

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



FACOLTÀ DI AGRARIA

Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale

Dottorato di Ricerca in:
Scienze e Tecnologie delle Produzioni Agro-Alimentari
XIX Ciclo

**NUOVE METODICHE DI ANALISI PALINOLOGICHE E STUDI
FINALIZZATI ALLA VALORIZZAZIONE DELLE PRODUZIONI
LOCALI DI MIELE**

Candidato: **Dr. Michele Scala**

Tutore: **Ch.ma Prof. Giovanna Aronne**

Coordinatore: **Ch.mo Prof. Salvatore Spagna Musso**

INDICE

CAPITOLO 1 IL POLLINE	
1.1 CENNI STORICI	4
1.2 BIOLOGIA	5
1.3 ASPETTI APPLICATIVI	8
CAPITOLO 2 NUOVE PROPOSTE PER IL RICONOSCIMENTO DEL POLLINE	
2.1 METODI ANALITICI TRADIZIONALI	10
2.2 NUOVE TECNICHE DI OSSERVAZIONE DEL POLLINE	14
2.3 SISTEMA AUTOMATICO PER IL CONTEGGIO DEI POLLINI	20
2.4 CHIAVE DICOTOMICA PER L'IDENTIFICAZIONE DEI PRINCIPALI POLLINI AERODIFFUSI	24
2.5 DATABASE MELISSOPALINOLOGICO DELLE SPECIE MEDITERRANEE	30
2.6 DISCUSSIONI	34
CAPITOLO 3 EFFETTI DEI FATTORI AMBIENTALI SULLA BIOLOGIA DEL POLLINE	
3.1 EFFETTO INTEGRATO DELLA TEMPERATURA E DELL'UMIDITÀ SULLA VITALITÀ DEL POLLINE DI SPECIE ORTIVE	36
3.2 EFFETTO DELLA MICROGRAVITÀ SIMULATA SULLO SVILUPPO DEL TUBETTO POLLINICO	43
CAPITOLO 4 ANALISI PALINOLOGICHE FINALIZZATE AL MIGLIORAMENTO DELLA QUALITÀ DEI MIELI	
4.1 MELISSOPALINOLOGIA	53
4.2 VALUTAZIONE DELLE CARATTERISTICHE BOTANICHE DEL MIELE PRODOTTO TRADIZIONALMENTE DAGLI APICOLTORI DI UNA DETERMINATA AREA GEOGRAFICA	59
4.3 VALUTAZIONE DELLA PRODUTTIVITÀ POTENZIALE DI AREE GENERALMENTE NON UTILIZZATE PER LA PRODUZIONE DI MIELE	76
4.4 VALUTAZIONE DELLA VARIABILITÀ DELLE CARATTERISTICHE DEI MIELI PRODOTTI NELLO STESSO SITO DA ALVEARI DIVERSI ED IN ANNATE SUCCESSIVE	96

4.5 APPLICAZIONE DEI RISULTATI DEGLI STUDI DI CARATTERIZZAZIONE DEI MIELI PER L'INDIVIDUAZIONE DI PRODUZIONI DI QUALITÀ E PER LA REDAZIONE DI DISCIPLINARI DI PRODUZIONE FINALIZZATI ALL'OTTENIMENTO DI MARCHI DI QUALITÀ	103
CONCLUSIONI GENERALI	112
BIBLIOGRAFIA	114

CAPITOLO 1

IL POLLINE

1.1 CENNI STORICI

La funzione del polline come agente necessario alla fruttificazione era conosciuta fin dai tempi antichi come testimonia il bassorilievo del palazzo del re assiro Ashurnasirpal II, 883-859 a.c., conservato presso il Metropolitan Museum of Art di New York che raffigura l'impollinazione manuale della palma da datteri (Fig. 1.1).



Fig. 1.1: Bassorilievo raffigurante l'impollinazione manuale della palma da datteri, 883-859 a.c., Metropolitan Museum of Art New York.

Tuttavia, il termine polline (dal latino *pollen* = fine farina) fu coniato dal botanico tedesco Valerius Cordus intorno al 1500 per descrivere la fine polverina presente sulle antere dei fiori del giglio. E' solo intorno al 1640 che si riportano le prime osservazioni e descrizioni morfologiche di granuli di polline al microscopio ad opera dell'inglese Nehemiah Grew.

Lo studio sistematico del polline è una disciplina piuttosto recente, ufficializzato nel 1917 in occasione del XVI Meeting dei Naturalisti Scandinavi ad opera di Lennart Von Post che presentò uno studio statistico di pollini fossili nei sedimenti lacustri (Von Post, 1917), seguì di pochi anni i primi lavori pubblicati di Paulus Reinsch nel 1884 con la descrizione dei trattamenti con acidi del polline e nel 1895 con i lavori del polline nel miele di Pfister. Il termine palinologia fu proposto successivamente nel 1944 ad opera di Hyde & Williams (1944) per descrivere lo studio di pollini e spore presenti nell'ambiente.

1.2 BIOLOGIA

Nel ciclo ontogenetico delle piante superiori il granulo di polline rappresenta il passaggio dalla generazione sporofitica (diplonte) a quella gametofitica (aplonte). La produzione del polline nella pianta avviene a livello delle antere nei fiori delle angiosperme o a livello dei microsporofilli nei microconi delle gimnosperme. Questo polline una volta maturo viene liberato dalle logge delle antere e con varie modalità raggiunge lo stigma delle angiosperme o la

goccia micropilare degli ovuli delle gimnosperme dove germina producendo un tubetto pollinico. La funzione del tubetto pollinico, che rappresenta la generazione gametofitica, è quella di trasportare i microgameti aploidi "*sperm cells*" in prossimità del macrogamete, l'ovocellula, dove avverrà successivamente il processo di fecondazione e sviluppo dell'embrione.

Il momento iniziale dello sviluppo del polline avviene come detto a livello delle antere o dei microsporofilli ed ha inizio dalle cellule madri delle microspore $2n$ che attraverso la meiosi danno origine a quattro microspore aploidi n unite insieme a formare una tetrad. Le microspore raggiungono lo stadio di maturità attraverso continui ed intensi apporti di materiali strutturali e nutritivi da parte delle cellule del tappeto (tessuto basale delle antere appositamente dedicato a tale compito). Il processo di maturazione del polline nelle antere è, dunque, guidato dall'attività del tappeto stesso che, oltre a nutrire le microspore, produce numerose sostanze tra cui i precursori della parete esterna del granulo, la callasi per degradare il callosio che tiene unite le tetradi, i corpi di Ubisch (piccoli granuli di circa $5\ \mu$ di diametro la cui funzione è ancora pressoché sconosciuta), enzimi, proteine, trifina e pollenkitt. Questi ultimi composti sono presenti sulla superficie esterna del granulo maturo ed hanno svariate funzioni quali proteggere il polline durante il trasporto, favorire l'adesione tra i granuli, al corpo dei pronubi e allo stimma, regolare il processo di riconoscimento polline-stimma, favorire l'idratazione e la germinazione del granulo pollinico (Pacini *et al.*, 1985; Hesse, 1981).

La struttura finale del granulo pollinico al momento del rilascio dalle antere è abbastanza complessa. Il materiale cellulare è racchiuso in un doppio involucro costituito da una parete interna di natura pectocellulosica chiamata *intina* e da una parete esterna di sporopollenina (derivati dei carotenoidi) detta *esina*.

L'intina è sostanzialmente simile per struttura e composizione alla parete primaria di una cellula vegetale, ha un andamento più o meno regolare con uno spessore variabile da specie a specie. La sua deposizione avviene sotto il controllo genetico della microspora e la sua deposizione avviene successivamente a quella dell'esina.

L'esina è la parete più esterna del granulo pollinico ed è costituita come detto dalla sporopollenina. La deposizione dell'esina precede quella dell'intina ed avviene sotto il controllo del tappeto (Heslop-Harrison, 1968; Heslop-Harrison *et al.*, 1973). A differenza dell'intina questa parete è quella che caratterizza morfologicamente il granulo di polline, in quanto presenta interruzioni e sculture superficiali specifici del gruppo tassonomico e quindi utili ai fini del riconoscimento.

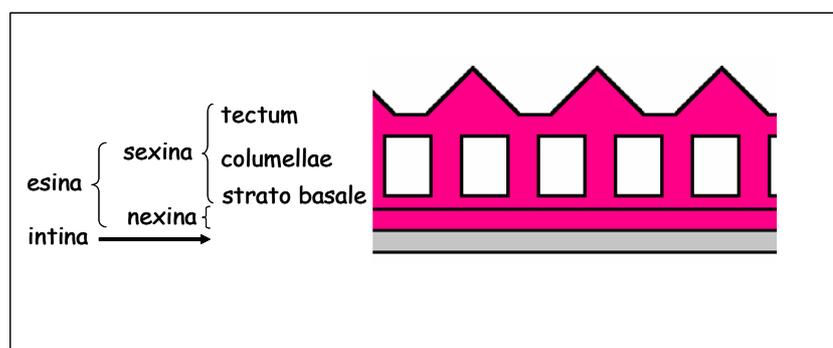


Fig. 1.2: Schema semplificato della parete del polline.

Strutturalmente l'esina è suddivisa in una porzione esterna sculturata la *sexina* ed una parte interna non sculturata a contatto con l'intina detta *nexina*. La *sexina* a sua volta è costituita da uno *strato basale* e da un *tectum* poggiante sullo strato basale mediante strutture simili a pilastri dette *columella* o *bacula* (Fig. 1.2 e 1.3).



Fig. 1.3: Fotografia al microscopio elettronico a scansione dell'esina del polline di *Anthemis* sp. (Asteraceae). Da John J. Skvarla, sito web: <http://www.ou.edu/cas/botany-micro/faculty/skvarla.html>

1.3 ASPETTI APPLICATIVI

La palinologia studia la morfologia dei granuli di polline per collegarli al tipo di pianta che li ha prodotti. Non è una scienza fine a se stessa ma presenta innumerevoli risvolti applicativi non solo in campo botanico, entomologico ed agronomico ma anche in campo medico, archeologico, geologico, alimentare e forense. Tre sono i tronconi principali in cui si sviluppa l'analisi palinologica:

- Aerobiologia e allergologia: alla luce del progressivo aumento dei casi di allergie respiratorie causate dai pollini è andata sempre più

crescendo l'attività di monitoraggio dei pollini presenti nell'atmosfera al fine di produrre dei calendari e bollettini pollinici utili per i programmi di prevenzione per i soggetti allergici.

- Paleopalinologia, il riconoscimento tassonomico dei granuli pollinici conservati nei sedimenti stratificati permette di ricostruire la vegetazione esistente in quel periodo, è sorprendente come pochi grammi di materiale siano sufficienti per ricostruire la vegetazione di una intera foresta.
- Melissopalinologia: Il nettare bottinato dalle api, elaborato e depositato nei favi dell'alveare, contiene sempre una quantità variabile di granuli pollinici. Dall'analisi del polline contenuto nel miele è possibile risalire al tipo di flora visitata dalle api e quindi alla sua origine botanica. Inoltre la frequenza con cui ricorrono le varie specie è caratteristica di un dato territorio permettendo così anche una caratterizzazione geografica del miele prodotto.

NUOVE PROPOSTE PER IL RICONOSCIMENTO DEL POLLINE

2.1 METODI ANALITICI TRADIZIONALI

Il lavoro di determinazione botanica del polline si basa comunemente sulla osservazione al microscopio ottico dei granuli. Questo lavoro è tecnicamente possibile in quanto ogni specie pollinica presenta caratteristiche peculiari che un occhio educato è in grado di riconoscere e classificare. In particolare le strutture più comunemente adottate per la discriminazione dei granuli sono:

- Tipo di aperture. Le aperture sono delle discontinuità dell'esina la cui funzione è quella di favorire la fuoriuscita del tubetto pollinico. Oltre a forme non classificabili a causa di margini poco definiti (*aperturoidi*), le aperture si classificano in semplici o composte. Le aperture semplici sono di due tipi: *pori* e *colpi* (Fig. 2.1 a e b) ed i pollini si definiscono rispettivamente *porati* o *colpati*. Le aperture composte sono costituite dall'insieme di poro e colpo ed il granulo è detto *colporato* (Fig. 2.1 c).

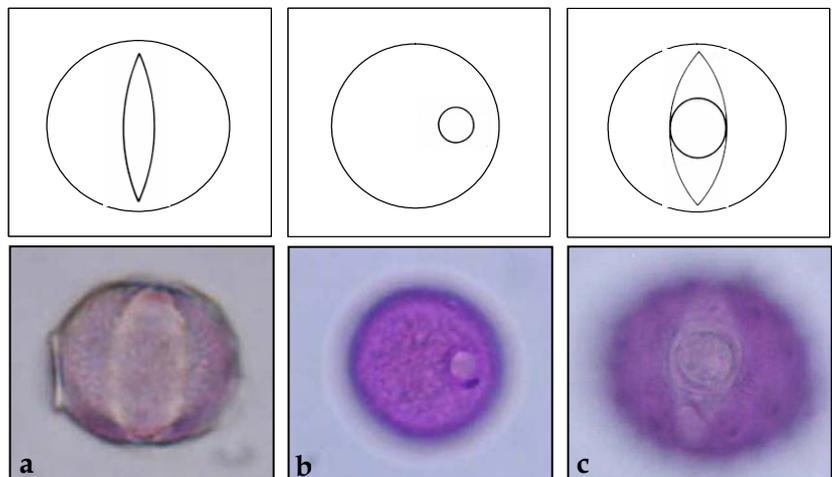


Fig. 2.1: Tipi di aperture comunemente presenti sui granuli di polline. a): colpato (*Brassica rapa* L.); b): porato (*Poa annua* L.); c) colporato (*Centaurea solstitialis* L.).

- Numero delle aperture. I pollini possono essere privi di aperture (*inaperturati*) o presentare una, due, tre, quattro, cinque, sei, molte aperture (*pollini mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, esa-, poli-aperturati*) (Fig. 2.2).

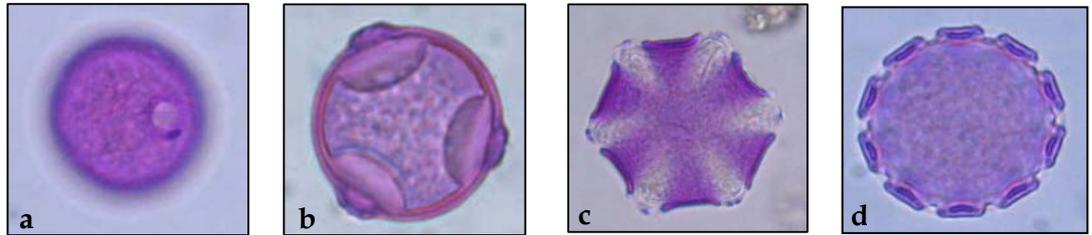


Fig. 2.2: Numero di aperture. a): monoporato (*Poa annua* L.); b): triporato (*Ostrya carpinifolia* Scop.); c): esacolpato (*Calamintha nepeta* (L.) Savi); d): policolpato (*Borago officinalis* L.).

- Scultura dell'esina. La superficie esterna dell'esina può essere variamente sculturata, infatti essa può presentarsi da completamente liscia a fortemente modellata (Fig. 2.3).

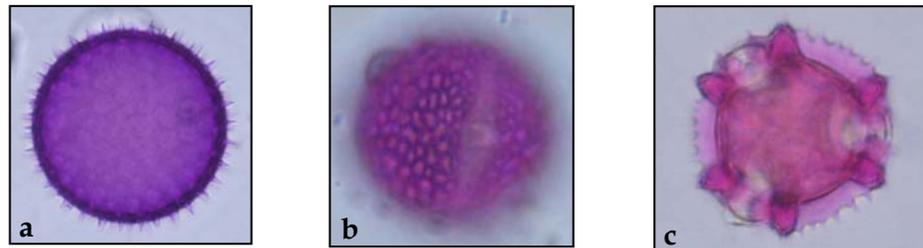


Fig. 2.3: Sculture superficiali. a): echinato (*Malva sylvestris* L.); b): reticolato (*Citrus limon* L.); c): fenestrato (*Taraxacum* sp.).

- Rapporto asse polare (P) ed asse equatoriale (E). Il granulo di polline può avere una forma che varia da sferica ad ellissoidale con una differente proporzione tra gli assi. Si hanno così pollini *sferoidali* ($P=E$), *prolati* ($P>E$), *oblato* ($P<E$), *piriformi*, *saccati* (Fig. 2.4).

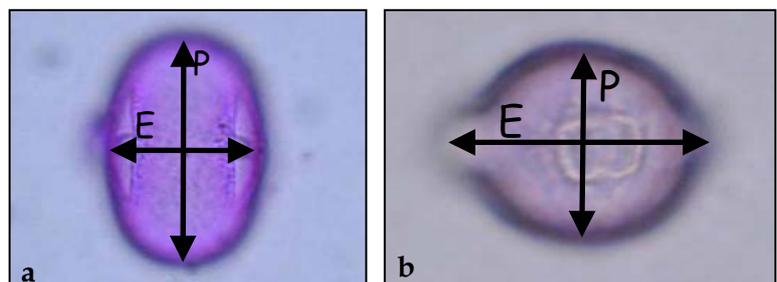


Fig. 2.4: Rapporto assi. a): polline prolato (*Anchusa* sp.); b) Polline oblato (*Rosa* sp.)

- Dimensioni. La dimensione del polline non è un carattere fortemente discriminante in quanto è funzione soprattutto dello stato di idratazione del granulo (Pacini, 1990; Nepi *et al.*, 2001). Tuttavia i pollini vengono classificati in classi di dimensione che variano dal molto piccolo (5 μm per i generi *Myosotis* e *Parietaria*) al molto grande (200 μm nel genere *Cucurbita*) (Fig. 2.5 e 2.6).

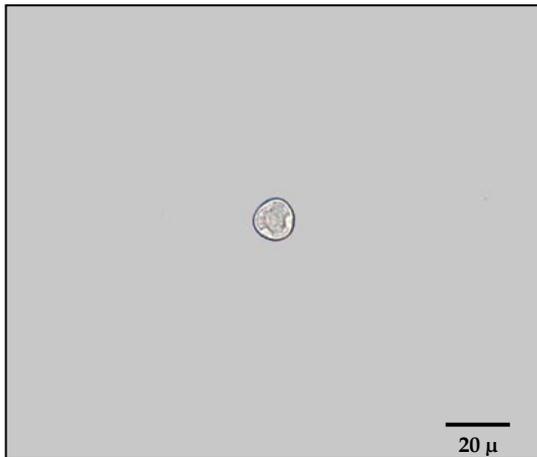


Fig. 2.5: Polline di *Parietaria* osservato al microscopio ottico a luce trasmessa.

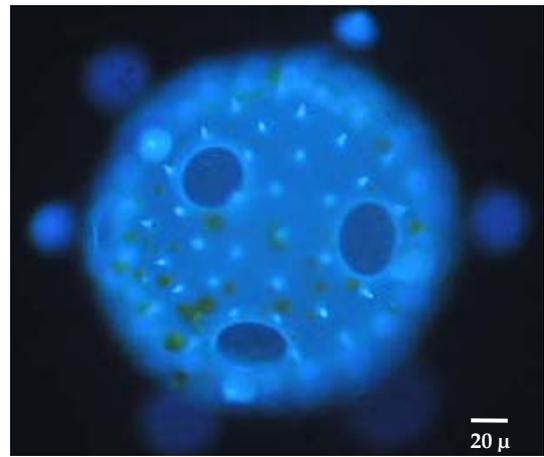


Fig. 2.6: Polline di *Cucurbitaceae* osservato al microscopio ottico in fluorescenza.

Attraverso la comparazione delle caratteristiche dei granuli pollinici osservati al microscopio con campioni di riferimento, presenti nelle collezioni (palinoteche) o riportati su atlanti specifici, è possibile l'identificazione botanica della specie.

Difatti il metodo di analisi di per se è semplice, quello che lo rende astioso e tedioso sono le ore ed ore passate a sfogliare atlanti specifici e a cercare specie di riferimento nelle collezioni per giungere alla determinazione del polline incognito. L'altra grande difficoltà che si incontra durante l'osservazione al microscopio è dovuta al fatto che il polline avendo una forma tridimensionale può presentarsi in

molteplici posizioni differenti tali da agevolare o precludere completamente la buona osservazione dei caratteri discriminanti.

Per ovviare a tali inconvenienti diversi gruppi di ricerca stanno lavorando per sviluppare dei sistemi di riconoscimento automatico del polline basato sull'analisi di immagine (Langford *et al.*, 1990; France *et al.*, 1997; Boucher *et al.*, 2002; Ronneberger *et al.*, 2002). Il principio su cui si basa la maggior parte di questi metodi è il riconoscimento automatico per sovrapposizione di immagini, questo comporta la produzione di una libreria di immagini digitali di specie note utilizzate dal software come maschera da sovrapporre a quella incognita. Tuttavia, due sono le difficoltà che limitano l'utilizzo di tale metodo, una riguarda la differente posizione che il granulo pollinico può assumere sul vetrino che richiederebbe l'acquisizione in libreria di un numero altissimo di immagini per ogni specie, e, l'altra, è quella che sul fondo del vetrino oltre ai granuli pollinici sono sempre presenti, in quantità variabile, particelle di diverso tipo.

Scopo di questa parte del lavoro è stato quello di trovare nuove tecniche per velocizzare il riconoscimento del polline e per aumentare il livello di qualità dell'analisi stessa. Questo obiettivo è stato raggiunto sia migliorando l'osservazione dei granuli al microscopio e sia velocizzando la ricerca delle specie polliniche sugli atlanti passando dagli archivi cartacei a quelli digitali.

2.2 NUOVE TECNICHE DI OSSERVAZIONE DEL POLLINE

Introduzione

Durante l'osservazione del polline al microscopio è comune imbattersi in impurità di diversa origine che normalmente sono presenti nel preparato e che a volte ricoprono anche i granuli. In più ad interferire in modo più o meno marcato sulla buona osservazione delle strutture polliniche è lo stesso citoplasma presente all'interno del polline assieme a varie sostanze (pollenkitt, trifina) presenti sulla superficie.

In letteratura sono riportate diverse procedure per meglio mettere in evidenza l'esina (Erdtman, 1971). Due sono i sistemi maggiormente adoperati: la colorazione dell'esina con fuxina basica e l'acetolisi. La tecnica della colorazione con fuxina prevede l'aggiunta di questo colorante alla gelatina glicerinata (Ogden *et al.*, 1974) che si usa per il montaggio del preparato sul vetrino. Questo metodo anche se è il più veloce e comodo presenta tutti i problemi di osservazione sopra esposti. La tecnica dell'acetolisi, invece, ha il vantaggio di eliminare tutto il materiale biologico presente ad eccezione dell'esina che diventa ben visibile. Lo svantaggio di questa tecnica è che si possono verificare alterazioni morfologiche del granulo tali da renderne difficoltoso il successivo riconoscimento (Hesse & Waha, 1989; Dafni, 1992).

Per superare tali difficoltà diversi ricercatori utilizzano la microscopia elettronica a scansione (SEM) e la microscopia laser confocale per meglio mettere in

evidenza i piccolissimi dettagli della superficie del granulo (Langford *et al.*, 1990; Ronneberger *et al.*, 2002). Tuttavia entrambi questi metodi risulterebbero troppo costosi per analisi di routine.

La microscopia a fluorescenza utilizza come sorgente luminosa la luce UV proveniente da lampade al mercurio o allo xenon. Normalmente la lunghezza d'onda dello spettro luminoso prodotto da queste lampade varia dai 300 ai 600 nm. Con il termine fluorescenza si può definire quella proprietà che hanno i corpi di assorbire la luce ad una determinata lunghezza d'onda e di emetterla rapidamente ad una lunghezza d'onda più alta. Opportuni filtri posti lungo il passaggio ottico della luce UV consentono di selezionare le varie lunghezze d'onda emesse dall'oggetto favorendone il passaggio di alcune ed escludendone altre.

La microscopia a fluorescenza è comunemente applicata agli studi anatomici e citologici di diverse strutture biologiche, ed è molto più sensibile rispetto alla microscopia a luce trasmessa perché permette di ottenere un elevato contrasto tra l'immagine dell'oggetto ed il fondo. Inoltre la microscopia a fluorescenza e la microscopia a luce trasmessa sono in genere accoppiate su di un unico microscopio, con il vantaggio di poter osservare contestualmente lo stesso campione con entrambi i metodi.

Questa parte del lavoro si inserisce in questo scenario scientifico finalizzato allo sviluppo di nuove tecniche di riconoscimento tassonomico automatico dei granuli polline. Più specificamente, scopo di questi esperimenti è stato trovare un metodo di analisi microscopica capace di mettere in evidenza solo l'esina dei

granuli pollinici in modo da evitare l'interferenza con lo sfondo e le impurità presenti nel campione, ma senza ricorrere all'acetolisi.

Materiali e Metodi

Le procedure adottate per la preparazione dei campioni sottoposti alla osservazione in fluorescenza sono quelle tradizionali descritte da Erdtman (1971). Il polline utilizzato per le osservazioni è stato prelevato sia da antere alla deiscenza sia da sedimenti di mieli. Tale polline è stato successivamente montato su vetrino in fuxina glicerinata. Per l'osservazione si è utilizzato un microscopio Olympus BX60 ad epifluorescenza con lampada al mercurio. Al fine di ottenere una immagine della sola esina, sono state analizzate varie combinazioni di filtri di eccitazione, dicroici e di emissione per individuarne la combinazione più adatta allo scopo. Alla fine di questa fase di lavoro è stata individuata una specifica combinazione di filtri, i cui dettagli non saranno riportati in quanto sono attualmente oggetto di valutazione per l'ottenimento di un brevetto.

Risultati

In Fig. 2.7 si riporta, come esempio, l'immagine del polline di *Chorisia speciosa* St.-Hill. Durante l'osservazione in luce trasmessa (Fig. 2.7 a, b, c) risulta poco visibile il tipo di apertura e la scultura superficiale, inoltre la presenza di pollenkitt disturba ulteriormente l'osservazione. Lo stesso granulo osservato in

fluorescenza mostra in modo molto più evidente la scultura superficiale (d), il numero (e) e il tipo di aperture (f). Queste immagini mettono in chiara evidenza la scultura superficiale del granulo di polline che appare più nitida e ricca di particolari rispetto a quella in luce trasmessa.

Inoltre la tecnica permette di ottenere una immagine della sola esina che appare su fondo nero.

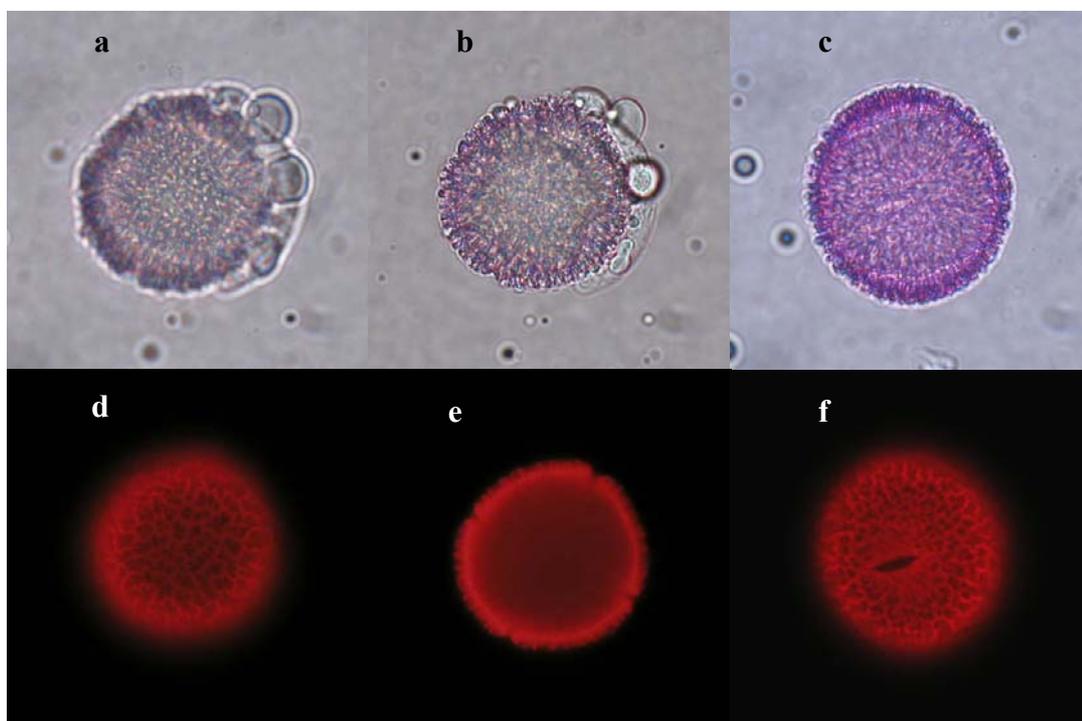


Fig. 2.7: Granulo di polline di *C. speciosa* osservato sia al microscopio ottico in luce trasmessa e sia in fluorescenza: a-d, b-e, c-f: visione polare, mediana ed equatoriale.

In Fig. 2.8 si riporta, come ulteriore esempio, una immagine di sedimento di miele osservata in luce trasmessa a sx ed in fluorescenza a dx. Anche in questo caso il riconoscimento ed in alcuni casi addirittura l'individuazione dei pollini in luce trasmessa è resa difficile dall'enorme quantità di impurità presente nel sedimento.

La stessa immagine osservata in fluorescenza mostra chiaramente i granuli di polline eliminando tutte le particelle estranee e le impurità presenti.

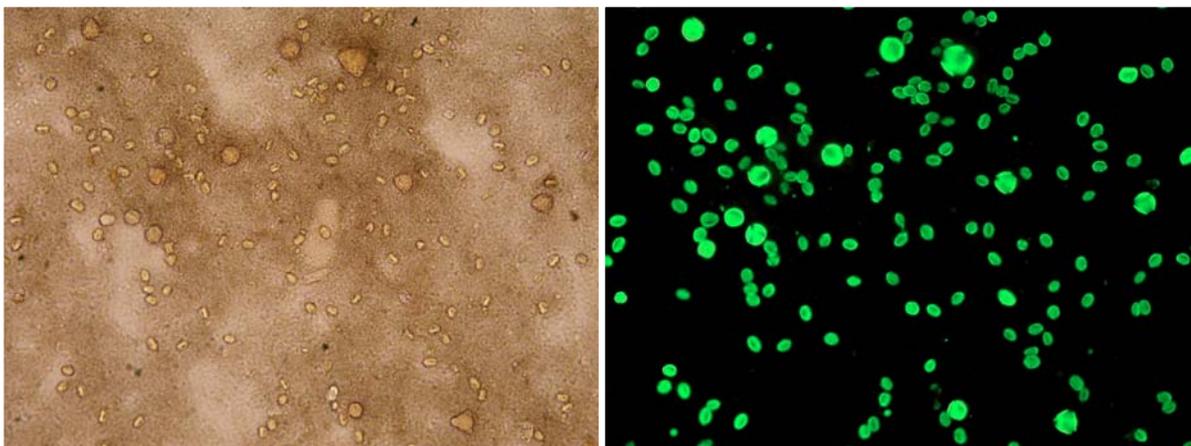


Fig. 2.8: Sedimento di miele osservato in luce trasmessa a sx ed in fluorescenza a dx.

