g

Tab. 3.16 - Protocollo per la preparazione del terreno KNUDSON C (1946) modificato (WHITTIER, 1965).

Lavori più recenti indicano come, in varie specie di *Ophioglossaceae*, la germinazione asimbiotica venga inibita dai nitrati e stimolata dall'ammonio (WHITTIER, 2000), per questo motivo è stato scelto un secondo terreno di coltura, MOORE (1903) modificato da WHITTIER e MOYROUD (1993) per *Ophioglossum palmatum*, non contenente nitrati, ma solo cloruro di ammonio come fonte di azoto.
Il substrato è stato preparato secondo il protocollo riportato nella tabella seguente ed il pH è stato aggiustato a 6.1±1 prima dell'aggiunta dell'1% di agar.

MOORE (1903) modificato (WHITTIER, MOYROUD, 1993)		
Componenti	Formula	Quantità (mg/L)
Solfato di magnesio eptaidrato	$MgSO_4*7\ H_2O$	100 mg
Cloruro di calcio	$CaCl_2$	40 mg
Fosfato dipotassico	K_2HPO_4	100 mg
Cloruro di ammonio	NH_4Cl	100 mg
Soluzione di elementi minori (WHITTIER, STEEVES, 1960)		0,5 mL
Fe-EDTA (SHEAT *et al.,* 1959)		8 mL
Saccarosio		20 g

Tab. 3.17 - Protocollo per la preparazione del terreno MOORE (1903) modificato da WHITTIER e MOYROUD (1993)

Infine, è stato testato il terreno di coltura BM-1 *Terrestrial Orchid Medium* (VAN WAES, 1984) molto utilizzato negli ultimi anni per la riproduzione asimbiotica *in vitro* di orchidee terrestri (SGARBI, 2001; SGARBI *et al.,* 2007; DUTRA *et al.,* 2008; KAUTH *et al.,* 2008; MAGRINI *et al.,* 2009). BM1 è una modifica

del terreno BM (RASMUSSEN, 1995) dove i composti inorganici dell'azoto [KNO_3, $(NH_4)\ 2SO_4$, e NH_4NO_3] sono stati sostituiti con azoto esclusivamente in forma organica: caseina idrolizzata per digestione enzimatica (triptone) e L-glutammina.

Il substrato è stato preparato secondo il protocollo riportato nella tabella seguente ed il pH è stato aggiustato a 6.3±1 prima dell'aggiunta dello 0,6% di agar.

BM-1		
Componenti	Formula	Quantità (mg/L)
Fosfato di potassio	KH_2PO_4	300 mg
Solfato di magnesio eptaidrato	$MgSO_4 * 7\ H_2O$	100 mg
Cloruro di rame (II) pentaidrato	$CuSO_4 * 5\ H_2O$	0.025 mg
Solfato di ferro eptaidrato	$FeSO_4 * 7\ H_2O$	27.85 mg
Molibdato di sodio diidrato	$Na_2MoO_4 * 2\ H_2O$	0.25 mg
Acido borico	H_3BO_3	10 mg
Solfato di manganese tetraidrato	$MnSO_4 * 4\ H_2O$	25 mg
Cloruro di cobalto (II) esaidrato	$CoCl_2 * 6\ H_2O$	0.025 mg
Solfato di zinco eptaidrato	$ZnSO_4 * 4\ H_2O$	10 mg
Na_2EDTA	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8*2H_2O$	37.25 mg
Biotina		0.05 mg
Acido folico		0.5 mg
L-glicina		2.0 mg
Myo-inositolo		100.0 mg
Acido nicotinico		5.0 mg
Piridoxina		0.5 mg
Tiamina		0.5 mg
Caseina idrolizzata		500 mg
L-glutammina		100 mg
Saccarosio		20 g

Tab. 3.18 - Protocollo per la preparazione del terreno BM1.

Messa a punto di nuovi terreni per *Ophioglossum vulgatum*

Dal confronto dei componenti dei terreni utilizzati per la riproduzione asimbiotica di *Ophioglossum* (WHITTIER, 1981; 2006; WHITTIER, MOYROUD, 1993), *Botrychium* (WHITTIER, 1972; 1973; 1981; GIFFORD, BRANDON, 1978; WHITTIER,THOMAS, 1993) e di orchidee spontanee (VAN WAES, 1984; RASMUSSEN, 1995; SGARBI, 2001; SGARBI *et al.,* 2007; DUTRA *et al.,* 2008; KAUTH *et al.,* 2008) è stato possibile ideare alcune varianti originali di due terreni descritti precedentemente.

Infatti, è stato testato un terreno denominato BM-1P, ottenuto sostituendo in BM-1, la caseina idrolizzata con pari quantità (500mg/L) di Bacto™ Peptone, un digerito enzimatico di proteine animali.

Inoltre, si è arrivati a definire 4 varianti del terreno MOORE modificato (WHITTIER, MOYROUD, 1993), sostituendo il cloruro d'ammonio con amminoacidi come arginina o L-glutammina e/o con prodotti di idrolisi di proteine come triptone o peptone, così da poter valutare l'effetto delle diverse fonti di azoto.

È stata preparata una *stock solution*, denominata W-Base, contenente i componenti comuni ai 4 terreni e caratterizzata dall'assenza di composti dell'azoto, descritta nella tabella seguente:

W-Base Componenti	Formula	Quantità (mg/L)
Solfato di magnesio eptaidrato	$MgSO_4*7\ H_2O$	100 mg
Cloruro di calcio	$CaCl_2$	40 mg
Fosfato dipotassico	K_2HPO_4	100 mg
Soluzione di elementi minori (WHITTIER, STEEVES, 1960)		0,5 mL
Fe-EDTA (SHEAT *et al.,* 1959)		8 mL

Tab. 3.19 - Protocollo per la preparazione della *stock solution* W-Base.

Nella tabella seguente, i protocolli per la preparazione dei 4 terreni, WA, WA1, WT e WP sono messi a confronto con MOORE modificato dal quale derivano. Per tutti, il pH è stato aggiustato a 6.1±1 prima dell'aggiunta dell'1% di agar.

Componenti	MOORE mod.	WA	WA1	WT	WP
Cloruro di ammonio	1g	1g	-	-	-
Fe-EDTA	-	8 mL	8 mL	-	-
Arginina	-	25 mg	25 mg	-	-
L-glutammina	-	-	-	100 mg	100 mg
Triptone	-	-	-	500 mg	-
Peptone	-	-	-	-	500 mg
Saccarosio	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g
W-base	a volume (1L)	a volume (1L)	a volume (1L)	a volume (1L)	a volume (1L)

Tab. 3.20 - Protocollo per la preparazione dei 4 terreni, WA, WA1, WT e WP sono messi a confronto con MOORE modificato dal quale derivano

Preparazione del fungicida

Per ridurre il rischio di contaminazione, i terreni di coltura sono stati integrati con un fungicida, aggiunto in sterilità dopo la sterilizzazione in autoclave, quando il substrato ha raggiunto una temperatura di circa 50°C così da non danneggiarlo.

Come fungicida è stata utilizzata una soluzione di *Nystatin* (*Applichem*, 4400 U.I./mg), disciolto in un solvente aprotico, il dimetilsolfossido (DMSO), preparata prima dell'utilizzo, visto che non può essere conservata; la quantità di unità attive di nistatina nel terreno di coltura deve essere pari a 100 U.I./ml (SIMABUKURO *et al.,* 1998b; QUINTANILLA *et al.,* 2002; ARAGON, PANGUA, 2004; PANGUA *et al.,* 2006).

3.5.2. Preparazione delle spore: pulizia e pretrattamenti

Prima della semina le spore raccolte devono subire alcuni trattamenti preliminari, necessari per evitare contaminazione delle colture, come la pulizia e la sterilizzazione superficiale, o per stimolare la germinazione, fra questi la reidratazione ed altri eventuali pretrattamenti.

Pulizia

La pulizia è stata condotta manualmente utilizzando microsetacci con maglia da 56, 71 e 100 μm per allontanare dalle spore la maggior parte del materiale estraneo, come sporangi, palee, parafisi, frammenti vegetali, ecc., potenziali fonti di contaminazioni (da alghe, funghi o batteri) che potrebbero creare problemi lungo tutte le fasi del lavoro. A questa è seguita un'ulteriore pulizia manuale allo stereomicroscopio, ponendo il materiale su fogli di carta patinata e utilizzando spilli di acciaio e pinzette per microscopia.

Reidratazione

L'imbibizione con acqua è il primo *step* nel processo di germinazione, perché porta alla reidratazione del contenuto sporale, in particolar modo della cromatina e dei granuli di riserva, inducendo i cambiamenti metabolici propedeutici alla germinazione, come la sintesi del fitocromo ed altri componenti. L'ingresso di acqua all'interno delle spore è determinato dallo spessore degli strati più esterni e dallo stato di idratazione del protoplasma incluso e per questa ragione il tempo di reidratazione necessario per dare inizio all'attività di sintesi associata alla germinazione varia da specie a specie e per le spore dormienti risulta maggiore rispetto a quello necessario per le spore clorofilliane, già metabolicamente attive e che richiedono solo poche ore (RAGHAVAN, 1989).

Le spore sono state immerse in acqua distillata sterile, all'interno di *Eppendorf* da 1,5 ml, in modo da permettere la loro reidratazione: quelle di *Osmunda regalis* per un periodo di tempo di almeno 12 ore, mentre quelle di *Ophioglossum vulgatum* e di *Dryopteris tyrrhena* per almeno 24 ore (RAGHAVAN, 1989).

Sterilizzazione superficiale

La sterilizzazione della superficie delle spore seguita nel presente lavoro si basa su protocolli messi a punto da vari autori (FERNANDEZ *et al.,* 1997a, b; SIMABUKURO *et al.,* 1998b; FERNANDEZ *et al.,* 1999; FERNANDEZ, REVILLA, 2003; CHÁ-CHÁ *et al.,* 2005; MENÉNDEZ *et al.,* 2006; WHITTIER, 2006). Tranne casi particolari, si è proceduto alla sterilizzazione superficiale solo delle spore fresche e non delle spore raccolte da *exsiccata*, perché già sottoposte a disinfestazione in erbario, ma soprattutto per evitare un ulteriore stress che potesse comprometterne la vitalità.

Il protocollo utilizzato prevede la sospensione delle spore in una soluzione di ipoclorito di sodio (0,5-1% vedi Tab. 3.21), con l'aggiunta di circa 40 μl di un surfattante idrofilico, *Tween* 20 o *Tween* 80; i tempi di sterilizzazione utilizzati sono diversi per ogni specie, come indicato nella tabella seguente, testati nell'ambito della presente ricerca e di una tesi di laurea (OLMATI, 2007).

Durante il primo minuto di sterilizzazione è necessario vorticare il campione per permettere alla soluzione di raggiungere tutte le spore che tenderebbero a sedimentare sul fondo e per facilitare il

distacco di eventuali impurità. Successivamente, vengono sottoposte a centrifugazione per 1 minuto alla velocità di 6000 rpm, prima di procedere all'aspirazione della soluzione sterilizzante e del surnatante, seguita da 3 lavaggi in acqua distillata sterile. Analogamente, ad ogni lavaggio le spore vengono vorticate per 1 minuto e sottoposte a centrifugazione per 3 minuti alla velocità di 6000 rpm e il surnatante viene eliminato insieme all'acqua. Tutte queste operazioni vengono svolte in sterilità utilizzando una cappa a flusso laminare orizzontale.

Specie	Concentrazione NaClO	Tempo di sterilizzazione	Bibliografia
Ophioglossum vulgatum	1%	2 minuti	WHITTIER, 2006
Osmunda regalis	0,5%	3 minuti	FERNANDEZ *et al.,* 1997b; OLMATI, 2007
Dryopteris tyrrhena	0,5%	3 minuti	FERNANDEZ *et al.,* 1997b; MENÉNDEZ *et al.,* 2006

Tab. 3.21 -Protocolli di sterilizzazione superficiale utilizzati per le varie specie.

Scarificazione

Nel caso delle spore di *Ophioglossum vulgatum* è stato utilizzato e testato un ulteriore pretrattamento: la metà delle spore utilizzate per la semina ha subito una scarificazione meccanica per stimolare la germinazione, come descritto da WHITTIER (1972): le spore sono state schiacciate per 30 secondi con un pestello in un mortaio di ceramica, prima della sterilizzazione. Questa tipologia di scarificazione, come altre analoghe, chimiche o fisiche, utilizzate per la riproduzione asimbiotica *in vitro* di orchidee (RASMUSSEN, 1995; SGARBI, 2001; MAGRINI *et al.,* 2010a), simula l'azione meccanica delle ife fungine che penetrando all'interno della spora ne rompono lo strato esterno (esina), facilitando l'ingresso dell'acqua.

3.5.3. Semina delle spore

Dopo queste prime fasi preparatorie, le spore da seminare sono state sospese in 1,5 ml di acqua distillata sterile all'interno di *Eppendorf*. Tutte le semine sono state effettuate in sterilità, prelevando circa 500 µl di sospensione sporale da ogni *Eppendorf* con una micropipetta a volume variabile *Acura-Vario* 100-1000 µL, dopo aver vorticato per qualche secondo per evitare che le spore si depositino sul fondo. Sono state seminate, in tre repliche, in capsule Petri sterili (diametro 6 cm), contenenti 15 ml di terreno minerale agarizzato specifico, oppure in piastre *multiwell* da 12 pozzetti, contenenti 4 ml di substrato ciascuno, a seconda della tipologia di prova. Tutte le piastre sono state chiuse con *Parafilm® M*, sia per evitare un'eccessiva perdita d'acqua e mantenere l'umidità necessaria per la germinazione e per le successive fasi di sviluppo del gametofito, sia per ridurre il pericolo di contaminazioni dell'esterno (MORINI, 2000; COX *et al.,* 2003).

3.5.4. Incubazione delle colture

Le colture sono state incubate in frigotermostati ad illuminazione programmata, con 2 temperature diverse a seconda della specie e della tipologia di test, avendo cura di disporre tutte le piastre di ogni prova su vassoi di plastica e sullo stesso ripiano del termostato, in modo da standardizzare le condizioni colturali e ridurre possibili differenze di temperatura e illuminazione fra le repliche.

Le colture di *Osmunda regalis* e *Dryopteris tyrrhena* sono state incubate alla temperatura di +20°C ± 1 (DYER, 1979; WINDHAM *et al.,*1986; PANGUA *et al.,* 1994; SHEFFIELD *et al.,* 2001; QUINTANILLA *et al.,* 2002; ARAGON, PANGUA, 2004; BALLESTEROS *et al.,* 2004; MENÉNDEZ *et al.,* 2006; PANGUA *et al.,* 2006), illuminate tramite lampade tubulari a luce fluorescente *cool-white* (*Osram Dulux* L 36W/840 *Lumilux*, 2900 lm) con un fotoperiodo 12/12 h (DYER, 1979; WINDHAM *et al.,*1986; BALLESTEROS *et al.,* 2004; MENÉNDEZ *et al.,* 2006; PANGUA *et al.,* 2006).

Per le colture di *Dryopteris tyrrhena* da spore provenienti da saggi d'erbario della Sierra Nevada, dove la specie cresce a circa 2000 m s.l.m., sono state testate anche altre 2 temperature, T = +5°C ± 1 e T = +15°C ± 1, per valutarne le preferenze termiche.

Per quanto riguarda *Ophioglossum*, le piastre sono state avvolte in fogli di alluminio e quindi incubate al buio e per ricreare condizioni analoghe a quelle naturali e alla temperatura di +24°C± 1 (WHITTIER, 1981; MAGRINI *et al.,* 2006). Infatti, contrariamente a quella che è la condizione della maggior parte delle felci per le quali è la luce che induce la germinazione delle spore, per le *Ophioglossaceae* ha un effetto inibitorio ed è proprio la coltura al buio completo per lunghi periodi di tempo che può contribuire a rompere la dormienza delle spore di certe specie di *Botrychium*, *Ophioglossum vulgatum* ed *Helminthostachys zeylanica* (GIFFORD, BRANDON, 1978; WHITTIER, 1981; 1987).

3.5.5. Osservazioni periodiche delle colture

Le colture di *Osmunda regalis* e *Dryopteris tyrrhena* sono state esaminate con uno stereomicroscopio (*Nikon* SMZ 1000) una volta al giorno fino all'osservazione della germinazione (intesa come emergenza del primo rizoide dalla spora) e della formazione di gametofiti laminari, e, successivamente, una volta a settimana, prendendo nota dei tempi e delle percentuali di germinazione e di sviluppo delle diverse specie in un'apposita scheda di rilevamento dati (Fig. 3.31). Per *Ophioglossum vulgatum* sono stati effettuati controlli mensili, dato il lungo tempo necessario per la germinazione indicato in letteratura (WHITTIER, 1981).

Contemporaneamente è stato effettuato il controllo dell'umidità all'interno delle capsule, provvedendo all'aggiunta acqua distillata sterile nelle piastre in cui si è verificata un'eccessiva evaporazione.



BGT – Banca del Germoplasma della Tuscia

Pteridofite

Scheda di lavoro - RIPRODUZIONE *IN VITRO*

Specie .....

Provenienza .....

Prove di germinazione

Data di inizio												
Terreno												
Tempo di sterilizzazione												
Temperature di incubazione												
n° repliche												

Tipologia di prova	Germinazione		Fase laminare (%)		Gametofiti in fase riproduttiva (%)			Giorno formazione primo sporofito
	Giorno	(%)	30 gg	60 gg	60 gg	90 gg	120 gg	

Fig. 3.31 - Scheda per il rilevamento di dati durante la riproduzione *in vitro* di Pteridofite

3.5.6. Trasferimento delle colture

I gametofiti in fase tridimensionale sono stati trasferiti in contenitori di vetro di dimensioni maggiori contenenti lo stesso terreno di coltura, utilizzando anse sterili per microbiologia, per agevolarne lo sviluppo completo in subcolture con una minor densità di individui e, quindi, minor competizione per spazio, acqua e luce.

I gametofiti maturi sono stati poi trasferiti in una miscela di terriccio (torba, corteccia di conifere sfibrata, sabbia; pH 7,2), preventivamente sterilizzato in autoclave alla temperatura di 121°C per 20 minuti e reidratato con acqua distillata sterile.

Dopo l'osservazione dello sviluppo dei gametangi, quotidianamente è stata aggiunta acqua distillata sterile per nebulizzazione per favorire il rilascio degli spermatozoidi e la fecondazione (RAGHAVAN, 1989).

3.5.7. Definizione della tipologia di apogamia in *Dryopteris tyrrhena* e prove di induzione

Per riuscire a definire il tipo di apogamia in *Dryopteris tyrrhena* sono state allestite prove mirate, prendendo in considerazione i fattori di induzione dell'apogamia noti in letteratura (Par. 2.4.6.): la scarsità di acqua (RAGHAVAN, 1989), la presenza di saccarosio nel terreno di coltura (WHITTIER,

STEEVES, 1960; 1962; WHITTIER, 1962; 1975; ELMORE, WHITTIER, 1975; FERNÁNDEZ *et al.,* 1996), l'aggiunta di auxina, citochinine e gibberelline (WHITTIER 1966), la crescita verticale dei gametofiti (MEHRA, SULKLYAN, 1969), un'alta intensità luminosa (WHITTIER, PRATT, 1971), la produzione di etilene (ELMORE, WHITTIER 1975).

Una prima prova ha riguardato le spore della popolazione di Riomaggiore (DTR) che hanno mostrato il comportamento apogamo (MAGRINI, SCOPPOLA, 2009; 2010a). Per definire il tipo di apogamia, obbligata o facoltativa, sono state allestite nuove colture, analizzando il protocollo utilizzato in precedenza (Par. 3.5.) ed eliminando tutti i possibili fattori di induzione. A tale scopo, oltre al terreno MS già utilizzato per la riproduzione, è stato utilizzato un secondo substrato di coltura, DYER modificato (come descritto nel Par. 3.5.1.), molto più semplice e povero in nutrienti; a nessuno dei due substrati è stato aggiunto saccarosio, né ormoni o altri fitoregolatori della crescita. Anche se la sterilizzazione superficiale non è riportata in letteratura come causa di induzione, le spore non sono state sterilizzate superficialmente, così da testare anche questo fattore. È stata garantita la presenza di un velo d'acqua sulla superficie del terreno agarizzato durante tutte le fasi della riproduzione, provvedendo ad aggiungere acqua distillata sterile quando necessario. Non potendo intervenire sulla produzione di etilene, gas che è normalmente prodotto dal metabolismo dei gametofiti, si è provveduto all'apertura periodica delle piastre in sterilità per consentirne la fuoriuscita e alla subcoltura dei gametofiti in contenitori di dimensioni maggiori. La disposizione e la densità dei gametofiti sono state controllate periodicamente per verificare e intervenire in caso di crescita non parallela al substrato, spesso causata da un'eccessiva densità. Le colture sono state incubate a 2 diverse temperature T = +20±1°C e fotoperiodo 12/12h e T = +24±1°C e fotoperiodo 16/8h.

Prove di induzione

È stata allestita una seconda prova per verificare la possibilità di indurre apogamia nelle spore provenienti dalla popolazione di Capraia (DTC) che nella riproduzione *in vitro* hanno prodotto gametangi e sporofiti per via sessuale (MAGRINI, SCOPPOLA, 2009; 2010a).

Le spore sono state suddivise in due aliquote, delle quali una è stata sterilizzata superficialmente mentre l'altra è stata seminata direttamente. Come nella prova precedente, sono stati utilizzati 2 terreni di coltura, DYER modificato e MS (Par. 3.5.1.), ma al secondo sono state aggiunte diverse quantità di saccarosio (2% e 3%). Non si è provveduto ad eliminare l'etilene endogeno prodotto durante la crescita, né a verificare posizione e densità dei gametofiti. Come nella precedente prova, le colture sono state incubate a 2 diverse temperature T = +20±1°C e fotoperiodo 12/12h e T = +24±1°C e fotoperiodo 16/8h. Complessivamente la prova ha previsto 16 combinazioni diverse di possibili fattori

3.6. Conservazione delle spore

Tutte le accessioni in ingresso alla Banca del Germoplasma della Tuscia vengono dotate di un codice alfanumerico univoco che le identificherà durante tutte le fasi di conservazione o riproduzione. Tale codice è formato dall'identificativo del gruppo tassonomico di appartenenza (P = Pteridofite; G = Gimnosperme; A = Angiosperme) seguito da un numero progressivo che indica le accessioni dell'anno in corso e dalle due ultime cifre dell'anno di riferimento.

Per la conservazione a lungo termine delle spore sono state seguiti 2 diversi protocolli: un protocollo per la conservazione di spore deidratate per *Ophioglossum vulgatum* e *Dryopteris tyrrhena,* e un altro per le spore clorofilliane di *Osmunda regalis*, per il quale si rimanda al paragrafo seguente (par. 3.6.1.).

Le spore, dopo la pulizia eseguita come descritto nel Par. 3.5.2., sono state poste all'interno di *vials* di vetro che sono state lasciate aperte per una settimana all'interno di una camera di deidratazione alla temperatura di 15°C e con il 15% di umidità relativa, così da portare il contenuto in acqua intorno al 5%, valore adatto per la conservazione a basse temperature (LINDSAY *et al.,*1992; SIMABUKURO *et al.,* 1998b; QUINTANILLA *et al.,* 2002; ARAGON, PANGUA,2004; BALLESTEROS *et al.,* 2004; CHÁ-CHÁ *et al.,* 2005; MAGRINI *et al.,* 2006; BACCHETTA *et al.,* 2008b).

La collezione attiva, utilizzata soprattutto per la riproduzione *in vitro*, viene mantenuta in frigorifero, T = +5±1°C, per brevi periodi di tempo, in *vials* da 4 ml con tappo a vite. La collezione a lungo termine viene mantenuta a T = -20°C in un congelatore a colonna, con controllo elettronico della temperatura e sistema *no frost* che limita l'umidità al suo interno, collocato all'interno di un locale climatizzato. Le spore vengono stoccate in *vials* tipo penicillina da 10 ml contenenti gel di silice granulare e uno strato di cotone idrofobo, a loro volta racchiuse in barattoli Bormioli a chiusura ermetica, con gel di silice granulare e indicatori di umidità *Levosil* a 3 spot (RH=5, 10 e 15%) (BACCHETTA et al. 2006; 2008b; MAGRINI *et al.,* 2010b). Tutte le *vials* della collezione attiva e della collezione a lungo termine sono dotate di etichetta adesiva che ne riporta il binomio specifico, il codice identificativo e la data di raccolta.

3.6.1. Prove di conservazione delle spore di *Osmunda regalis*

Nel caso di *Osmunda regalis*, unica con spore clorofilliane metabolicamente attive e scarsa longevità (vedi Par. 2.4.2), sono state allestite prove utili alla definizione della miglior combinazione fra i fattori idratazione/deidratazione e temperatura per la conservazione a lungo termine (MAGRINI *et al.,* 2006). A tale scopo, una volta pulite (Par. 3.5.2.), una parte delle spore è stata destinata all'allestimento di test per valutarne la germinabilità prima dell'inizio del periodo di conservazione. Le rimanenti sono state suddivise in 3 aliquote che hanno subito trattamenti diversi denominati NORMAL, DRY e WET.

NORMAL: conservazione di spore allo stato naturale. Le spore fresche hanno un contenuto in acqua di circa il 17% (LLOYD, KLEKOWSKI, 1970), senza subire alcun pretrattamento, sono state versate all'interno di *vials* di vetro da 4 ml chiuse con tappo a vite.

DRY: conservazione di spore deidratate. Le spore fresche sono state versate all'interno di *vials* di vetro da 4 ml e deidratate secondo il protocollo già descritto (Par. 3.6.).

WET: conservazione di spore allo stato idrato in terreno agarizzato**.** Questo metodo tende a ricreare condizioni analoghe a quelle naturali dove le spore permangono vitali nel suolo spesso in condizioni di forte umidità per molto tempo (LINDSAY *et al.,* 1992; SIMABUKURO *et al.,* 1998b; QUINTANILLA *et al.,* 2002; ARAGON, PANGUA,2004; MAGRINI *et al.,* 2006). Le spore fresche sono state sterilizzate seguendo la stessa procedura utilizzata per la riproduzione *in vitro* (Par. 3.5.2.), quindi sono state seminate all'interno di *vials* di vetro da 8 ml con tappo a vite, contenenti 5ml di KNOP, lo stesso terreno minerale agarizzato utilizzato per le colture (Par. 3.5.1.).

Per evitare una pre-germinazione, tutte le *vials* contenenti le spore preparate secondo le 3 tipologie di conservazione, una volta chiuse, sono state avvolte in fogli di alluminio così da garantirne lo stoccaggio al buio. Le spore deidratate (DRY) e allo stato naturale (NORMAL) sono state conservate a quattro diverse temperature: -20°C, +5°C, +15°C, + 25°C, mentre per le spore allo stato idrato (WET) non è stata considerata la temperatura di -20°C perché l'esposizione a basse temperature di spore allo stato idrato può causare danni per la formazione di ghiaccio intracellulare o disseccamento per la formazione di ghiaccio extracellulare (TRIGIANO, GRAY, 2003). Il periodo di conservazione ha avuto inizio il 23 maggio 2007.

Il 5 ottobre 2009 sono state prelevate aliquote delle spore DRY e NORMAL conservate alla temperatura T = -20°C da 28 mesi. Si è proceduto quindi al loro stoccaggio a due diverse temperature T = -40°C e T = -80°C per ulteriori 10 giorni.

Prove di germinazione

Dopo un periodo di conservazione di 28 mesi, sono state prelevate aliquote delle spore conservate alle 3 condizioni di idratazione/deidratazione e temperatura per effettuare dei test di germinazione.

Le spore sono state trasferite in sterilità in *Eppendorf* contenenti 1,5 mL di acqua distillata sterile, utilizzando una spatolina. Si è preferito non procedere alla sterilizzazione superficiale delle spore per non correre il rischio di inficiare o comunque falsare eventuali risultati.

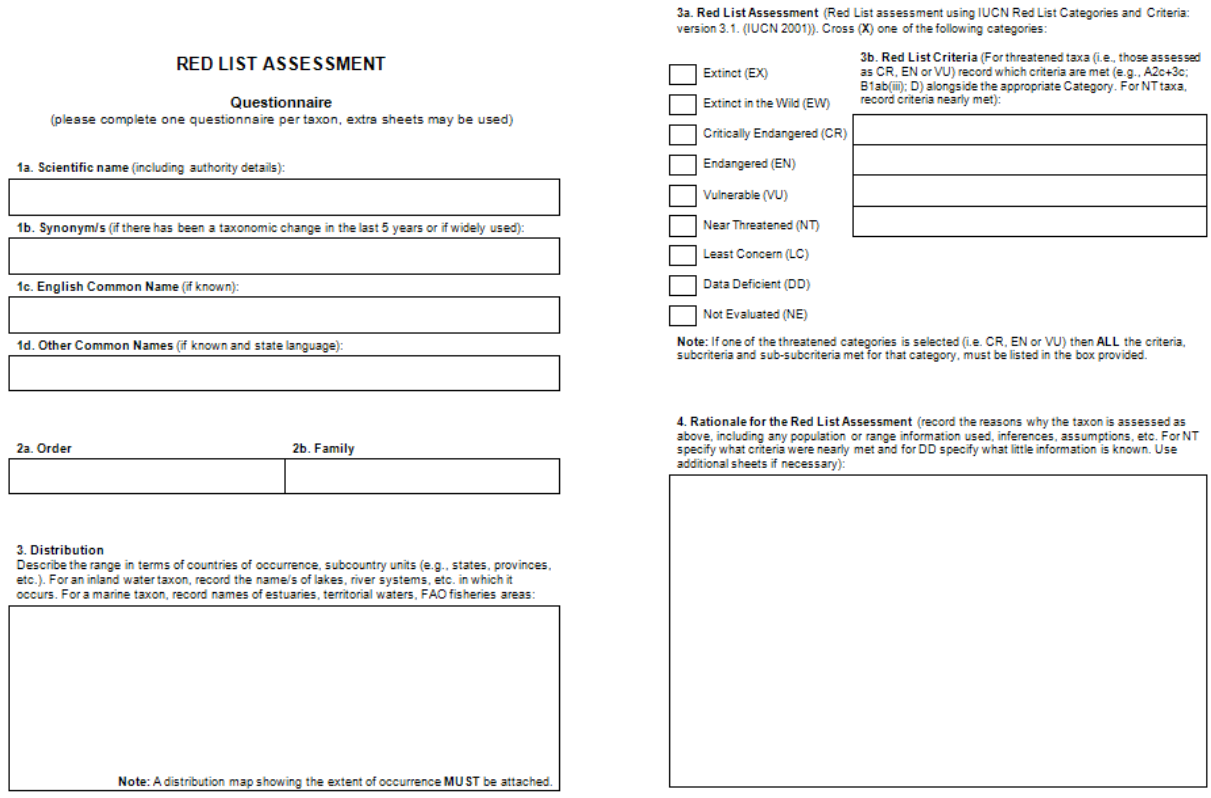
Le prove di germinazione hanno previsto le stesse fasi di reidratazione, semina, incubazione e controllo periodico delle colture già descritte per la riproduzione *in vitro* (Par. 3.5.), tranne che per le spore conservate allo stato idrato che sono state seminate direttamente in piastre con terreno di coltura KNOP.

3.7. *Assessment* IUCN di *Dryopteris tyrrhena*

Lo scopo del protocollo IUCN consiste nell'attribuzione del *taxon* ad una tra dieci categorie che ne riflettono il livello di rischio di estinzione in natura, il grado di conoscenza e la posizione nei confronti delle procedure di *red listing*. In accordo con IUCN (2001) e GÄRDENFORS *et al.* (2001) queste categorie sono: EXTINCT (EX), REGIONALLY EXTINCT (RE), EXTINCT IN THE WILD (EW), CRITICALLY ENDANGERED (CR), ENDANGERED (EN), VULNERABLE (VU), NEAR THREATENED (NT), LEAST CONCERN (LC), DATA DEFICIENT (DD), NOT EVALUATED (NE) (descritte nel Par. 1.2.2.). L'attribuzione ad una delle categorie presuppone conoscenze approfondite su modelli e dinamiche distributive e demografiche di ogni specie considerata. Tali informazioni sono quindi utilizzate nell'applicazione di criteri quantitativi; a sostegno di una procedura di valutazione dello stato di rischio il più possibilmente oggettiva (Par. 1.2.2.).

3.7.1. Scheda di valutazione

Per l'inserimento di una specie nella *IUCN Red List of the Treathened Species* (solo *on line* all'indirizzo: http://www.iucnredlist.org/) è necessario intraprendere la procedura di valutazione con la compilazione dell'*IUCN Red List Assessment Datasheet* (http://intranet.iucn.org/webfiles/doc/SSC/RedList/Red_List_Assessment_Datasheet.doc) (Fig. 3.32), una scheda complessa che prevede l'applicazione della metodologia a livello globale e regionale (*sensu* IUCN) per assegnare uno *status* di minaccia secondo i criteri e le categorie versione 3.1 (IUCN, 2001).



RED LIST ASSESSMENT

Questionnaire
(please complete one questionnaire per taxon, extra sheets may be used)

1a. Scientific name (including authority details):

1b. Synonym/s (if there has been a taxonomic change in the last 5 years or if widely used):

1c. English Common Name (if known):

1d. Other Common Names (if known and state language):

2a. Order | **2b. Family**

3. Distribution
Describe the range in terms of countries of occurrence, subcountry units (e.g., states, provinces, etc.). For an inland water taxon, record the name/s of lakes, river systems, etc. in which it occurs. For a marine taxon, record names of estuaries, territorial waters, FAO fisheries areas:

Note: A distribution map showing the extent of occurrence **MUST** be attached.

3a. Red List Assessment (Red List assessment using IUCN Red List Categories and Criteria: version 3.1. (IUCN 2001)). Cross (**X**) one of the following categories:

- Extinct (EX)
- Extinct in the Wild (EW)
- Critically Endangered (CR)
- Endangered (EN)
- Vulnerable (VU)
- Near Threatened (NT)
- Least Concern (LC)
- Data Deficient (DD)
- Not Evaluated (NE)

3b. Red List Criteria (For threatened taxa (i.e., those assessed as CR, EN or VU) record which criteria are met (e.g., A2c+3c; B1ab(iii); D) alongside the appropriate Category. For NT taxa, record criteria nearly met):

Note: If one of the threatened categories is selected (i.e. CR, EN or VU) then **ALL** the criteria, subcriteria and sub-subcriteria met for that category, must be listed in the box provided.

4. Rationale for the Red List Assessment (record the reasons why the taxon is assessed as above, including any population or range information used, inferences, assumptions, etc. For NT specify what criteria were nearly met and for DD specify what little information is known. Use additional sheets if necessary):

Fig. 3.32 - *Red List Assessment datasheet*
(http://intranet.iucn.org/webfiles/doc/SSC/RedList/Red_List_Assessment_Datasheet.doc)

Oltre alla scheda riassuntiva deve essere prodotta la seguente documentazione come indicato nell'*Annex 3* dell'*IUCN Red List Categories and Criteria* (IUCN, 2001):

- ***Taxonomy*****:** Regno, *Phylum*, Classe, Ordine e Famiglia; binomio scientifico con il patronimico; note tassonomiche in caso di particolari problemi, variazioni nomenclaturali, presenza di sinonimi, compresi i nomi utilizzati nelle passate *Red List* ma non più accettati come validi o scritti in modo errato (errori ortografici), o nomi alternativi in uso; nomi comuni solo in inglese (E), francese (F) e spagnolo (S); eventuali procedure di *assessment* in corso per ogni entità di rango infraspecifico (per es., sottospecie, varietà o sottopopolazioni).
- ***Assessment Information*****:** Indicazioni sulle categorie e criteri assegnati; la versione del *Red List Category and Criteria* usata per la valutazione; data dell'*assessment* (ogni valutazione più vecchia di 10 anni sarà considerata *out-of-date* e indicata sul sito *web* con la sigla .OD nel campo *Caveat*); indicazione dell'eventuale presenza di procedure passate ancora non valutate dalla *Red List Standards and Petitions Subcommittee*; il nome delle persone o organizzazioni responsabili della procedura di *assessment* nel campo *Assessors*; nel campo *Evaluators* il nome di almeno 2 valutatori (della *Red List Authority* o dell'organizzazione di appartenenza) che hanno revisionato e accettato l'*assessment* e la documentazione di sostegno; una giustificazione della valutazione (inclusi tutti i dati utilizzati e le elaborazioni fatte, oltre a *link* a file PDF con ulteriore documentazione); la *Red List History* (storia del *taxon* nelle *IUCN Red Lists*).
- ***Distribution*****:** Per la distribuzione devono essere indicati i nomi degli Stati dove è segnalata la presenza, secondo la 5ª edizione (e successivi aggiornamenti) dell'ISO-3166-1 standard (http://www.iso.org/iso/country_codes.htm). A meno che non siano molto distanti, le isole e altri territori vengono inclusi nello Stato di appartenenza. Nel caso di specie che vivono in isole significativamente distanti dal continente, il nome dell'isola viene messo fra parentesi [per es., Spain (Canary Islands)]. La nomenclatura delle isole segue la 2ª edizione del *World Geographical Scheme for Recording Plant Distributions* (BRUMMITT *et al.,* 2001) redatta per l'*International Working Group on Taxonomic Databases* (TDWG).
- ***Summary Documentation*****:** Sistema ambientale in cui si trova la specie (per es., marino, acque interne, terrestre); habitat preferenziali; maggiori minacce (passate, presenti, future, in corso); tendenze attuali delle popolazioni (crescente, decrescente, stabile, incerto o sconosciuto, mancanza di osservazioni); azioni di conservazione in corso e necessarie; eventuali usi della specie.
- ***Detailed Documentation*****:** Note generali su popolazione; habitat e ecologia; minacce; quali misure di conservazione (o azioni) sono in atto o necessarie; commenti sull'uso della specie (inclusi *links* a *files* PDF con ulteriore documentazione); carta dell'areale di distribuzione.
- ***Links to Other Sources*****:** Collegamenti a siti *web* che contengano ulteriori informazioni e immagini.

- ***Data Sources*:** Elenco dei riferimenti bibliografici (anche inediti) usati per la valutazione e per la documentazione di sostegno.

3.7.2. Documentazione dettagliata

L'*Annex 1. Authority Files For Habitats, Threats and Conservation Actions and Utilization* contenuto nella scheda di *assessment* fornisce indicazioni sulle categorie standard da utilizzare per documentare: A) gli habitat principali in cui si trova il *taxon* (*Habitats Authority File. Version 2.1*); B) le maggiori minacce passate, presenti e future (*Major Threats. Version 2.1*); C) quali azioni di conservazione sono in corso o sono necessarie (*Conservation Actions Authority File. Version 1.0*); D) le informazioni sugli usi del *taxon* (a livello locale, nazionale o internazionale).

Classificazione degli habitat

Il sistema di classificazione degli habitat (*Habitats Classification Scheme. Version 3.0*) è basato su due livelli, su una classificazione climatica e biogeografica secondo le zone ecologiche di HOLDRIDGE (1947) (Fig. 3.33), anche se per gli habitat acquatici si basa principalmente sul sistema di classificazione usato dalla Convenzione di Ramsar (http://www.ramsar.org/key_ris_types.htm).

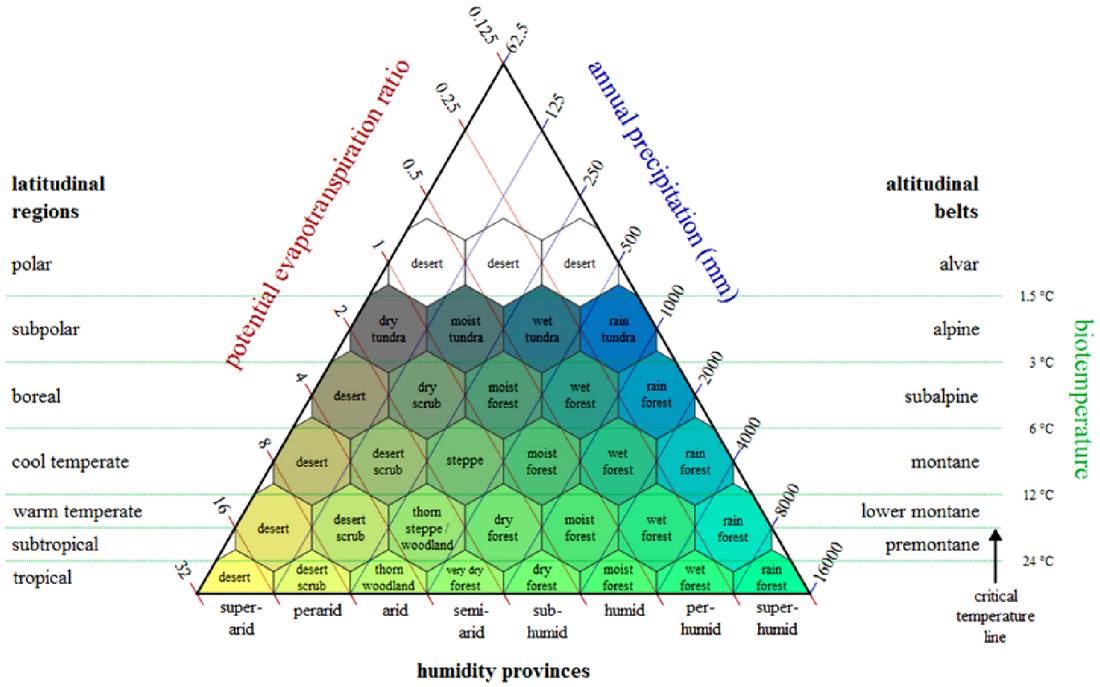


Fig. 3.33 - Schema di classificazione delle *life zones* di HOLDRIDGE (1947).

Usando questa classificazione è necessario indicare in quali *habitat* è stato ritrovato il *taxon* selezionando il livello gerarchico più basso possibile (perché indicare un livello gerarchico maggiore implica automaticamente la presenza del *taxon* in tutte le tipologie di habitat a livello inferiore) e attribuendo un punteggio secondo il seguente sistema: 1 = Idoneo (habitat principale o preferito,

habitat contenente le subpopolazioni principali, habitat con alta densità di popolazione); 2 = Moderatamente idoneo (habitat secondario, habitat contenente le subpopolazioni minori, habitat con bassa densità di popolazione; 9 = Indefinito (dati carenti, possibilmente o moderatamente idoneo come si evince dall'ecologia del *taxon*).

Valutazione dei fattori di minaccia

Per valutare correttamente il rischio di estinzione di un *taxon* secondo i criteri e le categorie IUCN, è necessaria l'individuazione dei fattori di minaccia che ne limitano l'espansione, ne causano il declino o che ne mettono a rischio la sopravvivenza. Questo consente così la redazione di liste di attenzione per scopi conservazionistici, come le Liste Rosse, e di intraprendere azioni di conservazione *in situ* ed *ex situ* (SMITH *et al.,* 2003; GAFTA, AKEROYD, 2006).

Le minacce principali che gravano sulle specie da valutare devono essere rilevate nei siti di crescita dei *taxa* trattati e nelle aree limitrofe, sulla base di osservazioni dirette e di raccolta dati. È necessario indicare se le minacce sono passate e/o presenti e/o future, usando un arco temporale di tre generazioni o dieci anni (comunque non superiore a 100 anni) come indicato nei *Red List Criteria*.

Il primo tentativo per giungere ad una classificazione condivisa dei fattori di minaccia viene proposto da LUCAS, WALTERS (1976) e dall'evoluzione di questa prima classificazione si è arrivati alle tipologie di minaccia codificate dalla IUCN secondo una classificazione gerarchica nella Versione 2.1 del *Red List Threats Authority File* (giugno 2005) e nella seguente *Unified Classification of Direct Threats, Version 1.0.* (IUCN-CMP, 2006; http://www.iucn.org/themes/ssc/sis/classification.htm) prevista dal protocollo attuale. In questa classificazione, l'indicazione di un livello gerarchico superiore non implica necessariamente che siano presenti anche tutte le minacce dei suoi sottolivelli.

Azioni di conservazione

Per descrivere le azioni di conservazione è necessario utilizzare la classificazione gerarchica del *Conservation Actions Authority File. Version 1.0*, elencando con il massimo realismo le misure di conservazione in atto e/o necessarie per ogni *taxon*, con l'indicazione delle azioni indispensabili e che, realisticamente, potrebbero essere attivate nei successivi cinque anni.

3.7.3. La scheda utilizzata per le nuove Liste Rosse in Italia

Per la procedura di *assessment* a livello regionale (*sensu* IUCN), nell'ambito del progetto "Implementazione delle categorie e dei criteri IUCN (2001) per la redazione di nuove Liste Rosse" è stata utilizzata una scheda-tipo, che adatta la scheda IUCN alla realtà italiana. La scheda prevede le seguenti informazioni:

Nomenclatura. Nome scientifico, secondo la *Check-list della flora vascolare italiana* (CONTI *et al.,* 2005a; 2007). Sinonimi. Famiglia. Nome comune secondo la *Flora d'Italia* di PIGNATTI (1982).

Descrizione. Indicazione dei caratteri morfologici specifici.

Biologia. Informazioni relative a: forma di crescita, periodo di fioritura, riproduzione sessuale, riproduzione vegetativa, tipo di dispersione del polline, tipo di unità di dispersione e tipo di dispersione, vitalità dei semi, capacità germinativa, numero cromosomico, ecc.

Ecologia. Inserire note generali sugli ambienti di crescita ed eventuali informazioni di carattere fitosociologico.

Distribuzione in Italia. Regione/i biogeografica, facendo riferimento alle regioni biogeografiche di PEDROTTI (1996). Regioni amministrative. Numero di stazioni note e, a discrezione individuale, descrizione della localizzazione (Es. Provincia, Comune, settore geografico, Lat. e Long.).

Tipo corologico e areale globale. Accennare all'eventuale distribuzione del *taxon* anche al di fuori dell'Italia.

Minacce. Indicazione e breve descrizione delle minacce secondo la codifica IUCN delle "major threats" (IUCN-CMP, 2006; http://www.iucn.org/themes/ssc/sis/classification.htm).

Criteri IUCN applicati. Specificare quale/i criterio/i è stato applicato, indicando i sottocriteri e le opzioni stimate in base alle informazioni disponibili. Mentre la procedura IUCN prevede la possibilità di utilizzare anche un solo criterio, nella presente iniziativa, visto anche il carattere scientifico, teso a testare la bontà dell'approccio (oltre che a diffonderne l'uso), è prevista l'applicazione di tutti i criteri possibili, in base ai dati disponibili, anche per saggiare quali criteri siano maggiormente applicabili alla realtà italiana.

Categoria di rischio. Indicare le categorie di rischio scaturite in base ai criteri considerati.

Interazioni con la popolazione globale. Come previsto dalle linee guida per l'applicazione "a livello regionale" (sensu IUCN, cioè locale, non globale) del protocollo IUCN, indicare la possibilità o meno di interazioni con la popolazione globale che possano suggerire un abbassamento/innalzamento del livello di rischio assegnato alla popolazione regionale valutata.

***Status* alla scala "regionale":** indicando i criteri, sottocriteri e opzioni utilizzati.

***Status* alla scala globale**: voce eventuale.

Precedente attribuzione a livello nazionale: categoria indicata nelle Liste Rosse di CONTI et al. (1997).

Strategie/Azioni di conservazione e normativa. Segnalare strategie di conservazione, sia già esistenti, sia previste e/o suggerite: protezione secondo leggi regionali, nazionali o internazionali; protezione in *situ* ed *ex situ*, ecc.

Note: da riempire a discrezione.

Letteratura citata

3.7.4. Aggiornamento della distribuzione

Per aggiornare la distribuzione di *D. tyrrhena* è stata eseguita un'approfondita ricerca bibliografica, soprattutto di lavori recenti, a cui hanno fatto seguito ricerche d'erbario e verifiche di campo.

Ricerca bibliografica

Come primo passo sono stati consultati tutti i testi riportanti dati distributivi su *Dryopteris tyrrhena* così da ottenere un quadro aggiornato delle conoscenze sulla specie oggetto di studio: articoli scientifici (FRASER-JENKINS *et al.,* 1975; FRASER-JENKINS, 1977; NARDI, 1979; PICHI SERMOLLI, 1979; FRASER-JENKINS, 1982; MARCHETTI, 1984; 1985; FERRARINI *et al.,* 1986; MANNOCCI, BARSOTTI, 1989; ROSSELLÓ *et al.,* 1989; JESSEN *et al.,* 1994; BLANCA *et al.,* 1998; FOGGI, GRIGIONI, 1999; MARCHETTI, 2004; PEÑAS DE GILES *et al.,* 2006), flore (PAOLI, ROMAGNOLI, 1976; BADRÉ, DESCHATRES, 1979; PIGNATTI, 1982; FOSSI INNAMORATI, 1983; CASTROVIEJO *et al.,* 1986; TUTIN *et al.,* 1993; FOGGI *et al.,* 2001; BERTACCHI *et al.,* 2005a,b; CONTI *et al.,* 2005a; ARRIGONI, 2006), *red list* o libri rossi (GARDINI PECCENINI, 1984; CONTI *et al.,* 1992; 1997; CELLINESE *et al.,* 1996; BLANCA *et al.,* 1999; 2000; SÁEZ, ROSSELLÓ, 2001; BLANCA *et al.,* 2002; BAÑARES BAUDET *et al.,* 2004; CABEZUDO *et al.,* 2005; MORENO, 2008), atlanti (PRELLI, BOUDRIE, 1992; SCOPPOLA, SPAMPINATO, 2005), guide o manuali (SALVO TIERRA, 1990; PRELLI, 2001; SOSTER, 2001; BERNARDELLO, MARTINI, 2004).
Per ogni dato distributivo indicato nell'areale "storico" della specie (descritto in dettaglio nel Par. 3.1.4.), si è cercato di risalire alla fonte bibliografica originaria e al dato più recente.

SPAGNA. *Sierra Nevada, Andalucìa*. È il *locus classicus* di *Dryopteris tyrrhena*, indicato da BOISSIER (1838) nel protologo (*sub Aspidium nevadense*) e da FRASER-JENKINS et al. (1975) nella descrizione della specie. Più recentemente troviamo dati e mappe di distribuzione di dettaglio nella *Flora amenazada y endémica de Sierra Nevada* (BLANCA *et al.,* 2002) e nella *Lista roja de la flora vascular de Andalucìa* (CABEZUDO *et al.,* 2005). ***Puig Major, Mallorca Illes Balears.*** Citata per questa località per la prima volta da ROSSELLÓ et al. (1989) e confermata da SÁEZ e ROSSELLÓ (2001) nel *Llibre Vermell de la flora vascular de les illes Balears.* In entrambe le stazioni spagnole la specie è stata oggetto di studi recenti per la redazione dell'*Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España* (BAÑARES BAUDET *et al.,* 2004), che ne fornisce dati distributivi e demografici aggiornati ed una mappa di distribuzione, e poi del suo aggiornamento secondo i criteri IUCN (2001), *Lista Roja de la flora vascular española amenazada* (MORENO, 2008).
FRANCIA. *Vallée de la Roya, Alpes-Maritimes*: località citata per la prima volta in BADRÉ, DESCHATRES (1979) e riportata successivamente nell'*Atlas écologique* di PRELLI e BOUDRIE (1992) e in PRELLI (2001). ***Pont de Labeaume, Ardèche***: citata per la prima volta da FRASER-JENKINS (1977) che revisiona un saggio di TL (Toulouse), sub *Polystichum abbreviatum* (*legit* J. Revol, 1907), non più ritrovata fino al 1993

(JESSEN *et al.,* 1994). ***Corsica:*** citata da FRASER-JENKINS et al. (1975) per varie località: La Trinite presso Bonifacio, Calanche de Piana, Mt Renoso, Mt Cinto, Asco, Cap Corse, confermate nell'*Atlas écologique* di PRELLI e BOUDRIE (1992) e in PRELLI (2001)

ITALIA. ***Isola di Capraia, Livorno***: citata da FRASER-JENKINS et al. (1975) che revisiona il saggio citato da FIORI (1943) *sub D. villarii* var. *nevadensis* (*legit* Sommier, 1896 sub *Aspidium filix-mas* in FI!). In tempi più recenti è indicata da BERTACCHI et al. (2005a,b). ***Isola d'Elba, Livorno***: citata da FIORI (1943) *sub D. villarii* var. *nevadensis* e da FRASER-JENKINS et al. (1975) che revisiona un saggio d'erbario del 1900 (*legit* Sommier, *sub Aspidium filix-mas* var. *glandulosum*, FI!). I dati più recenti sono riportati in FOSSI INNAMORATI (1983) basati su saggi del 1979 (*legit* Nardi, Tardelli, FI!). ***Isola di Montecristo, Livorno:*** PAOLI, ROMAGNOLI (1976) e NARDI, 1979 citano i saggi di Fabbri *et al.* degli anni 1964-1966 (FI!) determinati da Paoli nel 1975 *sub Dryopteris filix-mas* var. *glandulosa* e revisionati da Nardi nel 1979. Non esistono dati bibliografici più recenti. ***M. Spada, Gennargentu, Nuoro:*** citata da FRASER-JENKINS et al. (1975). Non esistono riferimenti bibliografici più recenti. ***Montiferru vicino a Santu Lussurgiu, Oristano:*** NARDI, 1979 che cita 2 saggi in FI (*legit* Arrigoni, 1969 e *legit* Arrigoni e Nardi, 1975). Non esistono riferimenti bibliografici più recenti. ***Coste da Deiva Marina a Campiglia, Valle di Vara a Piana Battolla; La Spezia:*** citata da FRASER-JENKINS et al. (1975) per Riomaggiore e recentemente da BERNARDELLO, MARTINI (2004) che ne specificano la distribuzione in Liguria.

