

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



**FACOLTÀ DI AGRARIA**  
**Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale**

Dottorato di Ricerca in:  
**Valorizzazione e Gestione delle Risorse Agro-forestali**  
XXI Ciclo

**STUDI DI BIOLOGIA RIPRODUTTIVA  
PER LA CONSERVAZIONE DI ALCUNE SPECIE VEGETALI  
DELL'AMBIENTE MEDITERRANEO E PER LA  
VALORIZZAZIONE DI PRODUZIONI ECO-COMPATIBILI**

Candidato: **Dott.ssa. Sara Barbi**

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

Coordinatore: **Ch.mo Prof. Antonio Cioffi**

## SOMMARIO

<b>CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE</b> .....	7
<b>1. 1. BIODIVERSITÀ SU SCALA MONDIALE</b> .....	7
<b>1. 2. LE CATEGORIE IUCN CONSIDERATE</b> .....	10
Specie Minacciate (E) .....	10
Specie Vulnerabili (V) .....	11
Specie Endemiche e Relitte.....	11
Specie Rare (R) .....	12
Specie estinte (X) .....	12
<b>1. 3. DIVERSITÀ IN AMBIENTE MEDITERRANEO</b> .....	13
<b>1.4. BIODIVERSITÀ ED AMBIENTI SENSIBILI</b> .....	14
<b>1. 5. FATTORI DI DISTURBO NEL BACINO DEL MAR MEDITERRANEO</b> .....	15
Attività antropiche.....	15
Scomparsa degli impollinatori .....	15
Introduzione di specie aliene.....	16
<b>1. 6. CICLI RIPRODUTTIVI E SOPRAVVIVENZA DELLE SPECIE</b> .....	17
Fioritura.....	17
Microsporogenesi.....	18
Impollinazione.....	18
Fecondazione.....	20
Macrosporogenesi e Macrogametogenesi .....	21
Embriogenesi.....	21
Formazione dei frutti.....	22
Dispersione.....	22
Germinazione .....	23
Attecchimento delle Plantule .....	24
BIBLIOGRAFIA CAPITOLO 1.....	26
<b>CAPITOLO 2 - SCOPI DELLA TESI</b> .....	32
<b>2. 1. CONSERVAZIONE DELLE SPECIE RARE</b> .....	32
<b>2. 2. PREVISIONE DEGLI EFFETTI DEI CAMBIAMENTI CLIMATICI SULLE SPECIE VEGETALI</b> .....	34
<b>2. 3. APPLICAZIONE AI FINI PRODUTTIVI</b> .....	39
BIBLIOGRAFIA CAPITOLO 2.....	42
<b>CAPITOLO 3 - <i>PRIMULA PALINURI</i> PETAGNA: SPECIE RARA ED ENDEMICA</b> .....	44
<b>3.1. INTRODUZIONE</b> .....	44

3.1.1. Finalità del lavoro .....	44
3.1.2. Descrizione della specie.....	46
3.1.3. Areale di distribuzione della specie .....	46
3.1.4. Caratteristiche edafiche e geografiche delle stazioni.....	47
3.1.5. Stato di conservazione .....	48
3.1.6. Osservazioni sulla vegetazione delle stazioni.....	49
3.1.7. Cariologia e sistematica .....	50
3.1.8. Evoluzione in <i>Primula</i> .....	51
<b>3.2. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>53</b>
3.2.1. Area di studio .....	53
3.2.2. Analisi biometriche .....	56
3.2.3. Analisi degli stadi fenologici .....	58
3.2.4. Analisi al microscopio ottico ed a fluorescenza.....	58
3.2.5. Analisi al microscopio elettronico a scansione .....	59
3.2.6. Analisi funzionali.....	60
<b>3.3. RISULTATI</b> .....	<b>66</b>
3.3.1. Caratteristiche morfometriche ed anatomiche .....	66
3.3.2. Analisi funzionali delle fasi precedenti alla dispersione dei semi .....	73
3.3.3. Analisi funzionali delle fasi successive alla dispersione dei semi .....	81
<b>3.4. DISCUSSIONE</b> .....	<b>91</b>
Forma biologica .....	91
Caratteristiche della foglia .....	94
Caratteristiche del nettario .....	94
Distilia .....	95
Impollinazione.....	96
Caratteristiche morfo-funzionali del polline .....	97
Successo riproduttivo .....	100
Caratteristiche dei semi .....	102
Germinazione .....	104
Caratteristiche dell'ipocotile .....	105
Riproduzione vegetativa.....	107
Erosione genetica nelle piccole popolazioni clonali .....	108
BIBLIOGRAFIA CAPITOLO 3.....	112
<b>CAPITOLO 4 - <i>DAPHNE SERICEA</i> VAHL.</b> .....	<b>126</b>
<b>4. 1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>126</b>
Ambienti mediterranei e biodiversità.....	126
Descrizione della specie.....	127
Distribuzione della specie .....	128
<b>4.2. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>130</b>
Luogo di studio .....	130

Sviluppo e durata dei fiori.....	130
Morfologia fiorale .....	131
Microsporogenesi.....	131
Produzione di polline .....	131
Morfologia e citologia del polline.....	131
Vitalità del polline.....	132
Numero di granuli di polline per antera .....	132
Recettività stigmaticca.....	132
Macrosporogenesi – Fecondazione – Embriogenesi.....	132
Caratteristiche dei nettari .....	133
Analisi del nettare .....	134
Determinazione degli zuccheri nel nettare.....	135
Misurazione del pH del nettare .....	135
Insetti impollinatori.....	135
Prove di impollinazione manuale.....	136
Produzione di fiori e frutti.....	136
Dispersione dei semi .....	136
Vitalità dei semi .....	136
Germinazione dei semi.....	137
Analisi statistica dei dati .....	137
<b>4.3. RISULTATI.....</b>	<b>138</b>
Morfologia del fiore .....	138
Fenologia.....	138
Polline: morfologia, vitalità e produzione.....	140
Recettività stigmaticca.....	141
Macrosporogenesi-macrogametogenesi.....	141
Fecondazione ed Embriogenesi.....	141
Nettario .....	142
Caratteristiche del nettare.....	143
<i>Standing Crop</i> .....	143
Confronto tra “standing crop” e “protected crop”.....	149
Determinazione degli zuccheri del nettare.....	150
Determinazione del pH del nettare.....	150
Produzione di fiori e frutti.....	150
Impollinazione.....	151
Impollinatori diurni .....	151
Impollinatori notturni .....	154
Dispersione.....	154
Vitalità e germinazione dei semi.....	155
<b>4.4. DISCUSSIONE.....</b>	<b>157</b>
Struttura del nettario.....	157

Composizione del nettare.....	158
Produzione di nettare.....	159
Impollinazione.....	161
Dispersione dei semi.....	163
Biologia della conservazione - Conclusioni.....	164
Individuazione della fase critica.....	166
BIBLIOGRAFIA CAPITOLO 4.....	167
<b>CAPITOLO 5 - <i>ARBUTUS UNEDO</i> L.....</b>	<b>172</b>
<b>5. 1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>172</b>
Origine e distribuzione della specie.....	172
Descrizione della specie.....	173
Scopo.....	175
<b>5. 2. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>176</b>
Aree di studio.....	176
Morfologia floreale.....	177
Fenologia.....	177
Recettività dello stamma.....	178
Stima del numero di granuli di polline per antera.....	178
Numero di ovuli per fiore.....	178
Rilascio del polline.....	179
Sostanze di riserva nel polline.....	179
Vitalità del polline durante i diversi stadi fiorali.....	179
Effetto combinato di temperatura ed umidità relativa.....	179
Germinazione del polline.....	180
Ricerca degli agenti impollinatori.....	180
Impollinazione manuale.....	180
Produzione di nettare.....	181
Morfologia del frutto.....	182
Successo riproduttivo.....	182
Esperimento di diradamento.....	182
Produzione dei frutti nell'ambito dell'infiorescenza.....	182
Germinazione dei semi.....	183
<b>5. 3. RISULTATI.....</b>	<b>184</b>
Morfologia floreale.....	184
Numero di granuli di polline, numero di ovuli e P/O.....	185
Sostanze di riserva e dimensioni del polline.....	187
Recettività dello stamma.....	187
Vitalità del polline.....	187
Rilascio del polline.....	189
Germinabilità del polline.....	189
Produzione di nettare.....	190

Ricerca degli agenti impollinatori.....	191
Impollinazione manuale.....	191
Morfologia del frutto e caratteristiche dei semi.....	191
Successo riproduttivo.....	192
Esperimento di diradamento.....	193
Germinazione dei semi.....	194
<b>5. 4. DISCUSSIONE.....</b>	<b>195</b>
Fenologia.....	195
Morfologia florale.....	196
Recettività dello stamma.....	197
Vitalità del polline.....	198
Germinazione del polline.....	199
Sostanze di riserva nel polline.....	200
Impollinazione.....	200
Agenti impollinatori.....	201
Impollinazione manuale.....	202
Successo riproduttivo.....	203
BIBLIOGRAFIA CAPITOLO 5.....	208
<b>CAPITOLO 6 <i>ROBINIA PSEUDOACACIA</i> L. : BIOLOGIA FIORE E PRODUZIONE DI NETTARE DI UNA DELLE PRINCIPALI SPECIE DI INTERESSE APISTICO IN EUROPA.....</b>	<b>217</b>
<b>6.1 INTRODUZIONE.....</b>	<b>217</b>
<b>6. 2. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>219</b>
Biologia florale.....	220
Recettività dello stamma.....	221
Vitalità del polline.....	221
Produzione di polline.....	221
Biometria del fiore.....	221
Flusso nettario.....	222
Determinazione degli zuccheri nel nettare.....	223
<b>6. 3. RISULTATI.....</b>	<b>224</b>
Biologia florale.....	224
Produzione di polline.....	225
Biometria del fiore.....	225
Vitalità del polline e recettività stigmatica.....	225
Flusso nettario.....	225
Composizione del nettare.....	228
<b>6. 4. DISCUSSIONE.....</b>	<b>229</b>
Nettare e miele.....	229
Composizione del nettare.....	230
BIBLIOGRAFIA CAPITOLO 6.....	232

<b>CAPITOLO 7 CITRUS SPP.</b> .....	233
<b>7.1. INTRODUZIONE</b> .....	233
Miglioramento delle produzioni di agrumi, di miele di agrumi e tutela della biodiversità .....	233
Descrizione delle specie .....	234
Miele di agrumi: aree di produzione e caratteristiche organolettiche .....	234
Scopo della ricerca .....	236
<b>7. 2. MATERIALI E METODI</b> .....	237
Confronto tra specie .....	237
Biologia florale.....	237
Flusso nettario.....	237
Confronto tra <i>cultivar</i> di limone .....	239
Composizione del nettare delle 2 varietà di limone .....	239
<b>7. 3. RISULTATI</b> .....	240
Confronto tra specie .....	240
Flusso nettario.....	241
Confronto tra <i>cultivar</i> di limone .....	243
Composizione del nettare delle 2 varietà di limone .....	246
<b>7. 4. DISCUSSIONE</b> .....	247
Situazione attuale e prospettive economiche .....	249
<b>BIBLIOGRAFIA CAPITOLO 7</b> .....	251

## CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE

### 1. 1. Biodiversità su scala mondiale

La diversità biologica o biodiversità, che costituisce l'insieme di geni, specie ed ecosistemi presenti sulla Terra, è il prodotto di centinaia di milioni di anni di evoluzione ed è fondamentale per il funzionamento di tutti gli ecosistemi presenti sul pianeta. I dati disponibili mostrano che le attività umane stanno portando ad una perdita della biodiversità del pianeta e tale tendenza si accentuerà con l'ulteriore incremento della popolazione umana e del conseguente sviluppo economico (Tolba, 1992). Le piante esotiche invasive contribuiscono a ridurre la diversità biologica a livello mondiale. Le vie della migrazione oggi sono infinite: ogni barriera biogeografica è superata infatti con la globalizzazione del commercio e con l'uso dei moderni mezzi di trasporto. L'immissione volontaria o casuale di piante in ambienti diversi da quello di origine impoverisce gli ecosistemi quando i nuovi elementi trovano le condizioni ambientali ottimali per lo sviluppo e la riproduzione; in tal caso, essendo privi di controllo da parte di predatori, parassiti e competitori, spesso prendono il posto delle specie spontanee e si diffondono velocemente, rompendo equilibri ecologici che si sono stabiliti nel corso di centinaia o migliaia di anni. Molte piante, come gli alberi da frutto e da legname, i cereali e i legumi, sono state introdotte in Europa prevalentemente dall'Asia e dall'Africa. Assieme alle piante coltivate sono state diffuse le prime infestanti.

Nel corso degli ultimi secoli, l'espansione delle attività antropiche rapide e spesso incontrollate, è stata associata con l'erosione della biodiversità globale (Mack *et al.*, 2000; Sala *et al.*, 2000, Penuelas & Boada, 2003; Hobbs *et al.*, 2006). L'omogeneizzazione biotica è il processo che porta all'aumento di similarità tra la flora e la fauna di diverse regioni del mondo ed è portata avanti da due fattori principali:

1. Estinzioni locali delle specie più rare attraverso la perdita degli habitat, l'inquinamento o la predazione.
2. Diffusione delle specie aliene in regioni in cui non sono native e che non potrebbero mai aver raggiunto senza l'aiuto dell'uomo.

Spesso il secondo problema può accentuare il primo se le specie invasive competono o



predano quelle native, o modificano il loro habitat in modo da renderlo meno adatto per le specie originali (Olden & Poff, 2003). Sebbene i due processi possano non portare necessariamente all'omogeneizzazione (e potrebbero anche aumentare la diversità su scala locale), numerosi studi in varie parti del mondo hanno mostrato che il risultato netto è spesso un aumento di dominanza delle specie più diffuse, che comporta una maggiore similarità tra le categorie tassonomiche di diverse regioni (Collins *et al.*, 2002; McKinney, 2005; Qian & Ricklefs, 2006, Smart *et al.*, 2006).

La biodiversità è essenziale per diversi motivi: aumenta la resilienza delle comunità nei confronti degli eventi catastrofici, aumenta la capacità degli ecosistemi a far fronte ai cambiamenti climatici e conserva una ricchezza di risorse apprezzate dall'uomo (McGrady-Steed *et al.*, 1997; Naem & Li, 1997; Olden *et al.*, 2005). Questi benefici non nascono solo dalla varietà di specie ma anche da fattori meno evidenti. Entro le specie, la variabilità genetica è fondamentale, mentre tra le specie il numero e la diversità delle interazioni ecologiche potrebbe essere un fattore critico nell'adattabilità e nella produttività degli ecosistemi (Lyons & Schwartz, 2001; Montoya *et al.*, 2006). Questa "complessità ecologica" è difficile da quantificare, sebbene potrebbe essere ugualmente soggetta ai processi di omogeneizzazione biotica.

I processi coinvolti operano sia entro che tra le comunità:

1. A livello intra-comunità si considera la diversità funzionale: la varietà dei ruoli ecologici si realizza entro un ecosistema (Olden *et al.*, 2004).

Un'elevata diversità funzionale è un parametro critico nella resilienza e nell'uso efficiente delle risorse di un ecosistema (Tilman *et al.*, 2004); essa potrebbe anche contribuire ad aumentare la resistenza contro l'invasione da parte delle specie aliene (Levine & D'Antonio, 1999; Pokorny *et al.*, 2005).

2. A livello inter-comunità, la diversità a livello tassonomico e funzionale degli assemblaggi di specie in diversi habitat è un indicatore significativo della qualità ambientale (Lambdon *et al.*, 2008). Gli ecosistemi interagiscono indirettamente, attraverso processi di successione ed effetti di vicinato abiotici (protezione dall'erosione, interazione ed immagazzinamento di acqua piovana in eccesso, etc.) e il mantenimento delle loro specifiche funzioni risiede nella composizione strutturale distintiva. Inoltre esse interagiscono direttamente con le specie animali che si muovono tra gli habitat. I servizi che forniscono (impollinazione, controllo delle malattie, etc.) possono portare benefici a ciascuna comunità visitata e la loro sopravvivenza potrebbe dipendere da una matrice eterogenea di risorse.

La diversità biologica o biodiversità è l'espressione della varietà degli organismi viventi. Elemento chiave del funzionamento della biosfera, la diversità biologica si esprime come diversità genetica, diversità di specie, diversità paesaggistica, diversità degli ecosistemi. In tutto il mondo la conservazione della biodiversità è riconosciuta come un valore universale. Nel 1992 centosettanta paesi hanno firmato la convenzione sulla diversità biologica a Rio di Janeiro, impegnandosi in questo modo a conservare il ricco tesoro della biodiversità sulla Terra. Tale conservazione si rivela un'attività essenziale, non solo per la difesa di interessi umani come l'alimentazione, la salute, l'energia, ma anche per il mantenimento della natura ai fini di uno sviluppo sostenibile. Attualmente nella comunità scientifica c'è un particolare interesse per la conservazione della biodiversità e per il suo ruolo nel mantenimento della funzionalità degli ecosistemi (Fitter *et al.*, 2005). In studi recenti si assume che caratterizzando la diversità si può comprendere e controllare il funzionamento degli ecosistemi e che la capacità di ripresa di un ecosistema in seguito ad un disturbo dipende in parte dal grado di diversità dell'ecosistema (Nannipieri *et al.*, 2003). L'importanza della biodiversità per la funzionalità degli ecosistemi è stata messa in rilievo dal protocollo internazionale di intenti Agenda 21, un documento stipulato in occasione della Conferenza delle Nazioni Unite su Ambiente e Sviluppo, tenutasi a Rio de Janeiro nel 1992. Il documento ha avuto l'obiettivo di promuovere la cooperazione scientifica ed internazionale per una migliore comprensione dell'importanza della biodiversità e delle sue funzioni negli ecosistemi. Il termine "diversità" è stato definito in vari modi (Liesack *et al.*, 1997); negli studi di microbiologia tale termine è spesso utilizzato per descrivere il numero di specie differenti o, in termini molecolari, il numero di differenti sequenze geniche, presenti in un habitat; una misura completa della diversità tiene conto anche della relativa abbondanza di ciascuna componente biotica all'interno della comunità e le funzioni svolte da ciascuna componente (Punkhurst, 1997). La diversità di un sistema comprende, dunque, anche la diversità di funzioni che è caratterizzata dalla ricchezza delle funzioni e dalla omogeneità di espressione di tali funzioni. Infatti le funzioni che avvengono in un ecosistema sono molteplici, ma non sempre tutte vengono svolte con la stessa efficienza. Secondo Loreau e collaboratori (2001) un numero minimo di specie è essenziale per il funzionamento di un ecosistema in condizioni di equilibrio, mentre un maggiore numero di specie è probabilmente necessario per il mantenimento di processi stabili in ecosistemi in continuo mutamento. Il ruolo ecologico della diversità tassonomica è dunque quello di assicurare che, in presenza di perturbazioni, vi siano

comunque delle specie in grado di svolgere determinate funzioni (Bengtsson, 1998). Infatti, maggiore è il grado di biodiversità intra o interspecifica o funzionale di un ecosistema, maggiori saranno la sua tolleranza alle perturbazioni e la sua resilienza (Giller *et al.*, 1997), poiché vi saranno più probabilità che vi siano genotipi o specie che possano svolgere le funzioni di quelli scomparsi.

Per elaborare un programma di tutela della flora è necessario possedere informazioni su due punti fondamentali: quali specie sono in pericolo (censimento) e quali sono le cause di minaccia (valutazione). Soltanto così si possono proporre adeguati interventi. Il risultato di questo lavoro di censimento e di valutazione sono le Liste Rosse che costituiscono, insieme agli atlanti di distribuzione della flora e della fauna, un importante strumento per la conservazione del patrimonio biologico e per l'individuazione degli aspetti di biodiversità che oggi sono più a rischio. Sin dal 1966 l'Unione Internazionale per la Conservazione della Natura aveva iniziato la lunga e difficile catalogazione delle specie vegetali minacciate, ma solo nel 1970 è apparsa una prima pubblicazione con la denominazione *Red Data Book*, seguita poi, nel 1978, da una nuova edizione ampliata. Esse rappresentavano i primi elenchi di specie minacciate su scala mondiale. Nel 1983 il Consiglio d'Europa ha pubblicato *List of rare, threatened and endemic plants in Europe*. Alla realizzazione di questo volume hanno partecipato anche istituzioni e studiosi italiani, e le liste sono state compilate regione per regione. Ma solo nel 1992 è stato pubblicato nel nostro Paese il primo Libro Rosso delle specie vegetali minacciate su tutto il territorio nazionale (Conti F. *et al.*, 1992). In quest'opera sono state segnalate 458 entità in pericolo, il cui grado di minaccia venne valutato a livello nazionale secondo le 5 categorie (Estinta "Ex", Minacciata "E", Vulnerabile "V", Rara "R" ed Indeterminata "I") codificate dalla International Union Conservation Nature (IUCN). In seguito nel 1994 queste categorie sono state rielaborate ed incrementate al fine di permettere una sempre più puntuale valutazione del grado di pericolo a cui le specie sono sottoposte.

## **1. 2. Le categorie IUCN considerate**

### **Specie Minacciate (E)**

Per minacciata si intende un'entità in pericolo d'estinzione, la cui sopravvivenza è improbabile se le cause che ne hanno determinato l'attuale condizione continuano a

sussistere. Include anche quelle entità il cui numero di individui è ridotto a livelli critici o i cui habitat sono stati drasticamente contratti, tanto che esse si trovano in una situazione di immediato pericolo di estinzione.

Tra le specie minacciate si trovano soprattutto quelle la cui presenza sul territorio italiano è limitata ad una o poche stazioni, spesso con popolazioni di pochi individui.

Esempi di queste specie sono: *Abies nebrodensis* (Lojacono) Mattei, *Aquilegia barbaricina* Arrigoni e Nardi, *Bassia saxicola* (Guss) A. J. Scott, *Dianthus morisianus* Valsecchi, *Lamyropsis microcephala* (Moris) Dittrich et Greuter, *Silene hicesiae* Brullo e Signorello e *Silene velutina* Pourret. Alcune specie vanno considerate minacciate in quanto strettamente dipendenti da un tipo di ambiente in via di trasformazione o scomparsa: l'eliminazione dell'habitat determinerebbe anche la scomparsa della specie (*Armeria helodes* Martini et Poldini, *Erucastrum palustre* (Pirona) Vis., *Isoetes malinverniana* Cesati et De Notaris).

### **Specie Vulnerabili (V)**

È considerata vulnerabile un'entità che potrebbe essere inserita nella categoria precedente se non cessano le cause che l'hanno riportata alla situazione attuale. Comprende anche quelle entità le cui popolazioni hanno subito una forte riduzione per eccesso di sfruttamento, distruzione estensiva degli habitat o per altre alterazioni ambientali; entità le cui popolazioni sono state seriamente sfruttate e la cui sopravvivenza non è assicurata; entità con popolazioni ancora abbondanti ma minacciate in tutto il loro areale da gravi fattori avversi. In questo gruppo ci sono: *Cyperus papyrus* L., *Cypripedium calceolus* L., *Eryngium alpinum* L., *Periploca graeca* L., *Primula palinuri* Petagna. Inoltre si trovano specie costiere e legate agli stagni e torbiere quali: *Armeria pungens* (Link) Hoffm. e Link, *Calendula maritima* Guss., *Campanula sabatia* De Notaris, *Caralluma europea* (Guss.) N. E. Br., *Centaurea horrida* Badarò, *Dianthus rupicola* Biv., *Erica sicula* Guss., *Limonium* spp., *Andromeda polifolia* L., *Botrychium* spp. e molte *Carex*, *Cortusa matthioli* L., *Lycopodiella inudata* (L.) Holub, *Oxycoccus oxycoccus* (L.) Adolphi, *Scheuchzeria palustris* L.

### **Specie Endemiche e Relitte**

Poiché le caratteristiche di vulnerabilità da una parte e di endemismo e relittualità dall'altra riflettono criteri di classificazione differenti, si è preferito suddividere le specie secondo il primo criterio, riferendosi a quanto indicato dall'IUCN, inserendo i dati relativi all'altro nel seguente modo: i dati relativi alla relittualità possono essere invece

reperiti nei campi “Motivi di interesse” e/o “Minacce Potenziali”. Il dato scientifico relativo all’endemismo risulta da un’analisi complessiva di tutte le specie considerate.

### **Specie Rare (R)**

Sono quelle che vivono in un’area ristretta, oppure che possono anche esser più o meno diffuse, ma con popolazioni costituite da un modesto numero d’individui. Esse non sono al momento minacciate, ma possono facilmente divenire tali nel caso in cui cambino le condizioni del contesto. Tra queste si possono distinguere varie categorie:

- Specie di cui sono note soltanto 1-2 popolazioni: *Androsace mathildae* Levier, *Centaurea leucadea* Lacaita, *Galium montis-arerae* Merxm. e Ehrend., *Helichrysum montelinasanum* Schmid, *Paeonia peregrina* Miller, *Phagnalon metlesicsii* Pignatti;
- Specie descritte recentemente di cui si conosce un numero ristretto di popolazioni ma che potrebbero venire ritrovate in seguito: *Allium lopadusanum* Bartolo, Brullo e Pavone, *Aquilegia champagnatii* Moraldo, Naldi e La Valva, *Cirsium alpis lunae* Br.-Catt. E Gubell., *Daphne reichsteinii* Landolt e Hauser, *Epipactis tremolsii* Pau., *Pinguicula fiorii* Tammaro e Pace, *Suaeda pelagica* Bartolo, Brullo e Pavone, *Vicia cusnae* Foggi e Ricceri;
- Specie note in letteratura, non osservate nel nostro secolo e ritrovate di recente: *Aster sorrentinii* (Tod.) Lojac, *Viola bertolonii* Pio;
- Specie rarissime in Italia ma più diffuse al di fuori del nostro territorio: *Aurinia leucadea* (Guss.) C. Koch, *Serapias orientalis* ssp. *Apulica* Nelson;
- Specie ritenute rare di cui negli ultimi anni sono stati effettuati nuovi ritrovamenti: *Jonopsidium savianum* (Caruel) Ball ex Arcangeli.

### **Specie estinte (X)**

Un elenco di 15 specie note soltanto per una o poche località italiane, osservate nel passato, ma che non sono state ritrovate durante ricerche recenti viene riportato nel Libro Rosso (Conti, Manzi, Pedrotti, 1992): esse devono essere verosimilmente considerate estinte, anche se una prova certa in questi casi risulta difficile. Fortunatamente si tratta di un numero ridotto di specie e nessuna di queste è endemica, quindi si può sperare che esse si siano conservate almeno al di fuori del nostro territorio ed in qualche caso sarebbe pure possibile pensare ad una reintroduzione, almeno in Orti Botanici. Va osservato che due di queste (*Nepeta italica* L. e *Trifolium latinum* Sebastiani) hanno nomi derivati dal nostro Paese, dove ormai sono distrutte, mentre hanno potuto mantenersi altrove. Come risultato dell’indagine effettuata per la stesura

di questa base di dati, bisogna tuttavia aggiungere *Pilularia minuta* Durier ex Braun, formalmente inclusa tra le vulnerabili e minacciate ma che è stata inutilmente ricercata in tempi recenti, così che essa ormai appare del tutto scomparsa dal nostro territorio.

### **1. 3. Diversità in ambiente mediterraneo**

Nel bioma mediterraneo sono state identificate 48250 specie di piante, circa il 20% delle specie totali del pianeta (Cowling *et al.*, 1996), la maggior parte delle quali si trova nel bacino del mar Mediterraneo, in accordo con la maggior estensione dell'area, della elevata eterogeneità topografica e climatica. Nel bacino del Mediterraneo, infatti, sono state identificate 25.000 specie di piante, di cui più della metà sono endemiche ed alcune delle quali sono a carattere puntiforme.

Il particolare clima presente negli ecosistemi di tipo mediterraneo ha determinato l'evoluzione di una peculiare vegetazione costituita da alberi ed arbusti sempreverdi con accentuata sclerofillia, che consiste nella presenza di foglie rigide, resistenti alla siccità e alla decomposizione. Mentre gli alberi e gli arbusti sclerofilli tollerano l'aridità, le piante erbacee dell'ambiente mediterraneo sopravvivono alla stagione arida attuando una strategia di evitanza: nelle piante erbacee perenni in estate muore la parte epigea e sopravvive solo la porzione ipogea ricca di acqua, dalla quale in inverno o in primavera si sviluppa la biomassa aerea; le piante erbacee annuali invece si riproducono alla fine dell'inverno o in primavera, in estate muoiono dopo aver disperso i semi che meglio resistono alla disidratazione ed alle elevate temperature (Venturelli e Virli, 1995).

Tutto il nostro paese si affaccia al Mediterraneo, tuttavia soltanto le coste occidentali, l'Italia meridionale e le isole hanno carattere di vero mediterraneismo. Questo dipende dal clima che nel bacino mediterraneo è caratterizzato da estate secca e calda che impone alle piante una fase di riposo vegetativo. Invece l'inverno è mite e le nevicate rappresentano un evento abbastanza eccezionale. Questo clima mediterraneo dipende strettamente dalla traiettoria delle perturbazioni atlantiche che portano le precipitazioni sull'Europa.

Nell'ambiente mediterraneo si sono sviluppate le prime forme di civiltà del nostro paese, dalla cultura nuragica, le colonie greche e fenicie, agli Etruschi ed al grande ciclo della civiltà romana. Da quasi 4000 anni l'uomo trasforma questo ambiente ed ampie zone sono ormai degradate in maniera irreversibile. Tuttavia è proprio nel Mediterraneo che noi oggi troviamo la maggiore biodiversità, collegata soprattutto agli ambienti

costieri, alle zone umide, alle alte montagne ed alle isole. Si tratta però di ambienti molto delicati, che possono essere facilmente degradati e che richiedono misure di salvaguardia particolarmente adeguate.

#### **1.4. Biodiversità ed ambienti sensibili**

La biodiversità non è distribuita in maniera uniforme sul territorio. La concentrazione delle specie botaniche e zoologiche dipende sia dalle condizioni attuali dell'ambiente, sia dai fattori storici che hanno modificato queste condizioni durante le ultime ere geologiche. La flora italiana si compone di quasi 6000 specie, tuttavia si hanno aree molto ricche ed altre devastate dalle attività umane. Nella grande varietà di condizioni geografiche e territoriali che caratterizzano il nostro Paese si hanno ecosistemi che includono un'elevata biodiversità ed altri che, soprattutto a causa dell'azione umana, risultano impoveriti. Questi possono essere definiti dei "punti caldi" (*hot spots*) nei quali si concentrano le specie rare o minacciate e di conseguenza i problemi di conservazione. Questi punti caldi fanno riferimento principalmente alle seguenti tipologie di habitat:

- . ambienti costieri (*Primula palinuri* Petagna e *Daphne sericea* Vahl.)
- . pareti rocciose, rupi e pietraie (*Primula palinuri* Petagna)
- . ambienti periglaciali
- . foreste naturali
- . macchia e gariga (*Arbutus unedo* L.)
- . ambienti umidi, soprattutto nella zona mediterranea

## **1. 5. Fattori di disturbo nel bacino del mar Mediterraneo**

### **Attività antropiche**

Gli ecosistemi di tipo mediterraneo sono caratterizzati da fluttuazioni climatiche stagionali che, in futuro, potrebbero essere più instabili a causa di cambiamenti globali. Sono inoltre frequentemente soggetti a variazioni ambientali repentine a seguito di incendi, disboscamenti, pascolamenti intensivi. Tali ecosistemi sono una vera e propria miniera di diversità biologica da preservare e contengono una flora molto ricca di specie, molte delle quali rare o a rischio di estinzione. L'elevata diversità di specie vegetali nel bacino del mar Mediterraneo è legata alla coesistenza di aree a diverso stadio successionale, principalmente la lecceta, la macchia mediterranea e la gariga.

Le peculiarità dell'ambiente mediterraneo sono state determinate anche dalla prolungata presenza dell'uomo. Nel bacino del Mediterraneo il disturbo antropico (deforestazione, pascolo, agricoltura e gestione del fuoco) è cominciato 10.000 fa, con lo sviluppo dell'agricoltura.

Un problema che ha interessato l'ambiente mediterraneo è la diminuzione significativa delle aree naturali o semi-naturali causata dall'urbanizzazione, che ha sottratto molti ettari di suolo alla vegetazione. L'uso del territorio influenza la distribuzione della vegetazione così come i cambiamenti climatici. I paesaggi modificati dall'uomo possono porre serie minacce al ristabilirsi della vegetazione soggetta a cambiamenti climatici, in particolare a causa della frammentazione delle popolazioni autoctone (Duckworth *et al.*, 2000; Hobbs, 2000; Hansen *et al.*, 2001; McCarty, 2001).

### **Scomparsa degli impollinatori**

Non è da escludere che l'impollinazione di piante minacciate (Lista Rossa 2000), viste le scarse informazioni in materia, avvenga in natura ad opera di insetti che, per svariate e differenti cause, non possono più svolgere il proprio ruolo di impollinatore o lo eseguono in modo non efficiente. In questi casi potrebbe essere opportuno prevedere, durante la fioritura, l'introduzione di impollinatori generalisti (per esempio apiari itineranti di api indigene) nelle zone dove sono stati censiti gli esemplari in pericolo; questo per poter prevenire una diminuzione degli individui vegetali scarsamente diffusi, ma non ancora a rischio di estinzione, e per tentare di incrementare il numero degli



esemplari più o meno gravemente minacciati.