E' evidente che il sistema è in grado di eliminare la visione di eventuale materiale estraneo presente nel sedimento in quanto le impurità in seguito ad eccitazione con luce UV emettono con una lunghezza d'onda differente da quella del polline.

Conclusioni

Questo metodo è stato presentato durante il Congresso Internazionale di palinologia tenutosi a Granada nel 2004 (Aronne & Scala, 2004). In quella occasione la tecnica ha destato notevole interesse sia nei ricercatori che nei rappresentanti di società finalizzate allo sviluppo per scopo commerciale di sistemi innovativi per l'analisi dei pollini.

La combinazione di filtri individuata è in grado non solo di mettere in evidenza soltanto i singoli granuli di polline isolandoli dalle eventuali impurità presenti nel preparato, ma anche di ottenere immagini molto più nitide dei particolari diagnostici dell'esina. Come riportato da Ronneberger *et al.*, (2002), quest'ultimo aspetto è caratteristico dell'osservazione al microscopio con il principio dell'epifluorescenza. L'osservazione in fluorescenza con microscopio laser confocale è stata adottata anche per ricostruire modelli tridimensionali dei granuli di polline delle diverse specie finalizzati al riconoscimento automatico (Ronneberger *et al.*, 2002). Anche in questi casi l'eliminazione dell'interferenza delle impurità e del substrato è riportata come un aspetto fondamentale per rendere concretamente utile l'uso dei sistemi di riconoscimento automatico delle forme.

2.3 SISTEMA AUTOMATICO PER IL CONTEGGIO DEI POLLINI

Introduzione

In molte tipologie di analisi palinologiche è importante conoscere il numero totale di pollini presenti sul vetrino da microscopio. Nel caso delle analisi melissopalinoologiche la conoscenza del numero totale di granuli di polline ha valenza analitica importante in quanto permette all'operatore di conoscere il metodo di estrazione del miele dai favi ed è di supporto all'analisi qualitativa per la determinazione dell'origine botanica del miele. L'analisi prevede, per ogni campione, l'individuazione ed il conteggio di circa un migliaio di granuli. Questo lavoro quasi sempre è reso difficoltoso dalla presenza sul vetrino non solo di polline ma anche di particelle estranee, e richiede, per ogni campione, un tempo di lavoro lungo e noioso.

La possibilità di usufruire di un sistema automatico per il conteggio del numero totale dei pollini è quindi un utile strumento capace di velocizzare i tempi di lavoro (Aronne *et al.*, 2001). L'applicazione di un tale tipo di analisi è indubbiamente vantaggiosa ai fini della riduzione dei costi complessivi che sono giudicati dai committenti sempre piuttosto alti. Lo scopo di questa parte del lavoro è stato quello di progettare e sviluppare un sistema di analisi d'immagine finalizzato al conteggio automatico dei granuli presenti sul vetrino.

Materiali e Metodi

La preparazione del vetrino per l'analisi è quella descritta in letteratura (Von Der Hoe *et al.*, 2004). Per l'osservazione del vetrino si è utilizzato un microscopio ad epifluorescenza Olympus BX 60 con lampada al mercurio. Mediante la tecnica descritta in precedenza (vedi par. 2.2) si ottiene un'immagine ripulita da tutte le particelle estranee presenti. Successivamente tale immagine è stata digitalizzata mediante fotocamera Olympus 4040 ed analizzata da un software specifico denominato *Pollen*© realizzato in collaborazione con esperti informatici e di seguito descritto.

Risultati

L'immagine microscopica del polline, acquisita attraverso una fotocamera o videocamera digitale, deve essere processata dal software che come prima operazione procede alla sua binarizzazione (trasformazione dell'immagine in colori bianco e nero). Questa fase è la più delicata dell'intero processo perché è il momento in cui vengono selezionati gli elementi da conteggiare. Questo lavoro è particolarmente semplificato utilizzando il sistema a fluorescenza descritto in precedenza in quanto viene fornito al software una immagine già privata di tutte le particelle estranee. Il software quindi in pochi secondi classificherà come sfondo tutti i pixel dell'immagine di colore nero o con combinazioni RGB molto simili al nero e come oggetti tutte le parti dell'immagine colorate. Successivamente, il software numera e conta tutti gli oggetti presenti.

In Fig. 2.9 si riportano a titolo di esempio le fasi di lavoro del software *Pollen©* relative al conteggio del numero totale di pollini presenti in un sedimento di miele. In particolare in Fig. 2.9a si riporta l'immagine del sedimento vista al microscopio a fluorescenza. La stessa immagine viene successivamente acquisita da software (Fig. 2.9b), binarizzata (Fig. 2.9c), e rapidamente processata con la numerazione ed il conteggio finale del numero totale dei granuli di polline presenti (Fig. 2.9d).

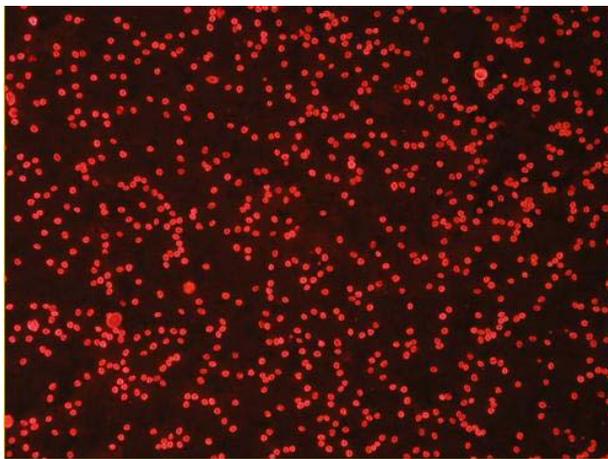


Fig. 2.9a: Immagine del sedimento di miele osservata in fluorescenza.

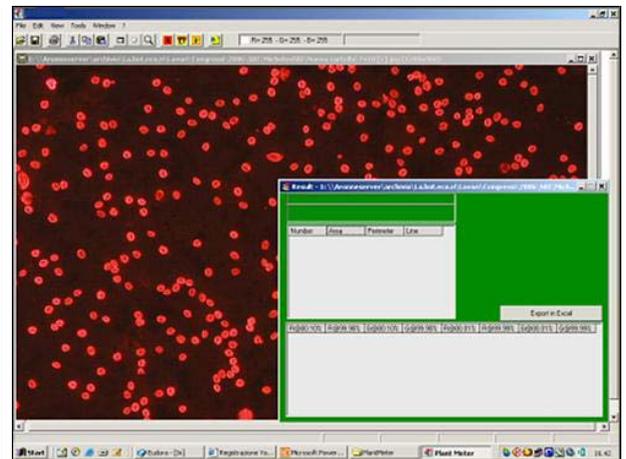


Fig. 2.9b: Acquisizione dell'immagine da parte del software.

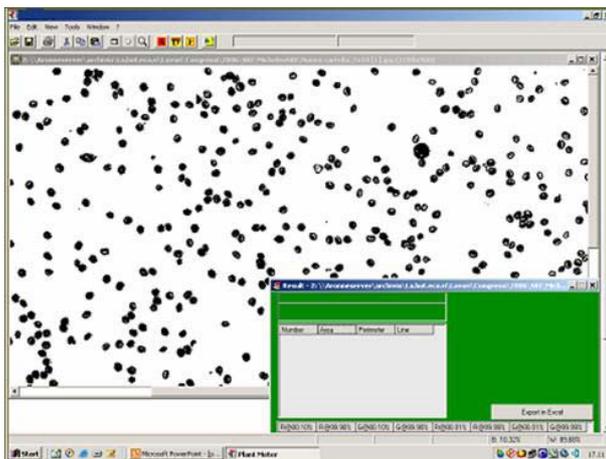


Fig. 2.9c: Binarizzazione ed elaborazione dell'immagine da parte del software.

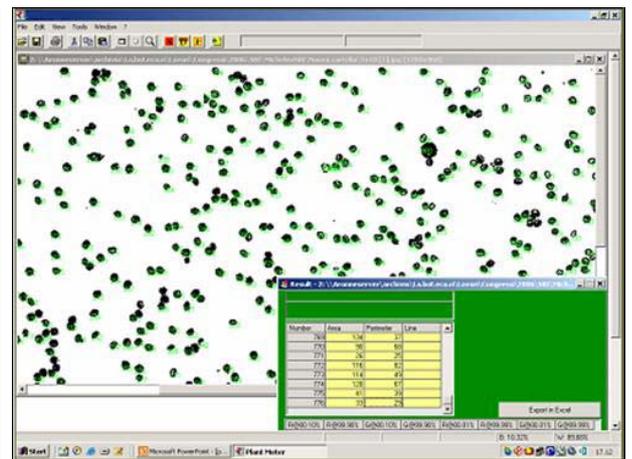


Fig. 2.9d: Conta dei granuli ed espressione del risultato.

Conclusioni

Questa analisi rappresenta un primo esempio di applicazione del metodo di osservazione dei pollini in fluorescenza descritto in precedenza. In questo caso il lavoro lungo e tedioso di conta manuale dei granuli di polline totali presenti nel campione viene sostituito da un conteggio automatico di gran lunga più rapido. Relativamente alla precisione, il conteggio degli oggetti effettuato dal software non è sottoposto ad errori soggettivi determinati dalla conta più di una volta dello stesso oggetto o dall'involontaria non considerazione di uno o più granuli. Tuttavia, il limite di questo sistema si verifica in quelle situazioni in cui due o più granuli sono così vicini che durante l'elaborazione dell'immagine il software li identifica come un unico oggetto. In questo caso il conteggio automatico è sottostimato rispetto a quello reale. Per risolvere anche questo problema ed ottenere un conteggio esatto di tutti i granuli di polline presenti nel campioni si sta attualmente provando a trattare le immagini attraverso una routine di elaborazione che separa gli oggetti tangenti attraverso meccanismi di "erosione".

2.4 CHIAVE DICOTOMICA PER L'IDENTIFICAZIONE DEI PRINCIPALI POLLINI AERODIFFUSI

Introduzione

Come già riportato in precedenza, una parte del lavoro di identificazione dei pollini presenti in un determinato campione si basa sull'associazione mentale tra le caratteristiche di ogni specifico granulo e quelle di pollini di riferimento che sono o presenti nella memoria dell'analista o da ricercare di volta in volta in atlanti che riportano schede morfologiche ordinate quasi sempre secondo un criterio filogenetico. La necessità di disporre di un metodo schematico per il riconoscimento del granulo di polline basato sulla descrizione delle caratteristiche morfologiche e biometriche, ha portato alla realizzazione della presente chiave dicotomica per il riconoscimento dei pollini allergenici aerodiffusi. A causa della presenza di reti sempre più ampie e capillari finalizzate al monitoraggio dei pollini aerodiffusi il numero dei tecnici impegnati nell'attività continua di riconoscimento dei pollini è in continuo aumento.

Sebbene il palinologo con esperienza sia in grado di identificare a memoria i principali pollini aereodiffusi, i tecnici meno esperti sono costretti spesso a consultare atlanti fotografici specifici mediante i quali eseguono il riconoscimento dei granuli più per associazione di immagine che per caratteristiche morfobiometriche. Questa tecnica piuttosto approssimativa si ripercuote sulla qualità dei risultati delle analisi. Per venire incontro alle esigenze dei novelli palinologi e mantenere elevato il rigore del riconoscimento morfologico è stata

organizzata una guida dicotomica simile in principio a quella delle flore (Fiori, 1970; Baroni, 1986; Pignatti, 1997).

Materiali e Metodi

Lo schema base di costruzione delle chiavi analitiche è quello riportato da De Leonardis *et al.*, (1986). Le specie polliniche prese in considerazione per la realizzazione della chiave sono quelle allergeniche desunte dalla letteratura specifica e riportate in Tab. 2.1 (Mandrioli & Puppi, 1978; Ciampolini & Cresti, 1981; Frenguelli & Mincigrucci, 1994). Per ogni specie sono stati raccolti i dati morfologici e biometrici utili ai fini del riconoscimento. La nomenclatura morfologica utilizzata è quella riportata da Erdtman (1954).

1	<i>Acer campestre</i>	14	<i>Corylus</i>	27	<i>Platanus</i>
2	<i>Acer negundo</i>	15	<i>Cupressus</i>	28	<i>Polygonaceae</i>
3	<i>Alnus</i>	16	<i>Eucalyptus</i>	29	<i>Populus</i>
4	<i>Amaranthaceae</i>	17	<i>Fagus</i>	30	<i>Quercus</i>
5	<i>Ambrosia</i>	18	<i>Fraxinus</i>	31	<i>Salix</i>
6	<i>Artemisia</i>	19	<i>Graminaceae</i>	32	<i>Taraxacum</i>
7	<i>Betula</i>	20	<i>Ligustrum</i>	33	<i>Taxus</i>
8	<i>Carex</i>	21	<i>Mercurialis</i>	34	<i>Ulmus</i>
9	<i>Carpinus</i>	22	<i>Olea</i>		
10	<i>Castanea</i>	23	<i>Ostrya</i>		
11	<i>Cedrus</i>	24	<i>Parietaria</i>		
12	<i>Celtis</i>	25	<i>Pinus</i>		
13	<i>Chenopodiaceae</i>	26	<i>Plantaginaceae</i>		

Tab. 2.1: Elenco dei tipi pollinici presenti nelle chiavi dicotomiche.

Risultati

Descrizione della guida - Mentre per le guide botaniche le varie specie sono organizzate secondo la tassonomia classica in ordini, famiglie, generi e specie, nelle chiavi per il riconoscimento del polline l'organizzazione delle varie specie è stata fatta in base alle caratteristiche morfologiche comuni. In questo modo si è ottenuta una prima suddivisione in base al numero di aperture, successivamente la distinzione è stata fatta in base al tipo di apertura, e infine le varie specie sono state ordinate in base ad altre caratteristiche morfologiche quali dimensioni e scultura dell'esina.

NUMERO DI APERTURE	
NESSUNA	I
UNA	II
TRE	III
QUATTRO	IV
CINQUE	V
SEI	VI
MOLTE	VII

I - Nessuna apertura			
1	esina psilata con microgemme disposte in gruppi irregolari		2
1	esina sottile con superficie microreticolata-foveolata e granulata		<i>Populus</i>
2	granuli decidui e citoplasma stellato		<i>Cupressus</i>
2	granuli non decidui e citoplasma circolare		<i>Taxus</i>

II - Una apertura			
1	presenza di sacche aerifere laterali		2
1	da sferoidale ad ovoidale		3
2	le due sacche sono ben distanziate dal corpo centrale		<i>Pinus</i>
2	le due sacche formano quasi un corpo unico con la parte centrale		<i>Cedrus</i>
3	presenza di un singolo poro con opercolo ed annulus		Graminaceae

III - Tre aperture			
1	colpati		2
1	porati		6
1	colporati		10
2	colpi molto corti ed esina echinata		<i>Ambrosia</i>
2	colpi lunghi		3
3	colpi lunghi e stretti		4
3	colpi lunghi e larghi		5
4	esina sottile scabrato verrucata, colpi con membrana sporgente		<i>Quercus</i>
4	esina reticolata con maglie uniformi		<i>Fraxinus</i>
5	esina microreticolata con granulazioni sulla membrana colpale		<i>Platanus</i>
5	esina striata		<i>Acer campestre</i>
5	esina rugulata		<i>Acer negundo</i>
6	presenza dell'opercolo		7
6	assenza dell'opercolo		8
7	onci ed annulus ben evidenti, Ø 19-30 µm		<i>Ostrya</i>
7	onci ed annulus poco evidenti, Ø 14-19 µm		<i>Parietaria</i>
8	onci larghi convessi e ben evidenti		<i>Corylus</i>
8	onci poco convessi		9
9	presenza del vestibulum in prossimità dei pori		<i>Betula</i>
9	assenza del vestibulum in prossimità dei pori		<i>Carpinus</i>
10	esina reticolata		11
10	esina psilata		13
10	esina echinata		<i>Taraxacum</i>
10	esina foveolata		Polygonaceae

11	reticolo omobrocato		<i>Olea</i>
11	reticolo eterobrocato		12
12	presenza del margo		<i>Salix</i>
12	assenza del margo e columellae ben evidenti		<i>Ligustrum</i>
13	esina sottile		14
13	esina spessa		<i>Artemisia</i>
14	prolato-subprolato in visione equatoriale		15
14	oblato-suboblato-sferoidale in visione equatoriale		16
15	pori con margine sporgente, Ø 18-25 µm		<i>Mercurialis</i>
15	colpi sottili e lunghi, Ø 11-16 µm		<i>Castanea</i>
16	colpi stretti, pori grandi, Ø 40-45 µm		<i>Fagus</i>
16	forma triangolare in visione polare, sincolpato, Ø 16-18 µm		<i>Eucalyptus</i>

IV - Quattro aperture

1	isopolare		2
1	eteropolare piriforme		<i>Carex</i>
2	presenza di ispessimenti (arci) sottesi tra i pori		<i>Alnus</i>
2	presenza di onci sotto ai pori		3
3	presenza di incospicui opercoli		4
3	senza opercoli, onci piccoli, 30-40 µm		<i>Carpinus</i>
4	esina finemente granulata, 19-30 µm		<i>Ostrya</i>
4	esina scabrata, 25-35 µm		<i>Celtis</i>

V - Cinque aperture

1	presenza di ispessimenti (arci) sottesi tra i pori		<i>Alnus</i>
1	presenza di onci sotto ai pori		2
2	esina psilato-scabrata, 30-40 µm		<i>Carpinus</i>
2	esina ondulato-scabrata, pori leggermente allungati, 25-36 µm		<i>Ulmus</i>
2	esina scabrata, presenza di sottili opercoli, 25-35 µm		<i>Celtis</i>

VI - Sei aperture			
1	esina ondulato-scabrata, pori leggermente allungati, 25-36 μm		<i>Ulmus</i>

VII - Molte aperture			
1	8-14 pori con opercolo, 16-30 μm		Plantaginaceae
1	pori > 30 μm		2
2	40-70 pori, perimetro con andamento ondulato		Chenopodiaceae Amaranthaceae

Trial Test – Per verificare la facilità d’uso e l’attendibilità dei risultati è stato preparato e condotto un trial test. Sono stati allestiti tre vetrini con miscele di pollini diversi. Il riconoscimento è stato eseguito da palinologi più esperti prima con il metodo tradizionale e successivamente con l’uso della guida ma anche da tecnici con minore esperienza: tra i risultati è stata sempre verificata una correlazione positiva statisticamente significativa.

2.5 DATABASE MELISSOPALINOLOGICO DELLE SPECIE MEDITERRANEE

Introduzione

Le analisi melissopalinologiche costituiscono il mezzo indispensabile per determinare da quali fiori è stato bottinato il nettare utilizzato dalle api per la produzione dei mieli. L'analisi botanica qualitativa richiede l'allestimento di preparati di pollini prelevati direttamente dalle piante (palinoteca), che servono per il confronto con quelli del miele e ne consentono l'identificazione. E' indispensabile che ogni laboratorio di Palinologia sia dotato di una palinoteca di riferimento ottenuta prendendo i fiori di piante correttamente classificate da un punto di vista botanico, aprendo le antere in laboratorio e lasciando cadere i granuli su un vetrino portaoggetto su cui è presente una goccia di fucsina glicerinata. I preparati si montano con vetrino coprioggetto, si lutano e possono essere conservati per alcuni anni costituendo una palinoteca di riferimento. Il riconoscimento dei granuli si effettua principalmente in base alle caratteristiche morfologiche dei pollini. Oltre alle palinoteche, al fine di facilitare il riconoscimento, le informazioni relative ad ogni tipo pollinico sono riportate in schede palinologiche che, a volte, sono raccolte in atlanti (Moore *et al.*, 1991; Reille, 1992; Ricciardelli D'Albore, 1997; Ricciardelli D'Albore, 1998; Von Der Hoe & Von Der Hoe, 2000; Bucher *et al.*, 2004). In queste monografie, le centinaia di schede sono elencate per Famiglia botanica o secondo ordine alfabetico. La consultazione di tali atlanti a partire dalle caratteristiche morfologiche è quindi molto disagiata e talvolta lunga. Al fine di velocizzare l'analisi pollinica ed evitare, per ogni polline sconosciuto, di passare ore ed ore a

sfogliare pagina per pagina gli atlanti di riferimento, è stato prodotto un Archivio digitale contenente tutte le informazioni riguardo alle caratteristiche morfobiometriche necessarie al riconoscimento, comprese le immagini dei particolari diagnostici. Questo tipo di archivio digitale è simile per struttura ad altri già esistenti alcuni dei quali presenti su Web (Buchner & Weber, 2000). I limiti maggiori dell'archivio presente su web sono innanzitutto la necessità di collegarsi ad internet ogni volta che si vuole effettuare il riconoscimento, la ricerca stessa può essere fatta solo utilizzando un numero limitato di parole chiavi e infine le immagini riportate, con cui confrontare i pollini incogniti, sono ottenute al SEM.

Materiali e Metodi

L'archivio informatico è stato sviluppato su una piattaforma Microsoft® Access 2002. La struttura principale del database è costituita da 443 record. Ogni record, a cui è associata una specie pollinica, contiene 20 campi in cui sono riportate le caratteristiche morfobiometriche specifiche dei granuli. I dati palinologici da inserire sono stati raccolti sia da fonti bibliografiche sia da osservazioni al microscopio di preparati istologici.

Ogni record, inoltre, riporta l'immagine polare ed equatoriale del granulo di polline associato alla scheda.

Risultati

Il risultato della classificazione digitale è stato quello di ottenere un archivio informatico costituito da 443 record visualizzati sottoforma di maschera che, per ogni specie pollinica, riporta le caratteristiche tipiche del granulo.

In Fig. 2.10 è riportata una schermata esemplificativa del database.

The screenshot shows the 'Palinoteca' software interface. On the left, a table lists 275 records with columns for 'Famiglia', 'Genere', and 'Specie'. The record for 'Boraginaceae', 'Anchusa', 'italica' is highlighted. The main window displays a 'Scheda' (card) for this species, containing various morphological and taxonomic details. On the right, four micrographs (Foto 1-4) show the pollen grains under a microscope.

Famiglia	Genere	Specie
Leguminosae	Acacia	dealbata
Acanthaceae	Acanthus	mollis
Aceraceae	Acer	campestre
Hippocastanaceae	Aesculus	hippocastanum
Agavaceae	Agave	americana
Rosaceae	Agrimonia	eupatoria
Simaroubaceae	Ailanthus	altissima
Labiatae	Ajuga	reptans
Alismataceae	Alisma	plantago-aquatica
Liliaceae	Allium	cepa
Liliaceae	Allium	roseum
Liliaceae	Allium	sphaerocephalon
Betulaceae	Alnus	cordata
Amaranthaceae	Amaranthus	retroflexus
Boraginaceae	Anchusa	italica
Compositae	Anthemis	arvensis
Scrophulariaceae	Anthirinum	maius
Ranunculaceae	Aquilegia	vulgaris
Cruciferae	Arabis	turrita
Ericaceae	Arbutus	unedo
Compositae	Artemisia	arborescens
Liliaceae	Asparagus	officinalis
Liliaceae	Asphodeline	lutea
Liliaceae	Asphodelus	microcarpus
Leguminosae	Astragalus	monspessulanum
Graminaceae	Avena	barbata
Begoniaceae	Begonia	semperflorens
Compositae	Bellis	sylvestris
Betulaceae	Betula	alba
Boraginaceae	Borago	officinalis
Cruciferae	Brassica	oleracea var. botry
Cucurbitaceae	Bryonia	cretica
Buxaceae	Buxus	sempervirens

Scheda

Famiglia	Boraginaceae
Genere	Anchusa
Specie	italica
Nome Comune	Buglossa azzurra
Raggruppamento	monade
Simmetria	radiale
Polarità	isopolare
Forma	subprolato
Visione Polare	subquadrangolare, goniotremo
Visione Equatoriale	ovale-ellittico
Apertura	tetrazonocolporato
Pori	lalongati con annulus e membrana
Colpi	stretti e corti
Exina	subtectata, finemente reticolata, psilata
Intina	-
Citoplasma	-
Fioritura	aprile-luglio
Dimensioni P x E	29 x 27 µ
Distribuzione	-
Valore melissopalnologico	Le foto sottoriportate si riferiscono ad Anchusa cretica (1,2) e ad Anchusa hybrida (3,4)

Foto 1, Foto 2, Foto 3, Foto 4

Fig 2.10: Schermata di lavoro del software di gestione dell'archivio elettronico.

Conclusioni

Il vantaggio di un archivio digitale è notevole in quanto è possibile eseguire una o più “query” contemporaneamente, inserendo nei campi di ricerca le caratteristiche morfologiche del polline incognito, il software seleziona rapidamente tutte quelle specie che corrispondono a tali specifiche. Ovviamente più chiavi di ricerca verranno inserite nei campi e più sarà ristretto il numero di specie corrispondenti a quelle caratteristiche. Inoltre l’archivio è di tipo aperto in quanto è possibile inserire di volta in volta nuove specie. La presenza dell’immagine del granulo pollinico poi permette un rapido riscontro della scelta fatta. A differenza di analoghi database prodotti (Buchner & Weber, 2000), le immagini riportate sul nostro Archivio, ottenute al microscopio ottico, rispetto a quelle ottenute al SEM, sono più pratiche in quanto di solito il riconoscimento si esegue al microscopio ottico e quindi sono direttamente confrontabili con quelle osservate.

2.4 DISCUSSIONI

Questa parte di lavoro consiste in un insieme di sistemi e procedure di analisi a supporto e complemento di quelle tradizionali. Si è cercato, infatti, di dare un contributo sia per il miglioramento dell'osservazione dei granuli e sia per velocizzare e migliorare la qualità dell'analisi stessa.

In particolare ottimi risultati si sono ottenuti nella combinazione tra tecnica di colorazione e microscopia a fluorescenza, che hanno permesso di ottenere una immagine più nitida e ricca di particolari rispetto a quella ottenuta con i normali microscopi a trasmissione, senza dover ricorrere ad acetolisi o a complesse operazioni di preparazione del campione per osservazioni al SEM. Inoltre, questa tecnica si presenta veloce e poco costosa, ed il suo uso è promettente in laboratori di melissopalinoologia, aerobiologia e paleopalinoologia dove sono necessarie analisi di routine. In più, rispetto alle metodologie riportate in letteratura, questa tecnica permette di eliminare direttamente all'origine l'immagine del fondo del vetrino e le particelle estranee presenti, passo fondamentale per lo sviluppo futuro di un sistema di riconoscimento automatico del polline. L'utilità di tale metodo è stata, quindi, immediatamente verificata producendo un software per la conta automatica dei pollini. Con questo nuovo sistema di analisi, la conta del numero totale di granuli per ogni singolo campione non solo è molto più rapida (in pochi minuti vengono contati fino a 5000 elementi) ma anche estremamente precisa (si elimina infatti anche il problema della valutazione del livello di accuratezza del risultato in quanto a differenza dei conteggi manuali non è possibile dimenticare o

contare due volte lo stesso granulo). Inoltre un sistema automatico per la conta del numero totale degli elementi figurati è senza dubbio un utile strumento per velocizzare il lavoro di analisi e ridurre i costi.

Velocizzare le procedure di analisi è senza dubbio l'obiettivo principale dell'innovazione tecnologica, minor tempo di lavoro significa anche minor costo, per questo si è voluto intervenire su tutte le fasi "lente" dell'analisi palinologica. L'utilizzo di un archivio informatico per la ricerca delle specie polliniche incognite è conveniente in quanto a differenza degli atlanti cartacei permette di eseguire una consultazione molto più rapida ed accurata. La produzione delle stesse chiavi dicotomiche per l'identificazione dei pollini allergenici ha avuto la finalità di aumentare l'accuratezza dell'analisi in quanto la maggior parte degli operatori ancora riconosce le specie polliniche facendo una associazione di immagine. Invece, con questi sistemi, la ricerca della specie incognita avviene in modo sistematico in quanto l'operatore è indotto in un caso ad inserire nei campi di ricerca del database i caratteri morfologici osservati e nell'altro caso a seguire lo schema delle chiavi dicotomiche.

L'eliminazione dell'incertezza della misura che si ottiene utilizzando questi metodi è un aspetto particolarmente importante se si considera che oggi è sempre più incalzante la richiesta di analisi certificate secondo normative ufficiali che garantiscono alti livelli di precisione e di ripetibilità dei risultati.

EFFETTI DEI FATTORI AMBIENTALI SULLA BIOLOGIA DEL POLLINE

3.1 EFFETTO INTEGRATO DELLA TEMPERATURA E DELL'UMIDITÀ SULLA VITALITÀ DEL POLLINE DI SPECIE ORTIVE

Introduzione

Il polline non è una particella inerte presente nell'aria, ma è un individuo ben definito con un fine ben preciso: quello di raggiungere lo stigma, sviluppare il microgametofito e permettere al microgamete la fecondazione dell'ovocellula. Essendo il polline, quindi, un essere vivente, come tale è esposto all'influenza di tutti quei fattori biotici e abiotici che ne condizionano la capacità di sopravvivenza. Particolarmente sensibile è la fase che va dalla fuoriuscita dalle antere al raggiungimento dello stigma, dove il polline è generalmente esposto a notevoli variazioni di temperatura e umidità che si ripercuotono sulla durata della sua vitalità e, conseguentemente, sul successo riproduttivo (Thompson, 1975; Herrero e Johnson, 1980; Aronne, 1999; Aronne *et al.*, 2006).

Lo studio della vitalità del polline, quindi, risulta essenziale nella pratica agricola se si considera che l'impollinazione è l'unico mezzo naturale, salvo poche eccezioni, per la produzione dei frutti (Baldini, 1979; Ryugo, 1988; AA.VV., 1992; AA.VV., 1993). Infatti con la diffusione delle tecniche di agricoltura biologica, che vietano l'uso di fitoregolatori per l'allegagione, e sono più attente alle pratiche che

salvaguardano e favoriscono l'equilibrio ambientale, l'impollinazione diventa fondamentale per la produzione dei frutti. Inoltre in alcune colture, l'impollinazione, pur non essendo essenziale per la produzione, determina raccolti più abbondanti e soprattutto di migliore qualità (Bianco & Pimpini, 1990; McGregor, 2003).