Ricerca d'erbario

Sono stati consultati 24 erbari europei in possesso di saggi di *Dryopteris tyrrhena*: 5 erbari in Italia, 15 in Spagna, 2 in Francia e 2 in altri Paesi europei, per un totale di 125 saggi. Gli erbari sono stati consultati secondo 3 modalità: la visita diretta per gli erbari CAG, FI, GE, SIENA e VAL, la consultazione *on line* dei dati dei cartellini e in molti casi delle foto degli *exsiccata* e, nei casi dubbi, la richiesta dell'invio dei saggi da verificare o revisionare all'erbario GDA o di loro foto, BGBM, CLF, MA e P. Per i dettagli sugli erbari consultati e sui dati distributivi raccolti si rimanda alla tabella seguente:

ERBARIO	LOCALITÀ	LEGIT	DATA
ARAN 45524-1	Dilar. Dilar, Sierra Nevada; Barranco Dilar. Granada	M. L. Gil Zúñiga & J.A. Alejandre	09/10/1987
BCN 9384	Puig Major.	Sáez Goñalons, Llorenç	02/01/1988
BCN 9522	Puig Major.	Sáez Goñalons, Llorenç	16/10/1990
B 20 0125745	France:Cevennen.	C. Stark, G. Zenner & S. Jeßen	10/08/1993
B 20 0125742	Italy: Cinque Terre.	S. Jeßen	---/05/1984
B 20 0125747	France:Korsika.	H. Rasbach & K. Rasbach	04/05/1971
B 20 0125744	France:Korsika.	H. Rasbach & K. Rasbach	25/04/1977
B 20 0125741	France:Korsika.	H. Rasbach & K. Rasbach	28/05/1977
B 20 0125740	France:Korsika.	H. Rasbach & K. Rasbach	28/05/1977
B 20 0142828	Spain: Prov. Grenada.	M.L. Gil Zúniga & J.A. Alejandre	09/10/1987

ERBARIO	LOCALITÀ	LEGIT	DATA
B 20 0125743	Italy: Riomaggiore.	D. Marchetti, H. Rasbach, K. Rasbach & R. Viane	08/09/1993
B 20 0125746	Italy: Sardinien.	C. R. Fraser-Jenkins & T. Reichstein	25/07/1974
BIO 22382-1	Dilar. Sierra Nevada. Barranco Dilar. Granada	M.L. Gil Zúñiga & J.A. Alejandre	13/08/1988
BIO 29168-1	Dilar. Sierra Nevada. Barranco Dilar. Granada	M.L. Gil Zúñiga & J.A. Alejandre	13/08/1988
BIO 29169-1	Güejar-Sierra. Sierra Nevada. Barranco San Juan. Granada	J.A. Alejandre	21/08/1990
BIO 15486-1	Sierra Nevada. Guejar Sierra. Loma de la Cuna de los Cuartos. Granada	J. Molero Mesa & M.R. González-Tejero	07/07/1993
CAG	Rio Cardaxius, Miniera S. Luigi. Buggerru (CA)	Bacchetta, Casti, Pontecorvo, Garau	06/05/2002
CAG	Rio Cardaxius, Miniera S. Luigi. Buggerru (CA)	Bacchetta, Casti, Pontecorvo, Garau	06/05/2002
CLF	Corse: Asco, vallée de Violini	R. de Litardière	25/07/1921
CLF	Corse: Asco, Rochers au Pinzalone	R. de Litardière	25/07/1921
CLF	Corse: Près de Bonifacio, rochers granitiques de la Trinité	R. Deschâtres	07/08/1967
CLF	Corse: près d'Albertacce	R. Deschâtres	21/07/1974
CLF	Pont de Labeaume (Ardèche).	R.Deschâtres	14/07/1978
FCO 20236-1	Sierra Nevada. Guejar Sierra. Loma de la Cuna de los Cuartos. Granada	Molero Mesa & Gzlez. Tejero	07/07/1993
FI	Isola di Montecristo, presso la Cima dei Lecci	F. Fabbri, R. Bavazzano, A. Contardo	05/10/1964
FI	Isola d'Elba, Marciana, tra Ripa Barata e St Anna	S. Sommier	07/05/1900
FI	Isola di Capraia, Cala della Mortola, nel bosco della valle del Capo	S. Sommier	06/04/1896
FI	Isola di Capraia, Cala della Mortola	S. Sommier	19/08/1896
FI	Isola di Montecristo, presso le rovine della Grotta del Santo	F. Fabbri, R. Bavazzano, A. Contardo	24/05/1964
FI	Isola di Montecristo, lungo il sentiero fra il Convento e il Monte della Fortezza	F. Fabbri, R. Bavazzano, A. Contardo	02/06/1965
FI	Isola di Montecristo, lungo il sentiero fra il Convento e il Monte della Fortezza	F. Fabbri, R. Bavazzano, A. Contardo	31/03/1965
FI	Isola di Montecristo, lungo il sentiero fra il Convento e il Monte della Fortezza	F. Fabbri, R. Bavazzano, A. Contardo	27/05/1964
FI	Isola di Montecristo, Collo dei Lecci	F. Fabbri, R. Bavazzano, A. Contardo	01/06/1965
FI	Isola di Montecristo, Cima dei Lecci, vetta	F. Fabbri, R. Bavazzano, A. Contardo	02/04/1965
FI	Isola di Montecristo, Vallone di Cala Maestra, salendo verso il Collo dei Lecci	F. Fabbri, M. Tardelli	04/05/1966
FI	Isola d'Elba, Marciana presso S. Andrea	E. Nardi, M. Tardelli	30/04/1979
FI	Isola d'Elba, Marciana presso S. Andrea	E. Nardi, M. Tardelli	30/04/1979
FI	Albertacce (France, Corse)	R. Deschatres	27/07/1974
FI	Dilar, sierra Nevada (Espana, prov. Granada), Barranco Dilar	M.L. Gil Zúñiga & J.A. Alejandre	09/10/1987
G 3535/1	France (Corse) secteur Cintu, Bocca Bianca (lieu-dit), région de Galeria,	Thiébaud, M.-A. & J. Gamisans	10/05/1980
G 144234/1	France (Corse) Asco, au Fornello di Grosso	Litardière, R. V.	22/07/1921
G144234/2	France (Corse) Asco, au Fornello di Grosso	Litardière, R. V.	22/07/1921
G 144234/3	France (Corse) Asco, au Fornello di Grosso	Litardière, R. V.	22/07/1921
GDA 21847	Granada, Sª Nevada, Dornajo.	F.P.Raya & I.Ramos	24/11/1984
GDA 21884	Cantabria, Fuente de Hayedo, Funicular.	J.Molero	04/07/1987
GDA 23505	Granada, Sª Nevada, Dílar, Barranco del Dílar.	M.L.Gil, L.F.Sánchez & J.A.Alejandre	13/07/1988
GDA 24076	Almería, Fiñana, Loma del Horcajo.	J.Molero & J.M.Marfil	19/07/1990
GDA 26540	Granada, Sª Nevada, Güéjar Sierra, Loma de la Cuna de los Cuartos.	J.Molero & M.R.González	07/07/1993

ERBARIO	LOCALITÀ	LEGIT	DATA
GE	Toscana, Alpi Apuane	R. Pichi Sermolli	27/05/1961
GE	Canale Ruffinale dietro il santuario di Montenero (La Spezia)	S. Peccenini	16/04/2001
GE	Presso il santuario di Montenero. Sentiero 3 (La Spezia)	Brunetti, Santarelli	16/07/98
GE	presso Schiara Sentiero 4b (La Spezia)	Dente	05/09/01
GE	Sentiero per Codeglia (La Spezia)	Dente	16/05/01
HUAL 641-1	Baza, pr. Peñón de la Cabeza. Granada	J. Peñas	16/07/1991
HUAL 642-1	Bacares, Bajo Pico Las Hoyas (cara N) Almeria	J. Peñas	19/07/1994
JACA 517592	Barranco Dilar. Sierra Nevada. Granada	J.A. Alejandre & M.L. Gil Zúñiga	13/08/1992
JACA 517692	Barranco Dilar. Sierra Nevada. Granada	J.A. Alejandre & M.L. Gil Zúñiga	13/08/1992
JACA 517292	Barranco San Juan. Güéjar-Sierra Nevada. Granada	J.A. Alejandre	21/08/1992
JACA 517392	Barranco San Juan. Güéjar-Sierra Nevada. Granada	J.A. Alejandre	18/08/1992
JACA 517492	Barranco San Juan. Güéjar-Sierra Nevada. Granada	J.A. Alejandre	18/08/1992
JBAG 720-1	Albertacce, rive droite du Golo en amont du Ponte Alto, près du confluent du Viro	R. Deschatres	Sine data
MA 762087-1	Arcadia, Trípoli, Mt. Menalo, pr. Levidhi, from Ski Station to Ostrakina Peak, medium-high areas. PEL	Medina & al.	25/04/2007
MA 267315-1	Corse, Albertacce, rive droite du Golo en amont du Ponte Alto	R. Deschatres	09/08/1975
MA 357566-1	Corse, Albertacce, rive droite du Golo en amont du Ponte Alto	R. Deschatres	09/08/1975
MA 531996-1	Dilar, Sierra Nevada. Granada	J.A. Alejandre & M.L. Gil Zúñiga	09/10/1987
MA 493044-1	Dilar, Sierra Nevada. Granada	J.A. Alejandre & M.L. Gil Zúñiga	13/08/1988
MA 422843-1	Dilar, Sierra Nevada. Granada	J.A. Alejandre & M.L. Gil Zúñiga	09/10/1987
MA 468053-1	Dilar, Sierra Nevada. Granada	J.A. Alejandre & M.L. Gil Zúñiga	08/07/1988
MA 468028-1	Dilar, Sierra Nevada. Granada	J.A. Alejandre & M.L. Gil Zúñiga	13/07/1988
MA 468031-1	Dilar, Sierra Nevada. Granada	J.A. Alejandre & M.L. Gil Zúñiga	13/07/1988
MA 468061-1	Dilar, Sierra Nevada. Granada	J.A. Alejandre & M.L. Gil Zúñiga	13/07/1988
MA 468062-1	Dilar, Sierra Nevada. Granada	J.A. Alejandre & M.L. Gil Zúñiga	13/07/1988
MA 468027-1	Dilar, Sierra Nevada. Granada	J.A. Alejandre & M.L. Gil Zúñiga	13/08/1988
MA 468056-1	Dilar, Sierra Nevada. Granada	J.A. Alejandre & M.L. Gil Zúñiga	13/08/1988
MA 468063-1	Dilar, Sierra Nevada. Granada	J.A. Alejandre & M.L. Gil Zúñiga	13/08/1988
MA 468026-1	Güejar-Sierra: Sierra Nevada. Granada	J.A. Alejandre & M.L. Gil Zúñiga	10/07/1988
MA 583930-1	Güejar-Sierra: Sierra Nevada. Granada	J.A. Alejandre & L.F. Sánchez	20/08/1990
MA 468035-1	Güéjar-Sierra: Sierra Nevada, barranco De San Juan. Granada	J.A. Alejandre & M.L. Gil Zúñiga	12/08/1988
MA 492995-1	Güejar-Sierra: Sierra Nevada, barranco San Juan. Granada	J.A. Alejandre	18/08/1990
MA 492994-1	Güejar-Sierra: Sierra Nevada, barranco San Juan. Granada	J.A. Alejandre	21/08/1990
MA 765391-1	Monte Peristeri (cadena Lakmos). IPI	S. Castroviejo & al. (Epifenómeno '07)	30/06/2007
MA 622905-1	Piano Zucchi, montañas de Madonia, Palermo, Sicilia	H.S. Nava	20/06/1983
MA 356140-1	Sierra Nevada. Granada	A. Segura Zubizarreta	28/07/1967
MA 540490-1	Sierra Nevada, Guejar Sierra, Loma de la Cuna de los Cuartos. Granada	J. Molero Mesa & M.R. González Tejero	07/07/1993
MA 350692-1	Sierra Nevada, Lagunillos de la Virgen. Granada	M. Luceño & al.	25/08/1985
MA 172756	Lagunillas de Sierra Nevada (Granada)	A. Clemente	Sine data

ERBARIO	LOCALITÀ	LEGIT	DATA
MGC 18669-1	Liguria oriental. Valle de Vara. En Piana Battolla, hacia el Valle Corticchia	Dino Marchetti	04/02/1986
P 00695910	Haute-Corse Corse Le long du sentier variante du GR20 contournant la Punta Stranciacone par le Sud-Ouest	G. Rouhan	10/09/2009
P	Corse, Asco	Deschatres	09/07/1977
P	Cap Corse, flanc S d Mt Stello	G. Vida	05/02/1974
P	Sud de Col de Tende	C.R. Fraser-Jenkins	09/04/1977
SALA 93210-1	Guejar Sierra. Granada	Molero Mesa, J. & González Tejero, M. R.	07/07/1993
SALA 116274-1	Dílar, Sierra Nevada, Barranco Dílar. Granada	M.L. Gil Zúñiga & J.A. Alejandre	09/10/1987
SANT 27884	Granada	J.Molero Mesa; M.R.González Tejero	07/07/1993
SASSA	Bruncu Spina, Monte Spada (Nuoro)	A.D. Atzei	21/08/1997
SEV 27088-1	Corsica. Albertacce, rive droite du Golo en amont du Ponte Alto, près du confluent du Viro. Exp. N	R. Deschatres	27/07/1975
SIENA 1101	Piana Battolla verso la valle Corticchia - Val di Vara. (La Spezia, Liguria, Italia)	D. Marchetti	19/02/1985
SIENA 1090	Braccio di sinistra della Valle di Riomaggiore Riomaggiore (La Spezia, Liguria, Italia)	D. Marchetti	07/11/1978
SIENA 1092	tra Campi e Fossola a sud di Riomaggiore(La Spezia, Liguria, Italia)	D. Marchetti	14/11/1981
SIENA 1093	Costa dell'Angelo, tra Fossola e la galleria stradale, presso Tramonti(La Spezia, Liguria, Italia)	D. Marchetti	14/11/1981
SIENA 1094	Rio Finale a monte del viadotto sopra Riomaggiore (La Spezia, Liguria, Italia)	D. Marchetti	07/04/1981
SIENA 1095	Valletta secondaria del braccio di sinistra della valle di Riomaggiore (La Spezia, Liguria, Italia)	D. Marchetti	07/11/1978
SIENA 1096	Piana Battolla in Val di Vara(La Spezia, Liguria, Italia)	E. Ferrarini	01/10/1989
SIENA 1097	braccio sinistro della Valle di Riomaggiore(La Spezia, Liguria, Italia)	D. Marchetti	05/01/1978
SIENA 1098	braccio sinistro della Valle di Riomaggiore(La Spezia, Liguria, Italia)	D. Marchetti	05/01/1978
SIENA 1099	Valle Acquapendente, tra Monterosso al Mare e Vernazza (La Spezia, Liguria, Italia)	D. Marchetti	21/04/1984
SIENA 1100	Sentiero tra Campiglia e la parte est di Schiara(La Spezia, Liguria, Italia)	D. Marchetti	10/01/1981
SIENA 1091	Deiva Marina(La Spezia, Liguria, Italia)	D. Marchetti	30/11/1983
SIENA 1102	Primo canaletto a sud di Castello, tra Piana Battolla e il torrente Gorda(La Spezia, Liguria, Italia)	D. Marchetti	12/03/1985
SIENA 1103	Terza valletta a sud-ovest del braccio di sinistra della Valle di Riomaggiore(La Spezia, Liguria, Italia)	D. Marchetti	24/01/1981
SIENA 1104	Sponda sinistra del canale che divide Schiara sotto il sentiero che viene da Campiglia(La Spezia, Liguria, Italia)	D. Marchetti	10/01/1981
SIENA 1089	Tra Lemmen e Casarino presso Riomaggiore(La Spezia, Liguria, Italia)	D. Marchetti	21/11/1981
SIENA 4101	Mulattiera tra Riomaggiore e il Santuario della Madonna di Montenero, Cinque Terre (La Spezia, Liguria, Italia	D. Marchetti	25/01/1994
SIENA 2752	Tra Piana Bettolla e la Valle Corticchia (Val di Vara) (La Spezia, Liguria, Italia	D. Marchetti	10/10/1998

ERBARIO	LOCALITÀ	LEGIT	DATA
UIB 87-254	Mallorca, Puig Major de Torrella	J. Rossello et al.	11/07/1987
UIB 87-309	Mallorca, Puig Major de Torrella	J. Rossello et al.	11/07/1987
UIB 87-392	Mallorca, Puig Major de Torrella	J. Rossello et al.	03/10/1987
UIB 87-396	Mallorca, Puig Major de Torrella	J. Rossello et al.	03/10/1987
UIB 87-330	Mallorca, Puig Major de Torrella	J. Rossello et al.	03/10/1987
VAL 141429-1	Buggerru (CA), rio Cardaxius, Miniera S. Luigi	Bacchetta, Casti, Pontecorvo, Garau	06/05/2002
VAL 141814-1	Dilar, Sierra Nevada ,Barranco Dilar. Granada	M.L.Gil Zúñiga & J.A. Alejandre	09/10/1987
VAL 14761	GRANADA: Sierra Nevada, Laguna de las Yevuas	Fernandez Casas	19/07/1970
VAL 83412-1	Dilar; Sierra Nevada, pr. barranco Dilar. Granada	Gil Zúñiga, A J.A. lejandre	13/08/1988
VAL 83413-1	Güéjar-Sierra; Sierra Nevada, pr. barranco San Juan. Granada	J.A. Alejandre	21/08/1990
VAL 191686	GRC. 44: Monte Peristeri (cadena Lakmos),	*S. Castroviejo & al. (Epifenómeno '07)*	30/06/2007

Tab. 3.22 - Elenco dei saggi di *Dryopteris tyrrhena* consultati negli erbari europei

Verifica di campo delle segnalazioni del passato

Le verifiche di campo hanno riguardato le segnalazioni non confermate da dati recenti (meno di 10 anni), saggi d'erbario, riferimenti bibliografici o studi specifici. Sono state controllate le stazioni italiane e alcune francesi. In particolare, le stazioni liguri nell'area delle Cinque Terre (SP), quelle dell'Arcipelago Toscano (LI), nell'Isola di Capraia, nell'Isola d'Elba e nell'Isola di Montecristo (LI), in Sardegna sul Monte Spada (NU) e sul Montiferru (OR) e le stazioni della Vallèe de la Roya (Alpes-Maritimes, Francia).

Realizzazione delle mappe di distribuzione

Per l'elaborazione del database geografico e per la produzione dei *layout* delle mappe di distribuzione e delle elaborazioni necessarie per la procedura di *assessment* (IUCN, 2001) si è utilizzato il software *ESRI ArcView 3.2*. Nel presente lavoro è stato utilizzato il sistema di coordinate metriche *European Datum* 50 F32N per l'Italia, mentre per il resto dell'areale, che comprende Francia e Spagna, le coordinate metriche sono state convertite in coordinate geografiche secondo il sistema WGS84.

Sono stati quindi costruiti due *shape-file* di punti: uno con i dati di presenza in Italia e l'altro con i dati della sua distribuzione a livello globale.

3.7.5. Valutazione dello *status* di rischio

Per l'applicazione del Criterio B sono stati calcolati l'EOO e l'AOO come previsto dal protocollo IUCN (2001) (Tab. 3.23) e dalle linee guida suggerite per la sua applicazione (IUCN, 2001; 2006a, b; 2008) (http://iucn.org/themes/ssc/red-lists.htm). La presenza ed il grado di frammentazione sono stati valutati considerando una scala spaziale congruente alle caratteristiche biologiche del *taxon*, con particolare riferimento alle sue capacità di dispersione. Perciò la frammentazione è stata stimata tenendo conto di

una distanza minima tra sottopopolazioni compresa tra 100 e 1.000 Km, come suggerito dal protocollo per *taxa* che disperdono spore (HALLINGBÄCK *et al.,* 2000).

Calcolo dell'*Extent of occurrence, EOO*

L'areale (*Extent of occurrence, EOO*) è definito come la superficie inclusa nel più breve confine, immaginario e continuo, che circoscrive tutti i siti in cui la presenza del *taxon* è nota, supposta o prevista (escludendo presenze occasionali). attraverso il metodo del (o *convex hull*), cioè il più piccolo poligono nel quale nessun angolo interno eccede i 180° e che contiene tutti i siti di presenza (IUCN, 2001), operando sullo *shape* di punti rappresentanti i siti di presenza, Quando sono presenti tali discontinuità o disgiunzioni nella distribuzione di una specie, il poligono convesso minimo fornisce una sovrastima sostanziale della superficie, in particolare per poligoni di forma molto irregolare (OSTRO et al. 1999). Quindi, come raccomandato dal protocollo IUCN, è stato applicato anche il metodo dell'*α-hull*, cioè una generalizzazione del poligono convesso minimo (Fig. 3.34), che fornisce una descrizione della forma dell'EOO più realistica, ripetibile e confrontabile nelle diverse stime temporali (BURGMAN, FOX, 2003).
α-hull, il poligono convesso minimo è stato scomposto in un set di 63 triangoli contigui e non sovrapposti, operando sullo *shape* di punti rappresentanti i siti di presenza, attraverso il comando *Build TIN* . La procedura TIN, *Triangulated Irregular Network*, usa la Triangolazione di *Delaunay*, prevista dal protocollo IUCN: i punti vengono triangolati in modo da soddisfare la proprietà del "cerchio vuoto", cioè che il cerchio circoscritto ad ogni triangolo non deve contenere nessun altro punto (Fig. 3.34). Dopo aver calcolato la distanza media, identificata come distanza di discontinuità, sono stati testati valori di α=1,2,3,4, e si è proceduto a cancellare tutte le linee più lunghe di un multiplo α=2 della media (IUCN, 2008). L'EOO è stato calcolato sommando le aree di tutti i triangoli rimasti.

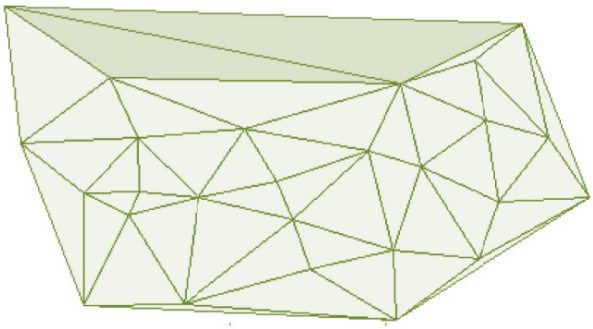


Fig. 3.34 - Le linee mostrano la triangolazione di *Delauney* fra i punti corrispondenti alle stazioni del *taxon*. Il perimetro esterno è quello del poligono convesso minimo, mentre i 2 triangoli più scuri vengono esclusi per ottenere l'*α-hull*. La somma delle aree dei triangoli più chiari costituisce l'EOO basato sull'α-hull (IUCN, 2008).

Calcolo dell'*Area of occupancy, AOO*

La superficie occupata (*area of occupancy*, AOO) è la porzione dell'areale (EOO) occupata con successo da un *taxon*. Per il calcolo dell'AOO è stato utilizzato il reticolo prodotto per l'Italia per il progetto

"*Implementazione delle categorie e dei criteri IUCN (2001) per la redazione di nuove Liste Rosse*" (Par. 1.2.5). La griglia, essendo stata ricavata da una carta del globo non proiettata, è priva delle deformazioni legate al tipo di proiezione geografica, quindi è costituita da maglie perfettamente identiche e regolari di 2x2 Km come suggerito dal protocollo IUCN (2005; 2006a, b; 2008). Per il calcolo dell'AOO in *ArcView 3.2* con tale sistema di riferimento, dopo aver caricato i dati distributivi della specie è stato applicata sulla griglia una *select-by-theme* per selezionare tutte le celle che includono almeno uno dei punti di presenza delle specie; l'AOO (in kilometri quadrati) è stata ottenuta, quindi, moltiplicando per 4 km^2 (area della singola cella) il numero di celle selezionate.

Sintesi delle linee guida per l'applicazione dei criteri IUCN

Si riporta di seguito una sintesi delle linee guida per l'applicazione dei 5 criteri IUCN (2001), per ulteriori dettagli e indicazioni metodologiche si rimanda al documento integrale redatto dalla IUCN (2008).

CRITERIO	Gravemente minacciata CR	Minacciata EN	Vulnerabile VU
A. Riduzione della popolazione	10 anni o 3 generazioni **A1**>90% **A2**, **A3**, **A4**>80%	10 anni o 3 generazioni **A1**>70% **A2**, **A3**, **A4**>50%	10 anni o 3 generazioni **A1**>50% **A2**, **A3**, **A4**>30%
B. Distribuzione geografica	**B1** EOO<100 km^2 oppure **B2** AOO<10 km^2 e 2 fra **(a)** severa frammentazione o n° di location =1 **(b)** e **(c)**	**B1** EOO<5.000 km^2 oppure **B2** AOO<500 km^2 e 2 fra **(a)** severa frammentazione o n° di location ≤5 **(b)** e **(c)**	**B1** EOO<20.000 km^2 oppure **B2** AOO<2.000 km^2 e 2 fra **(a)** severa frammentazione o n° di location ≤10 **(b)** e **(c)**
C. Ampiezza e declino di piccole popolazioni	n° individui maturi <250 e **C1** 25% in 3 anni o 1 generazione oppure **C2** e **(a)** e/o **(b)** **(a i)** n° individui maturi <50 oppure **(a ii)** individui maturi in una subpopolazione = 90-100%	n° individui maturi <2.500 e **C1** 20% in 5 anni o 2 generazioni oppure **C2** e **(a)** e/o **(b)** **(a i)** n° individui maturi <250 oppure **(a ii)** individui maturi in una subpopolazione = 95-100%	n° individui maturi <10.000 e **C1** 10% in 10 anni o 3 generazioni oppure **C2** e **(a)** e/o **(b)** **(a i)** n° individui maturi<1.000 oppure **(a ii)** individui maturi in una subpopolazione = 100%
D. Popolazioni molto piccole	**D1** n° individui maturi <50	**D1** n° individui maturi <250	**D1** n° individui maturi <1.000 oppure **D2** AOO<20 km^2
E. Probabilità di estinzione	50% in 10 anni o 3 generazioni (max 100 anni)	20% in 20 anni o 5 generazioni (max 100 anni)	10% in 100 anni

Tab. 3.23 - Schema di applicazione dei 5 criteri IUCN per l'assegnazione delle categorie di rischio (CR, EN, VU) (IUCN, 2001; 2008).

4.1. *Ophioglossum azoricum* e *O. vulgatum*

4.1.1. Studio palinologico

Nella tabella seguente (Tab. 4.1) vengono riportati i dati della misurazione delle spore: il valore medio con la deviazione standard e il *range* delle misure effettuate, con il valore minimo e massimo. Nel grafico boxplot (Fig. 4.1) sono evidenziati la mediana e l'intervallo fra il 25 e il 75% percentile. Possiamo osservare che le spore di *Ophioglossum sp.* della Selva del Lamone corrispondono come dimensioni al *range* rilevato per *O. azoricum*, mentre quelle di Moriglion di Penna, sono molto più grandi. Dalle dimensioni *O. azoricum* e *O. vulgatum* non sono discriminabili con certezza.

Specie	Provenienza	Dimensioni delle spore	
		Media (in µm)	Range (in µm)
Ophioglossum vulgatum	Selva del Lamone, Murcia Strompia	40,88±1,56	39,68-43,13
Ophioglossum azoricum	Monte Pisano, Sella di Monte Cotrozzi	47,52±2,62	40,01-60,25
Ophioglossum sp.	Selva del Lamone, Pian della Femmina	46,07±2,35	42,09-50,03
Ophioglossum sp.	Monte Pisano, Moriglion di Penna	59,54±2,65	52,87-64,31

Tab. 4.1 - Dimensione delle spore prelevate da campioni freschi della Selva del Lamone e del Monte Pisano.

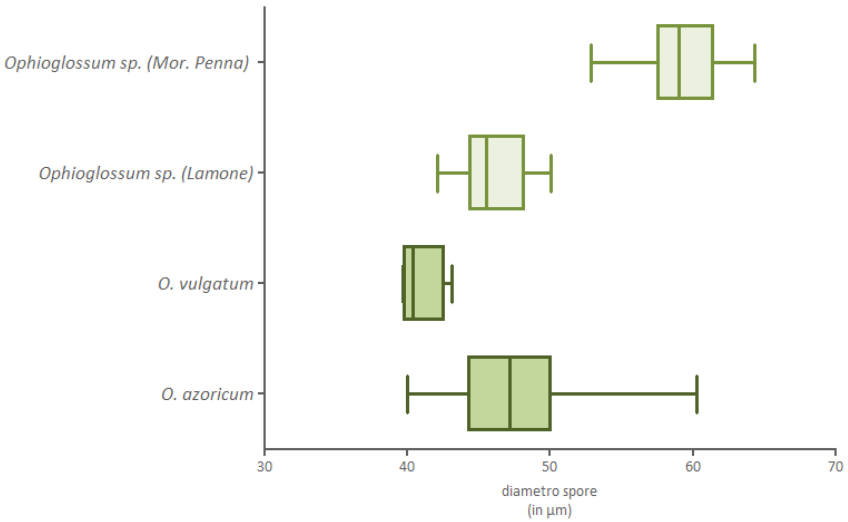


Fig. 4.1 - Grafico *boxplot* delle dimensioni delle spore dei 4 campioni analizzati.

Attraverso l'utilizzo del SEM è stato possibile osservare la morfologia esterna delle spore, apprezzando i dettagli dell'ornamentazione dell'esina (Fig. 4.2) e, quindi, di darne una descrizione dettagliata. Per la terminologia si è fatto riferimento FERRARINI *et al*. (1986), PRADA (1990) e PERONI e PERONI (2004).

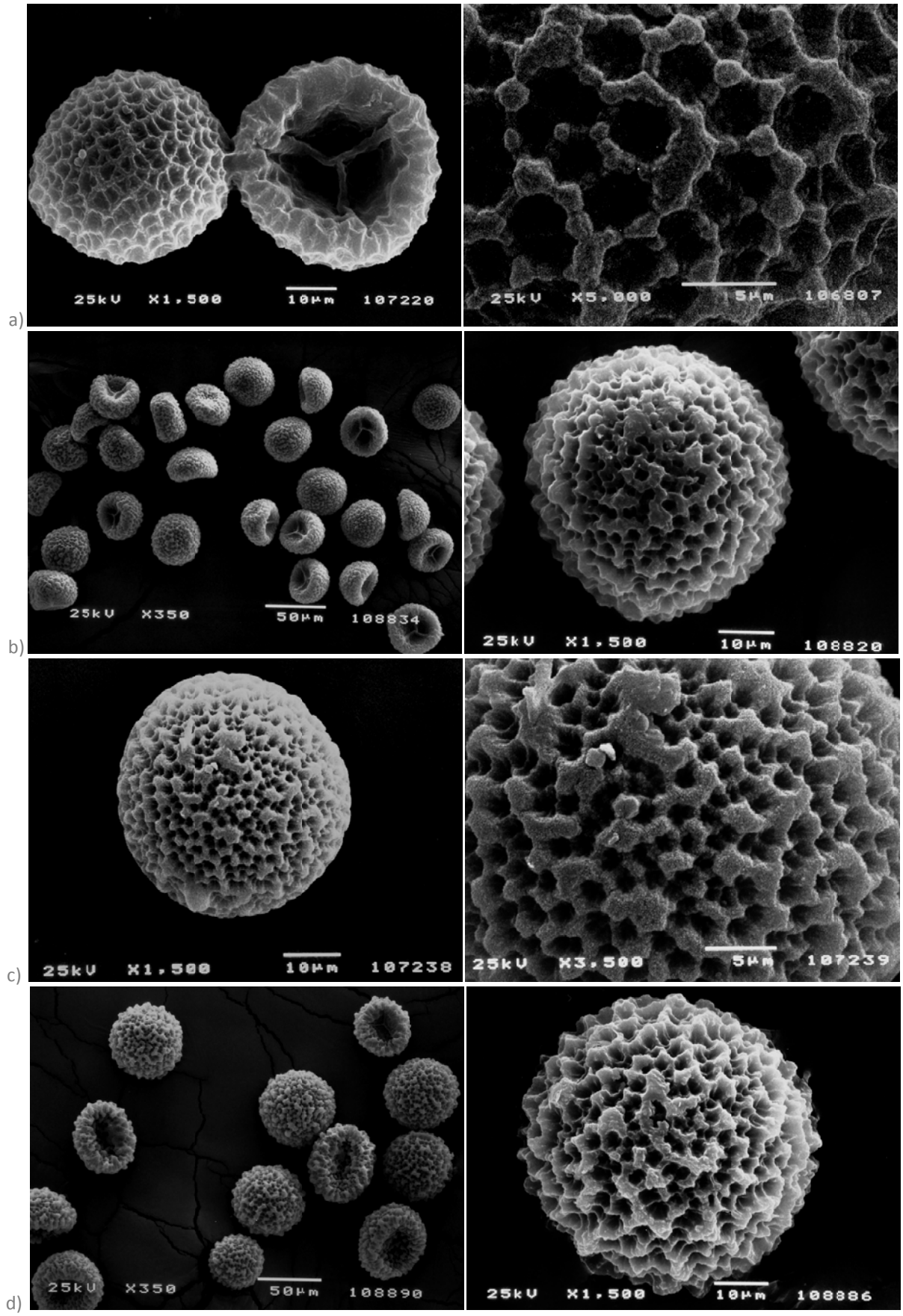


Fig. 4.2 - Microfotografie al microscopio elettronico a scansione di spore di: a) *Ophioglossum vulgatum*, provenienti dalla Selva del Lamone, in vista prossimale e distale; b) *O. azoricum* provenienti da Sella di Monte Cotrozzi; c) *Ophioglossum sp.* dalla Selva del Lamone; d) *Ophioglossum sp.* da Moriglion di Penna

Descrizione dei campioni

Ophioglossum vulgatum: Spora trilete, anisopolare, radiosimmetrica, a profilo globoso in vista polare, piatto (faccia prossimale) ed emisferico (faccia distale) in vista laterale. Esina reticolata con muri che variano notevolmente in altezza e spessore. Nella faccia prossimale ornamentazione appiattita fino a scomparire intorno ai bracci della lesura. Superficie microgranulosa.

Ophioglossum azoricum: Spora trilete, anisopolare, radiosimmetrica, a profilo globoso in vista polare, concavo (faccia prossimale) ed emisferico (faccia distale) in vista laterale. Esina della faccia distale irregolarmente foveo-reticolata. Esina della faccia prossimale foveolata con ornamentazione appiattita fino a scomparire intorno ai bracci della lesura. Superficie finemente scabrata.

Ophioglossum sp. **proveniente dalla Selva del Lamone:** Spora trilete, anisopolare, radiosimmetrica, a profilo globoso in vista polare, concavo (faccia prossimale) ed emisferico (faccia distale) in vista laterale. Esina della faccia distale foveo-reticolata. Nella faccia prossimale ornamentazione foveolata appiattita fino a scomparire intorno ai bracci della lesura. Superficie finemente scabrata.

Ophioglossum sp**. proveniente da Moriglion di Penna:** Spora trilete, anisopolare, radiosimmetrica, a profilo globoso in vista polare, piatto (faccia prossimale) ed emisferico (faccia distale) in vista laterale. Esina della faccia distale irregolarmente foveo-reticolata. Nella faccia prossimale con muri che variano notevolmente in altezza e spessore, ma non appiattiti. Superficie finemente scabrata.

4.1.2. Studio del *pattern* di nervatura

Si riportano di seguito alcune immagini utilizzate per lo studio del *pattern* di nervatura delle foglie e le relative descrizioni secondo la terminologia di PAUL (1987).

Ophioglossum vulgatum**, Selva del Lamone:** Nervatura reticolata primaria formante areole poco prolungate nelle aree esterne della lamina, più allungate nella parte centrale. Nelle areole marginali e in quelle centrali è presente un reticolo secondario (Fig. 4.3).

Ophioglossum sp., **Selva del Lamone:** UTV 29454: Nervatura reticolata primaria formante areole poco prolungate nelle aree esterne della lamina, più allungate nella parte centrale. Nelle areole marginali è presente un reticolo secondario più fine che è assente nelle centrali (Fig. 4.3). UTV 29455: Nervatura reticolata primaria formante areole poco prolungate nelle aree esterne della lamina, più allungate nella parte centrale. Sia nelle areole marginali che in quelle centrali è presente un reticolo secondario più fine (Fig. 4.3).

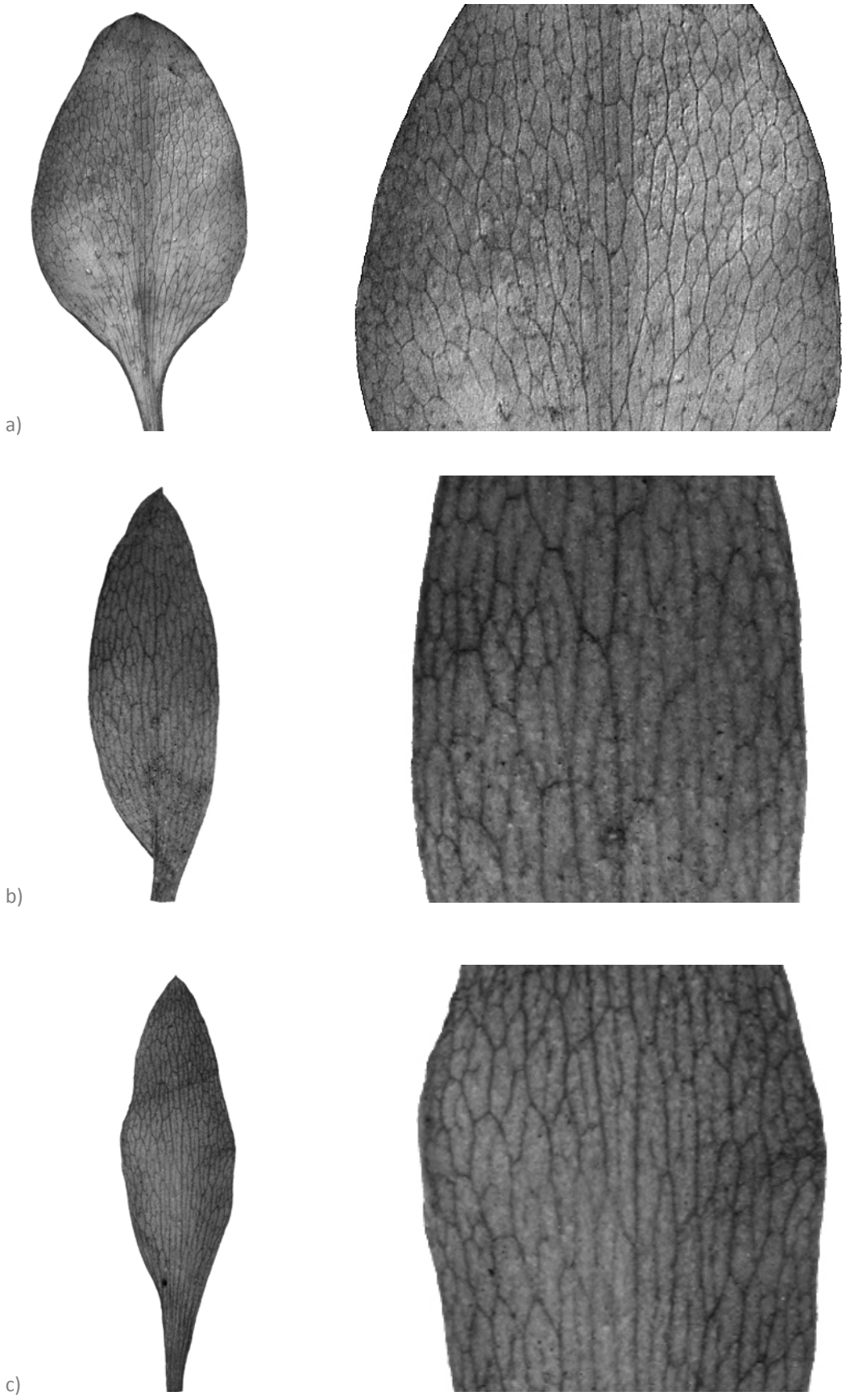


Fig. 4.3 - Lamine sterili elaborate per evidenziare il pattern di nervatura di: a) *Ophioglossum vulgatum*, saggio UTV 15504; b) *Ophioglossum sp.*, saggio UTV 29454 e c) *Ophioglossum sp.*, saggio UTV 29455.

4.1.3. Studio morfometrico

Si riportano di seguito i risultati dello studio condotto con la morfometria tradizionale e con la morfometria geometrica.

Morfometria tradizionale

Questi i risultati delle analisi sugli 8 caratteri meristici e morfologici considerati.

È stato contato il numero di lamine sterili per individuo da 592 esemplari delle 3 specie, in particolare da 73 di *Ophioglossum azoricum*, 292 di *O. lusitanicum* e 227 di *O. vulgatum*. I grafici seguenti mostrano come il 97% degli individui di *O. vulgatum*, il 78% di *O. azoricum* e il 45% di *O. lusitanicum* abbiano una sola lamina. La percentuale di individui con 2 lamine in *O. vulgatum* è trascurabile, mentre è predominante in *O. lusitanicum* (53%) ed è solo il 22% in *O. azoricum*.

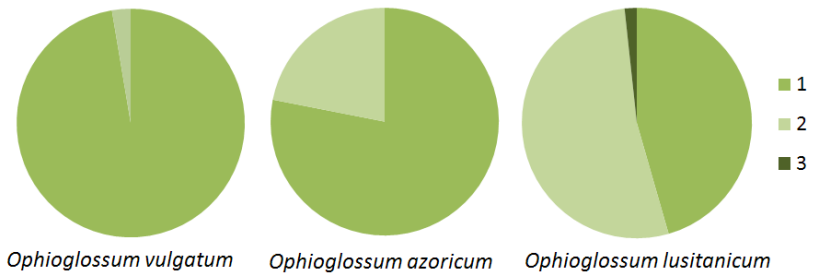


Fig. 4.4 - Numero di lamine sterili per individuo osservate nelle 3 specie.

Di seguito si riportano i risultati delle analisi basate su un *dataset* di misure effettuate su 300 esemplari delle 3 specie e di *Ophioglossum sp.* della Selva del Lamone.

Nella tabella seguente (Tab. 4.2) sono riportati i *range* delle misure effettuate sulla lamina sterile e sullo sporoforo. I grafici *boxplot* (Fig. 4.5 e Fig. 4.6) mettono a confronto i dati morfometrici, rispettivamente, della lamina sterile e dello sporoforo. Il box indica il range di valori significativi (25-75%) e la mediana è indicata dalla linea verticale all'interno, le linee orizzontali indicano i valori minimo e massimo.

Specie	O. azoricum range		O. lusitanicum range		O. vulgatum range		Ophioglossum sp. range	
Caratteri	min-max	25%-75% percentile	min-max	25%-75% percentile	min-max	25%-75% percentile	min-max	25%-75% percentile
larghezza della lamina	0,3-1,7	**0,5-1,0**	0,1-0,5	**0,3-0,4**	1,0-4,7	**2,0-3,0**	0,6-2,6	**1,1-2,0**
lunghezza della lamina	1,8-5,5	**2,4-3,5**	1,0-6,0	**1,8-3,0**	2,0-14,0	**4,5-8,2**	1,6-5,4	**3,0-4,5**
rapporto larghezza/lunghezza	0,13-0,49	**0,20-0,31**	0,05-0,29	**0,10-0,19**	0,19-0,80	**0,34-0,48**	0,22-1,00	**0,33-0,48**
n° sporangi/lato	9-21	**11-14**	5-13	**7-9**	10-48	**23-33**	9-21	**11-17**
lunghezza sporoforo	0,8-2,0	**0,9-1,4**	0,6-1,7	**0,7-1,2**	1,1-6,3	**2,7-4,2**	0,9-1,7	**1,1-1,5**

Tab. 4.2 - Tabella con i range di misure della lamina sterile e dello sporoforo nelle 3 specie: larghezza massima e lunghezza della lamina e rapporto fra larghezza e lunghezza; numero di sporangi per lato e lunghezza dello sporoforo.

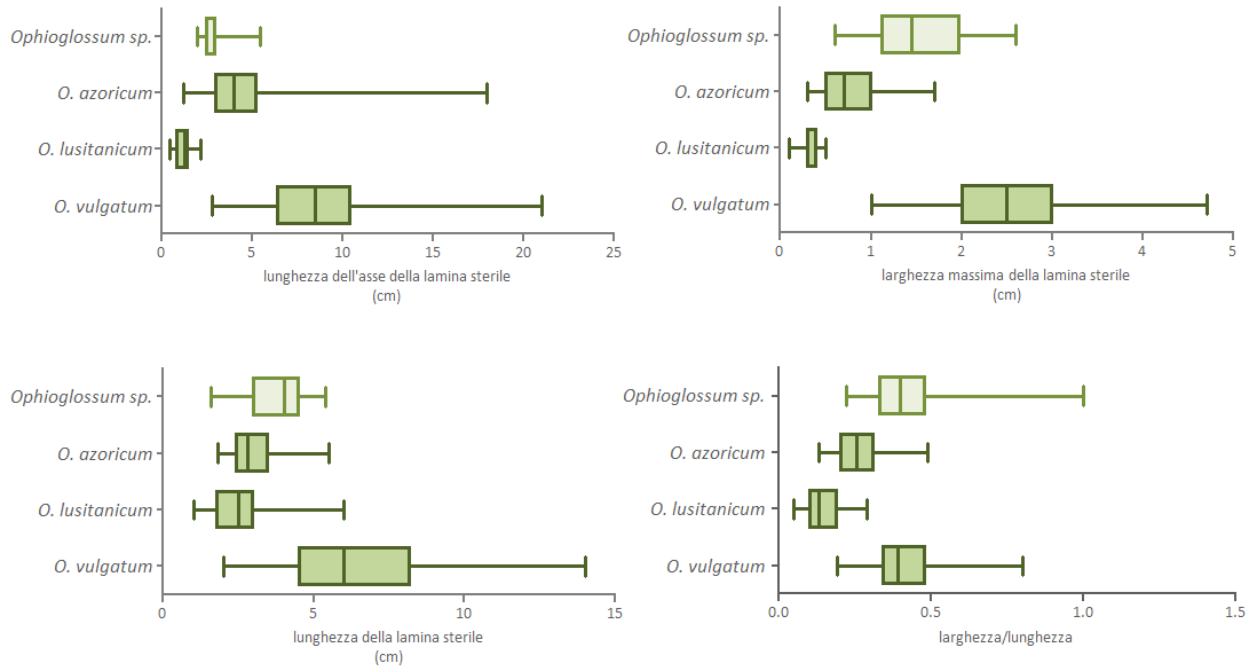


Fig. 4.5 - Grafici *boxplot* che mettono a confronto i dati morfometrici della lamina sterile misurati nelle 3 specie: lunghezza dell'asse della lamina, larghezza massima e lunghezza della lamina e rapporto fra larghezza e lunghezza. Il box indica il *range* di valori significativi con la mediana indicata dalla linea verticale all'interno, le linee orizzontali indicano i valori minimo e massimo.

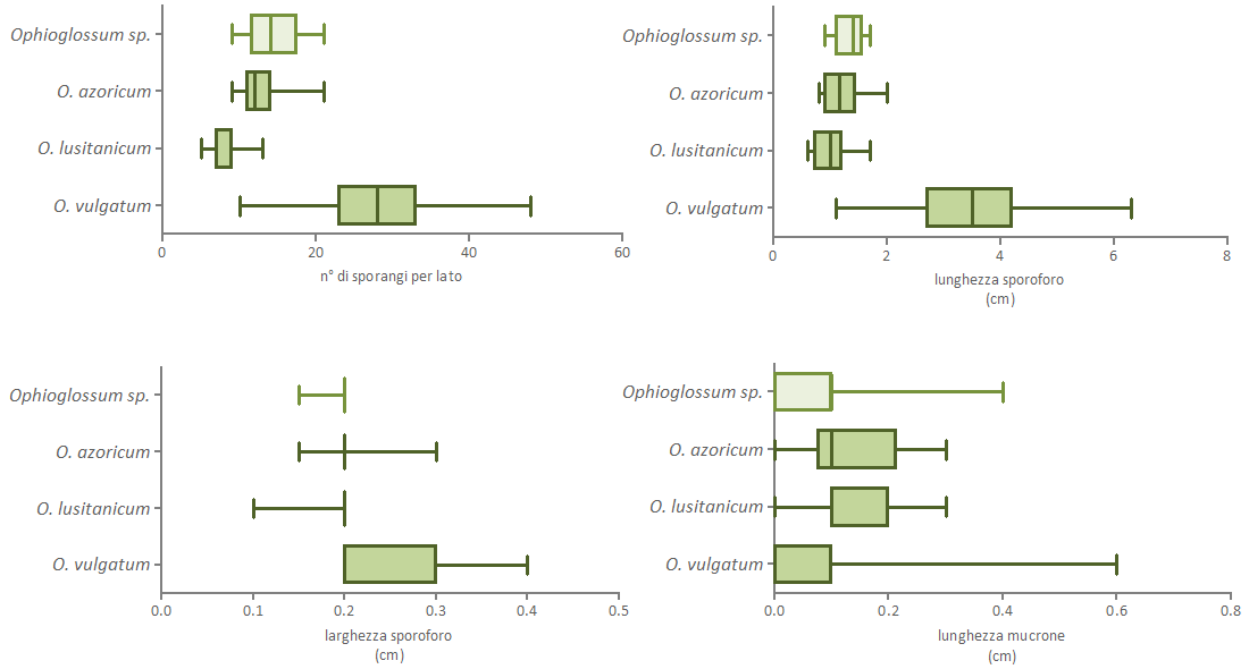


Fig. 4.6 - Grafici *boxplot* che mettono a confronto i dati morfometrici dello sporoforo misurati nelle 3 specie: numero di sporangi per lato, lunghezza e larghezza dello sporoforo e lunghezza del mucrone.

I risultati del test di correlazione di Pearson riportati nella Tab. 4.3 mostrano una forte correlazione (alpha = 0,05) fra la lunghezza della lamina sterile e il numero di sporangi per lato (0,830); fra la larghezza massima della lamina sterile e il numero di sporangi per lato (0,805); fra la lunghezza dell'asse

della lamina sterile e la lamina stessa (0,799) e fra la lunghezza dell'asse e il numero di sporangi per lato (0,798).

Variabili	n° lamine sterili	lunghezza lamina	larghezza max lamina	largh/ lungh	n° sporangi/ lato	lunghezza sporoforo	larghezza sporoforo	lunghezza mucrone	lunghezza asse
n° lamine sterili	**1,000**	-0,543	-0,576	-0,420	-0,648	-0,594	-0,501	0,285	-0,655
lunghezza lamina	-0,543	**1,000**	0,889	0,315	**0,830**	0,814	0,489	-0,292	**0,799**
larghezza max lamina	-0,576	0,889	**1,000**	0,671	**0,805**	0,785	0,542	-0,320	0,760
largh/ lungh	-0,420	0,315	0,671	**1,000**	0,403	0,367	0,348	-0,226	0,347
n°sporangi/ lato	-0,648	**0,830**	**0,805**	0,403	**1,000**	**0,943**	0,597	-0,309	**0,798**
lunghezza sporoforo	-0,594	0,814	0,785	0,367	**0,943**	**1,000**	0,654	-0,262	0,708
larghezza sporoforo	-0,501	0,489	0,542	0,348	0,597	0,654	**1,000**	-0,354	0,402
lunghezza mucrone	0,285	-0,292	-0,320	-0,226	-0,309	-0,262	-0,354	**1,000**	-0,245
lunghezza asse	-0,655	0,799	0,760	0,347	0,798	0,708	0,402	-0,245	**1,000**

Tab. 4.3 - Matrice di correlazione fra le 9 variabili analizzate con il metodo di Pearson.

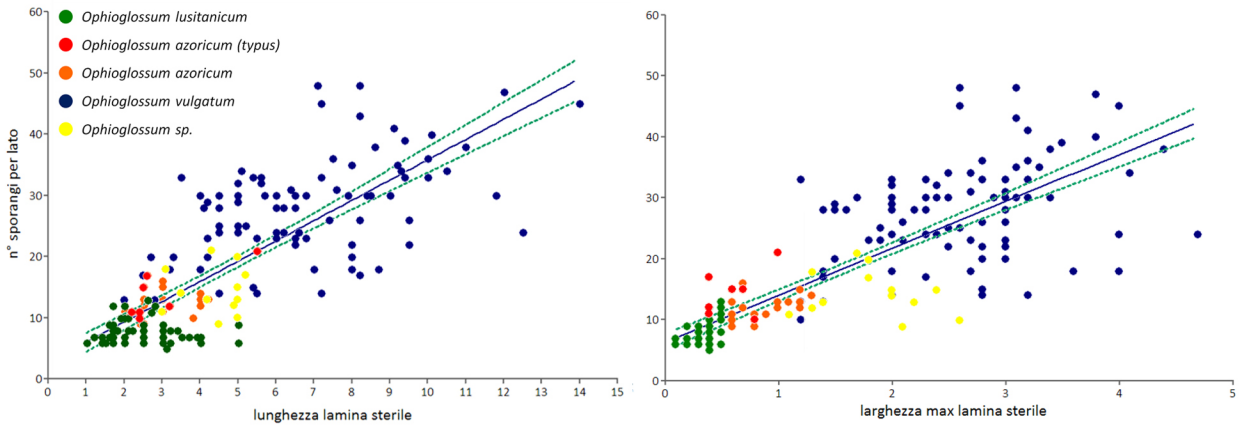


Fig. 4.7 - Correlazione fra il numero di sporangi per lato e, rispettivamente, la lunghezza della lamina sterile (a sinistra) e la larghezza massima della lamina sterile (a destra). Nei due grafici è riportata la retta di regressione lineare con un intervallo di confidenza del 95%.

Analizzando i dati specie per specie, si osserva correlazione fra il numero di sporangi per lato e la lunghezza della lamina sterile in *Ophioglossum vulgatum* e *O. azoricum*, mentre la correlazione (alpha = 0,05) non è significativa in *Ophioglossum lusitanicum* e *Ophioglossum sp.* C'è correlazione fra il numero di sporangi per lato e la larghezza della lamina sterile in *Ophioglossum vulgatum* e *O. lusitanicum*, mentre la correlazione (alpha = 0,05) non è significativa, in *Ophioglossum azoricum* e *Ophioglossum sp.*

I risultati dell'Analisi Fattoriale Discriminante effettuata sulle 9 variabili della lamina sterile e dello sporoforo evidenziano la correlazione fra le variabili esaminate e i 3 fattori F1, F2 e F3 (Tab. 4.4; Fig. 4.8).

In particolare, variabili come la larghezza dello sporoforo e la lunghezza del mucrone non risultano discriminanti, mentre per la larghezza massima e la lunghezza della lamina sterile, per la lunghezza dello sporoforo e per il numero di sporangi per lato si osservano valori di correlazione alti sia lungo F2 che lungo F3.

Correlazioni Variabili/Fattori:	F1	F2	F3
n° lamine sterili	-0,808	0,427	0,286
lunghezza lamina sterile	0,763	0,078	0,188
larghezza max lamina sterile	0,862	0,224	0,229
largh/lungh lamina sterile	0,732	0,426	0,022
n° sporangi/lato	0,842	-0,137	0,270
lunghezza sporoforo	0,778	-0,183	0,452
larghezza max sporoforo	0,543	-0,149	0,220
lunghezza mucrone	-0,333	-0,098	-0,237
lunghezza asse della sporoforo	0,803	-0,267	0,129
Autovalore	13,799	1,239	0,285
Discriminazione (%)	90,053	8,087	1,860
% cumulata	90,053	98,140	100,000

Tab. 4.4 - Valori di correlazione fra le variabili esaminate tramite Analisi Fattoriale Discriminante e i 3 fattori F1, F2 e F3 dei quali sono riportati autovalori e percentuale di discriminazione.

In particolare, lungo F2 si osserva (Fig. 4.8) una correlazione inversa fra il numero di lamine sterili e la lunghezza dell'asse e lungo F3 una correlazione diretta fra lunghezza dello sporoforo, numero di sporangi per lato, larghezza e lunghezza della lamina e lunghezza dell'asse. La lunghezza del mucrone e la larghezza dello sporoforo sono le variabili meno significative.

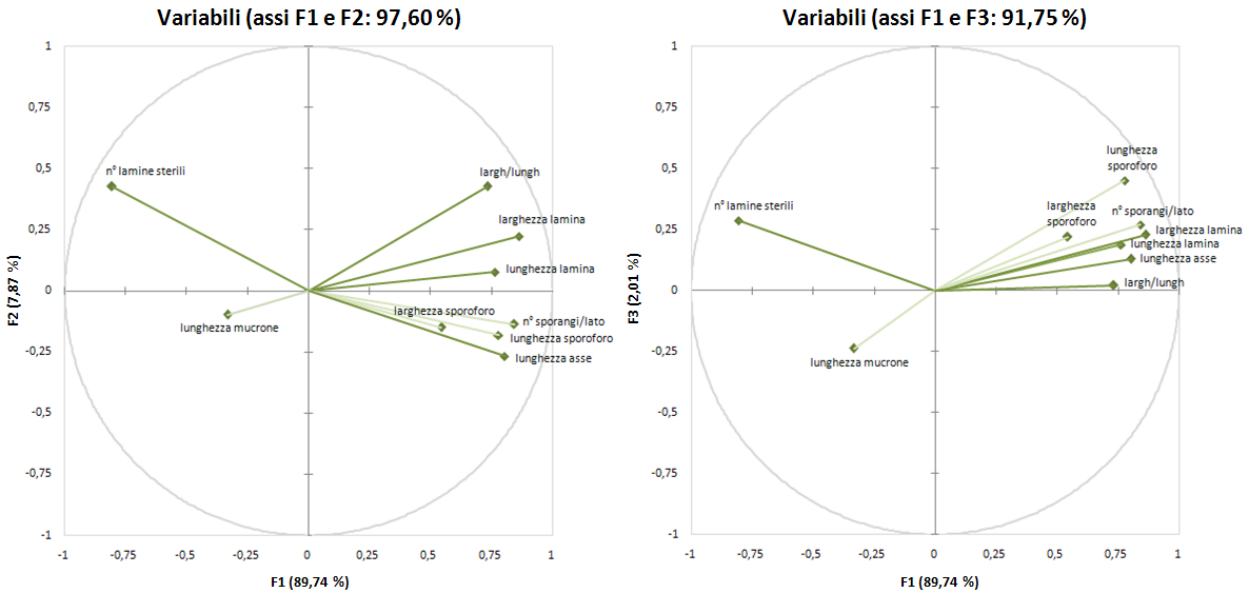


Fig. 4.8 - Grafici *biplot* della correlazione fra le variabili esaminate tramite Analisi Fattoriale Discriminante e i 3 fattori F1, F2 e F3. Le variabili riferite alla lamina sterile sono indicate con il verde scuro e quelle dello sporoforo con il verde chiaro.

Il *plot* dell'Analisi Fattoriale Discriminante rispetto a F1-F3 (Fig. 4.9), che discriminano una percentuale cumulata del 91,75%, mostra una netta separazione fra *O. vulgatum* e *O. lusitanicum* lungo F3 (Lambda di Wilks = 0,021; df = 8; p < 0,0001), con i baricentri nei due quadranti superiori. Lungo questo asse la discriminazione è funzione principalmente del numero di sporangi per lato e della larghezza della lamina. Fra questi due gruppi, si osservano *O. azoricum* e *Ophioglossum sp*., parzialmente sovrapposti e abbastanza ben separati dagli altri, con baricentri nel quadrante inferiore sinistro.

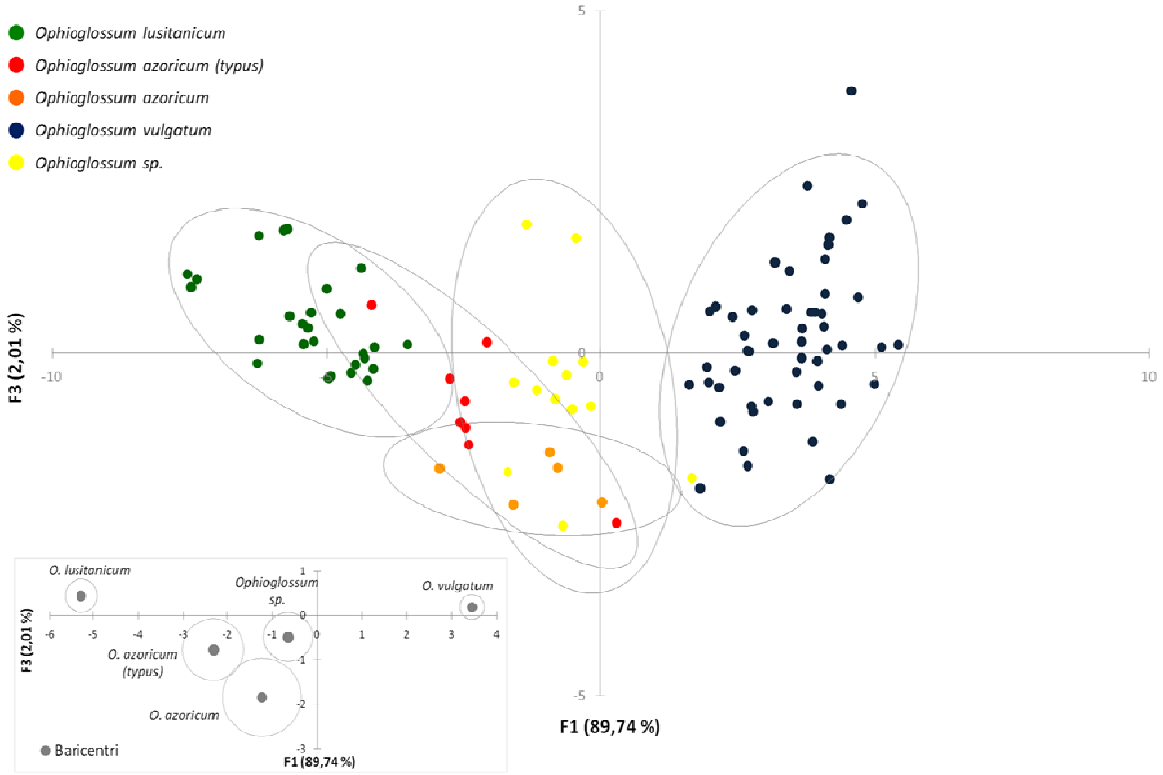


Fig. 4.9 - *Plot* dell'Analisi Fattoriale Discriminante rispetto a F1-F3 (91,75%) e nel riquadro in basso, *plot* della distribuzione dei baricentri dei gruppi. F3 discrimina principalmente rispetto al numero di sporangi per lato e della larghezza della lamina.