Le piante entomofile sono più a rischio delle anemofile perché l'impollinazione è affidata ad un altro organismo vivente le cui popolazioni possono essere soggette a fluttuazioni. Particolarmente a rischio di scomparsa sono quelle piante in cui c'è un rapporto di specie-specificità con l'impollinatore. E' il caso di alcune orchidee la cui sopravvivenza è strettamente legata a quella dell'unico insetto in grado di effettuare l'impollinazione ed è quindi necessario tutelare sia l'habitat della pianta sia quello dell'animale.

### **Introduzione di specie aliene**

Il bacino del mar Mediterraneo è stato caratterizzato dall'introduzione di specie aliene, di cui molte invasive. In esso si trovano circa 250 specie invasive (1% della flora locale), molte meno che negli altri ambienti di tipo mediterraneo. Molte piante invasive del bacino del mar Mediterraneo sono erbacee. Queste, insieme alle poche specie invasive legnose (*Fraxinus ornus* L. e *Robinia pseudoacacia* L.), sono generalmente escluse da molti ambienti naturali (eccetto le rive dei fiumi) ed occupano invece ambienti disturbati, come fossati e margini di strade.

La regione Mediterranea presenta una flora nativa molto diversa e una percentuale elevata di endemismi locali e regionali. Molte specie sono già minacciate dalla degradazione ambientale e dai cambiamenti climatici (Blondel & Aronson, 1999; Gritti *et al.*, 2006). Le piante aliene si stanno diffondendo rapidamente e stanno diventando una crescente minaccia per gli ambienti Mediterranei seminaturali (Hulme, 2004; Lambdon & Hulme, 2006). La riduzione della complessità degli ecosistemi potrebbe rendere ciò più vulnerabile verso ulteriori invasioni ed altri problemi ambientali. Inoltre, McKinney & la Sorte (2007) sostengono che le piante aliene "invasive" hanno un effetto omogeneizzante particolarmente forte, hanno cioè una maggiore probabilità di diffondersi in molte regioni rispetto alle specie autoctone.

Sono possibili 3 effetti del fenomeno di omogeneizzazione, le cui conseguenze sono strettamente connesse (Olden, 2006):

1. L'aumentata similarità tassonomica, importante perché potrebbe potenzialmente ridurre i *pools* locali di variabilità genetica e il *range* di nicchie disponibili per altri livelli trofici entro un dato ambiente (Olden *et al.*, 2004).
2. L'aumentata similarità funzionale, ci si aspetta che gli habitat siano strutturati diversamente per riflettere gli ambienti abiotici, che a loro volta potrebbero generare

ulteriori diversità di nicchia e, a causa della creazione di complementarità tra habitat, l'ambiente potrebbe supportare più specie ed individui attraverso i livelli trofici.

3. La diminuita diversità funzionale entro gli habitat porta alla perdita di nicchie ecologiche e di complessità strutturale, riducendo la capacità di supportare specie che richiedono una varietà di condizioni per portare a termine il loro ciclo vitale danneggiando la resistenza dell'ecosistema (Holway & Suarez, 2006).

Da uno studio di Lambdon *et al.* (2008), emerge che attualmente ci sono molte meno specie invasive rispetto alle autoctone nel Mediterraneo, e che il loro contributo alla diversità tassonomica è basso. Comunque il numero e l'abbondanza di queste specie sta aumentando rapidamente e ci possiamo aspettare maggiori problemi in futuro come è già successo in alcune isole oceaniche (Azzore, Nuova Zelanda), dove le specie aliene sono dominanti in termini tassonomici (Wilson *et al.*, 2000; Silva & Smith, 2004)

### **1. 6. Cicli riproduttivi e sopravvivenza delle specie**

Gli ambienti mediterranei sono caratterizzati da fattori ambientali soggetti a continui cambiamenti.

La riproduzione sessuale è l'unico processo capace di aumentare la variabilità genetica delle progenie e quindi di aumentare la probabilità di produrre nuovi genotipi che meglio si adattano alle modificate condizioni ambientali.

Il corretto funzionamento di tutto il ciclo biologico è fondamentale per garantire la riproduzione sessuale e quindi la conservazione delle specie nel tempo; è sufficiente, infatti, che una sola delle fasi non sia attiva, o che venga in qualche modo alterata, per interrompere il ciclo e quindi impedire la riproduzione.

Il ciclo biologico delle specie a riproduzione sessuale è costituito da diverse fasi, ognuna delle quali molto delicata e vulnerabile.

#### **Fioritura**

L'induzione antogena, ovvero l'acquisizione di una potenzialità morfogenetica di tipo riproduttivo da parte delle gemme neoformate sui germogli, segna l'inizio del ciclo riproduttivo. In questa fase, è fondamentale la quantità di energia radiante di cui l'apparato fogliare può disporre ed il soddisfacimento delle prioritarie esigenze nutrizionali da parte della pianta (Baldini, 1988). E' di notevole importanza un'adeguata disponibilità di metaboliti, soprattutto di carboidrati, da parte delle gemme. La fioritura può non essere indotta se vengono a mancare le condizioni di luminosità, disponibilità idrica e nutrienti necessarie a produrre adeguate quantità di glucidi e azoto. L'inibizione

dell'induzione antogena può essere esercitata dalla presenza di frutti e/o dalla competizione con lo sviluppo di apici vegetativi. Questo effetto sembra non dipendere dalla competizione nutrizionale esercitata da questi organi, bensì dall'azione negativa esercitata da ormoni elaborati in crescente quantità, sia dagli apici dei germogli sia da semi in via di sviluppo (Baldini, 1988). Sempre più spesso per descrivere il fenomeno dell'induzione alla fioritura si fa riferimento al modello multifattoriale che tiene conto di molteplici variabili tra cui alcuni nutrienti ed i fitormoni. Analisi genetiche condotte su specie modello hanno confermato questa teoria. (Boss et al 2004)

### **Microsporogenesi**

Qualora ci sia la differenziazione delle gemme a fiore, e quindi lo sviluppo del fiore con tutti i suoi componenti, nelle antere avviene la microsporogenesi, durante la quale nella parte centrale dei loculi delle antere si differenziano le cellule madri del polline; queste si dividono per meiosi ed ognuna di esse dà origine a quattro cellule aploidi che costituiscono il gametofito maschile, che, a completo sviluppo è formato da una sola cellula che contiene tre nuclei, quello generativo, che al momento dell'impollinazione coordinerà lo sviluppo del tubetto pollinico, e due nuclei spermatici, corrispondenti ai microgameti. E' possibile, però, che in questa fase si inneschino meccanismi di disturbo legati a fattori climatici avversi, come sbalzi termici, gelate precoci o tardive, che agendo a livello della meiosi, impediscono la corretta formazione di granuli pollinici funzionali.

D'altra parte, i processi di meiosi possono essere negativamente influenzati da fattori genetici legati alla presenza di linee sterili, nelle quali mancano condizioni intrinseche necessarie per la realizzazione della microsporogenesi.

### **Impollinazione**

Le Angiosperme possono presentare meccanismi di autoimpollinazione o impollinazione incrociata, anemofila o zoofila. A qualunque tipologia appartenga, l'impollinazione potrebbe essere influenzata negativamente da una serie di fattori.

Nel periodo che va dalla deiscenza delle antere all'arrivo sullo stimma florale, i granuli pollinici sono generalmente esposti a variazioni di temperatura ed umidità. Tali variazioni influenzano la vitalità del polline, essendo le condizioni di umidità e temperatura nel microhabitat del fiore differenti da quelle dell'ambiente esterno. Può accadere che il polline, formato normalmente durante la microsporogenesi, mentre

raggiunge lo stamma per la sua vitalità impedendo che avvenga la fecondazione. (Aronne 1999; Pacini *et al.* 1996, Pacini *et al.* 1997, Nepi *et al.*, 2001).

Nel corso del ciclo riproduttivo di una singola pianta si verifica la distribuzione delle risorse tra l'attività del gineceo e dell'androceo e, nell'ambito di tali risorse, quelle che risultano critiche sono energia, elementi minerali ed acqua (Willson, 1983).

I meccanismi di trasferimento del polline richiedono energia ed è chiaro che le risorse necessarie per la fase di impollinazione debbano essere disponibili nelle quantità necessarie. Dunque il successo riproduttivo può essere significativamente ridotto in quelle piante che vivono in suoli in cui ci sia carenza di nutrienti ed in ambienti in cui ci sia incremento di temperatura. L'impollinazione, e quindi il successo riproduttivo di una pianta che presenta specifici meccanismi di trasferimento del polline, possono essere negativamente influenzati anche da variazioni nella quantità di impollinatori. Tali fluttuazioni sono di frequente causati da modificazioni dell'ambiente oppure da attività umane, come l'uso di pesticidi e trasformazioni di habitat naturali in aree agricole.

Recenti studi empirici hanno mostrato che molte specie vegetali sono "generaliste" per gli impollinatori, cioè attraggono molti potenziali impollinatori (Herrera, 1989; Waser *et al.* 1996; Olsen, 1997; Memmott, 1999; Kandori, 2002). Tuttavia il declino degli impollinatori potrebbe causare l'estinzione di quelle specie che si affidano totalmente ad un'unica specie di pronubo per potersi riprodurre ("specialiste"). Inoltre, molte specie invasive si affidano agli impollinatori per riprodursi e per accrescere le loro popolazioni (Barthell *et al.* 2001); la loro diffusione potrebbe essere influenzata da quanto la loro impollinazione è generalizzata. Talvolta non occorre solo considerare la frequenza di visita degli impollinatori, ma anche la loro efficacia nel portare a termine il servizio di impollinazione (Jhonson & Steiner, 2000).

Comprendere la diversità degli impollinatori può influenzare le decisioni di conservazione e gestione perché la riproduzione delle specie e l'accrescimento delle popolazioni può essere fortemente affetta dalla riduzione nella disponibilità degli impollinatori (Larsen, 2005). Un insieme più ricco e vario di impollinatori può consentire di supplire alla mancanza dell'impollinatore specifico consentendo una efficiente riproduzione.

Un altro fattore responsabile dell'insuccesso riproduttivo è la frammentazione degli habitat; infatti, le popolazioni isolate generalmente producono una minore quantità di semi rispetto a quelle non isolate, a causa di una più bassa variabilità e quantità di insetti impollinatori.

## **Fecondazione**

Affinché avvenga l'impollinazione non è sufficiente che il polline arrivi sullo stimma aderendovi, ma è necessario che questo sia recettivo e che ci sia compatibilità sporofitica, in modo tale che si possano innescare specifici meccanismi di interazione. Lo stimma ha una superficie papillare che dispone di adeguati mezzi per la germinazione del polline; inizialmente le papille sono cellule turgide, dopo la maturazione dello stimma tali cellule degenerano producendo una secrezione (Herrero & Arbeloa, 1989; Herrero & Dickinson, 1979). In molte specie la recettività dello stimma coincide proprio con tale secrezione (Heslop-Harrison & Shivanna, 1977). In alcune specie, in seguito alla germinazione, il tubetto pollinico prima di svilupparsi lungo lo stilo deve attraversare la cuticola stigmaticca. In altre, invece, tale cuticola viene rotta durante il normale sviluppo della recettività stigmaticca (Dickinson & Lawson, 1975) o durante la visita degli insetti impollinatori (Lord & Heslop-Harrison, 1984; Kreitner & Sorenson, 1984; Owens, 1985).

Penetrato nello stilo, il tubetto pollinico si allunga (Herrero & Dickinson, 1980), e tale crescita è accompagnata da un cambiamento del metabolismo, da autotrofico ad eterotrofico (Herrero & Dickinson, 1981); infatti, lo stilo contiene elevate quantità di riserva di amido che scompaiono durante la crescita del tubetto pollinico lungo il tessuto stilare (Herrero & Dickinson, 1979). Herrero, Arbeloa & Gascon (1988) riportano che in alcune specie il periodo che va dall'arrivo del tubetto pollinico alla base dello stilo e la fecondazione è sfasato di qualche giorno. Tale ritardo è dovuto ad una protuberanza placentare, situata alla base dello stilo, che connette questo ultimo con il micropilo ovulare. In corrispondenza di tale protuberanza il tubetto blocca la sua crescita che riprenderà qualche giorno dopo. Le cellule di cui è composta l'invaginazione placentare sono ricche in amido, che all'arrivo del polline, scompaiono determinando la produzione di una secrezione composta da carboidrati e proteine, che il tubo pollinico utilizzerà per continuare il suo accrescimento nell'ovulo. Dunque si evince che per il successo riproduttivo di una pianta è necessario che ci sia contemporaneità tra crescita del tubetto pollinico e maturazione del pistillo (Herrero & Arbeloa, 1989). Da alcuni studi effettuati è emerso che sia nelle specie autocompatibili che in quelle autoincompatibili, non tutto il polline presente sullo stimma germina e che alcuni tubetti pollinici abortiscono sullo stimma o nello stilo (Palser *et al.*, 1989). In realtà sia il genotipo del polline sia l'ambiente possono influenzare la sua vitalità impedendo la germinazione oppure limitando la crescita dei tubetti pollinici (Thompson, 1989).

## **Macrosporogenesi e Macrogametogenesi**

Più o meno contemporaneamente alla microsporogenesi, negli ovuli in via di sviluppo, precisamente nella nocella, si differenzia la cellula madre delle macrospore, macrosporangio, che per meiosi origina quattro macrospore aploidi disposte in fila, di cui generalmente solo una si svilupperà, originando il gametofito femminile, macrogametofito o sacco embrionale, mentre le altre tre degenerano e rimangono schiacciate dall'accrescimento della prima. Il nucleo della macrospora fertile inizia, quindi, a dividersi formando due nuclei che migrano ai poli del sacco embrionale e fra essi si formano dei vacuoli. Questi due nuclei si dividono ulteriormente dando origine a due gruppi di quattro nuclei, uno dal lato micropilare e l'altro dal lato calazale. Infine due nuclei, uno per ciascun gruppo, migrano al centro e si fondono, costituendo un nucleo secondario diploide. Successivamente i nuclei si circondano di una parete e formano sette cellule delle quali le tre presenti nel lato calazale vengono indicate come antipodi, quella centrale contiene il nucleo diploide dell'endosperma secondario, mentre dal lato micropilare una diventa oosfera, gamete femminile, e le altre due sinergidi. Anche qui, come nella microsporogenesi, i processi di meiosi possono essere influenzati da fattori ambientali avversi e da fattori genetici.

Il tubetto pollinico contenente i tre nuclei penetra nell'ovulo attraverso il polo micropilare, arriva nel sacco embrionale rilasciando all'interno i due nuclei spermatici dei quali uno si unisce all'oosfera formando uno zigote diploide e l'altro si fonde con il nucleo secondario diploide, formando un nucleo triploide che darà origine all'endosperma secondario; il nucleo germinativo, invece, si dissolve una volta raggiunto il gametofito femminile (Adams & Greulach, 1979). Il processo di fecondazione viene inibito se si verifica incompatibilità gametofitica, a causa della quale non avviene la fusione dei gameti né la formazione dell'endosperma secondario.

## **Embriogenesi**

Dallo zigote si sviluppa l'embrione, la fase giovanile dello sporofito. Le modalità di sviluppo dell'embrione sono molto diverse nelle varie specie. Dalla prima divisione dello zigote si formano due cellule, una delle quali formerà il sospensore e l'altra l'embrione. Alla fine del suo sviluppo l'embrione sarà formato da una o due foglie embrionali, i cotiledoni, che hanno principalmente la funzione di deposito di sostanze di riserva, e dalla radichetta. Contemporaneamente allo sviluppo dell'embrione, l'endosperma secondario si ingrandisce; in esso si depositano notevoli quantità di

materiali di riserva che serviranno nelle prime fasi della germinazione per la nutrizione della plantula. Mentre nel sacco embrionale si formano l'embrione e l'endosperma secondario, l'intero ovulo si trasforma in seme. I tessuti più esterni della nucella possono diventare in certe specie depositi di materiale di riserva, mentre i tegumenti ovulari si trasformeranno in tegumenti seminali (Romano & Fringuelli, 1982). Tuttavia, a volte è possibile che si verifichi l'aborto dell'embrione, con conseguente formazione di semi in apparenza normalmente sviluppati e conformati, ma praticamente privi dell'embrione e costituiti dal solo involucro. Le cause dell'aborto embrionale possono essere varie: sterilità genetica, generalmente connessa con la riproduzione di piante triploidi, oppure insufficiente afflusso dei metaboliti al seme nel corso della sua formazione. In contrapposizione ai semi privi di embrione si collocano quelli nei quali sono presenti due embrioni. Questi embrioni derivano da ovuli contenenti due ovocellule che vengono entrambe fecondate da due diversi granuli pollinici. Tale fenomeno è una caratteristica genetica influenzata da vari fattori ambientali.

### **Formazione dei frutti**

La formazione dei frutti è dovuta ad interazioni tra condizioni di crescita e caratteristiche morfologiche, oltre che alle attività fisiologiche dell'intera pianta.

Questa fase del ciclo biologico della pianta è connessa all'approvvigionamento di elementi nutritivi e, di qui, all'intercettazione luminosa da parte della pianta (Ho, 1992). Infatti, in generale, l'accrescimento dei frutti è sostenuto principalmente dall'approvvigionamento di fotoassimilati. Di conseguenza, la percentuale di materia organica accumulata nei frutti delle stesse potenziali dimensioni sarà proporzionale alla quantità di fotosintetati accumulati nelle foglie. In altre parole, quando la richiesta di fotosintetati è più alta rispetto alla percentuale fotosintetica, si ha competizione tra i frutti con conseguente abscissione o minore produzione. Tutto questo si manifesta in piante sottoposte a condizioni climatiche e nutrizionali non idonee ai propri fabbisogni.

### **Dispersione**

La dispersione dei semi e dei frutti è un meccanismo mediante il quale i semi vengono allontanati dalla pianta madre per diffondere così la progenie. Nel corso dell'evoluzione sono state selezionate molte modalità di allontanamento dei semi dall'individuo da cui sono stati prodotti, per colonizzare territori sempre nuovi e più favorevoli ed evitare la competizione intraspecifica. La maggior parte dei semi sono dispersi dal vento,

dall'acqua, o trasportati dagli animali; ma alcune specie hanno selezionato dei metodi per lanciare i propri semi a distanza dalla pianta madre (disseminazione balistica).

Gli animali sono i vettori più specializzati ed efficienti; i frutti attraenti, saporiti e carnosì, vengono mangiati da questi agenti, soprattutto dagli uccelli, passano nell'intestino di questi ultimi e vengono liberati con gli escrementi lontano dalla pianta madre. Capita di vedere piantine di alloro e di fico nei posti più inaccessibili: i semi vi sono arrivati con gli escrementi degli uccelli che ne avevano mangiato i frutti. Anche le formiche sono formidabili agenti di dispersione dei semi: raccolgono i semi nei loro formicai per costituirsi delle scorte, ma non sono in grado di mangiarli tutti, così che una parte riesce a germinare lontano dalla pianta di origine. Il metodo è tanto efficiente che alcune specie hanno sviluppato semi con un'appendice rotondeggiante ricca di grassi (elaiosoma) che attira le formiche. L'elaiosoma viene mangiato al posto del seme che così ha possibilità di germinare. Tuttavia ci sono casi in cui, soprattutto quando le condizioni ambientali sono avverse e i vettori biotici sono assenti, i semi non possono venire trasportati lontano dalla pianta madre. Questo può comportare a) la mancanza di germinazione, in quanto i semi non vengono digeriti, b) la competizione che si crea a livello dei semi, c) la morte delle plantule a causa della competizione post-germinazione.

### **Germinazione**

Nel corso della loro formazione, che è contemporanea a quella dei frutti, i semi costituiscono i centri di crescente richiamo dei metaboliti che vi affluiscono sotto l'effetto polarizzante del flusso auxinico proveniente dagli embrioni. Dalle foglie, i carboidrati e le altre sostanze plastiche trasmigrano ai semi e si accumulano nell'endosperma e nei cotiledoni dopo essere stati polimerizzati nei composti di riserva (amido, proteine). Nello stesso tempo l'attività auxinica degli embrioni diminuisce progressivamente e, al termine della fase di fruttificazione, nei semi affluiscono degli inibitori. Questi cambiamenti biochimici inducono una transitoria condizione di latenza fisiologica degli embrioni in virtù della quale, i semi permangono quiescenti, chiamata dormienza, anche se le condizioni ambientali sono favorevoli all'avvio del processo germinativi (Salisbury & Ross, 1999).

L'interruzione della dormienza è accompagnata dalla diminuzione degli inibitori e dall'aumento dei promotori. Una volta superata la quiescenza embrionale, lo sviluppo del seme resta subordinato alla presenza di condizioni di temperatura e di umidità



relativa adeguate e al grado di permeabilità dell'involucro nei confronti dell'acqua, dell'ossigeno e dell'anidride carbonica. Venendo a mancare tali condizioni, il seme non germina. Alcuni semi sono caratterizzati da un tegumento particolarmente duro e compatto e trovano difficoltà a germinare perché l'ossigeno stenta a raggiungere l'embrione o perché l'anidride carbonica proveniente dalla respirazione cellulare ristagna presso l'embrione stesso. Esistono poi semi il cui involucro oppone una elevata resistenza meccanica allo sviluppo dell'embrione e alla conseguente formazione della plantula e deve essere opportunamente trattato per permettere la germinazione (Baldini, 1988).

### **Attecchimento delle Plantule**

La fase di germinazione dei semi è seguita dall'attecchimento delle plantule. Tale fase, insieme a quella della germinazione, rappresenta uno dei problemi che caratterizzano molte specie della flora mediterranea, poiché è frequente il verificarsi di circostanze che ostacolano il successo di questi stadi. Le condizioni necessarie per le fasi di attecchimento sono meno restrittive rispetto a quelle per la germinazione. Qualora la radichetta riesca a penetrare nel suolo, la probabilità di attecchimento della plantula è alta, ma una volta avvenuta la germinazione, la rapidità di penetrazione della radice nel suolo è fondamentale per evitare la disidratazione della plantula. Spesso il passaggio di macchine (Vomocil, Fountaine & Reginato, 1958) ed animali (Thomas, 1960), l'impatto delle gocce di pioggia sul suolo nudo (McIntyre, 1955), determinano modificazioni sulla superficie del suolo provocando la compattazione, la quale riduce la dimensione dei pori ed incrementa la rigidità del suolo. La germinazione del seme che arriva sulla superficie compattata può essere inibita a causa della rimozione di micrositi durante il processo di compattazione del suolo. Dunque, un suolo così fatto, rappresenta una barriera meccanica per la penetrazione della radice durante la fase di post-germinazione. Per penetrare la massa del suolo, la radice deve esercitare una pressione di crescita maggiore della resistenza opposta dal suolo.

Taylor & Gardner (1960) hanno dimostrato che per esercitare una valida pressione di crescita è necessario un buon ancoraggio delle radici al suolo, funzione questa che nelle radichette delle plantule è dovuta ai peli radicali. In un suolo compatto l'ancoraggio diventa più difficoltoso e la possibilità di penetrare attraverso una fessura o punti di debolezza del suolo è ridotta. Ciò provoca una prolungata esposizione delle plantule che possono soccombere durante il periodo di siccità, soprattutto se la radichetta è larga ed a

lenta crescita. L'impatto della pioggia sul suolo è causa di cementazione della superficie che varia con il tipo di suolo, con la velocità d'impatto della pioggia e con il livello di aridità (Peteszval & Lutz, 1957). Ai fini dell'attecchimento delle plantule la cementazione rappresenta un problema meccanico simile alla compattazione.

## BIBLIOGRAFIA CAPITOLO 1

- Adams, J. E. & Greulach, V. A. (1979). *Introduzione alla botanica moderna*. Liguori Editore.
- Aronne, G. (1999). Effect of relative humidity and temperature stress on pollen viability of *Cistus incanus* L. and *Myrtus communis* L. *Grana*, 38: 364-367.
- Baldini, E. (1988). *Arboricoltura generale*. CLUEB Editore, Bologna.
- Barthell J. F., Randall, J. M., Thorp, R. W., Wenner, A. M. (2001). Promotion of seed set in yellow star-thistle by honey bees: evidence of an invasive mutualism. *Ecol. Appl.* **11**: 1870-1883.
- Bengtsson, J. 1998. Which species? What kind of diversity? Which ecosystem function? Some problems in studies of relations between biodiversity and ecosystem function. *Applied Soil Ecology* **10**: 191-199.
- Blondel, J. & Aronson, J. (1999) *Biology and wildlife of the Mediterranean region*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Boss PK, Bastow R.M, Mylne J.S. Dean C. (2004). Multiple pathways in the decision to flower. Enabling, promoting and resetting. *Plant Cell* **16**: 18-31.
- Collins, M.D., Vásquez, D.P. & Sanders, N.J. (2002) Species-area curves, homogenization and the loss of global diversity. *Evolutionary Ecology Research*, **4**, 457-464.
- Conti F., Manzi A., Pedrotti F. (1992). *Il Libro Rosso delle piante d'Italia*. WWF Italia. Roma.
- Cowling, R.M., P.W. Rundel, B.B. Lamont, M.K. Arroyo, and M. Arianoutsou. (1996) Plant diversity in Mediterranean-climate regions. *Trends in Ecology and Evolution* **11**, 362-66.
- Dickinson, H. G. & Lawson, J. (1975). Pollen tube growth in the stigma of *Oenothera organensis* following compatible and incompatible intraspecific pollen. *Proceedings of the Royal Society of London*, B215, 45-62.
- Duckworth, J. W., Salter, R. E. and Khounboline, K. eds. (1999) *Wildlife in Lao P.D.R.: 1999 status report*. Vientiane: IUCN, WCS and CPAWM.
- Fitter AH, Gilligan CA, Hollingworth K, Kleczkowski A, Twyman RM, Pitchford JW and the members of the NERC Soil Biodiversity Programme (2005). Biodiversity and ecosystem function in soil. *Func. Ecol.* (in press).

- Giller, K.E., Beare, M.H., Lavelle, P., Izac, A.-M.N., Swift, M.J., (1997). Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Applied Soil Ecology* **6**, 3-16.
- Gritti, E.S., Smith, B. & Sykes, M.T. (2006) Vulnerability of Mediterranean Basin ecosystems to climate change and invasion by exotic plant species. *Journal of Biogeography*, **33**, 145–157.
- Hansen, J.E., R. Ruedy, Mki. Sato, M. Imhoff, W. Lawrence, D. Easterling, T. Peterson, and T. Karl, (2001). A closer look at United States and global surface temperature change. *J. Geophys. Res.*, **106**, 23947-23963.
- Herrera, C. M. (1989). Pollinator abundance, morphology, and flower visitation rate: analysis of the “quantity” component in a plant-pollinator system. *Oecologia* **80**: 241-248.
- Herrero, M & Arbeloa, A. (1989). Influence of the pistil on pollen tube kinetics in peach (*Prunus persica*). *American Journal of Botany*, **76**: 1441-1447.
- Herrero, M. & Dickinson, H. G. (1979). Pollen-pistil incompatibility in *Petunia hybrida*: changes in the pistil following compatible and incompatible intraspecific crosses. *J. Cell. Sci.*, **36**: 1-18.
- Herrero, M. & Dickinson, H. G. (1980). Pollen tube growth following compatible and incompatible intraspecific pollinations in *Petunia hybrida*. *Planta*, **148**: 217-221.
- Herrero, M. & Dickinson, H. G. (1981). Pollen tube development in *Petunia hybrida* following compatible and incompatible intraspecific mating. *J. Cell. Sci.*, **47**: 365-383.
- Herrero, M, Arbeloa, A., Gascon, M. (1988). Pollen pistil interaction in the ovary in fruit trees. In: M. Cresti, P. Gor, & E. Pacini (Editors), *Sexual Reproduction in Higher Plants*, pp. 297-302.
- Heslop-Harrison, Y., Shivanna, K. R. (1977). The receptive surface of the angiosperm stigma. *Annals of Botany*, **41**, 913-922.
- Ho, L. C. (1982). Fruit growth and sink strength. In C. Marshall & J. Grace (editors), *Fruit and Seed Production: Aspect of Development, Environmental Physiology and Ecology*, Cambridge, University Press, pp. 101-124.
- Hobbs, R.J., Arico, S., Aronson, J.D., Baron, J., Baron, J.S., Bridgewater, P., Cramer, V.A., Epstein, P.R., Ewel, J.J., Klink, C.A., Lugo, A.E., Norton, D., Ojima, D., Richardson, D.M., Sanderson, E.W., Valladares, F., Vilà, M., Zamora, R. & Zobel, M. (2006) Novel ecosystems: theoretical and management aspects of the new ecological world order. *Global Ecology and Biogeography*, **15**, 1–7.

- Hobbs, R.J., Arico, S., Aronson, J.D., Baron, J., Baron, J.S., Bridgewater, P., Cramer, V.A., Epstein, P.R., Ewel, J.J., Klink, C.A., Lugo, A.E., Norton, D., Ojima, D., Richardson, D.M., Sanderson, E.W., Valladares, F., Vilà, M., Zamora, R. & Zobel, M. (2006) Novel ecosystems: theoretical and management aspects of the new ecological world order. *Global Ecology and Biogeography*, **15**, 1–7.
- Holway, D.A. & Suarez, A.V. (2006) Homogenization of ant communities in Mediterranean California: the effects of urbanization and invasion. *Biological Conservation*, **127**, 319–326.
- Hulme, P.E. (2004) The current threat to Mediterranean islands from invasive non-native plants. *10th MEDECOS Conference, Rhodes, Greece* (ed. by M. Arianoutsou and V.P. Papanastasis), p. 127. Millpress, Rotterdam, the Netherlands.
- Jhonson, S. D. & Steiner, K. E. (2000). Generalization versus specialization plant pollination systems. *Trends Ecol. Evol.* **15**: 140-143.
- Kandori, I (2002). Diverse visitors with various pollinator importance and temporal change in the important pollinators of *Geranium thunbergii* (Geraniaceae). *Ecol. Res.* **17**: 283-294.
- Kreitner, G. L. & Soreson, E. L. (1984). Stigma development and the stigmatic cuticle of alfa alfa, *Medicago sativa* L. *Botanical Gazette*, **145**: 436-443.
- Lambdon, P.W. & Hulme, P.E. (2006) Predicting the invasion success of Mediterranean alien plants from their introduction characteristics. *Ecography*, **29**, 853–865.
- Lambdon, P.W. (2008) Why is habitat breadth correlated strongly with range size? Trends amongst the alien and native floras of Mediterranean islands. *Journal of Biogeography*, **35**, 1095–1105.
- Larsen, T. Williams N.M., Kremen, C. (2005). Extinction order and altered community structure rapidly disrupt ecosystem functioning. *Ecol. Lett.* **8**: 538-547.
- Levine, J.M. & D'Antonio, C.M. (1999) Elton revisited: a review of evidence linking biodiversity and invasibility. *Oikos*, **87**, 15–26.
- Lord, E. M. & Heslop-Harrison, Y. (1984). Pollen-stigma interaction in the Leguminosae: Stigma organization and breeding system in *Vicia faba* L. *Annals of Botany*, **54**: 827-836.
- Loreau e collaboratori (2001)
- Lyons, K.G. & Schwartz, M.W. (2001) Rare species loss alters ecosystem function – invasion resistance. *Ecology Letters*, **4**, 358–365.
- Mack, R.N., Simberloff, D., Lonsdale, W.M., Evans, H., Clout, M. & Bazzaz, F.A.