Questo problema è sentito ancor più nelle colture protette, dove l'assenza di impollinatori naturali costringe l'agricoltore a ricorrere all'utilizzo di api o bombi provenienti da allevamenti specializzati, al fine di ottenere una produzione omogenea e di qualità. Questa pratica diventa essenziale per prodotti come la fragola, i cui tessuti carnosì derivano dallo sviluppo del ricettacolo florale a seguito dello stimolo ormonale determinato dall'embrione presente negli acheni. Pertanto per evitare la formazione di frutti deformati e quindi incommerciabili è necessaria una completa ed uniforme impollinazione.

Tuttavia il buon esito dell'impollinazione e successivamente della fecondazione, ovviamente è funzione della biologia riproduttiva della coltura. Talvolta, infatti, il trasporto di polline effettuato dai pronubi non è sufficiente ad assicurare la fecondazione e conseguentemente lo sviluppo uniforme del frutto. Per garantire che avvenga lo sviluppo del tubetto pollinico, infatti, risulta essenziale che il polline trasportato sullo stimma sia vitale e che lo stimma stesso sia recettivo. E' stato inoltre sperimentalmente dimostrato che la lunghezza del periodo di vitalità del polline è funzione, non solo dell'azione dei fattori temperatura ed

umidità presi singolarmente ma soprattutto dell'interazione tra i due (Aronne, 1999).

Materiali e Metodi

La prova sperimentale è stata effettuata su piante di fragola *Fragraria vesca* L. "Camarosa", di zucchini *Cucurbita pepo* L. 'President' e di melanzana *Solanum melongena* L. 'Violetta Lunga di Napoli', allevate in coltura protetta.

Campioni di polline sono stati prelevati da antere in fase di deiscenza, sono stati sistemati in capsule petri e tenuti a tre diverse condizioni di umidità (0-48-100 % U.R.) e temperatura (4-22-38 °C). Ad intervalli di tempo stabiliti (1-4-7 ore) dalle capsule è stata prelevata una aliquota di polline su cui è stata determinata la vitalità attraverso la reazione fluorocromatica (FCR) secondo il metodo di Heslop-Harrison & Heslop-Harrison (1970). Il test è stato condotto disperdendo il polline in una goccia di soluzione di saccarosio (15 % in acqua) a cui è stato aggiunto acetato di fluoresceina in acetone (2 mg/ml) fino alla saturazione. Dopo 10 minuti il polline in soluzione è stato osservato al microscopio a fluorescenza. Dal conteggio dei pollini positivi al test è stata quindi calcolata la percentuale di vitalità, espressa come frequenza percentuale dei granuli vitali rispetto ai non vitali. Tutti i dati sono stati sottoposti ad analisi statistica (ANOVA) per valutare sia i singoli effetti dei fattori umidità e temperatura e sia l'effetto integrato degli stessi sulla vitalità del polline.

Risultati

Fragola - La vitalità del polline di fragola alla deiscenza delle antere è risultata essere pari a 98% (Fig. 3.1). Il polline tuttavia è rimasto vitale per un periodo di tempo limitato e la durata di tale periodo si è rivelata dipendente dalle condizioni di conservazione.

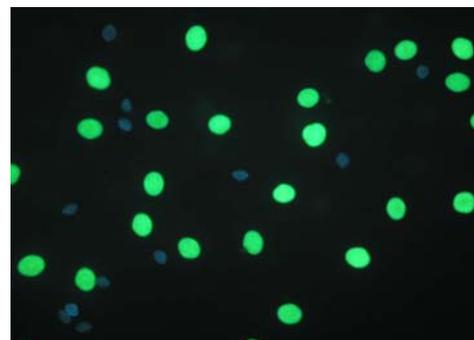


Fig. 3.1: Test FCR su polline di fragola. I granuli fluorescenti sono vitali, quelli non fluorescenti non sono vitali.

La riduzione di vitalità nel caso del polline tenuto a 38°C e 100% di umidità è stata molto veloce: già dopo 4 ore la vitalità era infatti ridotta al 14% e dopo 7 ore era 0%. Nelle altre condizioni, la perdita di vitalità è risultata più graduale. Dopo 4 ore la vitalità del polline variava tra il 44% e il 77% a seconda delle condizioni di conservazione (Fig. 3.2a), mentre dopo 7 ore risultava oscillare tra il 22% e il 56% (Fig. 3.2b). Dopo 24 ore tuttavia indipendentemente dalle condizioni di temperatura e umidità dell'ambiente di conservazione (Fig. 3.2c), tutti i granuli sono risultati non vitali.

L'esperimento riguardante l'effetto di temperatura e umidità sulla vitalità del polline ha dimostrato che entrambi i fattori interagiscono ed ha permesso di individuare quali sono le migliori condizioni di temperatura e umidità per aumentare la longevità. Dall'analisi della varianza, è risultato in particolare che la vitalità del polline conservato a 22°C è significativamente più alta di quella del

polline tenuto a 4°C. Analogamente quest'ultima è significativamente maggiore di quella del polline conservato a 38°C. La vitalità inoltre diminuisce significativamente passando da polline tenuto a 48% di umidità a polline conservato in un ambiente completamente secco. Il polline tenuto a 0% di umidità risulta inoltre a sua volta significativamente più vitale rispetto a quello conservato in un ambiente saturo di umidità. Dall'analisi dell'effetto combinato dei due fattori risulta infine che, entro le 4 ore, le condizioni ottimali di conservazione risultano essere 22°C con umidità indifferentemente pari a 0% o 48%. Dopo tale periodo di tempo, la condizione che permette di mantenere più alta la vitalità è risultata essere 22°C e 48% di umidità.

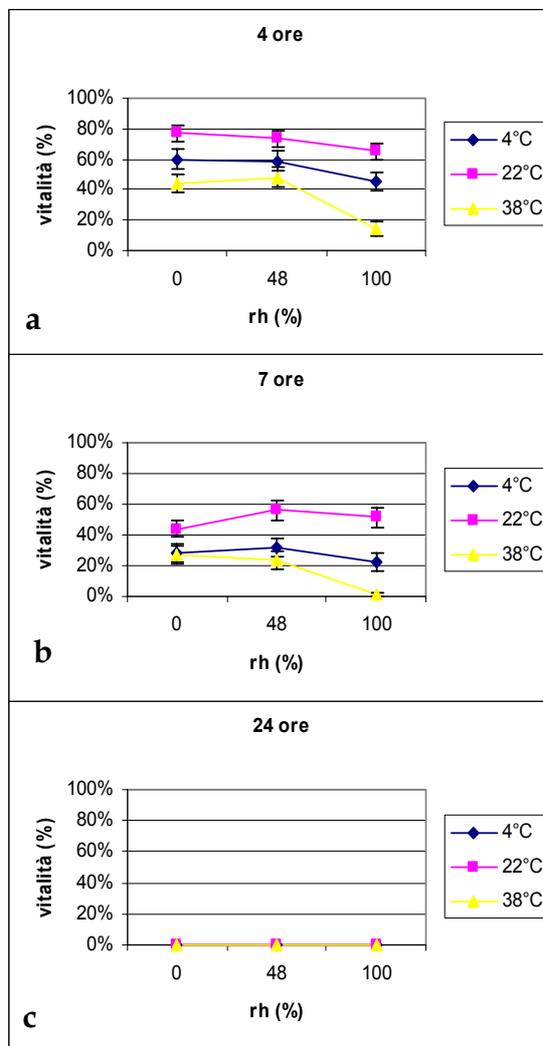


Fig. 3.2: Variazione nel tempo della vitalità del polline di fragola tenuto alle tre differenti condizioni di temperatura e UR.

Melanzana - Alla deiscenza delle antere il 52% del polline di melanzana era metabolicamente attivo (Fig. 3.3). Dopo un'ora ad umidità relativa pari allo 0%, il polline conservato a 4°C ha mostrato un leggero aumento di attività metabolica mentre quello a 22°C e 38°C ha perso di vitalità. Dopo un'ora a 100% UR, l'80% del polline conservato a 38°C era metabolicamente attivo,

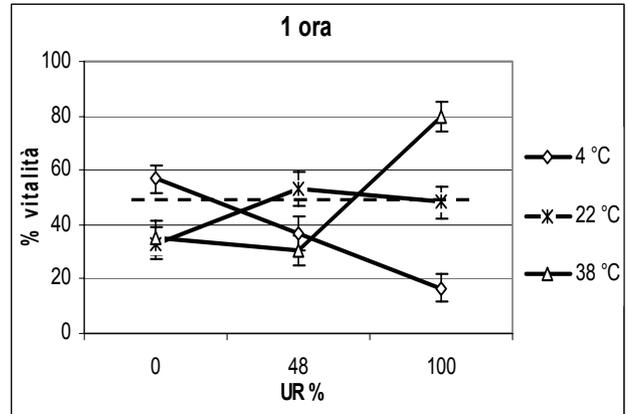


Fig. 3.3: Vitalità del polline di melanzana

mentre quello a 22°C è rimasto stazionario e quello a 4°C ha mostrato una forte riduzione di vitalità. Dopo quattro ore il polline è risultato non vitale in tutte le condizioni provate.

Zucchino - Per quanto riguarda lo zucchino (Fig. 3.4) alla deiscenza delle antere il 35 % del polline era metabolicamente attivo. Dopo un'ora, l'effetto dell'umidità non è stato significativo mentre a 4 °C è stata registrata la minore perdita di vitalità rispetto a quella verificata a 20 e 38°C.

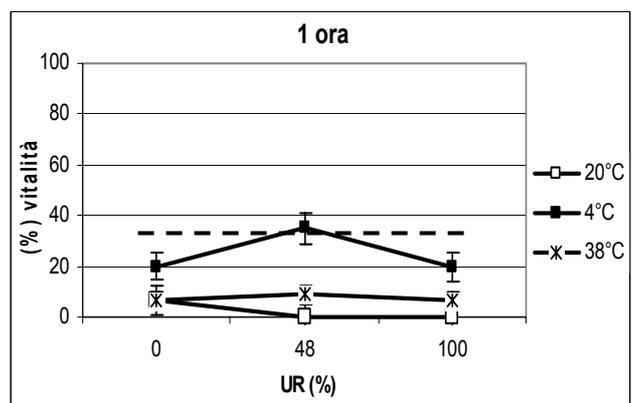


Fig. 4: Vitalità del polline di zucchino

Dopo quattro ore, in tutte le condizioni studiate, il polline si è presentato non vitale.

Discussioni

E' noto che le variazioni di temperatura e umidità a cui il polline è esposto dalla fuoriuscita dalle antere fino al raggiungimento dello stamma, si ripercuotono sulla durata della sua vitalità e, conseguentemente, sul successo riproduttivo (Thompson, 1975; Herrero & Johnson, 1980; Aronne, 1999). I risultati ottenuti hanno evidenziato che la vitalità del polline delle specie considerate diminuisce velocemente a partire dal momento del rilascio dalle antere. La temperatura e l'umidità dell'ambiente in cui si trova il polline dopo la deiscenza delle antere hanno inoltre manifestato una notevole influenza sulla sua vitalità. L'esperimento sull'effetto combinato di temperatura e umidità sulla durata della vitalità del polline ha confermato che la lunghezza del periodo di vitalità è funzione, non solo dell'azione dei fattori temperatura ed umidità presi singolarmente ma soprattutto dell'interazione tra i due come già riportato per altre specie (Aronne, 1999; Aronne *et al.*, 2006).

In conclusione risulta evidente che la conoscenza dell'effetto del binomio temperatura/umidità sulla durata della vitalità del polline ha una importanza rilevante al fine di individuare la combinazione ottimale dei fattori per estendere la durata del periodo di vitalità e garantire una buona impollinazione, requisito essenziale per l'ottenimento di produzioni elevate dal punto di vista sia qualitativo sia quantitativo.

3.2 EFFETTO DELLA MICROGRAVITÀ SIMULATA SULLO SVILUPPO DEL TUBETTO POLLINICO

Introduzione

La crescita delle piante nello Spazio è di importanza fondamentale per la permanenza dell'uomo a bordo delle stazioni spaziali e nelle missioni di lunga durata (Halstead & Dutcher, 1987; Salisbury, 1999). Gli organismi vegetali infatti rivestono un ruolo chiave nei sistemi bio-rigenerativi poiché permettono la rigenerazione dell'ossigeno, il recupero dell'acqua persa dalle piante per traspirazione, il riciclo dei rifiuti organici dell'equipaggio e la produzione di cibo fresco per l'integrazione alimentare degli astronauti. (Wheeler *et al.*, 1996).

Le piante si sono evolute nell'ambiente terrestre adattate a 1-g di gravità. Lo spazio quindi rappresenta un ambiente inusuale dove gli organismi viventi devono fare i conti con un nuovo fattore ambientale: la microgravità che influenza e non poco tutti i processi biologici. Oltre alla microgravità, infatti, anche la radiazione influisce sui diversi processi metabolici delle piante nello spazio. Inoltre la stessa microgravità altera la normale distribuzione dei liquidi e dei gas necessari per il normale sviluppo delle piante (Musgrave, 2002).

Sulla Terra possono essere condotti test in gravità alterata allo scopo di preparare gli esperimenti da condurre successivamente a bordo di stazioni orbitanti o altre piattaforme spaziali (Ruyters & Scott, 1997; Aronne *et al.*, 2003). Una delle apparecchiature comunemente adoperate per ottenere condizioni di

microgravità simulata per condurre tali tipi di prove è il clinostato (Dedolph & Dipert, 1971; Hoson *et al.*, 1997).

La maggior parte dei programmi di selezione varietale si basano sulla selezione sporofitica. Questo tipo di ricerca, purtroppo, è costoso, lungo e richiede ampi spazi per la sua attuazione. La tecnica alternativa, definita selezione gametofitica maschile, è una selezione basata sul granulo di polline germinato. Infatti è stato dimostrato che sia lo sporofito sia il gametofito maschile rispondono in maniera simile all'influenza di fattori esterni (Hormaza & Herrero, 1994). La valutazione dello sviluppo del gametofito fatto sviluppare in microgravità simulata può essere utilizzata per valutare la tolleranza dello sporofito alla microgravità.

Scopo di questa parte del lavoro è stato quello di valutare l'effetto della microgravità simulata sulla germinazione del polline di piante erbacee ed arboree per valutare la possibilità di utilizzare la selezione gametofitica.

I risultati di questo esperimento sono stati pubblicati su una rivista internazionale (De Micco *et al.*, 2006), di seguito si riporta una sintesi di questo lavoro.

Materiali e Metodi

Il polline è stato raccolto dai fiori di piante erbacee ed arboree appena aperti. Le specie studiate sono state: *Prunus persica* (L.) Batsch, *Prunus avium* (L.) L., *Prunus domestica* L., *Pyrus communis* L., *Brassica rapa* L. (Lam.) var. *silvestris* (Lam) S. M.

Briggs. La vitalità del polline è stata verificata mediante il test fluorocromatico (FCR) secondo Heslop-Harrison & Heslop-Harrison (1970). Una volta accertata la vitalità del polline mediante l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza, il polline è stato posto a germinare in capsule petri contenenti un substrato germinativo su Agar secondo Dafni (1992). Le capsule sono state sistemate sia clinostato sia in condizioni normali di gravità (controllo).

Dopo un periodo di 24 ore di incubazione, il materiale è stato posto in congelatore per bloccare tutti i processi biologici. A questo punto il polline è stato osservato al microscopio ottico per valutarne la germinazione e la direzione di allungamento del tubetto pollinico.

Pezzi di Agar contenente polline germinato sono stati prelevati dalle capsule petri e posti su vetrino da microscopio. Al fine di verificare la presenza e la distribuzione dei nuclei, i pollini germinati sono stati trattati con DAPI ed osservati al microscopio ad epi-fluorescenza. La presenza e la distribuzione dei tappi di callosio è stata evidenziata attraverso la colorazione con Blu di Anilina e l'osservazione in fluorescenza. La presenza e la distribuzione dell'amido è stata valutata attraverso la colorazione con iodioduro di potassio (IKI) e l'osservazione al microscopio ottico. I dati sono stati analizzati statisticamente mediante il software SPSS®.

Risultati

Sia in condizioni di microgravità simulata e sia in condizioni normali di gravità si è verificata la medesima velocità di germinazione del polline. Inoltre, a seconda della specie testata, la percentuale di germinazione su clinostato è risultata maggiore o minore rispetto al controllo. In particolare una minore germinazione si è riscontrata nelle prunoideae *P. persica*, *P. domestica*, *P. avium* and *P. communis*, mentre una maggiore germinazione si è avuta in *B. rapa* var. *silvestris*. Comunque nessuna delle differenze è stata statisticamente significativa (Fig. 3.5).

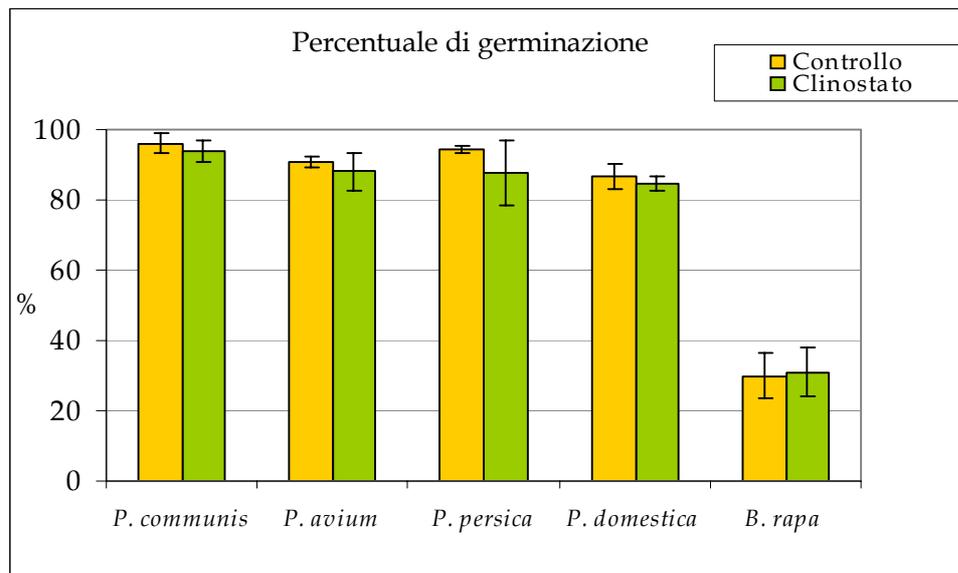


Fig. 3.5: Percentuale di germinazione del polline fatto sviluppare in condizioni di microgravità simulata rispetto al controllo.

Il tubetto pollinico non ha mostrato una direzione di accrescimento preferenziale ma per alcune specie si è verificata un'anomalia nella formazione e nella migrazione delle cellule spermatiche.

In *P. communis* si sono verificati quattro situazioni: a) le due cellule spermatiche sono migrate verso l'apice del tubetto pollinico; b) una o due cellule spermatiche sono state bloccate dai tappi di callosio (Fig. 3.6a); c) gametofito con 1 o 2 cellule spermatiche bloccate nel granulo di polline e isolate dall'apice del tubetto pollinico dal tappo di callosio; d) tubetti pollinici privi di cellule spermatiche.

In *P. persica*, sia la prova sul clinostato sia quella di controllo presentavano gametofiti ben formati con due cellule spermatiche, entrambi i tubetti pollinici presentavano soltanto una cellula spermatica mentre l'altra non aveva nucleo. In *P. avium* e *B. rapa*, le cellule spermatiche sono rimaste all'interno del granulo di polline e nella prima specie erano già presenti i tappi di callosio. Infine soltanto in *P. domestica* non si è verificata alcuna differenza nella formazione e nella migrazione delle cellule spermatiche (Fig. 3.6b).

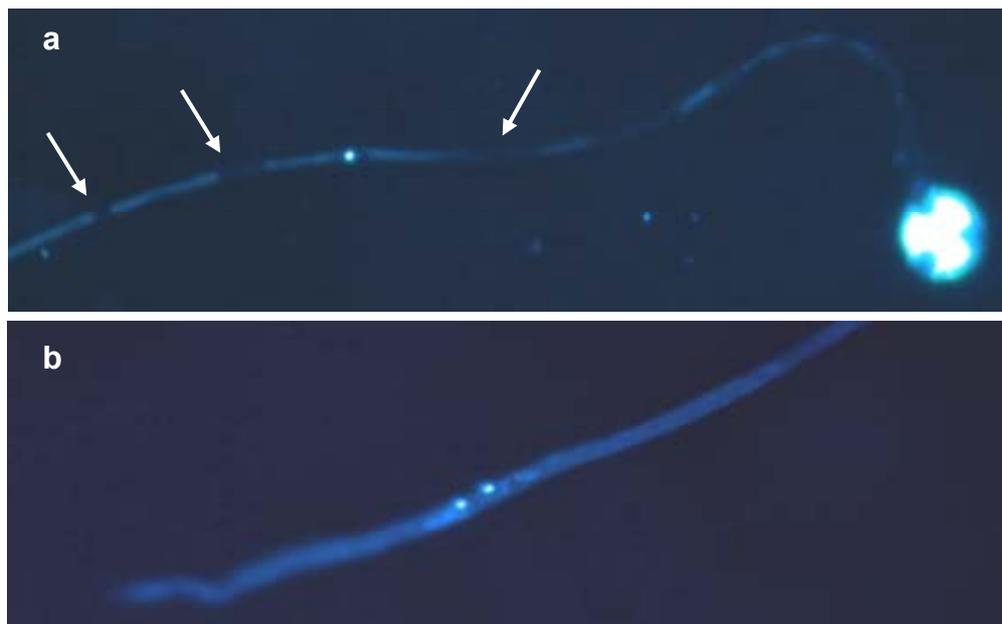


Fig. 3.6: Presenza dei nuclei in tubetti pollinici osservati al microscopio a fluorescenza. Le frecce indicano i tappi di callosio.

In Fig. 3.7 è riportata la differenza tra la percentuale di tubetti pollinici con 2 cellule spermatiche sviluppatasi da gametofiti posti a germinare sul clinostato e a terra. In tutte le specie analizzate ad eccezione di *P. domestica*, la microgravità simulata riduce la percentuale di tubetti pollinici con 2 cellule spermatiche dell'ordine variabile dal 30% (*B. rapa*) al 78% (*P. avium*).

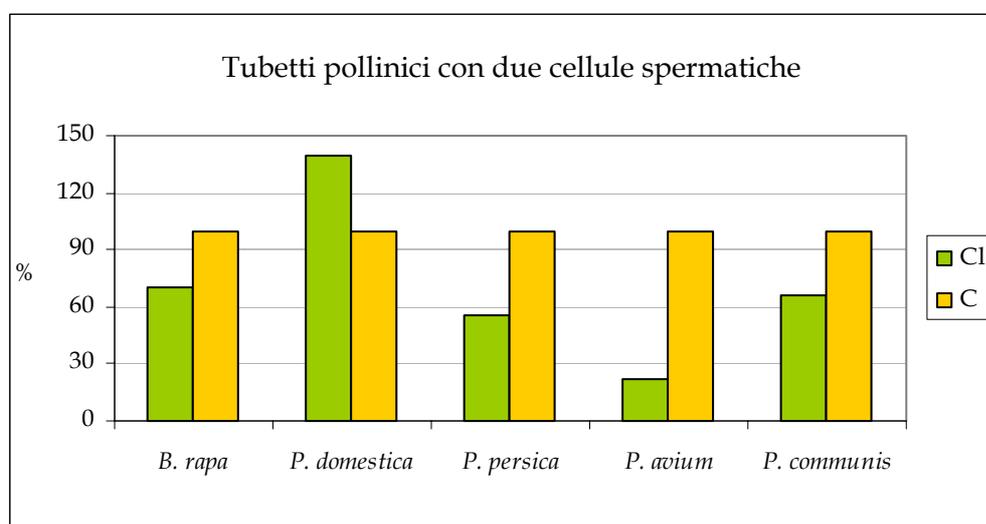


Fig. 3.7: Differenze percentuali tra tubetti pollinici con due cellule spermatiche sviluppate su clinostato rispetto al controllo.

La presenza di callosio lungo il tubetto pollinico è stata messa in evidenza mediante la colorazione con blu di anilina e l'osservazione al microscopio a fluorescenza. Dai risultati si evince che i tubetti pollinici sviluppati su clinostato presentano delle anomalie nella formazione dei tappi di callosio. Nei tubetti di controllo i tappi di callosio sono ben formati (Fig. 3.8a), nei gametofiti sottoposti a clinorotazione, i tappi appaiono più lunghi o addirittura spalmati lungo le pareti senza formare un setto di separazione (Fig. 3.8b). In alcuni casi i tappi di callosio

erano molto brevi e molto vicini gli uni agli altri rispetto al controllo, e in *P. persica*, ad esempio, essi non si sono formati completamente (Fig. 3.8c).

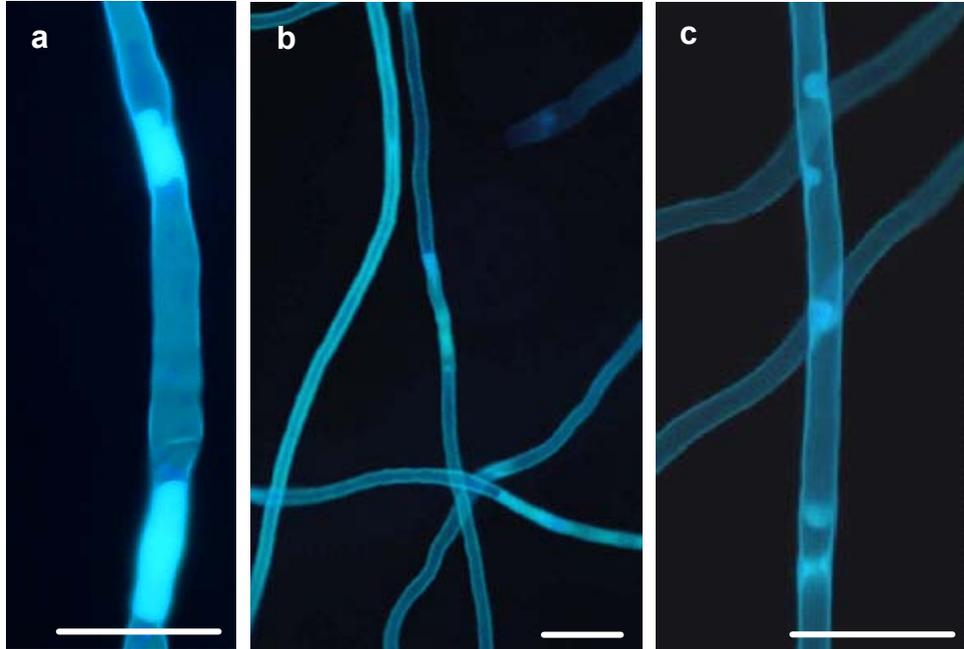


Fig. 3.8: Tubetti pollinici di *Prunus persica* osservati al microscopio a fluorescenza.

Per quanto riguarda le riserve di amido, ad eccezione di *B. rapa*, sembra che esse siano state traslocate lungo il tubetto pollinico più velocemente in microgravità simulata rispetto al controllo. La Fig. 3.9a mostra la presenza di tracce di amido lungo il tubetto pollinico dei pollini germinati in microgravità simulata, mentre, nel controllo era ancora presente amido o nel residuo del granulo di polline o traslocato nella zona apicale del tubetto pollinico (Fig. 3.9b).

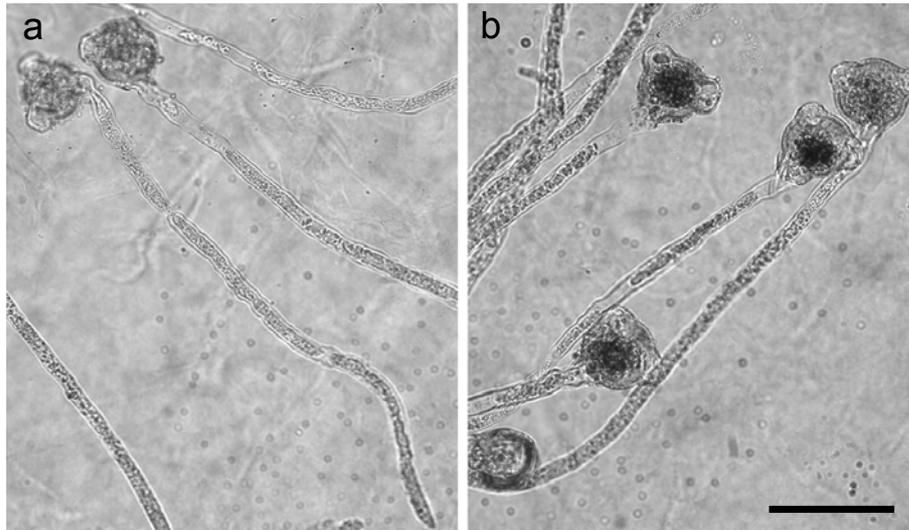


Fig. 3.9: Presenza di amido nei tubetti pollinici osservati al microscopio ottico.

Tranne *B. rapa* le percentuali di pollini che presentavano amido traslocato erano maggiori per quelli posti sul clinostato rispetto al controllo ma le differenze non erano statisticamente significative (Fig. 3.10).

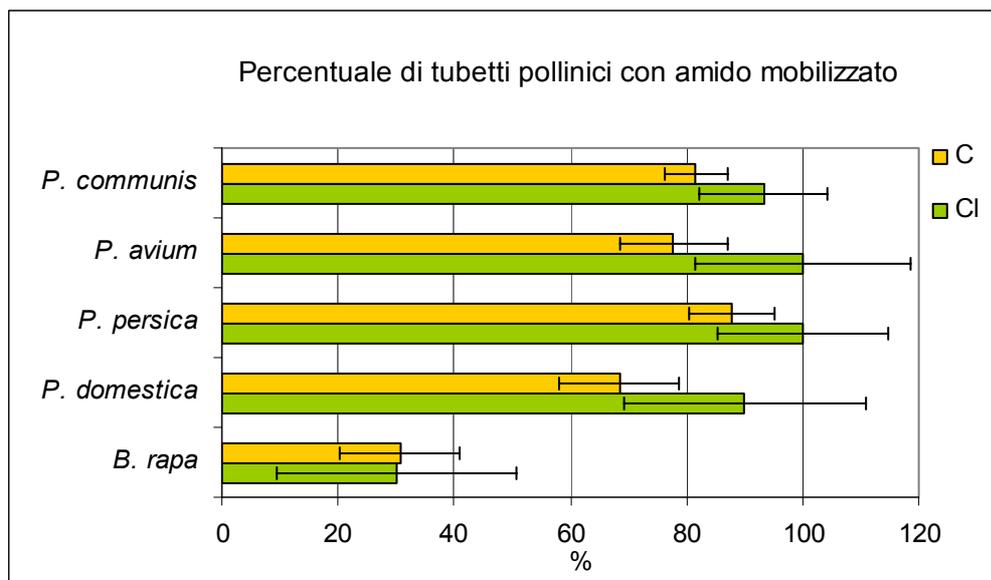


Fig. 3.10: Percentuale di tubetti pollinici con amido mobilizzato: confronto tra gametofiti clinorotati e controllo. I dati riportano valori medi e intervalli di confidenza ($p < 0.05$).