Morfometria geometrica – Metodo dei *Landmark*

Si riportano di seguito i risultati della *Relative Warps Analysis* (RWA) sull'intero *dataset* costituito da 203 lamine sterili delle 3 specie e delle 3 popolazioni di *Ophioglossum sp.* della Selva del Lamone, Moriglion di Penna e Monte Pianello. Nella legenda sono riportate le specie secondo la determinazione originale dei saggi d'erbario. L'analisi dei primi due *Relative Warp*, RW1 e RW2, che riassumono rispettivamente l'85,10% e il 6,07% della varianza totale, rivelano una chiara separazione fra *Ophioglossum vulgatum* e *O. lusitanicum* lungo RW1, mentre *O. azoricum* risulta poco discriminabile sia lungo RW1 che RW2. I campioni di Ophioglossum sp. provenienti dal Lamone e dal M. Pianello si sovrappongono con *O. azoricum*, mentre quelli provenienti da Moriglion di Penna (Fig. 4.10) si distribuiscono lungo RW1 nell'area di *O. vulgatum* e in quella di *O. azoricum*.

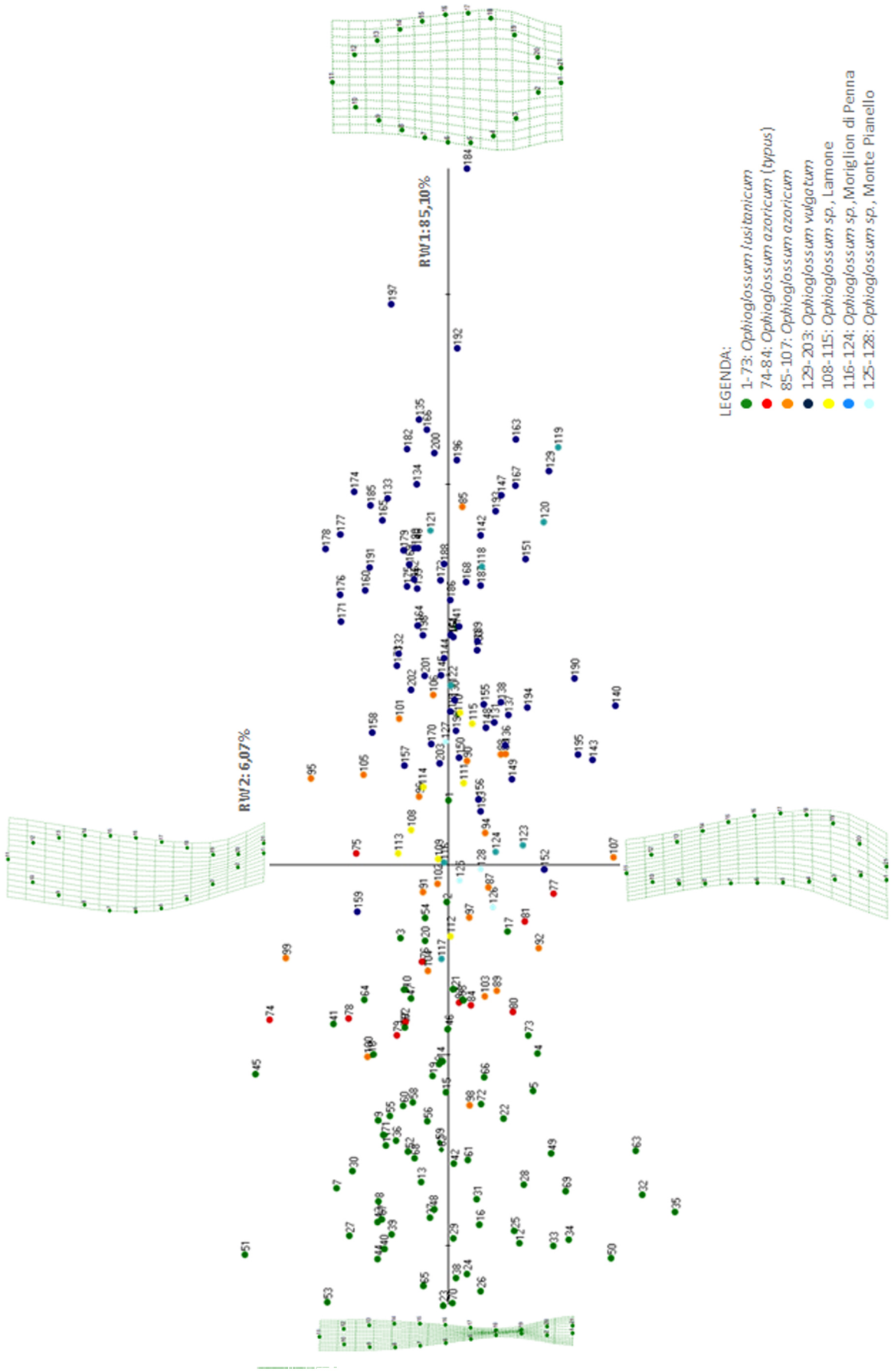


Fig. 4.10 - *Relative warp ordination plot* ottenuto dall'analisi dell'intero *dataset* e reticoli di deformazione lungo le prime 2 Relative Warp, che riassumono rispettivamente l'85,10% e il 6,07% della varianza totale.

Osservando i reticoli di deformazione associati alla variazione lungo RW1 (Fig. 4.11), si può osservare che passando da valori negativi, corrispondenti ad *O. lusitanicum*, ai valori positivi di *O. vulgatum*, il reticolo subisce una contrazione in senso verticale e si dilata in modo molto evidente in larghezza, particolarmente nella metà inferiore della lamina, in corrispondenza dei landmark 3-6 e 16-19.

Lungo RW2 (6,07%) (Fig. 4.10) le deformazioni del reticolo sono meno significative, riferendosi essenzialmente al passaggio da forme della lamina arcuate verso sinistra a forme arcuate verso destra.

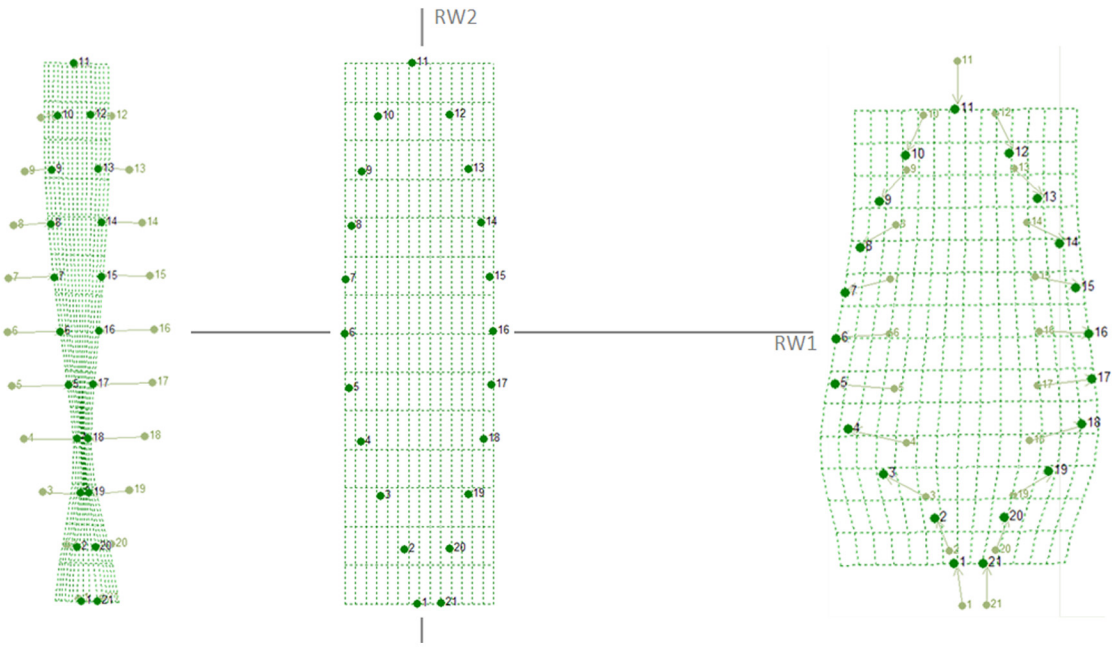


Fig. 4.11- Reticoli di deformazione rilevati agli estremi di RW1, con associati i vettori di deformazione rispetto alla forma media (all'origine degli assi). A sinistra l'estremo di *Ophioglossum lusitanicum* e a destra l'estremo opposto, *Ophioglossum vulgatum*.

Outline analysis

Si riportano di seguito i risultati dell'analisi dei dati di contorno applicata all'intero *dataset* costituito da 203 *outline* (Fig. 4.12) ed applicata a *dataset* parziali riferiti alle singole specie o popolazioni, attraverso l'analisi di 20 armoniche su 77 componenti.

Dalla PCA effettuata sulla matrice dei coefficienti delle armoniche si ottiene un *output* grafico che mostra l'*outline* medio ±2 deviazione standard, secondo le componenti principali effettive. In particolare nelle elaborazioni seguenti sono mostrate le prime due componenti principali.

Nei risultati dell'analisi degli *outline* applicata all'intero *dataset* (Fig. 4.12) si osserva che sia lungo PC1 che lungo PC2, la discriminazione è paragonabile a quella osservata per i *landmark*. Ciò è confermato dai valori di varianza spiegata dalle prime due componenti, pari al 92,93%: PC1 = 88,33% e PC2 = 4,60%. La prima componente concorda con la prima *relative warp* dell'analisi dei *landmark*, indicando le 2 forme estreme diversificate per la larghezza della lamina, particolarmente nella sua metà inferiore, e corrispondenti a *O. lusitanicum* per l'estremo negativo e *O. vulgatum* per l'estremo positivo.

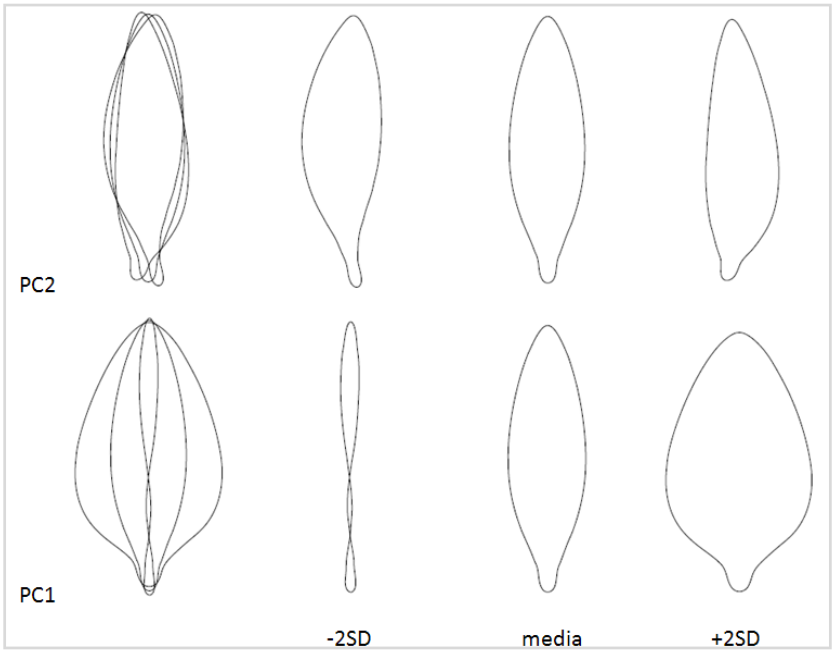


Fig. 4.12 - Risultati della PCA sull'intero *dataset*: o*utline* (media ±2 deviazione standard) secondo le prime 2 componenti principali: PC1 = 88,33% e PC2 = 4,60%.

Nei risultati dell'analisi degli *outline* applicata ai *dataset* parziali corrispondenti alle singole specie (Fig. 4.13 e Fig. 4.14) otteniamo un'ulteriore conferma a quanto visualizzato con la *Relative Warp Analysis*, evidenziando la parte inferiore della lamina come principale area di differenziamento fra le specie, anche se all'interno di ogni specie è presente una certa variabilità. In particolare, il *typus* di *Ophioglossum azoricum* mostra il valore più basso lungo PC1 (56,15%) indicando una maggiore uniformità del campione, è basso anche il valore di PC1 (61,34%) anche per *O. lusitanicum*, mentre il valore maggiore si osserva per *O. vulgatum* PC1 (70,67%), probabilmente anche per la presenza di saggi non determinati correttamente e appartenenti ad altre specie.

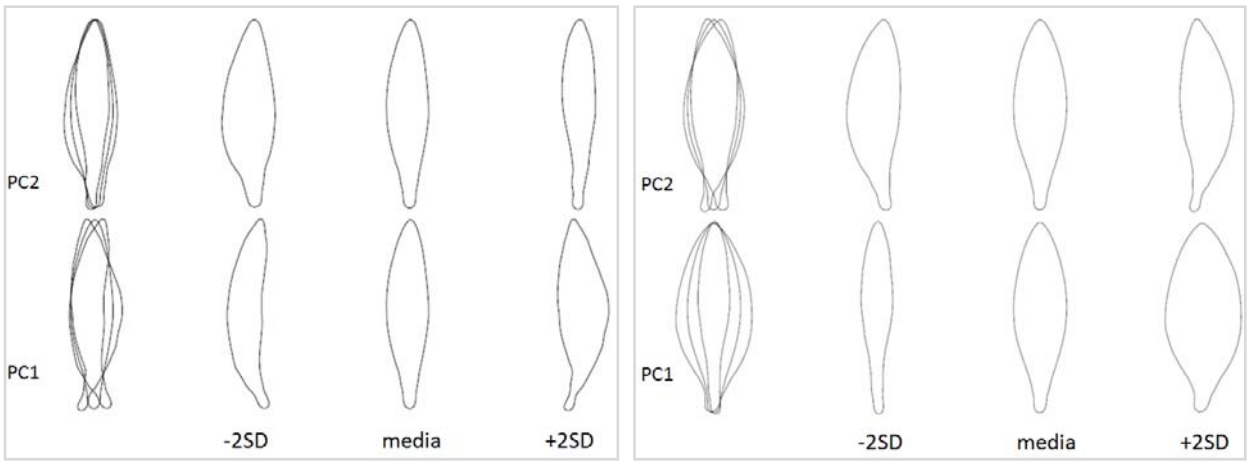


Fig. 4.13 - A sinistra: *outline* del *typus* di *Ophioglossum azoricum* secondo le prime 2 componenti principali: PC1 = 56,15%; PC2 = 29,06%. A destra: *outline* di *O.azoricum* secondo le prime 2 componenti principali: PC1 = 64,98%; PC2 = 15,82%

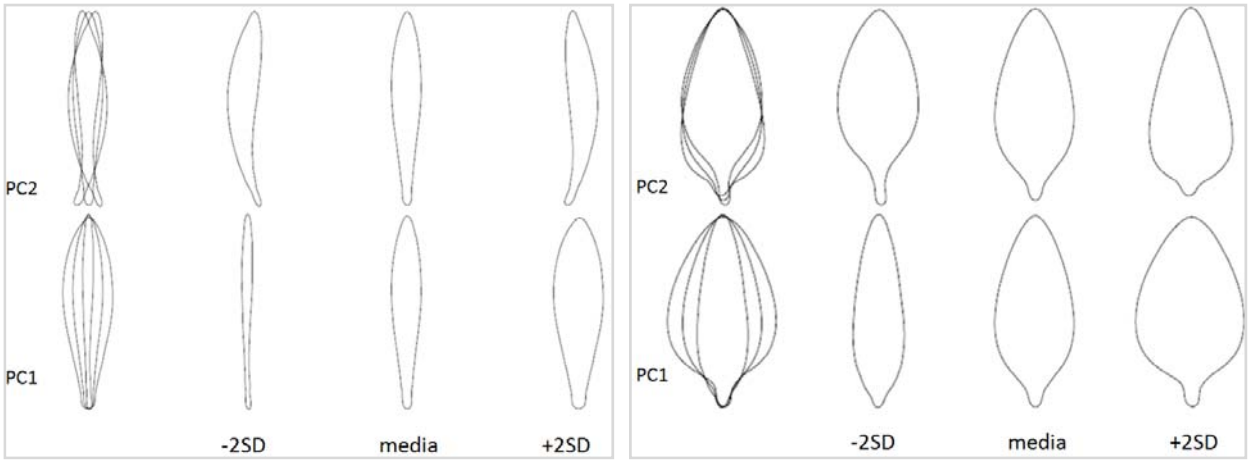


Fig. 4.14 - A sinistra: *outline* di *Ophioglossum lusitanicum* secondo le 2 componenti principali: PC1 = 61,34%; PC2 = 28,07%. A destra: *outline* di *O. vulgatum* secondo le 2 componenti principali: PC1 = 70,67%; PC2 = 15,12%

Utilizzando come termine di confronto gli *outline* ottenuti per le 3 specie possiamo analizzare gli *outline* di *Ophioglossum sp.* provenienti dalle popolazioni della Selva del Lamone, Monte Pianello e Moriglion di Penna. In particolare, possiamo osservare che gli *outline* di *Ophioglossum sp.* provenienti dalla Selva del Lamone (Fig. 4.15) mostrano bassa variabilità (PC1 = 64,15%) e sono, riconducibili ad *O. azoricum* (Fig. 4.13). Un risultato simile si ottiene per gli *outline* di *Ophioglossum sp.* provenienti dal Monte Pianello (Fig. 4.15), anche se il campione appare più diversificato (PC1 = 80,67%).

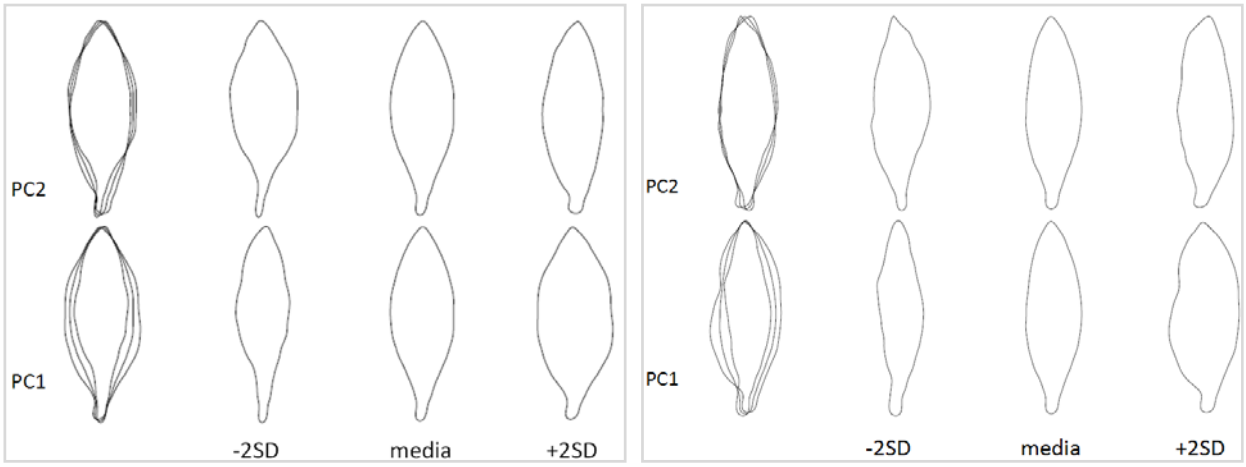


Fig. 4.15 - A sinistra: *outline* di *Ophioglossum sp.* (Selva del Lamone) secondo le 2 componenti principali: PC1 = 64,15%; PC2 = 20,17%. A destra: *outline* di *Ophioglossum sp.* (Monte Pianello) secondo le 2 componenti principali: PC1 = 80,67%; PC2 = 12,19%.

Invece, il campione di *Ophioglossum sp.* provenienti da Moriglion di Penna (Fig. 4.16) risulta piuttosto diversificato (PC1 91,54%), con forme estreme riconducibili ad *O. vulgatum* e a *O. azoricum*, indicando probabilmente una popolazione mista delle 2 specie, così come evidenziato anche dalla *Relative Warp Analysis*.

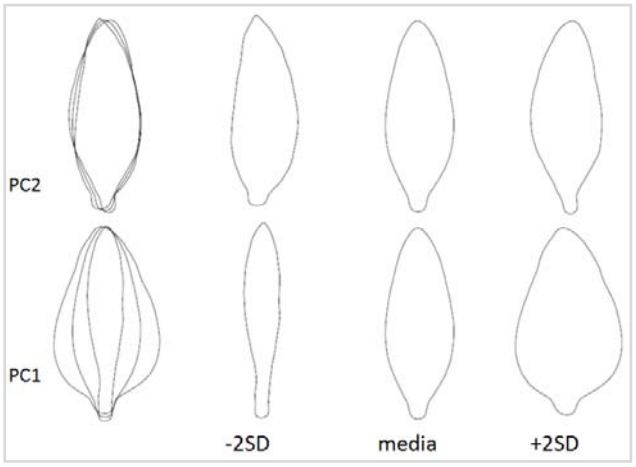


Fig. 4.16 - O*utline* di *Ophioglossum sp.* (Moriglion di Penna) secondo le 2 componenti principali: PC1 91,54%; PC2 3,81%.

4.1.4. Riproduzione *in vitro*

Per la riproduzione asimbiotica *in vitro* di *Ophioglossum vulgatum* sono stati utilizzati diversi terreni di coltura, descritti nel Par. 3.5.1., accomunati dalla presenza di saccarosio. Le prove effettuate utilizzando i terreni citati in letteratura non hanno ancora dato risultati, mentre sono stati osservati i primi gametofiti nelle colture su BM-1 e BM-1P. La prova è ancora in corso, quindi si riportano di seguito solo i primi risultati.

In particolare, le colture su KNUDSON C *Orchid Medium* (KNUDSON, 1946), un terreno per orchidee epifite tropicali contenente azoto in forma inorganica (nitrato di calcio e solfato di ammonio) modificato secondo WHITTIER (1965; 1981), dopo 1 anno dalla semina non hanno mostrato nessun risultato, così come le prove successive, a 9 mesi dalla semina, per le quali sono stati utilizzati terreni senza nitrati, ma con varie quantità di azoto ammoniacale.

Nelle colture su BM-1 *Terrestrial Orchid Medium* (VAN WAES, 1984) e su BM-1P, una sua variante, sono stati osservati i primi gametofiti tuberosi (0-3 per piastra). Per quanto riguarda i pretrattamenti (Par. 3.5.2.), nelle colture di spore non trattate (U, unground) sono stati osservati i primi gametofiti su entrambi i terreni, mentre nelle colture di spore scarificate (G, ground) solo su BM-1 (Fig.4.17).

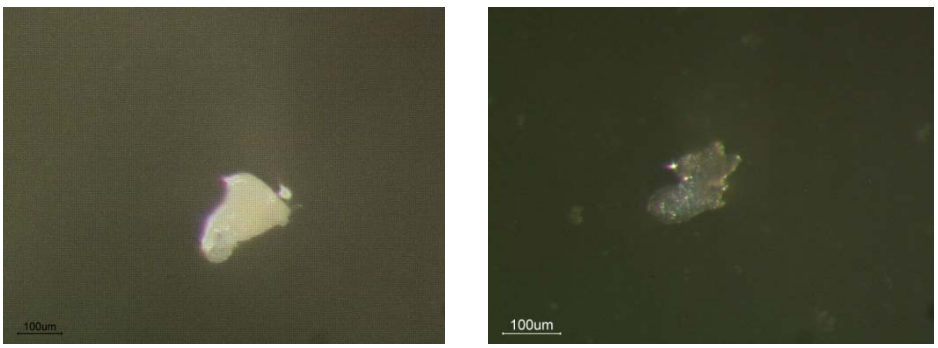


Fig. 4.17 - Sviluppo dei primi gametofiti nelle colture di *O.. vulgatum* su BM-1 (a sinistra) e su BM-1P (a destra).

4.2. *Osmunda regalis*

4.2.1. Studio palinologico

Una parte delle spore raccolte sono state utilizzate per effettuare osservazioni micromorfologiche al microscopio ottico e al microscopio elettronico a scansione, per le misurazioni e per realizzare microfotografie. Le spore prelevate dai saggi d'erbario sono state osservate al microscopio ottico prima della semina, sia per controllarne l'integrità che per verificare la presenza di cloroplasti al loro interno (Fig. 4.18 e Tab. 4.5).

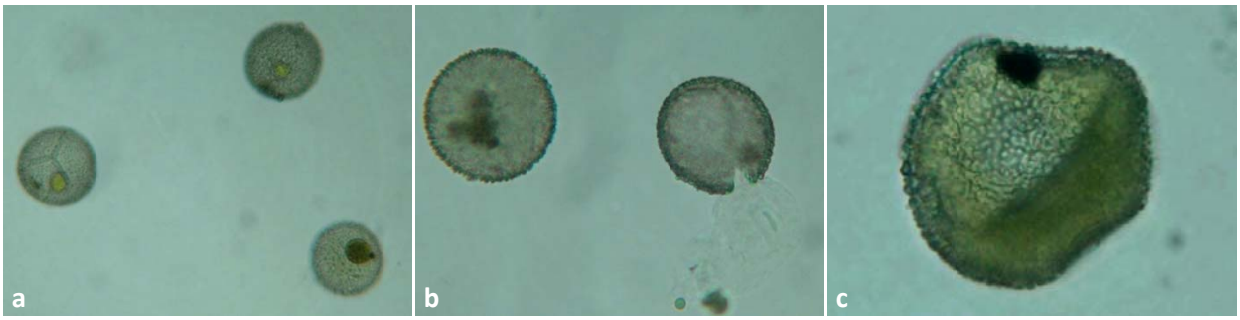


Fig. 4.18 – Microfotografie al microscopio ottico di spore di *Osmunda regalis* provenienti da *exsiccata* dell'erbario UTV, dove è possibile osservare: a) la presenza di cloroplasti, anche se fortemente ridotti e le 3 lesure tipiche delle spore trilete, e danni da rottura (b) e collasso (c) della parete sporale.

Nella tabella seguente (Tab. 4.5) è riportata una sintesi delle misurazioni effettuate al microscopio ottico: sono date le dimensioni minime, medie e massime in µm. Le misure ottenute concordano con i dati riportati nella bibliografia consultata: (58)-61,68-(68) µm in FERRARINI *et al*. (1986) e (57)-61,80-(69) µm in PERONI e PERONI (2004).

Campione	Provenienza	Data	Condizioni delle spore	Presenza dei cloroplasti	Dimensioni delle spore (in µm)
Raccolte in natura	Canale Monterano (Roma)	2006	integre	molti	(57)-62,40-(69)
UTV 15510	Isola del Giglio (Grosseto)	1989	integre	pochi	(54)-61,38-(70)
UTV 595	Gole dell'Infernaccio (Viterbo)	1997	integre	molto pochi	(56)-60,10-(65)
UTV 6473	Loc. Ferruzzano (RC)	1999	integre	molto pochi	(56)-62,40-(70)
UTV 16791	M. Capanne, Isola d'Elba (Livorno)	2001	integre	pochi	(57)-59,20-(68)
CAG 1669-2	Riu Maitopis, Sette Fratelli (Cagliari)	1900	danneggiate	nessuno	-
CAG 1669-3	Sotto il Monte Sette Fratelli (Cagliari)	1916	danneggiate	nessuno	-
FI	Sibolla (Lucca)	1891	danneggiate	nessuno	-
FI	Lago di Sibolla (Lucca)	1942	buone	molto pochi	(56)-61,22-(65)
FI	Isola d'Elba, Monte Castello, Vallone di Botro (Livorno)	1948	buone	molto pochi	(59)-62,73-(67)

Campione	Provenienza	Data	Condizioni delle spore	Presenza dei cloroplasti	Dimensioni delle spore (in µm)
FI	Isola d'Elba, fra Marciana Alta e S. Cerbone (Livorno)	1948	buone	molto pochi	(51)-59,49-(65)
FI	Isola d'Elba, Patresi, nei pressi di Zanca, Marciana (Livorno)	1964	integre	molto pochi	(56)-62,40-(70)
FI	Isola del Giglio, sopra Cala di Pietrabona (Grosseto)	1997	integre	molto pochi	(56)-60,88-(68)
SIENA 267911	Canale di Riomagno, Seravezza	1978	danneggiate	nessuno	-
SIENA 268211	Canale del giardino sotto Basati, Seravezza (Lucca)	1978	integre	molto pochi	(50)-58,32-(67)
SIENA 267611	Lungo il Torrente di Antona, presso Canevara (Massa Carrara)	1981	danneggiate	nessuno	-
SIENA 268711	Bosco del Belagaio, Monticiano (Siena)	1995	danneggiate	nessuno	-

Tab. 4.5 – Risultati delle osservazioni al microscopio ottico delle spore prelevate in natura e da saggi d'erbario. Sono riportate nella tabella le condizioni fisiche delle spore, presenza/assenza di cloroplasti al loro interno e la dimensione.

Le osservazioni al microscopio ottico hanno consentito di descrivere alcune caratteristiche delle spore non osservabili al microscopio elettronico a scansione: spore trilete e clorofilliane, senza perina (Fig. 4.19). Attraverso l'utilizzo del SEM è stato possibile osservarne la morfologia esterna, apprezzando i dettagli dell'ornamentazione (Fig. 4.19) e, quindi, di darne una descrizione dettagliata. Per la terminologia adottata si è fatto riferimento FERRARINI *et al*. (1986), PRADA (1990) e PERONI e PERONI (2004).

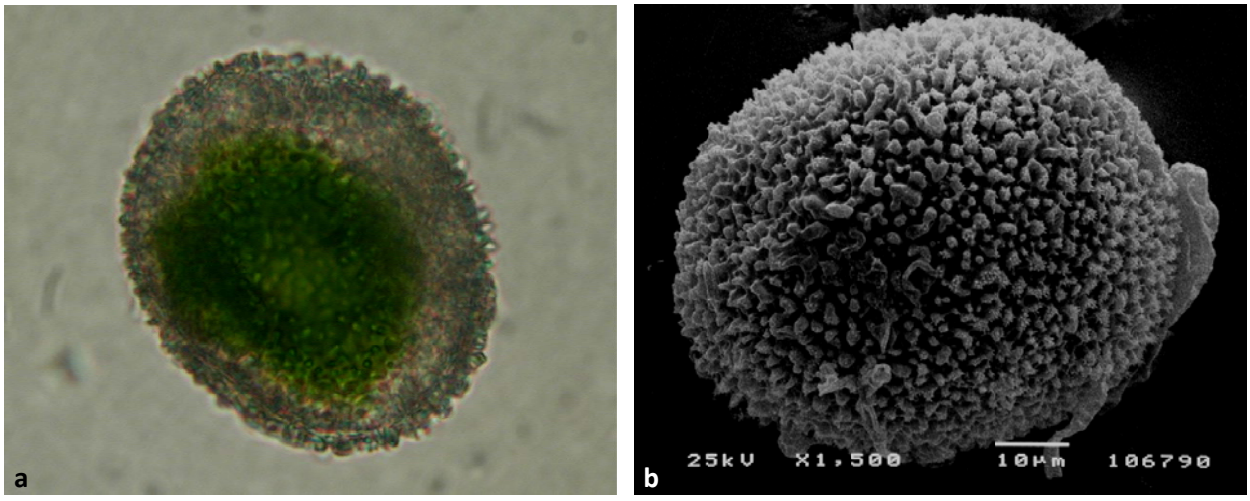


Fig. 4.19 – Spora di *Osmunda regalis* fotografata al microscopio ottico (a), dove sono visibili i cloroplasti al loro interno; e particolare di una spora al microscopio elettronico a scansione (b) in vista distale, dove è possibile osservare l'ornamentazione rugulata dell'esina.

Descrizione: spora clorofilliana trilete, anisopolare (con emisfero prossimale e distale dissimili), radiosimmetrica; profilo globoso in vista polare, conico in faccia prossimale ed emisferico in faccia distale. Perina assente. Esina rugulata cosparsa di radi microaciculi. Dimensione: (57)-62,40-(69) µm.

4.2.2. Riproduzione *in vitro* da spore fresche

Le spore dell'accessione P 22 07 (Tab. 3.4) sono state conservate a T=+5°C fino al momento della semina, l'8/06/2007. La germinazione, con l'emissione del primo rizoide, è stata osservata dopo 2-4 giorni dalla semina nella quasi totalità delle spore. Lo sviluppo laminare del gametofito è iniziato con la seconda o terza divisione cellulare perpendicolare rispetto al piano di divisione precedente, mostrando lo sviluppo caratteristico del genere *Osmunda* dove manca la crescita filamentosa (Fig. 4.21). Sono stati osservati i primi gametofiti cordati con meristema marginale nell'insenatura, dopo circa 33 giorni dalla germinazione e i gametofiti maturi, cordato-elongati, dopo circa 55-60 giorni (Fig. 4.21). Dopo l'osservazione dello sviluppo dei gametangi, confermata dalle osservazioni al SEM (Fig. 4.20), i gametofiti sono stati trasferiti su terriccio sterile e nebulizzati periodicamente con acqua distillata sterile per stimolare l'emissione degli spermatozoidi e favorire la fecondazione.

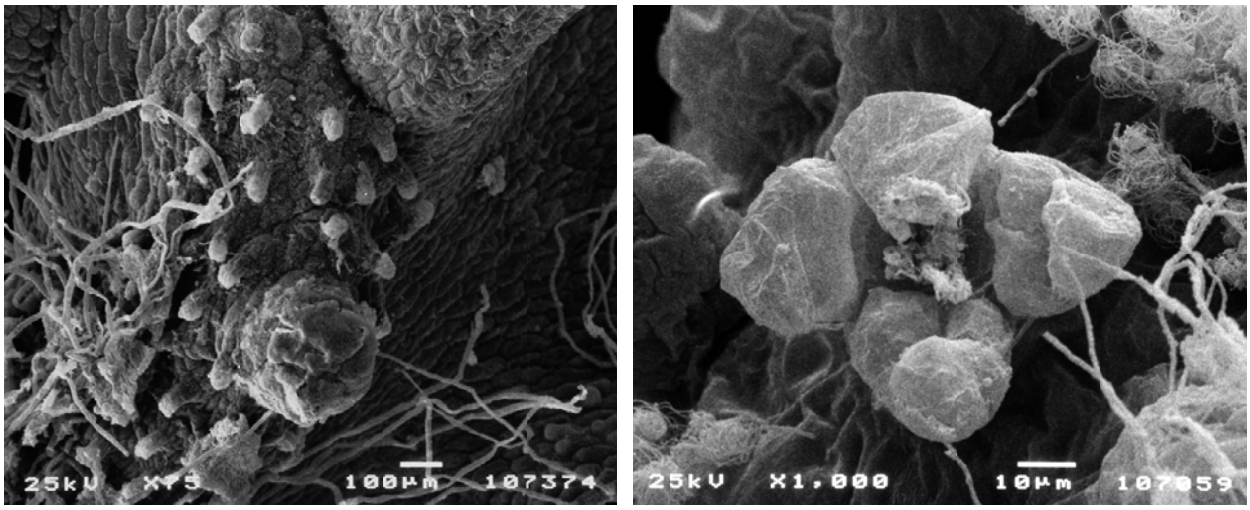


Fig. 4.20 - Fotografie al SEM di gametofiti maturi di *Osmunda regalis* dove si possono osservare gli organi sessuali. A sinistra: gli archegoni in alto e un anteridio (più grande) verso il basso. A destra: particolare di un archegonio aperto con spermatozoidi al centro.

Gli sporofiti non si sono sviluppati in modo sincrono dai vari gametofiti: è stata osservata la prima foglia dopo circa 200 giorni (Fig. 4.21; Tab. 4.6) e l'emergenza delle altre, da circa il 70% dei protalli maturi, distribuita nei successivi 30-40 giorni.

Germinazione		Gametofito in fase laminare (>10 cell.)		Gametofito cordato		Gametofito maturo		Primo sporofito	
gg dalla semina	**%**	**gg dalla germinaz.**	**%**	**gg dalla germinaz.**	**%**	**gg dalla germinaz.**	**%**	**gg dalla germinaz.**	**%**
3±1	90±1%	12±2	97±1%	33±2	94±1%	57±2	83±2%	225±9	58±3%
					97±1%		88±2%		70±2%

Tab. 4.6 – Tempi di germinazione e dello sviluppo di gametofito e sporofito da spore prelevate in natura (si riportano i valori medi con la deviazione standard). Le percentuali riportate nelle ultime 3 fasi si riferiscono rispettivamente alla quantità di spore germinate e alla fase precedente.

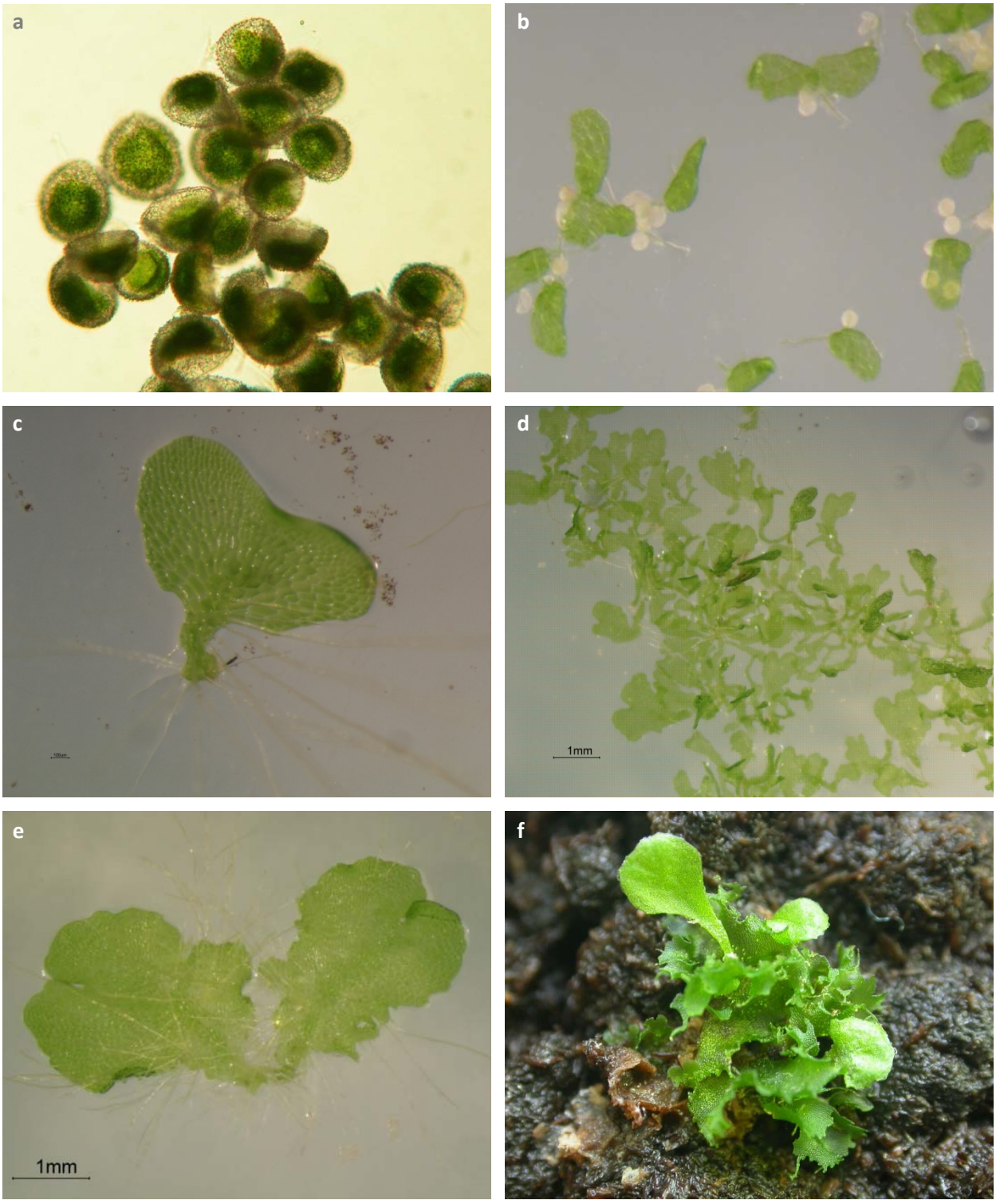


Fig. 4.21 – Fasi della riproduzione *in vitro* di *Osmunda regalis* da spore fresche: a) spore fresche fotografate al microscopio ottico, dove sono evidenti i cloroplasti; b) prima fase di sviluppo dei gametofiti, già in fase laminare; c) inizio della fase cordata dove è visibile il meristema marginale nell'insenatura in formazione; d) gametofiti cordati; e) gametofiti maturi cordato-elongati; f) osservazione del primo sporofito con foglia tipicamente indivisa.

4.2.3. Riproduzione *in vitro* da *exsiccata*

Per la riproduzione *in vitro* da saggi d'erbario, sono state raccolte spore da 16 *exsiccata* (Tab. 3.5). Dalle osservazioni microscopiche effettuate, 3 campioni di spore provenienti dai saggi più vecchi di CAG e FI (anni 1891-1916), oltre a 3 di SIENA, sono stati scartati perché tutte le spore presentavano danni e/o totale assenza di cloroplasti (Tab. 4.5). Sono state, quindi, seminate le spore di 10 saggi diversi di UTV FI e SIENA, con percentuali variabili di cloroplasti al loro interno, ma sempre in misura molto inferiore rispetto a quelle fresche.

Sono stati ottenuti risultati solo per le spore dei saggi UTV 15510 del 1989 e UTV 16791 del 2001 (MAGRINI *et al.,* 2007; 2010c).In particolare, le spore dei due saggi hanno germinato, rispettivamente, dopo circa 33 e 20 giorni dalla semina, con percentuali molto basse (Tab. 4.7).

Solo per le spore del saggio UTV 16791 sono state osservate anche le successive fasi del ciclo riproduttivo (Fig. 4.22), fino allo sviluppo degli sporofiti (Tab. 4.7). Sono stati osservati i primi gametofiti cordati, dopo circa 40 giorni dalla germinazione e i gametofiti maturi, cordato-elongati, dopo altri 30-35 giorni (Fig. 4.22).

Dopo l'osservazione dello sviluppo dei gametangi, i gametofiti sono stati trasferiti su terriccio sterile e nebulizzati periodicamente con acqua distillata sterile per stimolare l'emissione degli spermatozoidi e favorire la fecondazione.

Gli sporofiti non si sono sviluppati in modo sincrono dai vari gametofiti: è stata osservata la prima foglia dopo circa 210 giorni e l'emergenza delle altre, da circa il 67% dei protalli maturi, distribuita nei successivi 35-60 giorni (Fig. 4.22).

Germinazione		Gametofito in fase laminare (>10 cell.)		Gametofito cordato		Gametofito maturo		Primo sporofito	
gg dalla semina	**%**	**gg dalla germinaz.**	**%**	**gg dalla germinaz.**	**%**	**gg dalla germinaz.**	**%**	**gg dalla germinaz.**	**%**
UTV 16791 20±4	2±1%	19±2	95±1%	40±2	93±1% 97±1%	70±2	75±2% 81±2%	240±10	50±3% 67±3%
UTV 15510 33±3	<1%	-	0%	-	-	-	-	-	-

Tab. 4.7 - Tempi e percentuali di germinazione e dello sviluppo di gametofito e sporofito da spore prelevate da *exsiccata* (si riportano i valori medi con la deviazione standard). Nelle ultime 3 fasi sono riportate due percentuali che si riferiscono, rispettivamente, alla quantità di spore germinate e alla fase precedente

4.2.4. Conservazione delle spore

Le prove allestite per la definizione della miglior combinazione fra i fattori idratazione/deidratazione e temperatura per la conservazione a lungo termine delle spore clorofilliane di *Osmunda regalis* (MAGRINI *et al.,* 2006) hanno avuto inizio nel maggio 2007. Si riportano di seguito i risultati di questa sperimentazione (tuttora in corso) dopo un periodo di conservazione di 28 mesi. Per le tipologie di conservazione, Dry, Wet e Normal si rimanda al Par. 3.6.1.

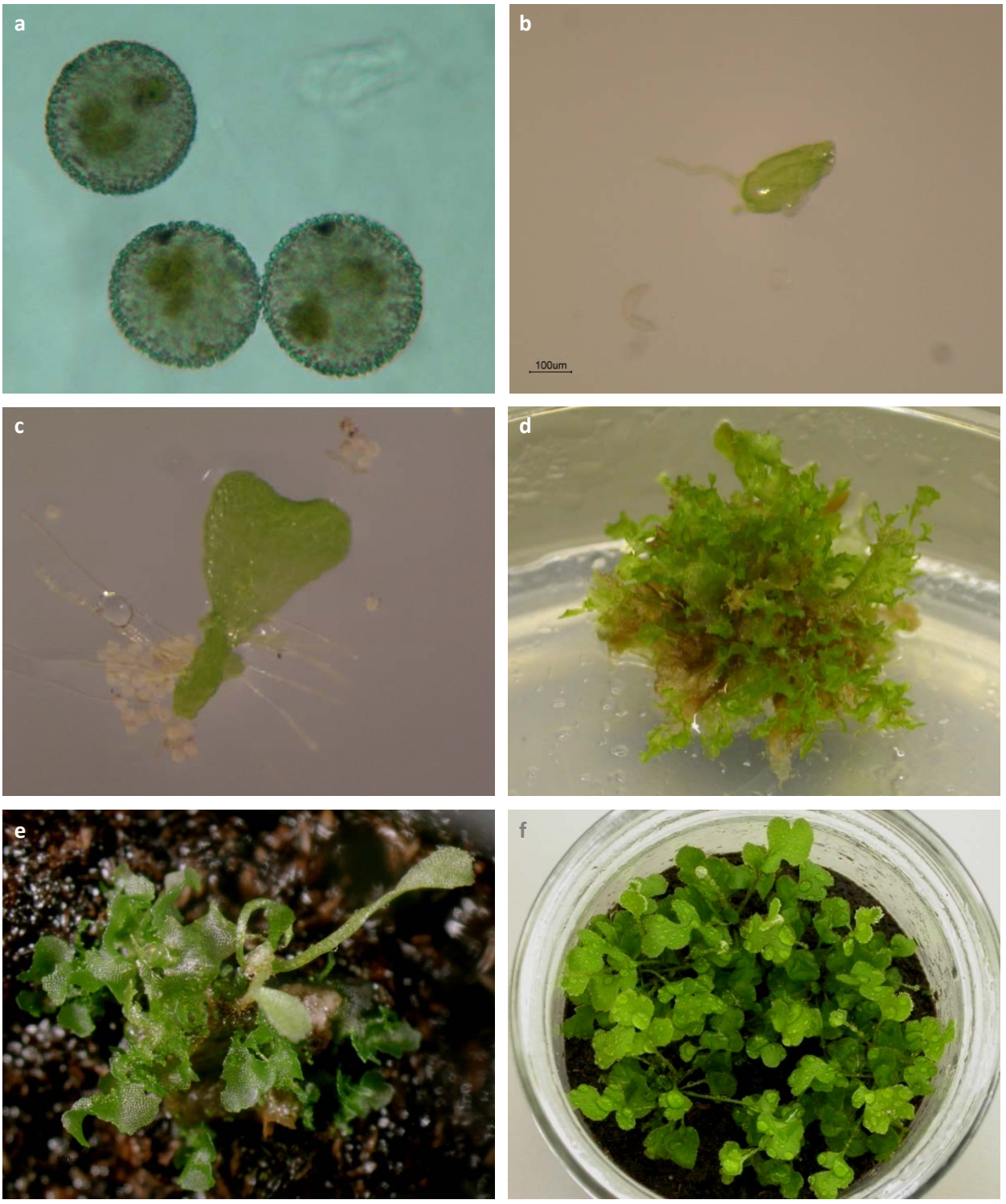


Fig. 4.22 – Fasi della riproduzione *in vitro* di *Osmunda regalis* da spore provenienti dal saggio UTV 16791 del 17/05/2001, dopo 5 anni di conservazione in erbario: a) spore dove sono evidenti i cloroplasti, ma in misura inferiore rispetto a quelle fresche; b) prima fase di sviluppo dei gametofiti; c) inizio della fase cordata dove è visibile il meristema marginale nell'insenatura in formazione; d) gruppo di gametofiti maturi; e) comparsa del primo sporofito con foglia tipicamente intera; f) giovani sporofiti ormai emancipati dai gametofiti, dove si possono osservare le giovani fronde divise con prefoliazione circinnata.

Sopravvivenza

Dal primo grafico (Fig. 4.23) possiamo osservare che nessuna delle spore conservate a T=+15°C e a T=+25°C è sopravvissuta e che tutte le spore conservate a T=+5°C hanno mostrato basse percentuali di sopravvivenza, con un minimo dell'1% per le spore *Normal* e un massimo di circa il 10% per le spore *Wet* (Tab. 4.8 e Fig. 4.23). Le spore conservate a T=-20°C hanno mostrato la maggiore percentuale di sopravvivenza, pari al 41,33% per le spore *Normal*, mentre tutte le spore *Dry* sono morte (Tab. 4.8).

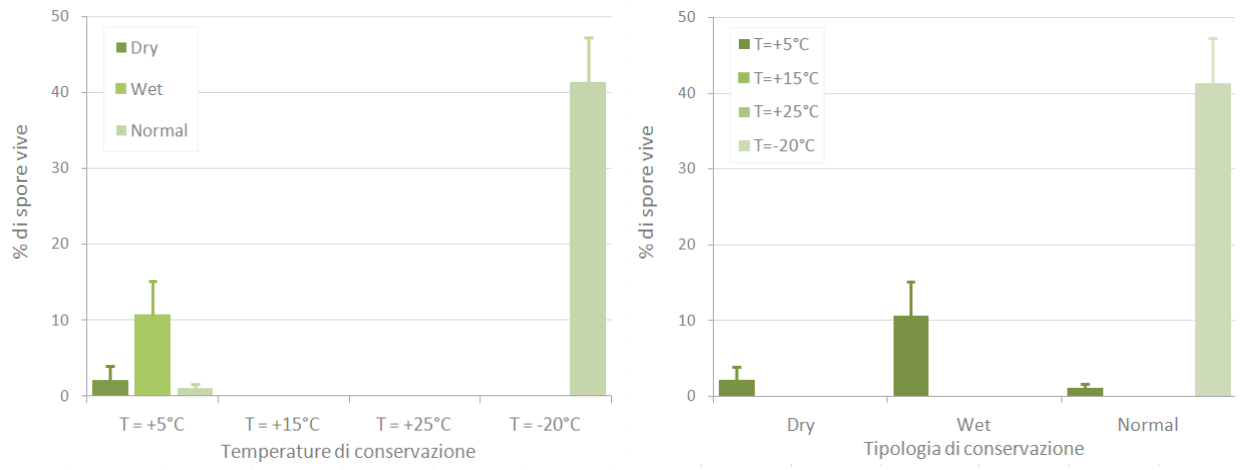


Fig. 4.23 - Percentuali di sopravvivenza delle spore alle varie temperature di conservazione utilizzate (grafico a sinistra) e rispetto alle tipologie di conservazione (grafico a destra).

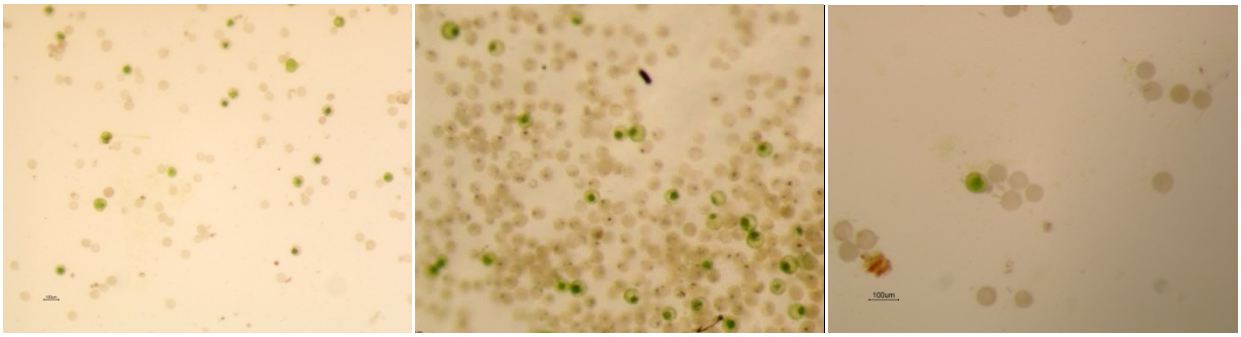
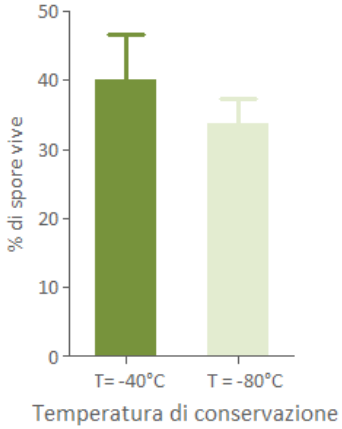


Fig. 4.24 - Spore conservate per 28 mesi a T = +5°C, dove sono evidenti le diverse percentuali di spore verdi. Da sinistra a destra: *Dry*, *Wet* e *Normal*.

	T=+5°C					T=-20°C				
	1	2	3	Media	DevSt	1	2	3	Media	DevSt
Dry	2,96	3,34	0	**2,10**	1,83	0	0	0	**0,00**	0,00
Wet	14,89	5,96	11,02	**10,62**	4,48	0	0	0	**0,00**	0,00
Normal	0,51	1,10	1,63	**1,08**	0,56	34,53	45,38	44,09	**41,33**	5,93

Tab. 4.8 - Dati di sopravvivenza delle spore conservate alle varie temperature; non sono stati riportati i dati riferiti a T = +15°C e +25°C, dal momento che non sono state osservate spore vive. Sono riportati i valori percentuali, la media delle tre repliche e la deviazione standard.

A seguito di questi primi risultati ottenuti, il 5 ottobre 2009 sono state prelevate 2 aliquote delle spore *Normal* conservate a T= -20°C, che sono state conservate per ulteriori 10 giorni a T = -40°C e T = -80°C. Di seguito i risultati di questa ulteriore prova.



	T=-40°C					T=-80°C				
	1	2	3	Media	DevSt	1	2	3	Media	DevSt
N	35,19	47,69	37,35	**40,08**	6,68	30,4	32,64	37,85	**33,63**	3,82

Fig. 4.25 - Grafico della sopravvivenza delle spore conservate per 28 mesi a T = -20°C e tenute per 10 giorni a T = -40°C e T = -80°C e tabella dei risultati. Sono riportati i valori percentuali, la media delle tre repliche e la deviazione standard.

Come risulta evidente dal grafico (Fig. 4.25), le spore conservate a T = -40°C sono sopravvissute con una percentuale del 40% e quelle conservate a T = -80°C con una percentuale di circa il 34%.

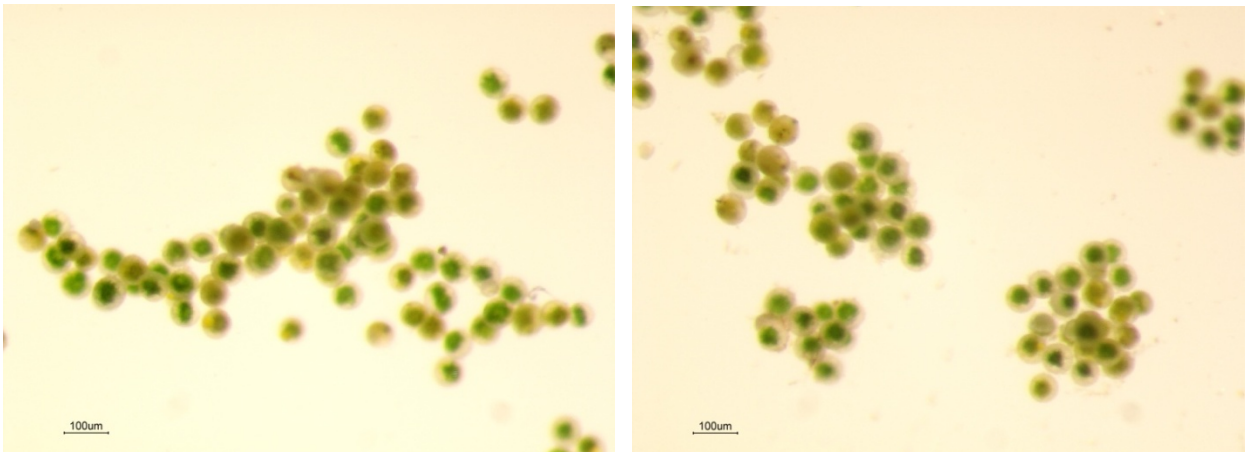


Fig. 4.26 - Spore *Normal* conservate per 28 mesi a T = -20°C e per ulteriori 10 giorni a T = -40°C (a sinistra) e a T = -80°C (a destra) dove è evidente l'alta percentuale di spore verdi.