- (2000) Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications*, **10**, 689–710.
- McCarty, G. W., and J. C. Ritchie. (2001). *Influence of sedimentation on carbon storage in agricultural wetlands. Workshop on Wetlands Carbon Cycling, and Future Climate Change*. Organized by The Institute for Wetland Science and Public Policy of the Association of State Wetland Managers Laurel, Maryland.
- McGrady-Steed, J., Harris, J.M. & Morin, P.J. (1997) Biodiversity regulates ecosystem predictability. *Nature*, **390**, 162–165.
- McIntyre, D. S. (1955). Effect of soil structure on wheat germination in a red-brown earth. *Aust. J. Agric. Res.*, **6**: 797-803.
- McKinney, M.L. & La Sorte, F.A. (2007) Invasiveness and homogenization: synergism of wide dispersal and high local abundance. *Global Ecology and Biogeography*, **16**, 394– 400.
- McKinney, M.L. (2005) Species introduced from nearby sources have a more homogenizing effect than species from distant sources: evidence from plants and fishes in the USA. *Diversity and Distributions*, **11**, 367–374.
- Memmott, J. (1999). The structure of a plant-pollinator food web. *Ecol. Lett.* **2**: 276-280.
- Montoya, J.M., Pimm, S.L. & Sole, R.V. (2006) Ecological networks and their fragility. *Nature*, **442**, 259–264.
- Naem, S. & Li, S. (1997) Biodiversity enhances ecosystems reliability. *Nature*, **390**, 507–509.
- Nannipieri P, *et al.* (2003). Microbial diversity and soil functions. *Eur J Soil Sci* **54**:655–670.
- Nepi M., Franchi G.G., Pacini E. 2001 – Pollen hydration status at dispersal: cytophysiological features and strategies. *Protoplasma*. **216**: 171-180.
- Olden, J.D. & Poff, N.L. (2003) Toward a mechanistic understanding and prediction of biotic homogenization. *The American Naturalist*, **162**, 442–460.
- Olden, J.D. & Poff, N.L. (2004) Ecological processes driving biotic homogenization: testing a mechanistic model using fish faunas. *Ecology*, **85**, 1867–1875.
- Olden, J.D. (2006) Biotic homogenization: a new research agenda for conservation biogeography. *Journal of Biogeography*, **33**, 2027–2039.
- Olden, J.D., Douglas, M.E. & Douglas, M.R. (2005) The human dimension of biotic homogenization. *Conservation Biology*, **19**, 2036–2038.
- Olsen, K. M. (1997). Pollination effectiveness and pollinator importance in a population

- of *Heteroteca subaxillaris* (Asteraceae). *Oecologia* 109: 114-121.
- Owens, S. J. (1985). Seed set in *Lotus berthelotii* Masteff. *Annals of Botany*, 55: 811-814.
- Pacini E., Franchi G. G. (1996) Some cytological, ecological and evolutionary aspects of pollination. *Acta Soc. Bot. Pol.* 65: 11–16.
- Pacini E., Franchi G. G., Lisci M., Nepi M. (1997) Pollen viability related to type of pollination
- Palser, B. F., Rouse, J. L. & Williams, E. G. (1989). Coordinated timetables for megagametophyte development and pollen tube growth in *Rhododendron nuttallii* from anthesis to early post fertilization. *American Journal of Botany*, 76(8): 1167-1202.
- Penuelas, J. & Boada, M. (2003) A global change-induced biome shift in the Montseny mountain (NE Spain). *Global Change Biology*, 9, 131–140.
- Petezval, L. & Lutz, J. F. (1957). Soil crusting and some factors affecting it. *Proc. Soil Sci. Soc. Am.*, 21:485-491.
- Pokorny, M., Sheley, R.L., Zabinski, C.A., Engal, R.E., Svejcar, T.J. & Borkowski, J.J. (2005) Plant functional group diversity as a mechanism for invasion resistance. *Restoration Ecology*, 13, 448–459.
- Qian, H. & Ricklefs, R.E. (2006) The role of exotic species in homogenizing the North American flora. *Ecology Letters*, 9, 1293–1298.
- Romano, B. & Fringuelli, G. (1982). *Botanica generale: la procreazione nei vegetali e organografia degli apparati procreativi*. Galeno Editore, Perugia.
- Sala, O.E., Chapin, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Salisbury, F. B. & Ross, C. W. (1999). *Fisiologia vegetale*. Seconda edizione italiana. Zanichelli editore.
- Silva, L. & Smith, C.W. (2004) A characterisation of the non-indigenous flora of the Azores archipelago. *Biological Invasions*, 6, 193–204.
- Smart, S.M., Thompson, K., Marrs, R.H., Le Duc, M.G., Maskell, L.C. & Firbank, L.G. (2006) Biotic homogenization and changes in species diversity across human-modified ecosystems. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 273, 2659–2665.
- Taylor, H. M. & Gardner, H. R. (1960). Use of wax substrates in root penetration studies. *Proc. Soil Sci. Soc. Am.*, 24: 79-81.
- Thomas, A. S. (1960). The trampling animal. *J. Br. Grassld Soc.*, 15: 89-93. Thompson, 1989

- Tilman, D., Knops, J., Wedin, D., Reich, P., Ritchie, M. & Siemann, E. (2004) The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes. *Science*, **277**, 1300–1302.
- Tolba, M. K. (1992). *Saving our Planet*. London: Chapman and Hall.
- Venturelli F., Virli L. (1995). *Invito alla botanica*, Zanichelli.
- Vomocil, J. A., Fountaine, E. R. & Reginato, R. G. (1958). The influence of speed and drawbar load on the compacting effect of wheeled tractors. *Proc. Soil Sci. Soc. Am.*, 22: 178-180.
- Waser, N. M. Chittke, L., Price, M. V., Williams, N. M., Ollerton, J. (1996). Generalization in pollination system, and why it matters. *Ecology* 77: 1043-1060.
- Willson, M. F. (1983). *Plant Reproductive Ecology*. John Wiley and Sons, Toronto.
- Wilson, J.B., Steel, J.B., Dodd, M.E., Anderson, B.J., Ullmann, I. & Bannister, P. (2000) A test of community reassembly using the exotic communities of New Zealand roadsides in comparison to British roadsides. *Journal of Ecology*, **88**, 757–764.



## CAPITOLO 2 - SCOPI DELLA TESI

Le attività svolte nell'ambito del Dottorato di Ricerca in "Valorizzazione e Gestione delle Risorse Agro-Forestali", hanno riguardato lo studio della biologia riproduttiva di alcune piante superiori.

Lo scopo principale di questo lavoro, è stato finalizzare questa tipologia di ricerca, generalmente considerata di base, ad aspetti applicativi:

**1. Aspetto Ecologico-Conservazionistico (Tutela della Biodiversità):** Le conoscenze sulle strategie di adattamento delle singole specie mediterranee sono essenziali non solo per gli studi botanici ed ecologici ma anche per lo sviluppo di modelli di previsione degli effetti dei cambiamenti climatici sugli ecosistemi.

**1.a. Conservazione delle specie rare:** l'individuazione delle fasi critiche del ciclo riproduttivo delle specie rare e/o endemiche permette di attuare interventi di recupero e programmi di azione volti alla loro conservazione

**1.b Previsione degli effetti dei cambiamenti climatici sulle specie vegetali:** conoscere le strategie riproduttive ed individuare eventuali fasi critiche del ciclo riproduttivo (ad esempio studiando l'effetto di alcuni parametri ambientali sui principali processi riproduttivi) di specie attualmente non in pericolo ma che potrebbero diventarlo in vista dei cambiamenti climatici (sviluppando modelli di previsione di crescita di piante individuali e di dinamiche della vegetazione).

**2. Applicazione ai fini produttivi:** gli studi di ecologia riproduttiva possono avere numerose applicazioni pratiche per l'uso sostenibile delle risorse naturali e la valorizzazione delle produzioni locali. Gli esempi di tali applicazioni sono numerosi: vanno dall'uso dell'impollinazione per migliorare le produzioni agro-alimentari agli studi dei potenziali melliferi per migliorare, ottimizzare e valorizzare le produzioni locali di miele.

### **2. 1. Conservazione delle specie rare**

Disporre di informazioni dettagliate di tipo corologico ed autoecologico, soprattutto

per le specie di maggior interesse, come quelle rare e/o minacciate, si rende necessaria per la valutazione delle caratteristiche intrinseche delle popolazioni, la vitalità, l'effettiva capacità riproduttiva o la dinamica di popolazione. In Italia gli studi delle piante rare e/o minacciate condotti sia a fini strettamente scientifici sia conservazionistici, raramente hanno prodotto sintesi ad uso applicativo.

La complessità ecosistemica e la molteplicità dei problemi scientifici, sociali ed economici, connessi alla conservazione della biodiversità hanno stimolato la comunità scientifica internazionale a predisporre strategie globali per la conservazione della natura, che si basano sull'“approccio ecosistemico e multidisciplinare” e sulla politica di gestione modulativa (i.e. *ecosystem and multidisciplinary approach e adaptive management policy*); inoltre sono ormai globalmente adottate tecniche di conservazione *ex situ* alternative e complementari a quelle *in situ* tradizionali, come la raccolta in natura e il mantenimento in coltura di piante vive presso gli Orti Botanici, nonché tecniche di conservazione in Banche del Germoplasma o la propagazione *in vitro*, finalizzate ai recuperi ambientali.

In particolare, la strategia globale per la conservazione delle piante (GSPC: *Global Strategy for Plant Conservation*) indica come obiettivi *target* per il 2010:

1. Lo studio, la conoscenza e la documentazione della diversità delle specie vegetali (*status* di conservazione, Liste Rosse IUCN) a livello globale e regionale (*biogeographical approach*);
2. La conservazione della diversità, con la salvaguardia della maggior parte delle specie di piante e delle aree in cui vivono, considerando prioritari i *taxa* ed i relativi *habitat*-minacciati ed in pericolo di estinzione;
3. L'uso sostenibile delle risorse derivanti dalla diversità vegetale;
4. La promozione dell'educazione, del rispetto per la natura, la sensibilizzazione dell'opinione pubblica e dei politici;
5. La formazione tecnico-professionale;
6. La creazione di Reti internazionali per lo scambio delle conoscenze.

Preliminare e di fondamentale importanza per le ricadute applicative è la definizione di tre classi principali di operazioni di conservazione, riconducibili nell'ambito delle “traslocazioni” (*translocation*), intese come movimento di organismi viventi da un'area ad un'altra:

1. Introduzioni: collocamento di specie al di fuori dell'areale originario in un habitat appropriato, nella medesima area ecogeografica o zona fitoclimatica;

2. Reintroduzioni: azioni nell'areale storico distributivo della specie, estirpata o estinta per cause naturali o antropiche;
3. Rafforzamenti: incremento del numero di individui di una popolazione esistente con individui conspecifici.

Il numero sempre crescente di discutibili interventi di “conservazione” ed i conseguenti possibili danni agli ecosistemi naturali (si pensi ad esempio al caso delle introduzioni di piante esotiche ed invasive) ha portato allo sviluppo ed alla fissazione di principi generali e strategie operative, che vanno introdotte anche nel nostro paese e adattate alla situazione locale.

Le strategie di protezione delle specie rare e vulnerabili si limitano spesso ad individuare le popolazioni esistenti ed a limitare l'impatto antropico sulle stazioni in cui esse sopravvivono attraverso interventi di tutela degli ambienti, come quelli che realizzano presso i Parchi e le Riserve Naturali. Questi interventi di tutela sono necessari ma non sufficienti per garantire la sopravvivenza a lungo termine di queste specie.

La carenza di studi di autoecologia e biologia riproduttiva di molte specie a rischio potrebbe ridurre, fino a vanificare, la finalità di questi provvedimenti di protezione.

Le conoscenze sulle strategie riproduttive delle specie d'interesse sono essenziali per lo sviluppo di modelli di previsione di crescita di qualsiasi specie e di dinamiche della vegetazione, lo sono ancora di più per le specie rare o vulnerabili.

## **2. 2. Previsione degli effetti dei cambiamenti climatici sulle specie vegetali**

Il Ventesimo secolo è stato soggetto al più forte *trend* di riscaldamento dell'ultimo millennio con un incremento di temperatura di circa 0,6 °C (Jones *et al.* 2001). Si prevede che i futuri aumenti di temperatura oscilleranno tra 0,1 e 0,4 °C per decade in Europa (IPCC 2001), un aumento che non ha precedenti nella storia recente (Huntley, 1991).

Una delle conseguenze prevedibili derivanti dal cambiamento climatico è il movimento delle piante verso maggiori altitudini e latitudini dal momento che il clima al quale esse sono adattate si è spostato. Attualmente ci sono evidenze che stanno avvenendo cambiamenti nella distribuzione di alcune specie vegetali (Walther *et al.* 2002; Parmesan & Yohe, 2003; Walther, 2003). Aumenti significativi di altitudine sono stati riportati in Alaska (Lyod & Fastie, 2003), Scandinavia (Kullman, 2002), sulle Alpi (Grabherr *et al.* 1994) e nella regione mediterranea (Penuelas & Boada, 2003; Sanz-

Elorza *et al.* 2003), così come l'avanzare latitudinale della copertura arbustiva artica (Sturm *et al.* 2001).

Quando si confronta la velocità delle migrazioni delle specie del passato, la rapidità dell'attuale cambiamento climatico potrebbe potenzialmente rendere molte specie incapaci di seguire il clima al quale sono attualmente adattate (Davis & Shaw, 2001); un effetto che può essere estremizzato dalla frammentazione dell'habitat a causa delle attività umane (Honnay *et al.* 2002). Ciò che potrebbe derivare è un rapido ed universale aumento del rischio di estinzione (Thomas *et al.* 2004). Le migrazioni che si possono realizzare potrebbero differire tra le diverse specie e di conseguenza potremmo assistere alla formazione di comunità di piante diverse in risposta ai cambiamenti climatici (Walther *et al.* 2002; Walther, 2003). Queste comunità sono evidenti nei resti fossili poiché gli assemblaggi delle specie non hanno analoghi moderni.

La variabilità del clima in anni diversi è un fenomeno normale, anche in assenza di cambiamenti climatici a lungo termine. Molte specie tollerano questa variabilità a breve termine attraverso la plasticità fenotipica. Comunque, oltre il punto nel quale gli individui (e quindi le specie) sono in grado di tollerare i cambiamenti climatici, cambiamenti nella distribuzione e nell'evoluzione sono inevitabili (Lynch & Lande, 1993). Le evidenti migrazioni delle piante nel passato dimostrano che questo punto è già stato superato per molte specie.

Possono avvenire risposte diverse al clima, non solo tra popolazioni presenti nell'areale delle specie ma anche tra individui della stessa popolazione. Si possono verificare significative separazioni di individui che si trovano in micro siti adiacenti con diverse condizioni climatiche poiché possono variare le temperature e lo stato di umidità del suolo. Sebbene la differenziazione nell'ambito della popolazione possa essere promossa dal basso tasso di incrocio in queste specie, il flusso genico tra i micro siti (attraverso il trasferimento dei semi) può avvenire. La differenziazione delle popolazioni varia con il clima nello spazio e nel tempo come conseguenza della selezione naturale che opera sull'attecchimento delle plantule.

Sebbene la variazione genetica legata al clima possa essere presente, in molte popolazioni naturali, questo non indica necessariamente che sia avvenuto l'adattamento alle nuove condizioni climatiche.

La potenzialità di una popolazione di adattarsi ai cambiamenti del clima sarà in parte governata dalla durata di vita media degli individui e dall'età nella quale questi raggiungono la maturità riproduttiva. Se tutte le altre cose sono mantenute uguali, le

piante annuali si adatteranno più velocemente all'ambiente che cambia a causa del loro più breve tempo di generazione. Il tempo di adattamento delle specie con un lungo periodo di generazione e un lungo ciclo vitale sarà maggiore per una serie di motivi. La maturità riproduttiva ritardata ridurrà il numero di generazioni che si possono stabilire durante ciascun periodo di tempo, mentre la maggiore durata di vita (e quindi un minore *turnover*) di individui ridurrà le opportunità di stabilimento dei nuovi genotipi all'interno delle popolazioni esistenti (Savolainen *et al.* 2004). Per le popolazioni che mostrano scarsa potenzialità di adattamento ai cambiamenti climatici *in situ*, il flusso genico da popolazioni in aree più calde nel *range* della specie, sarà di fondamentale importanza nel consentire l'adattamento alle loro nuove condizioni (Billington & Pelham, 1991). Per molte specie, comunque, il flusso genico tra popolazioni potrebbe essere criticamente ridotto a causa degli effetti della frammentazione degli habitat; così in queste specie, l'adattamento al clima in cambiamento potrebbe essere ancora minore (Savolainen *et al.* 2004).

In una popolazione soggetta al cambiamento climatico, la risposta più rapida degli individui sarà di tipo fenotipico (Bradshaw, 1965). Nelle generazioni successive, la selezione naturale che agisce soprattutto durante l'attecchimento della pianta porterà ad un certo grado di adattamento, supponendo che esista variazione genetica per i tratti sottoposti a selezione all'interno della popolazione (Bradshaw, 1991).

Le prime risposte delle specie ai cambiamenti climatici saranno quindi di tipo fenotipico e legati ai cambiamenti genetici adattativi. La migrazione comporta la dispersione fisica dei propaguli (semi, frammenti di piante) e l'attecchimento di nuove popolazioni in territori precedentemente non occupati. La selezione naturale agirà sulla diversità dei propaguli per filtrare quelli che sono meno adattati alle condizioni del nuovo sito (Davis & Shaw, 2001). Con il riscaldamento del clima, gli individui di una popolazione tenderanno a spostarsi verso altitudini e latitudini maggiori, seguendo il loro optimum climatico. Così la migrazione avverrà in tutto il *range* della specie nella forma di propaguli e di polline, non solo come risultato dell'espansione e della riduzione dei margini del *range*. Comunque affinché una specie vegetale possa migrare attraverso un paesaggio, è necessario che le zone in cui questa si trova siano ben connesse per permettere il flusso genico tra le popolazioni (attraverso la dispersione del polline e dei propaguli). Dove gli habitat sono frammentati, soprattutto a causa delle attività umane, anche il *range* della specie risulta frammentato e di conseguenza viene aumentato l'isolamento genetico delle loro popolazioni (Williams *et al.*, 2003). La frammentazione

dell'habitat pone specifiche minacce alla popolazione attraverso fattori genetici come gli aumenti nella deriva genetica e negli incroci, insieme alla potenziale riduzione nel flusso genico dalle popolazioni vicine. (Young *et al.* 1996). Questi fattori, insieme a fattori demografici come sistemi di accoppiamento alterati e cambiamenti nel comportamento degli impollinatori, possono portare alla riduzione della *fitness* degli individui ed aumentare il rischio di estinzione della popolazione (Young *et al.* 1996). L'isolamento delle popolazioni è una caratteristica di molte comunità che si trovano in ambienti naturali isolati, come isole, ecosistemi alpini, dove la migrazione tra popolazioni è assente o estremamente ridotta (Krajick, 2004).

La frammentazione degli habitat ed il conseguente isolamento delle popolazioni, pone seri problemi per le specie soggette a rapidi cambiamenti climatici, dal momento che popolazioni isolate diffuse nel *range* della specie possono essere lasciate fuori dal loro spazio climatico ottimale.

I futuri scenari climatici non prevedono soltanto un aumento medio delle temperature globali ma anche un aumento nella frequenza di eventi climatici estremi. Questo richiederà agli individui di possedere una plasticità quasi perfetta, tollerando tutti i cambiamenti nel clima senza apparenti costi di *fitness* (DeWitt *et al.*, 1998). Se la popolazione contiene una considerevole variabilità per i tratti che determinano la risposta della specie al clima (sia genetici che plastici), è probabile che la popolazione mostri una maggiore tolleranza ai cambiamenti climatici (in termini di *fitness* della pianta, Rehfeldt *et al.*, 1999). Senza il flusso genico tra popolazioni vicine, ci sarà poco rifornimento di variabilità genetica (Davis & Shaw, 2001). Il rapido riscaldamento diminuirà la diversità genetica entro le popolazioni oltre alla diminuzione di quei *loci* direttamente coinvolti nel determinare la risposta della specie al clima.

Nelle specie ad ampia distribuzione e con popolazioni bene connesse, una riduzione nella variabilità genetica entro la popolazione contribuirà, probabilmente, all'estinzione della popolazione, ma è meno probabile che venga minacciata l'esistenza dell'intera specie. Le conseguenze, per le specie rare, e per quelle che si trovano in habitat isolati (per es. le specie delle alpi), potrebbero essere più severe, perché le loro popolazioni potrebbero essere meno numerose e meno ben connesse o trovarsi in regioni geografiche più limitate. Per molte di queste specie, anche quando vengono fatti tentativi per mantenere le dimensioni della popolazione, il cambiamento climatico, da solo, può avere effetti deleteri riducendone la *fitness* (Lynch & Lande, 1993). La combinazione della riduzione della *fitness* e nella diversità può essere catastrofica e portare

all'estinzione della popolazione localmente o su ampia scala (Gilpin & Soulé, 1986).

Il clima è un fattore chiave che determina la distribuzione di una specie e i cambiamenti climatici drastici o comunque con una decisa tendenza selettiva (aumento progressivo delle temperature) portano la specie a migrare verso zone in cui si riesca a ripristinare l'*optimum* termico.

Il problema nasce laddove l'isolamento delle popolazioni non ne consente la migrazione e dove la variabilità genetica non offre la possibilità di selezionare i genotipi più adatti a sopravvivere ed adattarsi alle mutate condizioni climatiche.

Il Mediterraneo emerge come una delle aree più sensibili ai possibili cambiamenti climatici futuri. Secondo i modelli più recenti, infatti, la zona mediterranea vedrà un riscaldamento maggiore della media globale (specialmente in estate), un sensibile aumento delle ondate di calore ed una marcata diminuzione delle precipitazioni (IPCC, 2007). Per il bacino del Mediterraneo gli scenari parlano di un abbassamento del livello medio delle precipitazioni, secondo diverse previsioni, tra il 30 e il 40% (Giorgi *et al.*, 2004) o, secondo altri autori, fino al 70% (Raisanen *et al.*, 2004). L'effetto combinato di temperature superiori e precipitazioni ridotte favorirà l'occorrenza di episodi di ondate di calore e siccità (Schar *et al.*, 2004). Le previsioni sul rischio di eventi estremi (*storminess*) riguardano l'intera Europa.

Attualmente, gli ecosistemi mediterranei sono caratterizzati da variazioni stagionali di luce, temperatura, disponibilità idriche e nutritive del suolo. Questi cambiamenti sono considerati fattori limitanti per lo sviluppo delle piante.

Le temperature più alte si verificano, inoltre, nel periodo in cui le precipitazioni sono scarse creando situazioni di aridità molto forte proprio nel periodo in cui la domanda evapo-traspirativa è maggiore.

Nell'ambiente mediterraneo i meccanismi messi in atto dalle piante per affrontare il periodo di aridità estiva possono essere ricondotti a due principali strategie di adattamento: "Evitare" o "Tollerare" il periodo in cui le condizioni sono avverse.

Strategie basate sulla capacità di evitare i periodi di stress sembrano essere adottate con successo da molte specie arbustive mediterranee che mettono in atto, e completano, processi dispendiosi dal punto di vista energetico, come la fioritura, la fruttificazione e la formazione di nuovi germogli, durante la primavera: prima che lo stress idrico intervenga e limiti la fotosintesi e la respirazione.

La presenza negli arbusteti mediterranei di specie che apparentemente non soffrono per l'aridità, tanto da continuare a sviluppare nuovi germogli ed a riprodursi durante l'estate,

è stata interpretata come un tipo specifico di tolleranza. Queste ultime specie presentano un ciclo riproduttivo adattato all'interazione con gli animali, con fioritura primaverile e fruttificazione autunnale per permettere in modo specifico l'impollinazione e la dispersione dei semi.

Lo stesso habitus delle specie poliennali dipende dall'ambiente in cui si trovano a vivere. A tale proposito è riconosciuto da molti che in un ambiente come quello mediterraneo le piante si siano adattate allo stress da carenza idrica assumendo l'*habitus* di sclerofille sempreverdi o attraverso il dimorfismo stagionale.

Per quanto riguarda la rigenerazione degli individui a seguito di fenomeni di disturbo quali il pascolo o l'incendio, le specie della macchia mediterranea reagiscono ancora una volta separandosi in due gruppi principali comunemente noti come *seeders* e *resprouters*. Le specie che appartengono al primo gruppo formano un elevato numero di semi, sacrificando la pianta madre che soccombe e affida la ricolonizzazione del suolo dopo il disturbo alle nuove plantule. In contrapposizione ci sono i *resprouters* che, dopo il disturbo, si rigenerano vegetativamente utilizzando le risorse accumulate nelle radici. Questo dualismo nel tipo di risposta a fenomeni di stress, che si riscontra in specie che normalmente colonizzano gli stessi ambienti, può essere collegato alla loro origine biogeografica e temporale.

Le specie "tipicamente mediterranee" sono piante che adottano una strategia vitale di tipo *r* caratteristica di ambienti instabili e indice di condizioni estreme di conquista rapida ma provvisoria. Il secondo gruppo comprende invece specie non autoctone, ma di origine tropicale o subtropicale ed elementi oloartici o euroasiatici; queste sono specie che mettono in atto strategie di tipo *K*, caratteristiche di ambienti stabili in cui ciascuna specie può massimizzare la sua capacità di autoregolazione e competizione.

Possono essere considerati realmente adattati all'ambiente mediterraneo solo gli elementi autoctoni, mentre le altre specie non presentano i caratteri di un vero adattamento pur riuscendo a sopravvivere in questi ecosistemi. Queste ultime, più di altre potrebbero risentire degli effetti dei cambiamenti climatici globali; pertanto, studiare l'attuale livello del loro successo riproduttivo e l'effetto dei singoli fattori climatici su alcune fasi chiave del loro ciclo vitale è utile per formulare scenari di previsione.

### **2. 3. Applicazione ai fini produttivi**



Gli studi sulle caratteristiche fiorali delle specie spontanee, condotti nell'ambito di questa attività di dottorato di ricerca, non sono finalizzati unicamente alla conservazione della specie, ma anche per l'uso sostenibile delle risorse naturali e la valorizzazione delle produzioni locali.

Una parte consistente della biodiversità degli ambienti naturali è data senza dubbio dalla componente entomatica. Le interazioni che si instaurano tra l'entomofauna forestale e l'ecosistema possono essere negative qualora si verificano danni temporanei o ciclici alle specie vegetali arboree ed arbustive oppure svolgere un ruolo fondamentale sia con l'attività riequilibratrice esplicata dagli antagonisti naturali nei confronti degli insetti dannosi sia dall'azione pronuba svolta da molte specie di apoidei, in particolare la nota ape domestica *Apis mellifera* contribuisce in modo determinante alla conservazione delle biocenosi forestali in quanto, dalla loro attività, dipende la riproduzione, la propagazione e l'evoluzione delle piante entomofile (specie che si affidano agli insetti per la dispersione del polline al fine di garantire la riproduzione). Esiste un legame imprescindibile tra piante entomofile ed api. E' stato confermato, infatti, che il degrado degli ecosistemi porta ad una drastica diminuzione degli apoidei e parallelamente alla scomparsa di molte specie vegetali che, per l'impollinazione, dipendono esclusivamente da questi. Inoltre la ricchezza per numerosità e diversità delle specie pronube contribuisce a definire lo "stato di salute" di un ambiente, dalla cui stabilità si può dedurre anche il grado di salubrità per l'uomo (Floris *et al.*, 1998; Porrini *et al.*, 1998).

Le api rappresentano anche un'importante risorsa economica attraverso l'esercizio dell'apicoltura. Un alveare contiene fino a 50.000 insetti, ed ogni volta che un'ape esce dall'alveare impollina un centinaio di fiori, «lavoro» che produce reddito. Le api sono in grado di sfruttare al meglio le risorse (flussi nettariiferi, resiniferi e polliniferi) che annualmente sono disponibili dalle diverse fioriture arboree, arbustive ed erbacee dell'ambiente forestale. La quantità e la qualità di nettare che una pianta è in grado di secernere dipende da svariati fattori sia interni che esterni alla pianta. Il raggio d'azione di un'ape bottinatrice è ampio generalmente intorno ai 3 km anche se in condizioni particolari può essere di gran lunga più elevato. Il parametro che misura la quantità di nettare che una pianta è in grado di produrre si chiama "potenziale mellifero" ed esprime appunto "la quantità teorica di miele (in Kg) che da essa si può ottenere in condizioni ottimali nel corso di una fioritura considerando un'estensione di superficie pari ad un ettaro".

Il “potenziale mellifero” è importante qualora si voglia indagare e studiare la flora di interesse apistico e rappresenta uno dei parametri essenziali. L’importanza pratica risiede non solo nell’individuare la capacità riproduttiva di una data specie botanica ma anche nell’individuazione dei tempi e delle condizioni tecniche migliori per lo sfruttamento del flusso nettario in un determinato areale. È opportuno, in prospettiva di uno sfruttamento adeguato delle risorse nettario di un determinato territorio, la redazione di uno studio appropriato sulle secrezioni nettario al fine di una prima ed essenziale valutazione dell’interesse apistico delle specie presenti. A livello regionale, lo studio della secrezione nettario rappresenta un approccio di base per la valutazione dell’interesse apistico delle specie coltivate e spontanee.

Una parte delle attività di ricerca di biologia riproduttiva svolte nell’ambito di questo dottorato è stata condotta in questo scenario ed è stata finalizzata alla determinazione delle caratteristiche nettario di importanti specie apistiche.

## BIBLIOGRAFIA CAPITOLO 2

- Billington, H.L. & Pelham, J. (1991). Genetic variation in the date of budburst in Scottish birch populations: Implications for climate change. *Funct. Ecol.*, **5**, 403–409.
- Bradshaw, A.D. (1991). Genostasis and the limits to evolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.*, **333**, 289–305.
- Davis, M.B. & Shaw, R.G. (2001). Range shifts and adaptive responses to quaternary climate change. *Science*, **292**, 673–679.
- DeWitt, T.J., Sih, A. & Wilson, D.S. (1998). Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends Ecol. Evol.*, **13**, 77–81.
- Floris I., Acciaro M., Lentini A., Ortu S., Prota R., Satta A., (1998). Entomofauna pronuba e utilizzazione dell'ambiente. - Atti XVIII Congr. naz. it. Entomologia, Matera 21-26 giugno 1998.
- Gilpin, M.E. & Soule', M.E. (1986). Minimum viable populations: the processes of species extinctions. In: *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity* (ed. Soule', M.E.). Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 19–34.
- Grabherr, G., Gottfried, M. & Pauli, H. (1994). Climate effects on mountain plants. *Nature*, **369**, 448.
- Honnay, O., Verheyen, K., Butaye, J., Jacquemyn, H., Bossuyt, B. & Hermy, M. (2002). Possible effects of habitat fragmentation and climate change on the range of forest plant species. *Ecol. Lett.*, **5**, 525–530.
- Huntley, B. (1991). How plants respond to climate change – migration rates, individualism and the consequences for plant communities. *Ann. Bot. (Lond.)*, **67**, 15–22.
- in six angiosperm species. *Ann. Bot.* **80**: 83–87.
- IPCC (2001). *Climate Change 2001: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jones, P.D., Osborn, T.J. & Briffa, K.R. (2001). The evolution of climate over the last millennium. *Science*, **292**, 662–667.
- Krajick, K. (2004). All downhill from here? *Science*, **303**, 1600–1602.
- Kullman, L. (2002). Rapid recent range-margin rise of tree and shrub species in the Swedish Scandes. *J. Ecol.*, **90**, 68–77.
- Lynch, M. & Lande, R. (1993). *Evolution and extinction in response to environmental*

- change. In: *Biotic Interactions and Global Change* (eds Kareiva, P.M. & Kingsolver, J.). Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA, pp. 234–250.
- Lloyd, A.H. & Fastie, C.L. (2003). Recent changes in treeline forest distribution and structure in interior Alaska. *Ecoscience*, **10**, 176–185.
- Parmesan, C. & Yohe, G. (2003). A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature*, **421**, 37–42.
- Penuelas, J. & Boada, M. (2003) A global change-induced biome shift in the Montseny mountain (NE Spain). *Global Change Biology*, **9**, 131–140.
- Porrini C., Radeghieri P., Romagnoli F., Versari S., (1998). I pronubi selvatici come indicatori della biocomplexità ambientale. Atti XVII Congr. Naz. it. Ent., Maratea 21-26 giugno 1998.
- Rehfeldt, G.E., Ying, C.C. & Hamilton, D.A. (1999). Genetic responses to climate in *Pinus contorta*: Niche breadth, climate change, and reforestation. *Ecol. Monogr.*, **69**, 375–407.
- Sanz-Elorza, M., Dana, E.D., Gonzalez, A. & Sobrino, E. (2003). Changes in the high-mountain vegetation of the central Iberian Peninsula as a probable sign of global warming. *Ann. Bot. (Lond)*, **92**, 273–280.
- Savolainen, O., Bokma, F., Garcia-Gil, R., Komulainen, P. & Repo, T. (2004). Genetic variation in cessation of growth and frost hardiness and consequences for adaptation of *Pinus sylvestris* to climatic changes. *For. Ecol. Manag.*, **197**, 79–89.
- Schar, P., Fasi, M., Jessberger, R. (2004). SMC1 coordinates DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Res* **32**: 3921-3929.
- Sturm, M., Racine, C. & Tape, K. (2001). Climate change: increasing shrub abundance in the arctic. *Nature*, **411**, 546–547.
- Thomas, C.D., Cameron, A., Green, R.E., Bakkenes, M., Beaumont, L.J., Collingham, Y.C. et al. (2004). Extinction risk from climate change. *Nature*, **427**, 145–148.
- Walther, G.R. (2003). Plants in a warmer world. *Perspect. Plant. Ecol.*, **6**, 169–185.
- Walther, G.R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T.J.C. et al. (2002). Ecological responses to recent climate change. *Nature*, **416**, 389–395.
- Williams, B.L., Brawn, J.D. & Paige, K.N. (2003). Landscape scale genetic effects of habitat fragmentation on a high gene flow species: *Speyeria idalia* (Nymphalidae). *Mol. Ecol.*, **12**, 11–20.
- Young, A., Boyle, T. & Brown, T. (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol. Evol.*, **11**, 413–418.

## CAPITOLO 3 - *Primula palinuri* Petagna: SPECIE RARA ED ENDEMICA

### 3.1. INTRODUZIONE

#### 3.1.1. Finalità del lavoro

Questo studio si inserisce nella tematica relativa alla conservazione delle specie rare ed endemiche, ai fini della tutela della biodiversità.

La Biodiversità non è un fenomeno recente, ma è il frutto di 3 miliardi e mezzo di anni di evoluzione: è un patrimonio di valore inestimabile, un'eredità naturale da conservare, dal momento che garantisce la sopravvivenza della vita sulla Terra.

La perdita di specie ha raggiunto livelli tali da assumere carattere di emergenza e da richiedere strategie globali di conservazione, sancite nella Convenzione Internazionale sulla Diversità Biologica (CBD), adottata nel 1992 a Rio de Janeiro e ratificata in Italia nel 1994 (L. 124/94). Entro il 2050 almeno 100.000 delle circa 300.000 specie di piante superiori viventi sulla Terra potrebbero estinguersi, un migliaio in Italia ( IUCN 2003). A livello locale le strategie di conservazione devono trovare effettiva attuazione per contrastare la tendenza in atto e quindi anche il ruolo degli ecologi è di fondamentale importanza per rendere operative ed efficaci le politiche e le strategie di conservazione della biodiversità, sia *in situ* sia *ex situ*.

Le strategie di protezione delle specie rare e vulnerabili si limitano spesso ad individuare le popolazioni esistenti ed a limitare l'impatto antropico sulle stazioni in cui esse sopravvivono. La carenza di studi di autoecologia e biologia riproduttiva di molte specie a rischio potrebbe ridurre, fino a vanificare, la finalità di questi provvedimenti di protezione, soprattutto in vista dei cambiamenti climatici a cui si prevede di andare incontro.