Discussioni

La scelta della selezione gametofitica rispetto alla sporofitica è sicuramente vantaggiosa ai fini delle condizioni di risparmio di spazio ed energia, ed è applicabile in quanto le due generazioni rispondono in modo simile a vari fattori ambientali come temperatura, salinità, pressione osmotica (Mulcahy, 1984; Ottaviano & Mulcahy, 1989; Ottaviano *et al.*, 1990; Hormaza & Herrero, 1992).

E' stato dimostrato che la germinazione del polline e il successivo sviluppo del tubetto pollinico è fortemente determinata dalla presenza nel substrato germinativo di sostanze quali acqua, zuccheri, boro e calcio (Bhojwani & Bhatnagar, 1974; Knox, 1984; Mascarenhas, 1990; Dafni, 1992). La microgravità non è stata mai considerata fattore importante nello sviluppo del tubetto pollinico in quanto il suo sviluppo ed allungamento verso l'ovario è sostenuto dalla interazione con i tessuti dello stilo (Hill & Lord, 1987; Kandasami *et al.*, 1994).

I risultati mostrano che la microgravità simulata, sebbene non abbia influito sulla percentuale di germinazione del polline, ha causato, invece, alterazioni a livello fisiologico. Infatti le alterazioni maggiori si sono verificate nella gestione delle riserve e nell'organizzazione del citoscheletro. Ad eccezione di *P. domestica*, in molti tubetti pollinici cresciuti in microgravità si è riscontrato il blocco della migrazione delle cellule spermatiche causato da anomalie nella formazione dei tappi di callosio. Anche per quanto riguarda l'amido è risultato che esso viene metabolizzato più velocemente in microgravità rispetto al controllo.

Questi risultati mostrano che la microgravità influenza vari aspetti dello sviluppo del tubetto pollinico. Inoltre gli effetti della microgravità simulata sono specie specifici ed è ragionevole credere che le diverse cultivar di una stessa specie rispondano in modo differente a questi stimoli.

In conclusione sarebbe necessario proseguire questi studi sugli effetti della microgravità per valutare l'eventuale corrispondenza tra le anomalie verificatesi sullo sviluppo del gametofito e quelle eventualmente manifestate dallo sviluppo dello sporofito. Se ciò fosse verificato questo metodo potrebbe essere un utile strumento per la selezione delle piante e delle cultivar adatte alla vita nello spazio.

CAPITOLO 4

ANALISI PALINOLOGICHE FINALIZZATE AL MIGLIORAMENTO DELLA QUALITÀ DEI MIELI

4.1 MELISSOPALINOLOGIA

Il miele (Fig. 4.1) è “la sostanza dolce naturale che le api (*Apis mellifera* L.) producono dal nettare di piante o dalle secrezioni provenienti da parti vive di piante o dalle sostanze secrete da insetti succhiatori che si trovano su parti vive di piante che esse bottinano, trasformano, combinandole con sostanze specifiche proprie, depositano, disidratano, immagazzinano e lasciano maturare nei favi dell'alveare”. (Art. 1 del DL 21 maggio 2004 n. 179, Attuazione della Direttiva 2001/110/CE).



Fig. 4.1: Variabilità dei tipi di miele raccolti dalle api

Nei mieli è sempre presente una certa quantità di polline che deriva dal nettare bottinato (inquinamento primario). Oltre al polline, nel miele possono essere presenti spore e ife di funghi, alghe verdi microscopiche trattenuti dalla

viscosità delle gocce di melata deposte sulle foglie e sui rametti delle piante e raccolti dalle api insieme alla melata (Fig. 4.2). Oltre a questi elementi, marcatori dell'origine botanica, nel miele se ne ritrovano altri, che giungono nel prodotto durante la sua elaborazione all'interno dell'alveare (inquinamento secondario) o durante l'estrazione (inquinamento terziario) (Ferrazzi, 1992).



Fig. 4.2: Sedimento di miele osservato al microscopio ottico. Sono evidenti i pollini di varie specie ed una spora di *Alternaria* (freccia).

La Comunità Europea attraverso i regolamenti 1221/97 e 797/04 da anni è impegnata nel promuovere il miglioramento qualitativo e la valorizzazione dei prodotti apistici per sostenere il settore produttivo comunitario e difenderlo dalla massiccia importazione di mieli esteri provenienti soprattutto dalla Cina e dall'Argentina.

Tradizionalmente, il lavoro di caratterizzazione dei mieli si basa sull'analisi al microscopio ottico dei residui di polline sempre presenti nel miele. Anche se, più recentemente, sono stati proposti diversi metodi analitici di tipo chimico-fisico in alternativa a quello palinologico (Mateo & Bosh-Reig, 1998; Radovic *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 2002; Goodacre *et al.*, 2002; Terrab *et al.*, 2002; Cordella *et al.*, 2003;

Cotte *et al.*, 2004; Ampuero *et al.*, 2004; Benedetti *et al.*, 2004; Nalda *et al.*, 2005), l'analisi al microscopio dei residui pollinici tuttora rimane l'unica in grado di collegare direttamente il miele al tipo di fiore bottinato dalle api.

L'analisi melissopalinologica si differenzia in quantitativa e qualitativa ed è di solito condotta secondo le norme codificate dalla Commissione Internazionale Apicola dell'U.I.S.B. (Louveaux *et al.*, 1978; Bogdanov *et al.*, 1997; Von Der Hoe *et al.*, 2004). L'analisi qualitativa consente di determinare l'origine floreale dei mieli, mediante il riconoscimento ed il conteggio dei granuli pollinici e degli elementi di melata. Per ottenere percentuali statisticamente valide sono stati contati 1200 granuli pollinici. I conteggi sono stati eseguiti su almeno 2 vetrini preparati indipendentemente dallo stesso miele. Secondo le metodologie di analisi melissopalinologiche adoperate, i pollini che superano il 45% sono detti dominanti; i pollini compresi tra 16 e 45% sono detti secondari o d'accompagnamento, tra il 3 ed il 15 % isolati importanti, al di sotto di 3% rari. In generale se il polline normalmente rappresentato supera il 45%, il miele si può considerare uniflorale di tale specie. Tuttavia in caso di pollini iporappresentati è sufficiente una percentuale inferiore (per esempio 15% per la Robinia); se un polline è iperrappresentato è necessaria una percentuale più elevata (oltre il 90% per il Castagno). I pollini di piante anemofile o di piante prive di nettari sono contati a parte, poiché non derivando da piante nettariifere non possono dare indicazioni sull'origine floreale dei mieli. Tuttavia per una diagnosi corretta dei mieli uniflorali il risultato dell'analisi melissopalinologica talvolta deve essere integrato con i dati ottenuti

dalle analisi organolettica e chimico-fisica. Con l'analisi qualitativa si rileva anche l'eventuale presenza di lieviti nel miele o di elementi estranei indicatori di inquinamenti (per esempio di particelle carboniose) o di sofisticazioni (per esempio rilevante presenza di granuli di amido). Si riporta anche l'eventuale presenza di elementi indicatori di melata (spore ed ife fungine).

L'analisi quantitativa consiste nella determinazione del numero assoluto di elementi figurati vegetali per unità di peso di miele, e consente una più corretta interpretazione dell'analisi qualitativa soprattutto per i mieli a polline ipo ed iper-rappresentato. Si esegue al microscopio ottico a 400 ingrandimenti annotando i granuli pollinici e gli elementi di melata riscontrati in 100 campi microscopici. Il risultato ottenuto, calcolato tenendo conto della quantità di miele utilizzata, della sua diluizione e dell'area del campo microscopico, si esprime come numero assoluto di elementi figurati contenuti in 10 g di miele. Sulla base di questa analisi i mieli sono suddivisi in 5 classi:

I classe - meno di 20.000 elementi figurati /10 g di miele; appartengono a questa classe i mieli con pollini iporappresentati tra cui Robinia ed Agrumi;

II classe - 20.000-100.000 elementi figurati /10 g di miele; appartengono a questa classe i mieli con pollini normalmente rappresentati, i mieli di nettare e di melata, i mieli misti;

III classe - 100.000-500.000 elementi figurati /10 g di miele; appartengono a questa classe i mieli con pollini iperrappresentati tra cui Castagno;

IV classe – 500.000-1.000.000 elementi figurati /10 g di miele; appartengono a questa classe i mieli con pollini fortemente iperrappresentati e mieli ottenuti per pressatura o spremitura;

V classe – oltre 1.000.000 elementi figurati /10 g di miele; appartengono a questa classe i mieli ottenuti per pressatura o spremitura.

La valorizzazione dei prodotti apistici ed in modo particolare dei mieli si consegue attraverso interventi volti a migliorare le tecniche di produzione, a definire correttamente l'origine floreale e a collegare tali prodotti al territorio di origine. L'origine botanica dei mieli è determinata dall'analisi della frequenza dei pollini presenti nel sedimento. In genere si considera che un miele è originario del nettare di una determinata specie quando la frequenza del polline di quella specie supera il 45%. Però pochi sono i casi in cui sono rispettate tali indicazioni in quanto la percentuale di polline nel miele non è direttamente correlata alla quantità di nettare raccolto. Infatti esistono specie che producono una quantità enorme di polline e pochissimo nettare (specie a pollini iperrappresentati) e specie con una produzione di polline minima o addirittura assente (specie a pollini iporappresentati). Per ogni specie quindi è stata convenzionalmente stabilita una soglia percentuale minima oltre la quale il miele può essere definito monoflora (Persano Oddo *et al.*, 2000).

Ai fini della caratterizzazione geografica dei mieli, l'ideale sarebbe trovare forme polliniche esclusive della zona studiata e presenti costantemente ed abbondantemente nei mieli, ma questo avviene molto di rado. Più spesso ci si trova

a dover caratterizzare i mieli di un'area geografica in base alla frequenza con cui tali specie polliniche ricorrono nel miele. Per ogni zona di produzione di miele, quindi, è possibile individuare uno "spettro" pollinico tipico caratterizzante le produzioni di quel posto (Sabatini *et al.*, 2001; Piana & Persano Oddo, 2001; Bogdanov & Martin, 2002).

Questa parte di lavoro di tesi si inserisce in queste problematiche e più specificamente gli obiettivi sono stati perseguiti secondo le seguenti fasi di lavoro:

1. valutazione delle caratteristiche qualitative del miele prodotto tradizionalmente dagli apicoltori di una determinata area geografica;
2. valutazione della produttività potenziale di aree generalmente non utilizzate per la produzione di miele;
3. valutazione della variabilità delle caratteristiche dei mieli prodotti nello stesso sito ed in annate successive;
4. applicazione dei risultati degli studi di caratterizzazione dei mieli per l'individuazione di produzioni di qualità e per la redazione di disciplinari di produzione finalizzati all'ottenimento di marchi di qualità.

4.2 VALUTAZIONE DELLE CARATTERISTICHE BOTANICHE DEL MIELE PRODOTTO TRADIZIONALMENTE DAGLI APICOLTORI DI UNA DETERMINATA AREA GEOGRAFICA

Introduzione

La normativa vigente sulla commercializzazione del miele prevede che in etichetta venga riportato il paese di origine mentre è facoltativa l'indicazione dell'origine botanica. Gli apicoltori e i grossisti di miele tendono comunque ad indicare sulla confezione la specie o le specie nettariifere principali che hanno dato origine al miele perché questo è interpretato favorevolmente dal consumatore come un indice indiretto di qualità.

Per quanto invece riguarda il legame con il territorio, i metodi tradizionalmente utilizzati per la caratterizzazione geografica dei mieli sono impostati sul campionamento, l'analisi palinologica e la realizzazione di spettri pollinici di riferimento tipici della zona, che vengono utilizzati come modello di confronto per stabilire l'origine dei prodotti incogniti (Ferrazzi, 1986; Longhitano *et al.*, 1986; Ricciardelli, 1994; Seijo *et al.*, 1994; Priore *et al.*, 1995; Persano Oddo *et al.*, 2001; Sabatini *et al.*, 2001; Terrab *et al.*, 2003). Il limite maggiore di tale metodo è senza dubbio l'interpretazione della elevata mole di dati che viene prodotta in seguito alle analisi melissopalinoologiche. Normalmente l'interpretazione viene fatta "manualmente" per confronti uno-ad-uno di tutti i campioni. Questo metodo, come è intuibile, può essere viziato dalla soggettività dell'analista e comunque non risponde a criteri di ripetibilità ed oggettività.

L'analisi multivariata è comunemente utilizzata in ambito fitosociologico per la costruzione di modelli vegetazionali (Blasi *et al.*, 2004). Le problematiche relative all'elaborazione dei risultati delle analisi melissopalinologiche sono molto simili a quelle delle analisi dei rilievi della vegetazione in quanto in entrambi i casi in ogni campione sono presenti numerose specie in percentuali diverse tra loro; inoltre, solo alcune sono presenti in tutte le analisi mentre la maggior parte varia tra un campionamento ed un altro. Per questa ragione lo scopo di questa parte di lavoro è stato di utilizzare i metodi di analisi statistica avanzata che solitamente si utilizzano per gli studi della vegetazione di una determinata area geografica, in quanto permettono di organizzare ed analizzare contemporaneamente numerosi campioni caratterizzati da molte variabili rappresentate dalle percentuali polliniche ritrovate.

Materiali e metodi

L'area selezionata come caso studio è la Penisola Sorrentina-Costiera Amalfitana. Il territorio della penisola Sorrentina è caratterizzato da una conformazione tipica con ripidi pendii che passano velocemente da elevate quote (1444 m il complesso del Faito) al mare (Fig. 4.3). Di conseguenza la vegetazione della zona presenta delle caratteristiche peculiari in quanto è un mosaico di formazioni che vanno dalla vegetazione litoranea ai faggeti, comprendendo la macchia mediterranea, i lecceti, la gariga ed i boschi mesofili di latifoglie.



Fig. 4.3: Versante meridionale della Penisola Sorrentina.

Questa notevole ricchezza di specie d'interesse apistico è utilizzata dalle api per la raccolta del nettare, del polline e della propoli. Tale ricchezza di fonti d'approvvigionamento garantisce un ottimo stato di salute delle colonie che si presentano numerose e quindi notevolmente operose. Ciò garantisce raccolti abbondanti e di qualità con un notevole tornaconto dell'api-agricoltore sia in forma diretta, attraverso una fonte integrativa di reddito, sia in forma indiretta per la maggiore produzione agraria (Scala, 2005). Infatti, la raccolta di nettare e polline determina l'impollinazione, e quindi, la fecondazione dei fiori con conseguente maggiore produzione agricola e mantenimento della biodiversità delle specie vegetali spontanee (Aronne, 2005). Il lavoro di caratterizzazione dei mieli della penisola Sorrentino-Amalfitana rappresenta il punto di partenza per un successivo

cammino di valorizzazione dei prodotti apistici, che potrebbe concretizzarsi attraverso una richiesta di marchi di qualità e di origine ai sensi del regolamento comunitario 2081/92 (Certificazioni IGP e DOP dei prodotti agricoli ed alimentari).

Il campionamento dei mieli per la caratterizzazione è stato eseguito in penisola Sorrentina per due anni consecutivi. Attraverso le ASL, le Associazioni di Apicoltori ed il personale tecnico della Regione Campania, è stato possibile contattare gli apicoltori operanti sul territorio ed ottenere i campioni di miele. Agli apicoltori disponibili alla collaborazione è stato chiesto di fornire un campione rappresentativo di ogni tipologia di miele prodotto. Quelli che ne erano ancora in possesso hanno fornito anche campioni di annate precedenti. Inoltre con strumentazione GPS sono state rilevate le posizioni di tutti gli apiari da cui provenivano i campioni di miele (Fig. 4.4).

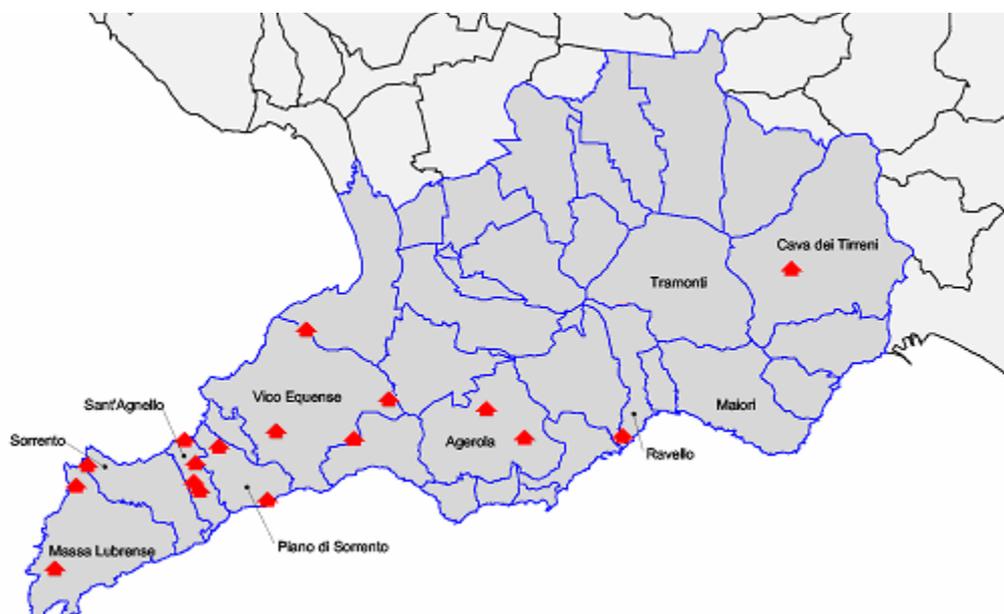


Fig. 4.4: Localizzazione degli apiari campionati in Penisola Sorrentina.

Per garantire la tracciabilità durante tutte le fasi delle analisi e per maggiore efficienza durante l'elaborazione dei dati, ogni campione è stato contrassegnato con un codice numerico identificativo a cui è stata associata la scheda di un archivio informatico (Fig. 4.5). Nel database sono stati inseriti sia i dati della stazione sia i risultati delle analisi effettuate.

I risultati ottenuti sono stati analizzati sia con i metodi tradizionali (torte e spettri pollinici) e sia con la tecnica della "cluster analysis" utilizzando il software di analisi multivariata Syntax®. Più precisamente, è stata costruita una matrice che per ogni miele analizzato (colonne) riporta numerose variabili costituite dalle percentuali delle forme polliniche trovate (righe). Successivamente, per calcolare le distanze tra i campioni ed il loro grado di dissimilarità, è stata utilizzata la procedura del vicino-lontano con le distanze calcolate con il metodo di Euclide.

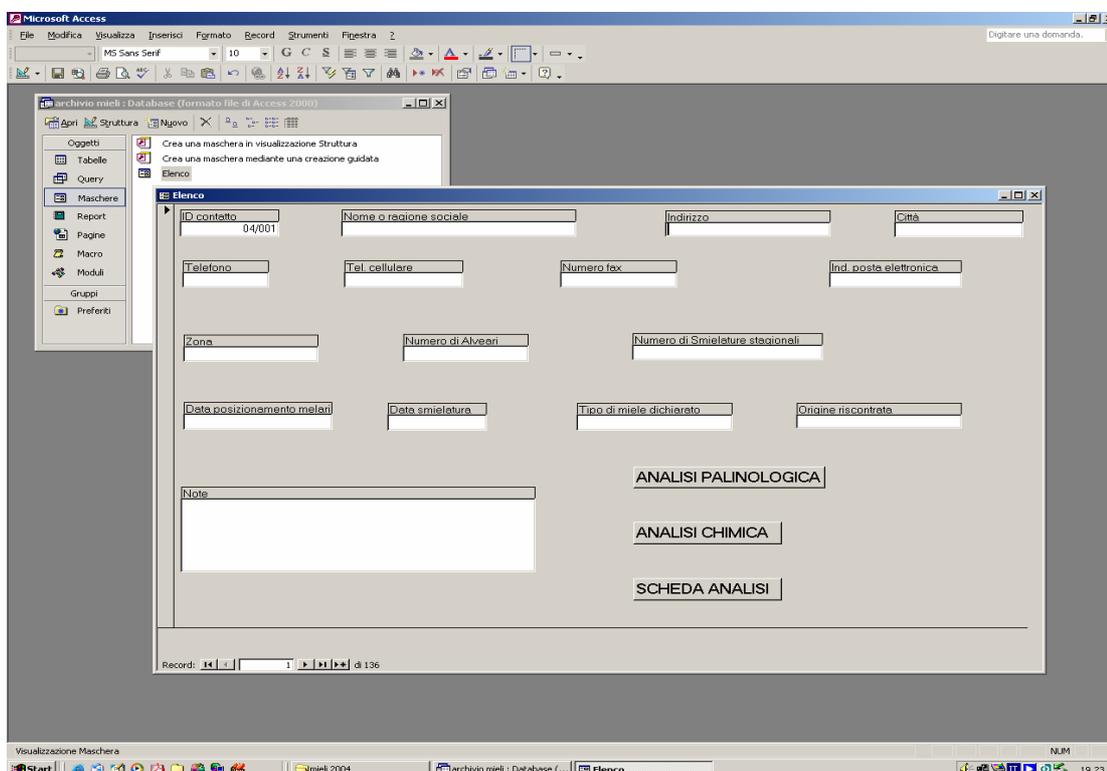


Fig. 4.5: Schermata rappresentativa del database dei mieli analizzati.

Risultati

Da un'analisi generale dei dati relativi a tutti i campioni si evince che nel primo anno di indagine il 44% dei mieli raccolti è stato classificato come millefiori; il 26% come miele di Castagno, il 17% di Agrumi, il 7 % di Melata, il 4 % di Acacia ed il 2% di Fruttiferi (*Prunus* sp.) (fig. 4.6a).

Dalle analisi dei mieli prodotti nell'annata successiva è risultato che il 35% dei mieli campionati è Millefiori, il 35% monoflora di Castagno e il 19% monoflora di Agrumi. La restante parte è costituita da produzioni minori ma di qualità: più del 5% monoflora di Erba Viperina, quasi il 3% sia monoflora di Eucalipto sia di Acacia (Fig. 4.6b).

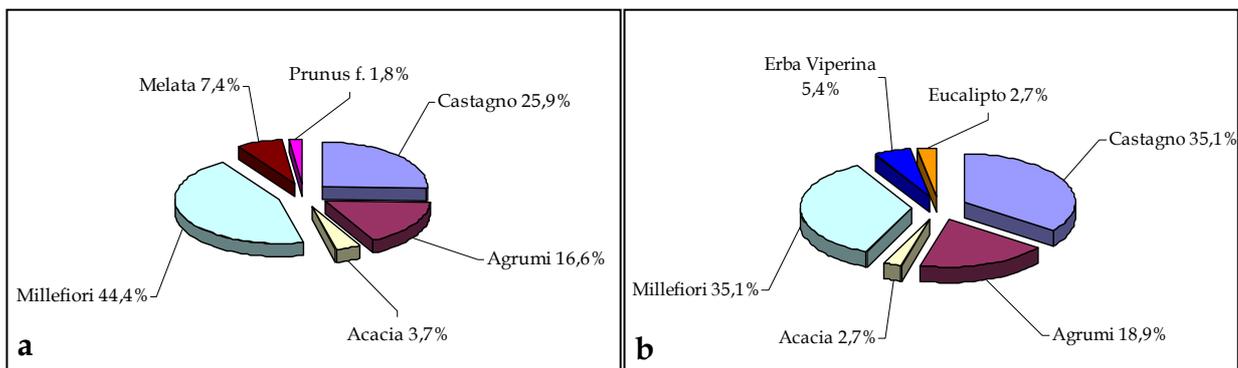


Fig. 4.6: Origine botanica dei campioni di miele analizzati il primo anno.

Complessivamente, nei mieli campionati nel primo anno sono stati ritrovati 64 tipi diversi di polline (Fig. 4.7). Relativamente alle specie nettariifere il polline di castagno era presente in tutti i campioni tranne uno, quello di agrumi nel 77% dei mieli analizzati, quello di Brassicaceae nel 74%, rovo nel 70%, erica nel 53%, Myrtaceae nel 48%, Apiaceae nel 46% e *Prunus* nel 42%. Tutte le altre specie sono presenti in una minore percentuale di mieli. Lo spettro pollinico dei mieli analizzati

il secondo anno riporta che sono stati riscontrati pollini appartenenti a 73 specie o tipi diversi. In Fig. 4.8 si riporta lo spettro pollinico di tutti i mieli analizzati nel secondo anno. Il polline di castagno è stato riscontrato nel 95% dei campioni ed in quasi il 50% di questi era presente in percentuali superiori al 45%. Molto rappresentati anche i pollini aerodiffusi dei gruppi *Olea* e Graminaceae. Più del 50% dei mieli presentava polline di *Cistus*, del gruppo delle Umbelliferae, del genere *Brassica*, di *Papaver*, *Echium* ed *Eucaliptus*. Il polline di *Citrus* è invece stato ritrovato in meno del 50% dei campioni.

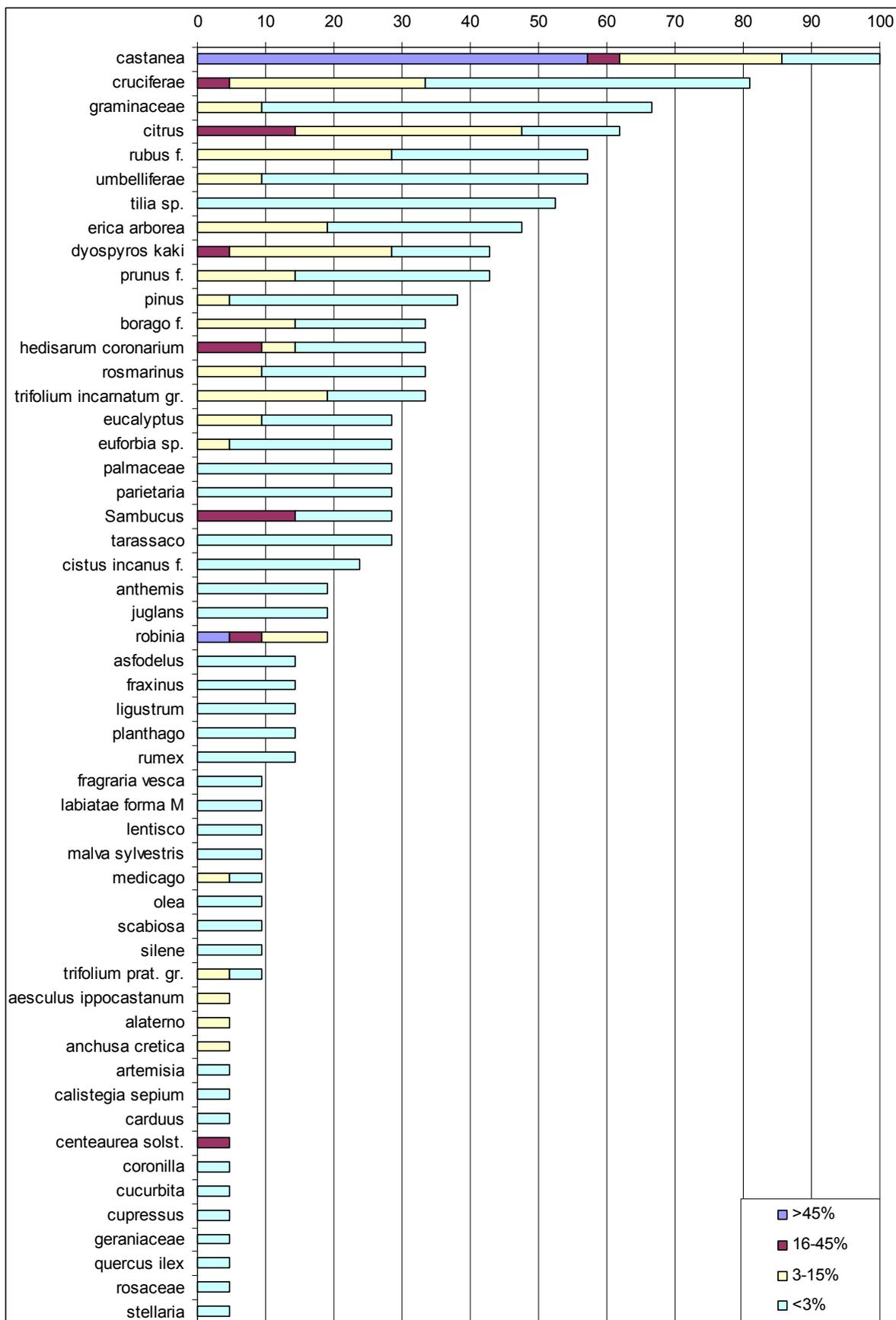


Fig. 4.7: Spettro pollinico dei campioni di mieli raccolti il primo anno in Penisola.