Prove di germinazione

Dopo averne osservato la percentuale di sopravvivenza, il 2/09/2009 sono iniziate le prove di germinazione su tutte le spore, mentre per le spore *Normal* conservate a T = -40°C e T = -80°C, le prove di germinazione hanno avuto inizio il 14/10/2009.

Come si può osservare dai grafici (Fig. 4.27e Fig. 4.28), sono evidenti due tendenze di sviluppo, con tempi di germinazione molto diversi a seconda della temperatura di conservazione. Le spore conservate a T = +5°C, indipendentemente dalla tipologia di conservazione, hanno mostrato un tempo di germinazione pari a 18-23 giorni dalla semina. Le spore *Normal* conservate a T = -20°C hanno germinato dopo 4 giorni e sia quelle conservate a T = -40°C che a T = -80°C hanno germinato dopo 5 giorni.

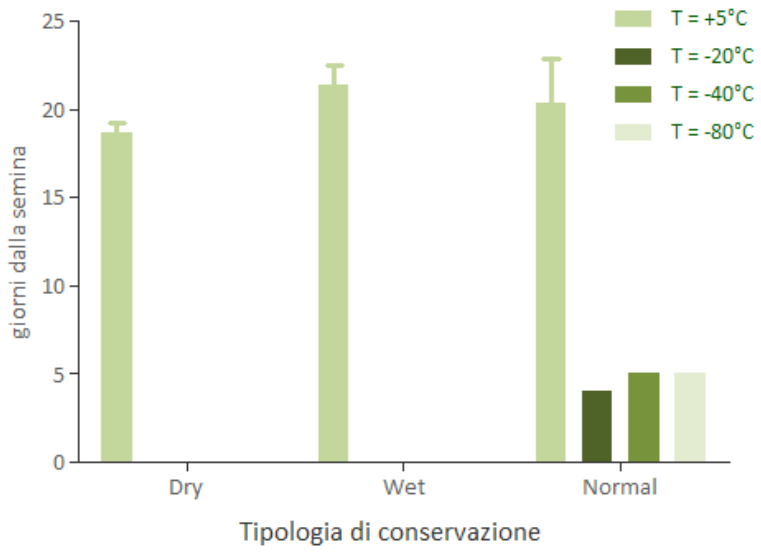


Fig. 4.27 - Il grafico mostra i tempi di germinazione rilevati nelle 3 tipologie di conservazione, *Dry*, *Wet* e *Normal*.

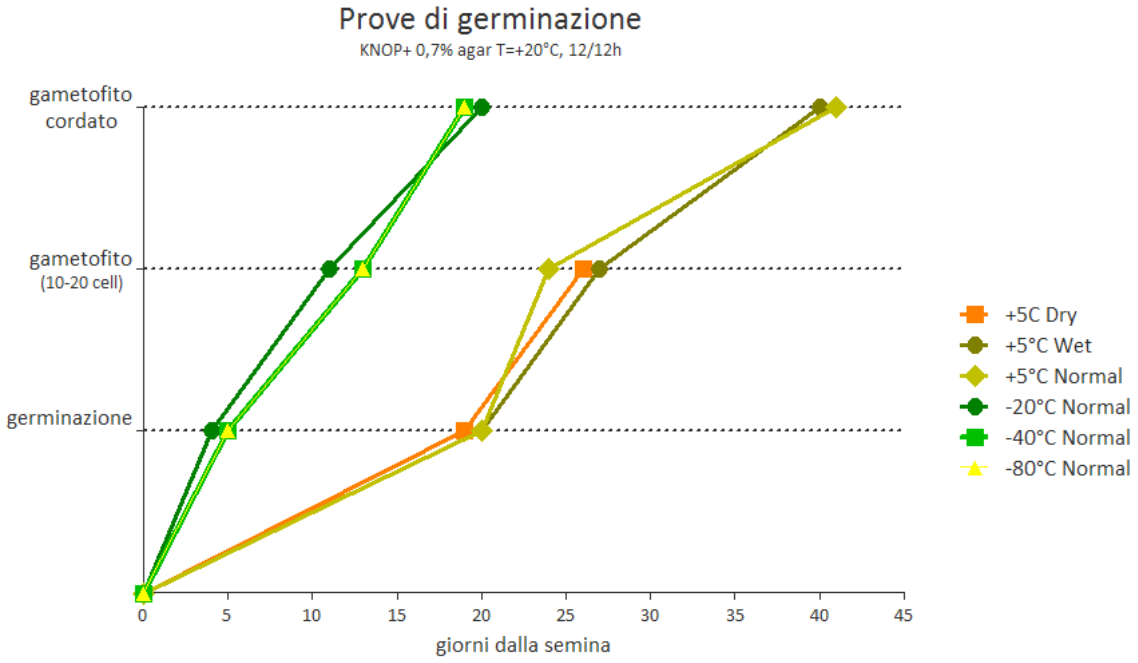


Fig. 4.28 - Il grafico mostra l'andamento delle prove effettuate, dalla germinazione delle spore allo sviluppo dei gametofiti.

Le spore *Normal* conservate alle basse temperature (T ≤ -20°C) hanno mostrato un *trend* di sviluppo molto diverso da quelle conservate a T = +5°C, raggiungendo la fase gametofitica a 10-20 cellule dopo 11-13 giorni e sviluppando i primi gametofiti cordati dopo 19-20 giorni dalla semina. Per le spore conservate a T = +5°C lo sviluppo è molto più lento, con 24-27 giorni dalla semina per la fase gametofitica a 10-20 cellule e 40-41 giorni per lo sviluppo di gametofiti cordati (Fig. 4.27, Fig. 4.28 e Fig. 4.29).

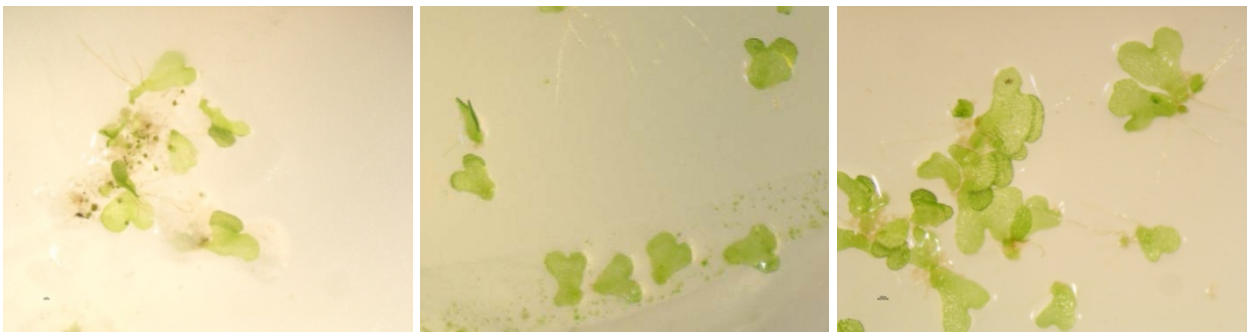


Fig. 4.29 - Le immagini mostrano lo sviluppo dei gametofiti cordati con tempi diversi per le varie tipologie di conservazione. Da sinistra a destra: *Wet* +5°C, dopo 55 giorni dalla semina; *Normal* -20°C dopo 28 giorni dalla semina; *Normal* -40°C dopo 29 giorni dalla semina.

Gemmazione

I gametofiti cresciuti da spore *Wet* +5°C, dopo circa 110 giorni dalla semina, hanno sviluppato alcune strutture sul margine della lamina (Fig. 4.30), identificate poi come gemme. Inizialmente è stata osservata una proliferazione di cellule meristematiche circondate da uno strato di cellule e formanti delle strutture globose, che hanno sviluppato nuovi gametofiti per un fenomeno alternativo al normale ciclo riproduttivo, chiamato gemmazione (Par. 2.4.6.). Dopo circa 2 mesi dall'osservazione delle prime gemme si sono sviluppate decine di nuovi gametofiti su ogni gametofito, che hanno raggiunto la fase cordata (Fig. 4.30).



Fig. 4.30 - Formazione di gemme sul margine dei gametofiti cresciuti da spore *Wet* +5°C, dopo circa 110 giorni dalla semina e loro sviluppo in gametofiti per gemmazione.

4.3. *Dryopteris tyrrhena*

4.3.1. Studio palinologico

Una parte delle spore raccolte sono state utilizzate per effettuare osservazioni micromorfologiche al microscopio elettronico a scansione, per le misurazioni e per realizzare microfotografie (Fig. 4.31). Attraverso l'utilizzo del SEM è stato possibile osservarne la morfologia esterna, apprezzando i dettagli dell'ornamentazione e, quindi, di darne una descrizione dettagliata. Per la terminologia adottata si è fatto riferimento FERRARINI *et al*. (1986), PRADA (1990) e PERONI e PERONI (2004).

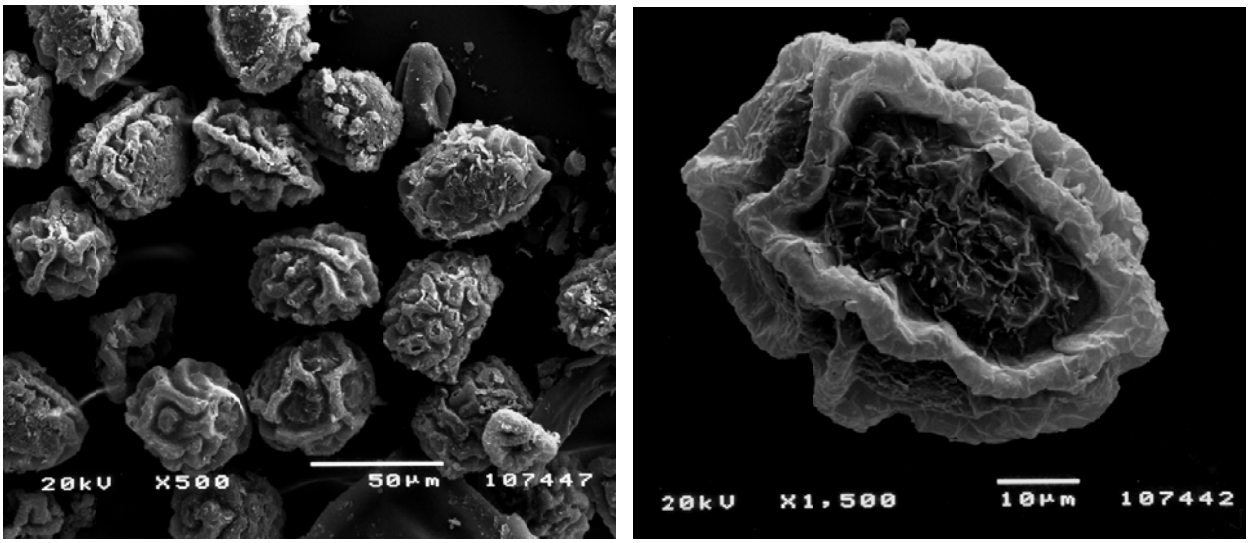


Fig. 4.31 – Spore di *Dryopteris tyrrhena* fotografate al microscopio elettronico a scansione Nel particolare è possibile osservare l'ornamentazione tubercolato-ectovermiculata della perina.

Descrizione: spora monolete, anisopolare (con emisfero prossimale e distale dissimili), bilaterale simmetrica, a profilo ellittico, da piano-convessa a biconvessa. Dimensione: (37-) 40,6 (-45) µm. Perina tubercolato-ectovermiculata, con elementi culturali vermiformi larghi 3-4 µm e alti 3 µm, più o meno allungati e sinuosi. Processi irregolarmente scabrati presenti tra essi. Esina psilata, priva di qualsiasi elemento culturale sopraelevato rispetto alla superficie.

4.3.2. Studio epidermologico

Dall'analisi delle immagini realizzate al microscopio elettronico a scansione, è stato possibile effettuare uno studio epidermologico.

Per quanto riguarda l'indumento, è stata documentata la presenza di varie tipologie di tricomi. In particolare, abbondanti di peli ghiandolari sulla lamina e sulle nervature sia nella pagina adassiale che nella pagina abassiale (Fig. 4.32), dove sono presenti anche peli multicellulari uniseriati su margine e lamina.

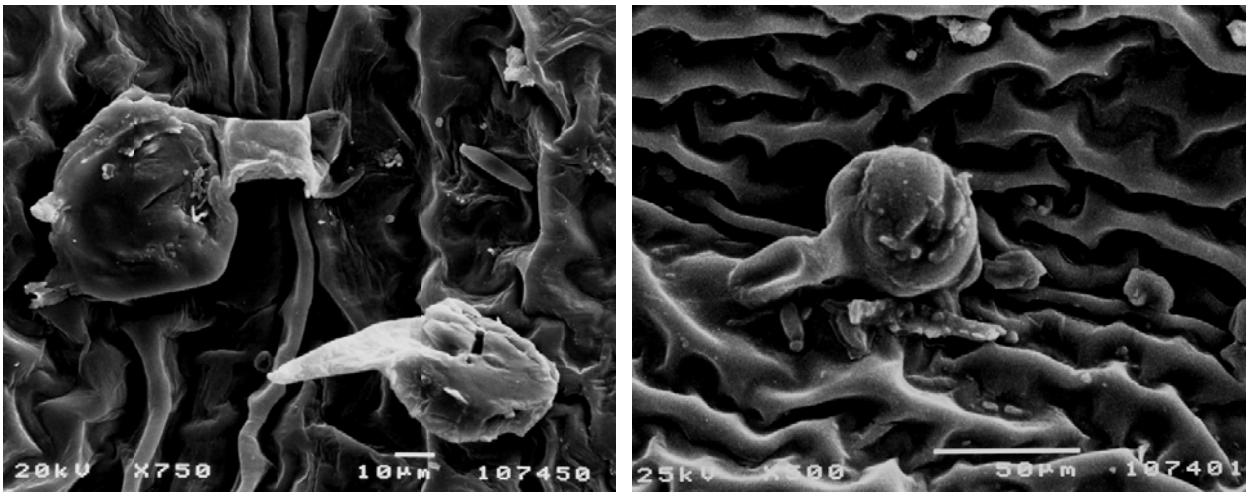


Fig. 4.32 - Fotografie al SEM di peli ghiandolari sulla superficie adassiale (a sinistra) e sulla superficie abassiale (a destra)

Peli ghiandolari	Valori medi (in µm)	Deviazione standard
Lt – lunghezza totale	96,65	2,69
dA – diametro dell'apice	48,15	1,72
dB - diametro della base	17,99	0,98
Ls – lunghezza peduncolo	48,50	1,29
dA/Ls	0,50	
dA/dB	2,58	

Tab. 4.9 - Misure dei peli ghiandolari secondo la tipificazione di VIANE (1990).

Le misure effettuate sui peli ghiandolari (Tab. 4.9) concordano abbastanza con i dati presenti in letteratura (VIANE, 1990; Par. 3.3.4.) per *Dryopteris tyrrhena*, che ha i valori maggiori rispetto alle altre specie. Possiamo evidenziare però alcune differenze: il diametro delle ghiandole pari a circa 48 µm risulta maggiore rispetto a quanto riportato da VIANE (1990), cioè 40±4 µm, così come il rapporto fra il diametro delle ghiandole e la lunghezza del peduncolo.

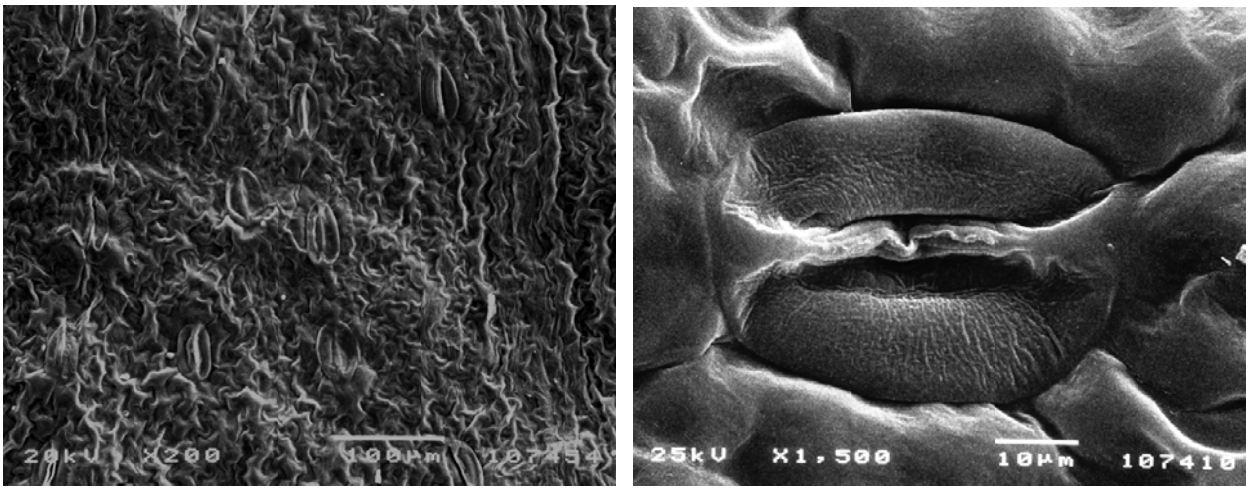


Fig. 4.33 - Fotografie al SEM della superficie adassiale della lamina dove sono evidenti gli stomi.

Dallo studio della pagina adassiale risultano:

- Cellule sinuose di: (100-) 130 (-162,5) µm;
- Densità stomatica: 56-79 stomi/mm^2;
- Stomi: (50-) 51,8 (-56,3) x (26,7-) 31,2 (-33,3) µm

La larghezza media degli stomi (Fig. 4.33) risulta di 51,8 µm, in accordo con VIANE (1990), mentre le dimensioni misurate nel presente lavoro risultano maggiori dei valori riportati in PERONI e PERONI (2004): (36-) 44,64 (-54) x (21-) 28,62 (-33) µm.

4.3.3. Riproduzione *in vitro* da spore fresche

I risultati mostrano una notevole differenza nei tempi e nelle percentuali di germinazione tra le 2 popolazioni da cui sono state raccolte le spore (Fig. 4.34) (MAGRINI, SCOPPOLA, 2008; 2009; 2010a).

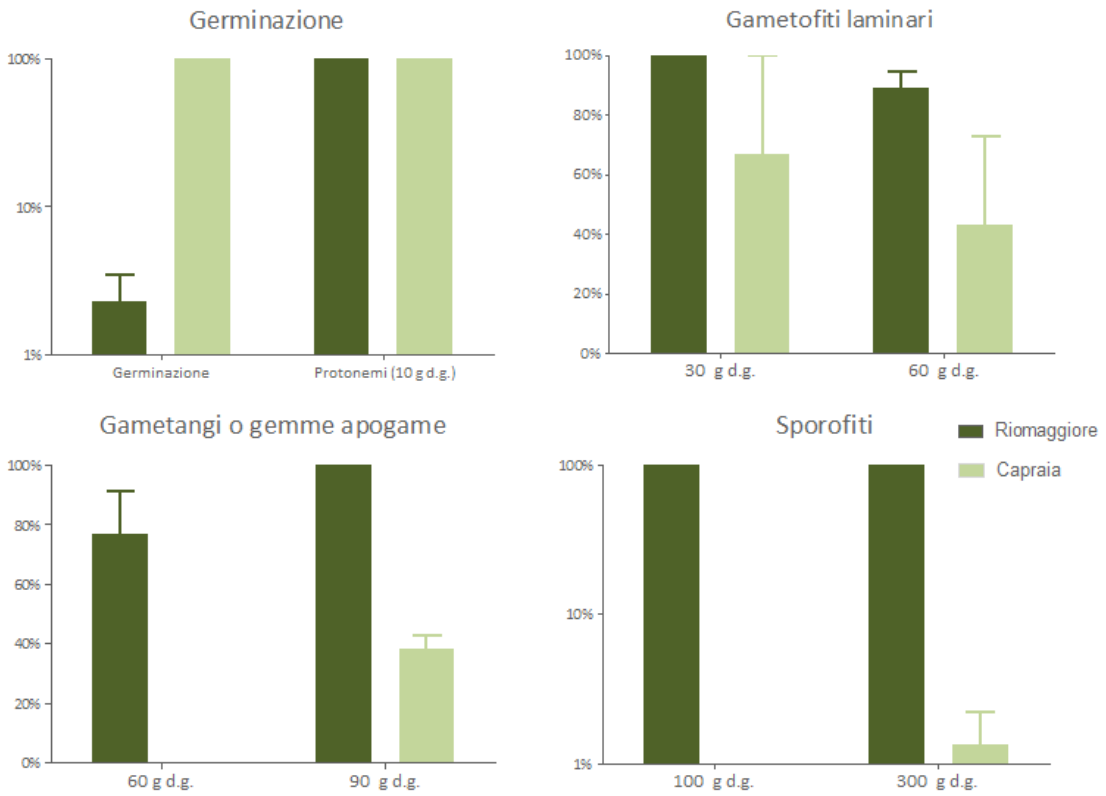


Fig. 4.34- Nei grafici sono riportati i risultati delle prove di germinazione e delle successive fasi della riproduzione *in vitro* di *Dryopteris tyrrhena*. Le percentuali si riferiscono alla precedente fase di sviluppo.

Le spore dell'accessione P 44 07 raccolte dalla popolazione di Riomaggiore hanno mostrato una percentuale di germinazione molto bassa, pari al 2,3% dopo 36 giorni dalla semina, mentre tutte le spore dell'accessione P 67 08 raccolte dalla popolazione di Capraia hanno germinato dopo 7-10 giorni. Tutti i gametofiti (sia provenienti da Riomaggiore che da Capraia) erano filamentosi nella fase iniziale, ma sono state osservate significative differenze nel passaggio verso la fase laminare-cordata (Fig. 4.34).

Nelle colture di spore provenienti da Capraia è stata osservata una crescita prevalentemente filamentosa per quasi 3 mesi e meno del 40 % dei protalli ha raggiunto la fase cordata (Fig. 4.37), dopo oltre 90 giorni dalla germinazione. Dopo circa 140 giorni hanno iniziato a svilupparsi gametangi nel 30% dei gametofiti (Fig. 4.35) ed il primo sporofito è stato osservato dopo 162 giorni dalla germinazione (Fig. 4.36 e Fig. 4.37).

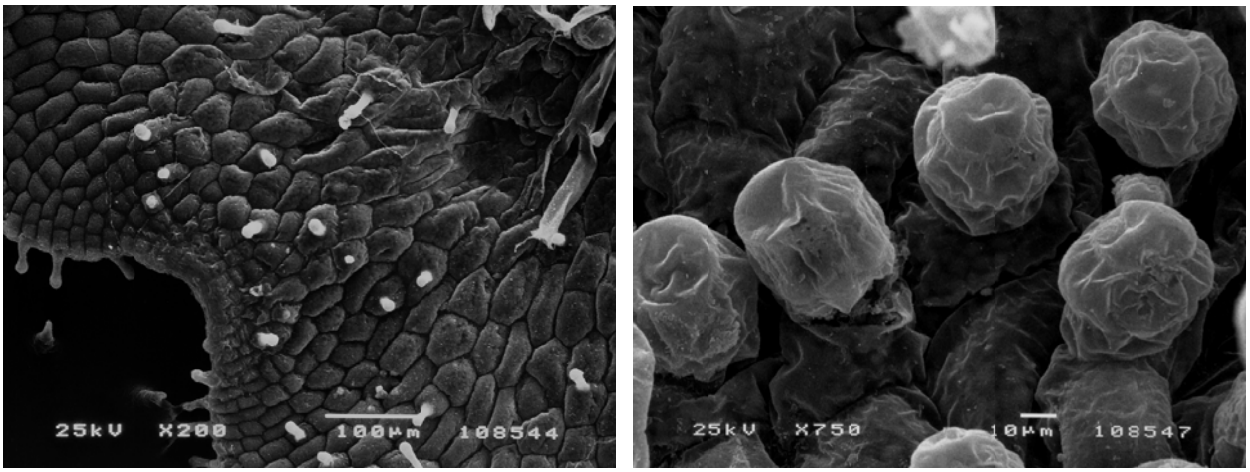


Fig. 4.35 - Fotografie al SEM di gametofiti di *Dryopteris tyrrhena* prodotti dalla coltura di spore provenienti dalla popolazione di Capraia. A sinistra, particolare del gametofito dove sono visibili gli archegoni vicino all'insenatura; a destra, ingrandimento degli anteridi.

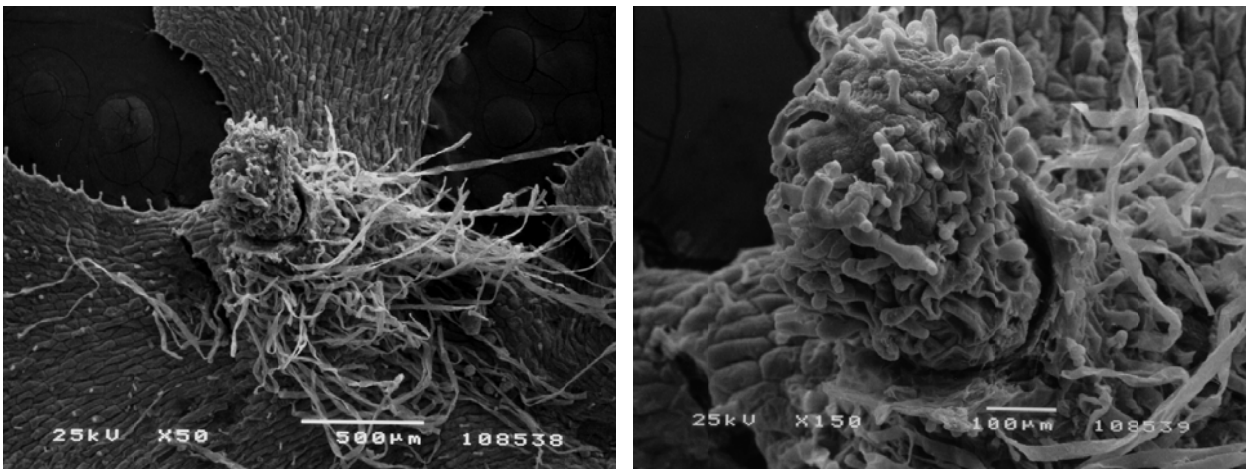


Fig. 4.36 - Fotografie al SEM di gametofiti di *Dryopteris tyrrhena* prodotti dalla coltura di spore provenienti dalla popolazione di Capraia. A sinistra, emergenza dello sporofito dall'archegonio; a destra, particolare dello sporofito.

Dopo 300 giorni, in DTC solo l'1,3% dei gametofiti maturi ha prodotto sporofiti, con un numero che risulta estremamente basso, pari a 4. È stata registrata una crescita estremamente lenta, infatti dopo un anno dalla germinazione, gli sporofiti sono meno di 10, formati da poche fronde composte, lunghe 2-4 cm e non è ancora indipendenti dai gametofiti, non avendo sviluppato radici (Fig. 4.37).

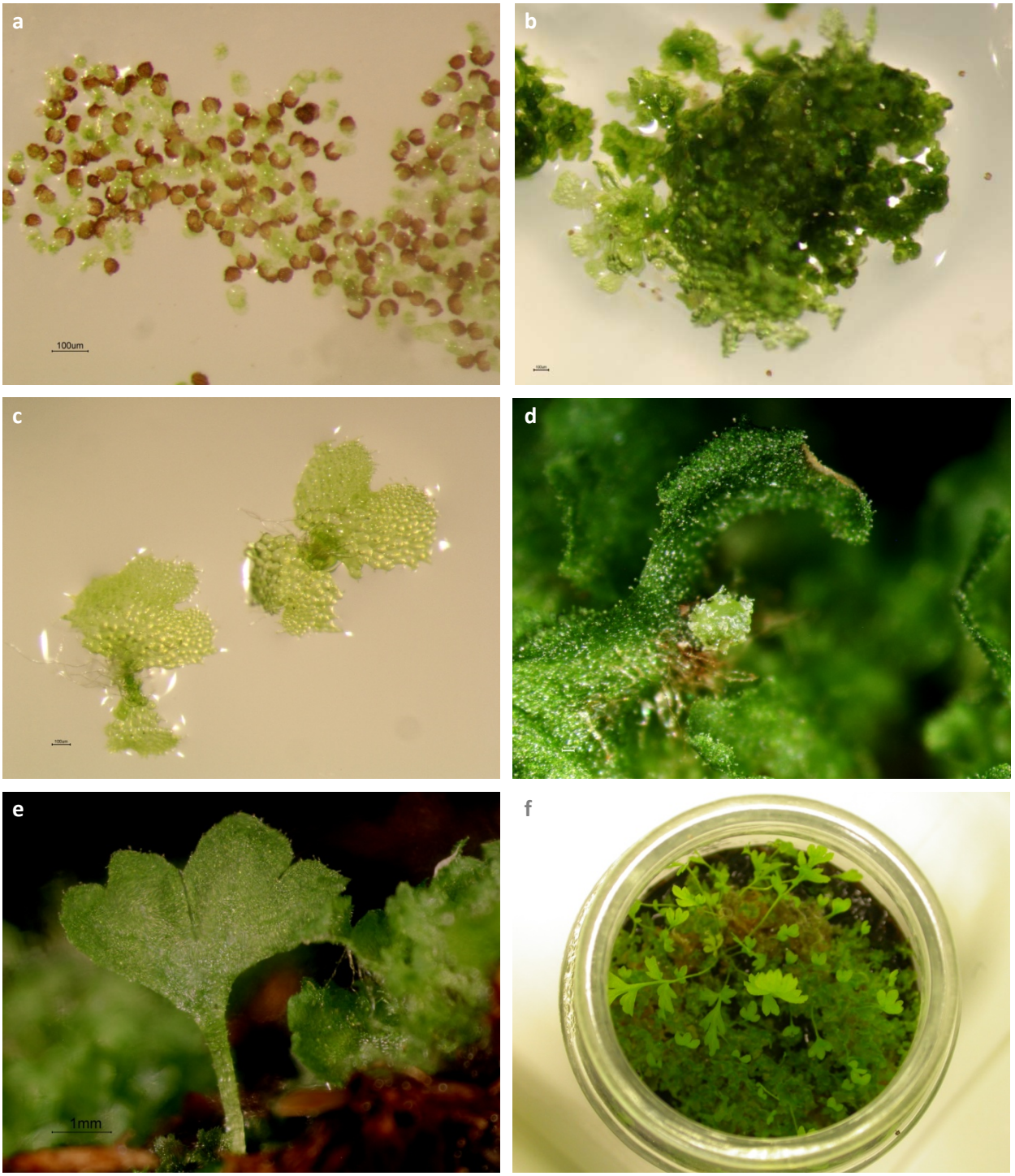


Fig. 4.37 - Fasi della riproduzione in vitro di *D. tyrrhena* da spore provenienti dalla popolazione di Capraia: a) germinazione delle spore dopo 7 giorni dalla semina; b) ammassi di gametofiti filamentosi e inizio dello sviluppo di protalli laminari; c) gametofito cordato dopo 90 giorni dalla germinazione; d) emergenza del primo sporofito sessuale dall'archegonio; e) primo sporofito sessuale con fronda semplice dopo 162 giorni d.g.; f) sporofiti non ancora emancipati dai gametofiti dopo circa un anno d.g.

Nelle colture di spore provenienti da Riomaggiore è stato osservato il normale *trend* di sviluppo del gametofito (RAGHAVAN, 1989), infatti, la prima divisione obliqua della cellula terminale del filamento germinale è iniziata dopo la quarta divisione longitudinale. Dopo 15 giorni dalla germinazione sono stati osservati gametofiti laminari (circa il 100%) e dopo circa 50 giorni d.g. si sono sviluppati gametofiti cordati (Fig. 4.40). Contemporaneamente, invece dello sviluppo dei gametangi, è stata osservata la crescita di una gemma apogama su ogni gametofito, portando allo sviluppo di sporofiti apogami, sempre in assenza di gametangi, dopo 74 giorni dalla germinazione (Fig. 4.38 e Fig. 4.40). Gli sporofiti apogami si sono emancipati dal gametofito molto velocemente, hanno sviluppato un apparato radicale e sono cresciuti producendo molte fronde tipicamente pennate e con vernazione circinnata, che hanno raggiunto in pochi giorni (circa 100 giorni dalla germinazione) una dimensione di 10-12 cm (Fig. 4.40).

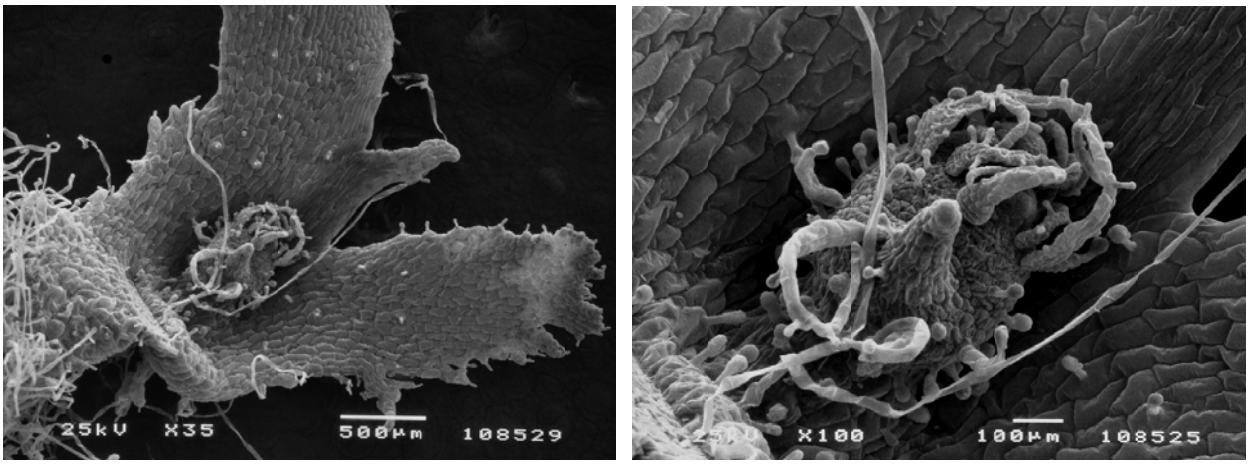


Fig. 4.38 - Fotografie al SEM di gametofiti di *Dryopteris tyrrhena* prodotti dalla coltura di spore provenienti dalla popolazione di Riomaggiore: a) gametofito dove si può notare l'assenza di anteridi e archegoni, con gemma apogama sviluppatasi nella zona meristematica apicale; b) particolare dello sporofito apogamo.

Gli sporofiti apogami hanno mostrato una caratteristica non nota in letteratura: l'assenza di geotropismo. Le fronde, infatti, continuano a crescere nella stessa direzione con cui si sviluppano dalla gemma apogama, spesso sviluppandosi verso il basso all'interno del terreno agarizzato (Fig. 4.39).

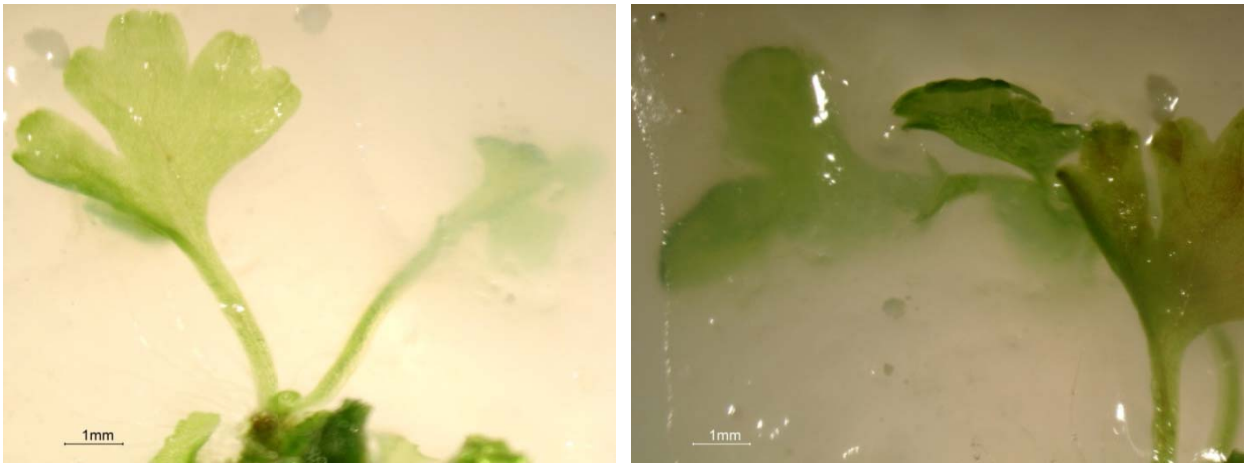


Fig. 4.39 - Sviluppo anomalo di fronde apogame con crescita verso il basso, all'interno del terreno agarizzato.

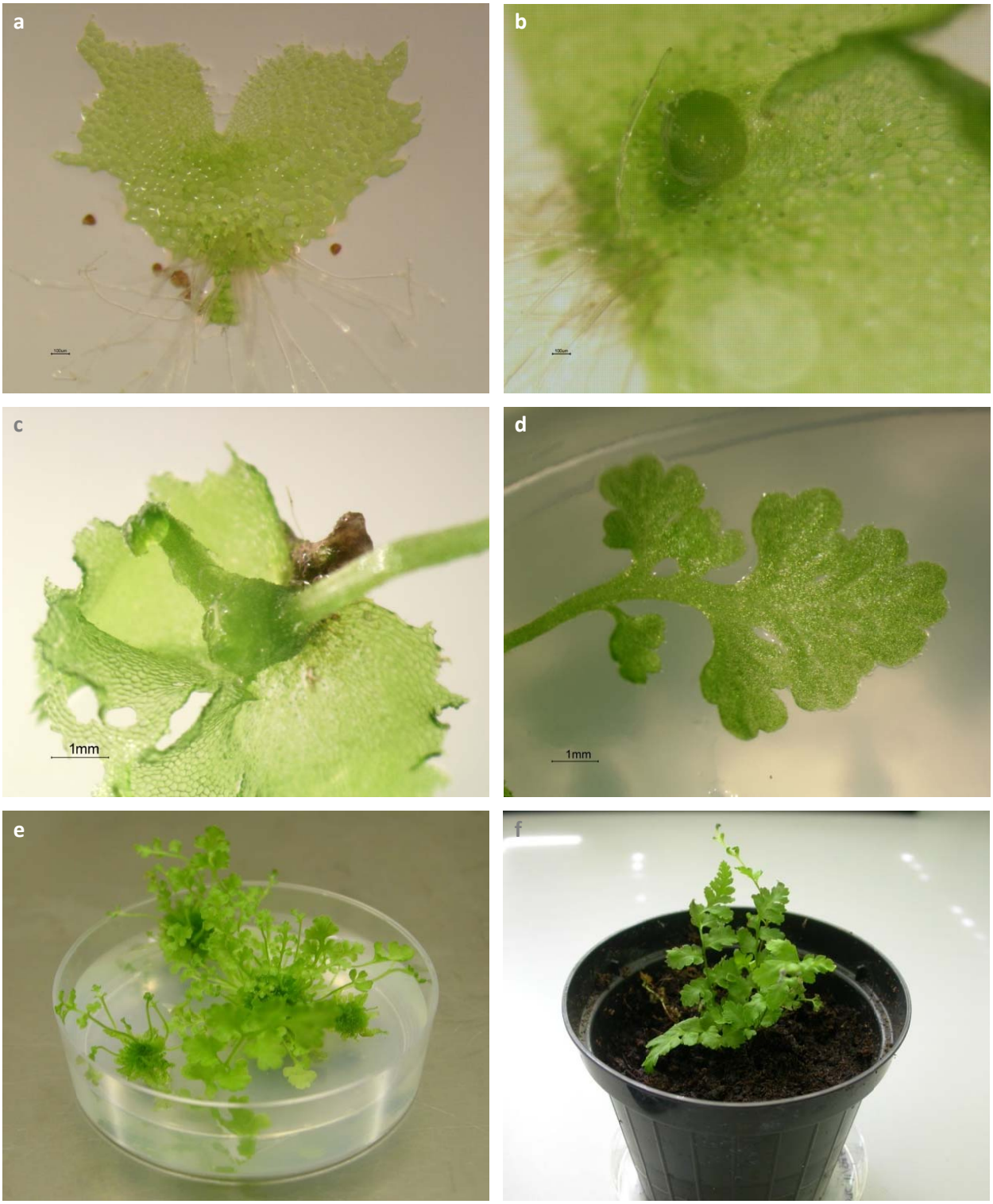


Fig. 4.40 - Fasi della riproduzione in vitro di *Dryopteris tyrrhena* da spore provenienti dalla popolazione di Riomaggiore: a) gametofito laminare dopo 15 giorni dalla germinazione; b) gametofito cordato con gemma apogama dopo 53 giorni d.g.; c) prime 2 fronde dello sporofito apogamo; d) fronda tipicamente pinnata; e) giovani sporofiti apogami prima del trasferimento in terriccio sterile dopo circa 80 giorni d.g.; f) sporofito apogamo coltivato in vaso dopo circa 100 giorni d.g.

4.3.4. Definizione della tipologia di apogamia e prove di induzione

Dall'analisi delle condizioni colturali che hanno portato alla riproduzione apogama (Par. 4.3.3.) è stato possibile escludere i principali fattori noti di induzione: c'è sempre stata disponibilità di acqua; è stato utilizzato un terreno minerale (MS) dove non sono presenti né sono stati aggiunti saccarosio o ormoni; i gametofiti hanno avuto una crescita regolare sviluppandosi in posizione completamente orizzontale e non sono stati esposti ad un'eccessiva intensità luminosa. Rimane, però, non verificabile a posteriori la possibile responsabilità della produzione di etilene nelle colture *in vitro*.

Verifica della tipologia di apogamia

La prova allestita per la definizione della tipologia di riproduzione apogama (come descritto nel Par. 3.5.7.) utilizzando spore non sterilizzate superficialmente, ha dato gli stessi risultati nei due terreni di coltura utilizzati. Le spore hanno germinato con basse percentuali, intorno al 4%, entro 7-9 giorni dalla semina, mostrando crescita filamentosa solo per pochi giorni e sviluppando gametofiti cordati dopo circa un mese. Su entrambi i substrati, i gametofiti hanno sviluppato gametangi dopo circa 3 mesi dalla germinazione (Tab. 4.10 e Fig. 4.41), senza alcuna produzione di gemme apogame.

Terreno	Sterilizz.	Germinazione	Gametofito laminare	Gametofito cordato	Gametofito maturo
		gg dalla semina	gg dalla germinaz.	gg dalla germinaz.	gg dalla germinaz.
MS	n.st.	8,6±2,1	10,2±2,0	30,5±2,5	87,2±2,3
DYER	n.st.	7,1±2,3	9,1±2,1	26,1±2,8	80,6±3,0

Tab. 4.10 - Risultati della prova effettuata sulle spore provenienti da Riomaggiore per definire la tipologia di apogamia. Le colture sono state incubate a T = +20°C.

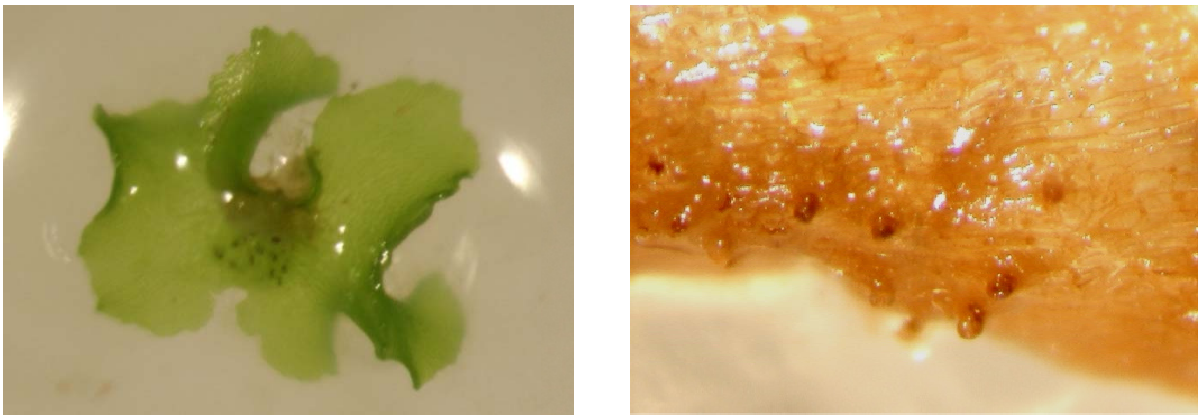


Fig. 4.41 - Particolare delle strutture riproduttive in DTR coltivata su DYER (a sinistra) e su MS (a destra).

Prove di induzione dell'apogamia

Si elencano di seguito i risultati delle prove di induzione dell'apogamia (Tab. 4.11) effettuate sulle spore della popolazione di Capraia. Le prove sono state allestite combinando vari fattori di induzione (Par. 3.5.7.) e incubate a due temperature, T = +20°C e T = +24°C. Non è stato possibile completare la prova

mantenuta a T = +24°C, né ripeterla, a causa della rottura del frigotermostato in cui erano incubate le colture, che ha provocato un forte innalzamento della temperatura per 2 giorni e la morte di tutti i gametofiti in coltura. Nella tabella (Tab. 4.11), quindi, i dati sono parziali, riferiti, per tali colture, ai primi 90 giorni dalla semina. Si riporta di seguito il dettaglio dei risultati per i vari fattori di induzione considerati.

Fattori			Germinazione	Gametofito laminare	Gametofito cordato	Gametofito maturo
T (°C)	Sacc.	Sterilizz.	gg dalla semina	gg dalla germinaz.	gg dalla germinaz.	gg dalla germinaz.
+20	-	n.st.	15,7±3,5	30,7±2,1	-	-
+20	-	st.	9,1±2,6	44,0±1,0	92,1±5,3	141,5±8,4
+20	2%	n.st.	INQ.	-	-	-
+20	2%	st.	12,3±0,6	INQ.	-	-
+20	3%	n.st.	INQ.	-	-	-
+20	3%	st.	12,7±0,4	-	-	Tutti filamentosi
+24	-	n.st.	13,0±13,9	22,5±9,2	33,0±5,7	74,1±5,6
+24	-	st.	8,3±0,6	16,3±1,5	29,3±0,6	-
+24	2%	n.st.	INQ.	-	-	-
+24	2%	st.	8,3±0,5	-	-	Tutti filamentosi
+24	3%	n.st.	INQ.	-	-	-
+24	3%	st.	7,7±0,6	-	-	Tutti filamentosi

Tab. 4.11 - Risultati ottenuti dalla prova di induzione. Vengono riportati i valori medi più la deviazione standard.

Saccarosio

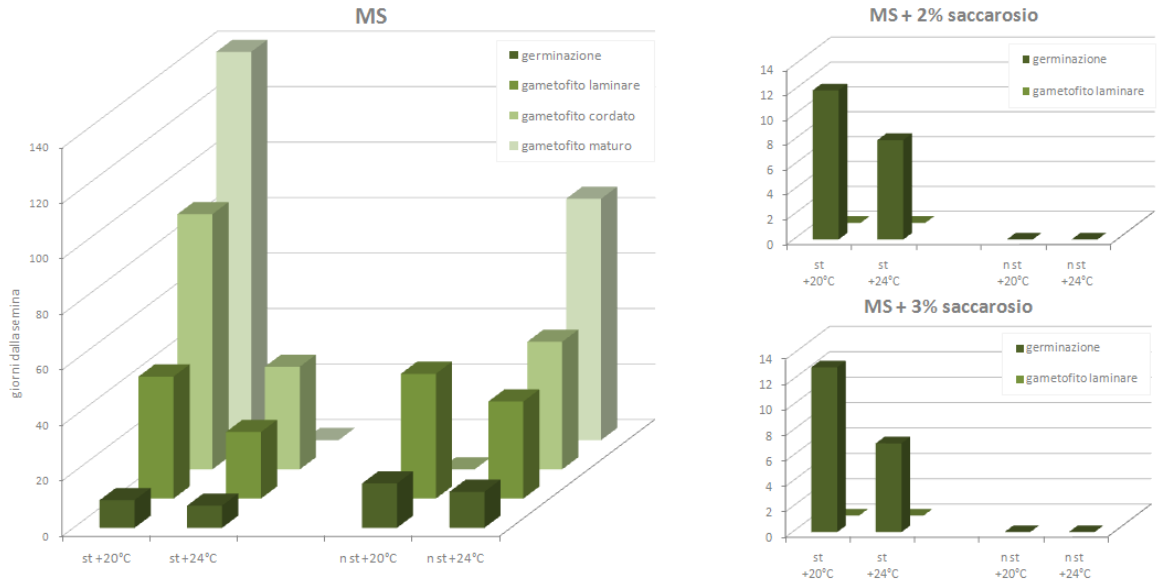


Fig. 4.42 - Nei tre grafici vengono confrontati i risultati della prova, evidenziando le differenze dovute alla percentuale di saccarosio aggiunta al terreno di coltura MS.

Le colture su substrati con aggiunta di saccarosio hanno mostrato risultati molto diversi rispetto al controllo (MS), dove tutte le spore sono germinate in 8-15 giorni dalla semina e hanno sviluppato gametofiti laminari, anche se con tempi diversi, da 16 a 44 giorni dalla germinazione (Tab. 4.11). Invece, fra le spore coltivate su terreni arricchiti con il 2-3% di saccarosio, solo quelle che hanno subito una

sterilizzazione superficiale sono germinate (entro 7-13 giorni dalla semina), mentre in tutte le altre colture si sono sviluppati da subito forti inquinamenti da funghi e lieviti, che hanno inficiato la prova (Fig. 4.42). Inoltre, in nessuna si sono sviluppati gametofiti laminari, ma il protonema iniziale ha continuato a crescere in modo filamentoso (Tab. 4.11 e Fig. 4.43).

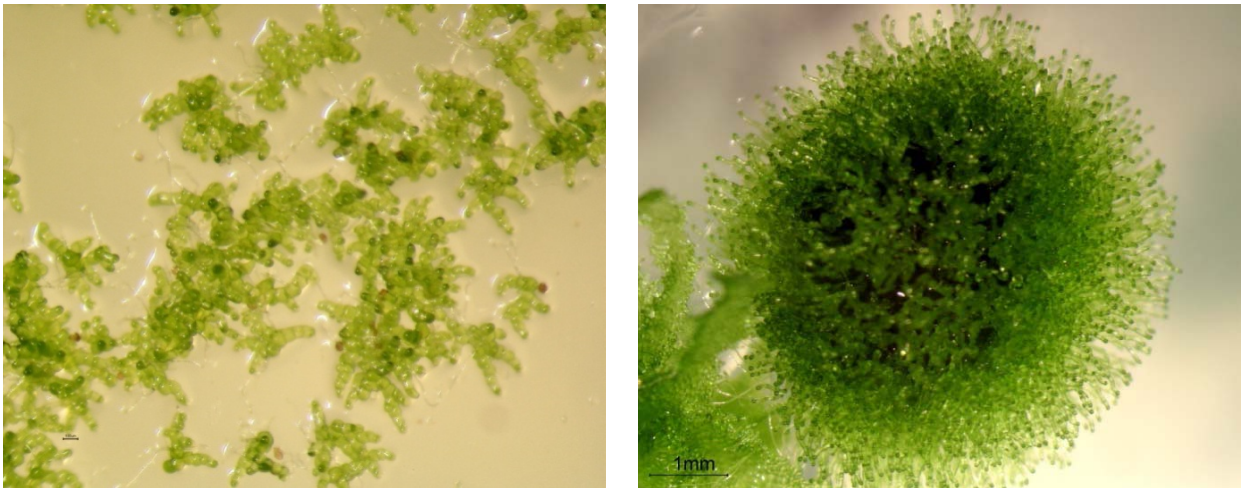


Fig. 4.43 - Problemi nello sviluppo dei gametofiti. Le 2 foto, scattate a colture di spore sterili su MS con diverse percentuali di saccarosio e incubate a T = +24°C, mostrano uno sviluppo totalmente filamentoso. A sinistra, 2% di saccarosio dopo 1 mese dalla semina e a destra, 3% di saccarosio dopo 3 mesi dalla semina.

Temperatura

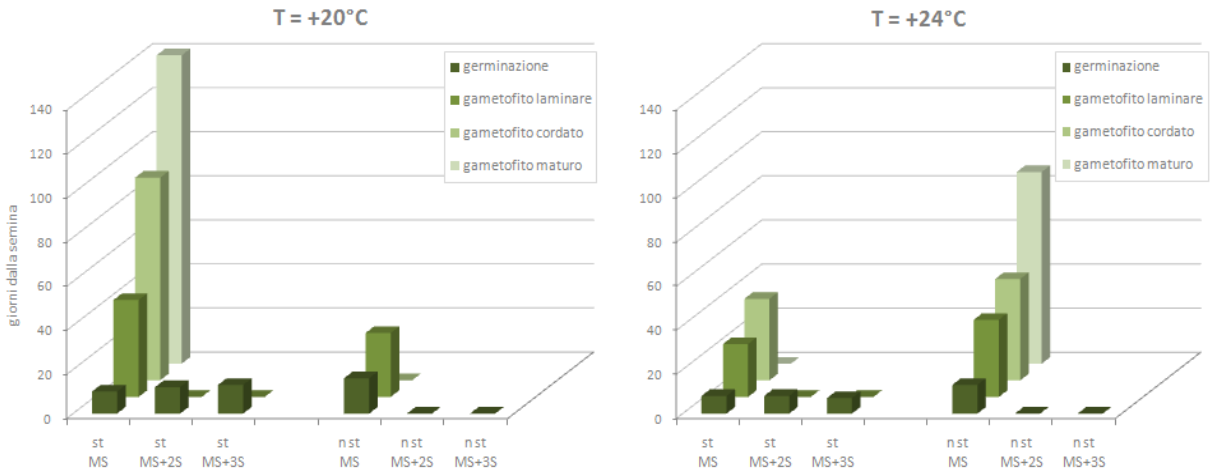


Fig. 4.44 - Nei due grafici vengono confrontati i risultati della prova, evidenziando le differenze dovute alle due temperature di incubazione.

I risultati delle prove incubate alle due temperature indicano tempi di germinazione minori per T = +24°C, mediamente 5-8 giorni dalla semina, contro gli 8-19 delle spore incubate a T = +20°C. Inoltre, mentre le colture a T = +20°C sono rimaste bloccate nella fase laminare, quelle a T = +24°C hanno sviluppato gametofiti cordati (in MS sterili e non) e gametofiti maturi (in MS non sterili) dopo meno di 90 giorni dalla semina (Fig. 4.44).

Sterilizzazione superficiale

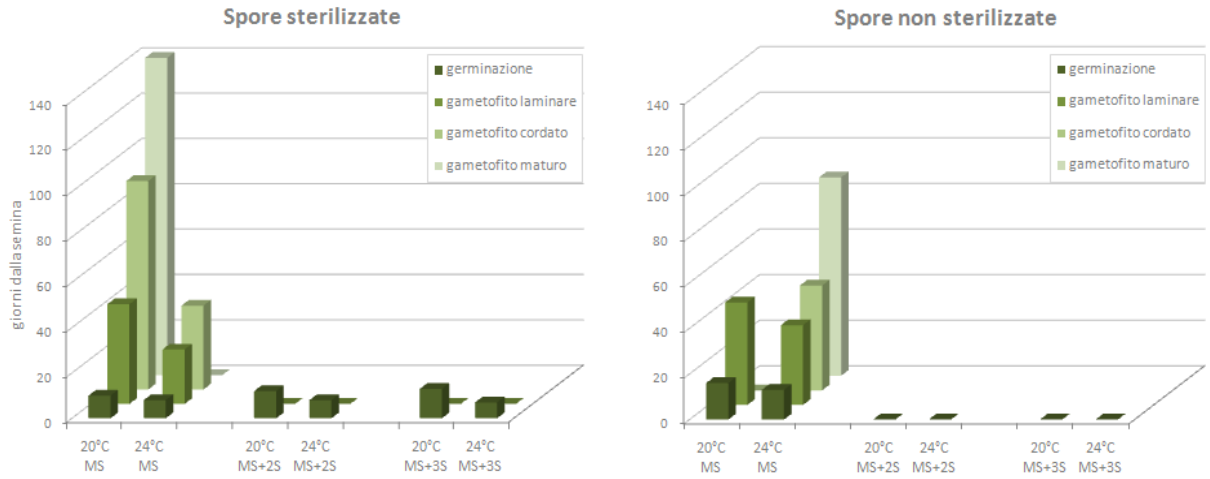


Fig. 4.45 - Nei due grafici vengono confrontati i risultati della prova, evidenziando le differenze dovute alla sterilizzazione superficiale delle spore.

I risultati delle prove mostrano germinazione in tutte le spore sterilizzate superficialmente, secondo tempi minori rispetto a quelle non sterili, che inoltre non hanno germinato nelle colture addizionate con saccarosio, come già detto, a causa degli inquinanti sviluppatisi. Tutte le spore seminate su MS senza saccarosio hanno prodotto gametofiti laminari, ma è stato osservato uno sviluppo normale dei gametofiti cordati solo nelle colture di spore non sterilizzate, mentre nelle colture di spore sterili (Fig. 4.45) è stata osservata una percentuale di gametofiti cordati estremamente bassa con la maggior parte dei protalli che mostra una morfologia aberrante, filamentosa o nastriforme (Fig. 4.43 e Fig. 4.46).

Solo nelle colture di spore non sterilizzate su MS a +24°C i gametofiti cordati hanno prodotto gametangi entro circa 74 giorni, mentre per le spore sterili su MS a +20°C, la prima osservazione delle strutture riproduttive è stata dopo 140 giorni dalla germinazione.