*Primula palinuri* Petagna rappresenta uno dei più rari endemismi del nostro Paese. La distribuzione attuale di questa specie è molto limitata e confinata ad un piccolo lembo costiero del Tirreno meridionale compreso tra Campania, Basilicata e Calabria, da Palinuro fino a Capo Scalea. In particolare tutte le stazioni campane rientrano nel Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano che l'ha anche scelta come simbolo del Parco stesso.

La particolarità biogeografica e l'ampiezza limitata e frammentata del suo areale fanno di *P. palinuri* una specie la cui conservazione è regolata da regimi di tutela sia in ambito regionale che comunitario. Secondo le categorie della IUCN, viene inserita nella categoria Vulnerabile (AA. VV, 2000) e si ipotizza che possa essere un relitto sopravvissuto attraverso la glaciazione del Quaternario in ristrette zone, dove si trova attualmente.

Nonostante il suo stato di conservazione, la sua rarità e la sua localizzazione in un'area protetta (Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano), fino ad ora sono stati condotti pochi studi su questa specie e le informazioni disponibili sulla sua autoecologia e biologia riproduttiva sono scarse.

Molte specie vegetali sono a rischio di estinzione a causa della distruzione dell' habitat derivante da azioni dirette o indirette dell'uomo (Falk & Holsinger, 1991).

Le specie endemiche aventi una distribuzione limitata sono particolarmente a rischio dal momento che il numero delle loro popolazioni è spesso basso e la loro perdita si traduce in una significativa riduzione del numero di individui che rimangono.

Sebbene la protezione degli habitat sia normalmente considerata di principale importanza nella conservazione di specie a rischio, il mantenimento di un notevole livello di variabilità genetica entro la specie è essenziale per permetterle di rispondere alle pressioni selettive imposte dalle malattie e facilitare l'adattamento ai futuri cambiamenti ambientali (Barrett & Kohn, 1991; Holsinger & Gottlieb, 1991 ; Scaal, Leverich & Rogstad, 1991). Quindi gli interventi di tutela sono necessari ma non sufficienti per garantire la sopravvivenza a lungo termine delle specie rare. Il sistema riproduttivo è uno dei fattori chiave che determinano l'abbondanza, la distribuzione e la diversità genetica degli organismi. Nelle piante rare, endemiche e ad areale limitato, i sistemi riproduttivi assumono particolare importanza dal momento che operano su di un numero limitato di individui/popolazioni.

Conoscere le strategie riproduttive delle specie d'interesse è essenziale per lo sviluppo di modelli di previsione di crescita di piante individuali e di dinamiche della popolazione, in particolar modo per le specie rare ed endemiche come *Primula palinuri* Petagna.

La finalità di queste ricerche durate tre anni (2006-2008) è di fornire dati concreti sulla reale capacità di sopravvivenza della specie (a medio e lungo termine) attraverso lo studio dei principali processi riproduttivi sia in campo che in laboratorio, cercando di individuare quelli che sono attualmente i "punti critici" nel suo ciclo riproduttivo e

quelli che potrebbero essere gli effetti di alcune variabili ambientali (in previsione dei cambiamenti climatici globali) sui processi riproduttivi di questa specie rara ed endemica. Gli effetti delle variazioni dei più importanti fattori ambientali su specifiche caratteristiche morfo-funzionali saranno valutate attraverso una serie di esperimenti di laboratorio in ambiente controllato.

Dall'elaborazione complessiva di tutti i dati raccolti si cercherà di individuare quali siano le caratteristiche biologiche e microambientali di questa specie e di conseguenza di capire perché essa riesce a sopravvivere soltanto in questo specifico areale, che sottoposto a disturbi di tipo antropico e climatico (talvolta anche biologico), pone a serio rischio la sopravvivenza di questo endemismo.

### **3.1.2. Descrizione della specie**

*Primula palinuri* Petagna fu descritta e catalogata per la prima volta nel 1592 dal botanico napoletano Fabio Colonna. Poi fu studiata ulteriormente nel Settecento da Petagna che le diede il nome.

*Primula palinuri* appartiene alla famiglia delle Primulaceae. La specie è perenne, decidua estiva, esaploide. Di portamento suffruticoso, si presenta dotata di un robusto rizoma sormontato da una folta rosetta di foglie carnose, coriacee ma non rigide, con margine dentato cartilagineo, in stretta aderenza alla roccia. L'infiorescenza è costituita da numerosi fiori distili di colore giallo-dorato intenso, dal calice bianco e farinoso, posti alla sommità di uno scapo alto 15-20 cm. Gli stami sono 5. La corolla, tubulare alla base, presenta 5 petali. Il calice, verde chiaro, è formato da 5 sepali. Il tubo calicino, liscio e cilindrico, evidenzia l'affinità con la *Primula auricola* L. (detta anche Orecchi d'orso), che cresce però in ambiente montano e dalla quale si discosta per l'assenza sulle foglie del margine cartilagineo.

*Primula palinuri* Petagna presenta un precoce periodo di fioritura (Gennaio-marzo).

### **3.1.3. Areale di distribuzione della specie**

*Primula palinuri* Petagna è una specie endemica del tratto di costa tirrenica meridionale che va dall'*Antiquarium* di Palinuro a Capo Scalea, interessando appena 90 chilometri di litorale per una profondità che, solo in rari casi, supera il centinaio di metri (Ricciardi, 1971).

Vive ad un'altitudine che oscilla tra 0-300 m s.l.m., preferendo le pareti esposte a Nord-Nord Ovest. Attecchisce sull'orlo di una sottile striscia pianeggiante che interrompe la verticalità della parete o nelle fenditure pareti rocciose di natura calcarea che si affacciano sul mare dove le radici si insinuano profondamente nel terreno di accumulo o sulle arenarie marine friabili, ma ha delle esigenze ecologiche che ne ricordano l'origine montana: si ritiene che due milioni di anni fa ebbe inizio un lungo viaggio che dalle montagne del Nord la portò al Sud sopravvivendo alle mutazioni climatiche e ambientali (Tucci e Pizzolongo, 1979).

Nel 1973 Ricciardi ha reso nota la distribuzione di questo endemismo lungo le coste tirreniche campano-lucane, segnalando alcuni nuovi popolamenti all'interno dei confini dell'areale già noto. Non è facile dire se si tratti di stazioni di nuovo impianto che denotino quindi una tendenza, anche se minima, ad una maggiore diffusione, o se si tratti piuttosto di popolamenti sfuggiti alle osservazioni dei botanici che, prima di Ricciardi, hanno studiato la distribuzione di questo celebre endemismo.

Considerando che alcuni popolamenti di *P. palinuri* sono oggi seriamente minacciati dai continui dissesti ecologici causati dall'uomo (Tucci e Pizzolongo, 1979), il problema della capacità di questa pianta di variare il suo così ristretto areale per ampliare le possibilità di sopravvivenza, assume notevole rilevanza.

Secondo Ricciardi (1971), le possibilità di vita e soprattutto di diffusione per *P. palinuri* sono legate prevalentemente al fattore esposizione in quanto regolatore dell'umidità ambientale e la sua costante assenza dai tratti di costa rivolti verso i quadranti meridionali ed orientali, potrebbe essere la conseguenza del mancato raggiungimento di tassi di umidità soddisfacenti.

La Valva e Ricciardi (1976-77) analizzando la vegetazione rupicola dell'isola di Dino, riferiscono di una *facies* in cui *P. palinuri* sembrerebbe essere indice di una più accentuata mesofilia rispetto ad altri raggruppamenti degli *Asplenietea rupestris*, mesofilia confermata, tra l'altro, dalla presenza di *Pistacia terebinthus* L. in prossimità di tali raggruppamenti.

#### **3.1.4. Caratteristiche edafiche e geografiche delle stazioni**

*Primula palinuri* è presente solo qualora si verificano contemporaneamente condizioni ecologiche del tutto particolari. Per quanto riguarda la matrice del substrato, essa è costituita quasi esclusivamente da calcari e dolomie proprio all'orlo di precipizi dove la



roccia diventa improvvisamente verticale, formando una sorta di fascia verde chiaro, larga pochi decimetri e lunga qualche metro, dove il terreno è maggiormente soggetto a continui cedimenti. La verticalità della roccia è condizione indispensabile per l'instaurarsi delle colonie, perché appena l'inclinazione diminuisce ed il suolo torna ad essere pianeggiante formando gradini di varia ampiezza, *P. palinuri* scompare sopraffatta da numerose altre specie.

*P. palinuri* si trova anche su arenarie marine friabili, solo nella zona compresa tra l'*Antiquarium* e il Porto di Palinuro (per un tratto di spiaggia di poche centinaia di metri).

Un altro fattore che condiziona la vita di *P. palinuri*, delineandone ancora meglio l'habitat, è l'esposizione. Questa specie si trova sempre sulle pareti rocciose esposte a Nord, a Nord-Ovest, o talora a Nord-Est.

Nel 1961 il Prof. Pizzolongo ha introdotto alcune piante nell'Orto Botanico di Portici ed ha potuto constatare che le piante esposte a Nord-Est, in un punto dell'Orto in cui il sole batteva soltanto per pochissimo tempo la mattina, hanno fiorito tutte abbondantemente. In un altro gruppo di piante tenute in serra calda ed illuminata meno intensamente rispetto al gruppo tenuto all'aperto, la fioritura non si è mai verificata. Anche le osservazioni compiute dal Prof. Pizzolongo (1963) a Palinuro hanno portato a concludere che gli individui di *P. palinuri* viventi in stazioni molto ombreggiate dalle piante vicine o da casuali schermi di altra natura non erano mai in fiore, contrariamente agli individui che ricevevano liberamente la luce indiretta e diffusa del sole.

### **3.1.5. Stato di conservazione**

*Primula palinuri* Petagna è una specie protetta sia a livello regionale che comunitario. È inserita negli elenchi nazionali ed internazionali delle specie protette a rischio di estinzione.

È inclusa, con la classificazione di Vulnerabile, nella Lista Rossa compilata dall'Unione Internazionale per la Conservazione della Natura (IUCN, *International Union for Conservation of Nature*). Attualmente questo endemismo appartiene alla categoria Minacciata della lista IUCN.

Nel "Rapporto Ambientale del Programma di Sviluppo Rurale 2007-2013", nella Tabella Natura 2000 n. 2, si riportano le "Specie animali e vegetali d'interesse comunitario la cui conservazione richiede la designazione di "Zone Speciali di

Conservazione” (Allegato II della Direttiva 92/43/CEE): tra queste compare *Primula palinuri*.

### 3.1.6. Osservazioni sulla vegetazione delle stazioni

I rilevamenti effettuati in campo dal Prof. Pizzolongo (1963) gli hanno consentito di notare delle affinità tra la vegetazione delle pareti verticali di Palinuro e quella delle rocce verticali di Marettimo studiate da Francini e Messeri (1955). Le affinità riguardano non tanto la composizione floristica quanto l'ecologia di alcune piante viventi nel particolare habitat rupestre di Palinuro e di Marettimo.

*Primula palinuri* si accompagna a tipiche specie rupicole casmofite, come *Dianthus rupicola* Biv., *Iberis semperflorens* L., (con le quali forma una cenosi di carattere relitto), *Centaurea cineraria* L., *Daucus gingidium* L., *Inula crithmoides* L., *Crithmum maritimum* L..

Le specie più tipiche delle pareti rocciose di Marettimo, *Scabiosa limonifolia* (Vahl) Deversa, *Bupleurum dianthifolium* Guss. e *Dianthus rupicola* Biv., sono esclusive delle rocce verticali con esposizione poco soleggiata ed hanno nel complesso una struttura del legno secondario e della foglia dimostrante un notevole grado di mesofilia. *P. palinuri* ha la medesima ecologia ed è quindi probabile un raggruppamento vegetale molto simile a quello rupicolo di Marettimo, che, secondo Pirola (1961) avrebbe come specie caratteristiche *Scabiosa limonifolia* Biv., *Bupleurum dianthifolium* Guss. e *Dianthus rupicola* Biv. A Palinuro mancano *Scabiosa limonifolia* Biv. e *Bupleurum dianthifolium* Guss. e il loro ruolo potrebbe essere esplicito dalla endemica *P. palinuri*.

Le specie che più spesso l'accompagnano sono quelle rupicole, fra le quali molto frequenti la *Parietaria ramiflora* Moench, *Dianthus rupicola* Biv., *Asplenium trichomanes* L., *Adiantum capillus-veneris* L., *Iberis semperflores* L., *Ficus carica* L., *Campanula fragilis* Cyr., *Sedum dasyphyllum* L., *Umbilicus pendulinus* DC., *Lotus cytisoides* L., *Catapodium loliaceum* Link, *Crithmum maritimum* L., *Statice minuta* L., *Inula crithmoides* L..

Talvolta a queste se ne aggiungono alcune tipiche delle dune marittime, come *Koeleria pubescens* Beauv., *Vulpia uniglumis* (Aiton) Dumort., *Pancratium maritimum* L., *Euphorbia paralis* L. o della macchia mediterranea come *Prasium majus* L., *Lonicera implexa* Aiton, *Asparagus acutifolius* L., *Coronilla emerus* L., *Pistacia lentiscus* L., ed *Euforbia dendroides* L..

Nelle stazioni meno tipiche e con minore inclinazione, il numero delle piante accompagnatrici della *Primula* diviene più elevato per l'infiltrazione di molte specie delle vicine praterie (Honsell, 1961).

*Primula palinuri* riesce ad insediarsi bene anche in piano assumendo la forma biologica di una *Emicriptofita rosulata* (Ricciardi, 1971).

Le osservazioni di Pizzolongo (1963) sulle stazioni meno disturbate perché più inaccessibili, lo hanno portato a concludere che la specie mostra una notevole socialità poiché forma dei raggruppamenti piuttosto folti, anche se non molto estesi, vivendo quasi sempre in colonie.

### 3.1.7. Cariologia e sistematica

Studi sistematici sul genere *Primula* (Bruun, 1932; Smith & Fletcher, 1949; Wendelbo, 1961; Valentine & Kress, 1972; Kelso, 1991; Mast *et al.*, 2001) hanno mostrato che il numero di cromosomi ( $x=8, 9, 10, 11, 12$ ) è significativo nella classificazione della maggior parte delle 37 sezioni e 6 sotto generi che sono ad oggi riconosciuti (Wendelbo, 1961; Richards, 1993, 2003).

Le variazioni nel numero dei cromosomi del genere *Primula*, insieme alle analisi cariologiche, rappresentano passi fondamentali per la comprensione del *trend* evolutivo, specialmente la relazione tra il livello di poliploidia, la biogeografia e l'origine del numero cromosomico di base.

Per *Primula palinuri* i risultati delle indagini cromosomiche sono risultati contrastanti. Chiarugi (1941, 1956), Wanner (1943) e Garbari (1974) riportano per questa specie un numero di cromosomi  $2n=44$  (considerando, *P. palinuri* primitiva rispetto all'intera sezione *Auricola*), mentre Kress (1963, 1989), Honsell (1961), Spanowsky e Casper (1959), sostengono che le forme esaploidi con  $2n=66$  cromosomi sono in questo momento molto diffuse e che le singole popolazioni sono molto omogenee dal punto di vista carilogico. Anche le osservazioni condotte da Ricciardi e Tucci (1980) in diverse stazioni dell'areale tirrenico di *P. palinuri* confermano l'esaploidia di questa specie endemica.

Secondo Chiarugi (1952), per la sezione *Auricola* del genere *Primula* esiste ancora oggi nella *P. palinuri* mediterranea il rappresentante vivente del ceppo Terziario Planiziario, che ha dato origine, ibridandosi e poliploidizzandosi, al ceppo che ha popolato, con le sue numerose specie, le Alpi e le altre montagne dell'Europa centrale. Per l'individualità

cariologica, ecologica e geografica di *P. palinuri* rispetto alle altre specie della sezione Auricola, Chiarugi (1952) considera *P. palinuri* l'unico rappresentante della nuova sezione *Paleoauricola* (definendola un autentico "fossile vivente", superstite di una flora anteriore all'orogenesi alpina, per questo considerata specie relitto, e unica primula in ambiente non montano), avente un numero di cromosomi base  $n=22$  e distinta dalla sezione *Neoauricola*, comprendente invece tutte le specie orofile, allopoliploidi, aventi un numero base di cromosomi  $n=31$ .

Queste conclusioni non riscuotono il consenso di chi vi riconosce un endemismo di recente formazione (neogenico e non paleogenico) e considera *P. palinuri* derivata da *Primula auricola* L. in seguito ad un abbassamento altimetrico dovuto alle crisi glaciali ed a profonde trasformazioni che l'hanno lasciata accantonata sulle calde rupi marine (Honsell, 1961; Ricciardi e Tucci, 1980; Mast *et al.*, 2001; Abou el Enain, 2006,).

La lunghezza media dei cromosomi, tra le specie di *Primula* studiate, è risultata avere il valore minimo in *P. palinuri* (1,4  $\mu\text{m}$  vs. 3,6  $\mu\text{m}$  di *P. frondosa*), secondo quanto riportato da Abou-El-Enain (2006), in cui i cromosomi sono metacentrici.

La variabilità nelle dimensioni del genoma è correlata con il numero di cromosomi ed il livello di poliploidia, infatti i cromosomi più piccoli sono stati osservati nelle specie poliploidi più evolute come *P. palinuri*. (Abou el Enain, 2006).

### **3.1.8. Evoluzione in Primula**

Sakya & Joshi (1990) sostengono che il probabile centro della diversità genetica del genere *Primula* sia da ricercare in un antenato asiatico con  $x=11$  che si trova sulle Himalaia. Qian (2002) ritiene che quando queste montagne si formarono durante il Terziario, la collisione del sub continente indiano con l'Asia e gli eventi che ne sono derivati, abbiano comportato una speciazione allopatrica tra il genere. Lang (2004), Bennett (1997) e Zhang & Kadereit (2004) hanno messo in evidenza che i cicli glaciali ed interglaciali durante il Pliocene ed il Pleistocene, hanno implicato successive suddivisioni del *range* ancestrale (speciazione simpatica) in Eurasia e un rallentamento della speciazione del genere durante il Quaternario.

La maggior parte delle specie con un livello piuttosto alto di poliploidia (almeno esaploide) basati su  $x=11$  (sezione *Auricula*, sottogenere *Auriculastrum*) sono endemiche soprattutto dell'Europa dove sono distribuite sia nel *range* montano dell'Europa centrale che meridionale e sono tra le poche specie endemiche presenti nei

sistemi alpini europei (Ozenda, 1995; Zhang & Kadereit, 2004), come si evince dalla Fig. 3.1.

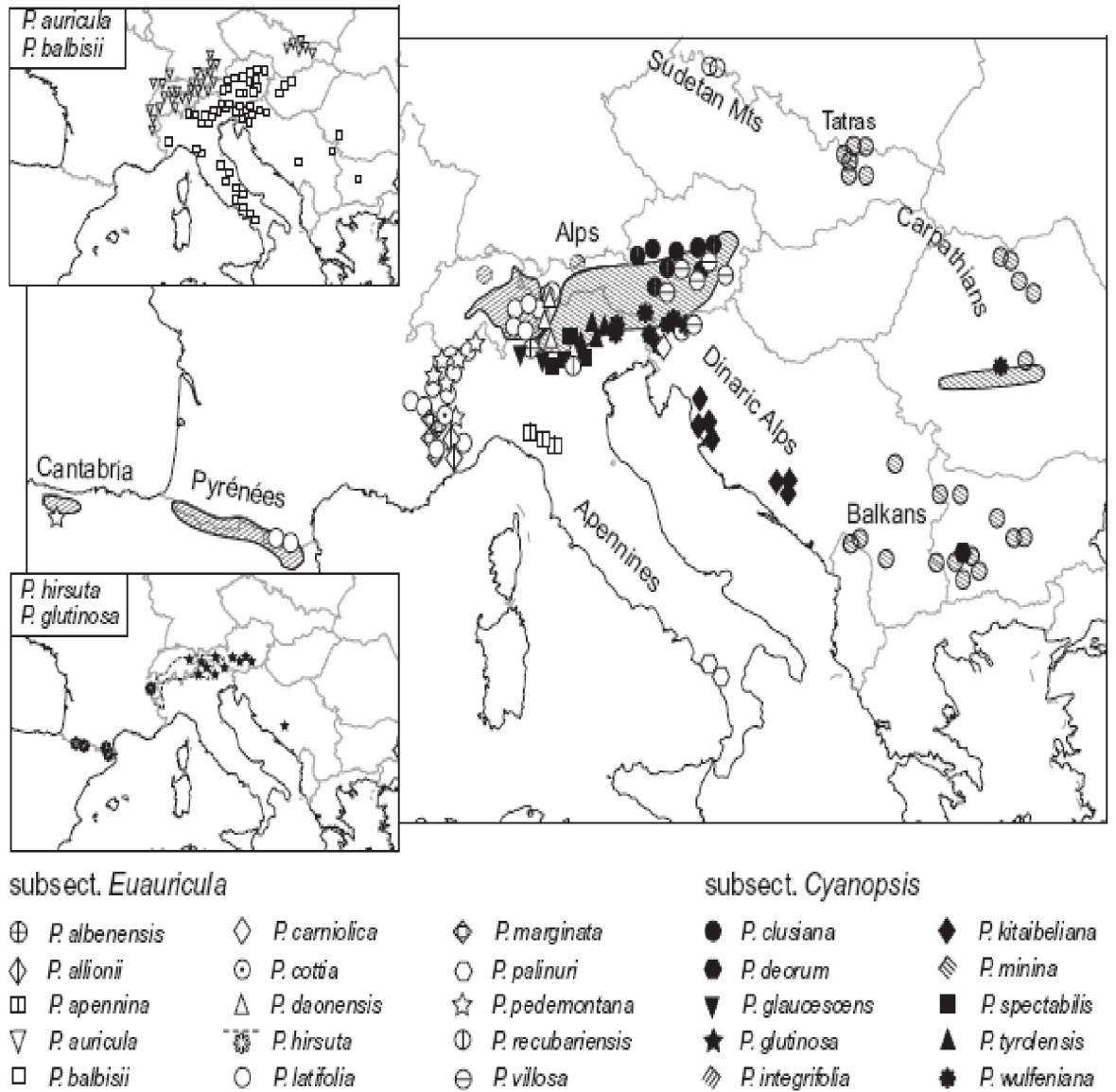


Fig 3.1. Distribuzione di 25 specie di *Primula* sez. *Auricula* sulla base di 1100 campioni di erbario e della letteratura (Richards, 1993, 2003).

## 3.2. MATERIALI E METODI

### 3.2.1. Area di studio

Gli studi effettuati in campo e la raccolta del materiale da analizzare in laboratorio sono stati effettuati su piante di *Primula palinuri* Petagna presenti presso le popolazioni naturali site in Capo Palinuro (substrato di arenaria , 40° 01' 38'' N; 15° 16' 52'' E) e S. Giovanni a Piro (substrato di rocce calcaree) facenti parte del Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano (Fig. 3.2) e presso l'Orto Botanico di Portici (Napoli), Parco Gussone (40° 49' N; 14° 20' E).

Il clima dell'area di studio è di tipo mediterraneo, con precipitazioni annuali di circa 1000 mm concentrate in autunno-inverno e seguite da un'estate secca.



Fig. 3.2. Cartina del Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano.

**Il Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano** - Con i suoi 181.048 ettari, rappresenta la seconda area protetta italiana per estensione dopo il Parco del Pollino. Il territorio del Parco si estende tra l'autostrada del Sole e il mare: i monti Alburni ne costituiscono il settore più settentrionale, le cime del Cervati, della Faiatella e del Gelbison ne costituiscono il cuore, mentre verso il mare si elevano i rilievi costieri (monte Bulgheria e monte Stella). Il parco si affaccia sul mar Tirreno per un lungo tratto, pari ad un terzo dell'intera costa campana, più dolce a nord e molto più aspro verso sud.

L'ampiezza e l'eterogeneità del territorio del Parco determinano la compresenza di ambienti molto differenti tra loro di elevato valore ambientale, naturalistico e paesaggistico.

Nell'ambito del Parco, l'habitat di Palinuro è unico: durante milioni di anni (dal tardo Terziario, circa 60 milioni di anni), ha conservato la sua peculiarità, rappresentando una nicchia ecologica unica e incontaminata.

La flora del Parco è rappresentata da circa 1800 specie di piante autoctone spontanee. Tra loro circa il 10% sono endemiche e/o rare. La più nota di queste specie e la più importante, è *Primula palinuri* Petagna, simbolo del Parco (specie bandiera), paleoendemica a diffusione estremamente localizzata.

Nel territorio del Parco, in virtù della sua particolare posizione geografica al centro del Mediterraneo, sono presenti specie tipicamente meridionali, tipiche degli ambienti aridi, al loro limite superiore di espansione, insieme a specie a distribuzione prettamente settentrionale, che qui raggiungono il limite meridionale del loro areale. Nel corso della dinamica evolutiva del territorio le piante hanno occupato tutte le nicchie ecologiche disponibili, comprese quelle via via create dall'uomo, arricchendo la biodiversità presente. Il territorio del Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano presenta una variegata orografia, che si estrinseca in una notevole complessità di ambienti e che è stata inoltre nel corso degli anni rimodellata e trasformata dall'uomo che abita qui ormai da mezzo milione di anni. Il già ampio mosaico della biodiversità si è allora arricchito di nuovi spazi, di nuove nicchie ecologiche che sono state sfruttate da specie che hanno seguito l'uomo nel corso del suo primitivo divenire attraverso i millenni, i suoi spostamenti, le sue migrazioni.

**L'Orto Botanico di Portici** - Se si considera che alcuni popolamenti di *Primula palinuri* sono oggi seriamente minacciati dai continui dissesti ecologici causati dall'uomo (Tucci e Pizzolongo, 1979), il problema della capacità di questa pianta di variare il suo così ristretto areale per ampliare le possibilità di sopravvivenza, assume notevole rilevanza.

Nell'intento di fornire utili indicazioni allo studio di tale problema, nel 1961 alcuni ricercatori dell'Istituto Botanico di Portici hanno prelevato nelle stazioni naturali di Capo Palinuro alcuni esemplari di *Primula* e li hanno coltivati nell'annesso Orto Botanico in condizioni ambientali diverse; sono state inoltre ricreate, in una stazione artificiale e in alcuni particolari, le condizioni ambientali delle stazioni di origine.

Tenuto conto che questa *Primula* vive preferibilmente negli interstizi di rocce calcaree verticali ad esposizione Nord, Nord-Ovest, Nord-Est (Ricciardi, 1973), prospicienti il mare o distanti da esso al massimo 300 metri, la stazione è stata realizzata costruendo, in un angolo dell'Orto Botanico con esposizione Nord-Ovest, un muretto a secco con sabbia, terriccio di bosco e grosse pietre calcaree; negli interstizi tra i blocchi di pietra sono state disposte numerose piante di *Primula*, facendo in modo che, dalla superficie verticale del muretto, sporgessero soltanto le rosette di foglie.

Seguendo ogni anno il comportamento di questo piccolo popolamento sono stati raccolte alcune indicazioni riguardanti l'adattamento alle condizioni ambientali di Portici.

Generalmente la fioritura inizia a gennaio, con apprezzabile anticipo rispetto alle stazioni di origine. La capacità di propagazione vegetativa (tramite rizomi) e la riproduzione sessuale sono inalterate. La produzione di semi è normale, così come la capacità germinativa che è generalmente alta (50-95%, secondo le annate).

Nella stazione artificiale realizzata a Portici gli esemplari di *P. palinuri* si sono normalmente accresciuti, fiorendo abbondantemente e producendo numerosi semi che, germinando, hanno prodotto nuove piante anch'esse in grado di dare discendenti.

Tranne l'anticipo della fioritura e le occasionali anomalie fiorali (legate alla presenza dell'afide *Myzus persicae* Sulzer), non si sono riscontrati altri segni di comportamento diverso rispetto agli individui viventi nelle stazioni di origine. Questo significa che *P. palinuri* riesce a vivere in soddisfacente equilibrio con l'ambiente di Portici dimostrando di poter sopravvivere in stazioni con caratteristiche non del tutto corrispondenti a quelle di origine. Questo purché si realizzino condizioni che diminuiscano la competizione con



le altre specie e cioè la verticalità della roccia e le esposizioni poco soleggiate, fattori che consentono agli individui di *Primula palinuri* di fruire anche di una più elevata umidità ambientale, altro elemento nei confronti del quale questa specie sembra più esigente delle altre entità che ad essa si accompagnano.

### **3.2.2. Analisi biometriche**

**Biometria floreale** - Il sistema riproduttivo è uno dei fattori chiave che determinano l'abbondanza, la distribuzione e la diversità genetica degli organismi. Nelle piante rare, endemiche e ad areale limitato, i sistemi riproduttivi assumono particolare importanza dal momento che operano su di un numero limitato di individui/popolazioni, soprattutto determinandone il successo riproduttivo e in secondo luogo determinando le dinamiche di popolazione e la diversità genetica.

Dal momento che il fiore è la struttura direttamente coinvolta nella riproduzione gamica delle piante, le sue caratteristiche morfologiche e funzionali hanno notevoli effetti sul successo riproduttivo della specie. La morfologia floreale, le ricompense fiorali (entrambe direttamente coinvolte nelle interazioni piante-animali), e la funzionalità degli organi sessuali staminiferi e pistilliferi, sono state studiate durante l'intero periodo di vita del fiore.

La raccolta del materiale da analizzare in laboratorio è stata effettuata durante il periodo di fioritura della specie (febbraio-marzo) degli anni 2006, 2007 e 2008 su piante di *Primula palinuri* Petagna presenti presso l'Orto Botanico di Portici (Napoli), Parco Gussone e presso le popolazioni naturali site in Capo Palinuro e S. Giovanni a Piro.

I campioni di fiori sono stati raccolti soltanto dal sito di Palinuro, dove il numero di individui della popolazione ivi collocata è sufficientemente elevato (diversamente dall'esiguo numero di piante presenti presso l'Orto Botanico di Portici, in cui non sono mai state adottate procedure di tipo distruttivo).

Per documentare la variazione delle caratteristiche fiorali associate alla distilia, sono stati scelti in maniera casuale dei gruppi di fiori appartenenti alle due diverse tipologie.

Durante i giorni di piena antesi (metà febbraio 2008), sono state effettuate numerose fotografie nelle piante appartenenti all'Orto Botanico di Portici (metodologia non distruttiva) e sono stati raccolti campioni di fiori in campo (Palinuro), trasportati in laboratorio e su di essi sono state effettuate le misure biometriche

I calici e le corolle sono stati tagliati longitudinalmente dalla base dell'ovario supero

fino alla bocca della corolla per ulteriori misure. La lunghezza del tubo della corolla, l'altezza delle antere e l'altezza dello stamma sono stati misurati dalla base dell'ovario. E' stata inoltre misurata la distanza tra stamma ed antere). Microfotografie sono state effettuate mediante una camera digitale (CAMEDIA C4040, Olympus, Germany) e le misure sono state effettuate usando il software per le analisi di immagini, AnalySIS. Le analisi biometriche sono state condotte su 10 fiori del tipo Brevistilo e 10 del tipo Longistilo, provenienti dal sito di Palinuro. Altezza di stamma e antere, distanza tra i due (separazione stamma-antere), lunghezza e diametro del tubo corollino, lunghezza e larghezza dei lobi della corolla, sono state misurate in 10 fiori per ciascuna morfologia florale.

**Biometria fogliare** - Presso l'Orto botanico di Portici sono state effettuate anche misure sulla lunghezza delle nuove foglie, la lunghezza dello scapo florale e lo spessore di questo ultimo.

**Numero di granuli di polline per antera** - Il numero di granuli di polline per antera è stato stimato da singole antere indeiscenti prese da piante diverse, sia longistilo che brevistilo. Ciascuna antera è stata macerata in 1 ml di etanolo, blu di metilene e detergente. Il numero medio di granuli di polline è stato contato in 10 sottocampioni di 1 µl ciascuno; il numero ottenuto è stato poi moltiplicato per 1000 per ottenere una stima del numero di granuli totali di una antera (Dafni, 1992).

**Numero di ovuli per ovario** - Il numero di ovuli è stato valutato utilizzando gli stessi fiori usati per contare i granuli di polline. L'ovario è stato posto su di un vetrino su cui era stata depositata una goccia di Blu Lattofenolo, è stato tagliato, schiacciato ed è stata effettuata la conta utilizzando il microscopio da dissezione equipaggiato con il sistema di acquisizione ed elaborazione delle immagini (CAMEDIA C4040 ed *Analysis*®, Olympus, Germany).

Per prevedere il tipo di sistema riproduttivo di questa specie, è stato determinato il rapporto P/O (Cruden, 1977). Il numero di granuli di polline per fiore è stato stimato in 10 antere prossime all'apertura ma non ancora aperte. Ciascuna antera è stata posizionata su di una goccia di glicerina al 50% su di un vetrino microscopico, aperta e schiacciata sotto il coprioggetto; i granuli pollinici sono stati contati al microscopio ottico a luce trasmessa (BX60, Olympus, Hamburg, Germany, ingrandimento 20X).

### **3.2.3. Analisi degli stadi fenologici**

*Primula palinuri* Petagna presenta un precoce periodo di fioritura (Gennaio-marzo) e una durata di vita del singolo fiore molto lunga. Sono stati monitorati numerosi fiori dall'inizio dell'antesi alla senescenza e ne è stato seguito il susseguirsi degli stadi fiorali, sia mediante osservazioni dirette sia mediante macrofotografie. Questo monitoraggio giornaliero è stato condotto sugli esemplari presenti presso l'Orto Botanico di Portici (Napoli) durante tutto il periodo di fioritura.