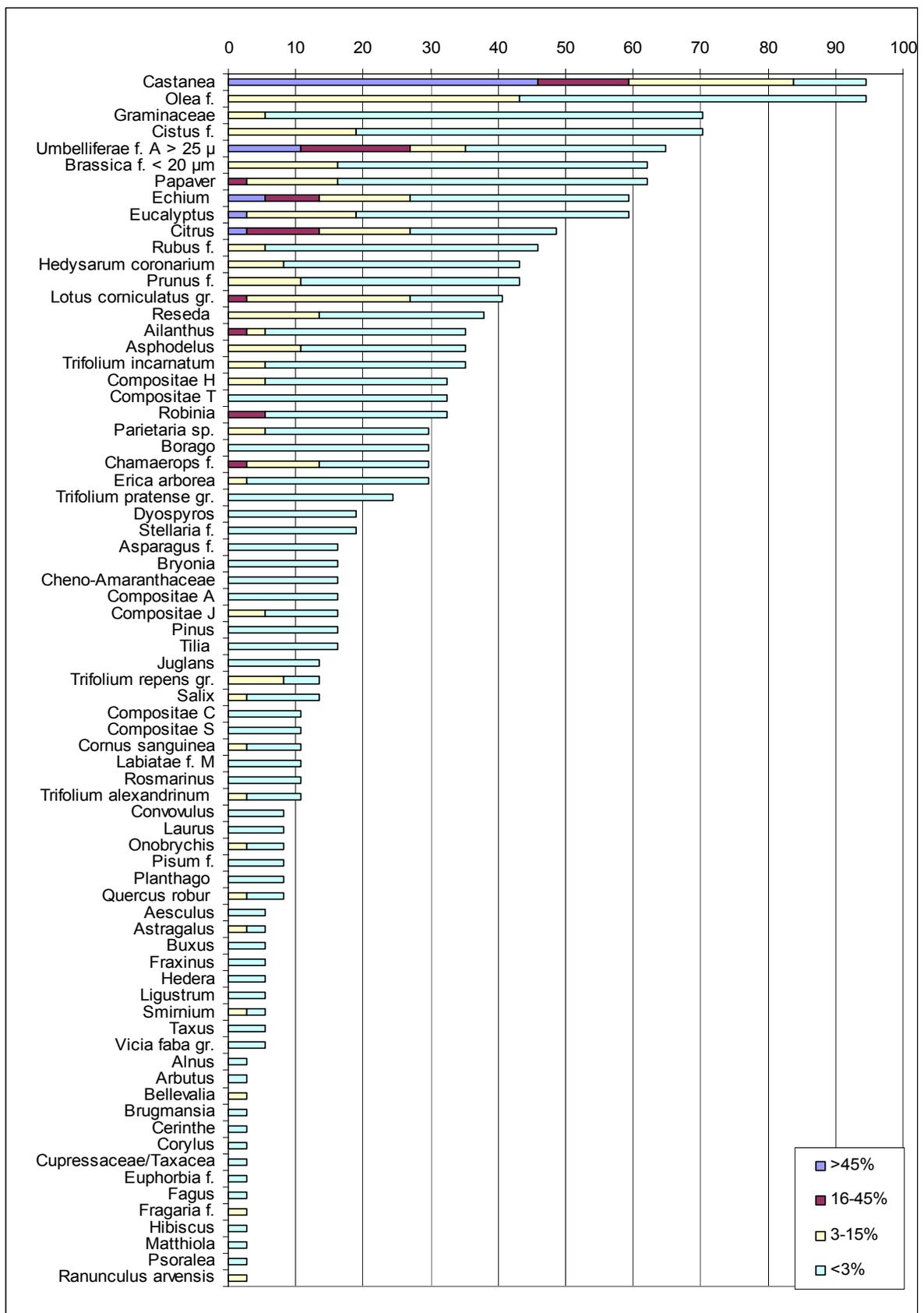


Fig. 4.8: Spettro pollinico dei campioni di mieli raccolti il secondo anno in Penisola.

In Fig. 4.9 si riporta il risultato dell'analisi multivariata dei risultati delle analisi dei mieli del primo anno in cui, per semplicità, ogni campione è stato contrassegnato con un numero. L'analisi separa i mieli in due grossi gruppi. Il primo più vicino all'asse è caratterizzato da una maggiore uniformità delle variabili rispetto al secondo; in esso sono raggruppati tutti i mieli di castagno. Più precisamente dal n° 1 al n° 24 sono mieli con la percentuale di castagno maggiore o uguale a 90; dal n° 5 al n° 43 sono raggruppati i mieli con percentuali di castagno da 84 ad oltre 90; dal n° 3 al n° 42 sono mieli millefiori con prevalenza di castagno. Nel secondo gruppo due mieli di *Prunus* (26 e 49) si separano per primi e successivamente due mieli di Robinia (10 e 52), un miele di sulla (19) ed uno di trifoglio (14). I rimanenti mieli sono di agrumi o di millefiori con presenza di agrumi. Oltre alla *cluster analysis* i dati sono stati anche sottoposti all'analisi delle componenti principali (PCA). In questo caso, utilizzando come variabili le percentuali delle forme polliniche i mieli si sono distribuiti in modo molto simile a quello ottenuto con la *cluster analysis*. Successivamente, a questa PCA è stata sovrapposta quella in cui le forme polliniche sono state considerate come variabili. Dal biplot ottenuto si evince che il primo asse spiega il 71% della variabilità insita nei dati ed è fortemente influenzato dal castagno, mentre il secondo spiega l'11% della variabilità ed in esso *Prunus* e *Citrus* sono dominanti.

Nella Fig. 4.10, si riporta il risultato della *cluster analysis* dei mieli campionati il secondo anno. Anche questa volta la prima divisione separa dagli altri tutto il gruppo dei mieli di castagno. Questi si differenziano anche per il minore grado di

dissimilarità presente tra loro. La seconda divisione separa 3 mieli monoflora di umbellifere (campioni 11, 14, 62); la terza un miele di eucalipto (88), la quarta 2 mieli monoflora di erba viperina, la quinta tutti i millefiori. La sesta separa ancora quelli di robinia da tutti quelli di agrumi (da 65 a 03).

Per superare i limiti dello studio dei casi singoli, è stato eseguito anche un confronto statistico di tutti i risultati delle analisi melissopalinoologiche dei mieli della Penisola prodotti durante i due anni di campionamento. Nella Fig. 4.11 si riporta il risultato dell'analisi delle componenti principali (PCA). I campioni del primo anno presentano una "b" prima del codice di riferimento, quelli del secondo anno una "a". Per quanto ci sia sovrapposizione di molti punti, a causa del numero elevato di campioni analizzati contemporaneamente, è evidente che i mieli delle due annate non si separano in due gruppi. Sullo stesso dendrogramma è stata anche riportata la distribuzione delle variabili per evidenziare quali sono le specie con maggiore carattere discriminante. Sull'asse orizzontale *Castanea* (n° 18) distribuisce i mieli verso destra; su quello verticale *Citrus* (n°23) e *Brassica* (n°13) separano i mieli verso l'alto e le *Umbelliferae* (n°92) verso il basso. Volendo generalizzare i mieli prodotti nelle due annate non sono così diversi come si potrebbe credere. La presenza di pollini di castagno, agrumi, Brassicacee ed Ombrellifere ha caratterizzato i mieli di entrambe le annate.

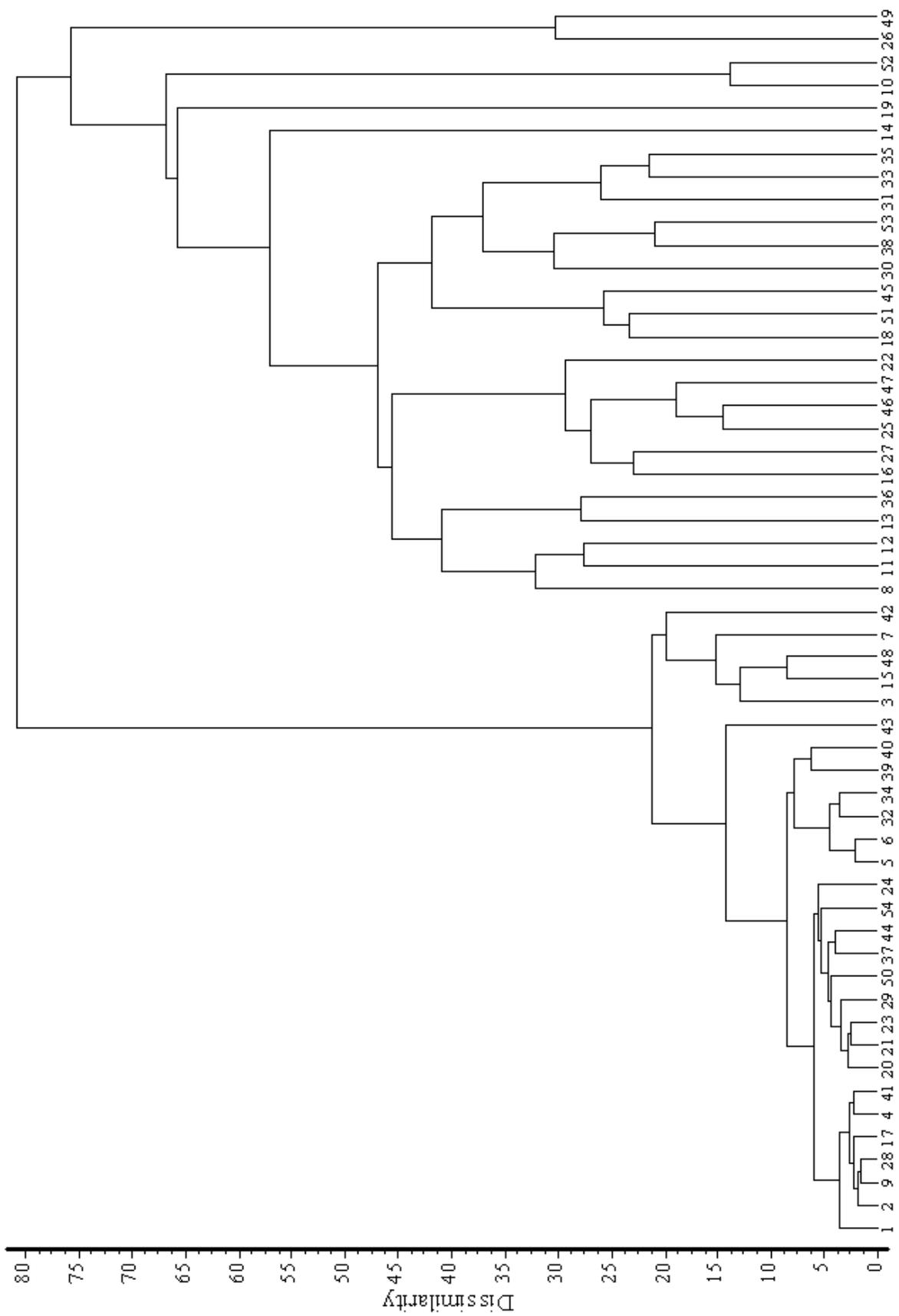


Fig. 4.9: Risultato della cluster analysis dei mieli prodotti nel primo anno

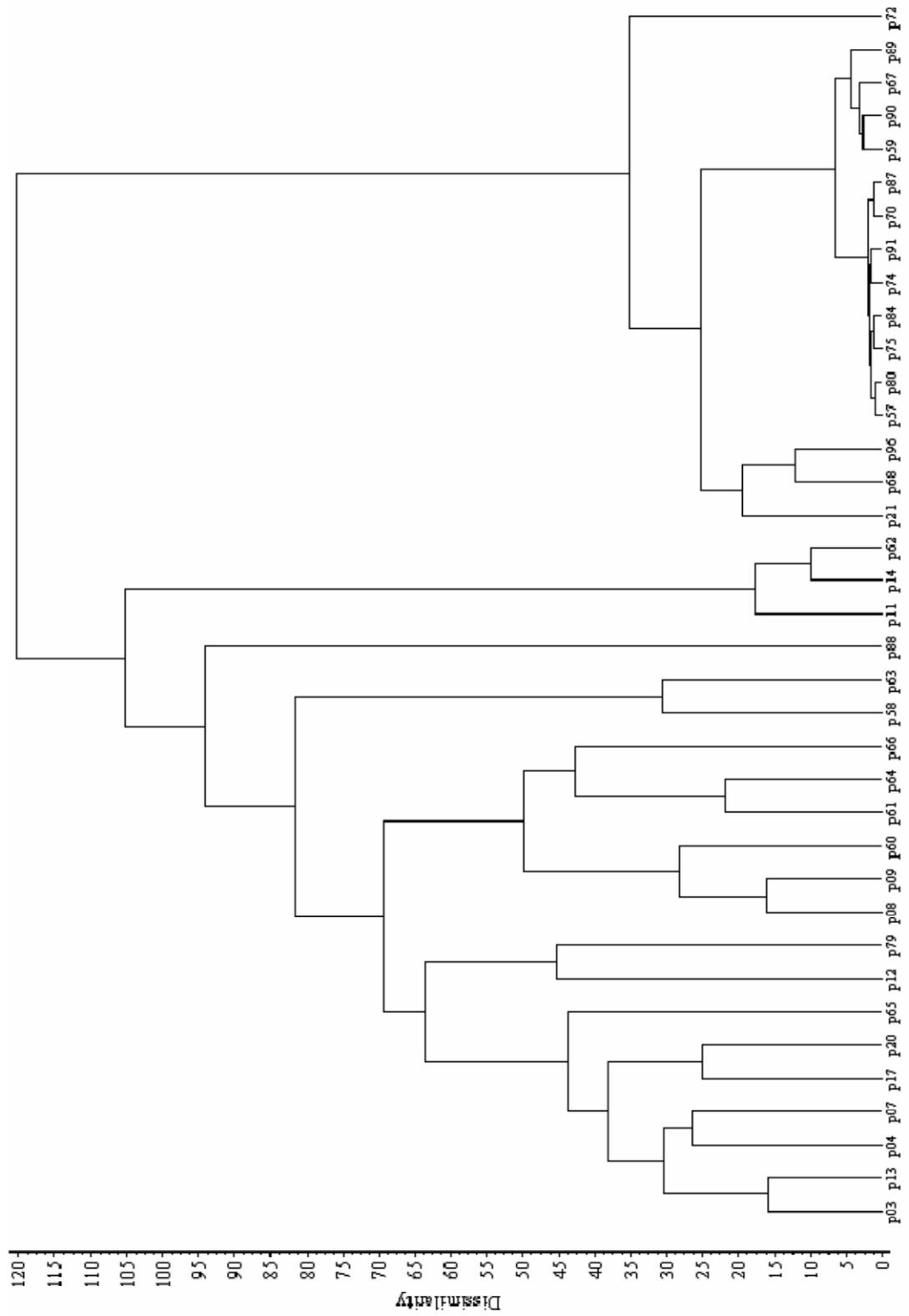


Fig. 4.10: Risultato della cluster analysis dei mieli prodotti nel secondo anno

Davies *et al.*, 2002; Goodacre *et al.*, 2002; Terrab *et al.*, 2002; Cordella *et al.*, 2003; Ampuero *et al.*, 2004; Benedetti *et al.*, 2004; Cotte *et al.*, 2004; Nalda *et al.*, 2005; Ruoff *et al.*, 2006). Infatti, mentre la variabilità tra mieli uniflorali è relativa solo alle specie di accompagnamento, nei mieli multiflora le variazioni nella percentuale dei pollini influisce sull'intera caratterizzazione botanica creando grossi problemi di classificazione e valutazione. La maggior parte dei ricercatori interessati a trovare una soluzione a tale problema sta lavorando nell'ottica di trovare soluzioni alternative all'analisi palinologica. Tuttavia riteniamo che i vantaggi dell'analisi dei residui pollinici possano non essere persi se i dati palinologici sono opportunamente analizzati con metodi di elaborazione più attuali ed appropriati. I risultati preliminari dell'applicazione di questi metodi alle analisi palinologiche sono riportati in letteratura (Ortiz Valbuena, 1987; Sancho *et al.*, 1991; Battesti & Goeury, 1992; Ferrazzi & Medrzycki, 2002; Munera & Garcia Perez, 2004; Scala *et al.*, 2004a). L'uso dei metodi di statistica multivariata ci ha dato la possibilità di confrontare e classificare in modo oggettivo non solo la produzione di tutti i tipi di miele prodotti in una stagione apistica in una data area geografica, ma anche valutare la variabilità tra produzioni di annate differenti.

Nello specifico, dal confronto dei tipi di miele delle due annate si evince che le produzioni principali sono rimaste le stesse anche se il miele di castagno il primo anno era in percentuale minore e quello millefiori maggiore. Inoltre, le produzioni uniflorali minori sono diverse probabilmente non solo a causa dei diversi

andamenti climatici stagionali, ma anche perché le smielature sono state eseguite in momenti differenti.

Confrontando, quindi, la variabilità delle produzioni di miele dei due anni di campionamento risulta che in Penisola, le tipologie di miele prodotte più diffusamente sono state: castagno ed agrumi. Più rari ma ricorrenti, anche i mieli di robinia e probabilmente melata.

Dallo studio delle variazioni delle caratteristiche botaniche dei mieli durante la stagione apistica, è evidente che il limone fiorisce prima del castagno ma che esiste una breve sovrapposizione delle due fioriture. Inoltre, nella competizione tra le due specie, le api, di gran lunga, preferiscono bottinare sul castagno anche quando gli alveari sono collocati negli agrumeti. Pertanto, durante la produzione di miele di agrumi, la concomitante fioritura del castagno determina in pochi giorni un apporto di nettare talmente elevato da compromettere irrimediabilmente la produzione del miele di agrumi. Nella programmazione delle smielature, quindi, gli apicoltori devono tenere conto di questo rischio.

La presenza di polline di castagno nel miele di agrumi è comunque una particolarità positiva al fine della caratterizzazione geografica del miele perché è legata alla peculiarità del territorio della Penisola Sorrentino-Amalfitana. Essa, per le sue caratteristiche geografiche e climatiche, comprime in aree molto limitate, e strettamente interconnesse, tipi vegetazionali che altrove caratterizzano territori ampi e ben separati tra loro.

L'analisi multivariata si presenta come un potente mezzo per discriminare i campioni di miele, il vantaggio maggiore di questa tecnica è senza dubbio la possibilità di analizzare tutti i campioni contemporaneamente e di eliminare la soggettività dell'interpretazione. Le informazioni che si possono ottenere attraverso questo tipo di elaborazione sono di gran lunga più dettagliate rispetto a quelle deducibili dai tradizionali spettri pollinici. In conclusione, si ritiene che l'uso di questa metodologia, ulteriormente perfezionata, sia un valido supporto per la caratterizzazione botanica dei mieli di un'area geografica ed il successivo controllo dei marchi DOP o IGP per la protezione delle produzioni locali.

4.3 VALUTAZIONE DELLA PRODUTTIVITÀ POTENZIALE DI AREE GENERALMENTE NON UTILIZZATE PER LA PRODUZIONE DI MIELE

Introduzione

Come già affermato precedentemente la caratterizzazione geografica si basa sulla determinazione delle caratteristiche fisico-chimiche e melissopalinologiche dei mieli prodotti dagli apicoltori di una determinata area da valorizzare (Persano Oddo *et al.*, 2001; Ricciardelli D'Albore, 2001; Sabatini *et al.*, 2001). Quando lo scopo del lavoro di caratterizzazione è il miglioramento e la valorizzazione delle produzioni apistiche di una area geografica è fondamentale che i mieli analizzati siano rappresentativi di quel territorio; ciò si verifica solo se la distribuzione degli alveari è uniforme. Questo aspetto raramente è stato preso in considerazione (Buonanno & Aronne, 2005) e quasi sempre i dati che si utilizzano riguardano solo gli ambienti in cui sono casualmente posizionati gli alveari mentre rimane pressoché sconosciuta allo studio di caratterizzazione la produttività di zone che per vari motivi non vengono utilizzate dagli apicoltori. Pertanto, è evidente che se si vuole migliorare la produzione di un determinato territorio, è fondamentale analizzare sia le produzioni effettive e sia le produzioni potenziali. Scopo di questa parte del lavoro è stato proprio quello di studiare le potenzialità produttive di un'area collocando una serie di alveari secondo un preciso design sperimentale al fine di definire un protocollo di attività e di elaborazione dei dati da proporre quando si vuole ottenere una valutazione delle caratteristiche produttive di miele di un determinato territorio.

Materiali e metodi

L'area di studio è stata la Penisola Sorrentino-Amalfitana. Attraverso lo studio di dati sull'uso del suolo e sulle caratteristiche floristico-vegetazionali, sono state individuate tre tipologie di ambienti (Fig. 4.12):

- a) aree coperte da vegetazione a prevalenza di macchia mediterranea;
- b) agrumeti;
- c) castagneti.



Fig. 4.12: Le tre tipologie di ambienti considerati. (Macchia Mediterranea, Agrumeti, Castagneti)

Per ogni ambiente sono state selezionate 4 stazioni rappresentative della variabilità interna ad ogni tipologia. Inoltre, per tutti gli ambienti si è avuto cura di collocare due stazioni sul versante della costiera Amalfitana e due su quello della costiera Sorrentina. Per quanto riguarda le aree a macchia, le stazioni sono state collocate nelle aree di Vico Equense, Punta Campanella, Positano e Capo d'Orso. Per quanto riguarda gli agrumeti gli apiari sono stati posizionati a Cetara, Maiori, Massa Lubrense e Piano di Sorrento. Per i castagneti sono state selezionate due aree nei cedui (Faito versante nord e Faito versante sud) e due nei castagneti da frutto (Moiano e Scala) (Fig. 4.13).



Fig. 4.13: Localizzazione delle stazioni di campionamento sperimentale in Penisola Sorrentina.

In tutte le stazioni sono stati posizionati 3 alveari del tipo generalmente utilizzato per il servizio di impollinazione (Fig. 4.14). Questa scelta è stata fatta per ottimizzare il frequente prelievo dei campioni di polline e miele dai favi.

Periodicamente (ogni 15 giorni) sono stati prelevati campioni di miele senza arrecare danno o alterare l'equilibrio delle famiglie. Tutti i telaini sono stati accuratamente etichettati e trasportati in laboratorio.

In laboratorio, da ogni favo sono stati estratti i campioni di miele dai quali sono stati preparati i vetrini per l'osservazione al microscopio secondo il metodo di Louveaux precedentemente riportato in dettaglio (Louveaux *et al.*, 1978). Su ogni vetrino è stata eseguita l'analisi palinologica qualitativa e quantitativa.



Fig. 4.14: Una delle postazioni di alveari dai quali sono stati prelevati i campioni di miele e polline.

Risultati

I risultati delle analisi melissopalinoologiche sono stati sottoposti a diversi tipi di analisi statistica semplice e multivariata. In Fig. 4.15 si riporta il dendrogramma di una *cluster analysis* in cui sono stati inseriti i dati di tutti i mieli

analizzati. Dall'intero gruppo si separa nettamente un miele di melata caratterizzato da abbondante presenza di spore ed ife fungine. A sinistra si differenzia un gruppo di mieli caratterizzato da minore grado di similarità: sono i mieli prodotti dalle api nel mese di maggio. Nel gruppo più a destra si distinguono i mieli con elevate percentuali di polline di castagno caratterizzati da minore dissimilarità. Infine, all'estrema destra del diagramma sono stati ordinati alcuni mieli degli alveari nella macchia caratterizzati dalla presenza di polline di *Rhamnus*.

Applicando questi metodi di ordinamento ai mieli prodotti negli alveari della macchia mediterranea (Fig. 4.16), è possibile separare (a sinistra del dendrogramma e con maggiore grado di dissimilarità) un gruppo di mieli primaverili, di cui molti sono millefiori, da quelli di castagno. Completamente isolato è il miele di melata. Se con gli stessi criteri si ordinano i mieli delle postazioni nei castagneti (Fig. 4.17), i campioni si dividono in due grossi gruppi. Il primo (a sinistra del dendrogramma) comprende tutti mieli primaverili, generalmente millefiori. Il secondo raggruppa tutti i mieli di castagno.

Per quanto riguarda i mieli degli alveari posti negli agrumeti (Fig. 4.18), la ripartizione generale è stata simile a quella degli altri due ambienti. Nel dendrogramma si differenzia nettamente un gruppo di mieli con maggiore variabilità che comprende mieli millefiori e monoflora di agrumi; un gruppo molto uniforme di mieli di melata ed un altro di mieli di castagno. In ultimo si isola un gruppetto di millefiori a prevalenza di polline di olivo.

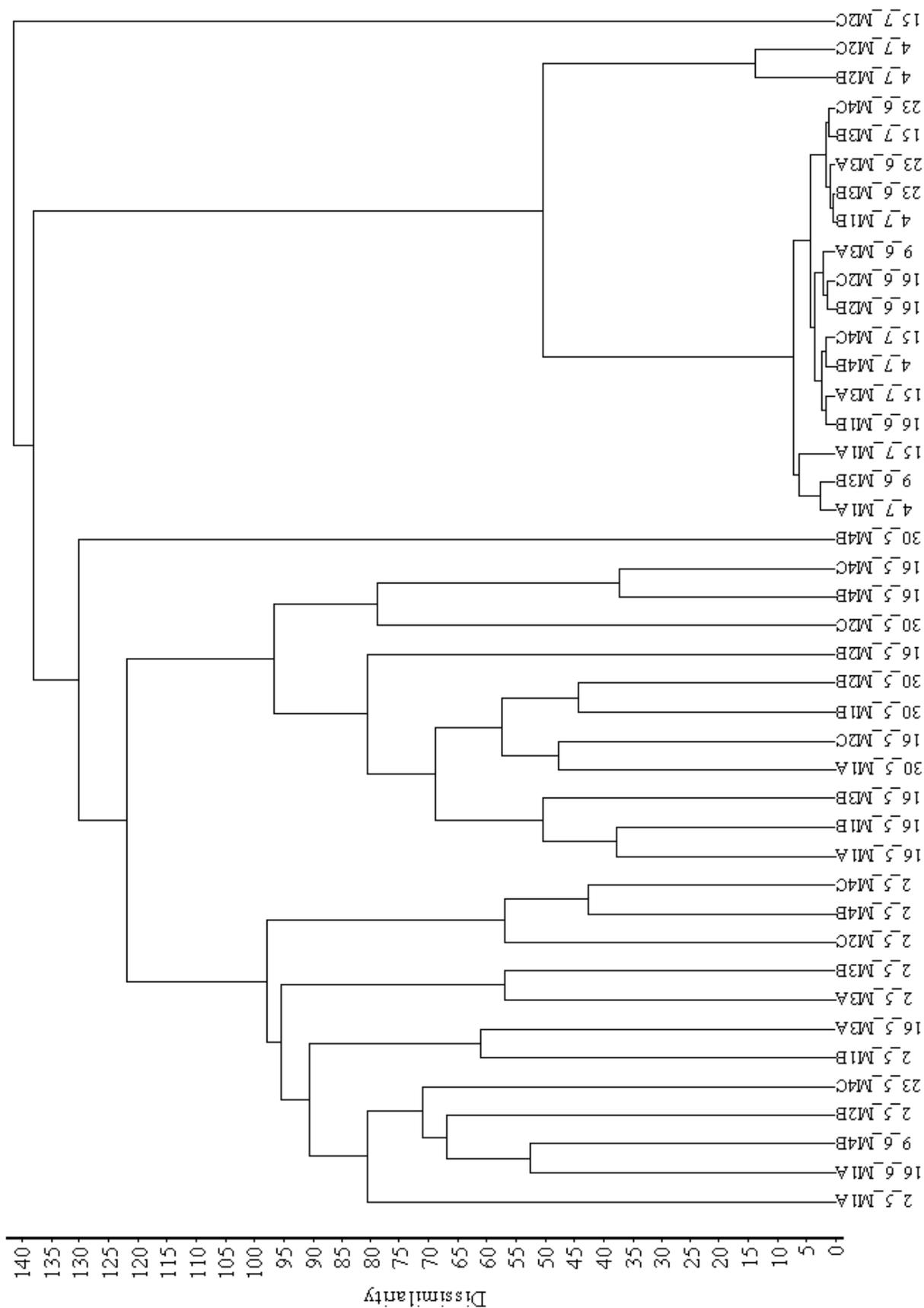


Fig. 4.16: Risultati della Cluster analysis dei mieli degli alveari nella macchia.

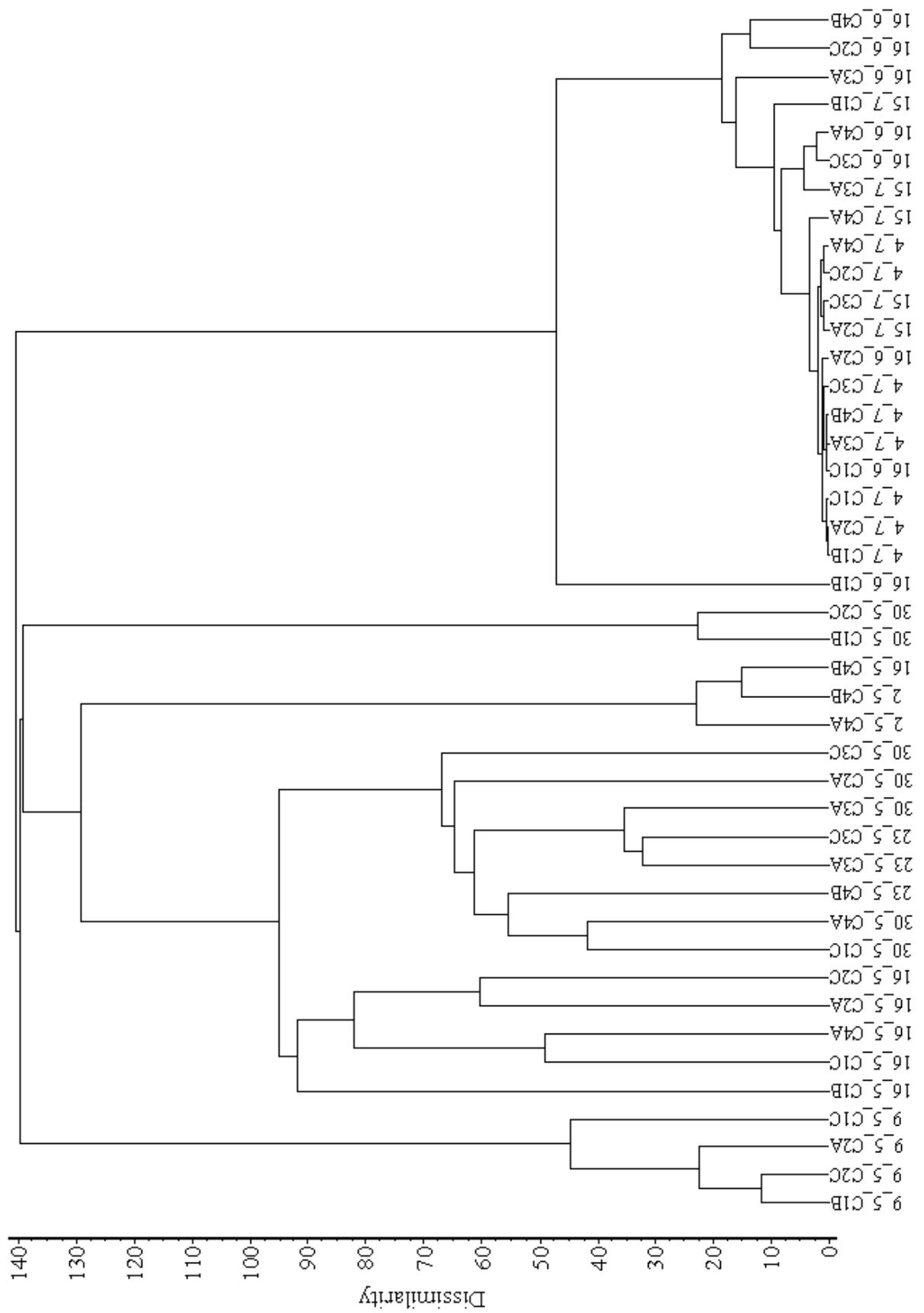


Fig. 4.17: Risultati della *Cluster analysis* dei mieli degli alveari nei castagneti.