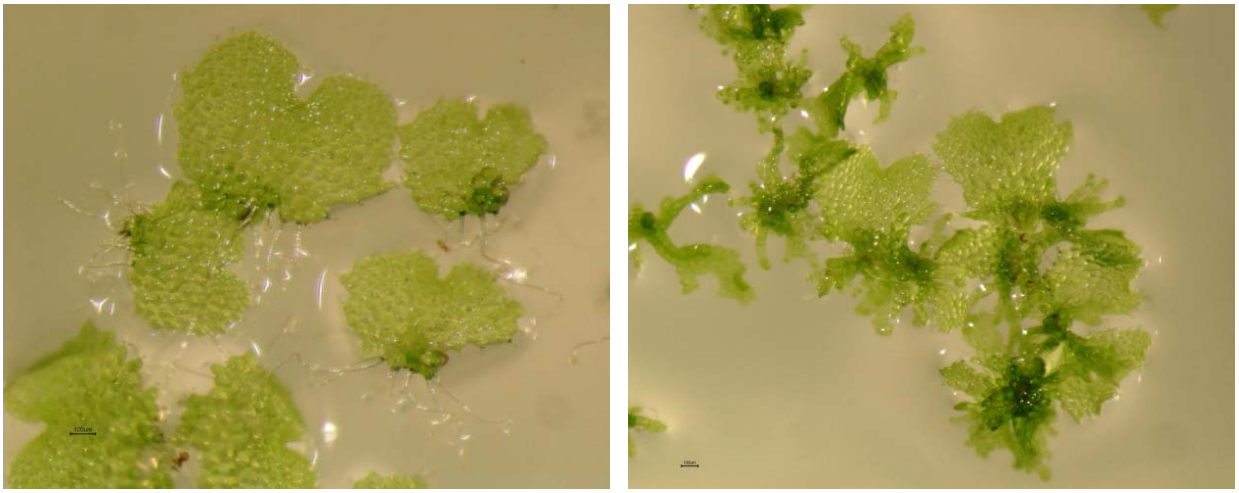


Fig. 4.46 - Differenze nello sviluppo dei gametofiti. Le 2 foto, scattate a colture su MS incubate a T = +24°C, dopo 1 mese dalla semina, mostrano gametofiti cordati con sviluppo normale nelle colture di spore non sterilizzate (a sinistra), mentre nelle colture di spore sterilizzate (a destra) la percentuale di gametofiti cordati è molto minore e sono presenti protalli laminari dalla morfologia aberrante.

Le prove non hanno dato risultati positivi, non essendosi sviluppata nessuna gemma apogama, ma hanno fornito dati utili per definire meglio le preferenze colturali di *Dryopteris tyrrhena*.

4.3.5. Riproduzione *in vitro* da *exsiccata*

La semina delle spore di *Dryopteris tyrrhena* raccolte da 10 saggi d'erbario come descritto nella Tab. 3.6, ha dato i seguenti risultati.

Le spore raccolte in FI da saggi provenienti dall'Isola di Montecristo, dall'Isola d'Elba e dalla Corsica, non hanno mostrato alcuna germinazione.

Tutte le spore raccolte in SIENA dai 4 saggi provenienti dalle Cinque Terre, n° 1097 e n° 1098 del 1978, n° 1100 del 1981 e n° 2752 del 1998, sono germinate con percentuali comprese fra lo 0,4 e il 18,3%, anche se non tutte stanno completando il loro ciclo riproduttivo (Fig. 4.47; Tab. 4.12). In particolare, le spore di SIENA 1098 hanno mostrato la minor percentuale di germinazione e i gametofiti sono degenerati dopo circa 1 mese dalla semina senza raggiungere la fase cordata. Nelle altre prove, il 90-100% delle spore germinate ha sviluppato gametofiti cordati, che hanno raggiunto la maturità sessuale nel 40-83%. A 160 giorni dalla semina, solo in SIENA 1100 sono stati ottenuti i primi sporofiti (Fig. 4.48): la percentuale, registrata dopo solo 3 giorni dall'emergenza dalla prima foglia, è molto bassa, pari all'1,5% rispetto alle spore germinate e al 2,4% dei gametofiti maturi, ma la prova è tuttora in corso. Nella tabella (Tab. 4.12) per alcune fasi sono riportati valori molto alti di deviazione standard, causati dall'assenza totale di germinazione o di sviluppo in una o più repliche.

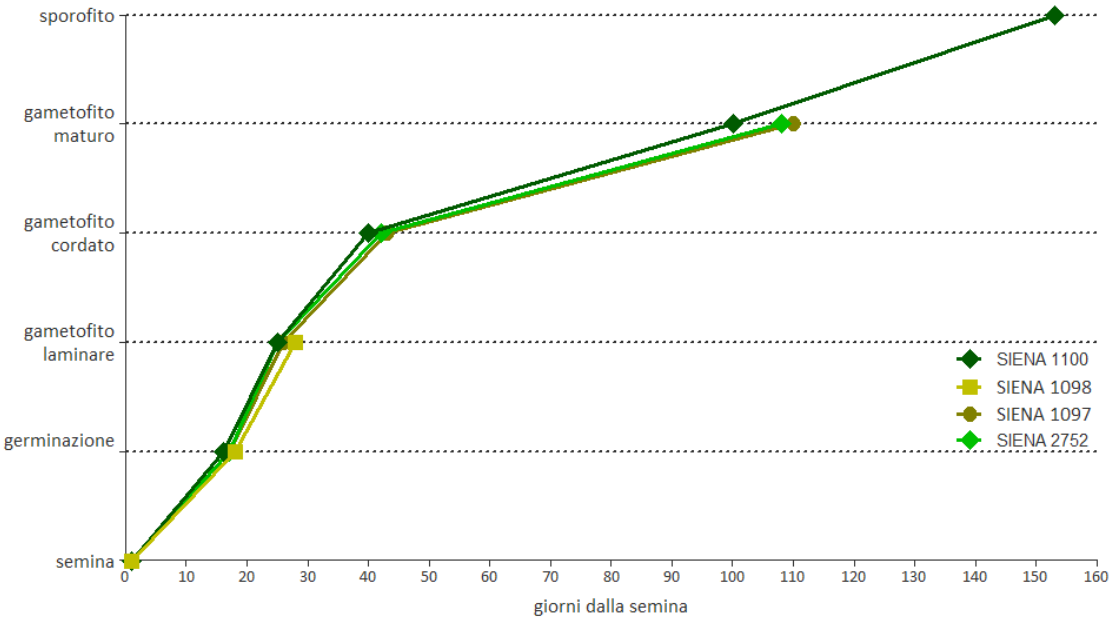


Fig. 4.47 - Riproduzione *in vitro* da spore di *exsiccata* provenienti dalle Cinque Terre. Nel grafico è messo a confronto l'andamento medio del ciclo riproduttivo per i 4 saggi da cui sono state raccolte le spore.

Germinazione		Gametofito laminare		Gametofito cordato		Gametofito maturo		Primo sporofito	
gg dalla semina	%	gg dalla germinaz.	%	gg dalla germinaz.	%	gg dalla germinaz.	%	gg dalla germinaz.	%
SIENA 1097					91,7±11,8%		33,3±47,1%		-
17,1±1,0	2,9±4,4%	9,2±2,1	95,8±5,9%	26,3±2,2	95,4±6,4%	93,1±2,5	40,0±56,6%	-	-
SIENA 1098 18,2±1,1	0,4±0,2%	10,3±1,5	100%	-	-	-	-	-	-
SIENA 1100					90,3±1,9%		70,7±7,0%		1,5±2,6%
16,1±1,1	18,3±3,7%	9,0±1,3	96,4±1,8%	24,2±2,1	93,7±3,8%	84,3±3,1	78,3±7,6%	140,1±10,5	2,4±4,1%
SIENA 2752					100%		83,3±23,6%		-
17,0±1,3	0,6±0,5%	8,1±2,1	100%	25,1±3,2	100%	91,1±3,0	83,3±23,6%	-	-

Tab. 4.12 - Tempi di germinazione e dello sviluppo di gametofito e sporofito da spore prelevate da *exsiccata* di SIENA (si riportano i valori medi con la deviazione standard). Nelle ultime 3 fasi sono riportati due valori percentuali: il primo è la percentuale rispetto alla quantità di spore germinate; il secondo rispetto alla fase precedente.

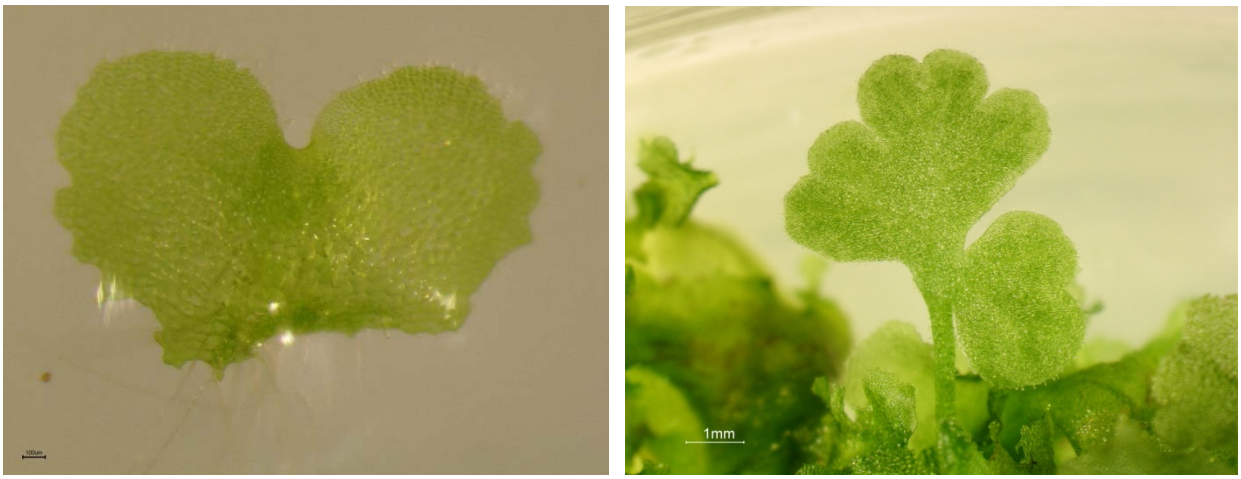


Fig. 4.48 - Fasi della riproduzione di *D. tyrrhena* da spore del saggio SIENA 1100 del 1981, proveniente dalle Cinque Terre, fra Campiglia e Schiara. a) Gametofito cordato dove sono visibili le numerose ghiandole sul margine; b) emergenza del primo sporofito.

Fra le spore della Sierra Nevada raccolte in VAL solo quelle prelevate dal saggio n° 83412 del 1988, sono germinate e stanno completando il loro ciclo riproduttivo, mentre quelle prelevate dagli altri saggi non hanno dato risultati.

Temperatura	Germinazione		Gametofito laminare		Gametofito cordato		Gametofito maturo	
	gg dalla semina	%	gg dalla germinaz.	%	gg dalla germinaz.	%	gg dalla germinaz.	%
T = +15°C	23,3±3,1	5,1±3,2%	12,3±2,1	83,9±21,1%	28,3±1,5	57,2±49,6%	91,7±1,5	60,6±2,6%
						59,7±51,7%		70,8±5,9%
T = +20°C	11,0±1,7	11,3±6,8%	11,0±1,0	94,6±7,8%	27,7±1,1	84,4±11,2%	89,3±1,5	68,5±9,9%
						88,9±4,9%		81,1±1,9%

Tab. 4.13 - Tempi di germinazione e dello sviluppo di gametofito e sporofito da spore prelevate dal saggio VAL 83412 (si riportano i valori medi con la deviazione standard). Nelle ultime 2 fasi sono riportati due valori percentuali: il primo è la percentuale rispetto alla quantità di spore germinate; il secondo rispetto alla fase precedente.

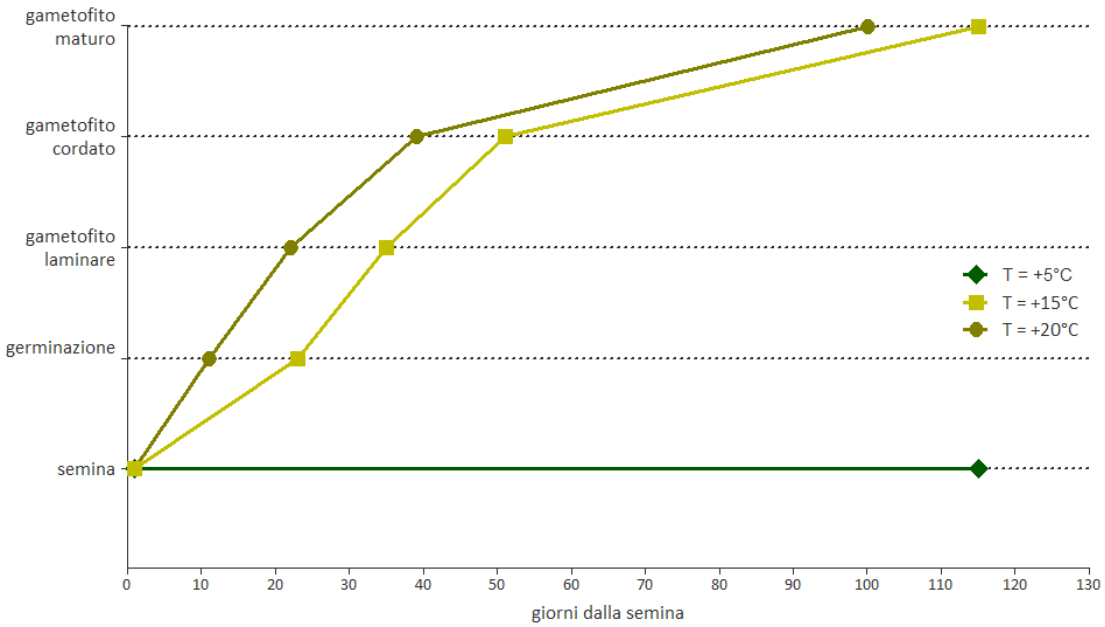


Fig. 4.49 - Riproduzione *in vitro* da spore di *exsiccata* provenienti dalla Sierra Nevada. Nel grafico è messo a confronto l'andamento del ciclo riproduttivo per le 3 temperature di incubazione utilizzate.

Le prove effettuate a diverse temperature per testarne le preferenze termiche hanno dato i seguenti risultati (Tab. 4.13; Fig. 4.49): nessuna germinazione per le spore incubate a T = +5°C; germinazione e successive fasi di sviluppo in tempi più brevi per T = +20°C rispetto a T = +15°C. Infatti, a T = +20°C, l'11% delle spore ha germinato mediamente in 11 giorni, e l'89% di queste ha sviluppato gametofiti maturi entro 100 giorni dalla semina (Fig. 4.50), mentre per T = +15°C, le spore germinate sono pari al 5%, e solo il 70% di queste ha prodotto gametofiti maturi dopo 115 giorni dalla semina. In alcune fasi sono riportati in tabella (Tab. 4.13) valori molto alti di deviazione standard, causati dall'assenza di germinazione o di sviluppo in una o più repliche.

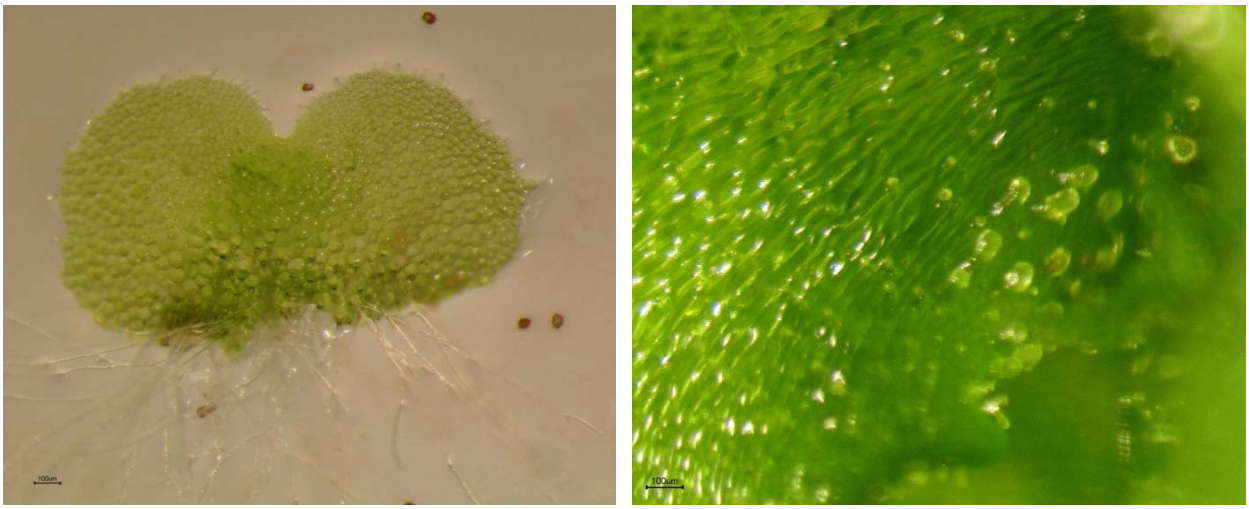


Fig. 4.50 - A sinistra, gametofito cordato di *D. tyrrhena* da spore del saggio VAL 83412 del 1988, proveniente dalla Sierra Nevada, dove sono visibili le numerose ghiandole sul margine; a destra, presenza dei gametangi.

4.3.6. *Assessment* IUCN

Per l'applicazione della procedura di assessment IUCN è stata aggiornata la distribuzione, calcolata l'estensione dell'areale e della superficie occupata, valutati i fattori di minaccia presenti e le azioni di conservazione presenti o necessarie ed è stato assegnato a *Dryopteris tyrrhena* uno *status* di rischio a livello globale e a livello regionale (*sensu* IUCN).

Aggiornamento distributivo

È stata aggiornata la distribuzione di *D. tyrrhena* con ricerche bibliografiche, ricerche d'erbario e verifiche in campo.

SPAGNA - *Sierra Nevada (Granada, Andalucìa).* È il *locus classicus* di *Dryopteris tyrrhena* (BOISSIER, 1838; FRASER-JENKINS *et al.,* 1975). Viene confermata da lavori recenti (BLANCA *et al.,* 2002; BAÑARES BAUDET *et al.,* 2004; CABEZUDO *et al.,* 2005; BLANCA *et al.,* 2009) la presenza di 2 subpopolazioni, in due località, *Barranco Dilar* e *Guejar Sierra* (1700-2400 m s.l.m.), comprese nella stessa maglia di 1x1km (vedi Fig. 4.51). La popolazione della Sierra Nevada risulta costituita complessivamente da meno di 500 individui (BLANCA *et al.,* 2002), con la subpopolazione cacuminale costituita da circa 44 individui (BAÑARES BAUDET *et al.,* 2004). Negli erbari consultati sono stati rinvenuti 42 *exsiccata* per le due località, raccolti negli anni 1967/1993.

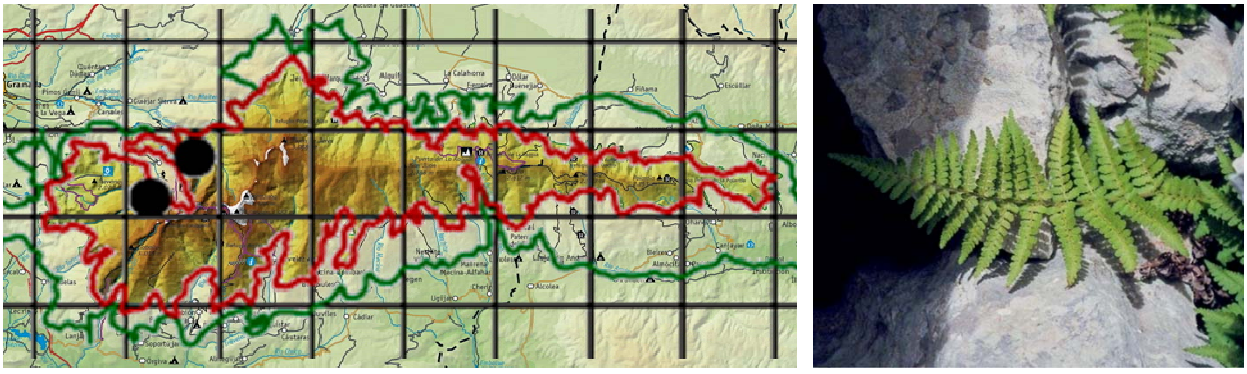


Fig. 4.51 - Distribuzione di *Dryopteris tyrrhena* in Sierra Nevada. Reticolo con maglia di 1x1km utilizzato per la procedura di *assessment* in Spagna (BLANCA *et al.,* 2002; BAÑARES BAUDET *et al.,* 2004). La linea rossa indica il confine del *Parque Nacional de Sierra Nevada* (da BLANCA *et al.,* 2002 modificato). A destra, foto di *D. tyrrhena* in Sierra Nevada (BAÑARES BAUDET *et al.,* 2004).

SPAGNA - *Puig Major, Mallorca Illes Balears.* La presenza della popolazione balearica nella *Serra de Tramuntana*, zona culminale del *Puig Major de Torrella*, 1.400-1.440 m, è confermata da SÁEZ e ROSSELLÓ (2001) e BAÑARES BAUDET *et al*. (2004), che indicano un'unica popolazione di circa 25 individui, in un'area di 2500 m^2. Negli erbari consultati sono stati rinvenuti 7 *exsiccata*, raccolti negli anni 1987/1990.

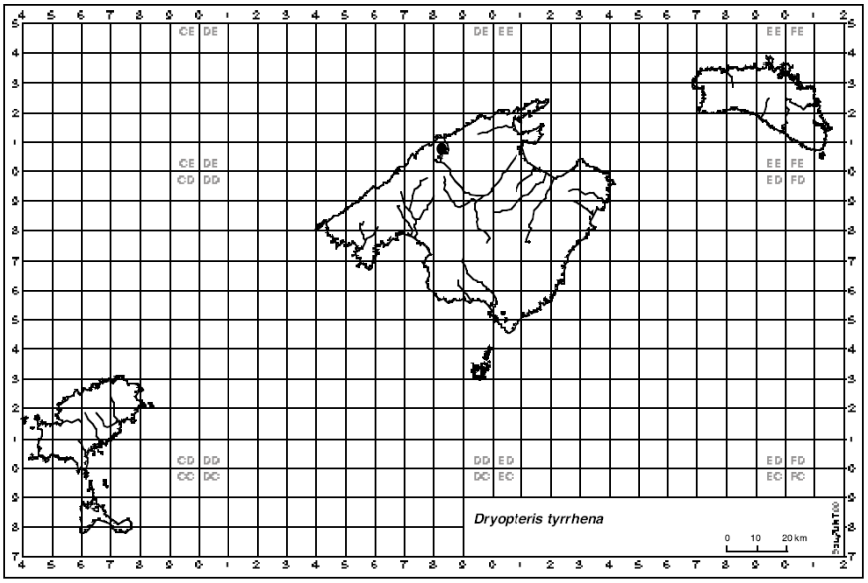


Fig. 4.52 - Distribuzione di *D. tyrrhena* a Mallorca (SÁEZ, ROSSELLÓ, 2001)

A queste località storiche, si aggiunge una nuova segnalazione per ***Sierra de Los Filabres, Almeria*** (PEÑAS DE GILES *et al.,* 2006) confermata dai saggi d'erbario GDA 24076 e HUAL 642-1 (vedi Tab. 4.14) e riportata recentemente nella *Flora Vascular de Andalucía Oriental* (BLANCA *et al.,* 2009), che va ad ampliare l'areale della specie in Spagna.

FRANCIA - *Vallée de la Roya, Alpes-Maritimes.* Località citata per la prima volta in BADRÉ, DESCHATRES (1979) e riportata successivamente in PRELLI e BOUDRIE (1992) e in PRELLI (2001), che citano gli stessi dati. È stato trovato un unico saggio d'erbario in P! del 1977 (*legit* C.R. Fraser-Jenkins). La sua presenza è stata verificata in campo il 2 agosto 2007 in due località, *Gorges du Paganin* e *La Brigue*, dove sono state rinvenute pochissime piante, sofferenti per l'aridità estiva.



Fig. 4.53 - *D. tyrrhena* fotografata il 2 agosto 2007 nelle 2 stazioni della Vallée de la Roya (Alpes-Maritimes): Gorges du Paganin (a sinistra) e La Brigue (a destra).

FRANCIA - *Pont de Labeaume, Ardèche* - ***Cevennen.*** Citata per la prima volta da FRASER-JENKINS (1977) e rinvenuta nel 1993 (*legit* C. Stark, G. Zenner & S. Jessen, 10/08/1993, in B!) (JESSEN *et al.,* 1994), la presenza di *D. tyrrhena* è confermata da PRELLI (2001).

FRANCIA - *Corsica.* Citata da FRASER-JENKINS et al. (1975) per varie località, *La Trinité*, *Calanche de Piana*, *M. Renoso*, *M. Cinto*, *Asco*, *Cap Corse*, confermate nell'*Atlas écologique* di PRELLI e BOUDRIE (1992) e in PRELLI (2001). La sua presenza è confermata da osservazioni della fine degli anni '80 per la *Corse-du-Sud*: *montagne de Cagna* (Porto-Vecchio), *Calanche de Piana* (Porto), la *Trinité près de Bonifacio*; e per l'*Haute-Corse*: *vallée du Golo*, *Viro* (*Albertacce*) (R. Prelly, *in litt*.). Rinvenuta nel 2008 presso *Cap Corse*, sul M. Stello, nell'ambito delle ricerche per la "*Carte de répartition des Ptéridophytes de la Corse*". Negli erbari consultati sono stati rinvenuti 14 *exsiccata*, raccolti negli anni 1921/1980, ma solo un saggio recente del 2009 (*legit*. G. Rouhan, 10/9/2009, in P), che ne conferma la presenza in *Haute-Corse*, presso Punta Stranciacone, Asco.

ITALIA - ***Vado del Capo, presso Cala della Mortola. Isola di Capraia, Livorno.*** Citata da FRASER-JENKINS et al. (1975) e indicata da BERTACCHI et al. (2005a,b), la presenza di *D. tyrrhena* sull'Isola di Capraia è stata verificata direttamente il 19 luglio 2008, rilevandone un unico nucleo di poche piante (o *ramet*) alla base di una roccia (Fig. 4.54), in una piccola area di circa $1m^2$.



Fig. 4.54 - *D. tyrrhena* fotografata il 19 luglio 2008 fra le rocce del Vado del Capo, presso Cala della Mortola. Isola di Capraia, Livorno; a destra, particolare di una fronda fertile.

ITALIA - ***Isola d'Elba, presso Marciana Marina, Livorno.*** Gli unici dati originali per l'Isola d'Elba risalgono al 1900, per Marciana, tra Ripa Barata e St Anna (*legit* Sommier, FI!) e al 1979 per Marciana presso S. Andrea (*legit* Nardi, Tardelli, FI!) riportati in FOSSI INNAMORATI (1983). Non sono stati rinvenuti saggi d'erbario più recenti, né altri dati in bibliografia, inoltre la specie non viene citata nel recente lavoro sul

paesaggio vegetale dell'Isola d'Elba (FOGGI *et al.,* 2006). Verifiche mirate nell'area fra Marciana Marina e Ripa Barata, verso S. Andrea non hanno dato esito positivo, evidenziando inoltre l'alto livello di urbanizzazione recente dell'area.

ITALIA - ***Isola di Montecristo, Livorno.*** Sia PAOLI, ROMAGNOLI (1976) e NARDI, 1979 citano i saggi in FI! di Fabbri et al. degli anni 1964-1966 e non esistono saggi d'erbario o dati bibliografici più recenti. La specie non è citata in lavori più recenti, come *La vegetazione dell'isola di Montecristo* (FILIPELLO, SARTORI, 1983) né in DEL PRETE et al. (2009), lavoro sul contingente pteridologico dell'Isola di Montecristo. Nonostante le 3 visite sull'isola, la verifica delle località segnalate, in particolare il Vallone di Cala Maestra, l'area presso la Grotta del Santo e la zona verso il Convento, non ha portato al ritrovamento della specie.

ITALIA - ***M. Spada, Gennargentu; Nuoro.*** Citata da FRASER-JENKINS et al. (1975), non esistono riferimenti bibliografici riferiti a dati originali più recenti, ma è stata raccolta recentemente in località Bruncu Spina, Monte Spada (*legit* A.D. Atzei, 21/08/1997, SASSA) e presso la vetta del Monte Spada il 10/05/2008 (R. Viane, *in litt.*).

ITALIA - ***Montiferru vicino a Santu Lussurgiu, Oristano.*** NARDI nel 1979 cita i saggi del 1969 (*legit* Arrigoni) e del 1975 (*legit* Arrigoni e Nardi) in FI. Non è stato possibile verificare tale segnalazione, dal momento che i 2 *exsiccata* non sono attualmente depositati nell'Erbario di Firenze e non esistono né altri saggi d'erbario, né riferimenti bibliografici più recenti. L'area indicata "presso la Madonnina" è stata indagata a fondo, senza però ritrovare la specie.

A queste località per la Sardegna, si è aggiunta una segnalazione bibliografica per una stazione al di fuori dell'areale storico, presso ***Punta Sebera - Pula, Cagliari***, riportata nella tabella di un rilievo fitosociologico del 1999 da BACCHETTA et al. (2004). Non esistendo un saggio d'erbario di riferimento (Bacchetta *in litt.*), questa segnalazione non è stata considerata ai fini dell'aggiornamento della distribuzione.

ITALIA - ***Coste da Deiva Marina a Campiglia, Valle di Vara a Piana Battolla; La Spezia.*** É citata da FRASER-JENKINS et al. (1975) per Riomaggiore e recentemente da BERNARDELLO e MARTINI (2004) che ne specificano la distribuzione in Liguria, dove *D. tyrrhena* è presente e localmente abbondante. Negli erbari consultati sono stati rinventi 24 *exsiccata* degli anni 1978/2001, provenienti in particolare da Riomaggiore, Schiara, Codeglia, Piana Bettolla e Val di Vara. Se ne conferma la presenza anche

attraverso più verifiche di campo, che hanno riguardato l'area nei pressi di Riomaggiore (Fig. 4.55), Santuario della Madonna di Montenero e Lemmen.



Fig. 4.55 - *Dryopteris tyrrhena* fotografata presso Riomaggiore lungo il sentiero di Torre Guardiola, il 14 settembre 2007 (a sinistra) e particolare di fronde raccolte il 13 marzo 2009, dove si può osservare la densa ghiandolosità e i denti delle pinnule convergenti all'apice (a destra)

Ricerche d'erbario

Sono stati consultati 24 erbari europei in possesso di saggi di *Dryopteris tyrrhena*: 5 erbari in Italia, 15 in Spagna, 2 in Francia e 2 in altri Paesi europei, per un totale di 125 saggi. (vedi Tab. 3.22). La ricerca ha consentito di rilevare la presenza di 11 saggi negli erbari CAG, GE, GDA, HUAL, MA e VAL, relativi a stazioni al di fuori dell'areale storico della specie, in Cantabria, Almeria, Grecia, Sicilia e Sardegna, come descritto nella tabella seguente (Tab. 4.14):

ERBARIO	PROVENIENZA	LEGIT	DATA
CAG – Cagliari	Rio Cardaxius, Miniera S. Luigi. Buggerru (CA)	Bacchetta, Casti, Pontecorvo, Garau	06/05/2002
CAG – Cagliari	Rio Cardaxius, Miniera S. Luigi. Buggerru (CA)	Bacchetta, Casti, Pontecorvo, Garau	06/05/2002
VAL 141429-1	Buggerru (CA), rio Cardaxius, Miniera S. Luigi	Bacchetta, Casti, Pontecorvo, Garau	06/05/2002
GE – Genova	Toscana, Alpi Apuane	R. Pichi Sermolli	27/05/1961
GDA 21884	Cantabria, Fuente de Hayedo, Funicular.	J.Molero	04/07/1987
GDA 24076	Almería, Fiñana, Loma del Horcajo.	J.Molero & J.M.Marfil	19/07/1990
HUAL 642-1	Bacares, Bajo Pico Las Hoyas (cara N) Almeria	J. Peñas	19/07/1994
MA 762087-1	Arcadia, Trípoli, Mt. Menalo, pr. Levidhi, from Ski Station to Ostrakina Peak, medium-high areas. PEL	Medina & al.	25/04/2007
MA 765391-1	Monte Peristeri (cadena Lakmos). IPI	S. Castroviejo & al. (Epifenómeno '07)	30/06/2007
VAL 191686	GRC. 44: Monte Peristeri (cadena Lakmos),	S. Castroviejo & al. (Epifenómeno '07)	30/06/2007
MA 622905-1	Piano Zucchi, montañas de Madonia, Palermo, Sicilia	H.S. Nava	20/06/1983

Tab. 4.14 - Saggi relativi a stazioni al di fuori dell'areale storico della specie, in Cantabria, Almeria, Grecia, Sicilia e Sardegna

In totale, sono stati revisionati 8 saggi. I 3 saggi di CAG! e VAL!, relativi ad una stazione presso Buggerru, in provincia di Cagliari, sono stati revisionati come *Dryopteris pallida* (Bory) Maire & Petitm. subsp. *pallida*, così come i 4 saggi di MA! e VAL! relativi ad 2 stazioni in Grecia nei Monte Peristeri e in Arcadia, e ad una stazione in Sicilia sulle Madonie. Il saggio raccolto sulle Alpi Apuane e conservato in GE! si riferisce piuttosto a *Dryopteris villarii* (Bellardi) Woyn. ex Thell. subsp. *villarii*, anche se in una forma un po' atipica (D. Marchetti *in litt.*). Il saggio in GDA! relativo ad una stazione in Cantabria, non appartiene né a *Dryopteris tyrrhena* né a *D. remota* (A. Braun ex Döll) Druce, come indicato da una revisione di A. Delgado Vazquez (*Dryopteris cfr. remota*), ma piuttosto a *D. dilatata* (Hoffm.) A. Gray. Ma la morfologia un po' insolita, pinne basali appena asimmetriche e palee molto scarse e pallide, e il fatto che si tratta di una fronda decisamente immatura, non ha consentito di revisionare con certezza il campione.
Solo i 2 saggi in GDA! e HUAL relativi a località in Almería sono stati confermati come *Dryopteris tyrrhena* e vanno a confermare il dato di presenza pubblicato in (PEÑAS DE GILES *et al.,* 2006).

Areale di distribuzione e superficie occupata

Le elaborazioni effettuate con *ArcView* (Par. 3.7.4. e 3.7.5.) hanno fornito i dati necessari per la definizione dello *status* di rischio e per la redazione di mappe di distribuzione di *Dryopteris tyrrhena* a livello globale e nazionale.
L'EOO calcolato su tutto l'areale tramite il metodo del Poligono convesso minimo è pari a 418.073 km^2; la sua estensione è stata poi ridotta tramite il metodo dell'*Alpha-hull* (con *alpha*=2), ottenendo una superficie pari a 81.691 km^2 (Fig. 4.56). L'EOO calcolato per l'Italia, tramite il metodo del Poligono convesso minimo è pari a 33.404 km^2; la sua estensione è stata poi ridotta tramite il metodo dell'*Alpha-hull* (con *alpha*=2), ottenendo una superficie pari a 4.377 km^2 (Fig. 4.57).
Per quanto riguarda l'AOO, dalla sovrapposizione con una griglia di maglia 2x2 km abbiamo ottenuto i seguenti risultati (Tab. 4.15): le 40 stazioni occupano 33 maglie per un totale di 132 km^2, mentre le stazioni italiane sono 23, concentrate soprattutto in Liguria (Fig. 4.58), e occupano 60 km^2.

Stato	n° stazioni	n° maglie	AOO
SPAGNA	**6**	**3**	**12 km^2**
Sierra Nevada	5	2	8 km^2
Mallorca	1	1	4 km^2
FRANCIA	**11**	**15**	**60 km^2**
Francia continentale	2	2	8 km^2
Corsica	9	13	52km^2
ITALIA	**23**	**15**	**60 km^2**
Liguria	14	8	32 km^2
Toscana	6	4	16 km^2
Sardegna	3	3	12 km^2
TOTALE	**40**	**33**	**132 km^2**

Tab. 4.15 - Risultati dell'aggiornamento distributivo: numero di stazioni, di maglie occupate e AOO, nei 3 stati.

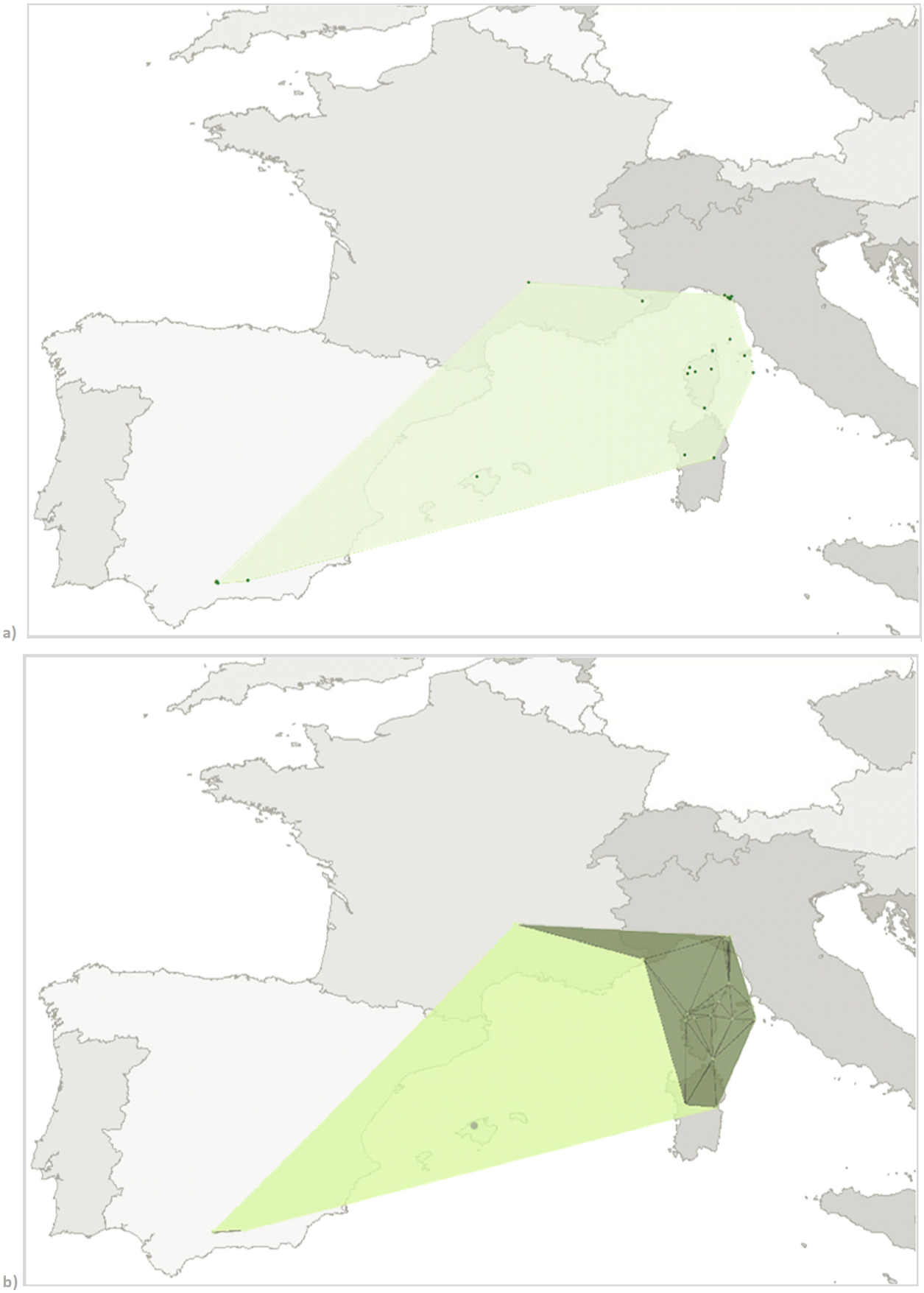


Fig. 4.56- Distribuzione globale di *Dryopteris tyrrhena*: a) areale secondo il metodo del Poligono convesso minimo; i punti corrispondono alle 40 stazioni; b) areale ridotto secondo il metodo dell'*Alpha-hull*

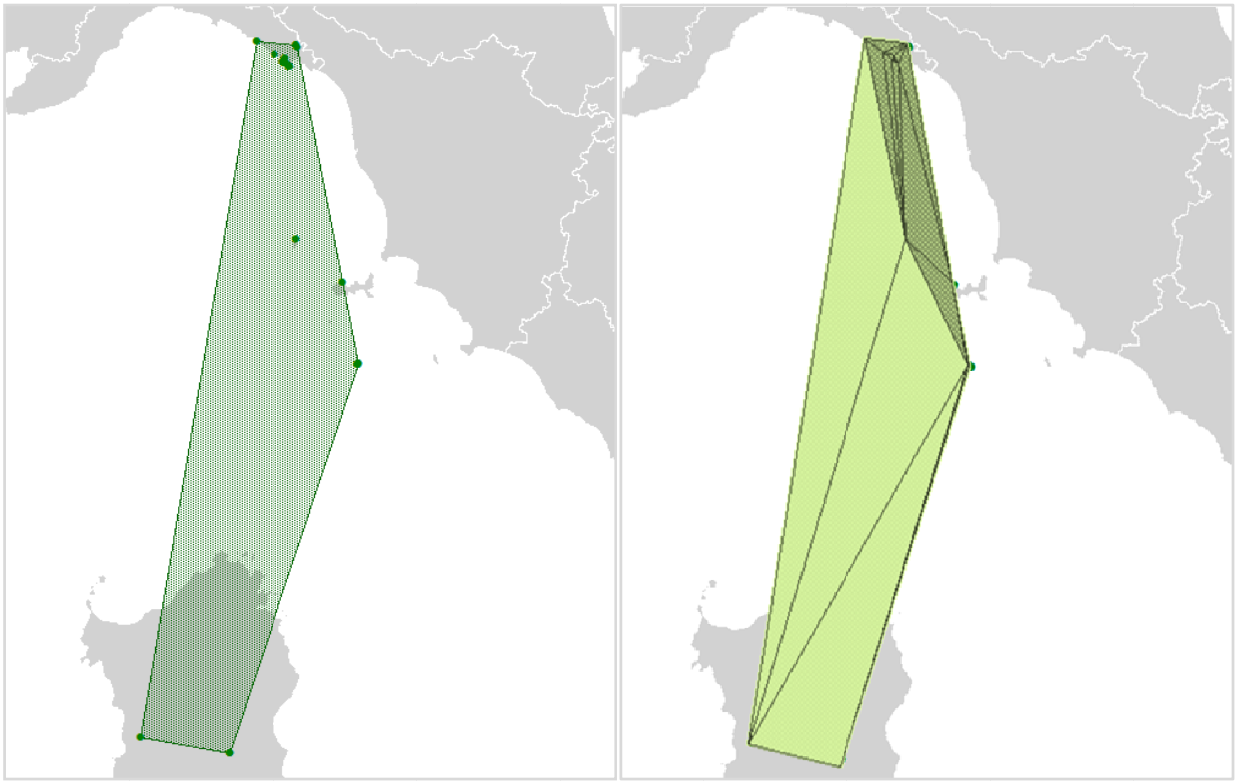


Fig. 4.57 - Distribuzione di *Dryopteris tyrrhena* in Italia. A sinistra: areale secondo il metodo del Poligono convesso minimo; i punti corrispondono alle 22 stazioni. A destra, triangolazione di *Delauney* e areale ridotto secondo il metodo dell'*Alpha-hull*

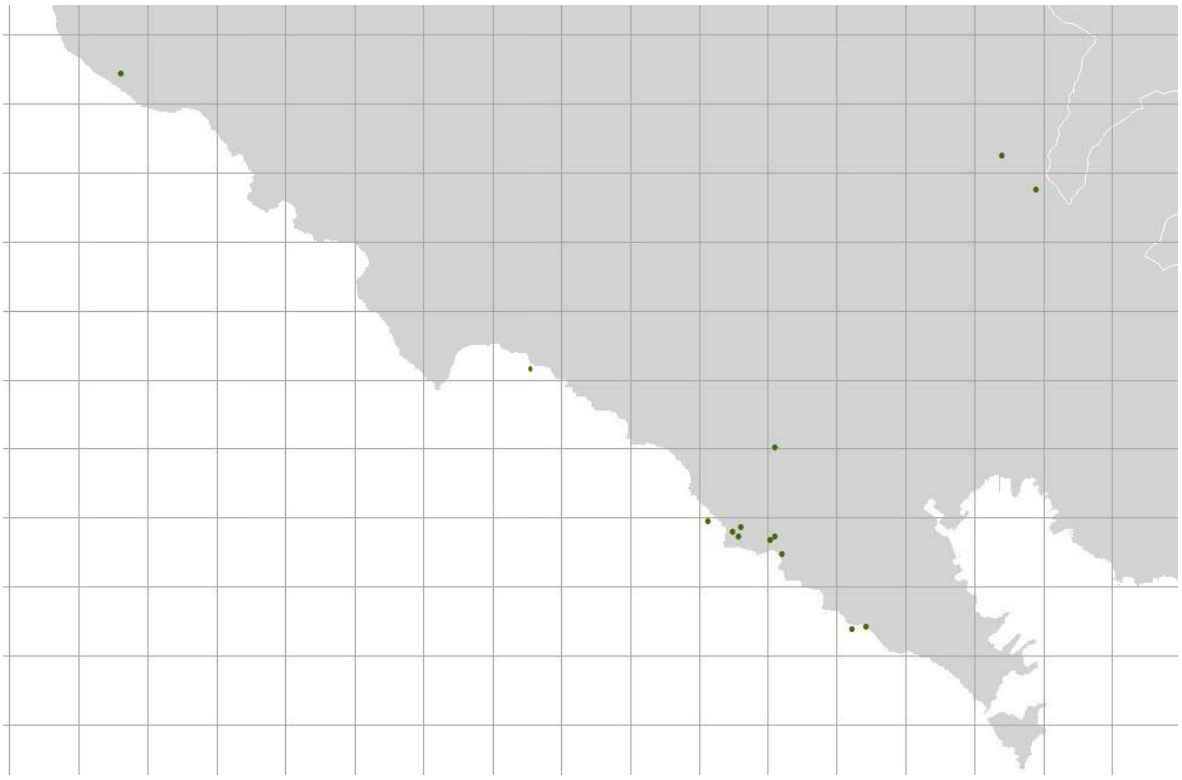


Fig. 4.58 - Particolare della distribuzione in Liguria

Habitat principali

Si riportano di seguito gli habitat principali dove è stata rinvenuta la specie, secondo l'*Habitats Classification Scheme. Version 3.0*, con il relativo punteggio (Par. 3.7.2.).

***6. Rocky Areas [e.g. inland cliffs, mountain peaks]*:** è questo l'habitat principale o preferito, *il locus classicus* e l'habitat contenente le subpopolazioni principali, in Sierra Nevada e Corsica (M. Renoso, Calanche de Piana, M. Cinto), ma anche con subpopolazioni minori sul Puig Major a Mallorca, nella Vallée de la Roya, sul Monte Spada, nell'Isola di Capraia. Punteggio: 1, Idoneo

3. Shrubland. 3.8. Mediterranean-type Shrubby Vegetation: soprattutto nelle località liguri, *Dryopteris tyrrhena* si rinviene in cespuglieti della macchia mediterranea, sempre alla base di muretti a secco dei terrazzamenti. Punteggio: 1, Idoneo

Fattori di minaccia presenti

Si riportano di seguito le minacce accertate sulla popolazione globale, secondo la classificazione gerarchica della Versione 2.1 del *Red List Threats Authority File* (giugno 2005) e della seguente *Unified Classification of Direct Threats, Version 1.0.* (IUCN-CMP, 2006).

Minaccia 1. Degradazione/perdita di habitat (indotte dall'uomo) - 1.1.4. Allevamento di bestiame. In Sierra Nevada, il pascolo bovino e soprattutto l'utilizzo come ricoveri delle aree dove vive *D. tyrrhena*, e soprattutto la conseguente nitrificazione costituisce una minaccia, provocando l'invasione di specie maggiormente adattate alle nuove condizioni e più competitive (BLANCA *et al.,* 2002).

***Minaccia 1. Degradazione/perdita di habitat (indotte dall'uomo)* - 1.4.2. *Costruzione d'infrastrutture - Insediamenti umani*.** Sia alle Cinque Terre che sull'Isola d'Elba le subpopolazioni vivono (o comunque sono state segnalate) in aree turistiche dove l'edilizia ha avuto un forte incremento negli ultimi 30 anni, compromettendo fortemente l'assetto originario del territorio e la sua naturalità.

***Minaccia 1. Degradazione/perdita di habitat (indotte dall'uomo)* - 1.4.3. *Costruzione d'infrastrutture - Turismo/attività ricreative*.** Sia sul Monte Spada che nella Sierra Nevada le subpopolazioni vivono in aree interessate da impianti sciistici, subendo quindi tutti gli impatti, diretti e indiretti, derivanti da tale attività e dalle attività correlate per esempio, per l'adeguamento delle piste e per la costruzione di infrastrutture (BLANCA *et al.,* 2002; BAÑARES BAUDET *et al.,* 2004).

Minaccia* 3. Raccolta (caccia/raccolta) - *3.5. Attività culturali, scientifiche e di tempo libero. La raccolta di esemplari a scopo scientifico sembra essere una minaccia importante, soprattutto per le subpopolazioni spagnole (BAÑARES BAUDET *et al.,* 2004), tanto che nell'ambito della presente ricerca

sono stati rinvenuti ben 42 *exsiccata* delle due piccole popolazioni della Sierra Nevada, raccolti negli anni 1967/1993.

Minaccia 6. Inquinamento (che incide su habitat e/o specie) - 6.1.1. Inquinamento atmosferico. Riscaldamento globale/marino. Specialmente la subpopolazione ligure e quella della *Vallée de la Roya* mostrano segni di sofferenza per l'eccessiva aridità, proprio durante il periodo della sporificazione.

Minaccia 9. Fattori intrinseci alla specie - 9.2. Scarse capacità di rinnovamento/riproduzione/ rigenerazione. Sull'Isola di Capraia è stato rinvenuto un unico nucleo costituito da 5-6 piante o meglio *ramet*, ma nessuna rinnovazione per via sessuale. Questa osservazione di campo è stata confermata dalla difficoltà di riprodurre *in vitro* la specie dalle spore provenienti da tale subpopolazione (MAGRINI, SCOPPOLA, 2009; 2010a). Anche per la subpopolazione della Sierra Nevada si sospetta una riproduzione quasi totalmente vegetativa (BAÑARES BAUDET *et al.,* 2004).

Minaccia 9. Fattori intrinseci alla specie - 9.9. Distribuzione limitata. Tranne le subpopolazioni corse e liguri, tutte le altre sono estremamente piccole e localizzate: in Sierra Nevada l'area occupata dalle 2 subpopolazioni rientra in una maglia di 1 km^2 (BAÑARES BAUDET *et al.,* 2004); la subpopolazione balearica è diffusa in un'area di 2.500 m^2 (SÁEZ, ROSSELLÓ, 2001); a Capraia è stato rinvenuto un unico nucleo in un'area di circa 1m^2; e anche nella Francia continentale le due subpopolazioni hanno un'estensione estremamente ridotta (PRELLI, 2001).

10. Disturbo antropico. *10.1. Turismo/attività ricreative*. Sia sul Monte Spada che nella Sierra Nevada le subpopolazioni vivono in aree interessate da turismo sciistico (BLANCA *et al.,* 2002; BAÑARES BAUDET *et al.,* 2004); nell'area delle Cinque Terre, *D. tyrrhena* cresce tipicamente sui muretti a secco lungo i sentieri che percorrono il Parco (BERNARDELLO, MARTINI, 2004).

Azioni di conservazione presenti o necessarie

Per descrivere le azioni di conservazione è stata utilizzata la classificazione gerarchica del *Conservation Actions Authority File. Version 1.0*.

1 Land/water protection 1.1 Site/area protection:

In Spagna:

- Parque Nacional de Sierra Nevada

In Francia:

- Parc naturel régional des Monts d'Ardèche (FR8000041)

- SIC FR9301566 - Sites a chauves souris de Breil-sur-Roya

In Corsica:

- Parc Naturel Régional Corse (FR8000012)
- SIC FR9400576 - Massif montagneux du Cinto
- SIC FR9400574 - Porto/Scandola/Revellata/Calvi/Calanches de Piana
- SIC FR9400611 - Massif du Renoso

In Liguria:

- Parco Nazionale delle Cinque Terre
- SIC IT1343412 - Deiva - Bracco - Pietra di Vasca – Mola

In Toscana:

- Parco Nazionale dell'Arcipelago Toscano
- SIC IT5150006 - Isola di Capraia
- SIC IT5150012 - Monte Capanne e Promontorio dell'Enfola
- Riserva Naturale Integrale Isola di Montecristo
- SIC IT5150014 - Isola di Montecristo

In Sardegna:

- Parco Nazionale del Gennargentu e Golfo di Orosei
- ITB001103 - Monti del Gennargentu

3 Species management. 3.3 Species re-introduction. 3.3.1 Reintroduction*.** Questa tipologia di intervento è fortemente raccomandata, sia per il restauro di popolazioni in declino o estremamente ridotte (per es. sull'Isola di Capraia), che per i casi di scomparsa locale (per es. sull'Isola di Montecristo). Risulta necessario incrementare le attività di riproduzione *in vitro* per poter procedere ad eventuali reintroduzioni. Nell'ambito della presente ricerca è stata intrapresa la riproduzione da spore provenienti da *exsiccata*, proprio come metodo per produrre nuove piante utilizzando il germoplasma delle popolazioni scomparse. ***3.4 Ex-situ conservation. 3.4.1 Captive breeding/artificial propagation. Coltivata *ex situ* presso il JBS - *Jardí Botànic de Sóller*, presso il *Jardìn Mundani* a *Mallorca* e presso l'Orto Botanico della Tuscia. ***3.4.2 Genome resource bank.*** Azione fortemente raccomandata per la conservazione della specie in Spagna (BAÑARES BAUDET *et al.,* 2004). Attualmente le accessioni di spore di *D. tyrrhena* raccolte nell'ambito della presente ricerca sono conservate presso la Banca del Germoplasma della Tuscia, che ne conserva il germoplasma anche *in vivo* (gametofiti, sporofiti).

5 Law & policy. 5.1 Legislation. 5.1.2 National level. Protetta in Francia: *Espèces végétales protégées sur l'ensemble du territoire. Arrêté du 20 janvier 1982 relatif à la liste des espèces végétales protégées*

sur l'ensemble du territoire national (Journal officiel du 13 mai 1982). ***5.1.3 Sub-national level.*** Protetta a livello regionale in Provence-Alpes-Côte d'Azur;

Nuovo *status* di rischio

Per la mancanza di dati demografici e di studi di ecologia di popolazione pregressi non è stato possibile applicare i criteri A, C ed E. La valutazione dello *status* di rischio si è basata quindi sul criterio B, in particolare il sottocriterio B2, dato che sia l'areale di distribuzione calcolato con il metodo del Poligono convesso minimo, 418.073 km^2, che con il metodo dell'*Alpha-hull*, 81.691 km^2, risultano molto maggiori di 20.000 km^2, il valore limite per attribuzione di uno *status* di rischio, mentre, l'AOO è estremamente ridotto, a causa della frammentazione dell'areale stesso (Tab. 4.16).

Il nuovo *status* di rischio a livello globale è: **EN B2ab(ii, iii, v)**.

In particolare è stato utilizzato il sottocriterio:

- **B2**: Area of Occupancy (AOO): 132 km^2 < 500 km^2 secondo le seguenti opzioni:

  (a) Areale severamente frammentato, infatti la subpopolazione della Sierra Nevada risulta fortemente disgiunta rispetto alle altre, con una distanza minima di oltre 600 km che la separa da quella di *Mallorca*, di circa 1.100 km da *Pont de Labeaume* e dalle stazioni in Sardegna, e di oltre 1.300 km dalle stazioni liguri. Anche la stazione di *Mallorca* è distante circa 500-700 km dalle altre e quella di *Pont de Labeaume* 250-1.100 km. Queste distanze sono maggiori del limite di 100-1.000 km indicato per definire la frammentazione dell'areale per le specie che si diffondono tramite spore, considerando anche il fatto che le varie subpopolazioni sono separate da ampi tratti di mare.

  (b) Continuo declino

  (ii) nella superficie occupata, infatti le subpopolazioni dell'Isola d'Elba, Montecristo e Santulussurgiu non sono state ritrovate nelle località segnalate nel passato;

  (iii) nell'estensione e qualità dell'habitat, soprattutto sull'Isola d'Elba e Montecristo, dove sembra che siano sempre più ridotte le aree idonee alla sua crescita, sia per motivi antropici, che per evoluzione naturale,

  (v) nel numero di individui adulti in Sierra Nevada, Capraia, Liguria.

La procedura di *assessment* applicata a livello regionale ha dato i seguenti risultati.

A livello regionale è stato possibile applicare sia il criterio B1 che B2.

- **B1:** L'areale di distribuzione calcolato con il metodo dell'*Alpha-hull* è pari a 4.377 km^2 < 5.000 km^2. Questo valore porta alla categoria EN.

- **B2**: L'AOO per l'Italia è pari a 60 km^2 < 500 km^2, che assegna uno status di rischio maggiore, EN.

Il nuovo status di rischio per l'Italia è: **EN B1+2ab(ii, iii, v)** (MAGRINI, SCOPPOLA, 2010b) per le stesse opzioni descritte in precedenza:

(a) Areale severamente frammentato, infatti la subpopolazione sarda è distante dalle altre circa 300-450 km, ma anche le subpopolazioni ligure e toscana risultano avere distanze reciproche maggiori di 100 km.