La durata di vita del singolo fiore è stata studiata in 10 fiori opportunamente marcati prima dell'apertura. I fiori sono stati monitorati a cadenza giornaliera fino al momento della senescenza. Il susseguirsi degli stadi fiorali e le modificazioni quotidiane nel fiore sono stati documentati mediante fotografie digitali, su cui è sempre stato posto un riferimento dimensionale (carta millimetrata).

Nel momento di massima fioritura è stato effettuato un censimento non distruttivo delle piante fiorite e non fiorite presenti a Palinuro (substrato di arenaria) e a San Giovanni a Piro (substrato di calcare). Per ogni pianta fiorita è stato eseguito il riconoscimento delle morfologie fiorali (Longistilo o Brevistilo) per verificare se la percentuale delle piante era equamente suddivisa in Longistilo e Brevistilo. I dati sono stati analizzati utilizzando il test statistico CHI-QUADRO e l'ANOVA ad una via.

Alla fine di giugno sono stati effettuati nuovi censimenti per vedere il numero di frutti prodotti in entrambi i siti. Tale valore è stato messo in relazione con il numero di fiori prodotti in modo da stimare il successo riproduttivo. A tal fine è stata utilizzata la regressione lineare.

Dopo aver contato il numero di capsule (frutti) per scapo fiorale, alcune capsule sono state raccolte e portate in laboratorio (con il permesso del Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano). Di queste è stato misurato il massimo diametro equatoriale e tale valore è stato poi messo in relazione con il numero di semi contenuti in ciascuna capsula, per entrambi i siti.

I semi di primula sono stati raccolti alla fine di Giugno 2007 da capsule prelevate in siti su diversi substrati (arenaria e rocce calcaree).

### **3.2.4. Analisi al microscopio ottico ed a fluorescenza**

I campioni di cui si è studiata l'anatomia (radici, rizomi, asse fiorale, petali, sepali, foglia, ovario, nettario, antere) sono stati fissati per diversi giorni in una miscela di Formaldeide al 40% : Acido acetico glaciale : Etanolo al 50% (5 : 5 : 90 per volume). Ciascuno di questi campioni fissati è stato successivamente disidratato in una serie crescente degli alcoli, inclusi nella resina acrilica JB4 (Polysciences, Warrington, PA, USA) e sezionati con un microtomo rotativo per ottenere sezioni sottili di 3-5  $\mu\text{m}$  sia longitudinali che trasversali.

Le sezioni sono state colorate con il Blu di Toluidina allo 0,5% (Feder & O'Brien, 1968) al fine di mettere in evidenza la parete cellulare, il nucleo ed il citoplasma; con lo Iodio Ioduro di Potassio (IKI) (Jensen, 1962) per rilevare la presenza di amiloplasti; con Sudan III, IV e Blu Nilo per evidenziare i lipidi cellulari.

Sezioni non colorate sono state osservate ad un microscopio ottico ad epi-fluorescenza (BX60, Olympus, Hamburg, Germany) equipaggiato con una lampada UV ed un filtro a filtraggio di banda BP 330-385, allo scopo di indagare sulla presenza di clorofilla, lignina dei vasi xilematici, cutina ed anche di fenoli che sono autofluorescenti a queste lunghezze d'onda (Ruzin, 1999).

Le sezioni colorate sono state montate con il Balsamo del Canada; quelle non colorate sono state montate in acqua.

### **3.2.5. Analisi al microscopio elettronico a scansione**

**Caratteristiche dello stamma** - Stimmi di entrambe le morfologie sono stati separati dagli ovari sotto lo stereomicroscopio. Si è proceduto alla loro fissazione in una miscela di F.A.A (Formaldeide al 40% : Acido acetico glaciale : Etanolo al 50% , 5 : 5 : 90 per volume) e quindi alla loro disidratazione in una serie crescente di alcool etilico. I campioni sono stati successivamente sottoposti a *Critical Point Drying* (Balzeers Union) e quindi coperta con un film di oro (spessore 20 nm) tramite vaporizzatore (Edwards) ed osservata con un microscopio elettronico a scansione (Philips SEM XL20).

Sono state poi effettuate delle microfotografie e su di esse, mediante l'ausilio del software *Analysis* ® 3.2 (Olympus, Germany) si è proceduto alla misurazione del numero medio di papille per area ( $\text{mm}^2$ ), delle dimensioni delle papille stimmatiche (diametro e lunghezza). I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistiche con il software SPSS®.

**Caratteristiche e dimensioni del granulo di polline** - Campioni di polline di entrambe

le morfologie (Longistilo e Brevistilo) sono stati prelevati dalle antere sotto lo stereomicroscopio. Si è proceduto alla loro preparazione e misura secondo il procedimento qui sopra descritto

### **3.2.6. Analisi funzionali**

**Recettività dello stamma** - La recettività dello stamma è stata testata attraverso l'uso del test enzimatico DAB (diamminobenzidasi) che rileva la presenza della Perossidasi secondo la procedura suggerita da Dafni (1992).

#### **Analisi del contenuto citoplasmatico del granulo di polline**

Per ognuno dei campioni di polline raccolto sono stati preparati dei vetrini istologici disperdendo i granuli in una soluzione con reagenti specifici dell'amido (IKI, iodio ioduro di potassio) e delle sostanze lipidiche (Sudan IV e Blu Nilo) (Jensen, 1962). I granuli sono stati successivamente osservati al microscopio ottico a luce trasmessa.

**Vitalità del polline** - La vitalità del polline è stata testata attraverso l'uso del test enzimatico DAB (diamminobenzidasi) che rileva la presenza della Perossidasi secondo la procedura suggerita da Riano-Rodriguez & Dafni (1992).

**Effetto di variabili ambientali sulla vitalità del polline** - La raccolta di campioni di polline da analizzare in laboratorio è stata effettuata durante il periodo di fioritura della specie (febbraio-marzo 2006 e 2008) su piante di primula site in Capo Palinuro

La vitalità del polline, intesa come percentuale di granuli vivi rispetto al totale, è stata inizialmente valutata su campioni di polline provenienti dalle due tipologie fiorali (brevistilo e longistilo) mediante l'uso del test DAB (diamminobenzidasi).

La vitalità del polline è stata valutata nei tre stadi di vita del fiore (giovane, adulto e senescente, con una durata di circa una settimana ciascuno), per ciascuna delle due tipologie fiorali.

La vitalità del polline è stata valutata per le due tipologie fiorali in funzione della temperatura (5-30°C) e dell'umidità relativa (0-100%).

Sulla base delle indicazioni fornite dalle indagini preliminari, si sono create condizioni intermedie di temperatura ed umidità relativa e si è valutata l'influenza dei due fattori

sulla vitalità del polline tenendo anche in considerazione la lunghezza del periodo durante il quale i campioni di polline sono stati sottoposti alle condizioni ambientali sperimentali. Adottando una metodologia di tipo non distruttivo, campioni di polline prelevati solo da fiori brevistilo (in cui le antere sporgono dal tubo corollino a differenza di quelle longistilo che trovandosi a circa metà lunghezza del tubo corollino avrebbero determinato la distruzione del fiore), in uno stadio florale giovane-adulto, sono stati raccolti e sottoposti a tre condizioni di temperatura (6-18-30°C) ed umidità relativa (0-48-100%). Il monitoraggio della vitalità è stato effettuato al 1°, al 5° e al 12° giorno del primo esperimento ed al 1°, 11°, 20° e 32° giorno di quelli successivi.

**Germinazione del polline** - La germinazione del polline è stata studiata sia *in vivo* che *in vitro*. Sono stati posti granuli di polline sullo stimma delle diverse morfologie e se ne è osservato il comportamento, sullo stimma, lungo lo stilo, fino all'eventuale raggiungimento degli ovuli. Successivamente, i pistilli sono stati ammorbiditi mettendoli per 24 ore in NaOH, e poi sono stati colorati con Blu di Anilina che rende fluorescenti le pareti callosiche dei tubetti pollinici. Le osservazioni sono state eseguite al microscopio ottico ad epifluorescenza (BX60, Olympus, Hamburg, Germany).

Sono state fatte prove di germinazione dei pollini anche in Capsule Petri aventi come substrato Agar (0,5%) e Saccarosio a due diverse concentrazioni (5% e 10%). Sono state valutate le percentuali di germinazione per le due morfologie (Longistilo e Brevistilo) ed è stato anche studiato l'effetto che la temperatura ha su tale processo. Prove preliminari hanno evidenziato che la concentrazione migliore di saccarosio era quella del 10%. Si è quindi proceduto all'utilizzo di questo substrato per analizzare la germinabilità del polline a diverse temperature (6-18-30 °C). L'osservazione microscopica e la successiva conta dei tubetti germinati sono state effettuate dopo 24 ore, sebbene già dopo 4 ore sono stati monitorati quei tubetti che iniziavano ad allungarsi. Sono inoltre state effettuate delle misure relative alla lunghezza del tubetto nel corso del tempo.

**Impollinazione** - Sono state effettuate osservazioni relative al tipo e alla frequenza degli agenti impollinatori di *P. palinuri*, sia presso l'Orto Botanico di Portici sia direttamente nel suo ambiente naturale, presso Palinuro. Le osservazioni sono state eseguite durante giornate soleggiate nel periodo gennaio-marzo degli anni 2006, 2007 e 2008.

**Esperimenti di impollinazione manuale** - Sono stati marcati 15 fiori Longistilo

presenti presso l'Orto Botanico di Portici e su questi, nel periodo di piena antesi (metà febbraio 2008) sono state effettuate prove di impollinazione manuale ripetute per 5 giorni consecutivi. Successivamente sono stati coperti con dei cappucci, in modo da far passare luce ed aria ma di impedire eventuali visite da parte dei pronubi.. Il polline utilizzato per effettuare queste prove è stato preso solo da fiori Brevistilo, per non utilizzare metodologie di tipo distruttivo. Contemporaneamente sono stati marcati 5 fiori su cui è stata eseguita una finta impollinazione: si è utilizzato un pennello privo di polline per vedere se la finta visita da sola poteva dare avvio allo sviluppo del frutto. Anche in questo caso si è proceduto alla copertura dei fiori. Infine, sono stati marcati 10 fiori lasciati liberi di impollinarsi (controllo).

**Produzione di nettare** - La produzione di nettare, che avviene alla base dell'ovario, ha richiesto una metodologia di tipo distruttivo. Per poter valutare la quantità di nettare prodotto è stato quindi necessario aprire il fiore tagliandolo longitudinalmente in modo da poter porre il microcapillare a contatto con la goccia di nettare, consentire la risalita dello stesso e misurarne le quantità, poggiando il capillare a contatto con la carta millimetrata. Le esigue quantità di nettare prodotto dalla specie non hanno consentito l'analisi della percentuale di zuccheri in esso contenuti.

**Successo riproduttivo** - La capacità di produrre semi è stata verificata e misurata sia su piante appartenenti alle popolazioni del Parco Nazionale del Cilento sia sugli esemplari presenti presso l'Orto Botanico di Portici.

Il numero dei semi prodotti è stato rapportato al numero iniziale di fiori per stimare il valore del successo riproduttivo, inteso come percentuale di fiori che sviluppano capsule.

**Semi** - I semi delle due diversi origini (arenaria e calcare) sono stati pesati utilizzando una bilancia di precisione Gibertini E42S-B. Date le piccole dimensioni degli stessi, si è proceduto effettuando numerose pesate di gruppi di 10 semi, 20 o 30 semi e poi si è proceduto al calcolo del peso unitario medio.

**Germinazione dei semi delle due differenti origini** - Semi provenienti da Palinuro (substrato di arenaria) e da San Giovanni a Piro (substrato calcareo) sono stati prelevati da capsule mature, raccolte casualmente da un elevato numero di piante e trasportate in laboratorio.

Circa 600 semi da ciascuna provenienza sono stati sterilizzati per 30 minuti in una soluzione acquosa di ipoclorito sodico commerciale (43%) diluito ulteriormente al 3% e successivamente lavati in acqua sterile. I semi, sono stati poi piastrati sia in agar sterilizzato e preparato a diverse concentrazioni (0,2%-0,5%-1% e 10%) e sia su carta da filtro imbevuta d'acqua, per verificare la percentuale di germinazione e i rispettivi tempi. I semi sono stati considerati germinati quando la radichetta raggiungeva la lunghezza di 1 mm e le osservazioni sono state condotte ogni giorno per un periodo di 60 giorni.

Nel 2007, un gruppo di 240 semi per ciascuna origine sono stati messi a germinare all'interno di contenitori alveolari aventi terriccio sterile come substrato.

**Effetto della disponibilità idrica sulla germinazione dei semi** - La percentuale di germinazione dei semi provenienti dai due substrati (arenaria e calcare) è stata studiata in diverse condizioni di disponibilità idrica, realizzate mediante l'uso di Agar a concentrazioni diverse di 0,2%-0,5%-1% e 10%.

**Effetto di temperatura sulla germinazione dei semi** - Il substrato di germinazione utilizzato è stato Agar 0,5% che prove preliminari hanno rivelato essere il migliore.

Il tempo richiesto e la percentuale di germinazione sono state analizzate su semi provenienti dai 2 substrati (arenaria e calcare) e sottoposti a 3 diverse temperature (8-24-32°C).

Le capsule di agar contenenti i semi A e C di *P. palinuri* non germinati alle temperature di 24 e 32°C sono state poste in frigorifero a 8° per vedere se un abbassamento della temperatura poteva indurne la germinazione.

**Strategie di attecchimento delle plantule** - Le prime fasi di sviluppo delle plantule sono state analizzate in *P. palinuri*, allo scopo di individuare la presenza di caratteristiche morfo-anatomiche e funzionali che permettano l'adattamento a seguito di stress abiotici nelle prime fasi di crescita.

**Fasi di sviluppo dell'ipocotile** - Cinquanta semi di entrambe le origini sono stati sistemati in capsule Petri su uno strato di carta da filtro inumidita con acqua distillata, ed osservati quotidianamente allo stereomicroscopio per ottenere differenti stadi di sviluppo post-germinativi. Appena raggiunto lo stadio di sviluppo post-germinativo,



alcuni semi sono stati osservati al microscopio ottico equipaggiato sia con la luce trasmessa che con la luce riflessa (BX60, Olympus, Hamburg, Germany). Altri sono stati attentamente trasferiti su di uno strato di carta da filtro inumidita con acqua distillata saturata con Blu di Anilina o Safranina O (Jensen, 1962) per verificare se i peli dell'ipocotile stavano assorbendo acqua. I semi rimasti nelle capsule sono stati fissati in FAA, successivamente inclusi in resina e sezionati secondo i protocolli sopra descritti.

Le sezioni sono state colorate con il Blu di Toluidina allo 0,5% (Feder & O'Brien, 1968) o con la Safranina O al 2% in acqua (Jensen, 1962) e montate con il Balsamo del Canada; sezioni non colorate sono state montate in acqua.

L'anatomia dell'ipocotile e della radichetta in via di sviluppo è stata studiata sulle sezioni colorate al microscopio ottico a luce trasmessa e ad epi-fluorescenza (BX60, Olympus, Hamburg, Germany).

Allo scopo di scoprire se la formazione dei peli dell'ipocotile era da mettersi in relazione alla disponibilità idrica del substrato, è stato effettuato un esperimento che ha previsto di far germinare i semi in capsule di Petri con Agar in acqua al 10%, 1%, 0,5% e 0,2%. Cinquanta semi sono stati disposti in ciascuna capsula Petri e ciascun trattamento è stato replicato 2 volte. I semi sono stati incubati al buio a temperatura ambiente (19-23 °C) e sono stati osservati quotidianamente allo stereomicroscopio.

Microfotografie di dieci semi all'inizio della germinazione per ciascun trattamento sono state effettuate mediante una camera digitale (CAMEDIA C4040, Olympus, Germany) e le immagini sono state analizzate usando il software per le analisi di immagini, *AnalySIS*® (Olympus, Germany).

La lunghezza dei peli dell'ipocotile è stata misurata in quattro punti opposti dell'anello e i dati sono stati sottoposti ad analisi statistiche (ANOVA) con il software SPSS.

**Sviluppo ed analisi delle plantule** - Mantenendo ben distinte le due origini (arenaria e calcare), i semi germinati nel precedente esperimento di germinazione, sono stati trapiantati in 3 tipi differenti di substrato: sabbia, terriccio e misto sabbia-terriccio (50:50 v:v).

Il monitoraggio è iniziato all'inizio di maggio del 2007 e si è concluso alla fine di gennaio 2008.

Il 26 aprile 2007, le plantule provenienti dai semi messi a germinare l'8 gennaio 2007, sono state fissate in FAA. Ciascuna di queste è stata successivamente inclusa in resina e sezionata con un microtomo rotativo per ottenere sezioni sottili di 3-5 µm sia

longitudinali che trasversali.

Il 26 settembre 2007, le plantule ormai morte, derivate da semi messi a germinare l'8 gennaio 2007, sono state fissate per numerosi giorni in FAA. Ciascuna di queste è stata successivamente, inclusa in resina, sezionata ed osservata al microscopio ottico ed a fluorescenza.

### 3.3.RISULTATI

#### 3.3.1. Caratteristiche morfometriche ed anatomiche

*Primula palinuri* è una specie perenne, decidua estiva. Ha radici numerose, filiformi, ispessite. Presenta un fusto ad andamento orizzontale od obliquo (rizoma).

Sviluppa uno scapo (asse aereo) annuo, nudo, nascente all'apice del rizoma, alto 12-25 cm, più lungo delle foglie, munito di numerosi fiori alla sommità.

Le foglie sono tutte basali, picciolate, verdi, membranacee, lunghe 8-16 cm, ovate o oblunghie. La pagina superiore è subglabra, inferiormente pubescente, con margine irregolarmente dentato.

I fiori sono 5-15, riuniti in ombrella bratteata, profumati, sorretti da peduncoli inclinato-pendenti, pubescenti o vellutati, di 3-20 mm. Il calice è gamosepalo di 4-5x8-10 mm, dilatato-rigonfio superiormente, a 5 denti triangolari, acuti, lunghi 1/3-1/4 del tubo calicino. La corolla è gamopetala, infundibuliforme, larga 8-16 mm. I petali sono 5, ad unghia saldata a formare un tubo corollino di 8-10 mm; lembo a margine obcordato o smarginato all'apice, di color giallo-dorato. Anche gli stami sono 5, epicorollini, a filamento breve, inclusi nel tubo corollino (brevistilo). Le antere sono lineari o ellittiche. L'ovario è ovato a stilo filiforme allungato. Lo stamma è capitato. IL frutto è una capsula urceolata, deiscende per 10 denti rovesciati verso l'esterno. I semi sono numerosi, bruno-nerastri.

I fiori Longistilo e Brevistilo differiscono significativamente per tutti i parametri di reciproca ercogamia misurati (Tab. 3.1). L'altezza delle antere dei fiori Brevistilo supera significativamente quella dei fiori Longistilo, e l'altezza dello stamma dei longistilo supera significativamente quella dei brevistilo.

La separazioni tra stamma e antere non differisce significativamente tra le due morfologie.

I parametri della corolla mostrano differenze tra le due morfologie. Le più evidenti differenze sono state riscontrate nella lunghezza del tubo della corolla.

Il tubo corollino dei fiori Brevistilo è significativamente più lungo di quello dei fiori Longistilo. Lunghezza e larghezza del lobo della corolla non mostrano differenze statisticamente significative tra Longistilo e Brevistilo.

Tabella 3.1. Parametri della reciproca ercogamia e della corolla nelle due morfologie di *Primula palinuri* Petagna. I valori corrispondono a media e deviazione standard (in mm). A lettere diverse corrispondono valori significativamente diversi ( $P < 0,05$ ).

Parametro misurato	Brevistilo		Longistilo	
	M	DS	M	DS
Altezza stimma	7,4(a)	1,1	13,3(b)	1,2
Altezza antere	13,6(a)	1,9	7,5(b)	1,1
Distanza stimma-antere	6,2(a)	2,3	5,8(a)	1,7
Diametro corolla	15,8(a)	1,3	16,(b)	1,3
Lunghezza corolla	17,6(a)	1,3	16,2(b)	0,8
Lunghezza lobo della corolla	5,1(a)	1,0	5,7(a)	0,7
Larghezza lobo della corolla	5,7(a)	0,8	5,9(a)	0,7

Durante i tre anni di osservazione, *Primula palinuri* Petagna ha sempre presentato un precoce periodo di fioritura (Gennaio-marzo). Ogni fiore ha mostrato una durata media di  $29 \pm 5$  giorni. I fiori che si sono aperti per primi sono rimasti sullo scapo per un periodo superiore rispetto a quelli che si sono aperti a fine periodo di fioritura.

Il numero medio di fiori per scapo florale è risultato di  $11,54 \pm 2,80$  per il sito calcareo di San Giovanni a Piro e di  $14,43 \pm 4,78$  per le piante dei substrati arenari di Palinuro. Le piante situate sull'arenaria producono un numero di fiori significativamente superiore a quelle su rocce calcaree.

Il numero medio di capsule per scapo florale risultato di  $5,36 \pm 3,01$  per il sito a San Giovanni a Piro e di  $7,57 \pm 4,89$  per le piante provenienti da Palinuro. Le piante situate sull'arenaria producono un numero di capsule per scapo florale significativamente superiore a quelle su rocce calcaree.

Il diametro equatoriale massimo delle capsule è risultato di  $4,92 \pm 0,72$  mm nel sito di S, Giovanni e di  $5,01 \pm 0,65$  mm nel sito di Palinuro. Le differenze tra i due siti non sono significative.

Infine, il numero medio di semi per capsula è di  $58,24 \pm 23,24$  a San Giovanni a Piro (calcare) e  $56,42 \pm 21,85$  per Palinuro (arenaria). Le differenze tra i due siti non sono significative.

La percentuale di fiori che sviluppano frutti, ovvero il successo riproduttivo della specie, è risultato essere del 46,5% per il sito di San Giovanni e 52,4% per il sito di Palinuro. Sia per il sito di Palinuro (substrato di arenaria) che per quello di S. Giovanni a Piro (calcare) si è indagato sulla correlazione tra il diametro equatoriale delle capsule e il numero di semi per capsula. Le relazioni, riportate in fig. 3.3.1, sono risultate in entrambi i casi significative (valori di  $R^2$  pari a 0,9407 per Palinuro e  $R^2$  pari a 0,8693 per S. Giovanni a Piro); quindi capsule più grandi contengono un numero maggiore di semi.

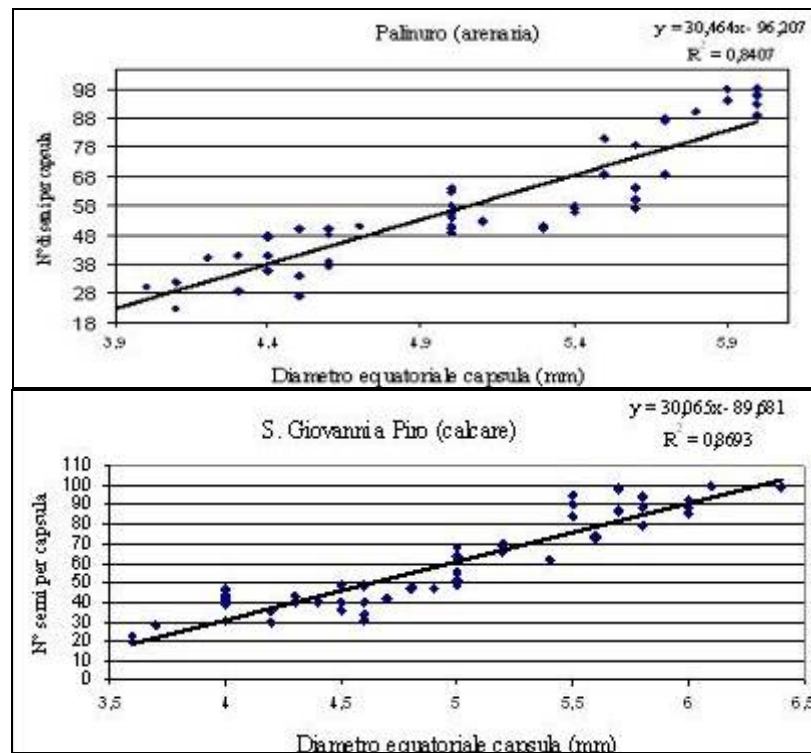


Fig. 3.3. Correlazione tra il diametro equatoriale delle capsule (mm) e il numero di semi in *P. palinuri* in entrambi i siti studiati.

I valori delle misure effettuate sulla lunghezza delle foglie, sulla lunghezza dello stelo e sullo spessore dello stesso di piante presenti presso l'Orto Botanico di Portici sono state correlate tra di loro, ottenendo i risultati riportati nella tab. 3.2.

Tab. 3.2. Lunghezza delle foglie, lunghezza dello stelo e spessore dello stelo di piante presenti presso l'Orto Botanico di Portici e relativa correlazione.

Lunghezza foglia (cm)	Lunghezza stelo (cm)	Spessore stelo (mm)
18	29,5	4,2
15,5	28,5	3,6
10,3	21,5	2,4
9,3	16,6	1,4
8,5	15	1,1
14	20	1,6
15	16	1,6
14,5	21,7	2

	Colonna 1	Colonna 2	Colonna 3
Colonna 1	1		
Colonna 2	0,719445	1	
Colonna 3	0,715966	0,967176	1

Al fine di indagare sulle capacità di adattamento ambientale di questa specie è stata studiata anche l'anatomia delle foglie e delle strutture riproduttive.

In sezione trasversale la lamina fogliare di *P. palinuri* (fig. 3.4) mostra i seguenti caratteri: l'epidermide superiore, monostratificata, scarsamente cutinizzata e povera di peli, presenta numerosi stomi piuttosto sporgenti; uguali caratteri si riscontrano nell'epidermide inferiore dove però gli stomi sono meno frequenti. Il tessuto clorenchimatico è costituito da cellule quasi isodiametriche o pochissimo allungate per cui si può dire che manchi un tipico tessuto a palizzata. Il tessuto spugnoso localizzato verso la pagina inferiore, presenta ampi spazi intercellulari. Scarsi sono i tessuti meccanici e le nervature sono poco sporgenti.

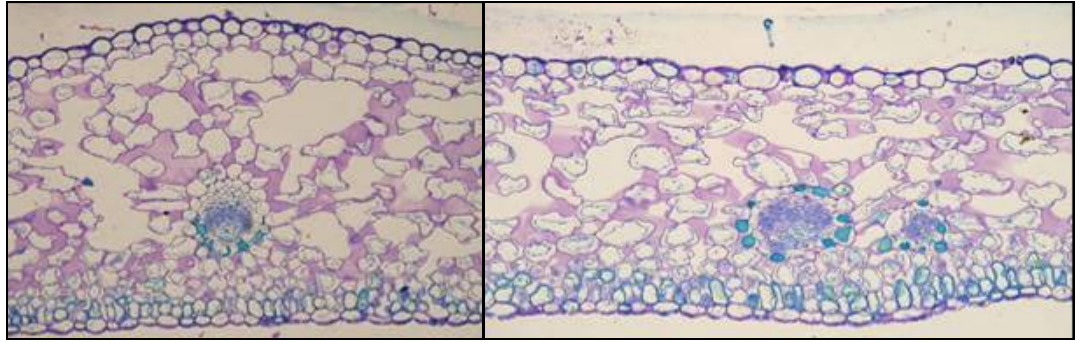


Fig. 3.4. Sezione trasversale di una foglia di *P. palinuri* colorata con Blu di toluidina.

I tessuti epidermici del sepalo sono provvisti di numerosi peli ghiandolari sia nella pagina inferiore che superiore; i tessuti epidermici del petalo sono al contrario sprovvisti di peli nelle due pagine interna ed esterna, ma mostrano in entrambe le facce le tipiche papille che conferiscono al petalo l'aspetto liscio e vellutato (Fig. 3.5).

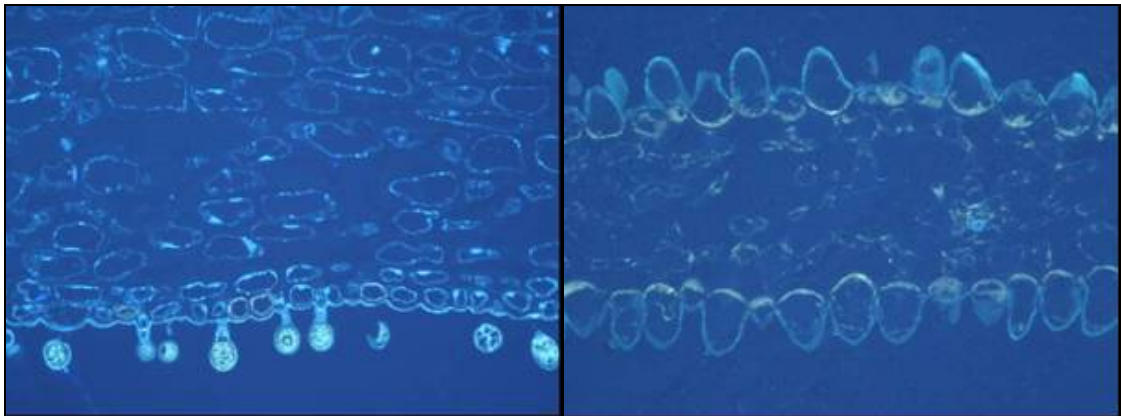


Fig. 3.5. A destra: sezione trasversale di un sepalo osservato al microscopio ad epifluorescenza. A sinistra: sezione trasversale di un petalo osservato al microscopio ad epifluorescenza.

I risultati del monitoraggio del numero di piante fiorite nelle diverse popolazioni dimostrano che la maggioranza degli apici dei rizomi non sviluppa uno scapo florale. La percentuale di piante fiorite non differisce significativamente tra i due siti anche se risulta leggermente più elevata nel sito dell'arenaria (28% vs. 22%) (Fig.3.6).

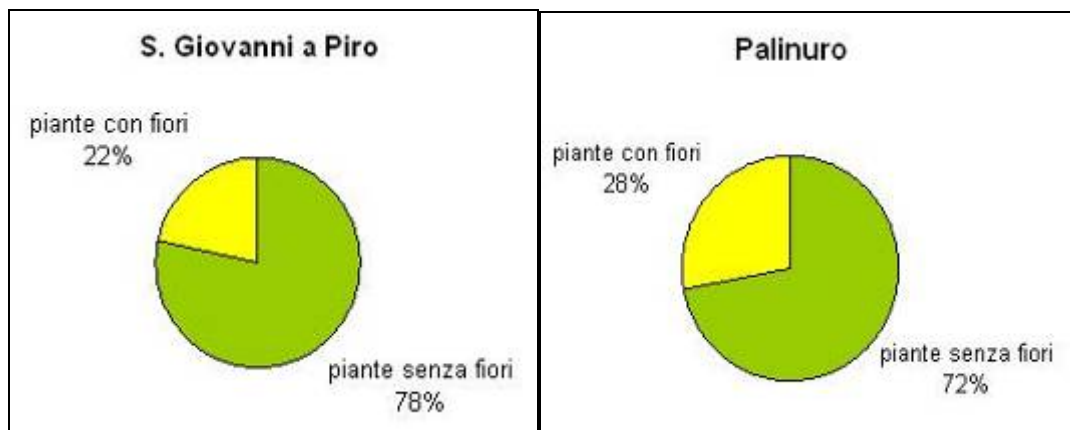


Fig.3.6. Percentuale di piante fiorite e non nei due siti

Per quanto riguarda le due tipologie fiorali, la proporzione in valori percentuali (analizzata con il test del Chi-quadro) è risultata statisticamente non differente per entrambi i siti anche se apparentemente i Brevistilo sembrano leggermente più frequenti: (57%) dei Longistilo (43%).

Il confronto tra fiori Longistilo e Brevistilo relativamente al numero medio di papille stigmatiche per area ( $\text{mm}^2$ ), alla lunghezza ed al diametro delle papille stigmatiche, ha dimostrato che in *P. palinuri*, le due tipologie fiorali non differiscono significativamente per nessuna delle tre caratteristiche analizzate.

La strategia di impollinazione incrociata attraverso il meccanismi della distilia generalmente è associata anche ad una differenza nelle dimensioni dei granuli di polline. Come si evince dai grafici in fig. 3.7, il polline di *P. palinuri* appartenente alla tipologia Brevistilo è più grande di quello Longistilo, sia per quanto riguarda il diametro polare che per quello equatoriale.