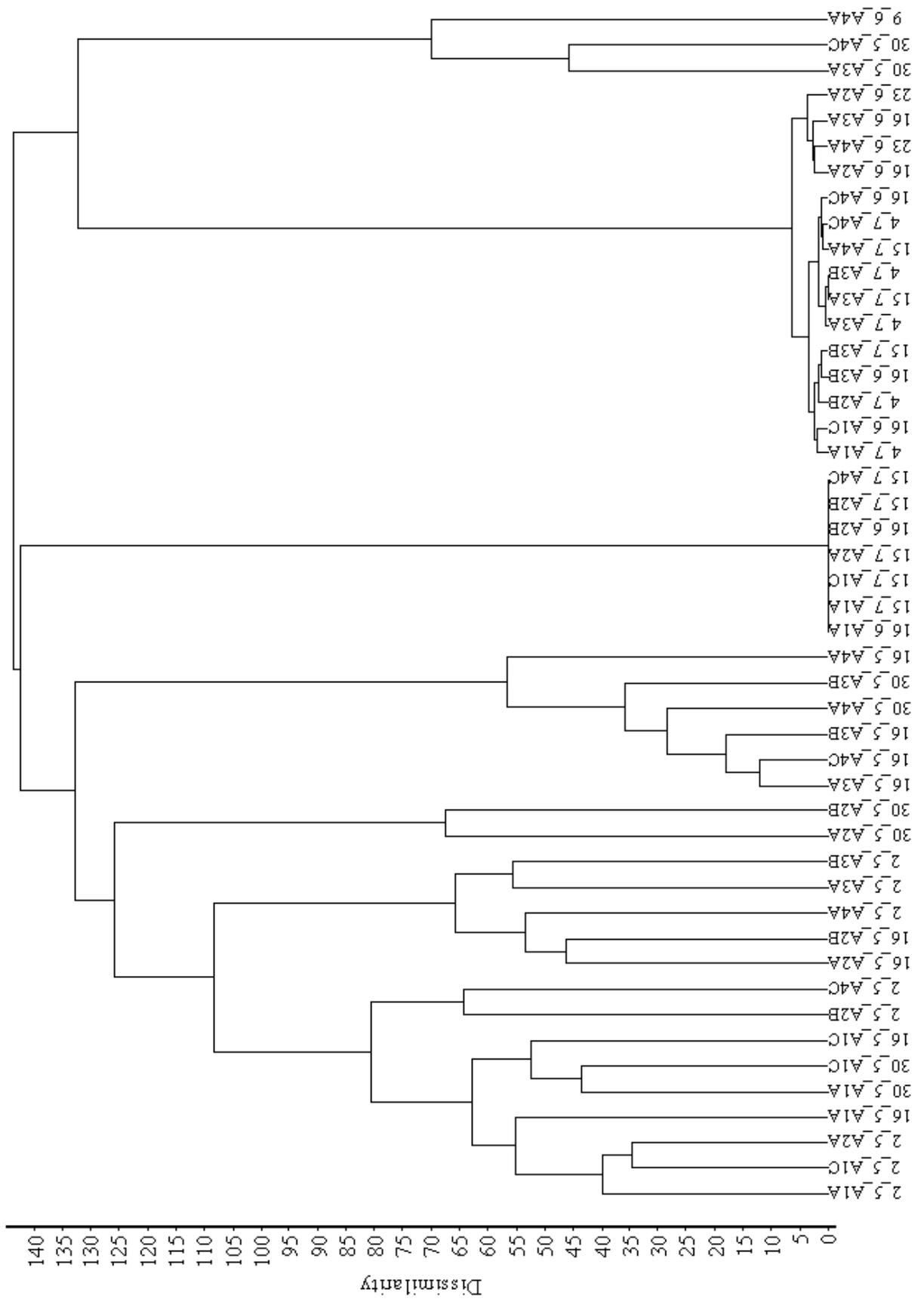


Fig. 4.18: Risultati della Cluster analysis dei mieli degli alveari negli agrumeti.

Complessivamente si può affermare che, a prescindere dall'ubicazione dell'alveare, le api hanno prodotto mieli primaverili generalmente millefiori e, successivamente, miele di castagno. Per quanto riguarda il miele monoflora di agrumi è stato prodotto dagli alveari collocati negli agrumeti e da alcuni nella macchia. Questo miele è stato accumulato in un periodo molto breve confermando che la sua produzione non è facile e richiede particolare attenzione da parte degli apicoltori. È infatti necessario seguire bene gli andamenti delle fioriture per evitare "l'inquinamento" di fioriture pre-agrumi e post-agrumi principalmente quella del castagno.

Se la ripartizione dei dati si esegue non per ambienti ma per mese si evidenzia che durante la fioritura delle specie primaverili (Fig. 4.19) in ogni ambiente, le api producono mieli con caratteristiche varie. Nel dendrogramma non è possibile differenziare nettamente un gruppo da un altro; inoltre, campioni provenienti da vari ambienti sono completamente mischiati gli uni agli altri. I mieli prodotti in giugno (Fig. 4.20) si distribuiscono secondo un gradiente che colloca i mieli millefiori con caratteristiche simili a quelli di maggio da un lato e gradualmente quelli di castagno, fino alla melata, dall'altro. Anche in questo caso i mieli non si raggruppano per tipo di ambiente.

I mieli di luglio (Fig. 4.21) sono principalmente di castagno, hanno maggiore similarità e si distinguono nettamente solo dai sei di melata prodotti quasi esclusivamente negli agrumeti.

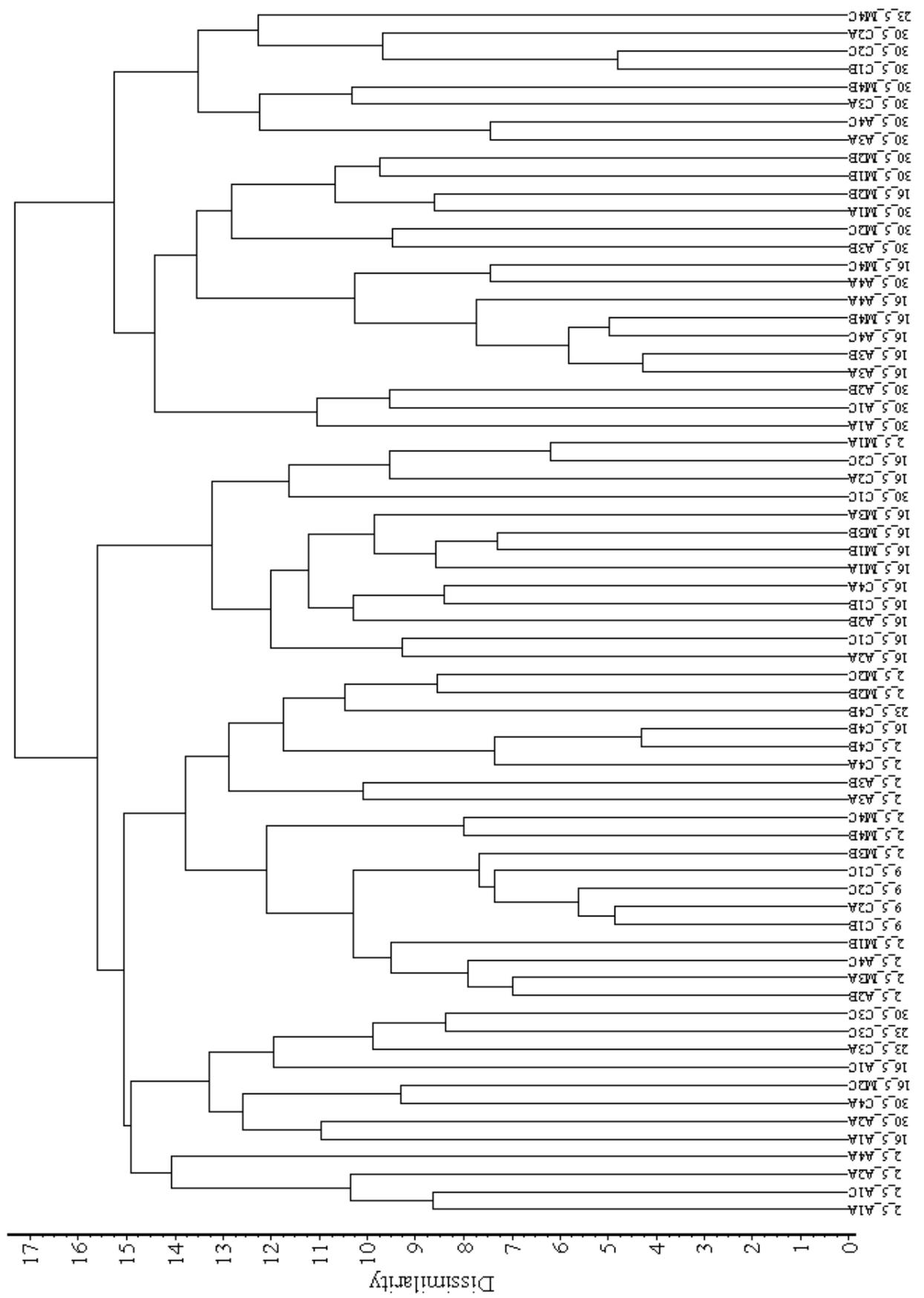


Fig. 4.19: Risultati della *Cluster analysis* dei mieli prodotti in maggio.

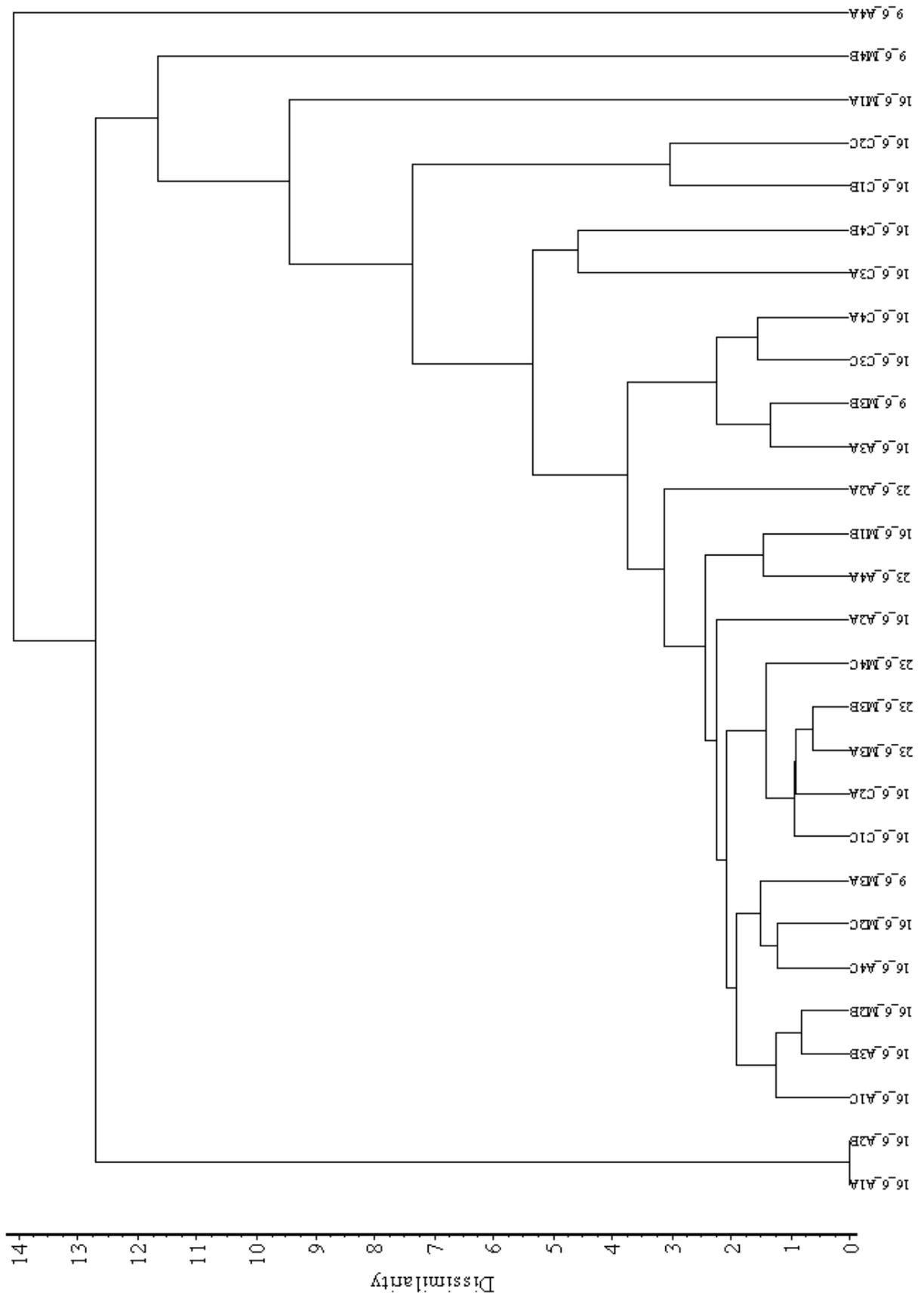


Fig. 4.20: Risultati della *Cluster analysis* dei mieli prodotti in giugno.

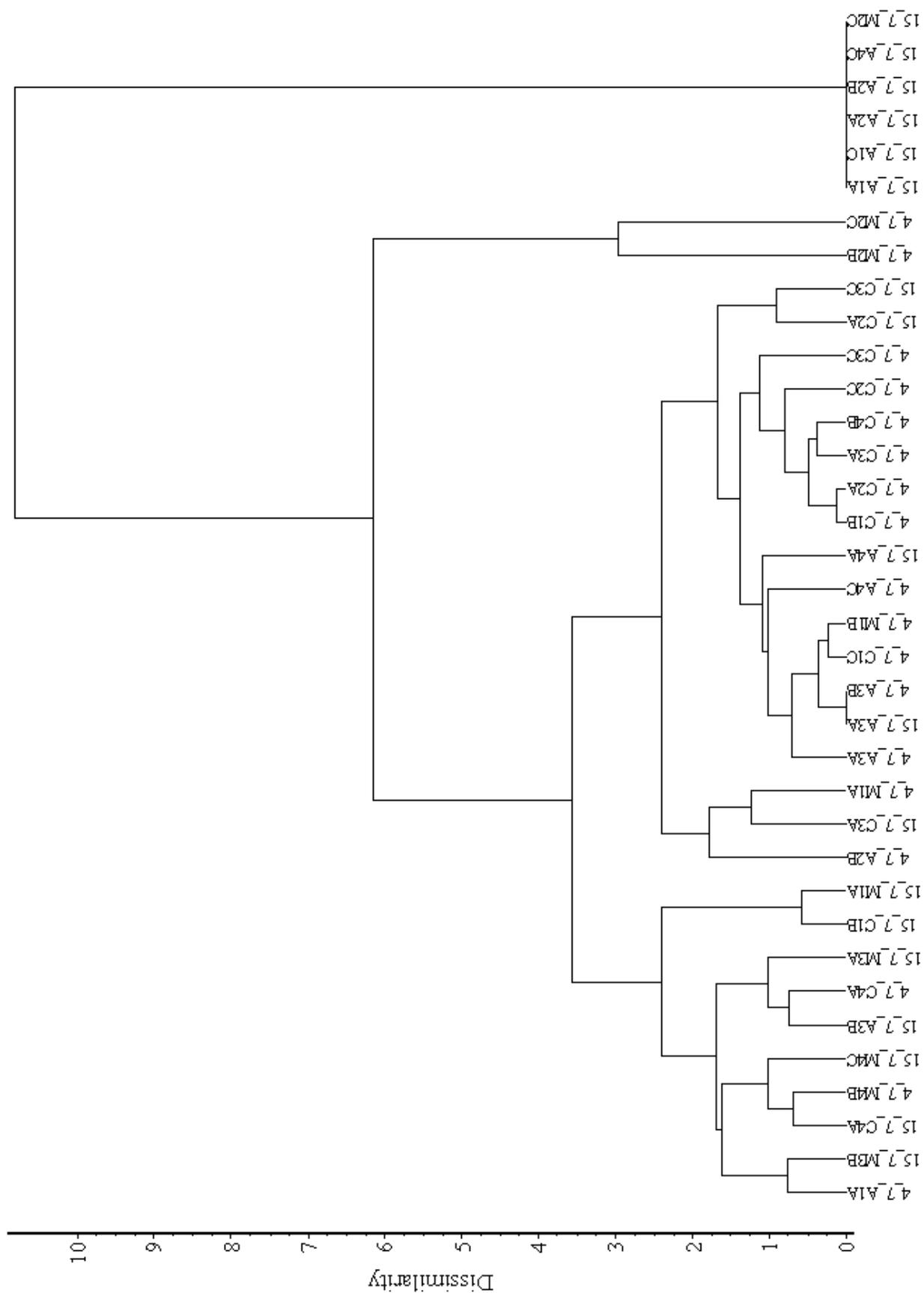


Fig. 4.21: Risultati della *Cluster analysis* dei mieli prodotti in luglio.

Oltre all'origine botanica, che si basa solo sulle specie più abbondanti presenti nei mieli, è stata valutata la ricchezza di specie dei singoli campioni per evidenziare eventuali strategie di bottinaggio delle api. Se si analizza, per ogni ambiente, il numero di specie bottinate, si deduce che esso varia significativamente nel tempo ed è massimo nel periodo primaverile. Ciò è vero nei castagneti in cui il numero di specie è alto da inizio maggio a metà giugno (Fig. 4.22 "Castagno") per poi diminuire nel periodo estivo.

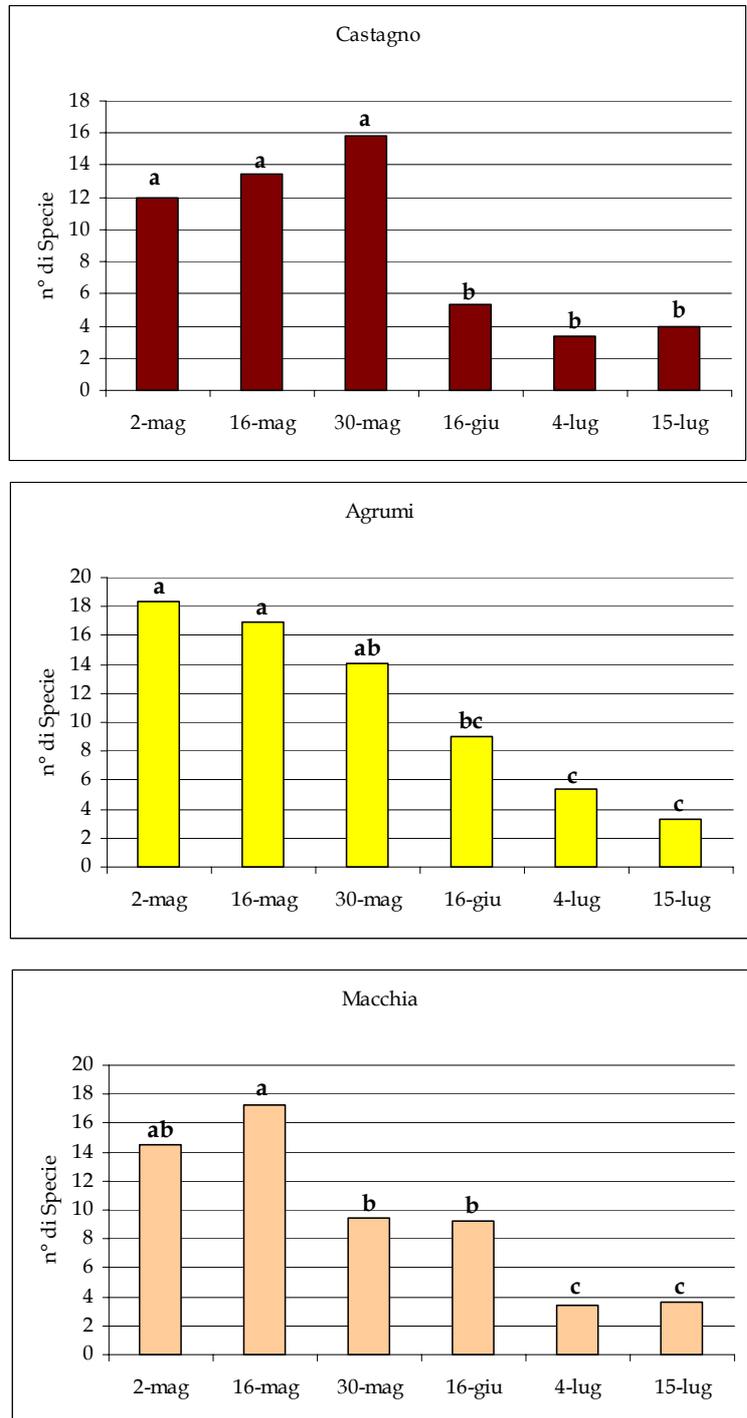


Fig. 4.22: Variazione nel tempo del numero di specie presenti nei mieli provenienti dai diversi ambienti.

Negli agrumeti la situazione è del tutto simile con un numero di specie bottinate più alto in primavera e decrescente in estate (Fig 4.22 “Agrumi”).

Anche per i mieli raccolti nella macchia la situazione è stata la medesima con un numero maggiore di specie visitate ad inizio stagione (Fig. 4.22 “Macchia”).

Tra i diversi ambienti la diminuzione del numero di specie bottinate non è simile solo nell’andamento. Infatti, se si considerano contemporaneamente i tre ambienti vegetazionali si evince che, per ogni periodo, le differenze tra il numero di specie ritrovate nei mieli non sono statisticamente significative (Fig. 4.23).

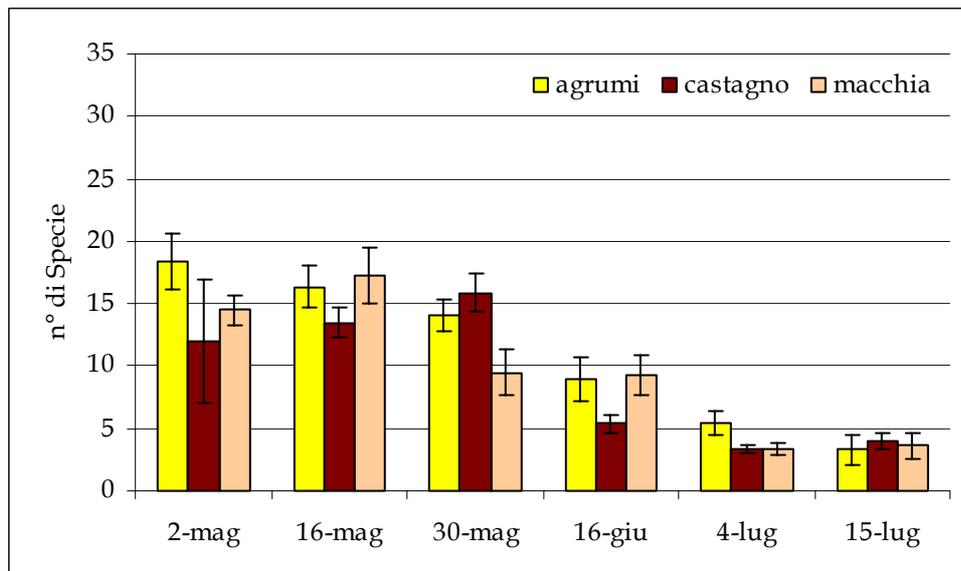


Fig. 4.23: Confronto tra il numero di specie presente nei mieli raccolto nei tre diversi ambienti.

Analizzando, per ogni ambiente, le frequenze percentuali dei pollini ritrovati nei mieli estivi, si evidenzia che l’ambiente vegetazionale influisce poco nella scelta della specie da bottinare. Infatti, oltre al castagno che si conferma come specie in assoluto più appetita, *Myosotis*, *Rubus* ed *Eucalyptus* sono presenti in circa il 50% dei campioni esaminati in tutti gli ambienti considerati Fig. 4.24, 4.25, 4.26.

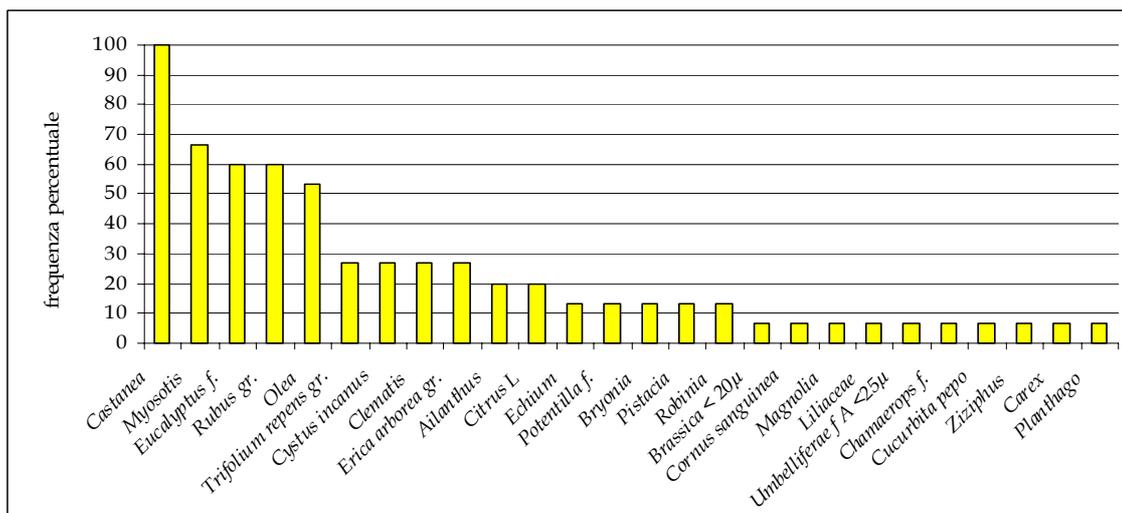


Fig. 4.24: Frequenza delle specie di polline presenti nei mieli estivi raccolti negli agrumeti.

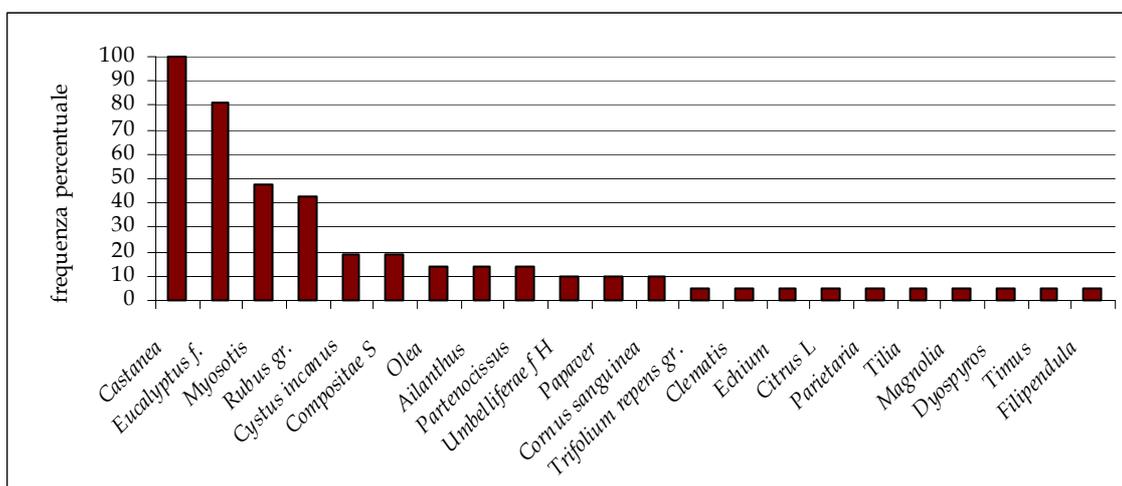


Fig. 4.25: Frequenza delle specie di polline presenti nei mieli estivi raccolti nei castagneti

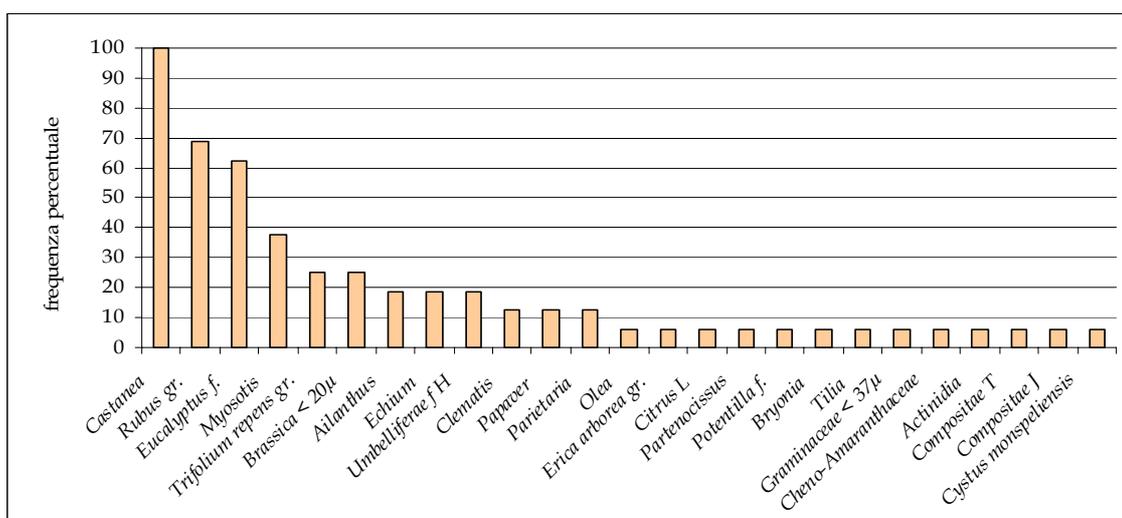
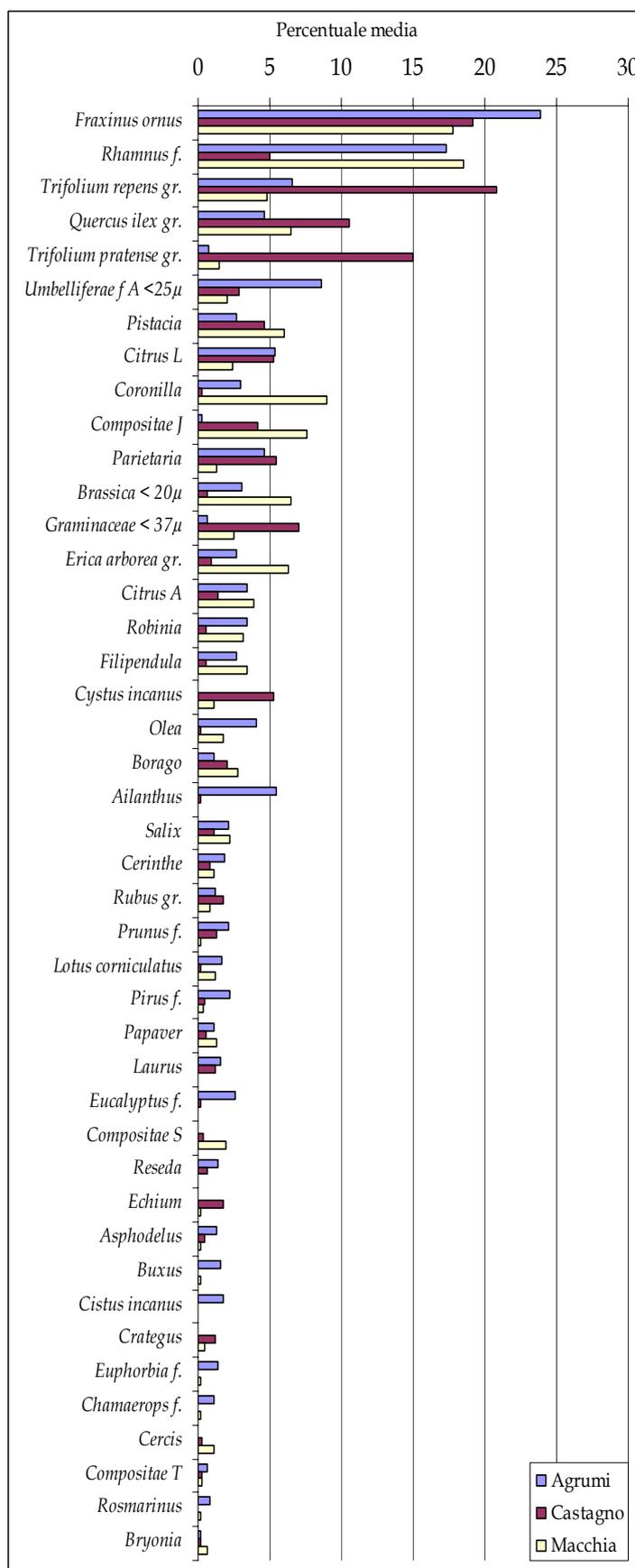


Fig. 4.26: Frequenza delle specie di polline presenti nei mieli estivi raccolti nella macchia.