(b) Continuo declino **(ii)** nella superficie occupata, **(iii)** nell'estensione e qualità dell'habitat, **(v)** nel numero di individui adulti.

Sempre per la misura dell'AOO (pari a 60 km^2 < 500 km^2) è possibile assegnare lo *status* EN a livello regionale anche per la Francia e correggere lo *status* da CR a EN per la Spagna, visto che l'AOO è pari a 12 km^2 < 500 km^2, ma > 10 km^2, valore soglia definito per lo *status* CR.

Stato	Regione	AOO	*Status* secondo B2
SPAGNA		**12 km^2**	**EN**
	Sierra Nevada	8 km^2	CR
	Mallorca	4 km^2	CR
FRANCIA		**60 km^2**	**EN**
	Francia continentale	8 km^2	CR
	Corsica	52km^2	EN
ITALIA		**60 km^2**	**EN**
	Liguria	32 km^2	EN
	Toscana	16 km^2	EN
	Sardegna	12 km^2	EN
TOTALE		**132 km^2**	**EN**

Tab. 4.16 - Attribuzione di uno *status* di rischio secondo il criterio B2 a livello regionale e globale.

5.1. Studio morfologico e morfometrico per la risoluzione di criticità tassonomiche nel genere *Ophioglossum*

Lo studio è partito dall'analisi dei caratteri diagnostici rinvenuti in letteratura ed ha evidenziato come nessuno di questi, considerato singolarmente, aiuti a discriminare fra le 3 specie, cosa possibile, invece, considerandone due o più e, soprattutto, integrando i risultati dei vari studi.

Andando ad esaminare tutti i risultati ottenuti si evidenzia una distinzione netta fra *Ophioglossum vulgatum* e *O. lusitanicum*, mentre *O. azoricum* si pone sempre fra le due specie e, spesso, in parziale sovrapposizione con entrambe.

In particolare, le tre specie sono abbastanza ben distinte dal punto di vista palinologico, ma solo considerando insieme sia la dimensione delle spore che l'ornamentazione dell'esina della faccia distale: infatti, possiamo distinguere *O. vulgatum*, con spore mediamente più piccole e ornamentazione reticolata, da *O. azoricum* con spore maggiori e ornamentazione foveo-reticolata.

Lo studio morfometrico "tradizionale" (Par. 4.1.3.) ha dato risultati analoghi, infatti analizzando singolarmente i caratteri morfologici studiati appare chiaro che non è possibile discriminare con certezza fra le 3 specie: sia il numero di lamine sterili che i *range* delle misure dei dati morfometrici della lamina e dello sporoforo, mostrano ampie aree di sovrapposizione fra le 3 specie. In particolare, la lunghezza dell'asse della lamina ed il rapporto larghezza/lunghezza sembrano essere i caratteri meno discriminanti. La lunghezza della lamina mostra una grande sovrapposizione fra i *range* di misure per le varie specie, soprattutto fra *O. azoricum* e *O. lusitanicum*, ma anche fra *O. azoricum* e *O. vulgatum*, discriminabile con certezza solo per misure maggiori di 6 cm. Per la larghezza massima della lamina, mentre i *range* 25-75% discriminano molto bene fra le 3 specie, considerando i range totali possiamo distinguere con certezza sempre e solo *O. lusitanicum* da *O. vulgatum. O. azoricum* si pone sempre fra le 2 specie in parziale sovrapposizione con entrambe: in quest'area possiamo distinguere *O. lusitanicum* da *O. azoricum* per valori minori di 0,3 cm e *O. vulgatum*, per valori maggiori di 1,7 cm; fra questi due valori estremi, *O. azoricum* è certo solo per valori compresi fra 0,5 e 1 cm. Fra i 4 caratteri considerati nello sporoforo, sembra che solo il numero di sporangi per lato e la lunghezza dello sporoforo (evidentemente correlati) possano avere un significato diagnostico. Infatti, per sporofori con più di 21 sporangi per lato

siamo nel *range* di *O. vulgatum* e con meno di 9 in quello di *O. lusitanicum*. Fra 9 e 21 si colloca *O. azoricum*, in parziale sovrapposizione con le altre 2 specie. Considerando invece solo il *range* definito dai quartili (25-75%) le 3 specie sono ben distinte, *O. lusitanicum* = 7-9, *O. azoricum* = 11-14 e *O. vulgatum* = 23-33.

Per riuscire ad interpretare meglio questi risultati sono state fatte ulteriori analisi statistiche. Tramite il Test di correlazione di Pearson (Tab. 4.3 e Fig. 4.7) è stata evidenziata, infatti, una forte correlazione fra la lunghezza della lamina sterile e il numero di sporangi per lato e, soprattutto, fra larghezza massima della lamina e numero di sporangi per lato nello sporoforo, combinazione di caratteri che discrimina bene fra *O. lusitanicum* e *O. vulgatum* (Fig. 4.7). Ma è attraverso l'Analisi Fattoriale Discriminante che riusciamo a discriminare maggiormente fra le 3 specie. Infatti, l'AFD rispetto a F1-F3 (con percentuale cumulata del 91,75%), oltre alla netta separazione fra *O. vulgatum* e *O. lusitanicum* lungo F3 (Lambda di Wilks = 0,021; df = 8; $p < 0,0001$ (Fig. 4.9), mostra *O. azoricum* ed il suo *typus*, parzialmente sovrapposti, ben separati dalle altre due specie. Anche la posizione dei baricentri delle nuvole di punti sottolinea questa distinzione, mostrando i baricentri di *O. azoricum* e del suo *typus* vicini nel quadrante inferiore sinistro, mentre le altre 2 specie hanno baricentri distanti nei due quadranti superiori. Lungo F3 (Fig. 4.9) la discriminazione è influenzata principalmente dal numero di sporangi per lato e dalla larghezza della lamina, oltre che dalla lunghezza dello sporoforo che influenza anche la distribuzione lungo F1. Indicando come questa coppia di caratteri possa essere utilizzata per distinguere le 3 specie.

5.1.1. Applicazione delle moderne tecniche di morfometria geometrica

Dalle analisi effettuate con la morfometria geometrica si sono ottenuti risultati che si integrano con i precedenti, portando ad una maggiore caratterizzazione delle specie oggetto di studio.

Dall'analisi delle forme con il metodo dei *landmark* non otteniamo ancora una discriminazione fra le 3 specie, che risultano distribuite lungo RW1 (85,10%) (Fig. 4.10), con una netta separazione fra *O. lusitanicum* e *O. vulgatum*, ma con un'ampia area (fra le 2) di sovrapposizione con *O. azoricum*, con l'area corrispondente al *typus* di *O. azoricum* che risulta molto più vicina ad *O. lusitanicum*. Maggiori informazioni derivano dall'osservazione della variazione dei reticoli di deformazione (Fig. 4.11) lungo questo primo asse. Possiamo, così, interpretare la distribuzione lungo RW1 come rappresentativa delle deformazioni della lamina rispetto alla sua larghezza relativa (confermando questo carattere come diagnostico), in particolare nella metà inferiore della lamina, e, soprattutto, rispetto alla sua base. Anche i risultati dell'analisi degli *outline* confermano quest'area di variazione morfologica come carattere diagnostico. Dalla PCA effettuata sulla matrice dei coefficienti delle armoniche sull'intero *dataset* si osserva che, sia lungo PC1 che lungo PC2, il livello di discriminazione è paragonabile a quello osservata per i *landmark*, risultano però estremamente utili gli *output* grafici delle PCA effettuate per ogni set

parziale di dati, riferito alla singola specie o località. Grazie a questi è possibile visualizzare le differenze fra le 3 specie, confermando la forma e la base della lamina come veri caratteri diagnostici. Possiamo osservare, quindi, che *O. vulgatum* è ben distinto dalle altre 2 specie per la forma della lamina (Fig. 4.14), che risulta da largamente lanceolata a ovata con base rotonda ampia o più o meno attenuata. Sia *O. azoricum* che *O. lusitanicum* hanno base più o meno cuneata, ma si differenziano per la forma, da lanceolata a strettamente ovata in *O. azoricum*, lanceolata-lineare in *O. lusitanicum*.
Ricordiamo che tutti i dati sono stati raccolti da saggi d'erbario, senza intraprendere prima una revisione degli stessi. I risultati di questo studio saranno così utilizzati anche per valutare tutti i campioni che hanno mostrato valori anomali, estremi o fuori *range*, e procedere ad eventuali revisioni.

In questo studio sono stati analizzati insieme alle 3 specie anche campioni di *Ophioglossum sp*. provenienti dalla Selva del Lamone e, per alcuni studi, dal Monte Pisano (Moriglion di Penna e Monte Pianello) per riuscire capire se appartengano a popolazioni di *O. vulgatum* o di *O. azoricum.*
I campioni di *Ophioglossum sp*. provenienti dalla Selva del Lamone, sia lo studio palinologico (per dimensioni e ornamentazione della faccia distale), sia l'analisi del *pattern* di nervature (per l'assenza nelle areole centrali di un reticolo secondario più fine che è presente solo nelle areole marginali), che l'analisi dei caratteri morfometrici (per la presenza di 2 lamine sterili, per la larghezza massima e la lunghezza della lamina, ed il numero di sporangi per lato) sembrano identificabili come *O. azoricum*. Questo risultato trova conferma nell'Analisi Fattoriale Discriminante (Fig. 4.9) che mostra i campioni del Lamone parzialmente sovrapposti con quelli di *O. azoricum* e abbastanza ben separati dagli altri (con baricentri vicini nel quadrante inferiore sinistro), così come nel *Warp Ordination Plot* ottenuto dall'analisi morfometrica con il metodo dei *landmark*. Grazie ai risultati dell'analisi degli *outline* possiamo confermare questa interpretazione dei dati. Infatti, gli *outline* che indicano la variabilità del campione di *Ophioglossum sp.* del Lamone secondo le prime 2 componenti principali (Fig. 4.15) sono perfettamente sovrapponibili con quelli ottenuti per *O. azoricum* (Fig. 4.13), entrambi sempre con base cuneata della lamina.
Un analogo risultato si ottiene per i campioni di Monte Pianello. Al contrario, i campioni di Moriglion di Penna non hanno mostrato risultati chiari, a partire dallo studio palinologico, nel quale sono state rilevate spore molto grandi, con un'ornamentazione della faccia distale molto irregolare e della faccia prossimale non appiattita intorno alle lesure, non riconducibile a nessuna delle 3 specie. L'analisi degli *outline* indica un campione piuttosto diversificato (PC1 91,54%), con le 2 forme estreme riconducibili ad *O. vulgatum* e ad *O. azoricum* (Fig. 4.16), così come evidenziato anche dalla *Relative Warp Analysis*, che mostra i punti distribuiti lungo RW1 sia nell'area di *O. vulgatum* che in quella di *O. azoricum* (Fig. 4.10).

Anche se questo campione potrebbe essere riconducibile alla variabilità di *O. vulgatum*, è plausibile però ipotizzare che nella popolazione di Moriglion di Penna le due specie convivano.

5.1.2. Proposta per una nuova chiave dicotomica

Le criticità tassonomiche legate al genere *Ophioglossum* in Italia (Par. 3.1.1.) e la difficoltà di ottenere risultati univoci e inequivocabili con il classico approccio tassonomico, cioè attraverso l'uso di chiavi dicotomiche, hanno portato alla necessità di intraprendere questo studio morfologico, integrando varie tipologie di studi, palinologici, micromorfologici e morfometrici, per poter contribuire a discriminare fra le 3 specie italiane. Grazie ai risultati di questo studio è possibile evidenziare alcuni errori comuni alle varie chiavi dicotomiche presenti in letteratura.

La chiave dicotomica presente nella *Flora d'Italia* (PIGNATTI, 1982) non considera la larghezza della lamina sterile, ma solo il loro numero e la lunghezza, dando però un range per *O. vulgatum* pari a 1-12 cm troppo ampio, che porta a determinare come *O. vulgatum* anche tutti quegli *O. azoricum* o *O. lusitanicum* con una sola lamina, che, come abbiamo visto, può superare anche i 5 cm.

Non è valida la dicotomia fra *O. azoricum* e *O. lusitanicum* basata su un valore soglia di 1 cm per la larghezza massima della lamina sterile presente in PRELLI (2001) e in MARCHETTI (2004). Questo errore probabilmente ha portato a molte errate determinazioni per tutti quegli esemplari di *O. azoricum* con foglia piccola (< 1 cm), che abbiamo visto essere invece quella tipica: infatti dalle misure effettuate su tutti gli esemplari presenti nei saggi *typus* abbiamo ottenuto un *range* di 0,3-1,0 cm.

MARCHETTI (2004) parla di (1) 2 lamine sterili per *O. lusitanicum* e di 2-3 (6) per *O. azoricum*, dai dati del presente studio sembra più corretto parlare di 1-2 (3) lamine sterili per *O. lusitanicum* e di 1-2 per O*. azoricum*, in accordo anche con quanto indicato nel protologo ed osservato nel *typus*.

Flora Iberica (CASTROVIEJO *et al.,* 1986) discrimina alla prima dicotomia *O. lusitanicum* dalle altre 3 specie per il rapporto fra lunghezza e larghezza della lamina sterile superiore a 3,5, ma dallo studio morfometrico condotto nell'ambito della presente ricerca risultano valori molto diversi, in un range che va da 3,5 a 20,0 per *O. lusitanicum*, da 2,0 a 8,0 per *O. azoricum* (da 3,0 a 8,0 per il *typus*) e da 1,25 a 5,26 per *O. vulgatum*. Risulta evidente anche in questo caso come questa prima dicotomia possa indurre facilmente in errori, portando ad indicare come *O. lusitanicum* tutti gli *O. azoricum* con la lamina stretta, anche perché le altre definizioni della dicotomia non aiutano a discriminare ulteriormente. Infatti, entrambe le specie hanno una lamina oblungo-lanceolata e ornamentazione delle spore non reticolata, ma foveolata o più o meno irregolarmente foveo-reticolata (FERRARINI *et al.,* 1986**)**.

Sia in *Flora Iberica* (CASTROVIEJO *et al.,* 1986) che in SALVO TIERRA (1990) e PRELLI (2001), viene utilizzato come carattere diagnostico il fatto che la lamina sterile sia sessile o picciolata, un carattere

osservabile solo quando è presente lo sporoforo e difficilmente valutabile per le forme estreme di *O. lusitanicum* con lamina lineare, molto sottile.

Infine, il numero di sporangi per lato indicato per *O. vulgatum* in *Flora Iberica* (CASTROVIEJO *et al.,* 1986), (15)18-45(50), e analogamente da MARCHETTI (2004), 15-50, non corrisponde a quelli rilevati: (10)23-33(48). Stessa discordanza si osserva per *O. azoricum* per cui il *range* indicato in *Flora Iberica*, (2)5-21(23), non corrisponde, soprattutto per i valori inferiori, ai dati rilevati: (9)11-14(21).

Caratteristica comune a tutte le chiavi analizzate è la presenza di 1-pochi caratteri per discriminare fra le 3 specie, ma come abbiamo visto questo non è possibile. Abbiamo provato, quindi, a stilare una proposta epr una nuova chiave dicotomica che va a considerare i caratteri evidenziati come realmente diagnostici, utilizzando i range di misure ottenuti nella presente ricerca.

Chiave per la determinazione delle specie italiane del genere *Ophioglossum*

1. Larghezza massima della lamina sterile > 1,7 cm..... 2.
1. Larghezza massima della lamina sterile ≤ 1,7 cm ..... 3.
2. Generalmente una sola fronda, lamina sterile ovata o largamente lanceolata, con base ampia, rotonda e con, numero di sporangi per lato ≥ 21..... *O. vulgatum*
2. Generalmente una o due fronde, lamina sterile da lanceolata a strettamente ovata, con base cuneata e con larghezza massima > 1,7 cm, numero di sporangi per lato < 21..... *O. azoricum*
3. Larghezza massima della lamina sterile < 0,3 cm..... *O. lusitanicum*
3. Larghezza massima della lamina sterile compresa fra 0,3 e 1,7 cm (estremi compresi) ..... 4.
4. Larghezza massima della lamina sterile 0,5-1 cm (estremi non compresi) ..... *O. azoricum*
4. Larghezza massima della lamina sterile non come sopra (0,3-0,5 cm oppure 1-1,7 cm estremi compresi)..... 5.
5. Larghezza massima della lamina sterile 1-1,7 cm (estremi compresi) ..... 6.
5. Larghezza massima della lamina sterile 0,3-0,5 cm (estremi compresi) ..... 7.
6. Base della lamina ampia e rotonda ..... *O. vulgatum*
6. Base della lamina cuneata..... *O. azoricum*
7. Numero di sporangi per lato < 9..... *O. lusitanicum*
7. Numero di sporangi per lato ≥ 9..... 8.
8. Rapporto larghezza/lunghezza della lamina sterile < 0,20..... *O. lusitanicum*
8. Rapporto larghezza/lunghezza della lamina sterile ≥ 0,20..... *O. azoricum*

5.2. Potenzialità della riproduzione *in vitro* per lo studio del ciclo riproduttivo

Sono stati ottenuti risultati da tutte le specie studiate, in particolare, la riproduzione *in vitro* ha dato buoni risultati per *Osmunda regalis* (Par. 4.2.2. e 4.2.3.) e *Dryopteris tyrrhena* (Par. 4.3.3. e 4.3.4.) riuscendo ad ottenere sporofiti delle 2 specie, sia utilizzando spore fresche che spore raccolte da saggi d'erbario. Nel caso di *Ophioglossum vulgatum*, la sperimentazione ha portato all'osservazione delle

prime fasi gametofitiche (Par. 4.1.4.), risultato di grande importanza data l'estrema difficoltà di riprodurre *in vitro* specie del genere *Ophioglossum* (WHITTIER, 1965; 1981), che potrà indirizzare meglio le future ricerche.

La riproduzione *in vitro* delle specie studiate è stata intrapresa per vari ordini di motivi. Innanzitutto per testare i protocolli disponibili in letteratura, e in qualche caso per sperimentare eventuali modifiche suggerite dall'ecologia della specie, o per definire nuovi protocolli specie-specifici, così da ottenere sporofiti da conservare *ex situ* senza intaccare le popolazioni naturali. Oltre a questa che è la finalità primaria, la riproduzione in laboratorio è un ottimo metodo per osservare e studiare tutte le fasi del ciclo riproduttivo (DYER, 1979b), cosa praticamente impossibile in natura, così da poterne valutare criticità o potenzialità dal punto di vista della conservazione ed evidenziare eventuali fattori intrinseci di rischio legati, per esempio, a difficoltà germinative o di sviluppo, o alle esigenze ecologiche delle varie fasi.

5.2.1. Studio della biologia riproduttiva e dell'ecologia dei gametofiti

La riproduzione di *Osmunda regalis* ha evidenziato la grande velocità di germinazione delle spore clorofilliane, in condizioni idonee di umidità e temperatura, condizioni che soddisfano anche le esigenze ecologiche delle successive fasi gametofitiche. Infatti, come già detto le spore clorofilliane sono caratterizzate da una scarsa longevità, con una perdita rapida di vitalità direttamente correlata con la loro disidratazione (Par. 2.4.2.). Essendo metabolicamente attive, possono germinare subito se trovano un substrato favorevole con umidità sufficiente a mantenerne il giusto livello di idratazione (circa il 17% secondo LLOYD, KLEKOWSKI, 1970), ma morire entro pochi giorni o settimane in condizioni avverse. Le spore clorofilliane, infatti, non vanno ad incrementare la banca-spore del suolo, come accade per le spore dormienti che possono germinare dopo mesi o anni. Se l'elevata specificità delle spore clorofilliane di *O. regalis* per habitat o microhabitat umidi costituisce il principale fattore limitante per la sua distribuzione in natura, d'altra parte è proprio questa caratteristica che fornisce garanzie di successo per le successive fasi di sviluppo del gametofito, che presenta analoghe esigenze ecologiche. Infatti, non presentando fase filamentosa, ma una crescita laminare fino dalle prime divisioni cellulari dopo la germinazione, risulta estremamente inadatto a tollerare stress idrici.

Durante le prove di germinazione effettuate per testare e confrontare le varie condizioni di conservazione delle spore (Par. 4.2.4.), in alcune colture è stata osservata una propagazione gametofitica per gemmazione, fenomeno di riproduzione vegetativa descritto in *Psilotum* (HUGHES, 1971), *Botrychium* (FARRAR, JOHSON-GROH, 1990) e nei gametofiti delle *Grammitidaceae* (STOKEY, ATKINSON, 1958; FARRAR, 1967), *Hymenophyllaceae* (STOKEY 1948) e *Vittariaceae* (BRITTON, TAYLOR, 1902; FARRAR, 1974; 1978), ma osservato per la prima volta in *Osmunda regalis* nel 1997, in particolari

condizioni colturali. Infatti, l'unico lavoro che riporta dati di propagazione vegetativa per gemmazione in questa specie (FERNÁNDEZ *et al.,* 1997) specifica che il fenomeno si era verificato solo nelle colture di gametofiti omogeneizzati (pratica utilizzata nella riproduzione industriale per velocizzare il processo), con l'aggiunta di saccarosio (1-5%) nel terreno colturale. Nel nostro caso, invece, il terreno colturale non era stato addizionato con saccarosio e l'unica differenza rispetto a tutte le altre prove effettuate è la tipologia di conservazione delle spore: conservate in *vials* con terreno minerale KNOP agarizzato (conservazione WET; Par. 3.6.1.) a T = +5°C. Saranno necessarie ulteriori ricerche per capire quale possa essere stato il fattore di induzione e per studiare meglio il fenomeno che nel presente lavoro ha mostrato caratteristiche diverse rispetto a quanto riportato in letteratura. Infatti, le gemme si sono sviluppate su tutto il margine dei gametofiti e non solo nella zona meristematica apicale (FERNÁNDEZ *et al.,* 1997).

Le prove di riproduzione *in vitro* effettuate con le spore di *Dryopteris tyrrhena* hanno dato risultati interessanti, che hanno consentito di conoscere meglio la biologia riproduttiva di questa specie così rara, e hanno indirizzato le successive fasi della ricerca.

I risultati delle prove effettuate con le spore provenienti dalla popolazione di Riomaggiore hanno mostrato, in genere, percentuali di germinazione piuttosto basse, ma con un tasso di sopravvivenza molto alto nelle successive fasi di sviluppo gametofitico. Le prove hanno mostrato sia lo sviluppo di gametangi sui gametofiti, che la possibilità di una via alternativa al normale ciclo riproduttivo sessuale, quale la riproduzione apogama (Par. 4.3.3. e 4.3.4.) (MAGRINI, SCOPPOLA, 2009; 2010a). Per definire la tipologia di apogamia, obbligata o facoltativa, sono state analizzate le condizioni di coltura che hanno portato ad una riproduzione apogama, escludendo tutti i possibili fattori di induzione noti in letteratura (Par. 3.5.7.). L'esclusione della presenza di questi fattori di induzione, insieme alla totale assenza di gametangi sui gametofiti potrebbero far propendere verso la definizione di apogamia obbligata, ma rimane non verificabile a posteriori la possibile responsabilità della produzione di etilene nelle colture *in vitro*. Per riuscire a definire meglio il tipo di apogamia osservato sono state effettuate nuove prove, più mirate, dove sono stati eliminati tutti i fattori noti di induzione e un fattore potenziale non citato in letteratura, la sterilizzazione superficiale. Su entrambi i terreni utilizzati, le colture hanno seguito *trend* di sviluppo simili, con basse percentuali di germinazione, intorno al 4%, crescita gametofitica regolare e produzione di gametangi sui gametofiti dopo circa 3 mesi dalla germinazione, senza alcuna produzione di gemme apogame. I risultati di questa prova testimoniano la capacità di riproduzione sessuale della popolazione di Riomaggiore, escludendo, quindi, l'apogamia obbligata. Il comportamento apogamo può essere stato indotto dallo stress causato dalla sterilizzazione superficiale delle spore, procedura standard per la riproduzione *in vitro*, che però può causare sia l'allungamento che la modificazione di alcune fasi del normale ciclo riproduttivo.

I risultati delle prove effettuate con le spore provenienti dalla popolazione dell'Isola di Capraia evidenziano molte criticità legate alle varie fasi del ciclo riproduttivo. Infatti, nonostante la percentuale di germinazione prossima al 100%, la prolungata e prevalente crescita filamentosa, nella quasi totalità delle prove effettuate, ha prodotto protonemi aberranti con grosse cellule globose, dalla morfologia irregolare, con una crescita marcatamente disorganizzata (Fig. 4.37) e un tasso di mortalità di oltre il 40%. Meno del 50% dei protonemi sopravvissuti si è sviluppato in gametofiti laminari e poi in protalli cordati; di questi solo il 30% ha prodotto gametangi. Nonostante il continuo apporto di acqua per stimolare il rilascio degli spermatozoidi, il numero degli sporofiti prodotti dopo più di un anno dalla germinazione è rimasto estremamente basso e la loro crescita decisamente lenta (Fig. 4.37), tanto che risultano ancora dipendenti troficamente dai gametofiti.

Il tentativo di indurre un comportamento apogamo nelle spore di questa popolazione non ha dato risultati. In particolare, sono state testate 2 percentuali di saccarosio che hanno causato da subito forti inquinamenti da funghi e lieviti nelle colture di spore non sterilizzate, bloccandone la germinazione e lo sviluppo. In tutte le colture di spore sterilizzate la percentuale di gametofiti cordati è molto bassa e la maggior parte dei protalli mostra una morfologia aberrante, filamentosa o nastriforme, ma in quelle con substrato addizionato con saccarosio è stata osservata una continua ed esclusiva crescita filamentosa, indicando come la combinazione dei due fattori possa inibire completamente lo sviluppo laminare (Fig. 4.42). Andando a confrontare i risultati ottenuti alle due temperature di coltura nei primi 90 giorni dalla semina (cioè fino alla rottura del frigotermostato che ha provocato la morte di tutte le colture incubate a T = +24°C) possiamo osservare per T = +24°C i minori tempi di germinazione e la maggior velocità di sviluppo delle varie fasi gametofitiche. Infatti, mentre le colture a 20°C sono rimaste bloccate nella fase laminare per altri 50-60 giorni prima di passare alla fase cordata, quelle a 24°C hanno sviluppato gametofiti cordati entro 10 giorni, raggiungendo la maturità dopo ulteriori 40 giorni, a meno di 3 mesi dalla semina (Fig. 4.44 e Tab. 4.11). L'analisi degli effetti della sterilizzazione superficiale evidenzia una germinazione più veloce delle spore sterili e mediamente un minor tempo per lo sviluppo di gametofiti laminari, ma con una percentuale estremamente bassa di sviluppo di gametofiti cordati, mentre la maggior parte dei protalli ha continuato a crescere mostrando morfologia aberrante, filamentosa o nastriforme (Fig. 4.43 e Fig. 4.46). Solo nelle colture di spore non sterilizzate è stato osservato uno sviluppo normale dei gametofiti cordati (Fig. 4.46).

I risultati di queste prove hanno evidenziato preferenze colturali che contribuiscono a definire un protocollo migliore per la riproduzione *in vitro*, utilizzando una temperatura di +24°C, in assenza di saccarosio e, quando possibile, senza sterilizzazione superficiale.

Se la popolazione di Capraia dovesse seguire in natura lo stesso trend di sviluppo che ha mostrato *in vitro*, questi risultati potrebbero aiutarci a spiegare la sua distribuzione puntiforme sull'isola, dove

cresce fra le rocce assolate del Vado del Capo, in secca per la maggior parte dell'anno come gli altri piccoli corsi d'acqua dell'isola. Infatti, nonostante l'alta capacità germinativa mostrata dalle spore coltivate *in vitro*, è stata evidenziata la criticità della fase gametofitica, sia per le basse percentuali di successo che per la sua durata prolungata. In particolar modo, le prime fasi di sviluppo gametofitico (cioè fino alla maturità) sono le fasi più sensibili del ciclo riproduttivo, perché richiedono un livello costante e piuttosto alto di umidità del substrato, a causa della mancanza o scarsa competenza dei rizoidi ancora in formazione. Questa fase, che *in vitro* ha avuto una durata di circa 3-4 mesi, si estende in natura proprio durante tutto il periodo estivo quando il greto del torrente è totalmente asciutto. Sembra plausibile, quindi, ipotizzare una mortalità gametofitica molto maggiore rispetto a quella, già alta, osservata *in vitro*, e che questa caratteristica del ciclo riproduttivo possa essere uno dei fattori che limitano la capacità di colonizzazione di questa specie sull'isola. Al contrario, la popolazione di Riomaggiore risulta potenzialmente più adattata ad ambienti aridi, a causa della possibilità di produrre embrioni in modo apogamo e della maggior velocità di formazione degli sporofiti stessi che la rendono capace di vivere e riprodursi anche in assenza di acqua.

Per la riproduzione asimbiotica *in vitro* di *Ophioglossum vulgatum* sono stati utilizzati diversi terreni di coltura, descritti nel Par. 3.5.1., accomunati dalla presenza di saccarosio, per sostituire il fungo micorrizico nella sua funzione trofica. Le prove effettuate utilizzando i 2 terreni citati in letteratura non hanno dato alcun risultato a 9 mesi dalla semina, mentre sono stati osservati i primi gametofiti tuberosi, in terreni come BM-1 *Terrestrial Orchid Medium* (VAN WAES, 1984), utilizzato con successo per la riproduzione asimbiotica *in vitro* di orchidee terrestri (RASMUSSEN, 1995; SGARBI, 2001; SGARBI *et al.,* 2007; DUTRA *et al.,* 2008; KAUTH *et al.,* 2008; MAGRINI *et al.,* 2009) con le quali le *Ophioglossaceae* condividono la micoeterotrofia, e in BM-1P, una sua variante. La prova è ancora in corso, quindi non disponiamo di risultati definitivi, ma i primi dati portano a confermare la possibilità che la germinazione asimbiotica anche in questa famiglia, sia inibita dai nitrati, ma non sembra essere stimolata dall'ammonio, come invece è riportato in lavori specifici (WHITTIER, MOYROUD, 1993; WHITTIER, 2000), ma, piuttosto, dalla presenza di azoto esclusivamente in forma organica, come per le *Orchidaceae*.

Questi primi risultati aprono molte nuove possibilità di ricerca in questo campo in cui non sono ancora stati raggiunti risultati soddisfacenti.

5.2.2. Vantaggi ecologici e problematiche legate alle vie alternative al normale ciclo riproduttivo

La gemmazione osservata in *Osmunda regalis*, come varie altre anomalie del normale ciclo riproduttivo, può portare alcuni vantaggi dal punto di vista ecologico. Nel caso specifico, aumenta enormemente la possibilità di sviluppo di nuovi sporofiti per spora: infatti, normalmente, ogni spora germinata genere un gametofito, dal quale non si sviluppano più di 1-2 sporofiti. La gemmazione, porta invece alla

produzione di decine di gametofiti da cellule meristematiche marginali del gametofito stesso, aumentando così il numero di sporofiti che si possono sviluppare a partire da ogni spora germinata. È da notare che tramite gemmazione si formano gametofiti geneticamente identici al gametofito di partenza, che produrranno però sporofiti diversi dal punto di vista genetico. Infatti, la gemmazione può favorire la fecondazione intergametofitica dal momento che vengono prodotti solo gametofiti maschili che si disperdono poi nell'ambiente circostante, evitando gli effetti negativi dell'*inbreeding* (BRITTON, TAYLOR, 1902; EMIGH, FARRAR, 1977; KLEKOWSKI, 1969).

Sicuramente questo fenomeno presenta caratteristiche e potenziali vantaggi nella riproduzione *in vitro*, dove le condizioni rimangono ottimali per tutta la durata del ciclo riproduttivo, ma, probabilmente, in natura questi vantaggi non sono così marcati. Non ci risultano dati sulla gemmazione di gametofiti di *Osmunda regalis* in natura, ma confrontando i dati relativi ad altre specie con le osservazioni effettuate *in vitro* nell'ambito della presente ricerca, possiamo dire che il gametofito dà inizio alla gemmazione dopo aver raggiunto la maturità, quindi lo sviluppo dei nuovi gametofiti risulta posticipato di circa 2 mesi rispetto al momento della germinazione. Così, viene ad allungarsi, fino a raddoppiarsi, la durata della fase gametofitica, la fase più sensibile alla disidratazione e alle fluttuazioni ambientali.

L'apogamia, che consiste nella produzione di sporofiti da cellule somatiche del gametofito, è un fenomeno frequente fra le pteridofite (RAGHAVAN, 1989; PARIHAR, 1996): può essere facoltativa, con la produzione di "gemme apogame" su gametofiti con gametangi, oppure obbligata, come riportato per *Dryopteris affinis* (MENÉNDEZ *et al*. 2006). È una via alternativa al normale ciclo riproduttivo che offre moli vantaggi sia in natura che *in vitro*, tanto che esistono molti studi per l'identificazione di possibili fattori di induzione in un gran numero di specie, soprattutto a scopi commerciali. Infatti, la possibilità di produrre embrioni in modo apogamo, riduce enormemente i tempi di formazione degli sporofiti stessi, costituendo un vantaggio notevole per la riproduzione a scopo vivaistico. Questa tipologia di riproduzione offre gli stessi vantaggi anche in natura, ma alla grande velocità di formazione e sviluppo degli sporofiti si aggiunge un grande vantaggio ecologico, la possibilità di svincolarsi dalla necessità di acqua per la riproduzione. Questo rende le specie apogame estremamente adattate ad ambienti aridi.

Gli sporofiti apogami hanno mostrato caratteristiche tipiche, come la fronda pennata, come quella adulta, la vernazione circinnata, la crescita rapida, l'emancipazione precoce dal gametofito. Oltre a queste è stata osservata una caratteristica non nota in letteratura: l'assenza di geotropismo. È stato osservato, infatti, che le fronde continuano a crescere nella stessa direzione con cui si sviluppano dalla gemma apogama, spesso allungandosi verso il basso all'interno del terreno agarizzato (Fig. 4.39). Serviranno ulteriori prove per definire se questa sia una caratteristica comune a tutti gli sporofiti di origine apogama e se la crescita verso l'alto sia dovuta solo a fototropismo.

5.2.3. Criticità e potenzialità della riproduzione *in vitro* da *exsiccata* per la conservazione di specie a rischio

È nota in letteratura la possibilità di utilizzare materiale vegetale prelevato da saggi d'erbario per studi genetici e sono molti i lavori che forniscono dati di longevità e di vitalità dei semi dopo lunghi periodi di conservazione in erbario. *Penstemon angustifolius* Nutt. ex Pursh (FREEMAN, 1983) e alcune specie di *Malvastrum* (HILL, 1983) sono stati riprodotti *in vitro* da semi di *exsiccata* raccolti rispettivamente 22 e 46 anni prima, per avere materiale per studi cromosomici. Sono noti dati di germinazione di semi di *Astragalus neglectus* (Torr. & Gray) Sheldon raccolti da saggi d'erbario di 97 anni (BOWLES *et al.,* 1993), semi di *Nelumbo nucifera* Gaertn. germinati dopo 100-200 anni (MORENO CASASOLA, 1996) e di alcune Leguminose arboree, *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit dopo 99 anni, *Senna bicapsularis* (L.) Roxb. dopo 115 anni, *Albizia julibrissin* Durazz. dopo 149 e *Senna multijuga* (L.C. Rich.) Irwin & Barneby dopo 158 (WILLAN, 1987). Questo può essere un metodo utile per riprodurre specie che sono a rischio o estinte in natura, almeno a livello locale, come è stato fatto in Spagna per una specie minacciata, *Limonium thiniense* Erben (LLEDÓ *et al.,* 1996), e, più recentemente, per *Linaria lamarckii* Rouy, una specie endemica spagnola estinta in natura (RENPA, 2007), così da pianificare la sua reintroduzione usandone germoplasma autoctono.

A fronte di un'ampia letteratura e di ricerche recenti sulle spermatofite, ad oggi solo pochi studi degli anni '80 forniscono dati sulla vitalità di spore non clorofilliane provenienti da collezioni d'erbario. JONHSON (1985) riporta che le spore di alcune specie di *Marsilea* mantengono la capacità germinativa dopo 99-100 anni e WINDHAM et al. (1986) forniscono dati di germinazione per spore di 50 anni di *Pellaea truncata* Goodding. Tale longevità è abbastanza comune per specie con spore non clorofilliane che vivono in habitat xerici, mentre specie mesofile, come *Cystopteris protrusa* (Weath.) Blasdell e *Woodsia obtusa* (Spr.) Torrey, perdono la capacità di germinare dopo pochi anni (WINDHAM, HAUFLER, 1986). Così, nell'ambito della presente ricerca è stata intrapresa la riproduzione *in vitro* da spore raccolte da *exsiccata* di *Osmunda regalis* e *Dryopteris tyrrhena,* con la finalità comune di testare la possibilità di riprodurre le due specie limitando la raccolta di spore in natura e di valutare le difficoltà legate a tale metodo.

Sicuramente, la prima difficoltà rilevata è la frequente assenza di spore nei saggi, sia per la raccolta di fronde non sporificate che con sporangi troppo maturi e aperti; ma anche per la raccolta di fronde con sporangi immaturi e chiusi che possono contenere spore con vari livelli di maturità oppure non vitali.

Dalle colture delle spore di 10 saggi diversi di UTV, FI e SIENA, sono stati ottenuti risultati di germinazione solo da 2 saggi di UTV del 1989 e del 2001, dopo, rispettivamente, 17 e 5 anni di conservazione in erbario (MAGRINI *et al.,* 2007; 2010c). Come si può vedere dai dati riportati nel Par. 4.2.3. (Tab. 4.7), le spore prelevate da *exsiccata* presentano basse percentuali di germinazione (<1% per

UTV 15510, 2% per UTV 16791) e tempi di germinazione molto più lunghi rispetto a quelli registrati da campioni freschi, 20 giorni dalla semina per le spore del 2001 e oltre 30 per quelle del 1989, rispetto ai 2-4 giorni impiegati dalle spore fresche, mentre i tempi di sviluppo di gametofiti e sporofiti non mostrano differenze significative. Questi dati sono una conferma del fatto che la velocità di germinazione è fortemente correlata con l'età delle spore (GERHARDT, 1927; LLOYD, KLEKOWSKI, 1970; WINDHAM *et al.,* 1986; RAGHAVAN, 1989).

Dal momento che non esistono dati in letteratura sulla riproduzione da *exsiccata* di specie con spore clorofilliane, i risultati ottenuti nella presente ricerca sono di grande interesse, specialmente se comparati con gli studi precedenti (LAGERBERG, 1908; OKADA, 1929; LLOYD, KLEKOWSKI, 1970), soprattutto GERHARDT (1927) che fornisce dati di germinazione per spore conservate fino ad un massimo di 150 giorni a temperatura ambiente. I risultati ottenuti forniscono, inoltre, nuove informazioni sulla vitalità delle spore clorofilliane e sulla loro potenziale longevità in condizioni idonee, dati utili per indirizzare la ricerca delle migliori condizioni e procedure per la conservazione a lungo termine in banche del germoplasma.

La coltura di spore di *Dryopteris tyrrhena* raccolte nell'erbario VAL, provenienti dalla Sierra Nevada, e raccolte nell'erbario SIENA, provenienti dalla Liguria, ha dato buoni risultati. In particolare, sono germinate spore del 1988 di VAL, dopo 21 anni di conservazione, e spore del 1978, 1981 e del 1998, dopo, rispettivamente, 31, 28 e 11 anni di conservazione nell'erbario SIENA. Anche per questa specie con spore dormienti, le prove hanno mostrato tempi di germinazione mediamente più lunghi rispetto alle spore fresche (Par. 4.3.5.), pari a circa 16-18 giorni per quelle di SIENA e di 11 giorni per quella di VAL (a 20°C), non mostrando però alcuna correlazione fra età delle spore e tempo di germinazione. Mediamente sono state registrate percentuali di germinazione maggiori rispetto a quelle osservate per *Osmunda regalis*, intorno all'11% per le spore della Sierra Nevada e fino al 18% per quelle di SIENA, per le quali sono state osservate tutte le fasi del ciclo riproduttivo, fino ad ottenere i primi sporofiti per via sessuale dopo circa 4 mesi dalla semina di spore.

Questi risultati confermano la possibilità di servirsi del germoplasma conservato negli erbari per ottenere nuove piante da utilizzare come materiale di studio (per studi morfologici, di filogenesi molecolare o analisi sulla diversità genetica) o per la conservazione *ex situ in vivo*, senza intaccare le popolazioni naturali con la raccolta di piante o di spore; ma soprattutto per eventuali reintroduzioni in natura, sia per il restauro della diversità genetica in popolazioni piccole o in continuo declino, che in caso di scomparse locali.

I fattori che incidono sulla vitalità delle spore (clorofilliane e non) sono piuttosto chiari (Par. 2.4. e 2.5.4.), ma si sa ancora poco circa le effettive cause di declino della longevità delle spore conservate negli erbari. A parte le cause legate alle loro caratteristiche biologiche, sembra che la tipologia di

trattamento utilizzato per ridurre le infestazioni di insetti sia il più importante fattore di controllo della longevità che declina rapidamente in campioni d'erbario trattati con microonde, con metodi chimici o trattamenti termici eccessivi, mentre l'esposizione a basse temperature sembra avere pochi effetti negativi sulle spore dormienti (HILL, 1983; BACCI et al. 1985; WINDHAM et al. 1986; WINDHAM, HAUFLER, 1986) e, come dimostrato nella presente ricerca, anche su quelle clorofilliane (MAGRINI *et al.,* 2010c).

Mentre per le spore di *Osmunda regalis* è estremamente difficile determinare quanto i trattamenti subiti o la conservazione in erbario abbiano influito sulla loro totale perdita di vitalità, per l'impossibilità di separare le cause biologiche da quelle esterne, per *Dryopteris tyrrhena* è possibile correlare la vitalità delle spore con la tipologia di conservazione in erbario e con i metodi di disinfestazione utilizzati. Infatti, non è stato ottenuto alcun risultato di germinazione dalle spore raccolte nell'erbario FI da saggi provenienti da varie località, dalla Corsica, dall'Isola d'Elba e dall'Isola di Montecristo, e raccolte in un periodo temprale compreso fra il 1900 e il 1979. Inoltre, a parità di età, le spore di SIENA del 1978-1979 provenienti da Riomaggiore hanno germinato, mentre quelle di FI del 1979 provenienti dall'Isola d'Elba non hanno dato risultati. La mancanza di vitalità delle spore raccolte in FI è stata determinata, molto probabilmente, dai trattamenti chimici con sublimato che tutti i saggi hanno subito nel passato; al contrario, tutte le spore raccolte in SIENA, dove i saggi subiscono solo trattamenti di disinfestazione tramite congelamento, hanno germinato anche dopo 32 anni di conservazione.

Nonostante queste criticità che influenzano l'efficacia e l'applicabilità del metodo, questi risultati contribuiscono ad evidenziare il grande valore degli erbari per la conservazione della biodiversità, non più solo musei, ma strutture per la conservazione *in sicco* di germoplasma vitale, con un potenziale significativo per il recupero di specie vegetali rare o minacciate, o di genotipi scomparsi in natura. L'uso di spore e semi prelevati da saggi d'erbario può risultare così di estrema importanza per il ripristino della diversità genetica in popolazioni piccole o soggette a depressione da *inbreeding* o per reintroduzioni in caso di scomparse locali usando il germoplasma autoctono (BOWLES et al. 1993).

5.3. Esiti della conservazione *ex situ* delle spore di *Osmunda regalis*

I risultati delle prove di germinazione effettuate dopo 28 mesi di conservazione di spore di *Osmunda regalis* (Par. 4.2.4.) hanno fornito varie tipologie di dati di grande utilità per valutare la miglior combinazione fra i fattori idratazione/deidratazione e temperatura e indirizzare la definizione di protocolli di conservazione a lungo termine per le spore clorofilliane.

La conservazione a lungo termine delle spore in banche del germoplasma è sicuramente un approccio semplice ed efficace per le spore, ma ad oggi le metodologie non sono ancora ben definite, soprattutto per quanto riguarda la conservazione di spore clorofilliane (Par. 2.4.). È noto che le basse temperature

prolungano la vitalità delle spore dormienti di molte Pteridofite (DYER, 1979; BALLESTEROS *et al.,* 2004; 2006), che, generalmente, hanno un basso contenuto in acqua, intorno al 5-10% (LLOYD, KLEKOWSKI, 1970). Non ci sono però sufficienti studi sulla conservazione delle spore clorofilliane, caratterizzate da una scarsa longevità (LLOYD, KLEKOWSKI, 1970; LEBKUECHER, 1997). In particolare, è noto che la vitalità delle spore delle *Osmundaceae* sia di breve durata: LAGERBERG (1908) ha mostrato che le spore di *Osmunda regalis*, conservate a temperatura ambiente, possono rimanere vitali per 2 mesi; OKADA (1929) riporta che le spore di alcune specie di *Osmunda* sono vitali solo per pochi giorni (*Osmunda cinnamomea* L. per 43-54 giorni and *Osmunda japonica* Thunb. per 23-43 giorni) e GERHARDT (1927) fornisce dati di germinazione per spore conservate fino ad un massimo di 150 giorni a temperatura ambiente, indicando una perdita totale di vitalità dopo 225 giorni. Meno del 5% di sopravvivenza è riportato per la conservazione di spore di *Osmunda regalis* e *O. claytoniana* dopo 3,5 anni a +4°C (STOKEY, 1951).

Dall'analisi dei risultati possiamo osservare, infatti, che la conservazione alle temperature comprese fra +15 e +25°C non consente la sopravvivenza delle spore, sopravvivenza non garantita nemmeno a +5°C dove tutte le spore hanno mostrato basse percentuali di sopravvivenza, 1-10%. La deidratazione e la conservazione "wet", metodi citati nella letteratura recente (PENCE, 2000; 2002; 2008), non sono risultati metodi efficaci per la conservazione di questa tipologia di spore. Al contrario, la conservazione di spore "normal", cioè che non hanno subito alcun pretrattamento né deidratazione, ha dato percentuali di sopravvivenza intorno al 40% per basse temperature (-20, -40 e -80°C), mostrando tempi di germinazione (4-5 gg), molto vicini a quelli delle spore fresche (2-4 gg) ed uno sviluppo gametofitico che sembra essere addirittura stimolato dalle basse temperature, con tempi molto inferiori sia rispetto alle spore conservate a +5°C che alle spore fresche.

PENCE (2000), riporta dati di sopravvivenza di spore disidratate di *Osmunda regalis*, dopo 18 mesi in azoto liquido, previo incapsulamento in alginato, ma la sopravvivenza di spore clorofilliane ad una temperatura di congelamento pari a -80°C senza alcun crioprotettivo non ha precedenti in letteratura e risulta difficilmente spiegabile. Infatti, secondo BALLESTEROS e WALTERS (2007a, b) gli eventuali danni causati dal congelamento in spore non clorofilliane possono essere prevenuti solo attraverso un controllo preciso del contenuto in acqua che deve rimanere all'interno di un *range* estremamente piccolo. Al contrario, i risultati della presente ricerca mostrano alte percentuali di sopravvivenza proprio per le spore che sono state stoccate a -20°C entro pochi giorni dal prelievo in natura, senza alcuna modifica nè controllo del contenuto in acqua, che secondo LLOYD e KLEKOWSKI (1970) è di circa il 17%.

Dalle prime osservazioni è stato evidente lo stato di salute delle spore, che mostravano un colore verde intenso, segno evidente della presenza di cloroplasti con clorofilla non degradata e quindi attivi, rispetto al colore marrone chiaro delle spore morte. Le aliquote di spore conservate per ulteriori 10 giorni a -40 e

-80°C hanno mostrato stessa percentuale di sopravvivenza, con una piccola differenza in quelle conservate a -80°C. Infatti, tali spore sono apparse addensate in grossi nuclei dove solo quelle al centro hanno conservato il colore verde caratteristico, mentre dalle esterne è fuoriuscito il contenuto sporale che, contenente lipidi, probabilmente ha funzionato come crioprotettivo.

Risulta chiaro che, nonostante le ricerche condotte negli ultimi anni, sono necessari ulteriori studi specifici che aiutino a comprendere più a fondo la fisiologia delle spore e i loro meccanismi di invecchiamento, allo scopo di determinare la migliore combinazione tra i fattori idratazione-deidratazione e temperatura per la conservazione a lungo termine di spore vitali.

5.4. Prospettive e limiti nell'applicazione della procedura di *Assessment* IUCN

La procedura di *assessment* intrapresa nell'ambito della presente ricerca ha portato ad assegnare a *Dryopteris tyrrhena* lo *status* di rischio *Endangered* [EN] secondo le categorie ed i criteri 3.1 (IUCN, 2001). È la prima volta che questa specie viene valutata a livello globale.

Lo stesso *status* viene assegnato anche a livello regionale in Italia (MAGRINI, SCOPPOLA, 2010b), dove era segnalata come VU nelle Liste Rosse (CONTI er al., 1997), e in Francia dove non è elencata nelle liste rosse nazionali. Il nuovo *status* va ad aggiornare anche la valutazione fatta in Spagna, dove è segnalata come CR secondo i criteri B1ab(v)+2ab(v); C2a(i), sia in passato (BAÑARES BAUDET *et al.,* 2004) che nel recente aggiornamento secondo i nuovi criteri (MORENO, 2008) dove è da escludere dalla diagnosi il criterio B2. La procedura IUCN, infatti, prevede di utilizzare un reticolo con maglia 2 x 2 km per la valutazione dell'AOO, che per la Spagna passa da 8 km^2 a 12 km^2 per il rinvenimento di una nuova stazione in Almeria che si aggiunge alle altre note (MORENO, 2008; BLANCA *et al.,* 2009).

La ricerca ha previsto varie fasi e tipologie di studio (studi palinologici, epidermologici, di biologia della riproduzione, distributivi) per ottenere tutta la documentazione richiesta dal protocollo IUCN.

La fase di aggiornamento della distribuzione è stata complicata dal fatto che in molti casi le indicazioni delle località in pubblicazioni anche molto recenti (BERNARDELLO, MARTINI, 2004; MARCHETTI, 2004; ARRIGONI, 2006) erano semplicemente citazioni derivanti o dal lavoro di descrizione della specie (FRASER-JENKINS *et al.,* 1975) o basate su vecchi saggi d'erbario, i più recenti degli anni '60, come per esempio tutte le segnalazioni per l'Isola d'Elba, Montecristo e per la Sardegna. La mancanza di dati di presenza aggiornati non può però essere sufficiente per indicare la scomparsa di subpopolazioni in tali località, per lo meno non dopo un periodo di tempo inferiore a 50 anni, pertanto non è stato possibile ridurre l'area effettivamente occupata dalla specie (AOO), che avrebbe portato comunque allo stesso status di rischio.

Per la mancanza di dati demografici pregressi e di studi di ecologia di popolazione non è stato possibile applicare i criteri A, C ed E, quindi lo *status* di rischio è stato valutato attraverso il criterio B, in

particolare il sottocriterio B2. Nonostante il calcolo dell'EOO sia stato eseguito anche con il metodo dell'*Alpha-hull*, il valore sovrastima ancora molto la superficie effettiva o potenziale, anche perché comprende vaste aree di mare. Anche l'uso di una griglia di 2x2Km consigliato dall'IUCN per il calcolo dell'AOO, va a sovrastimare il valore della superficie occupata, che comunque rimane estremamente ridotto.

La valutazione a livello regionale mostra alcuni limiti del protocollo, per esempio il calcolo dell'EOO ridotto secondo il metodo dell'*Alpha-hull*, ha consentito di applicare anche il criterio B1, confermando lo status EN. Ma il valore di EOO minore del valore soglia è stato ottenuto non considerando l'area di 3 triangoli, come consigliato dall'IUCN, comprendenti ampie aree di mare, che comprendono anche una parte del territorio corso, dove sono presenti subpopolazioni della specie. Il senso della riduzione dell'EOO, in questo modo, va a perdersi, visto che i confini dell'areale e la potenzialità di diffusione della specie non possono seguire i confini amministrativi.

Le difficoltà incontrate nel corso della procedura di *assessment* portano a focalizzare l'attenzione sulla necessità di incrementare gli studi floristici, demografici e di ecologia di popolazione, anche per le Pteridofite, nella speranza che una maggiore quantità di dati di base e di dati pregressi possa incentivare l'attività di assessment secondo i nuovi criteri, anche per questo gruppo, finora un po' trascurato e che invece mostra grandi criticità e problemi legati alla sua conservazione.

Capitolo 6.

CONCLUSIONI

Le analisi condotte nell'ambito della presente tesi di Dottorato hanno consentito di ottenere risultati importanti, che aprono nuove possibilità di ricerca in vari campi della conservazione della biodiversità pteridofitica, dalla risoluzione di criticità tassonomiche, allo studio della biologia riproduttiva alla definizione di nuovi protocolli per la conservazione *ex situ*.

Per la risoluzione delle criticità tassonomiche evidenziate nel genere *Ophioglossum* è stata sperimentata la possibilità di affiancare agli studi tradizionali, un metodo moderno come la morfometria geometrica che ha trovato molteplici applicazioni in campo antropologico, entomologico o medico, ma che è ancora poco usato in campo botanico e che non era mai stato applicato prima d'ora allo studio di Pteridofite. Lo studio ha portato a risultati interessanti: una più corretta caratterizzazione delle 3 specie italiane, grazie all'individuazione di caratteri diagnostici validi; la proposta di una nuova chiave analitica; la scoperta di 2 nuove popolazioni di *Ophioglossum azoricum* in Italia, sul Monte Pianello (Lucca) e nella Selva del Lamone (Viterbo). Questo studio non ha valore solo dal punto di vista tassonomico, ma aiuterà a comprendere e definire quale sia la reale distribuzione di *O. azoricum* e *O. vulgatum* in Italia.
La ricerca continuerà secondo varie linee:

- La revisione di tutti quei saggi che hanno mostrato valori anomali, estremi o fuori range. Questo contribuirà a definire meglio i confini fra le varie specie e a aggiornare la distribuzione di *O. azoricum* e *O. vulgatum* in Italia e in Europa;
- Incrementare il *dataset* di misure e di immagini per le analisi morfometriche con saggi provenienti da altri erbari europei così da ottenere risultati statisticamente sempre più validi;
- Allargare lo studio anche ad altre tipologie di analisi. Infatti, in collaborazione con il Dipartimento di Biologia Vegetale dell'Università di Pisa e con il Laboratorio di Pteridologia dell'Università di Ghent, sono in corso analisi quantitative sul DNA attraverso la citometria a flusso, che potranno chiarire la posizione tassonomica delle popolazioni europee indicate come *O. azoricum*.

La riproduzione *in vitro* di *Osmunda regalis* e di *Dryopteris tyrrhena* non solo ha consentito di ottenere sporofiti da conservare *ex situ in vivo* senza intaccare le popolazioni naturali, ma si è rivelata uno strumento potente per lo studio del ciclo riproduttivo: ha consentito di valutarne le potenzialità o

criticità dal punto di vista conservazionistico, evidenziando, per esempio, eventuali fattori intrinseci di rischio, e ha contribuito a definire le esigenze ecologiche delle specie studiate, non limitandosi allo sporofito, ma considerando tutte le fasi del ciclo riproduttivo.
In particolare, le prove di riproduzione *in vitro* effettuate con le spore di *Dryopteris tyrrhena* hanno consentito di conoscere meglio la biologia riproduttiva di questa specie così rara: per la popolazione dell'Isola di Capraia hanno evidenziato molte criticità legate alle varie fasi del ciclo riproduttivo, che giustificano la sua distribuzione puntiforme sull'isola; nella popolazione ligure hanno evidenziato l'esistenza di una via alternativa al normale ciclo riproduttivo sessuale, la riproduzione apogama, e i vantaggi che ne derivano in termini di velocità di sviluppo e di maggior adattamento all'aridità.
Sono stati ottenuti risultati preliminari dalle prove di riproduzione asimbiotica *in vitro* di *Ophioglossum vulgatum*, anche se tuttora in corso, con l'osservazione dei primi gametofiti tuberosi sviluppatisi su BM-1 e BM-1P, terreni specifici per la riproduzione asimbiotica *in vitro* di orchidee terrestri con le quali le *Ophioglossaceae* condividono la micoeterotrofia. Questi primi risultati sono di grande interesse data l'estrema difficoltà di riprodurre *in vitro* specie del genere *Ophioglossum* e aprono la strada a molte nuove ricerche in questo campo che ancora non ha dato risultati soddisfacenti.

Nell'ambito della presente tesi è stata verificata la possibilità di riprodurre *Osmunda regalis* e *Dryopteris tyrrhena* da spore provenienti *exsiccata*. In particolare, è stata riprodotta *D. tyrrhena* da spore della Sierra Nevada, dopo 21 anni di conservazione nell'erbario VAL, e da spore provenienti dalla Liguria, dopo 28-31 anni di conservazione nell'erbario SIENA. Inoltre, per la prima volta, è stata riprodotta *in vitro* da *exsiccata* una specie con spore clorofilliane, *O. regalis,* dopo 5 anni di conservazione nell'erbario UTV. I risultati, nonostante le basse percentuali di germinazione e alcuni limiti del metodo, indicano questa tipologia di riproduzione come un buon metodo per la conservazione di specie a rischio, per il ripristino della diversità genetica in popolazioni piccole o soggette a depressione da *inbreeding* o per reintroduzioni in caso di scomparse locali usando il germoplasma autoctono; contribuiscono, inoltre, ad evidenziare il grande valore degli erbari per la conservazione della biodiversità, non più solo musei, ma strutture per la conservazione *in sicco* di germoplasma vitale.