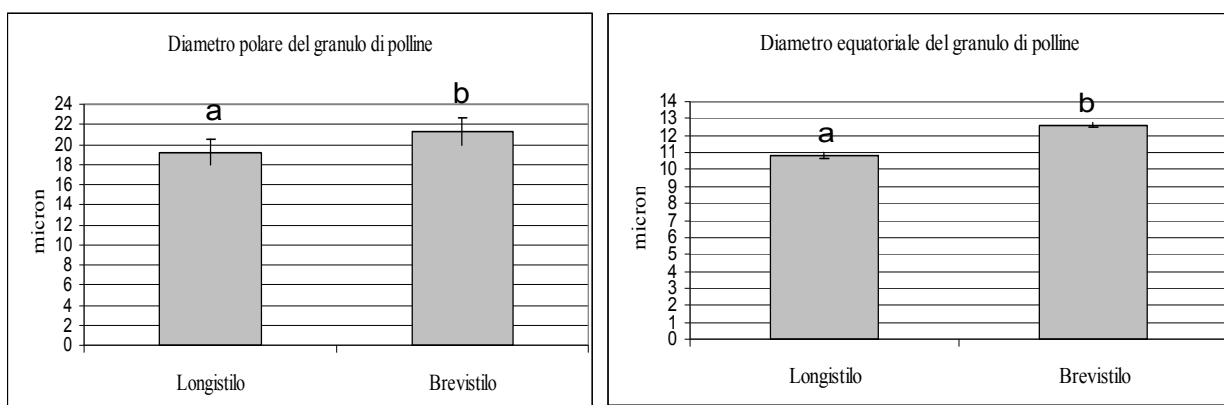


Fig 3.7. Diametro polare ed equatoriale del polline delle due tipologie fiorali di *P. palinuri*

Sia l'area delle maglie presenti sulla superficie del polline che la densità delle stesse, sono risultate essere caratteristiche che differenziano significativamente le due diverse tipologie fiorali: il polline delle piante Brevistilo presenta maglie di maggiori dimensioni, sebbene meno dense, rispetto a quelle del polline Longistilo (Fig. 3.8)

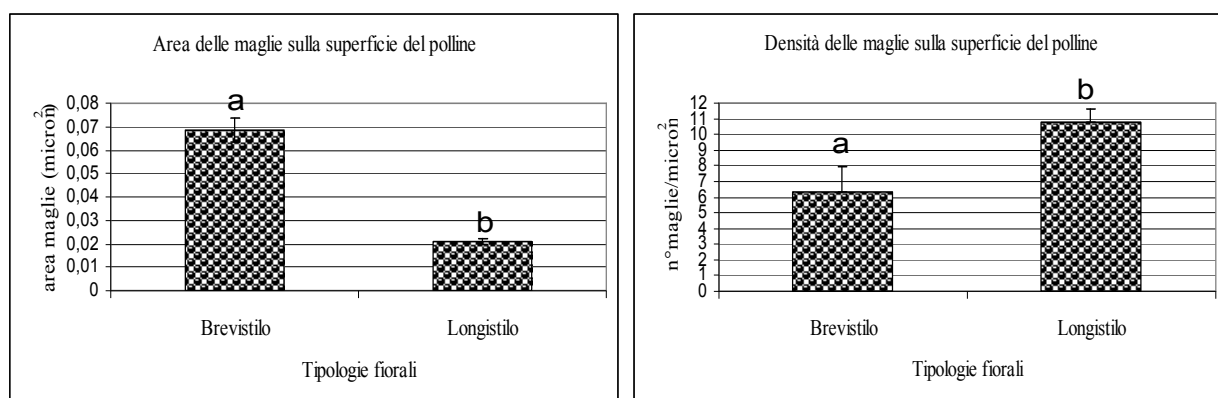


Fig. 3.8. Area delle maglie presenti sulla superficie del polline delle due diverse tipologie fiorali e densità delle stesse. A lettere diverse corrispondono valori significativamente diversi ( $p < 0,05$ ).

Dai conteggi effettuati sul numero di granuli di polline per entrambe le tipologie fiorali, è risultato che le antere dei fiori Longistilo producono più polline di quelli Brevistilo (Tab. 3.3).

Tab. 3.3. Numero di granuli di polline per antera, calcolato per le due differenti tipologie fiorali. Le differenze sono statisticamente significative ( $p = 0,00549$ )

Tipologia	N	Media	Deviazione standard	Errore standard
Longistilo	10	205500	37598,02	11889,54
Brevistilo	10	159000	27568,10	8717,798

Da questi dati si può stimare il numero di granuli di polline per fiore che, messo in relazione con il numero di ovuli per ovario, permette di calcolare il rapporto P/O (Tab. 3.4).

Tab. 3.4. Numero di granuli di polline per fiore, numero di ovuli per fiore e loro rapporto (P/O).

Tipologia	N. granuli di polline per fiore	Ovuli per fiore	P/O
Longistilo	205500	59	3483,051
Brevistilo	159000	79	2012,658

Il polline esternamente è ricco di *Pollenkitt* ed è disperso in monadi. Internamente è stata evidenziata la presenza di goccioline di olio; pertanto, si deduce che questa specie presenta i lipidi come riserva di energia nei granuli di polline.

### 3.3.2. Analisi funzionali delle fasi precedenti alla dispersione dei semi

La vitalità del polline, intesa come percentuale di granuli risultati positivi al test enzimatico rispetto al totale, è stata inizialmente valutata su campioni di polline appartenenti dalle due tipologie fiorali (Brevistilo e Longistilo), risultando significativamente diversa: 60% per il polline Brevistilo vs. 50% per il polline Longistilo (Fig. 3.9).

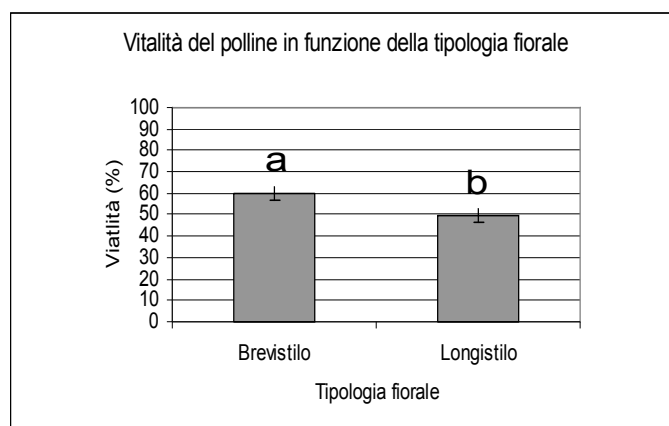


Fig. 3.9. Vitalità percentuale del polline delle due tipologie fiorali. A lettere diverse corrispondono valori significativamente diversi ( $p < 0,05$ ).

Si è proceduto quindi a valutare la vitalità del polline anche nei tre stadi di vita del fiore (giovane, adulto e senescente, con una durata di circa una settimana ciascuno), per ciascuna delle due tipologie fiorali. I risultati ottenuti sono riportati in Fig. 3.10.

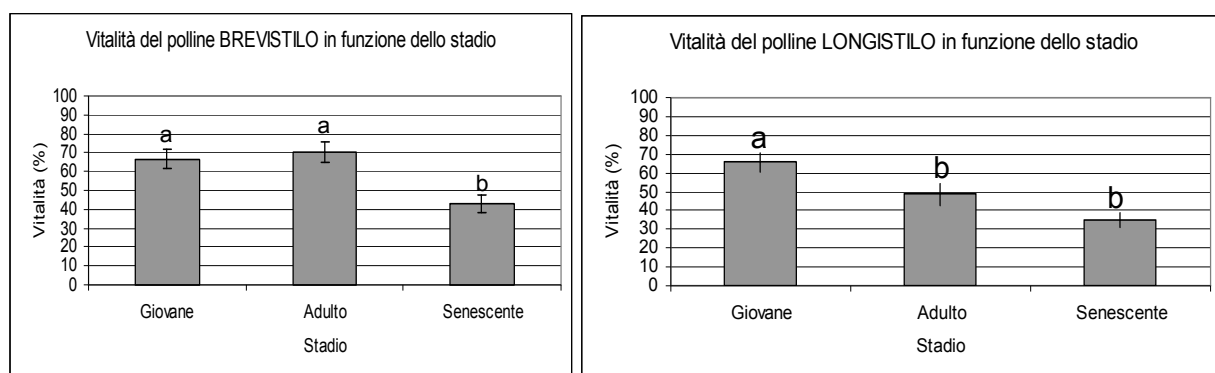


Fig. 3.10. Vitalità percentuale del polline delle due tipologie in funzione dello stadio fiorale. A lettere diverse corrispondono valori significativamente diversi ( $p < 0,05$ ).

Come si vede chiaramente dai grafici, la vitalità decresce progressivamente con l'avanzare dell'età del fiore, ma si mantiene comunque elevata anche alla terza settimana di vita (stadio senescente).

La vitalità del polline delle due tipologie fiorali è stata anche misurata in funzione della temperatura (5-30°C) (Fig. 3.11) dell'umidità relativa (0-100%) (Fig. 3.12).

Per entrambe le tipologie fiorali sia la temperatura di 30 °C che l'umidità relativa del 100% riducono significativamente la vitalità del polline.

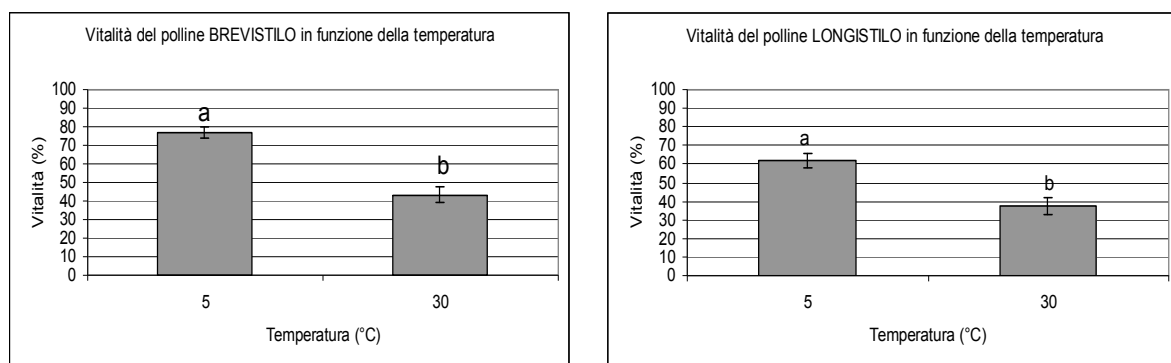


Fig. 3.11. Vitalità percentuale del polline delle due tipologie in funzione della temperatura. A lettere diverse corrispondono valori significativamente diversi ( $p < 0,05$ ).

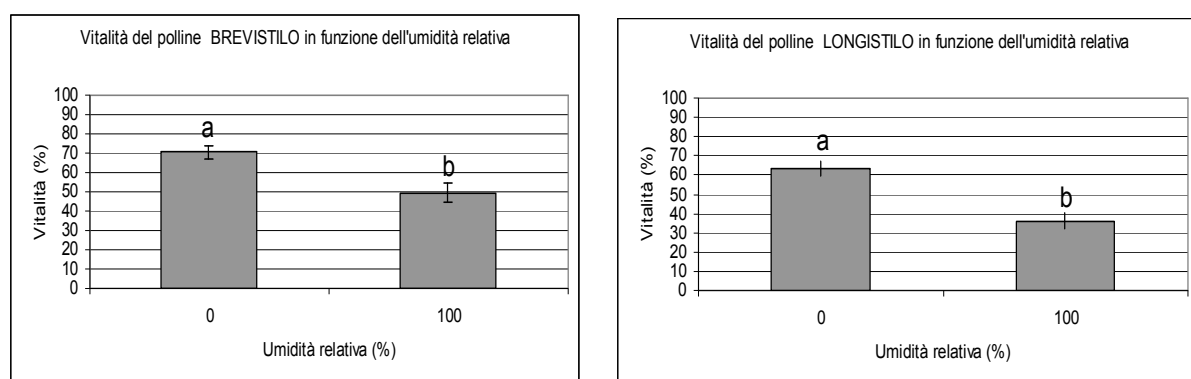


Fig. 3.12. Vitalità percentuale del polline delle due tipologie in funzione dell'umidità relativa. A lettere diverse corrispondono valori significativamente diversi ( $p < 0,05$ ).

Dopo questi risultati preliminari che hanno permesso di stabilire che le due tipologie fiorali presentano valori di vitalità del polline significativamente diversi e che la vitalità del polline si mantiene elevata per un notevole numero di giorni, si è proceduto alla valutazione della stessa considerando contemporaneamente gli effetti di tre diverse temperature (6-18-30°C ) e tre diverse umidità relative (0-48-100%) sulla vitalità del polline dei fiori Brevistilo (per adottare una metodologia di tipo non distruttivo, come anticipato nei materiali e metodi) e di uno stadio Giovane-Adulto. I risultati del primo esperimento condotto presso l'Orto Botanico di Portici sono sintetizzati in Fig. 3.13. La vitalità è diminuita più velocemente quando il polline è stato tenuto in condizioni di umidità relativa elevata rispetto a quello tenuto in ambiente più secco. Le diverse temperature hanno inoltre influito sulla perdita di vitalità nel senso che il polline tenuto al caldo è morto prima di quello tenuto a temperature basse. In altre parole, dopo 12 giorni di conservazione in condizioni secche e fresche il polline aveva ancora una vitalità molto simile a quella iniziale, mentre in ambiente caldo umido al 5° giorno era già tutto morto.

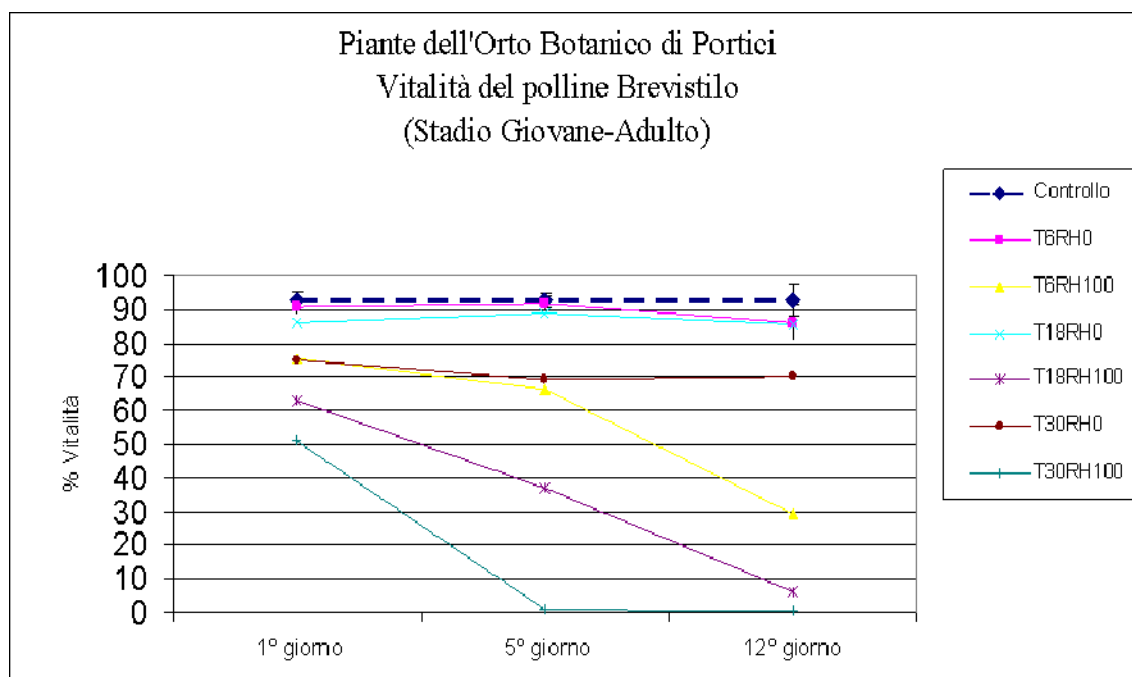


Fig. 3.13. Vitalità del polline Brevistilo (stadio giovane-adulto) al 1°, 5° e 12° giorno di antesi in funzione di tre diverse temperature (6-18-30°C ) e tre diverse umidità relative (0-48-100%).

Alla luce di questi risultati sono stati effettuati monitoraggi della vitalità del polline per periodi di tempo superiori, prelevando in questo caso polline delle due tipologie fiorali reperite presso Palinuro ed andando anche in questo caso ad evidenziare gli effetti combinati di temperatura ed umidità relativa sulla vitalità del polline Brevistilo e Longistilo (Fig. 3.14 e Fig. 3.15). E' evidente che il trend descritto nell'esperimento precedente si è nuovamente verificato. Inoltre, è interessante notare che in condizioni di freddo secco il polline è rimasto vitale per oltre un mese e quindi per tutta la durata della fioritura del singolo fiore.

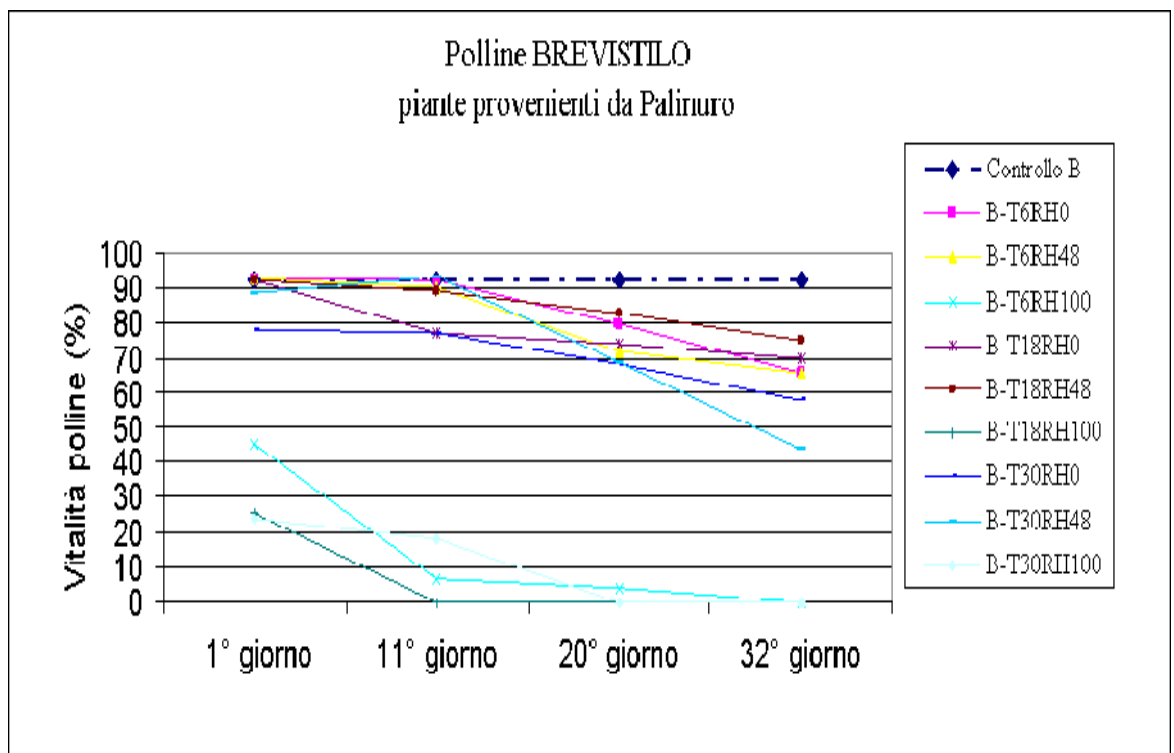


Fig. 3.14. Vitalità del polline Brevistilo (stadio giovane-adulto) al 1°, 11°, 20° e 32° giorno di antesi in funzione di tre diverse temperature (6-18-30°C ) e tre diverse umidità relative (0-48-100%).

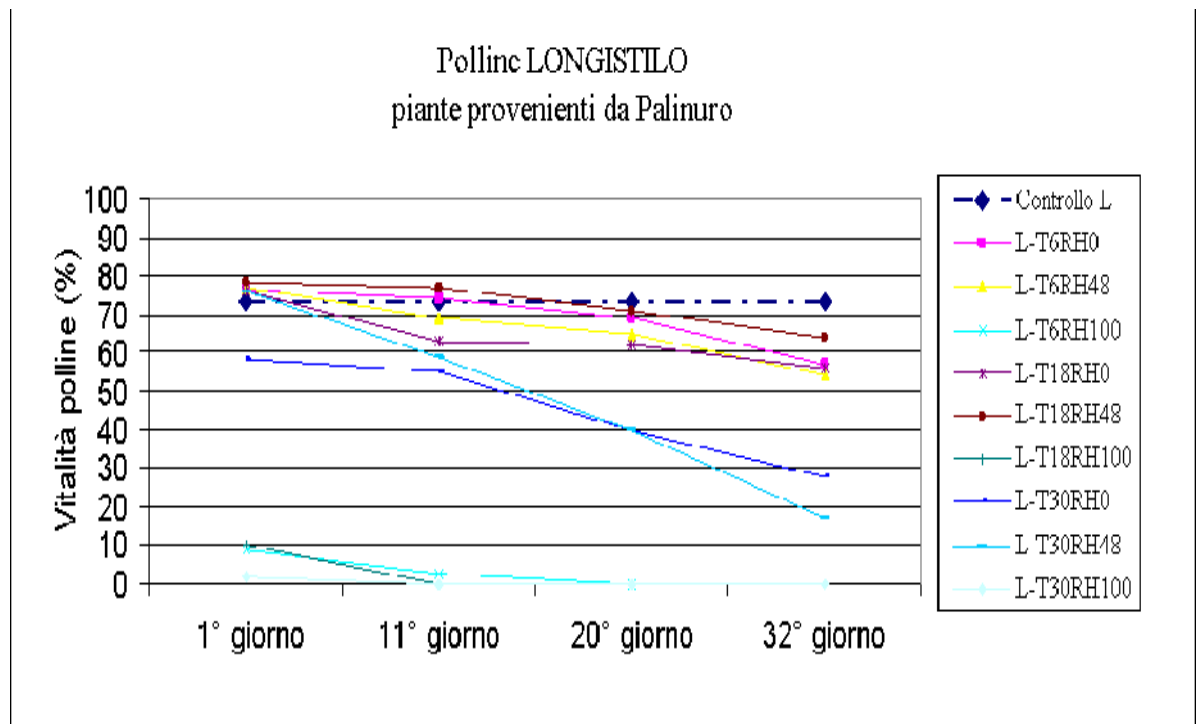


Fig. 3.15. Vitalità del polline Longistilo (stadio giovane-adulto) al 1°, 11°, 20° e 32° giorno di antesi in funzione di tre diverse temperature (6-18-30°C ) e tre diverse umidità relative (0-48-100%).

Le caratteristiche funzionali del polline sono state analizzate non solo con i test enzimatici, ma anche quelli di germinazione.

Dalle prove di germinazione su substrati diversi e a temperature diverse è emerso che il polline di *P. palinuri*, germina di preferenza su di un substrato in cui l'Agar ha una concentrazione dello 0,5% e il saccarosio del 10% (Fig. 3.16). In ogni caso, come riportato nella fig. 3.17, il polline della tipologia Brevistilo ha mostrato una percentuale di germinazione superiore a quella del polline di fiori Longistilo, sia alla temperatura di 6°C (98 vs 78%) che a quella di 18 °C (41 vs 20%). Questo probabilmente dipende dal fatto che ha maggiori dimensioni e maggiore contenuto di nutrienti. Alla temperatura di 30 °C, nessun granulo di polline (di entrambe le tipologie) è riuscito a germinare. Le differenze nella percentuale di germinazione dei granuli pollinici sono significative oltre che tra morfologie (Longistilo e Brevistilo) anche per quanto riguarda il confronto tra temperature diverse. I valori massimi si sono raggiunti tenendo il polline a 6°C e via via sono diminuiti con l'aumentare delle temperature. A 18°C la vitalità era minore che a 6°C e maggiore che a 30°C..

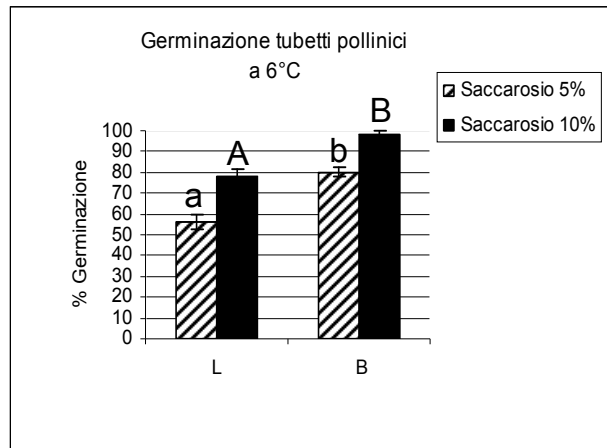


Fig. 3.16. Germinazione dei tubetti pollinici delle due tipologie di *P. palinuri* alla temperatura di 6 C in funzione del substato.

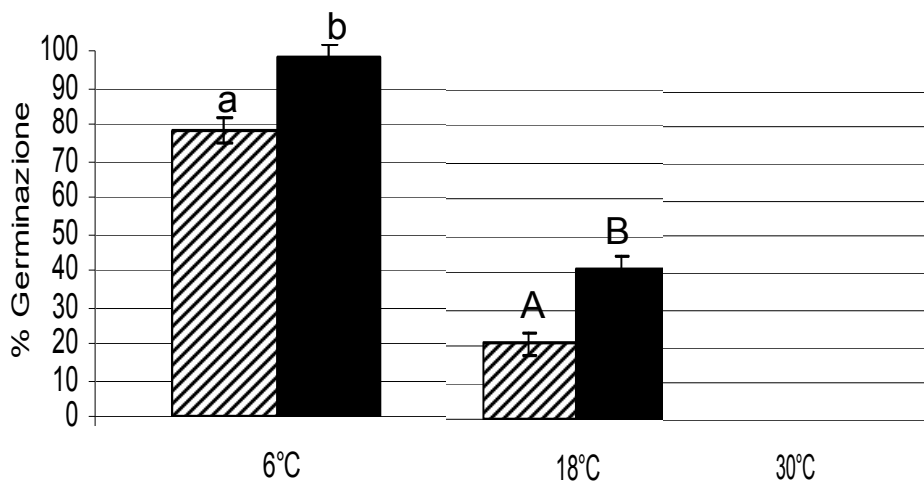


Fig. 3.17. Germinazione dei tubetti pollinici delle due tipologie di *P. palinuri* in funzione della temperatura.

Per quanto riguarda il numero di ovuli per ovario, la cui conta è stata effettuata attraverso l'apertura dell'ovario e la colorazione con lattofenolo blu, si è osservato che il numero medio di ovuli nei Brevistilo è risultato  $79 \pm 2,5$  mentre il valore medio per la tipologia fiorale Longistilo è  $59 \pm 5,8$ . Le differenze sono statisticamente significative.



Osservando stimmi di fiori Longistilo si ritrovano spesso molti granuli di polline di entrambe le tipologie, soprattutto di Brevistilo (maggiori dimensioni). Gli stimmi Brevistilo non presentano quasi mai polline sulla superficie. Lo stigma Longistilo risulta recettivo durante le varie fasi di vita anche se nel fiore giovane e adulto la recettività dello stesso risulta massima. Lo stesso *trend* si osserva per i Brevistilo.

Osservazioni sul polline presente sia nella parte interna del tubo corollino sia sui petali esterni della corolla hanno portato a poter dire che:

- Nel fiore Longistilo il polline che si trova interno al tubo corollino è di entrambe le tipologie fiorali, lo stesso vale per il polline ritrovato sui petali esterni anche se in questo caso, pur essendo presenti entrambe le tipologie c'è una predominanza del polline più piccolo appartenente quindi alla tipologia Longistilo.
- Nel fiore Brevistilo, invece, il polline che si trova all'interno del tubo corollino appartiene al tipo Brevistilo (grandi dimensioni), mentre sulla parte esterna della corolla si ritrova polline di entrambe le tipologie.

Per quanto riguarda la fase dell'impollinazione, presso l'Orto Botanico di Portici, nonostante il monitoraggio quotidiano durante l'intero periodo di fioritura negli anni 2006, 2007 e 2008, non sono stati osservati molti impollinatori. Solo durante le giornate più soleggiate i fiori di *P. palinuri* sono stati visitati da imenotteri e ditteri che non è stato possibile catturare e quindi classificare.

Durante le osservazioni nelle stazioni di *P. palinuri* presenti nel suo ambiente naturale (Palinuro, nella zona dell'Antiquarium), sono stati osservati, soprattutto nel periodo finale della fioritura (marzo 2008), imenotteri appartenenti al genere *Bombus* e *Xilocopa*. Anche in questa situazione, la difficoltà di raggiungere le piante e quindi gli insetti, non ne ha consentito la cattura e quindi la precisa caratterizzazione delle specie.

Oltre alle osservazioni sugli impollinatori naturali, sono state condotte prove di impollinazione manuale in campo (Orto Botanico di Portici). Da questi esperimenti è emerso che la specie mostra una autoincompatibilità sia per quanto riguarda il proprio polline che quello di fiori diversi ma aventi la stessa morfologia. La finta impollinazione non ha prodotto alcun frutto (fig. 3.18).

Le piante presenti nella serra, che negli anni 2006 e 2007 non hanno mai prodotto frutti (capsule), a seguito del trasferimento manuale di polline di diversa morfologia (nel

febbraio 2008) hanno sviluppato le capsule.

La piante in serra, a prescindere dal posizionamento o meno dei cappucci di voile, non hanno modo di essere visitate (e quindi impollinate) dagli insetti pronubi.

I fiori di controllo, sia in serra che nell'ambiente esterno dell'orto, nel 2008 non hanno prodotto frutti, mentre negli anni passati ciò si era verificato. Si può ipotizzare che le condizioni climatiche di questo anno, in particolare le frequenti piogge e le temperature piuttosto basse, unite al vento, abbiano creato ostacoli al volo dei pronubi impedendo l'impollinazione. Negli anni 2006 e 2007, così come nel 2008, durante l'intero periodo di fioritura (metà gennaio-metà marzo) è stato effettuato un monitoraggio quotidiano del progredire degli stadi fiorali. Nei primi due anni, durante alcune giornate soleggiate, sono stati visti insetti visitare la specie, mentre nel 2008 questo non si è mai verificato.

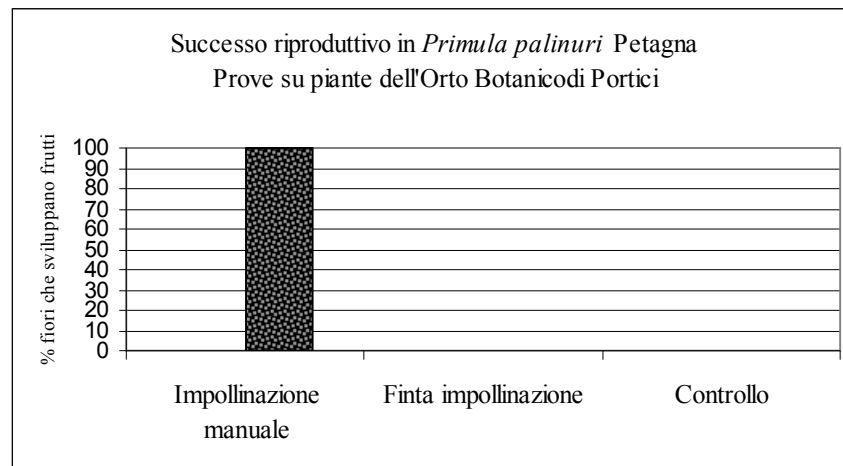


Fig. 3.18. Risultati di prove di impollinazione manuale, finta impollinazione e controllo in *P. Palinuri*.

Relativamente alle indagini sulla produzione di nettare, i fiori utilizzati, pur essendo di numero ridotto in quanto questa analisi è di tipo distruttivo, hanno tutti presentato presenza di nettare. La quantità di nettare prodotta mediamente da ciascun fiore alla base dell'ovario è risultata essere di  $0,63 \pm 0,37 \mu\text{l}$ .

### 3.3.3. Analisi funzionali delle fasi successive alla dispersione dei semi

I semi prodotti da piante presenti sull'arenaria pesano mediamente  $0,50 \pm 0,11 \text{ mg}$ , mentre quelli provenienti dal calcare pesano mediamente  $0,43 \pm 0,07$ . I due valori non sono statisticamente differenti.

La percentuale di germinazione è stata valutata per le due diverse origini (arenaria e calcare), in due diversi esperimenti.

Nel primo esperimento la percentuale di germinazione è stata valutata utilizzando un substrato di terriccio sterile: i risultati sono riportati in Fig. 3.19.

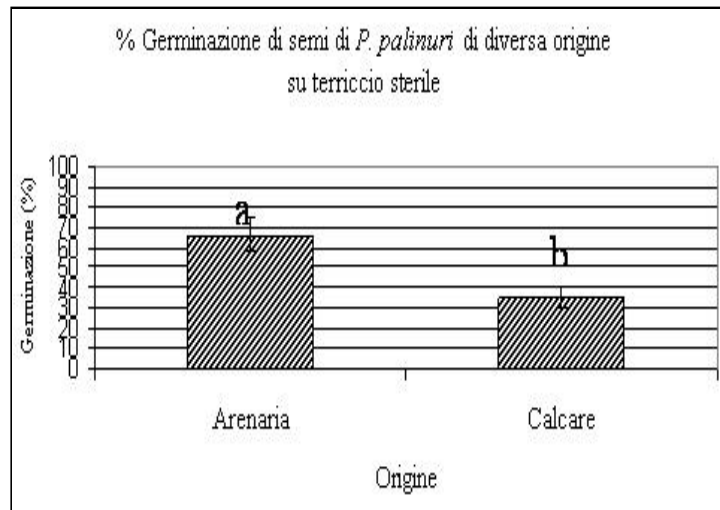


Fig. 3.19. Percentuale di germinazione di semi di *P. palinuri* aventi diversa origine su substrato di terriccio sterile. A lettere diverse corrispondono valori significativamente diversi ( $p < 0,005$ ).

Nel secondo esperimento la percentuale di germinazione è stata valutata utilizzando un substrato di agar sterile. I risultati sono riportati in Fig. 3.20.