Se si confrontano le percentuali medie di polline per specie trovate nei mieli degli alveari collocati nei tre tipi di ambiente (Fig. 4.27), si evince che a prescindere dalla posizione di partenza delle famiglie, le api hanno selezionato, se pur con variazioni nella quantità relativa, le stesse specie. Questa uniformità di scelta delle api è stata rilevata durante tutta la stagione apistica, quindi sia in primavera quando il numero di specie nei diversi ambienti vegetazionali è più elevata e quindi le tipologie di nettare disponibile più varie, sia in estate quanto il numero di specie in fiore si riduce.

Fig. 4.27: Percentuale media delle specie ritrovate nei vari ambienti.



Queste osservazioni supportano l'ipotesi che le api scelgono le specie da bottinare non in funzione dell'offerta disponibile ma in base alle esigenze nutrizionali della famiglia.

Discussioni

La collocazione di alveari in stazioni sperimentali secondo una pianificazione che tiene conto delle caratteristiche della vegetazione dell'intero territorio oggetto di studio si è dimostrata molto utile. I risultati ottenuti hanno dato la possibilità di valutare le caratteristiche botaniche della produzione reale e potenziale di miele della Penisola con maggiore rigore scientifico e quindi maggiore sicurezza nelle conclusioni. Pertanto, si ritiene che questo approccio metodologico possa essere utilizzato tutte le volte che sia necessario effettuare uno studio di caratterizzazione delle produzioni di miele di un qualsiasi territorio.

Entrando nello specifico, dagli studi sulle produzioni potenziali di miele nei vari ambienti del territorio della Penisola è risultato che nel periodo inizio maggio-fine luglio, in tutti gli ambienti è possibile produrre mieli primaverili seguiti da quelli di castagno. Per quanto riguarda i primi, questi sono risultati di particolare pregio in quanto risultano di colore chiaro e delicatamente profumati. Tra i mieli tardo-primaverili si inserisce anche quello di limone prodotto dagli alveari posti negli agrumeti. All'inizio della fioritura del castagno tutte le famiglie, ovunque collocate, hanno abbandonato le altre essenze per bottinare il nettare di questa

specie. Ovviamente, il massimo rendimento, in termini di quantità di miele prodotto, è stato riscontrato negli alveari posti nei castagneti dove nel periodo primaverile è stato possibile ottenere altre tipologie di miele monoflora quali *Erica* e *Myosotys*. Gli alveari negli agrumeti, hanno ottimizzato la loro attività scegliendo tra nettare di castagno e melata.

In conclusione, se si dovesse pianificare l'attività apistica dell'area studiata, si potrebbero definire alcune linee guida per gli apicoltori. Per quanto riguarda l'ubicazione degli alveari, se si opta per gli allevamenti stanziali, si suggerisce la collocazione degli apiari negli agrumeti. In questo caso, seguendo il sistema di smielature tradizionali ed avendo cura di tenere sotto controllo la fioritura del limone, sarà possibile produrre un eventuale miele primaverile, uno di agrumi ed uno di castagno e/o melata. Se invece si sceglie un'apicoltura transumante si consiglia a) di posizionare gli alveari nella macchia all'inizio della primavera per la produzione di miele chiaro, b) di valutare la possibilità di produrre miele di limone, c) di spostare gli apiari nei castagneti durante la fioritura del castagno, d) di riportarli nella macchia dopo il periodo di aridità estiva.

4.4 VALUTAZIONE DELLA VARIABILITÀ DELLE CARATTERISTICHE DEI MIELI PRODOTTI NELLO STESSO SITO ED IN ANNATE SUCCESSIVE

Introduzione

Le caratteristiche delle produzioni apistiche rispecchiano la flora di un determinato territorio (De Leonardis *et al.*, 1989; Montenegro *et al.*, 1992; Ricciardelli D'Albore & Intoppa, 2000; Aronne, 2005) Questa stretta relazione tra composizione palinologica di un miele e flora di interesse apistico è il punto cardine per la caratterizzazione geografica dei mieli. Essendo però la biologia delle piante correlata alla variabilità climatica è evidente come questa variabilità si rifletta anche nei mieli. Per questo motivo per la caratterizzazione delle produzioni di un dato territorio è necessario analizzare i mieli per più annate in modo da ridurre al minimo l'effetto del fattore climatico. Diversi autori riportano studi di variabilità delle produzioni in anni successivi (Adams & Smith, 1981; Accorsi *et al.*, 1989). Tuttavia la loro raccolta dei mieli non è stata eseguita secondo uno schema sperimentale rigoroso tale da evitare, o almeno limitare, l'influenza di altri fattori sulla variabilità delle caratteristiche botaniche dei mieli e permettere una valutazione oggettiva delle differenze.

Scopo di questa parte della ricerca è stato studiare e valutare la variabilità dei mieli prodotti negli stessi apiari stanziali in annate successive. E' stata inoltre confrontata la variabilità tra mieli di famiglie di uno stesso apiario.

Materiali e Metodi

Per studiare la variabilità annuale delle produzioni di mieli, sono state raccolte quattro produzioni ottenute in tre stagioni consecutive nelle stesse località dagli stessi apicoltori. In particolare, in Penisola Sorrentino-Amalfitana, sono state raccolte tre serie di mieli di castagno e una serie di miele di agrumi. Uno studio più di dettaglio è stato eseguito in provincia di Avellino, dove sono stati raccolti campioni di miele per quattro anni consecutivi da quattro alveari posti nello stesso apiario. Questo campionamento ha permesso di valutare anche la variabilità tra le famiglie.

Risultati

Le caratteristiche botaniche dei mieli di castagno prodotti da tre diversi apicoltori professionisti della penisola Sorrentino-Amalfitana in tre annate successive sono sintetizzate nella Fig. 4.28. Poiché quello di castagno è un miele con polline iperrappresentato, gli istogrammi riportano le presenze percentuali solo dei pollini di accompagnamento. È evidente che c'è variabilità sia tra i mieli della stessa annata ma di diversi produttori, sia tra i mieli prodotti dagli stessi alveari in stagioni successive. Le differenze sono determinate oltre che dalla presenza/assenza delle singole specie anche dalla loro reciproca proporzione. In ogni caso le essenze botaniche più frequentemente ed abbondantemente presenti sono state: *Erica*, *Citrus*, *Brassica* e *Trifolium*.

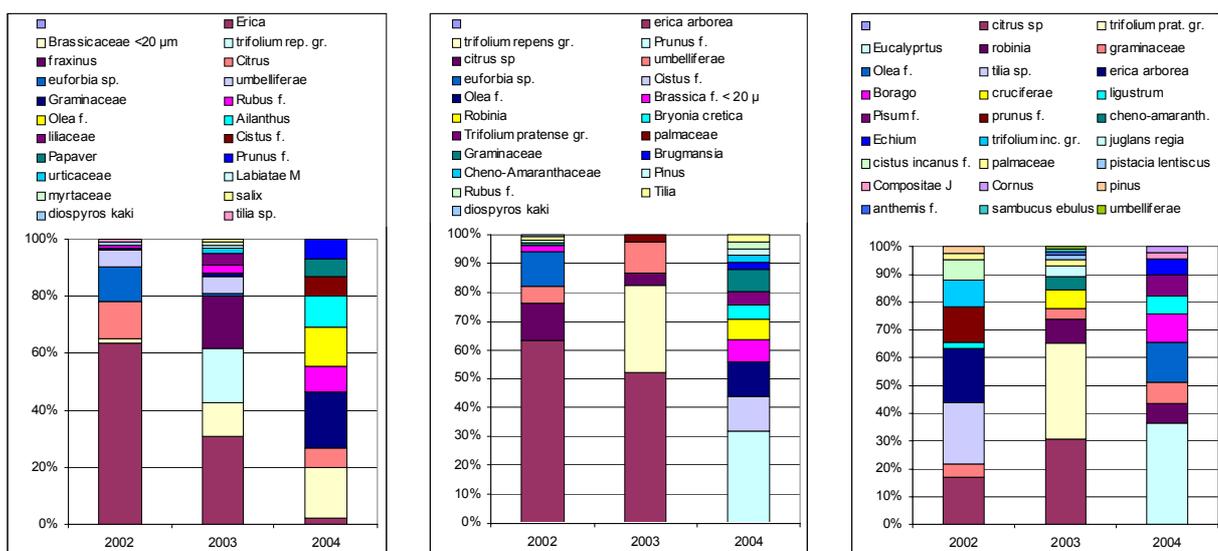


Fig. 4.28: Confronto tra le componenti polliniche di accompagnamento di mieli di castagno prodotti negli stessi apiari in tre anni successivi.

Un confronto simile ai precedenti è stato eseguito anche per le produzioni di miele di agrumi di un apiario. In questo caso si riporta la composizione pollinica completa (Fig. 4.29). I campioni delle tre annate successive pur essendo diversi tra loro contengono tutti oltre al polline d'agrumi, presente in percentuali diverse nei diversi anni, quello di *Brassica*, *Castanea* e *Lotus*.

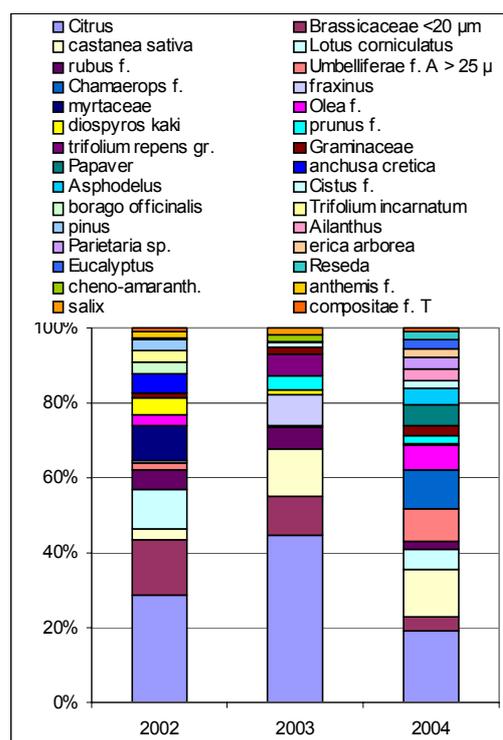


Fig. 4.29: Confronto tra le componenti polliniche di mieli di agrumi prodotti negli stessi apiari in tre anni successivi.

Per quanto riguarda l'obiettivo di valutare la variabilità nell'attività di bottinaggio delle famiglie di uno stesso apiario per confrontarla con la variabilità tra anni successivi, i risultati delle analisi dei campioni di miele di castagno di un apiario stanziale della provincia di Avellino sono stati elaborati con il metodo della *cluster analysis*. In Fig. 4.30 si riporta il dendrogramma che illustra il livello di similarità tra i campioni raccolti. In particolare si evidenzia che i mieli prodotti nel 2003 si separano nettamente dagli altri. Quelli delle annate 2000, 2001 e 2002 appartengono ad uno stesso gruppo, in cui le differenze riscontrate tra i mieli prodotti da famiglie differenti nel corso di una stessa stagione non sono maggiori rispetto a quelle tra anni diversi. Per quanto riguarda la produzione dell'anno 2003, si può ipotizzare che la maggiore differenza sia stata determinata dal fatto che la primavera e l'estate 2003 sono state climaticamente molto diverse dalla media in quanto particolarmente calde ed aride.

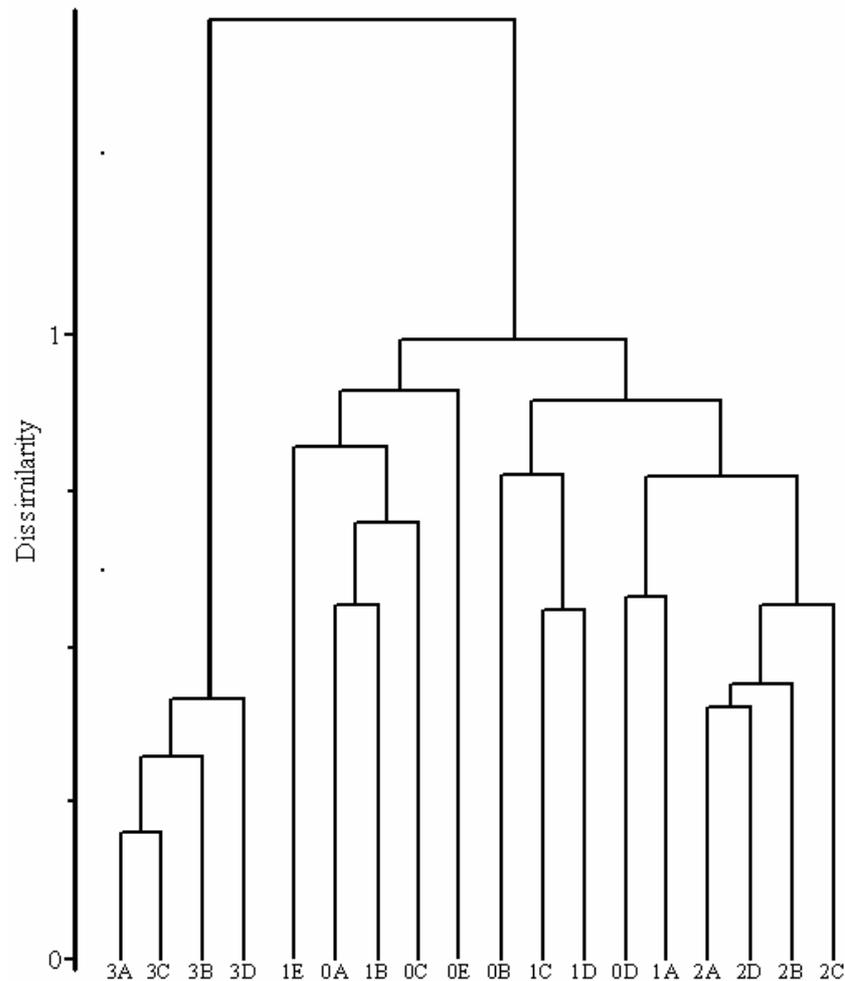


Fig. 4.30: Dendrogramma dei mieli prodotti nello stesso apiario da alveari differenti per quattro anni consecutivi. Nella legenda il numero si riferisce all'anno di raccolta (0=2000; 1=2001; 2=2002; 3=2003) mentre la lettera indica i mieli prodotti da famiglie differenti.

Discussioni

La valutazione della variabilità delle produzioni di una zona tra anni successivi riveste importanza economica in quanto per ottenere la definizione delle caratteristiche di un particolare tipo di miele, che si intende valorizzare con marchi di qualità, si devono prendere in considerazione le variazioni qualitative di tale prodotto dovute alle naturali oscillazioni dei fattori ambientali. In letteratura le differenze qualitative tra mieli di una stessa tipologia prodotti in annate diverse

sono state descritte tramite le analisi melissopalinoologiche (Adams & Smith, 1981; Accorsi *et al.*, 1989).

Questo tipo di confronto, molto dettagliato, si basa sul presupposto che il tipo di vegetazione nel raggio di bottinaggio delle api sia rimasto invariato durante il periodo di studio e quindi che le differenze riscontrate tra le produzioni delle diverse annate siano determinate dalle variazioni fenologiche e dalla scelta delle api. Tuttavia la variazione della data di smielatura, anche di pochi giorni, comporta variazioni significative nella presenza delle diverse specie e nella proporzione tra le frequenze polliniche. Questo aspetto è di solito completamente trascurato e le differenze riscontrate tra anni differenti si associano sempre a differenze climatiche e fenologiche. Il monitoraggio delle variazioni qualitative della produzione durante la stagione dovrebbe sempre essere eseguito quando l'obiettivo è uniformare la produzione di una specifica tipologia di miele in un territorio.

I risultati riportati, inoltre, dimostrano che ai fini della caratterizzazione geografica e botanica dei mieli, è necessario, non solo analizzare i mieli prodotti in annate successive, ma impostare il campionamento secondo uno schema scientificamente rigoroso che possa alla fine del lavoro fornire informazioni sicure sulla variabilità delle diverse produzioni, tra i diversi apicoltori, nella stessa stagione e tra stagioni differenti.

Infine anche i nostri dati dimostrano la presenza di una certa variabilità nella composizione pollinica sia tra i mieli prodotti in annate differenti sia tra quelli prodotti da famiglie differenti. Il punto critico è stimare quanto ampia possa essere

questa variabilità, e quanto gli estremi di questa variabilità possano sovrapporsi a quelli della variabilità di mieli dello stesso tipo prodotti in altre zone. Il lavoro di interpretazione dell'analisi pollinica dei mieli fino ad oggi si è basato sul commento dello spettro pollinico ottenuto dalle analisi melissopalinoologiche. Purtroppo questo metodo non si presta per ottenere una stima delle differenze. Per poter quantificare numericamente la variabilità esistente tra i vari campioni di miele è necessario adottare metodi statistici avanzati quali la *cluster analysis*. Questo metodo oltre a separare i campioni per gruppi omogenei (di similarità), fornisce un'altra informazione molto più importante della prima: la quantificazione della differenza.

4.5 APPLICAZIONE DEI RISULTATI DEGLI STUDI DI CARATTERIZZAZIONE DEI MIELI PER L'INDIVIDUAZIONE DI PRODUZIONI DI QUALITÀ E PER LA REDAZIONE DI DISCIPLINARI DI PRODUZIONE FINALIZZATI ALL'OTTENIMENTO DI MARCHI DI QUALITÀ

Introduzione

In Italia al momento esiste un solo miele certificato, il Miele della Lunigiana DOP. Numerose sono però le richieste già presentate al Ministero per le Politiche Agricole Alimentari e Forestali ed altre in corso di preparazione, sostenute principalmente dalle associazioni dei produttori e con il sostegno dei fondi comunitari stanziati per il miglioramento della produzione e della commercializzazione del miele Reg. 1221/97 e 797/04.

Parallelamente agli ottenimenti dei marchi di riconoscimento emergono, però, le frodi collegate, soprattutto quelle legate all'origine geografica, favorite anche dalla mancanza di un metodo analitico di controllo standardizzato (Piana, 1997). Ai fini della verifica dell'origine geografica è necessario quindi individuare un metodo oggettivo e ripetibile per l'interpretazione dei risultati delle analisi melissopalinologiche. Difatti la produzione di uno spettro pollinico dei mieli di un dato territorio seppur valida ai fini della caratterizzazione geografica non è sufficiente a garantire l'univocità del risultato (Bogdanov & Martin, 2002). Data la difficoltà di eseguire le analisi palinologiche e l'esiguo numero di operatori dedicati a questa attività, nell'ambito dell'International Honey Commission sono stati proposti e sono in corso di validazione metodi alternativi alla melissopalinologia

basati sulla determinazione di alcuni componenti chimici presenti nel miele (Bogdanov *et al.*, 1997; Barez *et al.*, 2000; Gonzales Paramas *et al.*, 2000). L'analisi multivariata è stata già proposta in passato per elaborare i dati delle analisi palinologiche ed ottenere informazioni sull'origine geografica dei mieli (Sancho *et al.*, 1991; Battesti & Goeury, 1992; Pena Crecente & Herrero Latorre, 1993; Sanz *et al.*, 1995; Ferrazzi & Medrzycki, 2002; Floris & Satta, 2002; Scala *et al.*, 2004b); tuttavia da questi risultati preliminari non sono state ancora ottenute proposte definitive. In questa parte di lavoro, dopo aver individuato i tipi di miele eleggibili in Penisola per un eventuale marchio di riconoscimento, è stata utilizzata l'analisi statistica multivariata per caratterizzare le tipologie in modo da discriminarle da produzioni con la stessa origine botanica ma provenienti da differenti aree geografiche.

Materiali e Metodi

I risultati delle analisi palinologiche di tutti i campioni classificabili come mieli d'agrumi (presenza di polline di *Citrus* superiore al 10%) sono stati sottoposti ad analisi multivariata con lo scopo di identificare l'eventuale presenza di specie guida o caratterizzanti. Allo stesso modo anche per i campioni classificabili come mieli di castagno (presenza di polline di castagno superiore a 90%), sono stati analizzati i risultati delle analisi palinologiche. Sono state quindi costruite le matrici di dati dei due tipi di miele da sottoporre alla *cluster analysis*. Poiché il castagno è

un miele a polline iperrappresentato, l'analisi multivariata è stata condotta eliminando dalla matrice i valori relativi al castagno stesso.

Inoltre mediante l'analisi multivariata ed in particolare con il metodo della PCoA è stata valutata l'eventuale disuguaglianza tra i mieli di castagno della Penisola e quelli di Avellino.

Risultati

Individuazione dei mieli da valorizzare con marchi di qualità

L'analisi complessiva dei risultati di tutte le analisi dei mieli raccolti in Penisola ha permesso di identificare diverse tipologie di mieli pregiati. Sovrapponendo questi risultati con valutazioni sulla quantità di miele potenzialmente producibile nell'area e la costanza negli anni della produzione, è stato possibile individuare tre diverse tipologie di miele che potrebbero essere valorizzate con marchi di qualità: miele di agrumi, miele primaverile di macchia e miele di castagno. Per ognuno di essi sono state individuate le specie più ricorrenti e quindi caratterizzanti. Di seguito si riportano in sintesi i risultati di tali analisi.

Miele di Agrumi della Penisola - Per il miele di Agrumi in Fig. 4.31 si riporta il dendrogramma delle variabili e cioè della distribuzione delle specie, in cui è evidente che la prima separazione divide il polline di agrumi e di castagno, con pari grado di dissimilarità, da tutti gli altri. Nei mieli d'agrumi la presenza di

polline di *Citrus* è scontata quella di *Castanea* è stata riscontrata per due annate successive e quindi può essere considerata come probabile specie caratterizzante. Lo studio della presenza di questa specie nei mieli d'agrumi della Penisola è stato ulteriormente approfondito calcolando la percentuale media di polline di castagno in tutti i campioni analizzati che è risultata 12,2% (deviazione standard = 4,40). Oltre al castagno altre forme polliniche ricorrenti sono *Hedysarum*, *Clematis*, *Papaver*, *Olea*, *Umbellifere*, *Eucalyptus*, *Rubus*, *Brassica* a cui si aggiungono altre con frequenza minore.

Miele Primaveraile di Macchia della Penisola – L'attività apistica nelle zone di macchia mediterranea permette di produrre con relativa facilità ed in grande abbondanza un miele millefiori dal colore chiaro ed aroma delicato. Specie polliniche caratterizzanti questo miele sono *Citrus*, *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*, *Lotus*, *Rhamnus* ed altre con frequenza minore.

Miele di Castagno della Penisola - Per i mieli di Castagno in Fig. 4.32 si riporta il dendrogramma delle variabili in cui le specie di accompagnamento più caratteristiche sono *Citrus* ed *Erica*. Con minore frequenza sono state anche ritrovate le forme polliniche dei *Trifolium*, di *Eucalyptus*, *Rubus*, *Brassica*, *Prunus*.

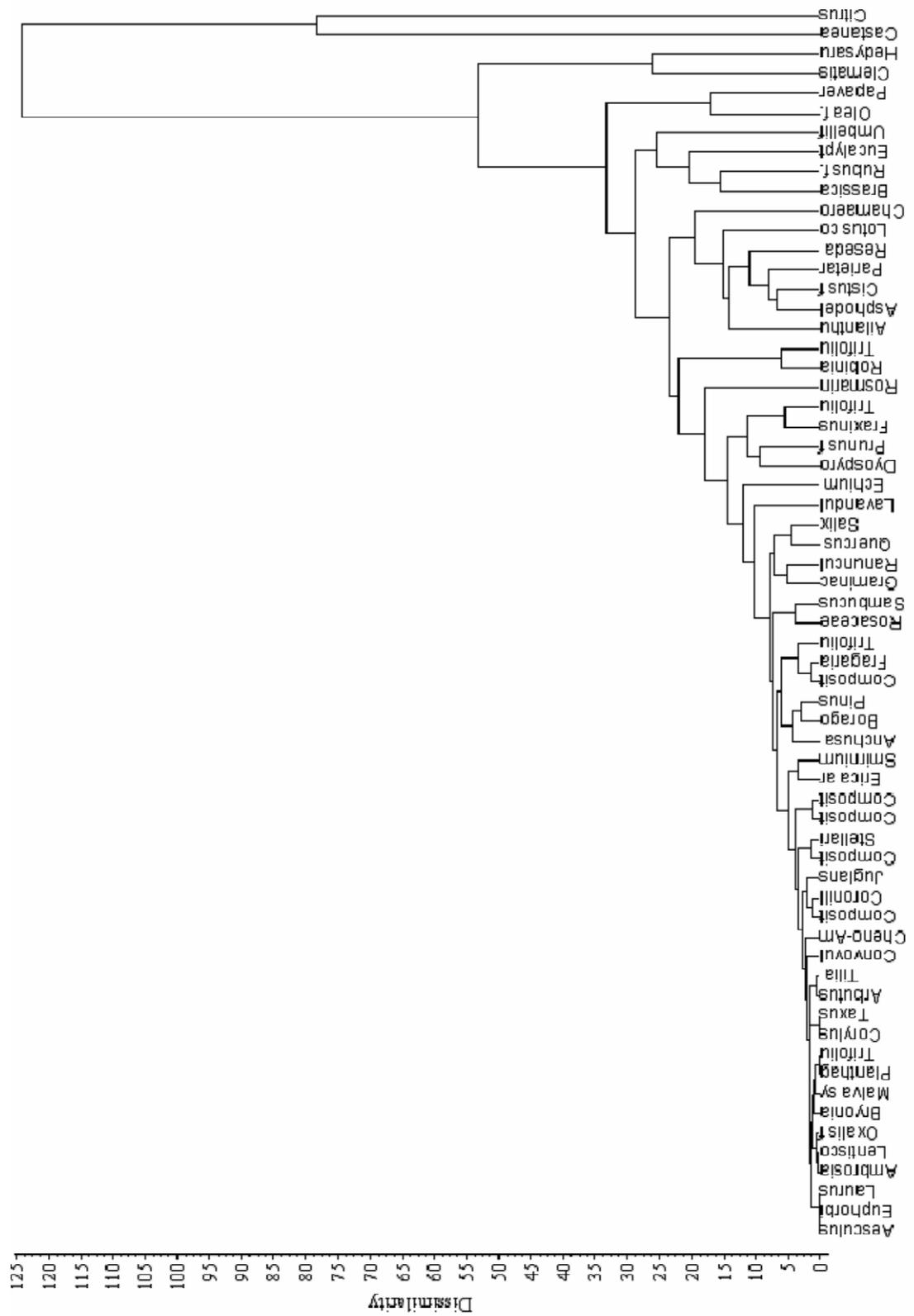


Fig. 4.31: Cluster Analysis: dendrogramma delle variabili dei mieli d'agrumi campionati.

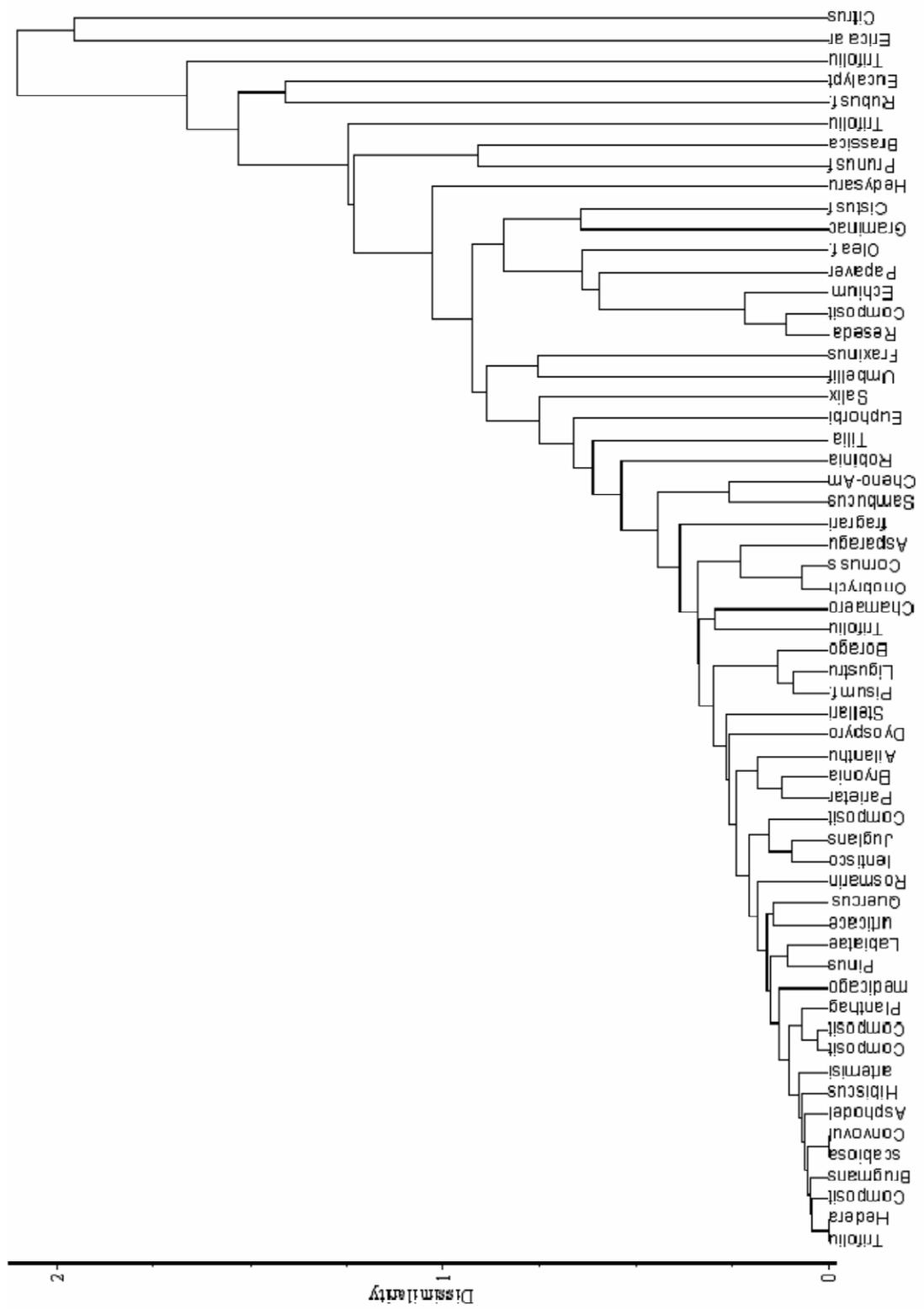


Fig. 4.32: Cluster Analysis: dendrogramma delle variabili dei mieli di castagno.