Le prove di conservazione delle spore di *Osmunda regalis* hanno contribuito alla definizione di un protocollo per la conservazione a lungo termine di spore clorofilliane in banche del germoplasma. In particolare, l'aver osservato la sopravvivenza (con percentuali intorno al 40%) di spore clorofilliane non deidratate a temperature di congelamento pari a -20°C (per 28 mesi), -40°C e -80°C (per ulteriori 10 giorni) senza alcun crioprotettivo non ha precedenti in letteratura. La ricerca è tuttora in corso e procederà con ulteriori prove di sopravvivenza e di germinazione, dopo periodi maggiori di stoccaggio

alle varie temperature, fornendo altri dati per la sperimentazione. Appare chiara, però, la necessità di ulteriori studi specifici che aiutino a comprendere più a fondo la fisiologia delle spore e i loro meccanismi di invecchiamento, allo scopo di determinare la migliore combinazione tra i fattori idratazione-deidratazione e temperatura per la conservazione a lungo termine di spore vitali.

La procedura di *assessment* ha portato ad assegnare a *Dryopteris tyrrhena* lo *status* di rischio *Endangered* [EN] secondo le categorie ed i criteri IUCN 3.1 (2001), sia a livello globale (valutata per la prima volta) che a livello regionale, in Italia, dove era segnalata come *Vulnerabile* nelle Liste Rosse del 1997. Oltre a questo risultato, la procedura ha previsto studi e approfondimenti di vario genere, che hanno consentito di ottenere un quadro completo di conoscenze sulla specie. Le difficoltà incontrate nell'applicazione della procedura evidenziano la necessità di incrementare gli studi pteridologici (in particolare, di cartografia floristica e di ecologia di popolazione), nella speranza che una maggiore quantità di dati pregressi possa facilitare e incentivare l'attività di *assessment* secondo i nuovi criteri per altre specie di questo gruppo così antico che mostra grandi criticità e problemi di conservazione, ma che è decisamente sottorappresentato nelle attuali liste rosse.

Capitolo 7

BIBLIOGRAFIA

ABBATE G., SCOPPOLA A., 2005 - *Diversità floristica e specie "critiche" in Italia.* Atti dei Convegni Lincei "Estinzioni di massa e biodiversità", 4 giugno 2004.

ABBIT R.J.F., SCOTT J.M., WILCOVE D.S., 2000 - *The geography of vulnerability: incorporating species geography and human development patterns into conservation planning*. Biol. Conserv., 96: 169-175.

ABELI T., GENTILI R., ROSSI G., BEDINI G., FOGGI B., 2009 - *Can the IUCN criteria be effectively applied to peripheral isolated plant populations?* Biodiv. Conserv., 18(14): 3877-3890.

ACCOGLI R., SCANDURA S., MARCHIORI S., 1999 - *Moltiplicazione di specie di interesse fitogeografico nell'Orto Botanico di Lecce*. Atti del 94° Congresso della Società Botanica Italiana - Ferrara: 153.

AGRAWAL D.C., PAWAR S.S., MASCARENHAS A.F., 1993 - *Cryopreservation of spores of* Cyathea spinulosa *Wall. ex. Hook. f. an endangered tree fern*. J. Plant Phys., 142: 124-126.

AKÇAKAYA H.R., 2000 - *Population viability analyses with demographically and spatially structured models*. Ecol. Bull., 48: 23-38.

AKÇAKAYA H.R., SJÖGREN-GULVE P., 2000 - *Population viability analysis in conservation planning: an overview*. Ecol. Bull., 48: 9-21.

ALESSANDRINI A., BONAFEDE F., 1996 - *Atlante della flora protetta della Regione Emilia-Romagna*. Bologna.

ANDERSSON E., 2008 - *On the identity of orchid populations: a morphometric study of the* Dactylorhiza traunsteineri *complex in eastern Sweden*. Nordic J. Bot., 14 (3): 269-275

ARAGON C.F., PANGUA E., 2004 - *Spore viability under different storage conditions in four rupicolous* Asplenium *L. taxa.* Amer. Fern J., *94(1)*: 28-38.

ARAÙJO M.B., 1999 - *Distribution patterns of biodiversity and the design of a representative reserve network in Portugal*. Divers. Distrib., 5: 151-163.

ARCAND N.N., RANKER T.A., 2008 - *Conservation biology*. In: RANKER T.A., HAUFLER C.H. (eds.), *Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes:* 257-283. Cambridge University Press, Cambridge.

ARGENTI C., LASEN C., 2004 - *Lista Rossa della flora vascolare della provincia di Belluno*. ARPAV, Belluno. 151 pp.

ARRIGONI P.V., 2006 - *Flora dell'isola di Sardegna. Vol. 1*. Carlo Delfino Editore, Sassari. 450 pp.

ATKINSON L.R., 1973 - *The gamethophyte and family relationships*. In: JERMY A.C., CRABE J.A., THOMAS B.A. (eds.), *The phylogeny and classification of the ferns*. Bot. J. Linnean Soc*.,* 67 suppl. 1: 73-90.

BACCHETTA G., BAGELLA S., BIONDI E., FARRIS E., FILIGHEDDU R., MOSSA L., 2004 - *A contribution to the knowledge of the order* Quercetalia ilicis *Br.-Bl. ex Molinier 1934 of Sardinia*. Fitosociologia, 41 (1): 29-51.

BACCHETTA G., BUENO SÁNCHEZ A., FENU G., JIMÉNEZ-ALFARO B., MATTANA E., PIOTTO B., VIREVAIRE M. (eds), 2008a - *Conservación ex situ de plantas silvestres*. Principado de Asturias/La Caixa. 378 pp.

BACCHETTA G., FENU G., MATTANA E., 2008b - *Studi di biologia della conservazione di specie vegetali endemiche della Sardegna nell'ambito del progetto "GENMEDOC"*. Webbia, 63 (2): 293-307.

BACCHETTA G., FENU G., MATTANA E., 2009 - *Individuazione di priorità e strategie di conservazione della flora a rischio di estinzione*. Atti 104° Congresso della Società Botanica Italiana - Campobasso, 16-19 settembre 2009: 165.

BACCHETTA G., FENU G., MATTANA E., PIOTTO B., VIREVAIRE M. (eds.), 2006 - *Manuale per la raccolta, studio, conservazione e gestione* ex situ *del germoplasma*. APAT - Manuali e lineee guida 37/2006. 244 pp.

BACCI M., CHECCUCCI A., CHECCUCCI G., PALANDRI M.R., 1985 - *Microwave drying of herbarium specimens.* Taxon, 34: 649-653.

BADRÉ F., DESCHATRES R., 1979 - *Les Ptéridophytes de la France, liste commentée des espècies (taxinomie, cytologie, écologie et répartition générale*. Candollea, 34: 379-457.

BALDERI F., GIOVANNINI A., 2003 - *Notule Pteridologiche Italiche: 40-41. 41.* Ophioglossum azoricum *C. Presl.* In: MARCHETTI D. (ed.), *Notule Pteridologiche Italiche. II (32-63).* Ann. Mus. Civ. Rovereto, Sez.: Arch., St., Sc. Nat., *17* (2001): 107.

BALLESTEROS D., ESTRELLES E., IBARS A.M., 2005 - *Conservación de esporas verdes de Pteridofitos en Bancos de Germoplasma. Ultracongelación como solución*. II Symposium of Plant Conservation Biology Proceedings. Jardín Botánico Atlántico. Gijón. Spain.

BALLESTEROS D., ESTRELLES E., IBARS A.M., 2006 - *Responses of Pteridophyte spores to ultrafreezing temperatures for long-term conservation in germplasm banks*. Fern Gaz., 17 (5): 293-302.

BALLESTEROS D., IBARS A.M., ESTRELLES E., 2004 - *New data about pteridophytic spore conservation in germplasm banks*. Planta Europa IV Proceedings. Valencia (España).

BALLESTEROS D., WALTERS C., 2007a - *Calorimetric properties of water and triacylglycerols in fern spores relating to storage at cryogenic temperatures*. Cryobiology, 55: 1-9.

BALLESTEROS D., WALTERS C., 2007b - *Water properties in fern spores: sorption characteristics relating to water affinity, glassy states, and storage stability*. J. Exp. Bot., 58(5): 1185-1196.

BAÑARES Á., BLANCA G., GÜEMES J., MORENO J.C., ORTIZ S. (eds.), 2004 - *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vascular Amenazada de España.* Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Madrid. 1069 pp.

BANKS J.A., 1999 - Gametophyte development in ferns. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50*: 163-186.

BATEMAN R.M., CRANE P.R., DIMICHELE W.A., KENRICK P.R., ROWE N.P., SPECK T., STEIN W.E., 1998 - *Early evolution of land plants: phylogeny, physiology and ecology of the primary terrestrial radiation*. Annual Review of Ecology and Systematics, 29: 263-292.

BATEMAN R.M., DIMICHELE W.A., 1994 - *Heterospory: the most interative key innovation in the evolutionary history of the plant kingdom*. Biol. Rev., 69: 345-417.

BEDINI G., 1996 - *I progetti degli Orti Botanici italiani per la conservazione del patrimonio vegetale*. Riv. Mus. Civ. Sci. Nat. "E. Caffi", 18: 23-30.

BEDINI G., ROSSI G., BONOMI C. (eds.), 2005 - *RIBES, la Rete Italiana di Banche del germoplasma per la conservazione Ex Situ della flora spontanea.* Atti 100° Congresso della Società Botanica Italiana. Inform. Bot. Ital., 37 (1, parte A): 114-115.

BENKERT D., 1982 - *Verbreitungskarten brandenburgischer Pflanzenarten 1. Reihe:* Ophioglossaceae *und* Pyrolaceae. Gleditschia, 9: 77-107.

BERI A., BIR S.S., 1993 - *Germination of stored spores of* Pteris vittata *L.* Amer. Fern J., 83: 73-78.

BERNARDELLO R., MARTINI E., 2004 - *Felci e piante affini in Liguria e in Italia*. Reg. Liguria. Le Mani-Microart's Edizioni, Recco-Genova. 239 pp.

BERTACCHI A., KUGLER P.C., LOMBARDI T., MANNOCCI M., MONALDI M., SPINELLI P., 2005a - *Prodromo della flora vascolare della Provincia di Livorno*. edizione ETS, Pisa. 401 pp.

BERTACCHI A., KUGLER P.C., LOMBARDI T., MONALDI M., SPINELLI P., TOMEI P.E., 2005b - *Appendice al prodromo della flora vascolare della provincia di Livorno - Prima lista di attenzione*. Edizione ETS, Pisa. 300 pp.

BGCI - BOTANIC GARDENS CONSERVATION INTERNATIONAL, 1995 - *A handbook for botanic gardens on the reintroduction of plant to the wild.* Joint publication with the IUCN Specie Survival Commission, Reintroduction Specialist Group. BGCI, Richmond, Surrey, UK.

BGCI - BOTANIC GARDENS CONSERVATION INTERNATIONAL, 2001 - *Piano d'Azione per i Giardini Botanici nell'Unione Europea*. Inform. Bot. Ital., 33 (2): 66 pp.

BHAMBIE S., MADAN P., 1982 - *Observations of the venation pattern in* Ophioglossum, Botrychium *and* Helminthostachys. Fern Gaz., 12 (4): 215-223.

BJÖRN L.O., 2007 - *Stratospheric ozone, ultraviolet radiation, and cryptogams*. Biol. Conserv., 135: 326-333.

BLANCA G., CABEZUDO B., CUETO M., FERNÁNDEZ LÓPEZ C., MORALES TORRES C. (eds.), 2009 - *Flora Vascular de Andalucía Oriental. Volumen 1:* Selaginellaceae-Ceratophyllaceae. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla. 427 págs.

BLANCA, G., CABEZUDO B., HERNÁNDEZ-BERMEJO E., HERRERA C.M., MUÑOZ J., VALDÉS B. (eds.), 1999 - *Libro Rojo de la Flora Silvestre Amenazada de Andalucía. Tomo I: Especies en Peligro de Extinción.* Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla.

BLANCA, G., CABEZUDO B., HERNÁNDEZ-BERMEJO E., HERRERA C.M., MUÑOZ J., VALDÉS B. (eds.), 2000 - *Libro Rojo de la Flora Silvestre Amenazada de Andalucía. Tomo II: Especies Vulnerables.* Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla.

BLANCA, G., CUETO M., MARTÍNEZ LIROLA M.J., MOLERO MESA J., 1998 - *Threatened vascular flora of Sierra Nevada (Southern Spain).* Biol. Conserv., 85: 269-285.

BLANCA G., LÓPEZ ONIEVA M.R., LORITE J., MARTÍNEZ LIROLA M.J., MOLERO MESA J., QUINTAS S., RUÍZ GIRELA M., VARO M.A., VIDAL S., 2002 - *Flora Amenazada y Endémica de Sierra Nevada.* Editorial Universidad de Granada y Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, Granada, Spain. 410 pp.

BLASI C., 2003. *Conservazione della biodiversità e rete ecologica d'Italia.* Atti della II Conferenza Nazionale della Aree Naturali Protette, vol. 3°: 11-12. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Teritorio. Regione Piemonte.

BLASI C., 2008 - *Presentazione*. In: ROSSI G., GENTILI R., ABELI T., GARGANO D., FOGGI B., RAIMONDO F.M., BLASI C. (eds.), *Flora da conservare. Iniziativa per l'implementazione in Italia delle categorie e dei criteri IUCN (2001)*

per la redazione di nuove Liste Rosse. Inform. Bot. Ital., 40, Suppl. 1: 9-10.

BLASI C., BOITANI L., LA POSTA S., MANES F., MARCHETTI M., 2005 - *Stato delle biodiversità in Italia. Contributo alla strategia nazionale per la biodiversità*. Palombi Editori. 466 pp.

BLASI C., RAIMONDO F.M., 2008 - *Conservazione* in situ *ed* ex situ *e* red list *della flora d'Italia*. In: ROSSI G., GENTILI R., ABELI T., GARGANO D., FOGGI B., RAIMONDO F.M., BLASI C. (eds.), *Flora da conservare. Iniziativa per l'implementazione in Italia delle categorie e dei criteri IUCN (2001) per la redazione di nuove Liste Rosse*. Inform. Bot. Ital., 40, Suppl. 1: 13-15.

BOISSIER E., 1838 - Elenchus plantarum novarum minusque cognitarum, quas in itinere hispanico legit. Geneve. 94 pp.

BONA E., 1999 - *Nuovo endemismo sulle Alpi Orobie:* Asplenium presolanense *(Mokry, Rasbach & Reichstein) J.C. Vogel & Rumsey*. Notiziario floristico del Gruppo Flora Alpina Bergamasca, 15: 14-15.

BONA E. (ed.), MARTINI F., NIKLFELD H., PROSSER F., 2005 - *Atlante corologico delle Pteridofite nell'Italia nordorientale*. Edizioni Osiride e Museo Civico, Rovereto (TN).

BONAFEDE F., DALLAI D., MAFFETTONE L., DEL PRETE C., 1999 - Marsilea quadrifolia *L. in Emilia-Romagna: distribuzione, ecologia e problematiche di conservazione integrate* in situ/ex situ. Atti del 94° Congresso della Società Botanica Italiana, Ferrara: 20.

BONAFEDE F., MARCHETTI D., TODESCHINI R., VIGNODELLI M., 2001 - *Atlante delle Pteridofite nella Regione Emilia-Romagna. Riconoscimento, distribuzione e note sull'ecologia delle Felci e piante affini in Emilia-Romagna.* Regione Emilia-Romagna, Assessorato Agricoltura, Ambiente e Sviluppo Sostenibile. Servizio Paesaggio, Parchi e Patrimonio Naturale.

BONOMI C., BERTOLLI A., CAVAGNA A., ZARA F., PROSSER F., BONAZZA A, TISI F., 2005 - *Trentino Seed Bank: la banca del germoplasma del Trentino.* Inform. Bot. Ital., 37 (1, parte A): 116-117.

BOOKSTEIN F. - 1989 - *Principal warps: Thin Plate Spline and the decomposition of the deformation*. I.E.E.E. Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 11: 567-585.

BOOKSTEIN F. - 1991 - *Morphometric tools for landmark data*. Cambridge Univ. Press.

BOWLES M.L., BETZ R.F., DEMAURO M.M., 1993 - *Propagation of rare plants from historic seed collections: implications for species restoration and herbarium management*. Restor. Ecol., 1 (2): 101-106.

BOYCE M.S., 1992 - *Population viability analysis*. Annu. Rev. Ecol. Syst., 23: 481-506.

BRITTON E.G., TAYLOR A., 1902 - *The life history of* Vittaria lineata. Mem. Torrey Bot. Club, 8: 185-211.

BROOK B.W., O'GRADY J.J., CHAPMAN A.P., BURGMAN M.A., AKÇAKAYA H.R., FRANKHAM R., 2000 - *Predictive accuracy of population viability analysis in conservation biology*. Nature, 404: 385-387.

BRUM F.R., RANDI Á.M., 2002 - *High irradiance and temperature inhibit the germination of spores of the fern* Rumohra adiantiformis *(Forst.) Ching (*Dryopteridaceae*).* Revista Brasileira de Botanica, 25(4): 391-396.

BRUMMITT R.K., 1992 - *Vascular Plant familias and genera.* Royal Botanic Garden, Kew.

BRUMMITT R.K., PANDO F., HOLLIS S., BRUMMITT N.A., 2001 - *Plant Taxonomic Database Standards Version 2.* World Geographical Scheme for Recording Plant Distributions, ed. 2. xv + 137 pp.; 17 mappe.

BRUMMITT R.K., POWELL C.E., 1992 - *Authors of plant names.* Royal Botanic Garden, Kew.

BURGMAN M.A., FERSON S., AKÇAKAYA H.R., 1993 - *Risk Assessment in Conservation Biology*. Chapman and Hall, London. 328 pp.

BURGMAN M.A., FOX J.C., 2003 - *Bias in species range estimates from minimum convex polygons: implications for conservation and options for improved planning*. Animal Conserv., 6: 19-28.

BURTON J.A., 2003 - *The context of Red Data Books, with a complete bibliography of the IUCN publications*. In: DE IONGH H.H., BÁNKI O.S., BERGMANS W., VAN DER WERFF TEN BOSCH M.J. (eds), *The Harmonization of Red Lists for Threatened Species in Europe.* Proc. Intern. Seminar Leiden, 27 and 28 November 2002, IUCN: 291-300.

CABEZUDO B., TALAVERA S., BLANCA G., SALAZAR C., CUETO M., VALDÉS B., HERNÀNDEZ BERMEJO J.E., HERRERA C.M., RODRÌGUEZ HIRALDO C., NAVAS D., 2005 - *Lista roja de la flora vascular de Andalucìa*. Junta de Andalucìa, Consejerìa de Medio Ambiente. 83 pp.

CALBI M., 2006 - *Notule Pteridologiche Italiche: 123-125. 124.* Ophioglossum azoricum C. Presl. In: MARCHETTI D. (ed.), *Notule Pteridologiche Italiche. V (111-133)*. Ann. Mus. Civ. Rovereto, Sez.: Arch., St., Sc. Nat., *21* (2005): 251.

CAMACHO F.J., LISTON A., 2001 - *Population structure and genetic diversity of B*otrychium pumicola *(*Ophioglossaceae*) based on inter-simple sequence repeats (ISSR)*. Amer. J. Bot., 88 (6): 1065-1070.

CAMLOH M., 1999 - *Spore age and sterilization affect germination and early gametophyte development of* Platycerium bifurcatum. Amer. Fern J., 89 (2): 124-132.

CAMOLETTO PASIN R., QUARANTA L., 2007 - *Coltivazione e riproduzione di entità della flora spontanea del Piemonte al Giardino botanico Rea (Trana, prov. Torino, Piemonte)*. Atti del 102° Congresso della Società Botanica Italiana. Palermo, 26-29 settembre 2007. Sicilia Foreste 34 (Suppl.): 218.

CAPPELLETTI E.M., CASSIN G., MIOTTO S., PALINI P., PIOVAN A., TACCHETTO R., 2007 - *Conservazione* ex situ *presso l'Orto Botanico di Padova di una specie italiana gravemente minacciata:* Erucastrum palustre. Atti 102° Congresso della Società Botanica Italiana - Palermo, 26-29 settembre 2007. Sicilia Foreste 34 (Suppl.): 346.

CAROTENUTO R.B., PRIMACK. L., 2003 - *Conservazione della Natura*. Zanichelli.

CASSON J., SHACKLEFORD I., PARKER L., SCHULTZ J., 2000 - *Conservation Strategy for the Goblin fern,* Botrychium mormo *W. H. Wagner*. USDA Forest Service - Eastern Region.

CASTROVIEJO S., LAINZ M., LÓPEZ G., MONTSERRAT P., MUÑOZ F., PAIVA J., VILLAR L. (eds.), 1986 - *Flora Iberica, Vol. I:* Lycopodiaceae-Papaveraceae. C.S.I.C. Madrid.

CELESTI-GRAPOW L., PRETTO F., CARLI E., BLASI C. (eds.), 2009 - Non-native flora of Italy. CD-ROM attached to: CELESTI-GRAPOW L., PRETTO F., BRUNDU G., CARLI E., BLASI C. (eds.), Plant invasion in Italy - an overview. Ministry for the Environment Land and Sea Protection - Nature Protection Directorate. Palombi & Partner S.r.l., Roma.

CELLINESE N., JARVIS C.E., PICHI SERMOLLI R.E.G., PRESS J.R., SHORT M.J., VICIANI D., 1996 - *Threatened plants of Italy. Pteridophytes*. In: PICHI SERMOLLI R.E.G., BIZZARRI M.P. (eds.), *Le Pteridofite della Lunigiana storica, delle Alpi Apuane e di altre regioni europee*: 117-145. Accademia Lunigianese di Scienza "G. Capellini".

CHÁ-CHÁ R., FERNANDES F., ROMANO A., 2005 - In vitro *spore germination of* Polysticum drepanum, *a threatened fern from Madeira Island.* J. Hort. Sci. Biotecn., 80(6): 741-745.

CHADDE S., KUDRAY G. (eds.), 2001 - *Conservation Assessment For Western Moonwort (*Botrychium hesperium*).* USDA Forest Service, Eastern Region. 37 pp.

CHANDRA S., FRASER-JENKINS C.R., KUMARI A., SRIVASTAVA A., 2008 - *A Summary of the Status of Threatened Pteridophytes of India*. Taiwania, 53(2): 170-209.

CHEFFINGS C.M., FARRELL L. (eds.), 2005 - *The Vascular Plant Red Data List for Great Britain*. Joint Nature Conservation Committee, Peterborough. Species Status, 7: 1-116.

CHENEY J., NAVARRETE NAVARRO J., WYSE JACKSON P.S. (eds.), 2000 - *Action Plan for Botanic Gardens in the European Union*. National Botanic Garden of Belgium, Meise Belgium.

CLAUSER M., BEDINI G., PERINI C., CASADIO A., 2005 - *La conservazione* ex situ *negli Orti botanici universitari della Toscana*. Inform. Bot. Ital., 37 (1, parte A): 128-129.

CONSTANTINO S., SANTAMARIA L.M., HODSON E., 2000 - *Storage and* in vitro *germination of tree fern spores*. Botanic Gardens Micropropagation News, 24: 58-60.

CONTI F., ABBATE G., ALESSANDRINI A., BLASI C. (eds.), 2005 - *An annotated check-list of the Italian vascular flora*. Palombi Editori, Roma. 420 pp.

CONTI F., ALESSANDRINI A., BACCHETTA G., BANFI E., BARBERIS G., BARTOLUCCI F., BERNARDO L., BONACQUISTI S., BOUVET D., BOVIO M., BRUSA G., DEL GUACCHIO E., FOGGI B., FRATTINI S., GALASSO G., GALLO L., GANGALE C., GOTTSCHLICH G., GRÜNANGER P., GUBELLINI L., IIRITI G., LUCARINI D., MARCHETTI D., MORALDO B., PERUZZI L., POLDINI L., PROSSER F., RAFFAELLI M., SANTANGELO A., SCASSELLATI E., SCORTEGAGNA S., SELVI F., SOLDANO A., TINTI D., UBALDI D., UZUNOV D., VIDALI M., 2007 - *Integrazioni alla checklist della flora vascolare italiana*. Natura Vicentina, 10 (2006): 5-74.

CONTI F., MANZI A., PEDROTTI F., 1992 - *Libro Rosso delle Piante d'Italia.* Roma, Ministero dell'Ambiente, Ass. Ital. per il W.W.F. Roma. 637 pp.

CONTI F., MANZI A., PEDROTTI F., 1997 - *Liste Rosse Regionali delle Piante d'Italia.* WWF Italia. Società Botanica Italiana. Università di Camerino. Camerino. 139 pp.

CORTI M., MARCUS L.F., HINGST-ZAHER E., 2000 - *Introduction to symposium: geometric morphometrics in mammology*. Hystrix, 11: 3-7.

COX J., BHATIA P., ASHWATH N., 2003 - In vitro *spore germination of the fern* Schizaea dichotoma. Scientia Horticulturae, 97: 369-378.

DALLAI D., SGARBI E., GRIMAUDO M., 2008 - *Esperienze di conservazione* in situ/ex situ *di* Senecio paludosus *L. nelle Valli di Novellara e Reggiolo (Reggio Emilia) condotte dall'Orto Botanico di Modena*. Atti del 103° Congresso della Società Botanica Italiana - Reggio Calabria, 17-19 settembre 2008: 297.

DE GRAMMONT P.C., CUARÒN A.D., 2006 - *An evaluation of threatened species categorization systems used on the American continent*. Conserv. Biol., 20: 14-27.

DEL PRETE C., ACCORSI C.A., BERTELLINI E., BULDRINI F., CRUDELE G., DALLAI D., LANDI M., MONTECCHI M.C., TORRI P., ZOCCOLA A., 2009 - *Studi sulla flora e vegetazione della Riserva Naturale dell'Isola di Montecristo (Arcipelago Toscano) - Il contingente pteridofitico*. Atti del 104° Congresso della Società Botanica Italiana. Campobasso: 220.

DE MAGGIO A.E., GREENE C., 1980 - *Biochemistry of fern spore germination*. Plant Physiol., 66: 922-924.

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. x + 110 pp.

DE PAULA FIILIPPINI E.C., DUZ S.R., RANDI Á.M., 1999 - *Light and storage on germination of spores of* Dicksonia sellowiana *(Presl.) Hook.,* Dicksoniaceae*.* Revista Brasileira de Botanica, 22(1).

DEL PRETE C., DALLAI D., SGARBI E., MAFFETTONE L., 2007 - *The Modena Botanic Garden: plant conservation and habitat management strategies*. In: GAFTA D., AKEROYD J. (eds.), *Nature Conservation. Concepts and Practice*: 369-379.

DENNIS B., MUNHOLLAND P.L., SCOTT J.M., 1991 - *Estimation of growth and extinction parameters for endangered species*. Ecol. Monogr., 61: 115-143.

DEVI Y., DEVI S., 1986 - *Effect of synthetic detergents on germination of fern spores*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 37: 837-843.

DIMICHELE W.A., SKOG J.E., 1992 - *The* Lycopsida*: A symposium*. Ann. Missouri Botanical garden, 79: 447-449.

DOBZANSKY T., 1950 - *Evolution in the tropics.* Amer. Sci., *38*: 208-221.

DOUGLAS G.E., SHEFFIELD E., 1990 - *A new technique for the culture of fern gametophytes*. Plant Cell Rep., 8: 632-634.

DOYLE J.A., 1998 - *Phylogeny of vascular plants*. Annual Rev. Ecol. Syst., 29: 567-599.

DUTRA D., JOHNSON T.R., KAUTH P.J., STEWART S.L., KANE M.E., RICHARDSON L., 2008 - *Asymbiotic seed germination,* in vitro *seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid* Bletia purpurea. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 94 (1): 11-21.

DYER A.F., 1979a - *Experimental Biology of Ferns (Experimental botany)*. London; New York: Academic Press. 657 pp.

DYER A.F., 1979b - *The culture of fern gametophytes for experimental investigation*. In: DYER A.F. (ed.), *The experimental biology of fern*: 253-305. Academic Press, London.

EAMES A.J., 1936 - *Morphology of vascular plants. Lower groups (Psilophytales to Filicales).* McGraw-Hill. New York. (US), 433 pp.

EHRENDORFER F., HAMANN U., 1965 - *Vorschläge zu einer floristischen Kartierung von Mitteleuropa*. Ber. Deutsch. Bot. Ges., 78: 35-50.

ELLIS R.H., 1988 - *The viability equation, seed viability nomographs, and pratical advice of on seed storage*. Seed Sci. Tecnol., 16: 29-50.

ELLIS R.H., ROBERTS E.H., 1980 - *Improved equations for the prediction of seed longevity*. Ann. Bot., 45: 13-30.

ELMORE H.W., WHITTIER D.P., 1975 - *The involvment of ethylene and sucrose in the inductive and developmental phases of apogamous bud formation in* Pteridium *gametophytes*. Can. J. Bot., 53: 375-381.

EMIGH V.D., FARRAR D.R., 1977 - *Gemmae: a role in sexual reproduction in the fern genus* Vittaria. Science, 198: 297-298.

ESTRELLES E., IBARS A.M., IRANZO J., MORALES F., 2001 - *Recuperación y reintroducción de* Marsilea quadrifolia *L. en los arrozales del delta del Ebro (Tarragona, España)*. Botanica Complutensis, 25: 251-259.

ENSCONET, 2009a - *ENSCONET. Curation Protocols & Recommendations*. Royal Botanic Gardens, Kew (UK). 53 pp.

ENSCONET, 2009b - *ENSCONET. Seed Collecting Manual for Wild Species*. Royal Botanic Gardens, Kew (UK) & Universidad Politécnica de Madrid (Spain). 36 pp.

FABRINI G., GRATANI L., 2005 - *Strategie di conservazione dell'Orto Botanico di Roma*. Inform. Bot. Ital., 37 (1, parte A): 432-433.

FARRAR D.R., 1967 - *Gametophytes of four tropical fern genera reproducing independently of their sporophytes in the southern Appalachians*. Science, 155: 1266-1267.

FARRAR D.R., 1974 - *Gemmiferous fern gametophytes* Vittariaceae*.* Amer. J. Bot., 61: 146-155.

FARRAR D.R., 1978 - *Problems in the identity and origin of the Appalachian* Vittaria *gametophyte, a sporophyteless fern of the Eastern United States*. Amer. J. Bot., 65: 1-12.

FARRAR D.R., 1998 - *Population genetics of moonwort* Botrychium. In: BERLIN N., MILLER P., BOROVANSKY J., SEAL U.S., BYERS O. (eds.), *Population and habitat viability assessment for the goblin fern (*Botrychium mormo*)*: 109-113. Final Report. The Conservation Breeding Specialist Group, Apple Valley, Minnesota, USA.

FARRAR D.R., DASSLER C., WATKINS J.E. Jr., SKELTON C., 2008 - *Gametophyte ecology*. *In*: RANKER, T.A., HAUFLER C.H. (eds.), *Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes:* 222-256*.* Cambridge University Press, Cambridge.

FARRAR D.R., JOHNSON-GROH C.L., 1990 - *Subterranean sporophytic gemmae in moowort ferns,* Botrychium *subgenus* Botrychium. Amer. J. Bot., 77: 1168-1175.

FERNÁNDEZ H., BERTRAND A.M., SÁNCHEZ-TAMÉS R., 1996 - *Influence of tissue culture conditions on apogamy in* Dryopteris affinis *ssp.* affinis*.* Plant Cell Tiss. Org. Cult., 45: 93-97.

FERNÁNDEZ H., BERTRAND A.M., FEITO I., SÁNCHEZ-TAMÉS R., 1997a - *Gametophyte culture* in vitro *and antheridiogen activity in* Blechnum spicant*.* Plant Cell Tiss. Org. Cult., 50: 71-74.

FERNÁNDEZ H., BERTRAND A.M., SÁNCHEZ-TAMÉS R., 1997b - *Gemmation in cultured gametophytes of* Osmunda regalis*.* Plant Cell Rep., 16: 358-362.

FERNÁNDEZ H., BERTRAND A.M., SÁNCHEZ-TAMÉS R., 1999 - *Biological and nutritional aspects involved in fern multiplication*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 56: 211-214.

FERNÁNDEZ H., REVILLA M.A., 2003 - In vitro *culture of ornamental ferns*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 73: 1-13.

FERRARINI E., CIAMPOLINI F., PICHI SERMOLLI R.E.G., MARCHETTI D., 1986 - *Iconographia Palynologica Pteridophytorum Italiae*. Webbia, 40 (1): 1-202.

FERRARINI E., MARCHETTI D., 1994 - *Prodromo alla flora della Regione Apuana. Parte prima (*Lycopodiaceae - Leguminosae*)*: 1-134. Acc. Lunig. Sci. G. Capellini. La Spezia.

FILIPELLO S. (ed.), 1981 - *Atti del Seminario sul tema "Problemi scientifici e tecnici della conservazione del patrimonio vegetale"*. C.N.R. Collana Programma Finalizzato "Promozione della qualità dell'ambiente", Pavia 1979.

FILIPELLO S., SARTORI F., 1983 - *La vegetazione dell'isola di Montecristo (Arcipelago Toscano)*. Atti Ist. Bot. Lab. Critt. Univ. Pavia, serie 6, 14 (1980-1981): 113-202.

FIORI A., 1943 - *Flora Italica Cryptogama*. 5. Pteridophyta: 191-193. Firenze.

FITTER R., FITTER M. (ed.), 1987 - *The Road to Extinction*. IUCN/UNEP, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.

FLINN K.M., 2006 - *Reproductive biology of three fern species may contribute to differential colonization success in post-agricultural forests*. Amer. J. Bot., 93(9): 1289-1294.

FOGGI B., CARTEI L., PIGNOTTI L., SIGNORINI M.A., VICIANI D., DELL'OLMO L., MENICAGLI E., 2006 - *Il paesaggio vegetale dell'Isola d'Elba (Arcipelago Toscano). Studio di fitosociologia e cartografico*. Fitosociologia, 43 (1), suppl. 1: 3-95.

FOGGI B., GRIGIONI A., 1999 - *Contributo alla conoscenza della vegetazione dell'isola di Capraia (Arcipelago Toscano)*. Parlatorea, 3: 5-33.

FOGGI B., GRIGIONI A., LUZZI P., 2001 - *La flora vascolare dell'Isola di Capraia (Arcipelago Toscano): aggiornamento, aspetti fitogeografici e di conservazione*. Parlatorea, 5: 5-53.

FORD M.V., 1992 - *Growing ferns from spores in sterile culture*. In: IDE J.M., JERMY A.C., PAUL A.M. (eds.), *Fern horticulture: past, present and future perspectives*. Andover Intercept.

FOSSI INNAMORATI T., 1983 - *La flora vascolare dell'Isola d'Elba (Arcipelago Toscano). Prima parte*. Webbia, 36 (2): 273-411.

FONCK M., MAGRINI S., MARACCI E., ONOFRI S., SCOPPOLA A., 2009 - *Allestimento di una collezione di Pteridofite all'Orto Botanico della Tuscia*. Atti del 104° Congresso della Società Botanica Italiana. Campobasso: 256.

FONCK M., MAGRINI S., SCOPPOLA A., ONOFRI S., 2007a - *Conservazione* ex situ *di orchidee spontanee all'Orto Botanico della Tuscia*. Sicilia Foreste, 34 (Suppl.): 350.

FONCK M., SCOPPOLA A., GAETANI B., MAGRINI S., ONOFRI S., 2007b - *Conservazione* ex situ *di* Santolina etrusca *(Lacaita) Marchi et D'Amato presso la Banca del Germoplasma della Tuscia*. Sicilia Foreste, 34 (Suppl.): 223.

FORTINI P., VISCOSI V., SLICE D., BLASI C., 2009 - *Analisi integrata per lo studio della variabilità morfologica nel subgenere* Quercus *(*Fagaceae*).* Atti 104° Congresso della Società Botanica Italiana - Campobasso, 16-19 settembre 2009: 26.

FORTINI P., VISCOSI V., LOY A. E C. BLASI, 2005 - *Contributo della morfometria geometrica alla problematica tassonomica del genere* Quercus *L. subgen.* Quercus *(gr.* Robur*).* Inform. Bot. Ital., 37 (1 parte A): 30-31.

FRASER-JENKINS C.R., 1977 - *Nomenclature notes on* Dryopteris - *5*. Fern Gaz., 12 (3): 183-184.

FRASER-JENKINS C.R., 1982 - Dryopteris *in Spain, Portugal and Macaronesia*. *Boletim da Sociedade Broteriana*, 55: 175-336.

FRASER-JENKINS C.R., REICHSTEIN T., VIDA G., 1975 - Dryopteris tyrrhena *nom. nov. - a misunderstood western Mediterranean species*. *Fern Gaz.*, 11 (2-3): 177-198.

FREEMAN C.C., 1983 - *Chromosome numbers in Great Plains species of* Penstemon *(*Scrophulariaceae*).* Brittonia, 35: 232-238.

FUNK V.A., ZERMOGLIO M.F., NASIR N., 1999 - *Testing the use of specimen collection data and GIS in biodiversity exploration and conservation decision making in Guyana*. Biodiversity and Conservation, *8*: 727-751.

GAFTA D., AKEROYD J., 2006 - *Nature conservation. Concepts and practice*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 460 pp.

GÄRDENFORS U., 2001 - *Classifying threatened species at national versus global levels*. Trends Ecol. Evol., 16: 511-516.

GÄRDENFORS U. (ed.), 2005 - *Rödlistade arter i sverige 2005 - The 2005 redlist of swedish species.* ArtDatabanken SLU Publikationsservice.

GÄRDENFORS U., HILTON-TAYLOR C., MACE G., RODRIGUEZ J.P., 2001 - *The Application of IUCN Red List Criteria at Regional Levels.* Conserv. Biol., 15 (5): 1206-1212.

GÄRDENFORS U., KINDVALL O., 2003 - *Temporal extrapolation of PVA results in relation to the IUCN Red List criterion E*. Conserv. Biol., 17 (1): 316-321.

GARDINI PECCENINI S. (ed.), 1984 - *Flora da proteggere. Indagine su alcune specie vegetali minacciate o rare in Italia.* ERREPIESSE. Edizioni. Pavia.

GARFÌ G., SIRAGUSA M., CARRA A., ABBATE L., GIANNÌ S., VENDRAMIN G.G., BUONAMICI A., DI MARCA A., LIVRERI CONSOLE S., CARIMI F., 2007 - *Actions to reduce the biodiversity loss: the campaign "Countdown 2010" and the project for the conservation of* Zelkova sicula*, a critically endangered endemism of Sicily*. Atti del 102° Congresso della Società Botanica Italiana. Palermo, 26-29 settembre 2007. Sicilia Foreste 34 (Suppl.): 226.

GARGANO D., 2008a - *La procedura IUCN, generalità*. In: ROSSI G., GENTILI R., ABELI T., GARGANO D., FOGGI B., RAIMONDO F.M., BLASI C. (eds.), *Flora da conservare. Iniziativa per l'implementazione in Italia delle categorie e dei criteri IUCN (2001) per la redazione di nuove Liste Rosse*. Inform. Bot. Ital., 40, Suppl. 1: 25-34.

GARGANO D., 2008b - *Linee guida per l'applicazione dei criteri IUCN (2001) ai fini della determinazione del livello di rischio d'estinzione: una sintesi*. In: ROSSI G., GENTILI R., ABELI T., GARGANO D., FOGGI B., RAIMONDO F.M., BLASI C. (eds.), *Flora da conservare. Iniziativa per l'implementazione in Italia delle categorie e dei criteri IUCN (2001) per la redazione di nuove Liste Rosse*. Inform. Bot. Ital., 40, Suppl. 1: 35-38.

GARGANO D., FENU G., MEDAGLI P., SCIANDRELLO S., BERNARDO L., 2007 - *The status of* Sarcopoterium spinosum *(*Rosaceae*) at the western periphery of its range: ecological constraints led to conservation concerns*. Israel J. Plant Sci., 55(1): 1-13.

GASTONY G.J., HAUFLER C.H., 1976 - *Chromosome number and apomixis in the fern genus* Bommeria *(*Gymnogrammaceae*)*. Biotropica, 8: 1-11.

GENTILI R., ROSSI G., DOMINIONE V., LEONARDI A., 2006 - *Valutazione dello status di conservazione di popolazioni isolate situate al limite dell'areale: il caso di* Juncus jacquinii *L. in Appennino Tosco-Emiliano (Italia)*. Arch. Geobot., 9(1-2) (2003): 57-68.

GERHARDT E., 1927 - *Untersuchungen über die vorkeimentwickelung einiger einheimischer farne*. Diss Marburg.

GIBBY M., DYER A.F., 2002. Ex situ *conservation of globally-endangered species*. In: DYER A.F., SHEFFIELD E., WARDLAW A.C. (eds.), *Fern Flora Worldwide, Threats and Responses*. Fern Gaz., 16 (6, 7 & 8): 369-370.

GIFFORD E.M. Jr., BRANDON D.D., 1978 - *Gametophytes of* Botrychium multifidum *as grown in axenic culture*. Amer. Fern J., 68: 71-75.

GIOVANNINI A., PIERINI B., 2006 - Ophioglossum *(*Ophioglossaceae, Polypodiophyta*) sul Monte Pisano (Toscana occidentale). Due nuove stazioni di* O. azoricum *e di* O. vulgatum. Atti Soc. tosc. Sci. nat., Mem., Serie B, 113: 67-68.

GIOVI E., ABBATE G., IBERITE M., 2003 - *Demographic, phytogeographic and state-of-habitat study on eight Red-Listed* taxa *of central-southern Italian vascular flora: early data.* In: DE IONGH H.H., BÁNKI O.S., BERGMANS W., VAN DER WERFF TEN BOSCH M.J. (eds.), *The Harmonisation of Red Lists for threatened species in Europe.* Proceedings of an International Seminar 27 and 28 November 2002, The Netherlands Commission for International Nature Protection. Leiden. Mededelingen, 38: 205-216.

GIVEN D.R., 1993 - *Changing aspects of endemism and endangerment in pteridophyta*. J. Biogeogr., 20: 293-302.

GIVEN D.R., 1994 - *Principles and Practice of Plant Conservation*. Chapman & Hall. London.

GIVEN D.R. 2002 - *Needs, Methods and Means*. In: DYER A.F., SHEFFIELD E., WARDLAW A.C. (eds.), *Fern Flora Worldwide, Threats and Responses*. Fern Gaz., 16: 269-277.

Glassburn, T.A. (1995). "A new palaeontological technique describing temporal shape variation in Miocene bivalves". *Palaeontology* 38: 133-151.

GÓMEZ CAMPO C. (ed.), 2001 - *Conservación de especies vegetales amenazadas en la región mediterranea occidental.* Centro de estudios Ramon Areces, Madrid, Spain.

GRATANI L., FABRINI G., 2004 - *Attività relativa alla Banca del Germoplasma dell'Orto Botanico di Roma*. Atti 99° Congresso della Società Botanica Italiana - Torino, 22-24 settembre 2004: 262.

GRIFFITH B., SCOTT J.M., CARPENTER J.W., REED C., 1989 - *Translocation as a species conservation tool: status and strategy.* Science, 245: 477-480.

GROSSONI P., 2006 - *La conservazione della biodiversità negli orti botanici e nei giardini storici. Un'esigenza per il XXI secolo.* Inform. Bot. Ital., 38 (1), 230-235.

HAINES A.J., CRAMPTON J.S., 2000 - *Improvements To The Method Of Fourier Shape Analysis As Applied In Morphometric Studies.* Palaeontology, 43 (4): 765-783.

HALLINGBÄCK T., HODGETTS N., RAEYMAEKERS G., SCHUMACKER R., SÉRGIO C., SÖDERSTRÖM L., STEWART N., VÁÒA J., 2000 - *Guidelines for Application of the 1994 IUCN Red List Categories of Threats to Bryophytes. Appendix 1*: 71-76. In: T. HALLINGBÄCK, N. HODGETTS (compilers), *Mosses, Liverworts, and Hornworts. Status survey and Conservation Action Plan for Bryophytes*. IUCN/SSC Bryophyte Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, U.K.

HANSEN A.J., DEFRIES R., 2007 - *Ecological mechanisms linking protected areas to surrounding lands*. Ecol. Appl., 17 (4): 974-988.

HARTLEY S., KUNIN W.E., 2003 - *Scale Dependency of Rarity, Extinction Risk, and Conservation Priority*. Conserv. Biol., 17 (6): 1559-1570.

HARTMANN H.T., KESTER D.E., 1990 - *Propagazione delle piante*. Edagricole, Bologna.

HASSLER M., SWALE B., 2001 - *Checklist of World Ferns*. http://homepages.caverock.net.nz/ ~bj/fern/list.htm.

HE F., GASTON K.J., 2000 - *Estimating species abundance from occurrence*. Amer. Nat., 156: 553-559.

HEGI G. (ed.), 1984 - *Illustrierte Flora von Mitteleuropa. Band I, Teil 1,* Pteridophyta.Terza edizione, Paul Parey, Berlin und Hamburg. 310 pp.

HEYWOOD V.H., DULLOO M.E., 2006 - In situ *conservation of wild plant species: a critical global review of good practices*. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Technical Bulletin, 11, Rome. 174 pp.

HILL S.R., 1983 - *Microwave and the herbarium specimens: potential dangers*. Taxon, 32: 614-615.

HIRSCH A.M., 1975 - *The effect of sucrose on the differentiation of excised fern leaf tissue into either gamethophytes or sporophytes.* Plant Physiol., 56: 390-393.

HOEFFERLE, A.M. 1999 - *Impacts of aerial leaf removal on leaf size of the daisy leaf moonwort (*Botrychium matricariifolium*) and the triangle moonwort (*Botrychium lanceolatum *var.* angustisegmentum*) in the subsequent year.* Master's thesis. Houghton, (MI): Michigan Technological University. 42 pp.

HOLDRIDGE L.R., 1947 - *Determination of world plant formations from simple climatic data*. Science, 105: 367-368.

HUANG Y.M., CHOU H.M., CHIOU W.L., 2004 - *Density affects gametophyte growth and sexual expression of* Osmunda cinnamomea *(*Osmundaceae*:* Pteridophyta). Ann. Bot., 94: 229-232.

HUCKABY C.S., RAGHAVAN V., 1981 - *Photocontrol of spore germination in the fern* Thelypteris kunthii. Physiol. Plant., 51: 19-22.

HUGHES S.J., 1971 - *On conidia of fungi and gemmae of algae, bryophytes and pteridophytes*. Can. J. Bot., 49: 1319-1339.

I.S.T.A., 1985 - *International rules for seed testing*. Seed Sci. Technol., 13: 299-355.

IUCN, 1987 - *The IUCN position statement on translocation of living organism*. Prepared by the Species Survival Commission in collaboration with the Commission on Ecology, and the Commission on Environmental Policy, Law and Administration. IUCN, Gland, Switzerland. 13 pp.

IUCN, 1993 - *Draft IUCN Red List Categories*. IUCN, Gland, Switzerland.

IUCN, 1994 - *IUCN Red List Categories. Prepared by the Species Survival Commission*. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, U.K. 21 pp.

IUCN, 1998 - *Guidelines for Re-introductions*. Prepared by the IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 10 pp.

IUCN, 2001 - *IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1.* Prepared by the IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, U.K. + 30 pp.

IUCN, 2002 - *Technical Guidelines on the management of* Ex-situ *population for conservation*. Approved at the 14th Meeting of the Programme Committee of Council, Gland, Switzerland. 4 pp.

IUCN, 2003 - *Guidelines for Application of IUCN Red List Criteria at Regional Levels: Version 3.0*. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.

IUCN, 2005 - *Analysis of the Application of IUCN Red List Criteria at a National Level*. Report from the National Red List Advisory Group Workshop, Villa Majagual, 21-26 January 2005.

IUCN, 2006a - *Guidelines for Using of IUCN Red List Categories and Criteria: Version 6.1*. Prepared by the Standard and Petition Working Group for the IUCN SSC Biodiversity Assessments Sub-Committee in July 2006.

IUCN, 2006b - *Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria. Version 6.2.* Prepared by the Standards and Petitions Working Group of the IUCN SSC Biodiversity Assessments Sub-Committee in December 2006.

IUCN, 2008 - *Guidelines for using the IUCN Red List Categories and Criteria. Version 7.0.* Prepared by the Standards and Petitions Working Group of the IUCN SSC Biodiversity Assessments Sub-Committee, in August 2008. 70 pp. http://intranet.iucn.org/webfiles/doc/SSC/RedList/RedListGuidelines.pdf

IUCN-BGCS, WWF, 1989 - *The Botanic Gardens Conservation Strategy*. IUCN Botanic Gardens Conservation Secretariat, Kew Richmond UK and WWF and IUCN Gland, Switzerland.

IUCN-CMP, 2006 - *Unified Classification of Direct Threats, Version 1.0.* 17 pp. http://www.iucn.org/themes/ssc/sis/classification.htm

IUCN/SSC Criteria Review Working Group, 1999 - *The IUCN Criteria Review: Report of the Range Areas and Uncertainty Workshop.* IUCN/SSC Criteria Review Working Group, 21 pp.

IWATA H., NESUMI H., NINOMIYA S., TAKANO Y., UKAI Y., 2002 - *Diallel analysis of leaf shape variations of* Citrus *varieties based on Elliptic Fourier descriptors.* Breed. Sci., 52 (2): 89-94

IWATA H., NIIKURA S., MATSUURA S., TAKANO Y., UKAI Y., 2004 - *Genetic control of root shape at different growth stages in radish (Raphanus sativus L.).* Breed. Sci., 54 (2): 117-124.

IWATA H., UKAI Y., 2002 - *SHAPE: A computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors*. *Journal of Heredity,* 93: 384-385

IZCO J., 1997 - *Jardines botánicos.* In: IZCO J. (ed.), *Botánica*: 581-606. McGraw-Hill, Interamericana. Madrid.

JALAS J., SUOMINEN J. (eds.), 1972 - Atlas Florae Europaeae. *Distribution of vascular plants in Europe. Vol. 1 - Pteridophyta (Psilotaceae to Azollaceae)*. Committee for mapping the Flora of Europe and Societas Biologica Fennica Varnano. Helsinki. 121 pp.

JAYAKUMAR M., EYINI M., LINGAKUMAR K., KULANDAIVELU G., 2002 - *Effect of ehnanced ultraviolet-B (280-320 nm) radiation on growth and photosynthetic activities in aquatic fern* Azolla microphylla *Kaulf.* Photosynthetica, 40: 85-89.

JENSEN, 1990 - *Detecting* shape *variation in* oak *leaf morphology: a comparison of rotational-fit methods*. Amer. J. Bot., 77 (10): 1279-1293.

JERMY A.C., 1990 - *Conservation of Pteridophytes*. *In*: KRAMER K.U., GREEN P.S. (eds.), *Vol. I Pteridophytes and Gymnosperms*. *In*: KUBITSKI K. (eds.) *The families and genera of vascular plants*: 14. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

JESSEN S, STARK C, ZENNER G. 1994 - Dryopteris tyrrhena *Fr.-Jenk. et Reichst. retrouve en Ardeche*. Monde Pl., 89. (449): 30.

JIMENEZ V.M., GUEVARA E., HERRERA J., BANGERTH F., 2001 - *Endogenous hormone levels in habituated nucellar* Citrus *callus during the initial stages of regeneration.* Plant Cell Rep., 20: 92-100.

JOHNSON D.M., 1985 - *New records for longevity of* Marsilea *sporocarps*. Amer. Fern J., 75:30-31.

JOHNSON-GROH C., 1999 - *Population ecology of* Botrychium *(moonworts), status report on Minnesota* Botrychium *permanent plot monitoring.* Dept. of Biology, Gustavus Adolphus College, St. Peter, MN.

JONCKERS L.H.M., 1973 - *The concept of population in biology. A logical analysis with a suggestion to diminish the confusion to thought.* Acta Biotheoretica, 22: 78-108.

JONES L.E., HOOK P.V., 1970 - *Growth and development in microculture of gametophytes from stored spores of* Equisetum. Amer. J. Bot., 54: 430-435.

JUDD W.S., CAMPBELL C.S., KELLOGG E.A., STEVENS P.F., DONOGHUE M.J., 2007 - *Botanica sistematica. Un approccio filogenetico.* Piccin, Padova.

KAUTH P.J., KANE M.E., VENDRAME W.A., ADAMS C.R., 2008 - *Asymbiotic germination response to photoperiod and nutritional media in six populations of* Calopogon tuberosus *var*. tuberosus *(*Orchidaceae*): evidence for ecotypic differentiation.* Ann. Bot., 102: 783-793.

KELLER V., BOLLMAN K., 2004 - *From Red List to species of conservation concern*. Conserv. Biol., 18: 1636-1644.

KELLY D. 1994 - *Demography and conservation of* Botrychium australe, *a peculiar sparse mycorrhizal fern*. N.Z. J. Bot., 32: 393-400.

KELSALL N., HAZARD C., LEOPOLD D.J., 2004 - *Influence of climate factors on demographic changes in the New York populations of the federally-listed* Phyllitis scolopendrium *(L.) Newm. var.* americana. J. Torrey Bot. Soc., 131: 161-168.

KENRICK P., CRANE P.R., 1997 - *The origin and early diversification of land plants: a cladistic study*. Smithsonian Press, Washington, D.C., USA.

KERR J.T., DEGUISE I., 2004 - *Habitat loss and the limits to endangered species recovery*. Ecology Letters, 7: 1163-1169.

KHARE P.B., BEHERA S.K., SRIVASTAVA R., SHUKLA S.P., 2005 - *Studies on reproductive biology of a threatened tree fern,* Cyathea spinulosa *Wall. ex Hook.* Current Science, 89(1): 173-177.

KINDVALL O., 2000 - *Comparative precision of three spatially realistic simulation models of metapopulation dynamics.* Ecol. Bull., 48: 101-110.

KLEKOWSKI E.J. Jr, 1969 - *Reproductive biology of the* Pteridophyta*. II. Theoretical considerations*. J. Linn. Soc. (Bot.), 62: 347-359.

KLEKOWSKI E.J. Jr, KLEKOWSKI E., 1982 - *Mutation in ferns growing in an environment contaminated with polychlorinated biphenyls.* Amer. J. Bot., 69: 721-727.

KNOP W., 1865 - *Quantitative untersuchungen uber die ernahrungsprozesse der pflanzen.* Landwirtsh Vers Stn., 7: 93-107.

KNUDSON L., 1946 - *A new nutrient solution for orchid seed germination*. Amer. Orchid Soc. Bull*.,* 15: 214-217.

KÖPPEL C., JANSEN F., BURTON J., SCHNITTLER M., HIRNEISEN N., 2003 - *A statistical survey on European Red Lists.* In: DE IONGH H.H., BANK O.S., BERGMANS W., VAN DER WERFF TEN BOSCH M.J. (eds.), *The harmonization of Red Lists for threatened species in Europe.* Proc. Intern. Seminar Leiden, 27 and 28 November 2002, IUCN: 59-76.

KRAMER K.U., 1993 - *Distribution patterns in major pteridophyte taxa relative to those of angiosperms*. J. Biogeogr., 20: 287-291.

KUCERA J., VÁÑA J., 2003 - *Check- and Red List of bryophytes of the Czech Republic*. Preslia, 75: 193-222.

KUHN F.P., GIARDINA C.R., 1982 - *Elliptic Fourier features of a closed contour*. Comp. Graph. Ima. Proc., 18: 236-258.

KUNIN W.E., 1998 - *Extrapolating species abundance across spatial scales*. Science, 281: 1513-1515.

LAGERBERG H., 1908 - *Morphologische-biologische bemerkungeli über die gametophyten einige schwedischer farlie.* Swensk Bot. Tidskr., 2: 229-276.

LAGUNA E., DELTORO V.I., PÈREZ-BOTELLA J., PÈREZ-ROVIRA P., SERRA LL., OLIVARES A., FABREGAT C., 2004 - *The role of small reserves in plant conservation in a region of high diversity in eastern Spain.* Biol. Conserv., 119 3): 421-426.

LAMBELET-HAUETER C., SCHNEIDER C., MAYOR R., 2006 - *Inventaire des plantes vasculaires du canton de Genève avec Liste Rouge*. Conservatoire et Jardin Botaniques de la Ville de Genève, Genève. 135 pp.

LANDI M., ANGIOLINI C., 2007 - Contributo alla conoscenza della distribuzione di Osmunda regalis L. in Toscana. Inform. Bot. Ital., 39 (1): 113-122.

LANDI M., ANGIOLINI C., 2008 - *Habitat characteristics and vegetation context of* Osmunda regalis *L. at the southern edge of its distribution in Europe*. Bot. Helv., 118:45-57.

LEBKUECHER J.G., 1997 - *Desiccation-time limits of photosynthetic recovery in* Equisetum hyemale *(*Equisetaceae*) spores.* Amer. J. Bot., 84(6): 792-797.

LELLINGER D.B., 2002 - *A Modern Multilingual Glossary for Taxonomic Pteridology*. American Fern Society.

LESICA P., AHLENSLAGER K., 1996 - *Demography and life history of three sympatric species of* Botrychium *subg.* Botrychium *in Waterton Lakes National Park, Alberta*. Can J. Bot., 74: 538-543.

LESICA P., McCUNE B., 2004 - *Decline of arctic-alpine plants at the southern margin of their range following a decade of climatic warming.* J. Veg. Sci., 15: 679-690.

LINDSAY S., DYER A.F., 1990 - *Fern spore banks: implications for gametophyte establishment*. In: RITA J. (ed.), *Taxonomía, biogeografía y conservación de pteridófitos*: 243-253. Palma de Mallorca: Institut Menorquí d'Estudís - Societat d'Història Natural del les Illes Balears.