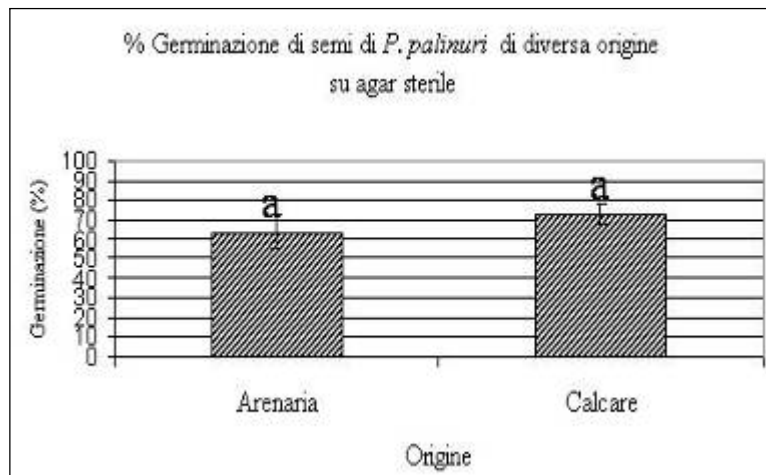


Fig. 3.20. Percentuale di germinazione di semi di *P. palinuri* aventi diversa origine su substrato di agar sterile. A lettere diverse corrispondono valori significativamente diversi ( $p < 0,005$ ).

I risultati delle prove di germinazione in diversi substrati di agar (per simulare diverse disponibilità idriche), sono mostrati in fig. 3.21. Solo il substrato costituito da agar 10% ha determinato una significativa riduzione della percentuale di germinazione.

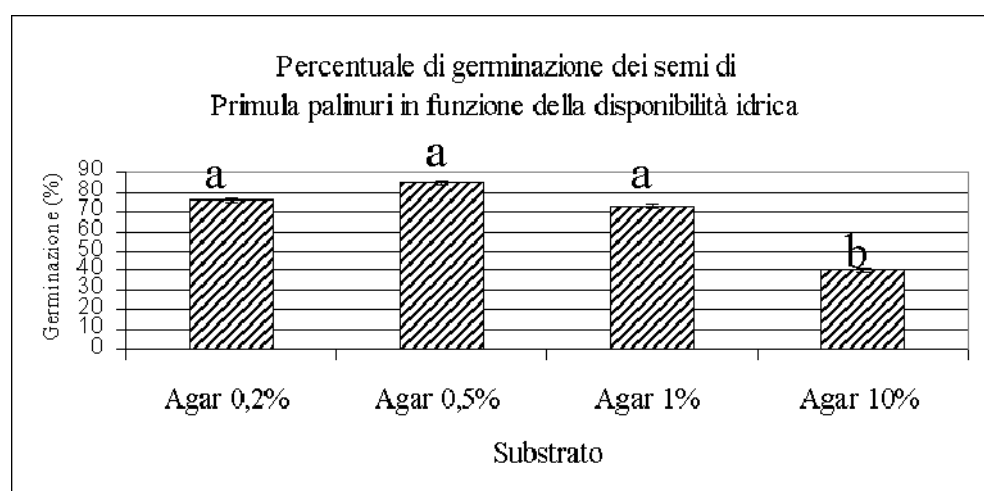


Fig. 3.21. Percentuale di germinazione di semi di *P. palinuri* su substrato di agar sterile a diverse concentrazioni. A lettere diverse corrispondono valori significativamente diversi ( $p < 0,005$ ).

La percentuale di germinazione dei semi provenienti dai due substrati (arenaria e calcare) in diverse condizioni di temperatura ha mostrato che, a prescindere dalla provenienza, i semi posti a temperature elevate non hanno mai germinato (Fig.3.22): Quelli posti a temperature intermedie hanno germinato solo dopo un periodo di esposizione al freddo.

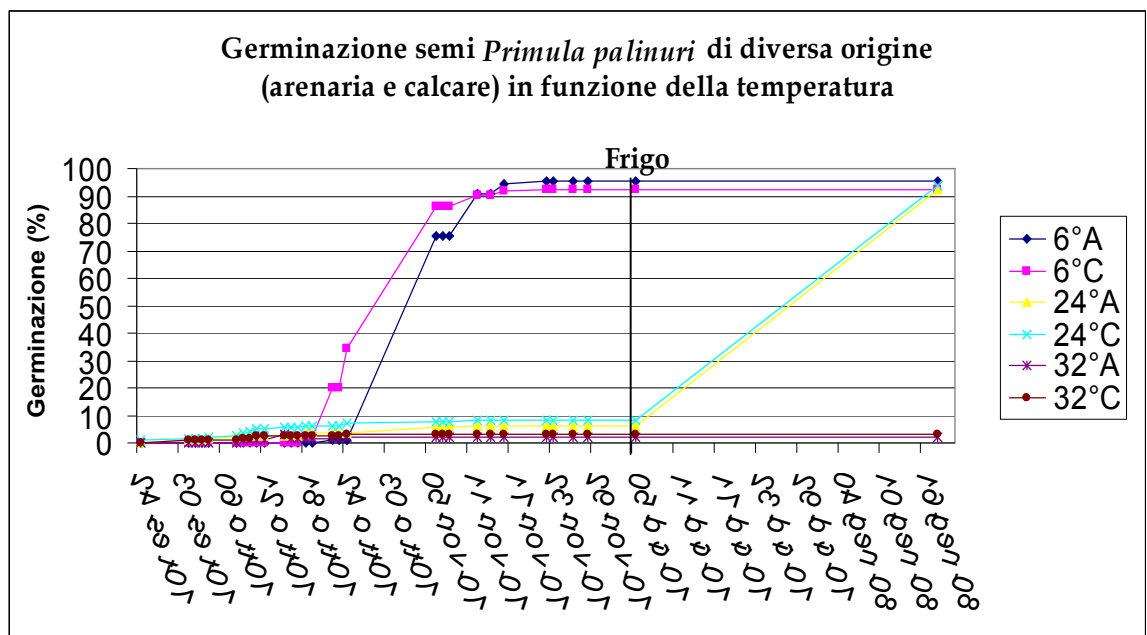


Fig. 3.22. Germinazione dei semi di *P. palinuri* di diversa origine in funzione della temperatura.

Durante e dopo la germinazione, sono stati individuati quattro stadi di sviluppo.

Il primo stadio corrisponde all'emergenza della radice-ipocotile attraverso il micropilo: in questa fase, la distinzione tra i tessuti della radice e quelli dell'ipocotile non è ancora ben evidente (Fig. 3.23. a)

Il secondo stadio corrisponde all'allungamento dell'ipocotile, all'iniziale sviluppo dei peli dell'ipocotile che appaiono come un anello di peli nella regione compresa tra l'ipocotile e la radice e alla comparsa dell'apice radicale attraverso questo anello di peli (Fig.3.23. b).

Lo stadio successivo corrisponde al completo sviluppo dei peli dell'ipocotile in un anello compatto ed uniforme mentre la radice continua il suo lento sviluppo raggiungendo una lunghezza non superiore ai 3 mm (Fig.3.23. c).

Durante lo stadio finale, i peli dell'ipocotile terminano il loro sviluppo mentre la radichetta continua a crescere e forma peli radicali nella zona di differenziazione (Fig.3.23. d); nello stesso tempo l'ipocotile continua il suo allungamento, causando la risalita dei cotiledoni e il loro distacco dagli involucri del seme.



Fig. 3.23. Stadi di sviluppo post-germinativi delle plantule di *P. palinuri*. a. Emergenza dell'ipocotile. b. comparsa dell'apice radicale attraverso l'anello di peli dell'ipocotile. c. Completo sviluppo dei peli dell'ipocotile. d. Allungamento della radice e sviluppo dei peli radicali.

La porzione inferiore dell'ipocotile ha mostrato un tropismo positivo: qualsiasi fosse la posizione del seme, questo si piega in modo da permettere all'anello di stendersi ed ancorare il seme appena germinato al substrato.

Le plantule trasferite sulla carta da filtro inumidita con il colorante hanno mostrato che i peli dell'ipocotile sono coinvolti anche nell'assunzione di acqua. Sotto allo stereo microscopio è stato possibile osservare i peli in contatto con la carta da filtro mentre assorbivano e trasferivano l'acqua colorata all'intero anello e agli altri tessuti in pochi minuti. Le successive sezioni trasversali dell'ipocotile hanno mostrato il colorante nel cilindro vascolare suggerendo che i peli dell'ipocotile possono nutrire e/o idratare l'intero tessuto sopra il terreno prima che la radice sia in grado di assicurare

l'assorbimento di acqua.

Le plantule sviluppatesi su diverse concentrazioni di Agar hanno mostrato che la formazione dei peli dell'ipocotile è dipendente dalla disponibilità di acqua.

Le analisi al microscopio hanno mostrato che la rottura dei tegumenti seminali durante la germinazione è causata sia dallo sviluppo della radice sia dall'allungamento dell'ipocotile. All'estrema base dell'ipocotile emergente, è possibile distinguere uno strato di cellule disposte con l'asse più lungo parallelo all'asse dell'ipocotile: queste cellule possono essere chiamate "cellule madri dei peli dell'ipocotile". La radice emergente rompe questo strato a costringe le cellule a spostarsi verso la periferia dell'asse dell'ipocotile. In questa fase, l'asse maggiore delle cellule madri dei peli dell'ipocotile forma un angolo di  $45^\circ$  con l'asse dell'ipocotile. Con il progredire dello sviluppo della radice, lo spostamento di queste cellule continua fino a quando l'angolo raggiunge almeno  $90^\circ$  e ciascuna cellula, si sviluppa in pelo unicellulare.

Le sezioni longitudinali mostrano anche la presenza di corpi sferici nelle cellule corticali dell'ipocotile. La microscopia a fluorescenza ha confermato che questi corpi rappresentano l'accumulo di polifenoli (Fig. 3.24) già presenti nell'embrione.

Inoltre, la microscopia a fluorescenza ha mostrato anche l'iniziale formazione di una ben sviluppata esodermide (Fig. 3.24.).

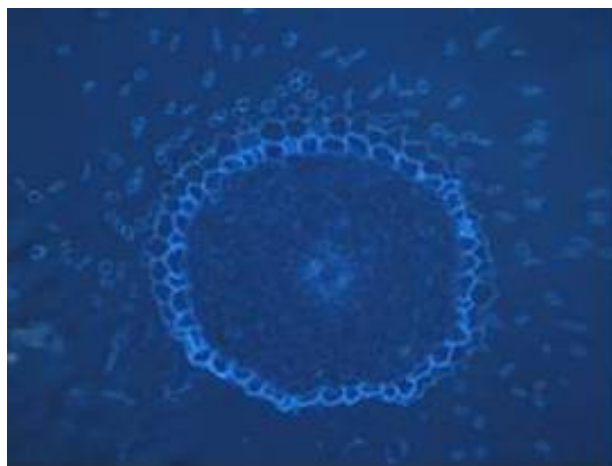


Fig. 3.24. Sezione trasversale dell'ipocotile di *P. palinuri*.

La percentuale di semi di *P. palinuri* che sviluppa un anello di peli attorno all'ipocotile è stata messa in relazione con il livello di disponibilità idrica: maggiore è la concentrazione dell'Agar (minore, quindi, la disponibilità idrica), maggiore è risultata essere la percentuale di peli dell'ipocotile formati (Fig. 3. 25) in entrambi i tipi di semi (arenaria e rocce calcaree).

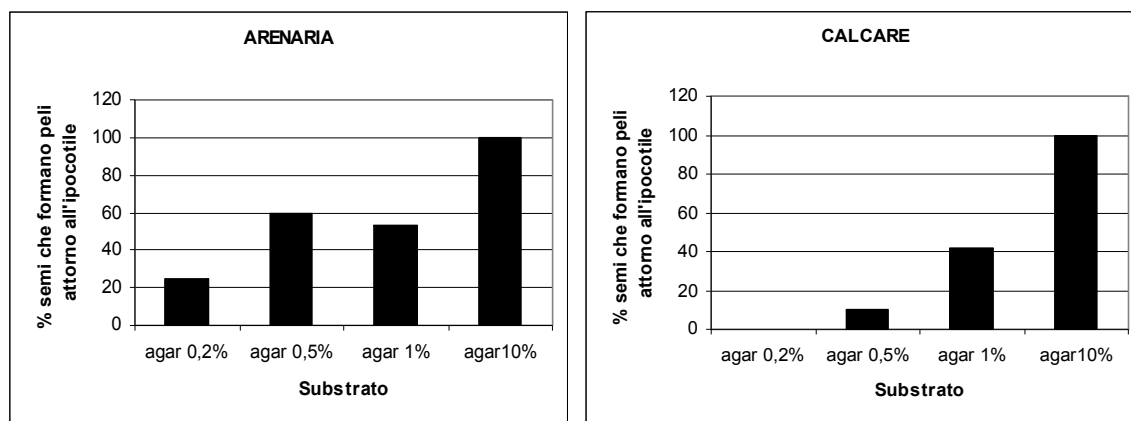


Fig. 3.25. Percentuale di semi di *P. palinuri* provenienti da arenaria (a sinistra) e dal calcare (a destra) che sviluppa un anello di peli attorno all'ipocotile.

La lunghezza dei peli dell'ipocotile è stata messa in relazione con il livello di disponibilità idrica: maggiore è stata la concentrazione dell'Agar (minore disponibilità idrica) più lunghi sono stati i peli dell'ipocotile in entrambi i tipi di semi (arenaria e rocce calcaree) (Fig. 3. 26).

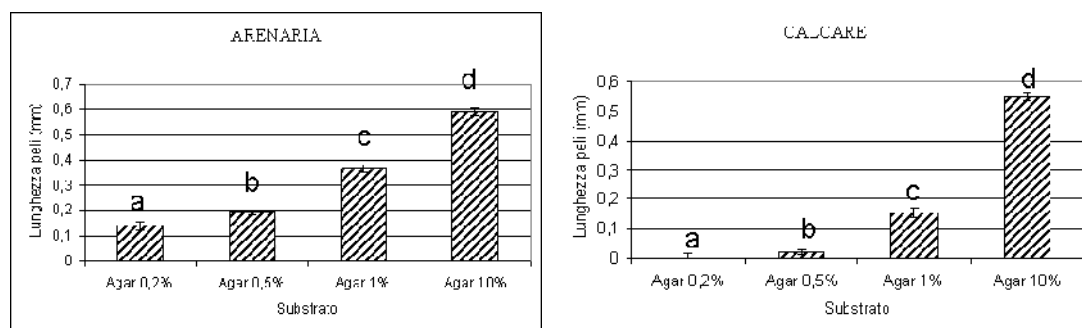


Fig. 3.26. Lunghezza dei peli dell'ipocotile in funzione del livello di disponibilità idrica. A lettere diverse corrispondono valori significativamente diversi ( $p < 0,05$ )



I risultati del monitoraggio relativo alla sopravvivenza delle plantule è iniziato a dicembre del 2007 e si è concluso alla fine di giugno 2008. Due mesi dopo la germinazione dei semi solo una minima parte delle plantule è sopravvissuta e dopo altri tre mesi tutte sono morte. La curva di sopravvivenza degli individui è riportata nella figura 3.27:

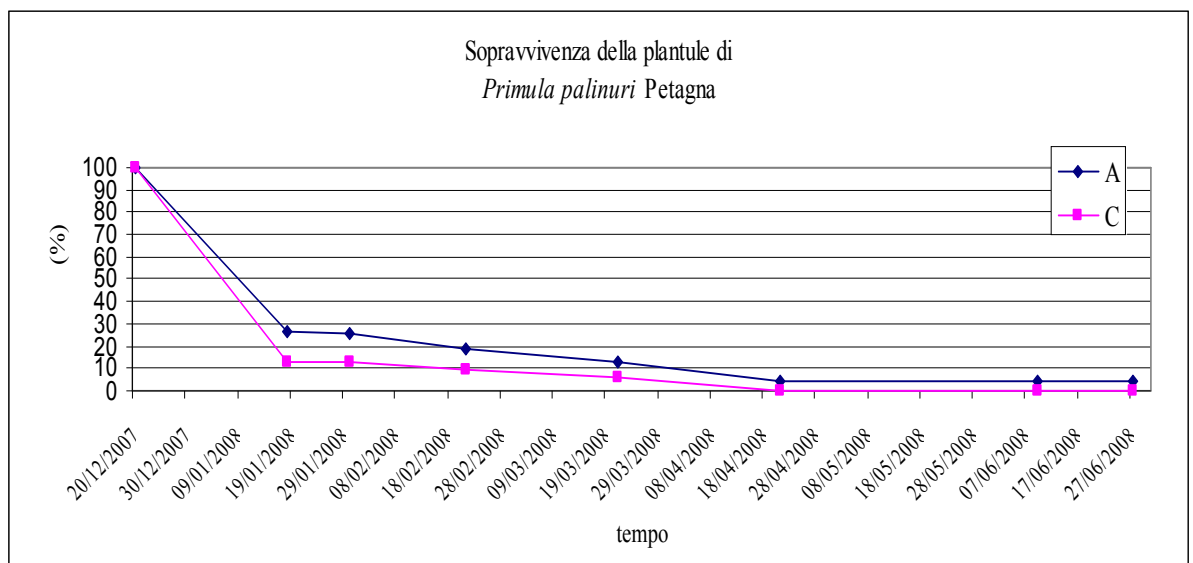


Fig. 3.27. Curva di sopravvivenza delle plantule di *P. palinuri* provenienti dai due diversi substrati.

La mortalità è avvenuta con andamento simile indipendentemente dal tipo di substrato in cui erano state trapiantate le plantule. Nella figura 3.28 si riporta la curva di sopravvivenza delle plantule trapiantate nei diversi substrati e monitorate a partire dall'inizio di maggio del 2007 fino alla fine di gennaio 2008, quando tutti gli individui sono morti.

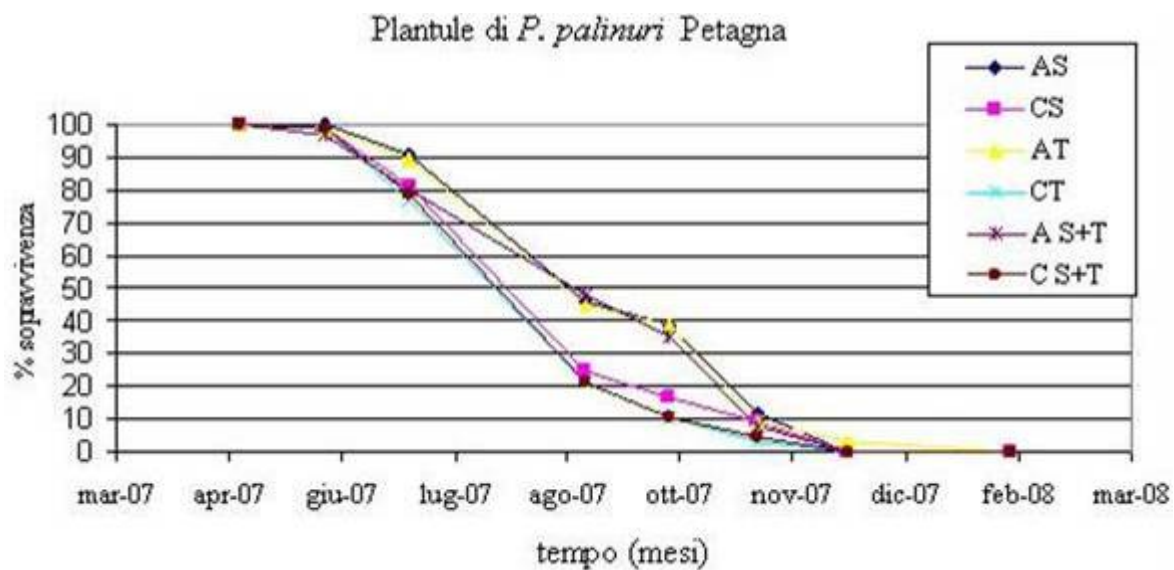


Fig. 3.28. Curva di sopravvivenza delle plantule di *P. palinuri* trapiantate su diversi substrati.

Al fine di indagare sul fenomeno della mortalità, il 26 aprile 2007, le plantule provenienti dai semi messi a germinare l'8 gennaio 2007, sono state preparate ed osservate al microscopio. E' emerso che le cellule parenchimatice erano ricche di amido, come si vede in fig. 3.29.

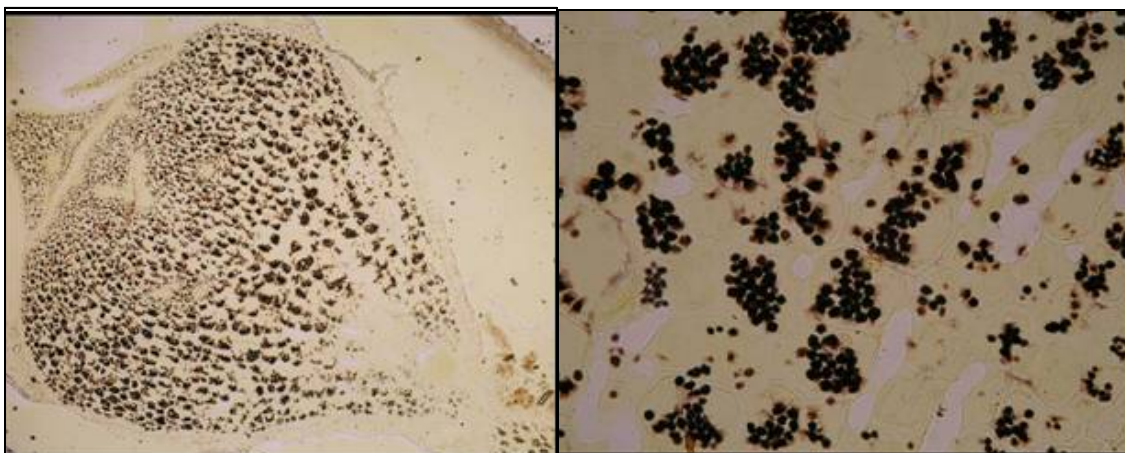


Fig.3.29. Sezioni longitudinali della plantula di *P. palinuri* colorate con IKI (Iodio Ioduro di Potassio).

Lo stesso è stato fatto, il 26 settembre 2007, con le plantule ormai morte, derivate da semi messi a germinare l'8 gennaio 2007. Le osservazioni al microscopio fluorescenza, hanno mostrato che le cellule parenchimatiche si sono progressivamente svuotate dell'amido (Fig. 3.30)

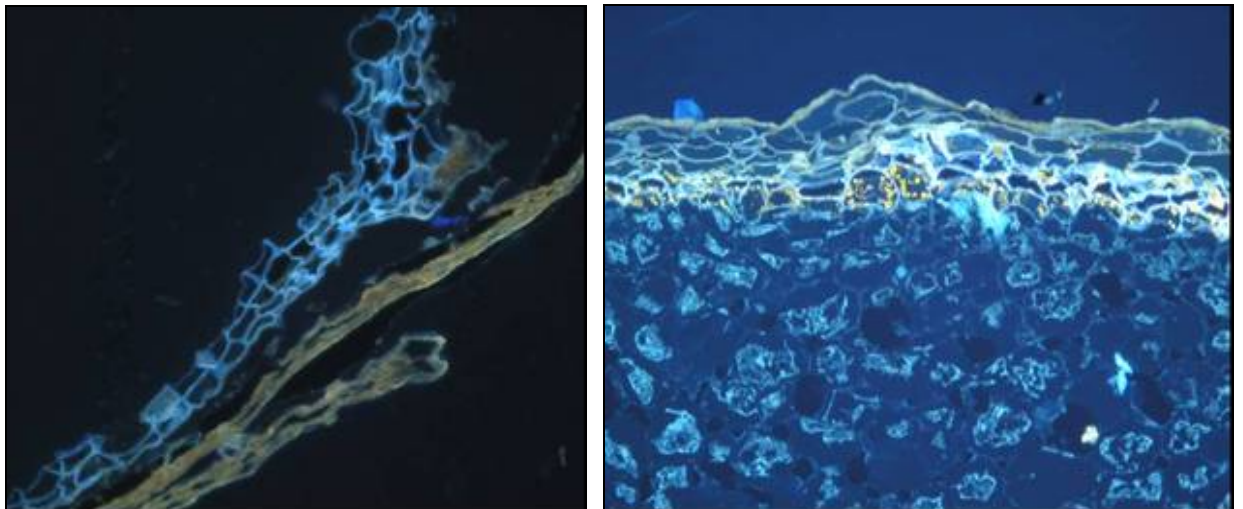


Fig. 3.30. A sinistra plantula morta vista all' Epifluorescenza con ancora un po' di amido nel parenchima, a destra plantula ormai completamente morta.

### 3.4. DISCUSSIONE

#### Forma biologica

Secondo Pizzolongo (1963), *Primula palinuri* è una geofita rizomatosa i cui rizomi, specialmente negli individui più sviluppati, sporgono notevolmente nella roccia, fino a 25-30 cm. Nella stagione sfavorevole alcune gemme rimangono nascoste nel terreno mentre altre sono sollevate dal suolo e protette dai residui delle foglie secche attaccate ai rizomi.

Secondo Davis (1951), *P. palinuri* è una neofita rizomatosa e possiede quindi una forma biologica che, è poco adatta all'ambiente rupicolo per il quale egli ritiene più idonee le camefite.

Gli studi condotti durante l'attività di dottorato hanno mostrato che i rizomi di *P. palinuri* non rimangono del tutto coperti dal terreno durante la stagione sfavorevole, anzi spesso sporgono fino a 25-30 cm dal suolo. Questa specie si comporta da camefita rizomatosa con andamento strisciante. A ciò bisogna aggiungere che *P. palinuri* ha una notevole fertilità perché produce numerosi semi di cui una percentuale elevata germina nelle anfrattuosità delle rocce. Per questo aspetto mostra caratteristiche simili ad una neofita rupicola.

I rilevamenti riportati da Pizzolongo (1963) mostrano che *P. palinuri* ha una fitosociologia del tutto particolare. Essa sembra partecipare a due raggruppamenti vegetali alquanto diversi tra loro; quello delle *Asplenietea-rupestris* e quello delle *Chrithmo-staticetea*; però in entrambi i raggruppamenti il suo insediamento è condizionato dalla forte inclinazione della roccia e dall'esposizione a settentrione. Ciò, secondo Pizzolongo (1961), costituisce un esempio di come si possono comportare alcune piante rare che, pur essendo proprie di luoghi montani o submontani, mostrano delle curiose preferenze per gli habitat costieri. Secondo Griggs (1940) la spiegazione del fatto che una gran parte delle piante rare inglesi si trovino vicino alle coste, sebbene esse non siano piante marittime, è che le piante rare trovano in determinati ambienti, quali le coste o altri habitat instabili, condizioni adatte alla loro sopravvivenza per la diminuita concorrenza delle altre specie. Le specie rare, quindi, spesso si rifugiano quegli ambienti dove si riduce al massimo la competizione con le altre specie. Questa considerazione potrebbe spiegare perché in alcune stazioni *P. palinuri* forma delle fasce anche molto strette, al margine della rimanente vegetazione, sulle pareti cedevoli

verticali o un po' rovesciate costituite da arenarie friabili.

Questa pianta endemica infatti preferisce vivere sulle pareti rocciose compatte e verticali dove oggi si realizzano particolari condizioni microclimatiche che probabilmente ricordano il clima esistente all'inizio del Terziario in vaste aree della zona Paleoequatoriale, corrispondente all'antico areale del genere *Primula*. Secondo Griggs (1940), le rocce verticali costituirebbero un habitat di rifugio per le piante rare; il loro ambiente, essendo incapace di evoluzione è quindi altamente statico e conservatore (Clements, 1934). Pertanto, esso offre possibilità di sempre nuovi impianti per l'incessante deterioramento della roccia ed è l'ideale per specie che non sono più in perfetto equilibrio con la vegetazione di una data regione (Francini e Messeri, 1955). In armonia con tali considerazioni, la *P. palinuri* vedrebbe rispettate le sue esigenze ecologiche anche sulle arenarie stratificate, i cui continui cedimenti le offrono in continuazione nuove possibilità di impianto.

Queste stazioni però oggi corrono il rischio di essere distrutte trovandosi molto vicine a Palinuro, in notevole valorizzazione turistica (Pizzolongo, 1963). Tale pericolo fu denunciato anche da Sprenger che già nel 1906 propose la costituzione di una Società protettrice della pianta.

Per quanto riguarda i fattori ambientali a cui questa *Primula* sembra legata nelle stazioni naturali, è stata messa in evidenza da Ricciardi (1973) la preferenza che questa dimostra nei confronti della matrice del substrato. In tutto il suo areale essa si insedia quasi esclusivamente sui pochi affioramenti di calcari giurassici e di dolomie triassiche ancora riscontrabili lungo questo tratto di costa. Tuttavia questa pianta riesce a vegetare bene anche sulle pareti di arenarie stratificate orizzontalmente, frequenti nel versante Nord-Ovest del Promontorio di Palinuro, dall'*Antiquarium* fino al Porticciolo. Gli strati orizzontali di arenaria friabile costituiscono, nel complesso, pareti verticali sulle quali si rifugia la *Primula*, colonizzandole nelle parti più alte esposte a settentrione (Pizzolongo, 1963).

Le analisi di alcuni campioni di terreno prelevati in località diverse in corrispondenza della rizosfera della *Primula*, hanno rivelato che il pH è quasi neutro, che i carbonati si aggirano intorno al 15% e che l'humus è generalmente scarso in relazione alla notevole inclinazione delle pareti che non consente l'accumulo della sostanza organica (Pizzolongo, 1963). Secondo Chiarugi (1954a) la localizzazione della *P. palinuri* sulle alte rocce calcaree verticali prospicienti sul mare assicura alla pianta condizioni ecologiche particolari: dal punto di vista termico per la forte insolazione diurna, dal

punto di vista idrico per l'accentuata umidità dell'aria durante una parte del giorno e la forte caduta della rugiada sulle rocce durante la notte.

Questa specie comunque non vive esclusivamente sulle pareti verticali. Ricciardi (1971) descrive le differenti caratteristiche morfologiche di *P. palinuri* riscontrate negli insediamenti in condizioni diverse dalla verticalità quasi assoluta. Gli individui che costituiscono i popolamenti delle pareti verticali presentano foglie a lamina perfettamente piana e disposte parallelamente al substrato, costituenti una vera e propria rosetta. Nella porzione ipogea si nota sempre un rizoma di notevole sviluppo, con scarse radici capillari, sporgente talora per un lungo tratto dalle fessure. Le piante cresciute in posizione orizzontale si presentano, invece, assai più sviluppate; le foglie sono piegate lungo la nervatura mediana ed erette, formando con il piano orizzontale un angolo di 45°, per cui l'aspetto della pianta non è esattamente rosolato; lo scapo florale è molto ricco. Il rizoma è molto ridotto, raggiungendo al massimo la lunghezza di un paio di centimetri; le radici secondarie sono molto sviluppate, abbondantemente ramificate e, intrecciandosi, trattengono un substrato di circa un centimetro di spessore, costituito di materiale detritico, derivante dalla disgregazione delle rocce sovrastanti.

Il comportamento degli individui cresciuti nell'Orto Botanico di Portici suggerisce qualche considerazione sull'ecologia di *Primula palinuri*. Queste piante, infatti, non solo si sono conservate *ex situ* nel migliore dei modi ma hanno dato anche origine ad una discendenza fertile. Considerato che, sia i massi calcarei, sia il terriccio nel quale sono state messe a dimora, sono di natura diversa da quella delle loro stazioni naturali, è evidente che la specie potrebbe potenzialmente vivere anche in aree geografiche diverse da quelle in cui si trova confinata e che il substrato non è un fattore particolarmente limitante per il suo sviluppo.

Secondo Pizzolongo (1963), le possibilità di vita e soprattutto di diffusione per *Primula palinuri* sarebbero legate prevalentemente al fattore esposizione in quanto regolatore dell'umidità ambientale e la sua costante assenza dai tratti di costa rivolti verso i quadranti meridionali ed orientali, potrebbe essere la conseguenza del mancato raggiungimento di tassi di umidità soddisfacenti. Anche La Valva e Ricciardi (1976-77) analizzando la vegetazione rupicola dell'isola di Dino, riferiscono di una facies in cui *P. palinuri* sembrerebbe essere indice di una più accentuata mesofilia rispetto ad altri raggruppamenti degli *Asplenietea rupestris*, mesofilia confermata, tra l'altro, dalla presenza di *Pistacia terebinthus* L. in prossimità di tali raggruppamenti. Del resto, secondo Pizzolongo (1963), la sopravvivenza in condizioni di esposizione sub-ottimali

può essere una delle cause della mancata fioritura degli individui in alcuni punti dell'Orto Botanico di Portici.

### **Caratteristiche della foglia**

La lamina fogliare di *P. palinuri* ha una forma molto espansa che, insieme alla sua anatomia interna, non rende questa specie adattata agli ambienti aridi del clima mediterraneo.

L'anatomia fogliare della *P. palinuri* è tipica delle piante mesofite (e non alofite) e ciò conferma l'ipotesi di Chiarugi (1952) che la considera sopravvissuta di una flora montana tropicale o subtropicale.

*Primula palinuri* è provvista di stomi anche sulla pagina superiore della foglia. Tale particolarità anatomica starebbe ad indicare livelli di traspirazione per i quali si rende indispensabile un'adeguata disponibilità idrica. Accanto a questa struttura tipica delle piante mesofite, *P. palinuri* presenta una particolarità nelle cellule del mesofillo le quali sono ricche di mucillagini e di sostanze pectiche (Pizzolongo, 1963). L'anatomia fogliare di *P. palinuri* ricorda in parte quella di alcune specie rupicole perché mentre possiedono dei dispositivi per agevolare la traspirazione, mostrano anche delle peculiarità strutturali atte a ritardarla, come le mucillagini e le sostanze pectiche che, come è noto, una volta imbibite, cedono l'acqua con molta lentezza. Tale tipo di struttura fogliare, secondo l'interpretazione sia di Chiarugi (1952) sia di Francini e Messeri (1955), sarebbe indice di condizioni microclimatiche con oscillazioni a ritmo diurno piuttosto che annuale, con precipitazioni frequenti e con forte umidità dell'aria. Del resto, essendo una specie decidua estiva, le foglie non hanno evoluto adattamenti morfo-funzionali per fronteggiare il periodo di aridità, ma è l'intera pianta che evita la stagione avversa privandosi di tutte le foglie.