Discriminazione dei mieli con origine geografica differente

Al fine di trovare un metodo capace di separare i mieli in base all'origine geografica i dati palinologici sono stati sottoposti ad analisi statistica multivariata. In Fig. 4.33 si riportano i risultati dell'analisi delle componenti principali (PCoA) dei mieli di castagno originari di Avellino e della Penisola Sorrentina. Dal biplot che si genera appare chiara la suddivisione di tutti i mieli considerati in due gruppi: in quello a destra sono finiti tutti i mieli prodotti in provincia di Avellino; nell'altro ci sono i mieli della Penisola. Questo metodo, ulteriormente sviluppato, permetterebbe la verifica dell'appartenenza di un miele alla Penisola Sorrentino-Amalfitana inserendo i dati del campione incognito nella matrice e valutando il grado di similitudine con gli altri campioni di origine nota.

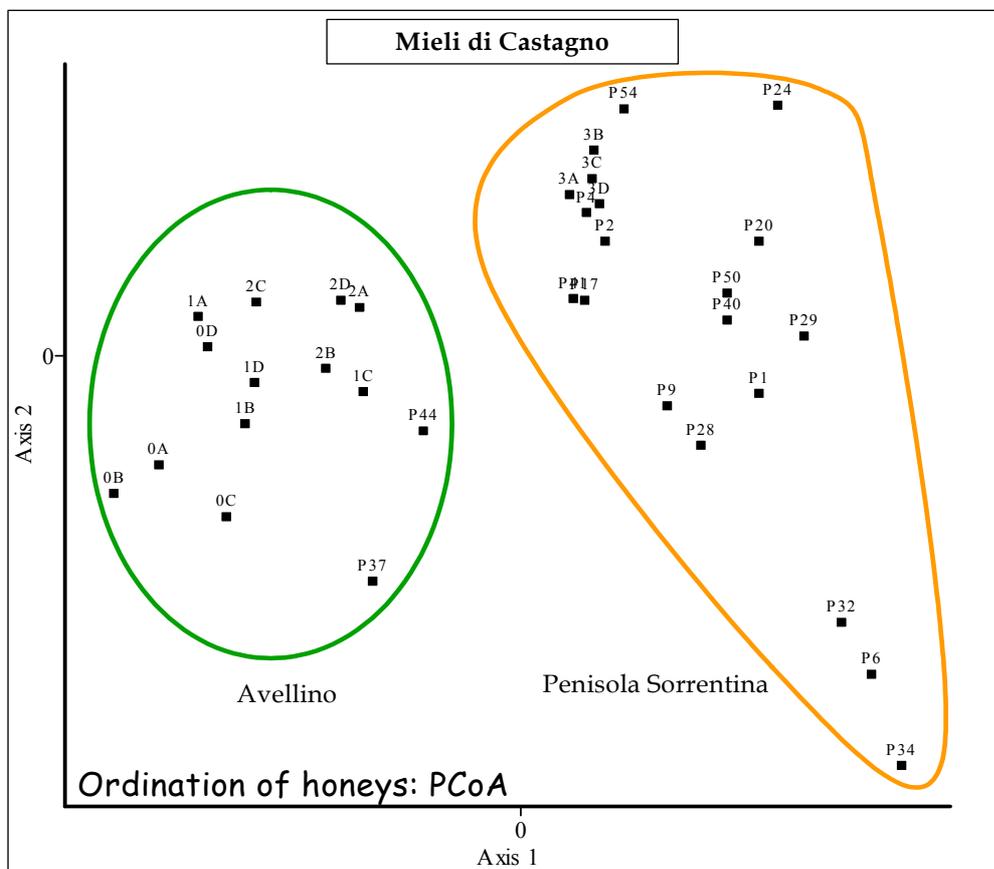


Fig. 4.33: Analisi multivariata: PCoA dei mieli di castagno di Avellino e della Penisola.

Discussioni

Lo studio di caratterizzazione geografica del miele, quindi, al di là del suo interesse scientifico, è indubbiamente molto utile per la sua immediata applicabilità per la stesura di un disciplinare di produzione e per la lotta alle frodi collegate alla commercializzazione di tale prodotto (Sancho *et al.*, 1991; Bogdanov *et al.*, 1997).

Vari metodi analitici sono stati proposti per la determinazione dell'origine geografica dei mieli basati per esempio sulla composizione degli amminoacidi (Davies, 1975; Gilbert *et al.*, 1981), il contenuto minerale (Latorre *et al.*, 1999 e 2000); combinati ad analisi multivariata dei dati. Tuttavia ad oggi nessuno di questi procedimenti è risultato concretamente utilizzabile per questo scopo e l'analisi dei pollini rimane l'unico metodo in grado di legare il miele alle specie nettariifere da cui proviene (Ruoff *et al.*, 2006). La sola analisi melissopalinoologica, però, non è in grado di fornire risultati prontamente fruibili per la determinazione dell'origine geografica di un campione. L'analisi statistica multivariata essendo un mezzo oggettivo e ripetibile è sicuramente un metodo valido, da sviluppare ulteriormente.

Allo stato attuale nel territorio della Penisola Sorrentina e Costiera Amalfitana, tra i mieli potenzialmente eleggibili per un marchio di qualità in quanto con caratteristiche di pregio, produzioni abbondanti e ripetibili negli anni, si segnalano: il miele di agrumi e il miele di castagno.

I risultati di questa ricerca sono attualmente oggetto di valutazione per redigere un disciplinare di produzione dei mieli della Penisola Sorrentina-

Amalfitana ai fini di una richiesta di marchi di origine (IGP o DOP) ai sensi del
Reg. CE 2081/92 (Certificazioni IGP e DOP dei prodotti agricoli ed alimentari).

CONCLUSIONI GENERALI

Le conoscenze sulla biologia del microgametofito rivestono una notevole importanza nel settore molto specifico della ricerca finalizzata alla possibilità di crescita e riproduzione delle Piante nello Spazio. Lo studio della biologia dei pollini spesso è considerato appartenente al campo delle scienze di base, mentre ci sono alcuni aspetti che hanno valenza applicata molto spiccata. Un uso diffuso delle analisi sulla vitalità de polline potrebbe infatti aiutare a risolvere una serie di problematiche produttive di diverse specie di interesse agro-alimentare.

Per quanto riguarda i pollini ed il miele, è stato più volte sottolineato che le analisi palinologiche sono molto costose perché richiedono un analista di provata capacità ed esperienza e tempi di esecuzione lunghi. Queste considerazioni hanno condotto vari gruppi di ricerca verso lo sviluppo di metodi alternativi, ma ad oggi nessuno di essi è in grado di fornire informazioni dirette sulle caratteristiche botaniche dei campioni. Il lavoro da noi svolto in questi anni, in questo settore, si basa sulla conferma della validità del metodo melissopalinologico ed è stato finalizzato al superamento dei suoi aspetti limitanti. In questa ottica sono stati sviluppati nuovi metodi di analisi morfologiche dei pollini attraverso l'uso del microscopio a fluorescenza che facilita il riconoscimento di dettagli diagnostici e velocizza le analisi palinologiche riducendone i costi. Contestualmente, si stanno provando nuovi approcci di elaborazione con metodi di statistica avanzata dei risultati in quanto si ritiene che il dato palinologico racchiuda una grande quantità di informazioni che al momento sono poco o niente utilizzate per caratterizzare le

produzioni di un'area geografica e determinare una relazione biunivoca tra un miele e il suo territorio di origine. L'impostazione sperimentale anche dello studio di valutazione delle caratteristiche produttive di un'area costituisce un esempio metodologico in grado di fornire, in poco tempo, risultati direttamente utilizzabili per l'identificazione delle caratteristiche dei prodotti di qualità e la stesura di disciplinari di produzione.

I risultati finora ottenuti sono promettenti e nel prossimo futuro si intende continuare a sviluppare questa linea di ricerca applicata al campo delle produzioni agro-alimentari.

BIBLIOGRAFIA

AA. VV. 1992 - Frutticoltura generale. Torino, Edizioni Reda.

AA. VV. 1993 - Frutticoltura speciale. Torino, Edizioni Reda.

Accorsi C.A., Bandini Mozzanti M., Piana A. 1989 - Apporto dell'analisi pollinica periodica del nettare per la conoscenza dell'origine botanica di un miele dell'area di Montecalderaro (BO), *Informatore Botanico Italiano*. 21: 302-307.

Adams R.J., Smith M.V. 1981 - Seasonal pollen analysis of nectar from hive and extracted honey. *Journal Apicultural Research*. 20 (4): 243-248.

Ampuero S., Bogdanov S., Bosset J.O. 2004 - Classification of unifloral honeys with an MS-based electronic nose using different sampling modes: SHS, SPME, and INDEX. *Eur. Food Res. Technol.* 218: 198-207.

Aronne G. 1999 - Effects of relative humidity and temperature stress on pollen viability of *Cistus incanus* and *Myrtus communis*. *Grana*. 38: 364-367.

Aronne G. 2005 - Le interazioni fiori - api: indagini sperimentali. In: *L'ape, il territorio e la biologia fiorale. Studi finalizzati al miglioramento della produzione di miele in Cilento*. A cura di Giovanna Aronne. S.B.R. Portici. 53-58.

Aronne G., Cavuto D., Eduardo P. 2001 - Classification and counting of fluorescent pollen using an image analysis system. *Biotechnic and Histochemistry*. 76(1): 35-40.

- Aronne G., De Micco V., Ariaudo P., De Pascale S. 2003 - The effect of uni-axial clinostat rotation on germination and root anatomy of *Phaseolus vulgaris* L. *Pl Bios.* 137(2): 155-162.
- Aronne G., De Micco V., Scala M. 2006 - Effects of relative humidity and temperature conditions on pollen fluorochromatic-reaction (FCR) of *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae). *Protoplasma.* 228: 127-130.
- Aronne G., Scala M. 2004 - Fluorescent staining procedure to identify pollen grains. XI International Palynological Congress. Granada. Spain. 4-9 July.
- Baldini E. 1979 - *Arboricoltura*. Bologna, Clueb.
- Barez J.A.G., Garcia Villanova R.J., Garcia S.E. Pala T.R., Paramas A.M.G., Sanchez J.S. 2000 - Geographical discrimination of honeys through the employment of sugar patterns and common chemical quality parameters. *Eur. Food Res. Techn.* 210: 437-444.
- Baroni E. 1986 - *Guida botanica d'Italia*. Cappelli, Bologna.
- Battesti M., Goeury C. 1992 - Efficacité de l'analyse mélitopalynologique quantitative pour la certification des origines géographique et botanique des miels: le model des miels corses. *Rev. Paleobo. Palynol.* 75: 77-102.
- Benedetti S., Mannino S., Sabatini A.G., Marcazzan G.L. 2004 - Electronic nose and neural network use for the classification of honey. *Apidologie.* 35: 397-402.
- Bhojwani S.S., Bhatnagar S.P. 1974 - *The Embryology of Angiosperms*. Vikas Publishing House PVT LTD Delhi, India.
- Bianco V.V., Pimpini F. 1990 - *Orticoltura*. Bologna, Patron Editore.

- Blasi C., Filibeck G., Frondoni R., Rosati L., Smiraglia D. 2004 - The map of the vegetation series of Italy. *Fitosociologia*. 41: 21-25.
- Bogdanov S., Martin P. 2002 - Honey Authenticity: a Review. Swiss Bee Research Centre. 20 pp.
- Bogdanov S., Martin P., Lullmann C. 1997 - Harmonized methods of the European Honey Commission. *Apidologie extra iussue*. 1-59.
- Boucher A., Hidalgo P.J., Thonnat M., Belmonte J., Galan C., Bonton P., Tomczak R. 2002 - Development of a semi-automatic system for pollen recognition. *Aerobiologia*. 18:195-201.
- Bucher E., Kofler V., Vorwohl G., Zieger E. 2004 - Lo spettro pollinico dei mieli dell'Alto Adige. Agenzia Provinciale per la protezione dell'ambiente e la tutela del lavoro. 676 pp.
- Buchner R. and Weber M. 2000 - PalDat - a palynological database: Descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. <http://www.paldat.org/>.
- Buonanno M., Aronne G. 2005 - Lo studio delle aree mellifere del Cilento attraverso l'uso dei sistemi informativi geografici (G.I.S.). In: *L'ape, il territorio e la biologia florale. Studi finalizzati al miglioramento della produzione di miele in Cilento*. A cura di Giovanna Aronne. S.B.R. Portici. 37-40.
- Ciampolini F. & Cresti M. 1981 - Atlante dei principali pollini allergenici presenti in Italia. Università di Siena. 190 pp.

- Cordella C., Faucon J.P., Cabros-Bass D., Sbirrazzuoli N. 2003 – Application of DSC as a tool for honey floral species characterization and adulteration detection. *J. Therm. Anal. Calorim.* 71: 279-290.
- Cotte J.F., Casabianca H., Giroud B., Albert M., Lheritier J., Grenier-Loustalot M.F. 2004 – Characterization of honey amino acid profiles using high-pressure liquid chromatography to control authenticity. *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (5): 1342-1350.
- Dafni A., 1992 – Pollination ecology - a practical approach. IRL Oxford University Press, Oxford.
- Davies A.M.C. 1975 – Amino acid analysis of honeys from eleven countries. *J. Apic. Res.* 14 (1): 29-39.
- Davies A.M.C., Radovic B., Fearn T., Anklam E. 2002 – a preliminary study on the characterisation of honey by near infrared spectroscopy. *J. Near Infrared Spectrosc.* 10 (2): 121-135.
- De Leonardis W., Longhitano N., Zizza A. 1989 – Relazione tra ambiente floristico e analisi pollinica dei mieli iblei (Sicilia Sud-Orientale). *Apicoltura* 5: 73-118.
- De Leonardis W., Piccione V., Zizza A. 1986 – Flora melissopalinoologica d'Italia. Chiavi di identificazione. *Bollettino Accademia Gioenia di Scienze Naturali* 19:309-474.
- De Micco V., Scala M., Aronne G. 2006 - Effects of simulated microgravity on male gametophyte of *Prunus*, *Pyrus* and *Brassica* species. *Protoplasma* 228: 121-126.

- Dedolph R.R., Dipert M.H. 1971 - The physical basis of gravity stimulus nullification by clinostat rotation. *Pl. Physiol.* 47: 756-764.
- Erdtman G. 1954 - Pollen Analysis. *Chronica Botanica Company*. Stockholm. 239 pp.
- Erdtman G. 1971 - Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms. *Hafner Publishing Company*. New York. 553 pp.
- Ferrazzi P. 1986 - Analisi melissopalinologica di mieli della Valle D'Aosta. *Boll. Acc. Gioenia Sci. Nat.* 19 (338): 67-93.
- Ferrazzi P. 1992 - Caratterizzazione dei mieli: analisi melissopalinologiche. *Apicoltore moderno*. 83: 129-138.
- Ferrazzi P., Medrzycki P. 2002 - Primo approccio di applicazione della Cluster Analysis alle analisi melissopalinologiche per la determinazione dell'origine geografica dei mieli. *Symposium "Il ruolo della ricerca in apicoltura"* Bologna, pp. 223-228.
- Fiori A. 1970 - Nuova flora analitica d'Italia. *Edagricole*, Bologna.
- Floris I., Satta A. 2002 - Approach to the diagnostic of the botanical and geographical origin of honey. *Symposium "Il ruolo della ricerca in apicoltura"* Bologna, pp. 229-234.
- France I., Duller A.W.G., Lamb H.F., Duller G.A.T. 1997 - A comparative study of model based and neural network based approaches to automatic pollen identification. *British Machine Vision Conference* 1:340-9.

- Frenguelli G., Mincigrucci G. 1994 - Guida al riconoscimento dei principali pollini aerodiffusi. In: Monitoraggio Aerobiologico in Emilia Romagna. Regione Emilia Romagna. 30: 21-60.
- Gilbert J., Shepherd M.J., Wallwork M.A., Harris R.G. 1981 - Determination of the geographical origin of honeys by multivariate of gas chromatographic data on their free amino acid content. J. Apic. Res. 20 (2): 125-135.
- Gonzales Paramas A.M., Gomez Barez J.A., Garcia Villanova R.J., Rivas Pala T., Ardanuy Albajar R., Sanchez J. 2000 - Geographical discrimination of honeys by using mineral composition and common chemical quality parameters. J. Sci. Food and Agr. 80: 157-165.
- Goodacre R., Radovic B.S., Anklam E. 2002 - Progress toward the rapid nondestructive assessment of the floral origin of European honey using dispersive Raman spectroscopy. Appl. Spectrosc. 56 (4): 521-527.
- Halstead T.W., Dutcher F.R. 1987 - Plants in Space. Ann. Rev. Plant Physiol. 38: 317-345.
- Herrero M.P., Johnson R.R. 1980 - High temperature stress and pollen viability of maize. Crop Science. 20:796-800.
- Heslop-Harrison J. 1968 - Wall development within the microspore tetrad of *Lilium longiflorum*. Can. J. Bot. 46: 1185-1192.
- Heslop-Harrison J., Heslop-Harrison Y. 1970 - Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intra-cellular hydrolysis of fluorescein diacetate. Stain Tech. 45: 115-120.

- Heslop-Harrison J., Heslop-Harrison Y., Knox R.B., Howlett B. 1973 - Pollen wall proteins: "gametophytic" and "sporophytic" fractions in the pollen wall of the Malvaceae. *Ann. Bot.* 37:403 - 412.
- Hesse M. & Waha M. 1989 - A new look to the acetolysis method. *Plant Systematic and Evolution.* 163:147-152.
- Hesse M. 1981 - Pollenkitt and viscin threads: their role in cementing pollen grains. *Grana.* 20: 145-152.
- Hill J.P., Lord E.M. 1987 - Dynamics of pollen tube growth in the wild radish *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae). II. Morphology, cytochemistry and ultrastructure of transmitting tissue and path of pollen tube growth. *Am J Bot* 74: 988-997.
- Hormaza J.I., Herrero M. 1992 - Pollen selection. *Theor Appl Genet* 83: 663-672.
- Hormaza J.I., Herrero M. 1994 - Gametophytic competition and selection. In: Williams EG, Clarke AE, Knox RB (eds.) *Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants.* Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 372-400.
- Hoson T., Kamisaka S., Masuda Y., Yamashita M., Buchen B. 1997 - Evaluation of the three-dimensional clinostat as a simulator of weightlessness. *Planta* 203: S187-S197.
- Hyde, H.A. and Williams, D.A. 1944 - The right word. *Pollen Science Circular.* No. 8 p. 6.

- Kandasamy M.K., Nasrallah J.B., Nasrallah M.E. 1994 - Pollen-pistil interactions and developmental regulation of pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Development* 120: 3405-3418.
- Knox R.B. 1984 - The pollen grain in Johri BM *Embryology of angiosperms*. Springer, New York, pp 197-271.
- Langford M., Taylor G.E., Flenley J.R. 1990 - Computerized identification of pollen grains by texture analysis. *Rev. Palaeobotan. Palynol.* 64: 97-203.
- Latorre M.J., Pena R., Garcia S., Herrero C. 2000 - Authentication of Galician (NW Spain) honeys by multivariate techniques based on metal content data. *Analyst.* 125:307-312.
- Latorre M.J., Pena R., Pita C., Botana A., Garcia S., Herrero C. 1999 - Chemometric classification of honeys according to their type. II. Metal content data. *Food Chem.* 66 (2): 263-268.
- Longhitano N., Pistorino M.P., Schembra C.P., Scibilia C.M. 1986 - Primo contributo alla determinazione dell'origine botanica e geografica dei mieli dell'Etna. *Boll. Acc. Gioenia Sci. Nat.* 19 (328): 33-40.
- Louveaux J., Maurizio A., Vorwohl G., 1978 - Methods of melissopalynology. *Bee World* 59: 139-157.
- Mandrioli P. & Puppi G. 1978 - Pollini allergenici in Emilia-Romagna. *Collana Studi e Documentazione n.13, Dip. Ambiente e territorio R.E.R., Bologna, 79 pp.*
- Mascarenhas J.P. 1990 - Gene activity during pollen development. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41:317-338.

- Mateo R., Bosh-Reig F. 1998 - Classification of Spanish unifloral honeys by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugar and pH. *J. Agric. Food Chem.* 46 (2): 393-400.
- McGregor S.E. 2003 - Insect Pollination of Cultivated Crop Plants. In: <http://gears.tucson.ars.ag.gov/book/> Originally published by USDA, 1976.
- Montenegro G., Gomez M., Avila G. 1992 - Importancia relativa de especies cuyo polen s utilizado por *Apis mellifera* en el area de la Reserva Nacional de los Ruiles, VII Region de Chile. *Acta Botanica Malacitana.* 17: 167-174.
- Moore P.D., Webb J.A., Collinson M.E. 1991 - Pollen Analysis. Second Edition. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 216pp.
- Mulcahy D.L. 1984 - Manipulation of gametophytic populations. In: Langel W, Zeven AC, Hogenboom NG (eds.) Efficiency in plant breeding. Proc 10th Congr Eucarpia. Pudoc, Wageningen, The Netherlands, pp 167-175.
- Munera Giner M., Garcia Perez R. 2004 - Palynology and spectrometry of monofloral Honeys from region de Murcia. *Polen.* 14: 110-111.
- Musgrave M.E. 2002- Seeds in Space. *Seed Sci Res* 12: 1-16.
- Nalda M.J.N., Yague J.L.B., Calva J.C.D., Gomez M.T.M. 2005 - Classifyng honeys from the Soria Province of Spain via multivariate analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2): 311-319.
- Nepi M., Franchi G.G., Pacini E. 2001 - Pollen hydration status at dispersal: cytophysiological features and strategies. *Protoplasma.* 216: 171-180.

- Ogden E.C., Raynor G.S., Hayes G.V., Lewis D.M., Haines J.H. 1974 - Manual for sampling airborne pollen. Hafner Press, N. Y. 182 pp.
- Ortiz Valbuena A. 1987 - El empleo del análisis de Cluster en la denominación geográfico-botánico de las mieles. Aplicación a las mieles de la Alcarria-Galicia (España). Cuadernos de Apicultura 3: 8-10.
- Ottaviano E., Mulcahy D.L. 1989 - Genetics of angiosperm pollen. *Adv. Genet.* 26: 1-64.
- Ottaviano E., Sari-Gorla M., Mulcahy D.L. 1990 - Pollen selection: efficiency and monitoring. In: Ogita ZI, Market CL (eds.) *Isozymes: structure, function, and use in biology and medicine.* Wiley-Liss, New York, pp 575-588.
- Pacini E. 1990 - Harmomegathic characters of pteridophyta spores and spermatophyte pollen. *Plant Syst. Evol. Suppl.* 5: 53-59.
- Pacini E., Franchi G.G., Hesse M. 1985 - The tapetum: its form, function, and possible phylogeny in Embryophyta. *Pl. Syst. Evol.* 149:155 - 185.
- Pena Crecente R., Herrero Latorre C. 1993 - Pattern recognition analysis applied to classification of honeys from two geographical origins. *J. Agr. Food. Chem.* 41: 560-564.
- Persano Oddo L., Belligoli P., Carini A., Morgia C., Piazza M.G., Pulcini P. 2001 - Studi di caratterizzazione geografica: I mieli del Lazio. In: *Miele e territorio: Guida alla valorizzazione del miele attraverso le denominazioni di origine.* Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria. 157-170.
- Persano Oddo L., Sabatini A.G., Accorti M., Colombo R., Marcazzan G.L., Piana M.L., Piazza M.G., Pulcini P. 2000 - I mieli uniflorali Italiani. Nuove schede

di caratterizzazione. Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria, Ministero per le Politiche Agricole e Forestali. 108pp.

Piana L. 1997 - L'origine botanica dei mieli e le frodi collegate. *Lapis-Rivista di apicoltura*. 7: 12-21.

Piana M.L., Persano Oddo L. 2001 - Miele e territorio: Guida alla valorizzazione del miele attraverso le denominazioni di origine. Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria. 321 pp.

Pignatti S. 1997 - *Flora d'Italia*. Edagricole, Bologna.

Priore R., Quaranta M., Valencia Barrera R. 1995 - Nuovo contributo alla caratterizzazione botanica dei mieli delle Marche. *Apicoltura*. 10: 1-9.

Radovic B.S., Goodacre R., Anklam E. 2001 - Contribution of pyrolysis-mass spectrometry (Py-MS) to authenticity testing of honey. *J. Anal. Pyrolysis*. 60 (1):79-87.

Reille M. 1992 - *Pollen et Spores d'Europe et d'Afrique du Nord*. Laboratoire de botanique historique et palinologie URA CNRS. Marseille.

Ricciardelli D'Albore G.C. 1994 - Caratterizzazione dei mieli del Veneto sulla base della qualità e dell'origine geografica. *Ann. Fac. Agr. Perugia*. 48: 457-492.

Ricciardelli D'Albore G.C. 1997 - *Textbook of Melissopalynology*. IITEA Apimondia. Bucarest. 308 pp.

Ricciardelli D'Albore G.C. 1998 - *Mediterranean Melissopalynology*. Università degli Studi di Perugia. 466 pp.

- Ricciardelli D'Albore G.C. 2001 - Studi di caratterizzazione geografica: I mieli del Parco Nazionale dei Monti Sibillini (Italia Centrale). In: Miele e territorio: Guida alla valorizzazione del miele attraverso le denominazioni di origine. Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria. 145-156.
- Ricciardelli D'Albore G.C., Intoppa F. 2000 - Fiori e Api. Edagricole, Bologna. 253 pp.
- Ronneberger O., Schultz E., Burkhardt H. 2002 - Automated pollen recognition using 3D volume images from fluorescence microscopy. *Aerobiologia* 18: 107-115.
- Ruoff K., Luginbühl W., Kunzli R., Bogdanov S., Bosset J.O., Von Der Ohe K., Von Der Ohe W., Amadò R. 2006 - Authentication of the botanical and geographical origin of honey by Front-Face Fluorescence Spectroscopy. *J. Agr. Food Chem.* 54: 6958-6866.
- Ruyters G., Scott T.K. 1997 - Future research in plant biology in space: summary of critical issues and recommendations of the workshop. *Planta*. 203: S211-S213.
- Ryugo K. 1988 - *Fruit Culture: Its Science and Art* New York. John Wiley & Sons.
- Sabatini A.G., Piana M.L., Grillenzoni F.V. 2001 - Studi di caratterizzazione geografica: i mieli dell'Emilia Romagna. In: Miele e territorio: Guida alla valorizzazione del miele attraverso le denominazioni di origine. A cura di Persano Oddo e Piana. Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria. 119-144.
- Salisbury F.B. 1999 - Growing crops for space explorers on the Moon, Mars or in space. *Adv Space Biol Med* 7: 131-162.

- Sancho M.T., Muniategui S., Huidobro J. F. Simal-Lozano J. 1991 - Discriminant analysis of pollen spectra of Basque Country (Northern Spain) honeys. *J. Apicult. Res.* 30: 162-167.
- Sanz S., Perez C., Herrera A., Sanz M., Juan T. 1995 - Application of a statistical approach to the classification of honey by geographic origin. *J. Sci. Food and Agr.* 69: 135-140.
- Scala M. 2005 - La coltivazione del limone sfusato in costiera. Terra del Sole eds. 32 pp.
- Scala M., De Micco V., Aronne, G. 2004a - Multivariate analysis of the accompanying pollen for the determination of the geographical origin of honey. *Polen.* 14: 109.
- Scala M., Aronne G., De Micco V. 2004b - Variability in pollen spectra of chestnut honeys from different sites and years. *Polen.* 14: 403.
- Seijo Coello M.C., Jato M.V., Aira M.J., Iglesias M.L. 1994 - Caratterizzazione pollinica dei mieli di Lugo (Spagna). *Apicoltura* 9: 7-18.
- Terrab A., Valdes B., Diez M.J. 2003 - Pollen analysis of honeys from the Marmora forest region (Morocco). *Grana.* 43: 47-54.
- Terrab A., Vega-Perez J.M., Diez M.J., Heredia F.J. 2002 - Characterization of northwest Moroccan honeys by gas chromatographic-mass spectrometric analysis of their sugar components. *J. Sci. Food Agric.* 82 (2): 179-185.
- Thompson LM. 1975 - Weather variability, climatic change, and grain production. *Science.* 188: 535-541.

- Von Der Hoe K., Von Der Hoe W. 2000 - Celler melissopalynologische Sammlung
CMS. Niedersächsisches Landesinstitut für Bienenkunde, Celle.
- Von Der Hoe W., Persano Oddo L., Piana M.L., Merlot M., Martin P. 2004 -
Harmonized methods of melissopalinology. *Apidologie*. Special issue
35:18-35.
- Von Post, L. 1917 - Om skogsträdpollen i sydsvenska torkmosselagerfolker.
Geologiska Föreningens i Stockholm Förhandlingar 38: 384-390.
- Wheeler R.M., Mackowiak C.L., Stutte G.W., Sager J.C., Yorio N.C, Ruffe L.M.,
Fortson R.E., Dreschel T.W., Knott W.M., Corey K.A. 1996 - NASA's biomass
production chamber: a testbed for bioregenerative life support studies.
Advances in Space Research 18: 215-224.