LINDSAY S., WILLIAMS N., DYER A.F., 1992 - *Wet storage of fern spores: unconventional but far more effective!* In: IDE J.M., JERMY A.C., PAUL A.M. (eds.), *Fern horticulture: past, present and future perspectives*: 285-294. Andover Intercept.

LININGTON S., 2001 - *The Millenium Seed Banck Project*. In: RUSHTON B.S., HACKNEY P., TYRIE C.R. (eds.), *Biological Collections and Biodiversity*. Linnean Society, London. 326 pp.

LININGTON S., PRITCHARD W.H., 2001 - *Gene banks*. Encyclopaedia of Biodiversity, 3: 165-181. Academic Press.

LLEDÓ M.D., CRESPO M.B., AMO-MARCO J.B., 1996 - *Micropropagation of* Limonium thiniense *Erben (*Plumbaginaceae*) using herbarium material.* Botanic Gardens Micropropagation News, 2 (2): 18-21.

LLOYD R.M., 1974 - *Reproductive biology and evolution in the* Pteridophyta. Ann. Missouri Bot. Gard., 61: 318-331.

LLOYD R.M., KLEKOWSKI E.J., 1970 - *Spore germination and viability in* Pteridophyta*: Evolutionary significance of chlorophyllous spores.* Biotropica, 2: 129-137.

LOVEJOY T.E., 2006 - *Protected areas: a prism for a changing world*. Trends Ecol. Evol., 21: 329-333.

LUCAS G., SYNGE H., 1978 - *The IUCN Plant Red data Book.* IUCN, Morges. 540 pp.

LUCAS G., WALTERS S.M., 1976 - *List of rare, threatened and endemic plants for the countries of Europe.* Morges. 166 pp.

MACCHERINI S., CASINI S., PERINI C., 1999 - *Le Orchidee spontanee della Toscana centro-meridionale all'Orto Botanico di Siena.* Atti del 94° Congresso della Società Botanica Italiana - Ferrara: 147.

MACE G.M., COLLAR N., COOKE J., GASTON K.J., GINSBERG J.R., LEADER-WILLIAMS N., MAUNDER M., MILNER-GULLAND, E.J., 1992 - *The development of new criteria for listing species on the IUCN Red List*. Species, 19: 16-22.

MACE G.M., COLLAR N.J., GASTON K.J., HILTON-TAYLOR C., AKÇAKAYA H.R., LEADER-WILLIAMS N., MILNER-GULLAND E.J., STUART S.N., 2008 - *Quantification of extinction risk: IUCN's system for classifying threatened species*. Conserv. Biol., 22 (6): 1424-1442.

MACE G.M., LANDE R., 1991 - *Assessing extinction threats: toward a re-evaluation of IUCN threatened species categories.* Conserv. Biol., 5: 148-157.

MACE G.M., STUART S.N., 1994 - *Draft IUCN Red List Categories, Version 2.2.* Species, 21-22: 13-24.

MAGRINI S., 2007 - *L'Orto Botanico dell'Università degli Studi della Tuscia (Viterbo).* Inform. Bot. Ital., 38 (2) (2006): 427-434.

MAGRINI S., 2009 - *Banca del Germoplasma*. In: AA.VV., *Musei di Viterbo*: 88-89. Regione Lazio, Dip. Regionale Cultura, Turismo e Sport; Provincia di Viterbo, Ass. Cultura Turismo e Sport. Tipolitografia Quatrini. Viterbo.

MAGRINI S., BRONZO F., ONOFRI S., SCOPPOLA A., 2010a - *Germinazione asimbiotica* in vitro *di semi immaturi di* Orchis palustris *Jacq*. Acta Biologica, 84 (in stampa).

MAGRINI S., GRANSINIGH E., BUONO S., BRONZO F., ONOFRI S., SCOPPOLA A., 2009 - *Conservazione* ex situ *di* Orchis lactea *Poir. nel Lazio*. Atti del 104° Congresso della Società Botanica Italiana. Campobasso: 179.

MAGRINI S., OLMATI C., ONOFRI S., SCOPPOLA A., 2010b - *Banca del Germoplasma della Tuscia*. Acta Biologica, 84 (in stampa).

MAGRINI S., OLMATI C., ONOFRI S., SCOPPOLA A., 2010c - *Recovery of viable germplasm from herbarium specimens of* Osmunda regalis *L*. Amer. Fern J. (accettato)

MAGRINI S., SCOPPOLA A., 2008 - *Conservazione* ex situ *di* Dryopteris tyrrhena *Fraser-Jenk. et Reichst*. Atti del 103° Congresso della Società Botanica Italiana - Reggio Calabria, 17-19 settembre 2008: 189.

MAGRINI S., SCOPPOLA A., 2009 - *Studies on the reproductive biology of a Western Mediterranean endemism:* Dryopteris tyrrhena *Fraser-Jenk. & Reichst*. In: BACCHETTA G. (ed), *Biodiversity Hotspots in the Mediterranean Area: species, communities and landscape level.* 45° International Congress of SISV & FIP, Cagliari, 22-24 June 2009. Book of abstracts: 290.

MAGRINI S., SCOPPOLA A., 2010a - *Studi sulla biologia riproduttiva di un endemismo del Mediterraneo occidentale:* Dryopteris tyrrhena *Fraser-Jenk. & Reichst*. Acta Biologica, 84 (in stampa).

MAGRINI S., SCOPPOLA A., 2010b- Dryopteris tyrrhena *Fraser-Jenk. & Reichst*. In: *Flora da conservare. Iniziativa per l'implementazione in Italia delle categorie e dei criteri IUCN (2001) per la redazione di nuove Liste Rosse.* Inform. Bot. Ital. (*submitted*).

MAGRINI S., SCOPPOLA A., OLMATI C., FONCK M., ONOFRI S., 2006 - *Conservazione* ex situ *di Pteridofite a rischio di estinzione nel Lazio*. Atti del 101° Congresso della Società Botanica Italiana. Caserta, 27-29 settembre 2006: 173.

MAGRINI S., SCOPPOLA A., OLMATI C., FONCK M., ONOFRI S., 2007. *Riproduzione* in vitro *di* Osmunda regalis *L. da* exsiccata *dell'Erbario UTV*. Atti del 102° Congresso della Società Botanica Italiana. Palermo, 26-29 settembre 2007. Sicilia Foreste 34 (Suppl.): 231.

MAHLBERG P.G., BALDWIN M., 1975 - *Experimental studies on megaspore viability, parthenogenesis and sporophyte formation in* Marsilea*,* Pilularia *and* Regnellidium. Bot. Gaz., 136: 269-273.

MANTON I., 1950 - *Problems of Cytology and Evolution in the* Pteridophyta. New York: Cambridge Univ. Press. 316 pp.

MAKGOMOL K., SHEFFIELD E., 2001 - *Gametophyte morphology and ultrastructure of the extremely deep shade fern,* Trichomanes speciosum. New Phytol., 151: 243-255.

MARCHETTI D., 1984 - *Note pteridologiche per la Costa Spezzina (Liguria occidentale)*. Boll. Mus. Storia Nat. Lunigiana, 1 (1981): 75-82.

MARCHETTI D., 1985 - *Note floristiche tosco-liguri-emiliane. III. Pteridofite interessanti della provincia della Spezia*. Boll. Mus. Storia Nat. Lunigiana, 3 (1983): 37-49.

MARCHETTI D., 1994 - Chiave per la determinazione delle pteridofite indigene e naturalizzate in Italia. Lista degli ibridi. *Ann. Mus. Civ. Rovereto, Sez.: Arch., St., Sc. Nat.* 9 (1993): 167-192.

MARCHETTI D., 2004 - *Le pteridofite d'Italia*. Ann. Mus. civ. Rovereto, 19: 71-231.

MARCONI G., 2007 - *Piante minacciate di estinzione in Italia. Il "Libro Rosso" fotografico*. Oasi Alberto Perdisa.

MATTANA E., FENU G., BACCHETTA G., 2005 - *La Banca del Germoplasma della Sardegna (BG-SAR): uno strumento per la conservazione del germoplasma autoctono sardo*. Inform. Bot. Ital. 37(1): 144-145.

McCAULEY D.E., WHITTIER D.P., REILLY L.M., 1985 - *Inbreeding and the rate of self-fertilization in a grape fern,* Botrychium dissectum. Amer. J. Bot., 72 (12): 1978-1981.

McCARTHY M.A., POSSINGHAM H.P., DAY J.R., TYRE A.J., 2001 - *Testing the accuracy of population viability analysis.* Conserv. Biol., 15: 1030-1038.

MEHRA P.N., BIR S.S., 1960 - *Cytological observations on* Asplenium cheilosorum *Kunze*. Cytologia, 25: 17-27.

MEHRA P.N., SULKLYAN D.S., 1969 - In vitro *studies on apogamy, apospory and controlled differentiation of rhizome segments of the fern* Ampelopteris prolifera *(Retz.) Copel*. Bot. J. Linn. Soc., 62: 431-443.

MENALE B., CASORIA P., BARONE LUMAGA M. R., 1999 - *Gli itinerari didattici nell'Orto Botanico di Napoli. II. Le aree a carattere sistematico.* Inform. Bot. Ital., 31 (1-3) (2000): 220-226.

MENÉNDEZ V., VILLACORTA N.F., REVILLA M.A., GOTOR V., BERNARD P., FERNÁNDEZ H., 2006 - *Exogenous and endogenous growth regulators on apogamy in* Dryopteris affinis *ssp.* affinis. Plant Cell Rep., 25: 85-91.

MILLER R.M., RODRIGUEZ J.P., ANISKOWICZ-FOWLER T., BAMBARADENIYA C., BOLES R., EATON M.A., GÄRDENFORS U., KELLER V., MOLUR S., WALKER S., POLLOCK C., 2007 - *National threatened species listing based on IUCN criteria and regional guidelines: current status and future perspectives*. Conserv. Biol., 21(3): 684-696.

MILNER-GULLAND E.J., KREUZBERG-MUKHINA E., GREBOT B., LING S., BYKOVA E., ABDUSALAMOV I., BEKENOV A., GÄRDENFORS U., HILTON-TAYLOR C., SALNIKOV V., STOGOVA L., 2006 - *Application of IUCN red listing criteria at the regional and national levels: a case study from Central Asia.* Biodivers. Conserv., 15: 1873-1886.

MINUTO L., 1996 - *Attività per la conservazione del patrimonio vegetale ligure nell'Orto Botanico di Genova.* Riv. Mus. Civ. Sci. Nat. "E. Caffi", 18: 53-64.

MOGGI G. *et al.* (ed.), 1972 - *Specie della flora italiana meritevoli di protezione.* A cura del Gruppo di Floristica della SBI. Inform. Bot. Ital., 4: 12-13.

MONDONI A., ROSSI G., PAROLO G., LEVA G., DOMINIONE V., BODINI F., VILLA M., 2005 - *Lombardy Seed Bank (LSB): uno strumento regionale di conservazione della flora spontanea.* Inform. Bot. Ital., 37 (1 parte A): 148-149.

MONTGOMERY J.D., 1990 - *Survivorship and predation changes in five populations of* Botrychium dissectum *in eastern Pennsylvania.* Amer. Fern J., 80: 173-182.

MOORE G.T., 1903 - *Methods for growing pure cultures of algae*. J. Appl. Microsc. Lab. Methods, 6: 2309-2314.

MORAN R.C, 2008 - *Diversity, biogeography, and floristics*. In: RANKER, T.A., HAUFLER C.H. (eds.), *Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes:* 367-394. Cambridge University Press, Cambridge.

MORENO J.C. (coord.), 2008 - *Lista Roja de la flora vascular española amenazada*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. 86pp.

MORENO CASASOLA P., 1996 - *Vida Y Obra De Granos Y Semillas*. Impresora Y Encuadernadora Progreso, S.A. De C.V., Iepsa.

MORINI S., 2000 - *In vitro* culture of *Osmunda regalis* fern. J. Hortic. Sci. Biotech., 75 (1): 31-34.

MOSER D., GYGAX B., BAUMLER B., WYLER N., PALESE R., 2002 - *Lista Rossa delle felci e piante a fiori minacciate della Svizzera.* Ed. Ufficio federale dell'ambiente, delle foreste e del paesaggio, Berna; Centro della Rete Svizzera di Flogistica, Chambésy. Collana UFAFP "Ambiente-Esecuzione". 118 pp.

MOTA J.F., PÉREZ GARCÍA F.J., POSADAS-FERNÁNDEZ L., LAHORA A., SORIA P., MENDOZA A.J., SOLA A.J., 2007 - *Contributión al conocimiento de la pteridoflora de Andalucía: sobre el genero* Ophioglossum *L. en Almería*. Acta Bot. Malacit., 32: 1-3.

MULLER S., 1993 - *Population dynamics in* Botrychium matricariifolium *in Bitcherland (Northern Vosges Mountains, France).* Belg. J. Bot., 126: 13-19.

MULLER S., 2000 - *Assessing occurrence and habitat of* Ophioglossum vulgatum *L. and other* Ophioglossaceae *in European forests. Significance for nature conservation.* Biodiv. Conserv., 9: 673-681.

MULLER S., 2002 - *Diversity of management practices required to ensure conservation of rare and locally threatened plant species in grasslands: a case study at regional scale (Lorraine, France).* Biodiv. Conserv., 11: 1173-1184.

MURASHIGE T., SKOOG F., 1962 - *A revised medium for rapid growth and bio assays with* Tobacco *tissue cultures*. Physiol. Plant., 15: 473-497.

NARDI E., 1979 - *Commentaria pteridologica*: 3. *Notulae chorologicae atque cytologicae Italicae*. Webbia, 33(2): 435-447

NICKRENT D.L., PARKINSON C.L., PALMER J.D., DUFF R.J., 2000 - *Multigene phylogeny of land plants with special reference to bryophytes and the earliest land plants.* Molec. Biol. Evol., 17: 1885-1895.

NONDORF S.L., DOOLEY M.A., PALMIERI M., SWATZELL L.J., 2003 - *The effects of pH, temperature, light intensity, light quality, and moisture levels on spore germination in* Cheilanthes feei *of Southeast Missouri*. Amer. Fern J., 93: 56-69.

OBERDORFER E., 1990 - *Pflanzensoziologische Exkursionsflora*. 6th edn. Ulmer, Stuttgart.

OELLGAARD B., 1993 - *Scandinavian ferns. A natural history of the ferns, clubmosses, quillworts, and horsetails of Denmark, Norway, and Sweden*. Rhodos, Copenhagen.

OKADA Y., 1929 - *Notes on the germination of the spores of some pteridophytes with special regard to their viability. Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ., Ser. IV Biol. 4*: 127-182.

OLMATI C., 2007 - *Conservazione* ex situ *e riproduzione* in vitro *di Pteridofite a rischio di estinzione nel Lazio*. Tesi di Laurea in Scienze Biologiche. Relatore Prof. S. Onofri; Correlatore Dott.ssa S. Magrini. Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali.

OSTRO L.E.T., YOUNG T.P., SILVER S.C., KOONTZ F.W., 1999 - *A geographic information system method for estimating home range size.* Journal of Wildlife Management, 63: 748-755.

PACE L., PIRONE G., DI MARTINO L., FASCIANI P., MANCINI G., 2007 - *Il Giardino Alpino di Campo Imperatore: esperienze relative alla coltivazione ed alla conservazione di piante di alta quota*. Atti del 102° Congresso della Società Botanica Italiana. Palermo, 26-29 settembre 2007. Sicilia Foreste 34 (Suppl.): 354.

PAGE C.N., 1979 - *Experimental aspect of fern ecology*. In: DYER A.F. (ed.), *The Experimental Biology of Ferns*: 551-589. London: Academic Press.

PAGE C.N., 1997 - *The Ferns of Britain and Ireland*. University Press, Cambridge.

PAGE C.N., 2002 - *The role of disturbance regimes in pteridophyte conservation management*. In: DYER A.F., SHEFFIELD E., WARDLAW A.C. (eds.), *Fern Flora Worldwide, Threats and Responses*. Fern Gaz., 16 (6, 7 & 8): 284-289.

PAGE C.N., DYER A.F., LINDSAY S., MANN D.G., 1992 - *Conservation of Pteridophytes: the* ex situ *approach*. In: IDE J.M., JERMY A.C., PAUL A.M. (eds.), *Fern horticulture: past, present and future perspectives*: 269-278. Andover Intercept.

PALMER D.D., 2003 - *Hawaii's Fern and Fern Allies*. University of Hawaii Press. Honolulu, HI. 324 pp.

PAMPANINI R., 1925 - *Gli esponenti più rimarchevoli e più rari della Flora Toscana nel censimento dei Monumenti Naturali d'Italia.* Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s., 32: 5-35.

PANGUA E., LINDSAY S., DYER A., 1994 - *Spore germination and gametophyte development in three species of* Asplenium. Ann. Bot., 73: 587-593.

PANGUA E., QUINTANILLA L.G., PAJARÓN S., 2006 - *Taxonomic relevance of the gametophytic generation in a strictly rupicolous fern group:* Asplenium seelosii s.l. Bot. J. Linnean Soc., 151: 375-386.

PAOLI P., ROMAGNOLI G., 1976 - *La flora vascolare dell'isola di Montecristo (Arcipelago Toscano)*. Webbia, 30 (2): 303-456.

PARIHAR N.S., 1996 - *The biology and morphology of pteridophytes*. Central Book Depot, Allahbad, 660 pp.

PAUL A.M., 1987 - *The status of* Ophioglossum azoricum *(*Ophioglossaceae: Pteridophyta*) in the British Isles. Fern Gaz*., *13: 173-187*.

PECK J.H., PECK C.J., FARRAR D.F., 1990 - *Influence of life history attributes on formation of local and distant fern populations*. Amer. Fern J., 80: 126-142.

PEDROTTI F., 1992 - *La Società Botanica Italiana per la protezione della natura: 1888-1990*. Univ. Camerino. 181 pp.

PEDROTTI F., 1996 - *Suddivisioni botaniche dell'Italia*. Giorn. Bot. Ital., 130 (1): 214-225.

PEÑAS DE GILES J., MARTÍNEZ MARTÍNEZ A., JOSÉ SOLA A., MOTA POVEDA J.F., 2006 - *Análisis corológico y novedades florísticas de la Sierra de los Filabres (Andalucia Oriental, España)*. Lagascalia, 26: 51-70.

PENCE V.C., 2000 - *Survival of chlorophyllous and nonchlorophyllous fern spores through exposure to liquid nitrogen.* Amer. Fern J., 90 (4): 119-126.

PENCE V.C., 2002 - *Cryopreservation and* in vitro *methods for* ex situ *conservation of pteridophytes*. In: DYER A.F., SHEFFIELD E., WARDLAW A.C. (eds.), *Fern Flora Worldwide, Threats and Responses*. Fern Gaz., 16 (6, 7 & 8): 362-368.

PENCE V.C., 2008 - Ex situ *conservation of ferns and lycophytes - approaches and techniques*. *In*: RANKER, T.A., HAUFLER C.H. (eds.), Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes: 284-300. Cambridge University Press, Cambridge.

PÉREZ-GARCÍA F., GONZÁLEZ-BENITO M.E., GÓMEZ-CAMPO C., 2007 - *High viability recorded in ultra-dry seeds of 37 species of* Brassicaceae *after almost 40 years of storage*. Seed Sci. Technol., 35: 143-153.

PÉREZ-GARCÍA F., GONZÁLEZ-BENITO M.E., GÓMEZ-CAMPO C., 2008 - *Germination of fourteen endemic species from the Iberian Peninsula, Canary and Balearic Islands after 32-34 years of storage at low temperature and very low water content.* Seed Sci. Technol., 36: 407-422.

PERINI C., CASINI S., CHIARUCCI A., 1996 - *Un singolare "giardino roccioso" all'Orto Botanico di Siena*. Giorn. Bot. Ital., 130 (1): 299.

PERONI A., PERONI G., 2004 - *Atlante di identificazione delle felci (Filicopsida) presenti in Svizzera e in Italia. Su base palinologica e epidermiologica*. Società ticinese di Scienze naturali e Museo cantonale di storia naturale. Reggiani, Varese.

PERUZZI L., CARTA A., PIERINI B., 2008 - *Ophioglossum azoricum* C. Presl. (inedito)

PHILLIPS A., 2002 - *Protected areas, and IUCN's World Commission on Protected Areas (WCPA) - how can they help in the conservation of ferns?* In: DYER A.F., SHEFFIELD E., WARDLAW A.C. (eds.), *Fern Flora Worldwide, Threats and Responses.* Fern Gaz., 16 (6, 7 & 8): 278-283.

PICHI SERMOLLI R.E.G., 1979 - *A survey of the pteridological flora of the Mediterranean Region*. Webbia, 34(1): 175-242.

PICHI SERMOLLI R.E.G., 1990 - *Le Pteridofite europee: la loro tassonomia e nomenclatura oggi.* In: RITA J. (ed.), *Taxonomía, biogeografía y conservación de pteridófitos*: 11-27. Palma de Mallorca: Institut Menorquí d'Estudís - Societat d'Història Natural del les Illes Balears.

PICHI SERMOLLI R.E.G., 1991 - *Considerazioni sull'affinità ed origine della flora pteridologica della Regione Mediterranea*. Acta Botanica Malacitana, 16: 235-280.

PIGNATTI S., 1982 - *Flora d'Italia*. Volume I. Edagricole. Bologna. 790 pp

PIGNATTI S., MENEGONI P., GIACANELLI V. (eds.), 2001 - *Liste rosse e blu della flora italiana*. A.N.P.A., Stato dell'ambiente 1. Alcagraf s.r.l. Roma. 326 pp. + CD-ROM.

PODANI J., 2007 - *Analisi ed esplorazione multivariata dei dati in ecologia e biologia*. Liguori Editore, Napoli. 548 pp.

PRADA C., 1990 - *El papel de la palinología en los estudios actuales sobre Pteridófitos*. In: RITA J. (ed.), *Taxonomía, biogeografía y conservación de pteridófitos*: 39-46. Palma de Mallorca: Institut Menorquí d'Estudís - Societat d'Història Natural del les Illes Balears.

PRELLI R., 2001 - *Les fougères et plant alliées de France et d'Europe occidentale*. Belin, Paris.

PRELLI R., BOUDRIE M., 1992 - *Atlas écologique dès fougères et plantes alliées. Illustration et répartition des Ptéridophytes de France.* Éditions Lechevalier, Paris. 274 pp.

PREMOLI A.C., 1996 - *A comparative study using traditional characters, landmark-based morphometrics, and outline analysis (Elliptic Fourier Analysis) to examine taxonomic and evolutionary relationships of three* Nothofagus *species*. Bot. J. Linnean Soc., 121: 25-40.

PRESL C., 1845 - Supplementum Tentaminis Pteridographiae - Continens Genera et Species Ordinum Dictorum Marattiaceae - Ophioglossaceae - Osmundaceae - Schizaeaceae et Lygodiaceae - Pragae 120 pp.

PROFUMO P., 1996 - *Studio e conservazione di specie endemiche ed esotiche nei Giardini Hanbury*. Rivista del Riv. Mus. Civ. Sci. Nat. "E. Caffi", 18: 75-78.

PROSSER F., 2001 - *Lista Rossa della flora del Trentino*. Museo Civico di Rovereto, Rovereto.

PRYER K.M., SCHNEIDER H., SMITH A.R., CRANFILL R., WOLF P.G., HUNT J.S., SIPES S.D., 2001 - *Horsetails and ferns are a monophyletic group and the closest living relatives to seed plants*. Nature, 49: 618-622.

PRYER K.M., SCHUETTPELZ E., WOLF P.G., SCHNEIDER H., SMITH A.R., CRANFILL R., 2004 - Phylogeny *and evolution of ferns (monilophytes) with a focus on the early Leptosporangiate divergences*. Amer. J. Bot., 91(10): 1582-1598.

PRYER K.M., SMITH A.R., SKOG J.E., 1995 - *Phylogenetic relationships of extant ferns based on evidence from morphology and rbcL sequences*. Amer. Fern J., 85: 205-282.

PUGGIONI G., BEDINI G., 2009 - *Seed shape and size in psammophile species of the Tuscan coast*. In: BACCHETTA G. (ed), *Biodiversity Hotspots in the Mediterranean Area: species, communities and landscape level*. 45° International Congress of SISV & FIP, Cagliari, 22-24 June 2009. Book of abstracts: 92.

QUINTANILLA L.G., AMIGO J., PANGUA E., PAJARÓN S., 2002 - *Effect of storage method on spore viability in five globally threatened fern species*. Ann. Bot., 90: 461-467.

QUINTANILLA L.G., ESCUDERO A., 2006 - *Spore fitness components do not differ between diploid and allotetraploid species of* Dryopteris *(*Dryopteridaceae*).* Ann. Bot., 98: 609-618

QUINTANILLA L.G., PAJARÓN S., PANGUA E., AMIGO J., 2000 - *Effect of temperature on germination in Northernmost populations of* Culcita macrocarpa *and* Woodwardia radicans*.* Plant Biol., 2: 612-617.

RABELLO L.R., BORDIN B., FURTADO DOS REIS S., 2000 - *Shape distances, shape spaces and the comparison of morphometric methods.* Trends Ecol. Evol., 15: 217-220.

RAGHAVAN V., 1989. *Developmental biology of fern gametophytes*. Cambridge University Press. 361 pp.

RAGHAVAN V., 1992 - *Germination of Fern Spores*. Amer. Scientist, 80: 176-185.

RAIMONDO F.M., SCIALABBA A., 1994 - *The role and function of germplasm in the context of the Palermo Botanical Garden*. Giorn. Bot. Ital., 128 (1): 414.

RASMUSSEN H., 1995 - *Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press, Cambridge.

RAUBESON L.A., JANSEN R.K., 1992 - *Chloroplast DNA evidence on the ancient evolutionary split in vascular land plants.* Science, 255: 1697-2699.

RAVEN P.H., EVERT R.F., EICHHORN S.E., 2005 - *Biologia delle piante*. Zanichelli, Bologna.

RAY P.M., STEEVES T.A., FULTZ S.A., 1985 - *Botanica*. Zanichelli, Bologna.

RENPA, 2007 - *El Laboratorio de Propagación Vegetal de Sevilla logra producir 17 plantas de una especie desaparecida en España*. Noticias RENPA 75.

RICH T.C.G., GIBSON C., MARSDEN M., 1999 - *Re-establishment of the extinct native plant* Filago gallica *L. (*Asteraceae*), narrow-leaved cudweed, in Britain*. Biol. Conserv., 91 (1): 1-8.

RINALDI G., 1996 - *Progetti di reintroduzione a livello locale del Giardino Botanico di Bergamo*. Riv. Mus. Civ. Sci. Nat. "E. Caffi", 18: 37-46.

RIZZOTTO M., 1996 - *Le categorie IUCN per la compilazione delle "Liste Rosse" e l'attività della S.B.I. per la conservazione della flora.* Inform. Bot. Ital., 27 (1995): 315-318.

RODRIGUES A.S.L., ANDELMAN S.J., BAKARR M.I., BOITANI L., BROOKS T.M., COWLING R.M., FISHPOOL L.D.C., FONSECA G.A.B., GASTON K.J., HOFFMANN M., LONG J.S., MARQUET P.A., PILGRIM J.D., PRESSEY R.L., SCHIPPER J., SECHREST W., STUART S.N., UNDERHILL L.G., WALLER R.W., WATTS M.E.J., YAN X., 2004 - *Effectiveness of the global protected area network in representing species diversity*. Nature, 428: 640-643.

RODRIGUES A.S.L., PILGRIM J.D., LAMOREUX J.F., HOFFMANN M., BROOKS T.M., 2006 - *The value of the IUCN Red List for conservation*. Trends Ecol. Evol., *21*: 71-76.

RODRIGUES A.S.L., TRATT R., WHEELER B.D., GASTON K.J., 1999 - The *performance of existing networks of conservation areas in representing biodiversity.* Proc. R. Soc. Lond. B, 266: 1453-1460.

RODRÍGUEZ J.P., ASHENFELTER G., ROJAS-SUÁREZ F., GARCIA FERNANDEZ J.J., SUÁREZ L., DOBSON A.P., 2000 - *Local data are vital to conservation worldwide*. Nature, 403: 241.

ROGERS S.O., BENDICH A.J., 1985 - *Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues*. Plant Mol. Biol. 5:69-76.

ROGGE RENNER G.D., RANDI Á.M., 2004 - *Effects of sucrose and irradiance on germination and early gametophyte growth of the endangered tree fern* Dicksonia sellowiana *Hook (*Dicksoniaceae*).* Acta Bot. Brasil., 18(2): 375-380.

ROHLF F.J., 1998 - *tpsDig32: A program for digitizing landmarks and outlines for geometric morphometric analyses.* Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, New York.

ROHLF F.J., CORTI M., 2000 - *The use of two-block partial least-squares to study covariation in shape*. Syst. Biol., 49: 740-753.

ROHLF F.J., MARCUS L.F., 1993 - *A revolution in morphometrics*. Trends Ecol. Evol., 8 (4): 129-132.

ROHLF F.J., SLICE D., 1990 - *Extension of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks*. Syst. Zool., 39: 40-59.

ROSSELLÓ J.A., GRADAILLE J.L., SASTRE B., VICENS J., SALVO A.E., 1989 - *Notas Pteridológicas: 21.* Dryopteris tyrrhena *Fraser-Jenkins & Reichst. en Baleares*. Acta Bot. Malacitana, 14: 255-258.

ROSSI G., BONOMI C., BEDINI G., 2006 - *Conservazione* ex situ *della flora spontanea italiana: RIBES, una nuova iniziativa nazionale.* Inform. Bot. Ital., 38 (1): 236-247.

ROSSI G., DELLAVEDOVA R., BERTIN L., MONDONI A., PAROLO G., 2004 - *Le banche del germoplasma per la conservazione delle specie vegetali rare e minacciate.* Quaderni di Biodiversità, 2 (2003): 77-86, Università di Bologna.

ROSSI G., GENTILI R., 2008a - *Applicazione dei criteri IUCN a popolazioni periferiche di specie artico-alpine in Appennino settentrionale.* Biogeographia, 27 (2006): 307-326.

ROSSI G., GENTILI R., 2008b - *A partnership project for a new Red List of the Italian Flora*. Plant Biosystems, 142 (2): 302-304.

ROSSI G., GENTILI R., 2008c - Cheilanthes persica *(Bory) Mett. ex Kuhn.* In: ROSSI G., GENTILI R., ABELI T., GARGANO D., FOGGI B., RAIMONDO F.M., BLASI C. (eds.), *Flora da conservare. Iniziativa per l'implementazione in Italia*

delle categorie e dei criteri IUCN (2001) per la redazione di nuove Liste Rosse. Inform. Bot. Ital., 40, Suppl. 1: 129-131.

ROSSI G., GENTILI R., ABELI T., FOGGI B., 2008a - *La redazione di Liste Rosse per la conservazione della flora spontanea*. In: ROSSI G., GENTILI R., ABELI T., GARGANO D., FOGGI B., RAIMONDO F.M., BLASI C. (eds.), *Flora da conservare. Iniziativa per l'implementazione in Italia delle categorie e dei criteri IUCN (2001) per la redazione di nuove Liste Rosse.* Inform. Bot. Ital., 40, Suppl. 1: 1-21.

ROSSI G., GENTILI R., ABELI T., GARGANO D., FOGGI B., RAIMONDO F.M., BLASI C. (eds.), 2008b - *Flora da conservare. Iniziativa per l'implementazione in Italia delle categorie e dei criteri IUCN (2001) per la redazione di nuove Liste Rosse.* Inform. Bot. Ital., 40, Suppl. 1, 186 pp.

ROSSI G., PAROLO G., MONDONI A., DELLAVEDOVA R., DOMINIONE V., VILLA M., 2005 - *La banca dei semi delle piante autoctone lombarde (LSB) per i recuperi ambientali e la conservazione della biodiversità vegetale.* Quaderni del Parco del Monte Barro, 7: 43-61.

ROSSI G., PERINI C., SCOPPOLA A., GENTILI R., BLASI C., 2007 - *Networking for a new italian Red List including lower and higher plants.* Abstract 5th European Conf. Conservation Wild Plants in Europe "Working together for Plants". September 5-9 , 2007, Cluj-Napoca.

ROSSI G., RIGONI P., LEONARDI A., 2001 - *Ricostruzione ed arricchimento di cenosi arbustive ed arboree nella pianura Padana sud-orientale (Riserva Naturale Speciale di Alfonsine, Ravenna).* Inform. Bot. Ital., 33 (1): 207-210.

ROTHWELL G.W., 1999 - *Fossils and ferns in the resolution of land plant phylogeny*. Bot. Rev., 65: 769-793.

RUBIN G., PAOLILLO D.J., 1983 - *Sexual development of* Onoclea sensibilis *on agar and soil media without the addition of antheridiogen*. Amer. J. Bot., 70 (6): 811-815.

RUMSEY F.J., VOGEL J.C., RUSSEL S.J., BARRETT J.A., GIBBY M., 1999 - *Population structure and conservation biology of endangered fern* Trichomanes speciosum *Willd. (*Hymenophyllaceae*) at its northern distributional limit.* Bot. J. Linn. Soc., 66: 333-344.

SÁEZ L., ROSSELLÓ J.A., 2001 - *Llibre Vermell de la flora vascular de les illes Balears.* Consell. Medi Ambient, Govern de les illes Balears, Palma de Mallorca, 232 pp.

SALVO TIERRA E., 1990 - *Guía de Helechos de la Península Ibérica y Baleares*. Ediciones Piramide, Madrid. 384 pp.

SARTORI F., 1982 - *Sebastiano Filipello (24 marzo 1936 - 30 Marzo 1982)*. Inform. Bot. Ital., 14: 207-212.

SCHÄFER H., 2001 - *Distribution and status of the pteridophytes of Faial Island, Azores (Portugal).* Fern Gaz., 16 (5): 213-237.

SCHICCHI R., BAZAN G., RAIMONDO F. M., 2004 - *The Sicilian Life Project "Conservation* in situ *and* ex situ *of* Abies nebrodensis *(Lojac.) Mattei": first results*. XI O.P.T.I.M.A. Meeting/XIème Colloque d'OPTIMA. Belgrado, 4-12 september.

SCHMID E., OBERWINKLER F., 1996 - *Light and electron microscopy of a distinctive VA mycorrhiza in mature sporophytes of* Ophioglossum reticulatum. Mycol. Res., 100: 843-849.

SCHNELLER J.J., 1998 - *How much genetic variation in fern populations is stored in the spore banks? A study of* Athyrium filix-femina *(L.) Roth.* Bot. J. Linn. Soc., 127: 195-206.

SCHNYDER N., BERGAMINI A., HOFMAN H., 2004 - *Rote Liste der gefährdeten Moose der Schweiz*. Hrsg. Buwal, Fub & Nism. Buwal-reihe: Vollzug umwelt, Bern.

SCIALABBA A., SCHICCHI R., CORDÌ R., 2007 - *Potenziale germinativo dei semi di* Abies nebrodensis (Pinaceae). Atti 102° Congresso della Società Botanica Italiana - Palermo, 26-29 settembre 2007: 237.

SCOPPOLA A., 1995 - *Piante minacciate, vulnerabili o molto rare della provincia di Viterbo*. Amministrazione Provinciale di Viterbo. Assessorato all'Ambiente. 159 pp.

SCOPPOLA A., 2005 - *Conservazione* ex situ. In: BLASI C., BOITANI L., LA POSTA S., MANES F., MARCHETTI M. (eds.), *Stato della biodiversità in Italia*. *Contributo alla strategia nazionale per la biodiversità*: 415-419. Palombi Editori, Roma.

SCOPPOLA A., BLASI C. (eds.), 2005 - *Stato delle conoscenze sulla flora vascolare d'Italia*. Palombi Editori, Roma. 253pp.

SCOPPOLA A., CAPORALI C., GALLOZZI M.R., BLASI C., 2003 - *Aggiornamento delle conoscenze floristiche a scala nazionale: commenti e primi risultati.* Inform. Bot. Ital., 35 (1): 178-197.

SCOPPOLA A., LATTANZI E., 1990 - *Nuovi reperti di* Ophioglossum vulgatum *L. (Ophioglossaceae) nel Lazio e in Campania.* Ann. Bot. (Roma), 47 (1989), Suppl. 6: 85-96.

SCOPPOLA A., LATTANZI E., ANZALONE B., 1996 - *La flora del Lamone (Alto Viterbese).* Ann. Bot. (Roma), 52 (1994), Suppl. 11 (1): 169-238.

SCOPPOLA A., SCARICI E., 1998 - *La conservazione delle piante. (Guida alla realizzazione di un erbario).* Centro Stampa, Roma. 64 pp.

SCOPPOLA A., SPAMPINATO G. (eds.), 2005 - *Atlante delle specie a rischio di estinzione. Versione* 1.0. CD-Rom incluso nel volume: SCOPPOLA A., BLASI C. (eds.), *Stato delle conoscenze sulla flora vascolare d'Italia*. Palombi Editori, Roma.

SCOPPOLA A., SPAMPINATO G., GIOVI E., MAGRINI S., CAMERIERE P., 2005 - *Le entità a rischio di estinzione in Italia: un nuovo* Atlante *multimediale*. In: SCOPPOLA A., BLASI C. (eds.), *Stato delle conoscenze sulla flora vascolare d'Italia*: 47-78. Società Botanica Italiana. Palombi editore. Roma.

SEDDON P.J., ARMSTRONG D.P., MALONEY R.F., 2007 - *Developing the Science of Reintroduction Biology.* Conserv. Biol., 21 (2): 303-312.

SEILHEIMER A.V., 1978 - *Chlorophyll and Lipid Changes on Germination in the Non-green Spores of* Thelypteris dentata*.* Amer. Fern J., 68 (3): 67-

SENN-IRLET B., BIERI G., EGLI S., 2007 - *Lista Rossa dei macromiceti minacciati in Svizzera*. Serie pratica ambientale n. 0718. Ed. Ufficio Federale Ambiente, Berna e WSL, Birmensdorf.

SÉRGIO C., BRUGUES M., CROS R.M., CASAS C., GARCIA C., 2006 - *The 2006 Red List and an updated checklist of bryophytes of the Iberian Peninsula (Portugal, Spain and Andorra).* Lindbergia, 31: 109-125

SGARBI E., 2001 - *La germinazione* in vitro *delle orchidee: un approccio metodologico*. Atti Soc. Nat. Modena, 132: 65-74.

SGARBI E., GRIMAUDO M., DEL PRETE C., 2007 - In vitro *asymbiotic growth of Mediterranean terrestrial orchids from immature seeds.* J. Eur. Orch., 39 (3/4): 611-624.

SHEAT D.E.G., FLETCHER B.H. STREET H.E., 1959 - *Studies on the growth of excised roots. VIII. The growth of excised tomato roots supplied with various inorganic sources of nitrogen*. New Phytol., 58 (2): 128-141.

SHEFFIELD R., 2009 - *Alternation of generations.* In: RANKER T.A., HAUFLER C.H. (eds.), *Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes:* 49-74*.* Cambridge University Press, Cambridge.

SHEFFIELD E., CUTTER E.G., DOUGLAS G.E., LINDSAY S., 1991 - *High resolution scanning electron microscopy of fern gametophytes: application of a non destructive method.* Amer. Fern J., 81 (4): 128-133.

SHEFFIELD E., DOUGLAS G.E., HEARNE S.J., HUXHAM S., WYNN J.M., 2001 - *Enhancement of fern spore germination and gametophyte growth in artificial media.* Amer. Fern J. 91(4): 179-186.

SHIPUNOV A.B., BATEMAN R.M., 2005 - *Geometric morphometrics as a tool for understanding* Dactylorhiza *(*Orchidaceae*) diversity in European Russia.* Biol. J. Linnean Soc., 85 (1): 1-12.

SIMABUKURO E.A., DE CARVALHO M.A.M., FELIPPE G.M., 1998a - Reserve substances and storage of *Cyathea delgadii* Sternb. Spores. *Revista Brasileira de Botanica* 21(2).

SIMABUKURO E.A., DYER A.F., FELIPPE G.M., 1998b - *The effect of sterilization and storage conditions on viability of the spores of* Cyathea delgadii*.* Amer. Fern J., 88(2): 72-80.

SIMON N., 1966 - *Red Data Book. Volume 1. Mammalia: a compilation*. IUCN, Morges, Switzerland.

SINISCALCO C., 2008 - *Case studies of Italian threatened species:* Isoetes malinverniana *(*Pteridophytes*)*. Atti del 103° Congresso della Società Botanica Italiana - Reggio Calabria, 17-19 settembre 2008: 58.

SJÖGREN-GULVE P., HANSKI I., 2000 - *Metapopulation viability analysis using occupancy model*. Ecol. Bull., 48: 53-71.

SMITH A.R., PRYER K.M., SCHUETTPELZ E., KORALL P., SCHNEIDER H., WOLF P.G., 2006 - *A classification for extant ferns.* Taxon*,* 55 (3): 705-731.

SMITH R.D., DICKIE J.B., LININGTON S.H., PRITCHARD H.W., PROBERT R.J. (eds.), 2003 - *Seed conservation: turning science into practice*. Kew: Royal Botanic Gardens Kew. 1023pp.

SMITH R.D., LININGTON S., 1997 - *The management of the Kew Seed Bank for the conservation of arid land and U.K. wild species*. Bocconea, 7: 273-280.

SOCIETÀ BOTANICA ITALIANA - COMMISSIONE PER LA PROMOZIONE DELLA RICERCA BOTANICA (ed.), 2004 - *La strategia europea per la conservazione delle piante (ed. italiana).* Inform. Bot. Ital., 36, suppl. 1. 41 pp.

SOCIETÀ BOTANICA ITALIANA - GRUPPO DI LAVORO PER GLI ORTI BOTANICI E I GIARDINI STORICI (ed.), 1995 - *Orti Botanici e Strategia della Conservazione*. Offset Grafica, Pisa. 64 pp.

SOCIETÀ BOTANICA ITALIANA (ed.), 2006 - *Orti Botanici e strategie di conservazione*. 20 pp.

SOLTIS D.E., SOLTIS P.S., 1986 - *Electrophoretic evidence for inbreeding in the fern* Botrychium virginianum *(*Ophioglossaceae*)*. Amer. J. Bot., 73 (4): 588-592.

SOONS M.B., OZINGA W.A., 2005 - *How important is long-distance seed dispersal for the regional survival of plant species?* Div. Distrib., 11: 165-172.

SOSTER M., 2001 - *Identikit delle Felci d'Italia. Guida al riconoscimento delle Pteridofite italiane*. Valsesia Editrice, Borgosesia. 304 pp.

SPAMPINATO G., CAMERIERE P., CRISAFULLI A., GANGALE C., PICONE R.M., SANTANGELO A., UZUNOV D., 2008 - Woodwardia radicans *(L.) Sm*. In: ROSSI G., GENTILI R., ABELI T., GARGANO D., FOGGI B., RAIMONDO F.M.,

BLASI C. (eds.), *Flora da conservare. Iniziativa per l'implementazione in Italia delle categorie e dei criteri IUCN (2001) per la redazione di nuove Liste Rosse.* Inform. Bot. Ital., 40, Suppl. 1: 132-134.

St. JOHN E.P., 1952 - *The evolution of the* Ophioglossaceae *of the eastern United States. III. The evolution of the leaf.* Quart. J. Florida Acad. Sci., 15: 1-19.

STOKEY A.G., 1948 - *The reproductive structures of the gametophytes of* Hymenophyllum *and* Trichomanes*.* Bot. Gaz., 109: 363-380.

STOKEY A.G., 1951 - *Duration of viability of spores of the* Osmundaceae. Amer. Fern J., *41*: 111-115.

STOKEY A.G., ATKINSON L.R., 1958 - *The gametophyte of the* Grammitidaceae. Phytomorphology, 8: 101-103.

STRASBURGER, 1995 - *Trattato di botanica - Parte sistematica.* Antonio Delfino Editore. Roma.

TALLOWIN N., SWINSCOW T.D.V., 1986 - Ophioglossum *in dense woodland*. Pteridologist, 1: 130

TEMPLEMAN T.S., DE MAGGIO A.E., 1990 - *Biochemistry of fern spore proteins: globulin storage proteins in* Onoclea sensibilis *and* Osmunda cinnamomea*.* Amer. J. Bot., 77 (2): 284-287.

TRAKHTENBROT A., NATHAN R., PERRY G., RICHARDSON D.M., 2005 - *The importance of long-distance dispersal in biodiversity conservation.* Div. Distrib., 11: 173-181.

TRIGIANO R.N., GRAY D.J., 2003 - *La coltura dei tessuti vegetali*. Edagricole. 382 pp.

TRYON A.F., BRITTON D.M., 1958 - *Cytotaxonomic studies on the fern genus* Pellaea. Evolution, 12: 137-145.

TRYON R.M. JR., TRYON A.F., 1982 - *Ferns and allied plants*. Springer-Verlag, New York.

TUTIN G.T, BURGES N.A., CHATER A.O., EDMONDSON J.R., HEYWOOD V.H., MOORE D.M., VALENTINE D.H., WALTERS S.M., WEBB D.A., (eds.) 1993 - *Flora Europea* 1, II ed., Univ. Press, Cambridge.

UNWIN G.L., HUNT M.A., 1996 - *Conservation and management of soft tree fern* Dicksonia antarctica *in relation to commercial forestry and horticulture.* In: CAMUS J.M., GIBBY M., JOHNS R.J. (eds.), *Pteridology in Perspective*: 125-137. Royal Botanic Gardens, Kew, London.

VAN WAES J.M., DEBERGH P.C., 1986 - In vitro *germination of some Western European orchids*. Physiol. Plant., 67: 253-261.

VIANE R.L.L., 1986 - *Taxonomical significance of the leaf indment in* Dryopteris *(*Pteridophyta*): I. Some North American, Macaronesian and European taxa.* Pl. Syst. Evol., 153: 77-105.

VIANE R.L.L., 1990 - *Epidermology of European ferns*. In: RITA J. (ed.), *Taxonomía, biogeografía y conservación de pteridófitos*: 69-89. Palma de Mallorca: Institut Menorquí d'Estudís - Societat d'Història Natural del les Illes Balears.

VIÉ J.-C., HILTON-TAYLOR C., POLLOCK C., RAGLE J., SMART J., STUART S.N., TONG R., 2008 - *The IUCN Red List: a key conservation tool.* In: VIÉ J.-C., HILTON-TAYLOR C., STUART S.N. (eds.) - *The 2008 Review of The IUCN Red List of Threatened Species*. IUCN Gland, Switzerland.

VIÉ J.-C., HILTON-TAYLOR C., STUART S.N. (eds.), 2009 - *Wildlife in a Changing World - An analysis of the 2008 IUCN Red List of Threatened Species™*. IUCN, Gland, Switzerland.

VINCENT J., 1966 - *Red Data Book* Vol. 2 *Aves*. IUCN, Morges, Switzerland.

VISCOSI V., FORTINI P., 2009 - *Analisi del pattern di covariazione dei caratteri morfologici fogliari di alcune specie simpatriche del subgenere* Quercus. Atti 104° Congresso della Società Botanica Italiana - Campobasso, 16-19 settembre 2009: 106.

VON ADERKAS P., CUTTER E., 1983 - *The Role of the Meristem in Gametophyte Development of the Osmundaceous Fern* Todea barbara *(L.) Moore.* Bot. Gaz., 144 (4): 519-524.

WAGNER H., 1998 - *A Background for the Study of Moonworts*. In: BERLIN N., MILLER P., BOROVANSKY J., SEAL U.S., BYERS O. (eds.), *Population and Habitat Viability Assessment Workshop for the Goblin Fern* (*Botrychium mormo*): Final Report. CBSG, Apple Valley, MN.

WAGNER W.H., SMITH A.R., 1993 - Pteridophytes*.* In: FLORA OF NORTH AMERICA EDITORIAL COMMITTEE (ed.), *Flora of North America: North of Mexico, Volume 1.* Oxford University Press. New York.

WAGNER W.H., WAGNER F.S., 1993 - Ophioglossaceae. In: MORIN N.R., *Flora of North America: North of Mexico, Volume 2,* Pteridophytes *and Gymnosperms.* Oxford University Press. New York.

WAGNER W.H., WAGNER F.S., BEITEL J.M., 1985 - *Evidence for interspecific hybridization in pteridophytes with subterranean mycoparasitic gametophytes.* Proc. Royal Soc. of Edinburgh, 86B: 273-281.

WALTER K.S., GILLET H.G. (eds.), 1998 - *1997 IUCN Red List of threatened Plants.* Compiled by the World Conservation Monitoring Centre. IUCN, the World Conservation Union, Gland and Cambridge. 862 pp.

WARDLAW A.C., 2002a - *Conservation of tree ferns* ex situ. In: DYER A.F., SHEFFIELD E., WARDLAW A.C. (eds.), *Fern Flora Worldwide, Threats and Responses.* Fern Gaz., 16 (6, 7 & 8): 393-397.

WARDLAW A.C., 2002b - *Horticultural approaches to the conservation of the ferns of the British Isles*. In: DYER A.F., SHEFFIELD E., WARDLAW A.C. (eds.), *Fern Flora Worldwide, Threats and Responses*. Fern Gaz., 16 (6, 7 & 8): 356-361.

WATANO Y., SAHASHI N., 1992 - *Predominant inbreeding and its genetic consequences in a homosporous fern genus* Sceptridium *(*Ophioglossaceae*)*. Syst. Bot., 17: 486-502.

WEBB G.J.W., 2008 - *The dilemma of accuracy in IUCN Red List categories, as exemplified by hawksbill turtles* Eretmochelys imbricata. Endang. Species Res., 6: 161-172.

WHITTIER D.P., 1962 - *The origin and development of apogamous structures in the gametophyte of* Pteridium *in sterile culture. Phytomorphology*, 12: 10-20.

WHITTIER D.P., 1965 - *Obligate apogamy in* Cheilanthes tomentosa *and* C. alabamensis. Bot. Gaz., 126: 275-281

WHITTIER D.P., 1966 - *The influence of growth substances on the induction of apogamy in* Pteridium *gametophytes*. Amer. J. Bot., 53: 882-886.

WHITTIER D.P., 1972 - *Gametophytes of* Botrychium dissectum *as grown in sterile culture*. Bot. Gaz., 133 (3): 336-339.

WHITTIER D.P., 1973 - *The effects of light and other factors on spore germination in* Botrychium dissectum. Can. J. Bot., 51: 1791-1794.

WHITTIER D.P., 1975 - *The influence of osmotic conditions on induced apogamy in* Pteridium *gametophytes*. Phytomorphology, 25: 246-249.

WHITTIER D.P., 1981 - *Spore germination and young gametophyte development of* Botrychium *and* Ophioglossum *in axenic culture.* Amer. Fern J., 71: 13-19.

WHITTIER D.P., 1987 - *Germination of* Helminthostachys *spores*. Amer. Fern J., 77: 95-99.

WHITTIER D.P., 1996 - *Extending the viability of* Equisetum hyemale *spores*. Amer. Fern J., 86 (4): 114-118.

WHITTIER D.P., 2000 - *Gametophyte and young sporophyte development in the* Ophioglossaceae. Amer. J. Bot., 87 (6) suppl.: 92

WHITTIER D.P., 2006 - *Red light inhibition of spore germination in* Ophioglossum crotalophoroides*.* Can. J. Bot., 84: 1156-1158.

WHITTIER D.P., MOYROUD R., 1993 - *The promotion of spore germination and gametophyte development in* Ophioglossum palmatum *by low pH.* Amer. Fern J., 83(2): 41-46.

WHITTIER D.P., PRATT L.H., 1971 - *The effect of light quality on the induction of apogamy in prothalli of* Pteridium aquilinum. Planta, 99: 174-178.

WHITTIER D.P., STEEVES T.A., 1960 - *The induction of apogamy in the bracken fern*. Can. J. Bot., 38: 925-930.

WHITTIER D.P., STEEVES T.A., 1962 - *Further studies on induced apogamy in ferns*. Can. J. Bot., 40: 1525-1531.

WHITTIER D.P.,THOMAS R.D., 1993 - *Gametophytes and young sporophytes of* Botrychium jenmanii *in axenic culture.* J. Plant Sci., 154 (1): 68-74.

WILHALM T., HILPOLD A., 2006 - *Rote Liste der gefährdeten Gefäbpflanzen Südtirols.* Gredleriana, 6: 115-198.

WILKINSON T., 2002 - In vitro *tecniques for the conservation of* Himenophyllum tumbrigense *(L.) SM.* In: DYER A.F., SHEFFIELD E., WARDLAW A.C. (eds.), *Fern Flora Worldwide, Threats and Responses*. Fern Gaz., 16 (6, 7 & 8): 458.

WILLAN R.L., 1987 - *A guide to forest seed handling with special reference to the tropics*. FAO Forestry Paper 20/2.

WILSON K.A., 2002 - *Continued pteridophyte invasion of Hawaii*. Amer. Fern J., 92: 179-183.

WINDHAM M.D. 1986 - *The use of fern herbarium specimens in biosystematic research: introduction*. Amer. Fern J., 76(3): 101.

WINDHAM M.D., HAUFLER C.H., 1986 - *Biosystematic uses of fern gametophytes derived from herbarium specimens.* Amer. Fern J., 76 (3): 114-128.

WINDHAM M.D., WOLF P.G., RANKER T.A., 1986 - *Factors affecting prolonged spore viability in herbarium collections of three species of* Pellaea. Amer. Fern J., 76 (3): 141-148.

WINTHER J.L., FRIEDMAN W.E., 2007 - *Arbuscular mycorrhizal symbionts in* Botrychium *(*Ophioglossaceae*).* Amer. J. Bot., 94 (7): 1248-1255.

WOLF P.G., PRYER K.M., SMITH A.R., HASEBE M., 1998 - *Phylogenetic studies of extant pteridophytes*. In: SOLTIS D.E., SOLTIS P.S., DOYLE J. (eds), *Systematics of plants II*: 541-556. Kluwer, Norwell, MA.

WORLD WATCH INSTITUTE, 1994 - *A World Watch Institute Report on Progress Towards a sustainable Society*. New York.

WYSE JACKSON P.S., 2004 - *Developing International Targets for Botanic Gardens in Conservation.* BGjournal, 1 (1): 4-6.

WYSE JACKSON P.S., SUTHERLAND L.A., 2000 - *International Agenda for Botanic Gardens in Conservation.* Botanic Gardens Conservation International, U.K.

ZELDITCH M., SWIDERSKI D., SHEETS D.H., FINK W., 2004 - *Geometric Morphometrics for Biologists*. Academic Press.

ZENKTELER E.K., 2002 - Ex situ *breeding and reintroduction of* Osmunda regalis *L. in Poland*. *In*: DYER A.F., SHEFFIELD E., WARDLAW A.C. (eds.), *Fern Flora Worldwide, Threats and Responses*. Fern Gaz., 16 (6, 7 & 8): 371-376.

ZHANG X.-C., JIA J.-S., ZHANG G.M., 2002 - *Survey and evaluation of the natural resources of* Cibotium barometz *(L.) J. Smith in China, with reference to the implementation of the CITES convention*. *In*: DYER A.F., SHEFFIELD E., WARDLAW A.C. (eds.), *Fern Flora Worldwide, Threats and Responses*. Fern Gaz., 16 (6, 7 & 8): 383-392.

ZOCCO PISANA L., TOMEI P.E., SANI A., 2005 - *Il ruolo dell'Orto Botanico di Lucca (Toscana) nella conservazione ex situ di specie vegetali legate agli ambienti umidi.* Inform. Bot. Ital., 37 (1 parte A): 460-461

ZURLINI G., GROSSI L., ROSSI O., 2002 - *Spatial-Accumulation pattern and extinction rates of Mediterranean flora as related to species confinement to habitats in preserves and larger areas.* Conserv. Biol., 16: 948-963.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutte le persone che a vario titolo hanno contribuito alla presente ricerca:
la prof.ssa Anna Scoppola e il personale dell'Orto Botanico della Tuscia e dell'Erbario UTV; il prof. Silvano Onofri e tutto il laboratorio di Botanica Sistematica e Micologia; Cristina Olmati della Banca del Germoplasma della Tuscia per l'aiuto nelle prime fasi del lavoro.
Ana Ibars e Elena Estrelles del Banco de Germoplasma de la Universitat de Valencia; Dino Marchetti di Massa per i preziosi consigli e la disponibilità.
Il personale degli erbari consultati, in particolare: Serenella Rais dell'Erbario di Cagliari (CAG); Carmen Quesada dell'Erbario di Granada (GDA); Piero Cuccuini dell'Erbario di Firenze (FI); Ilaria Bonini dell'Erbario di Siena (SIENA); Ulrike Starck e Robert Vogt dell'Erbario di Berlino (B); Jesús Riera Vicent dell'Erbario di Valencia (VAL); Germinal Rouhan, dell'Erbario di Parigi (P); Arnaud Delcoigne dell'Erbario di Clermont-Ferrand (CLF); Philippe Clerc dell'Erbario di Ginevra (G); Charo Noya dell'Erbario di Madrid (MA); Marianna Usai dell'Erbario di Sassari (SASSA); Lucia Amadei dell'Erbario di Pisa (PI).
Paul Ripley e Patrick J. Acock della British Pteridological Society, Sébastien Sant del Jardin Botanique de la Ville de Nice, Mairo Mannocci di Livorno; Simonetta Peccenini dell'Università di Genova; Sergio Buono di Oriolo Romano; i guardiaparco della Riserva Selva del Lamone (Viterbo) e i Forestali di Follonica (Grosseto) che mi hanno aiutato nella ricerca in campo. Lorenzo Peruzzi dell'Università di Pisa e Ronnie Viane dell'Università di Ghent, per la collaborazione riguardo allo studio su Ophioglossum.

Un ringraziamento speciale a Silvia e Giulia che mi hanno sopportato in questi 3 anni e ad Andrea per il sostegno e l'appoggio continuo.