### **Caratteristiche del nettario**

Il nettario, struttura ghiandolare coinvolta nelle secrezioni di nettare, si mostra in *P. palinuri*, costituito da una epidermide con cuticola dotata di "nettaro-stomata" (Nepi e Pacini, 2007). Trattasi di stomi modificati da un tessuto parenchimatico costituito da piccole cellule isodiametriche con un denso citoplasma, parete sottile, piccoli vacuoli e grandi nuclei, e da un tessuto sottostante (parenchima del sub nettario) costituito da cellule più grandi, lasse, grandi spazi intercellulari. È qui che giungono i fasci vascolari. La maggior parte della fotosintesi ha luogo nel parenchima del sub nettario dove è localizzata la maggior parte della clorofilla e dei fasci vascolari. Nel caso di *P. palinuri*

il basso tasso di secrezione del nettare implica una fotosintesi istantanea (Nepi e Pacini, 2007), per cui nel parenchima sono distribuiti dei cloro-amiloplasti, ovvero cloroplasti con pochi tilacoidi.

### **Distilia**

Secondo la teoria della reciprocità, l'altezza dello stamma deve seguire l'altezza delle antere a seconda del variare della lunghezza della corolla. Inoltre la distanza tra stamma e antere deve essere un valore costante indipendente dalla lunghezza della corolla (Faivre & McDade, 2001).

La distilia, ed in generale l'eterostilia, si riferiscono a quelle situazioni in cui una specie vegetale presenta due o più arrangiamenti nelle reciproche posizioni di stamma e antere. Si tratta di un polimorfismo genetico che fornisce un meccanismo meccanico per promuovere l'impollinazione incrociata (*outbreeding*).

Le piante *pin*, nelle quali lo stilo è lungo quanto il tubo corollino, lo stamma è esposto alla bocca del tubo della corolla e le antere sono fuse alla parte interna della corolla, circa a metà della sua lunghezza (guardando il fiore dall'alto, lo stamma assomiglia alla testa di uno spillo, da qui *pin* = spillo). Le piante *thrum*, hanno le antere sono posizionate alla bocca del tubo corollino e lo stilo è lungo solo la metà del tubo corollino.

Il polline di una pianta Brevistilo può cadere lungo il tubo corollino sul suo stesso stamma.

Infatti lo stamma è maturo e recettivo al polline circa 2-3 giorni prima della deiscenza delle proprie antere (i fiori sono protogini) e il polline Brevistilo è meccanicamente incapace di fecondare uno stamma Brevistilo.

Questo polimorfismo genetico è controllato da un supergene con tre componenti principali.

Le diverse dimensioni del polline restringono le possibilità di incroci Brevistilo x Brevistilo e Longistilo x Longistilo. Il polline Longistilo, più piccolo e quindi con una minore quantità di sostanze di riserva, è bene equipaggiato per mandare il suo tubetto pollinico germinante lungo il corto stilo del Brevistilo. Incroci Longistilo x Longistilo possono avvenire, ma a bassa frequenza. Il polline Brevistilo ha le riserve nutritive per far germinare il proprio tubetto pollinico lungo lo stilo lungo (PIN), quindi più che sufficiente a penetrare nel corto stilo brevistilo. Comunque il maggior diametro del tubetto pollinico del Brevistilo, è incapace di penetrare la superficie dello stilo



Brevistilo, sebbene possa penetrare lo stilo del Longistilo. Di conseguenza, l'impollinazione Brevistilo x Brevistilo è meccanicamente impossibile. Le impollinazioni di successo sono Longistilo x Brevistilo e Brevistilo x Longistilo. Le piante Longistilo produrranno gameti recessivi, mentre le piante Brevistilo produrranno un ugual numero di gameti dominanti e recessivi. Si produrranno dunque eterozigoti (brevistilo) ed omozigoti recessivi (Longistilo) in ugual numero. Comunque, poiché un piccolo numero di incroci Longistilo x Longistilo può avvenire, può esserci un leggero eccesso di Longistilo rispetto ai brevistilo in una popolazione.

Molte specie di *Primula* endemiche sono strettamente imparentate con altre piante subartiche che derivano da un antenato comune, nelle quali la produzione di semi ad elevate latitudini è garantita, nonostante la difficoltà a reperire pronubi in tali ambienti. La distilia, accompagnata da auto-incompatibilità e da incompatibilità tra la medesima morfologia, può essere rischiosa durante stagioni di fioritura limitate.

### **Impollinazione**

*P. palinuri* necessita di impollinatori affinché la riproduzione sessuale avvenga con successo. Questo è reso evidente, oltre che dalla distilia, anche dal rapporto tra il numero di granuli di polline e il numero di ovuli per ovario (P/O).

*P. palinuri* presenta un rapporto polline/ovuli più elevato rispetto a *P. auricola* (Mazer & Hultgard, 1993), per questo si ritiene che si riproduca soprattutto mediante impollinazione incrociata. Secondo Cruden (1979), la stima del livello di Outcrossing può derivare dal rapporto P/O, e valori di questo rapporto superiori a 2000 sono associati alla xenogamia obbligata.

Un insetto impollinatore, che atterra sulla piattaforma fornita dal fiore di *P. palinuri*, inserirà la sua proboscide lungo il tubo corollino per prendere il nettare alla base, e così facendo preleverà il polline in una delle due posizioni. Così il polline di una pianta Brevistilo verrà trasferito con buona probabilità allo stigma di una pianta Longistilo, e viceversa.

Le condizioni ambientali che impongono limiti all'attività degli impollinatori possono essere affrontate attraendo impollinatori efficaci e/o di più tipi. In precedenti studi condotti su altre specie di primula (*P. parryi* e *P. angustifolia*) è emerso che anche una sola visita può essere sufficiente a produrre semi. In particolare, imenotteri appartenenti al genere *Bombus* spp. si caricano notevolmente del polline di *Primula*. Nonostante la loro sensibilità alle basse temperature e le elevate richieste energetiche (Arroyo *et al.*,

1982; Levesque and Burget, 1982), le specie di *Bombus* possono essere efficienti impollinatori alpini grazie al loro grande corpo che consente loro di volare in condizioni ventose, i peli corporei e le modalità di bottinamento (Kevan and Baker, 1983). Lavori condotti in altre zone alpine hanno evidenziato che i Lepidotteri sono spesso importanti impollinatori ad elevati altitudini (Arroyo *et al.*, 1982). I Lepidotteri hanno una lunga proboscide che può facilmente raggiungere il nettare alla base del lungo tubo corollino, come quello delle specie di *Primula*. I Lepidotteri tendono a compiere voli più lunghi tra una visita e la successiva (rispetto agli imenotteri) e così facendo possono contribuire ad aumentare il flusso di polline tra popolazioni a più ampia distribuzione. (Schmitt, 1980). Anche i ditteri vengono considerati buoni agenti di impollinazione nelle zone alpine anche se spesso mostrano un modello di foraggiamento irregolare (Faegri & van der Pijl, 1979). Kevan (1972) suggerisce che le mosche possano essere agenti di impollinazione piuttosto buoni in ambienti alpini a causa della costanza fiorale nella stagione di crescita limitata nel tempo. I Sirfidi trasportano polline. Membri delle famiglie dei Collemboli e dei Tisanotteri, sono estremamente piccoli e probabilmente incapaci di trasportare il polline efficacemente.

In un lavoro di Vicidomini (2007), è emerso che la *Xilocopa violacea* visita 742 specie e varietà di fiori, appartenenti ad 85 famiglie differenti, un dato molto simile a quello riportato per *Apis mellifera* (<http://www.apicoltura2000.it/flora.htm>). Tra queste anche le Primulaceae (*Primula sp.*, *P. acaulis*, *P. malacoides*, *P. obconica*, *P. veris* (Vicidomini, 2002) sono state individuate come specie regolarmente visitate dalla *X. violacea*.

Insetti del genere *Bombus* e *Xilolopa* sono stati avvistati mentre visitavano i fiori di *P. palinuri*. Ciascuna pianta, pur offrendo un'esigua ricompensa agli impollinatori, mostra un'elevata durata di vita ed una scalarità nella produzione dei fiori. Anche se il numero di fiori portato da ciascun scapo fiorale non è elevato (questo potrebbe non attrarre sufficientemente le visite dei pronubi), *P. palinuri* può compensare attraverso la tendenza a crescere in gruppi. Anche in questo caso, il costo della competizione individuale potrebbe essere superato dai vantaggi derivanti da un aumento nei fiori che possono maggiormente attrarre le visite degli impollinatori (Waser, 1983).

### **Caratteristiche morfo-funzionali del polline**

Le sostanze di riserva del polline sono molto importanti nella germinazione del granulo e nello sviluppo del tubetto pollinico che ha la funzione di attraversare i tessuti

dell'ovario permettendo al microgamete di raggiungere l'oosfera e di fecondarla. I composti energetici presenti nei pollini sono generalmente amidi e lipidi. L'amido, accumulato in amiloplasti nel polline deriva dalla polimerizzazione di zuccheri prodotti durante l'attività fotosintetica dello sporofito e la successiva traslocazione attraverso le cellule del tappeto. I lipidi sono contenuti in piccole vescicole che si staccano dal reticolo endoplasmatico. Durante la formazione dei granuli di polline si assiste al progressivo accumulo di amido che in alcune specie viene degradato in zuccheri solubili al momento della dispersione o, più spesso, al momento della germinazione. In altre specie, durante le diverse fasi di sviluppo del granulo di polline, dopo la completa o parziale sintesi degli zuccheri in amido si verifica la loro trasformazione in lipidi. Questi ultimi saranno degradati nuovamente in zuccheri prima o durante la germinazione (Pacini & Franchi 1988; Speranza *et al.*, 1997).

Lo stretto legame tra il metabolismo dell'amido e quello dei lipidi potrebbe spiegare la varietà di combinazione della presenza/assenza di entrambi nelle specie analizzate. La presenza di amido o lipidi nella fase di maturità del granulo pollinico è stata interpretata come un processo evolutivo di adattamento al tipo di impollinazione. Secondo questa teoria, i lipidi, avendo maggiore potere energetico per unità di peso rispetto all'amido, meglio si adattano come sostanza di riserva dei pollini delle specie anemofile che si avvalgono di granuli più piccoli e leggeri di quelli delle specie entomofile (Baker & Baker, 1979). Gli stessi autori hanno dimostrato che i granuli pollinici privi di amido ma ricchi di lipidi, sono tipici di impollinazione dovuta ad api e mosche, soprattutto quando non sono offerte altre ricompense ai pronubi. I granuli ricchi di amido (che possono contenere un po' di lipidi), sono tipici di specie che si auto-impollinano, anemofile o impollinate da lepidotteri o uccelli. Nel caso di *P. palinuri*, il polline in fase di dispersione presenta lipidi come sostanze di riserva pertanto si ritiene che questa specie offra questo tipo di ricompensa ai suoi impollinatori, dal momento che il nettare viene prodotto in limitate quantità .

La riproduzione sessuale nelle angiosperme è costituita da una serie integrata di sottosistemi, ciascuno dei quali deve funzionare correttamente per consentire la fecondazione e la maturazione del seme. E' stato dimostrato che la temperatura interferisce con ognuno di questi stadi. Per questo l'effetto dei fattori ambientali è stato studiato sulle caratteristiche funzionali del polline.

Durante il periodo che intercorre tra la deiscenza delle antere e l'atterraggio sulla

superficie dello stamma, i granuli di polline sono spesso esposti a vari cambiamenti nelle condizioni di temperatura ed umidità. E' ben documentato che la variabilità meteorologica e le alte temperature sono fattori che influiscono sul successo dell'impollinazione e determinano una scarsa produzione di frutti (Thompson 1975, Herrero & Johnson 1980). L'umidità relativa (RH) è un altro fattore che influenza la vitalità dei granuli di polline dopo che questi sono stati rilasciati dalle antere (Pacini 1990). In un ambiente naturale la temperatura e l'umidità relativa variano continuamente ed entrambi i fattori possono essere strumentalmente monitorati per predire il loro effetto sulla vitalità del polline delle specie studiate. L'influenza dei fattori ambientali sulla vitalità del polline può essere studiata simulando differenti temperature e condizioni di umidità.

La tolleranza ad umidità relative alte e basse è altamente variabile tra le specie (Bassani et al. 1994) e sono state individuate differenti risposte della membrana plasmatica all'RH nell'ambito di piante dello stesso gruppo ma che vivono in diversi habitat (Chaudhury & Shivanna 1987). Secondo Shivanna et al. (1991) l'idratazione del polline sembra attivare alcuni processi fisiologici che rendono il polline suscettibile agli stress termici.

In alcuni casi le alte temperature durante la formazione del polline riducono la percentuale di polline vitale ma ne aumentano il numero totale di granuli. Inoltre, la temperatura influenza i meccanismi di incompatibilità: in alcune specie si è visto che le temperature elevate aumentano la crescita del tubetto pollinico e superano i meccanismi di incompatibilità gametofitica. (Chen & Gibson, 1973; Hiratsuka & Tomita, 1989; Williams & Knox, 1982).

In un lavoro di McKee e Richards (1998), è emerso che la germinazione del polline sullo stamma della stessa morfologia (impollinazione "illegittima") di *Primula veris* veniva significativamente stimolata dall'aumento della temperatura. Questo può far riflettere anche sulle possibili conseguenze del riscaldamento globale sull'abbattimento dei meccanismi che controllano l'autoincompatibilità e che promuovono, quindi, gli incroci. Se l'aumentata temperatura tenderà a facilitare, anche per le specie endemiche e rare come *Primula palinuri*, incroci "illegittimi", potremmo avere una ridotta variabilità genetica entro la specie con conseguenze disastrose per la possibilità di adattamento e sopravvivenza delle specie in condizioni ambientali e climatiche mutate.

Affinché le interazioni tra temperatura e processi riproduttivi siano di importanza evolutiva devono persistere attraverso le generazioni. In *Zea mays*, le differenze

genotipiche nelle reazioni del polline alle elevate temperature sono state individuate a livello gametofitica. Questo suggerisce che la variazione alla tolleranza al calore può consentire una efficace selezione a livello del gamete (Lyakh & Soroka, 1993).

Frova e Sarigola (1994) hanno identificato geni che controllano la crescita del tubetto pollinico a basse temperature, geni che controllano la germinazione del polline e la crescita del tubetto pollinico ad elevate temperature. I geni che controllano la tolleranza sia alle elevate temperature (Lyakh & Soroka, 1993) che alle basse temperature (Frova *et al.*, 1995) sono espressi sia nel microgametofito che nello sporofito, in modo tale che temperature anomale nel momento della fecondazione possono selezionare la prole con polline termo-tollerante. Se in futuro si verificherà un aumento delle temperature ambientali a causa dell'effetto serra, si può ragionevolmente ipotizzare che le caratteristiche riproduttive ed adattative di molte specie possano andare incontro a cambiamenti evolutivi basati sulla variazione genetica per queste caratteristiche che già esistono. Se le piante non riescono ad evolvere per tollerare nuovi climi, le modalità di riproduzione sessuale e vegetativa possono cambiare e di conseguenza potrebbe cambiare anche la composizione della vegetazione naturale

Gli esperimenti condotti sul polline di *P. palinuri* hanno mostrato come per questa specie le temperature ottimali per lo sviluppo dei microgametofiti siano piuttosto basse. Se è questo che ha spinto la specie verso la fioritura di fine inverno allora, in uno scenario di aumento di temperature, potrebbe determinare una spinta selettiva verso un ulteriore anticipo dell'antesi. Qualora il cambiamento climatico fosse troppo repentino rispetto alla velocità di adattamento della specie, allora si potrebbe ipotizzare uno scenario in cui questa specie dovrebbe sopravvivere senza riprodursi gamicamente.

### **Successo riproduttivo**

Il numero di semi prodotti da una pianta e i fattori che influenzano la produzione di semi possono variare enormemente a seconda dell'anno e del sito (Baker *et al.* 2000). La quantità di semi prodotti dalle piante è limitata da fattori interni ed esterni, così come dalle interazioni tra questi fattori. Tra i fattori interni, le dimensioni della singola pianta sono fortemente connesse allo schema riproduttivo e alla fecondità potenziale: in generale individui più grandi producono più semi rispetto alle piante più piccole (Samson & Werk, 1996). Un gran numero di fattori esterni, sia biotici che abiotici, possono interferire con la produzione dei semi, inclusa la disponibilità di risorse e di polline (Washitani *et al.* 1996), la predazione (Horvitz & Schemske, 1990) e l'ambiente

fisico (Inouye *et al.* 2003). Tra questi fattori, la disponibilità di polline determina la quantità di semi non solo direttamente ma anche indirettamente, attraverso il grado di incompatibilità fisiologica tra il polline disponibile e i fiori che lo ricevono. La disponibilità di polline delle piante impollinate da animali dipende dall'attività dell'impollinatore che gestisce la deposizione del polline compatibile sugli stimmi (Harder & Barrett, 1996). *Primula palinuri* Petagna presenta l'eterostilia, con auto-incompatibilità e incompatibilità tra la stessa morfologia. La produzione di semi nelle specie eteromorfe dipende fortemente dagli impollinatori per l'impollinazione incrociata tra morfologie mutuamente compatibili (Ishihama *et al.*, 2003; Watanabe *et al.* 2003).

Per quanto riguarda *P. palinuri* l'osservazione di un elevato numero di semi prodotti in piante raggruppate potrebbe essere dovuto alla maggiore frequenza di visita e alla maggiore probabilità di ricevere polline compatibile della diversa morfologia entro le vicinanze della specie. Tra i parametri della struttura spaziale della popolazione, la dimensione della zona dovrebbe influenzare l'attrazione degli impollinatori e le dimensioni dell'effettivo carico di polline. Come effetto combinato dei due fattori, l'aumento degli impollinatori (e quindi di polline) dovrebbe portare ad un aumento nella produzione di semi. La disponibilità del partner con cui accoppiarsi, che è determinato soprattutto dal grado di isolamento tra fiori compatibili, potrebbe essere un altro importante fattore limitante per il trasferimento di polline oltre che per la disponibilità di impollinatori (Nishihiro & Washitani, 1998). Il ridotto numero di specie compatibili, così come di impollinatori, potrebbe portare alla limitazione di polline, e di conseguenza ad una minore produzione di semi negli individui isolati. In questi casi, la riduzione nella produzione di semi può essere determinata da fenomeni avvenuti in fase pre-zigotica (per es. mancanza di impollinazione, mancato sviluppo dei gametofiti) (Marshall *et al.* 2000; Pasonen *et al.*, 2001) o post-zigotica (aborto del frutto, depressione da incrocio che agisce precocemente) (Montalvo, 1992).

La capacità della progenie di fare germinare i propri semi è influenzata dalla struttura spaziale della popolazione negli habitat naturali. Le piante materne isolate producono semi con una capacità germinativa significativamente inferiore paragonata a quella di semi prodotti da piante di popolazioni dense e numerose. Le differenze nella capacità di germinazione possono essere spiegate attraverso gli effetti combinati della competizione del polline tra incroci e in-incroci. L'aggregazione spaziale di diversi genotipi può facilitare l'impollinazione mista da parte dei bombi (Matsumura & Washitani, 2002):

ciò determina una paternità multipla, che si ritiene aumenti il successo riproduttivo di specie auto-incompatibili e impollinate da animali (Marshall 1990, 1991). Questo viene spiegato come risultato della competizione tra donatori diversi attraverso l'approvvigionamento di granuli pollinici geneticamente diversi. La progenie derivante dalle migliori combinazioni di zigoti parentali dovrebbe avere una *fitness* superiore. Sia l'auto-impollinazione che l'impollinazione tra parenti stretti (*inbreeding* biparentale, Heywood, 1993) produce prole che può soffrire di depressione da in-incrocio. Spesso si è notato che la depressione da in-incrocio per le piante erbacee porta ad effetti evidenti soprattutto in una fase di vita tardiva (Barrett & Kohn, 1991). In un analogo studio effettuato in *P. sieboldii* è emerso che la *fitness* nei primi stadi di vita (numero di semi prodotti per fiore, vitalità dei semi, attecchimento delle plantule) era notevolmente inferiore nella progenie di piante materne isolate, determinata, con buona probabilità, dalla depressione da in-incrocio.

Anche per *P. palinuri* la mortalità delle plantule durante le prime fasi di vita potrebbe essere da attribuire a problemi di depressione da in-incrocio. Indagini genetiche approfondite nell'ambito delle poche popolazioni rimaste, potrebbe consentire di verificare o meno tale ipotesi.

La produzione di semi, così come in precedenza il passaggio dalla fase vegetativa a quella riproduttiva, dipende anche dalla disponibilità di nutrienti del suolo. I diversi substrati in cui cresce *P. palinuri* (arenaria e calcaree) presentano notevoli differenze, anche per quanto riguarda la disponibilità di sostanza organica. La riproduzione nelle piante perenni può essere influenzata dalla produzione primaria e dalle riserve dei nutrienti (Chapin, 1980; Chapin *et al.*, 1990), ed è per questo motivo che le differenze nel substrato possono contribuire notevolmente alla produzione di semi. Sia la disponibilità di nutrienti presenti nel suolo che le riserve di sostanze presenti nei robusti rizomi, possono contribuire al successo riproduttivo di questa specie.

### **Caratteristiche dei semi**

Secondo il principio dell'allocazione delle risorse, l'aumentato investimento nelle dimensioni del seme comporta un diminuito investimento verso altre funzioni quando le risorse sono limitate. Sia le dimensioni del seme che il numero dei semi determinano insieme il successo riproduttivo totale. Molti studi hanno dimostrato che i semi più grandi determinano una maggiore sopravvivenza, crescita ed attecchimento delle plantule (Méndez, 1997; Eriksson, 1999). Ciò che emerge da alcuni studi (Geritz, 1995)

è che le dimensioni del seme dipendono sia da componenti genetiche che da componenti ambientali della pianta madre.

Quando una pianta perde gli ovuli a causa, ad esempio, di un basso successo di impollinazione, erbivoria fiorale o predazione dei frutti prima della dispersione, i semi che restano spesso crescono più grandi di dimensioni (Vaughton & Ramsey, 1998).

Le dimensioni del seme sono state stimate attraverso la massa dello stesso, come riportato in letteratura (Gomez, 2004; Moles *et al.*, 2005). E' stato dimostrato che le dimensioni del seme sono positivamente correlate con l'embrione, l'endosperma e la massa del seme. Uno studio condotto da Lehtila (2005) sui semi di *Primula veris* ha mostrato che la dimensione dei semi non determina la qualità dei semi di per sé, ma le dimensioni sono correlate con altri fattori genetici ed ambientali che influiscono sulla qualità dei semi. In *P. palinuri* i semi sono leggeri e attraverso le capsule si disperdono con il vento. Le pareti rocciose verticali che ospitano le popolazioni di primula sono continuamente battute dal vento che viene dal mare e soffia dal basso verso l'alto trasportando così i semi.

In molte Angiosperme il peso dei semi è molto variabile fenotipicamente, tra popolazioni (Ager & Stettler, 1983; Winn, 1988), tra individui della stessa popolazione (Pitelka *et al.*, 1983; Stanton, 1984b; Thompson, 1984; Wolfe, 1995) e nello stesso individuo (Stanton, 1984b; Thompson, 1984; Winn, 1991; Wolfe, 1995). La variabilità nel peso dei semi all'interno delle piante può dipendere da numerosi fattori: declini temporali nelle caratteristiche riproduttive e vegetative durante l'intera stagione di crescita (Cavers & Steel, 1984; Winn, 1991; Wolfe, 1995); la posizione del frutto nell'ambito dell'infiorescenza, (Hendrix, 1984) o del seme all'interno del frutto (Stanton, 1984b; Mazer *et al.*, 1986); la competizione tra embrioni in via di sviluppo per le risorse materne limitate che porta alla scelta tra il peso dei semi e il loro numero (Stanton, 1984b; Wolf *et al.*, 1986); e la depressione da in-incrocio che causa un basso peso dei semi che derivano dall'autofecondazione (Manasse & Stanton, 1991; Wolfe, 1995). Le popolazioni di primula di Palinuro che vivono su calcare producono semi più leggeri di quella su arenaria. Le cause non sono note: potrebbero essere di tipo genetico o legate alle differenze edafiche delle stazioni. In letteratura infatti è riportato che la competizione per le risorse materne limitate in genere riduce il peso medio dei semi mentre il numero di semi per frutto aumenta (Baker *et al.*, 1994). La disponibilità di substrato utile per lo sviluppo delle radici è minore per le piante di primula che vivono su calcare che per quelle su arenaria e questo potrebbe determinare una differenza di



quantità di risorse da destinare allo sviluppo dei semi.

I semi più leggeri anche se si disperdono più facilmente, spesso germinano più lentamente (Mogie *et al.*, 1990) e in minor numero (Stanton, 1985) rispetto a quelli più pesanti. Questo fa nascere plantule che crescono più lentamente (Stanton, 1984a) e raggiungono una biomassa inferiore (Zhang & Maun, 1990), che tende a non fiorire o a produrre pochi fiori e che produce pochi frutti e semi (Mazer, 1987), rispetto alle plantule che derivano da semi più pesanti. Semi più pesanti in alcune specie di *Primula* (*P. scandinavica* e *P. farinosa*) germinano in maggior numero e più velocemente formando prima rosette più grandi (Tremayne & Richards, 2000). Questo è stato verificato anche dai risultati degli esperimenti condotti sui semi di *P. palinuri*.

### **Germinazione**

I risultati sull'effetto della disponibilità idrica e della temperatura sulla germinazione dei semi di *Primula palinuri* hanno mostrato che in questa specie vi è dormienza embrionale (interrotta da basse temperature, *chilling*) e che il processo germinativo è influenzato in maniera significativa dal parametro termico, che incide sulle percentuali di germinazione, sulla velocità del processo e sullo stato di dormienza secondaria o vitalità dei semi. Infatti, con temperature attorno ai 6 °C la germinazione avviene con alte percentuali e piuttosto velocemente, con un tempo medio compreso tra 8 e 9.giorni circa. Viceversa a temperature superiori si verifica una forte riduzione della percentuale di germinazione, che a 30 °C diventa nulla. Alla temperatura di 24 °C i semi rimangono vivi ma non germinano, a meno che non vengano successivamente posti a temperature inferiori.

Le evidenze sperimentali farebbero ipotizzare per questa specie una dormienza secondaria (Baskin & Baskin, 1998) stimolata dalle temperature più elevate, cioè una dormienza in semi maturi come risposta a condizioni ambientali sfavorevoli. Secondo questa ipotesi, la dormienza secondaria si romperebbe successivamente quando le temperature si riabbassano. Tuttavia, se i semi sono sottoposti a temperatura troppo elevate si verifica la perdita definitiva della capacità di germinare.

Il comportamento germinativo in natura per molte specie può essere predetto basandosi sulle risposte ottenute in laboratorio (Grime *et al.*, 1981) ed in particolare quelle alla luce e alla temperatura possono essere usate per prevedere il momento in cui in natura si verifica la germinazione (Grime, 1989). Pertanto, sulla base delle evidenze sperimentali, è possibile interpretare il comportamento di *P. palinuri* in natura. Questa specie, pur

disseminando tra giugno e luglio, non germina in estate a causa della prolungata aridità (quiescenza dei semi) e delle elevate temperature, che in caso siano troppo elevate (superiori a i 30 °C) potrebbero rendere i semi incapaci di germinare anche quando le condizioni ambientali ritornano ad essere ottimali. *P. palinuri* trova nel periodo autunnale le condizioni ottimali per la germinazione. Infatti, è tra ottobre e novembre che lungo le coste del mediterraneo, oltre a realizzarsi una buona disponibilità idrica, le temperature non superano i 12 °C. Questo comportamento è comune a molte specie presenti in ambiente mediterraneo dove la germinazione è spesso ristretta a brevi periodi primaverili o autunnali ed è altamente improbabile che avvenga durante l'aridità estiva (Garcia-Fayos *et al.*, 2000; Quilichini & Debussche, 2000). Questa limitazione temporale della germinazione può risultare particolarmente critica per le specie, come *P. palinuri*, i cui semi non sono dormienti e di conseguenza non formano una persistente *seed bank* nel suolo. In questi casi la rigenerazione può avvenire solo nei brevi periodi in cui i fattori ecologici (temperatura ed umidità) risultano adatti e di conseguenza può essere esposta a notevoli rischi (Castro *et al.*, 2005).

In generale, considerando che in *P. palinuri* le elevate temperature, anche quando sono di breve durata, riducono drasticamente la capacità germinativa e quindi rappresentano un fattore limitante la germinazione di questa specie, la capacità di germinazione dei semi può essere considerata un indice di criticità importante in vista di un aumento globale delle temperature.

I risultati degli esperimenti sull'interazione con le temperature permettono anche di avanzare delle ipotesi interpretative sulla distribuzione di questa specie. e soprattutto sull'esposizione sempre a Nord o Nord-Est dove probabilmente le temperature del substrato più difficilmente raggiungono valori molto elevati. La sensibilità alle elevate temperature mostrata dalla specie definisce i confini del suo areale e limita la colonizzazione di nuovi ambienti. In vista dei cambiamenti climatici la specie tenderebbe a salire di quota ma il limitato areale in cui si trova non le consente di trovare un ambiente idoneo raggiungibile.

### **Caratteristiche dell'ipocotile**

La formazione dei peli dell'ipocotile in *P. palinuri* gioca un ruolo sia meccanico che fisiologico che potrebbe portare ad un rapido attecchimento delle plantule. Le capsule di *P. palinuri* maturano all'inizio dell'estate e i semi non mostrano nessuna apparente dormienza. Come conseguenza, i semi posti in adeguate condizioni di temperature ed

umidità possono germinare subito dopo la dispersione. Pertanto, una strategia per un rapido attecchimento può permettere alle plantule di sopravvivere in estate durante i primi stadi di crescita.

Due aspetti sono fondamentali per assicurare un rapido attecchimento delle plantule: un pronto ancoraggio al substrato seguito da un immediato assorbimento di acqua (Harper, Williams & Sagar, 1965; Young & Martens, 1991). L'anello di peli dell'ipocotile offre un rapido supporto fisico alle plantule di *P. palinuri* specialmente quando estati secche avvengono in substrati sabbiosi o rocciosi e suoli incoerenti che non riescono a trattenere adeguate quantità di acqua. L'importanza dei peli dell'ipocotile nel fungere da supporto fisico è riportata per altri generi come *Artemisia* e *Populus* in cui le plantule con vigorosi peli sono state osservate avere una migliore possibilità di attecchimento rispetto alle plantule con peli sottili o rotti (Polya, 1961; Young & Martens, 1991).

I peli dell'ipocotile delle plantule di *P. palinuri* mostrano anche la capacità di assorbire acqua immediatamente dopo essere state poste su di un substrato umido: questi peli agiscono come vie preferenziali per nutrire i tessuti sopra il terreno prima che la radice penetri nel substrato e diventi capace di assorbire umidità. Questo aspetto si conforma alla richiesta critica di assorbire acqua da un substrato prima che l'umidità venga dispersa nell'atmosfera (Harper *et al.*, 1965). Inoltre, la presenza di materiali mucilluginosi aumenta l'affinità con l'umidità fornendo una protezione contro la perdita di vapore nell'atmosfera (Harper *et al.*, 1965; Young & Evans, 1973). Di conseguenza, la presenza di mucillagine può essere considerata un vantaggio all'attecchimento delle plantule in ambienti semi-aridi e disturbati come quello di tipo mediterraneo dove la carenza di acqua è stata identificata come la causa principale di mortalità delle plantule come risultato della disidratazione (Herrera, 1991; Herrera *et al.*, 1994; García-Fayos & Verdú, 1998; Garcia, 2001).

Come confermato dall'esperimento in Agar a diverse concentrazioni, la formazione dei peli dell'ipocotile è innescata da una bassa disponibilità idrica mentre non avviene quando l'acqua è altamente disponibile ed accessibile. Questo avviene in modo analogo anche in *Myrtus communis* (Aronne & De Micco, 2004).

La regolazione dell'assorbimento di acqua nelle plantule di *P. palinuri* viene anche esercitata dalla presenza di una esodermide ben sviluppata. Lo stato di cellule suberizzate, alla periferia della radice, rappresenta un importante meccanismo non solo nell'assunzione di nutrienti ma specialmente perché regola il flusso inverso di acqua che, in estreme condizioni di aridità, potrebbe passare dalla radice al suolo (Peterson,

1988; Hose *et al.* , 2001).

L'adattamento ai fattori abiotici da solo non è sufficiente a garantire l'attecchimento e la sopravvivenza della plantula perché possono interferire altri fattori ecologici come l'erbivoria. E' ampiamente riconosciuto che il maggiore effetto dell'erbivoria sulla popolazione vegetale viene esercitato sulle plantule (Watkinson, 1997) e potrebbe esserci una forte selezione per le difese anti-erbivoria immediatamente dopo la germinazione (Kearsley & Whitam, 1989; Hanley, 1998; Hanley & Lamont, 2002). L'accumulo di polifenoli nei tessuti dell'ipocotile di *P. palinuri* potrebbe essere una strategia di protezione contro la predazione.

Questi composti organici si trovano in molti tessuti vegetali e sono considerati come deterrenti non letali di considerevole importanza in ecosistemi caratterizzati dal pascolo come in quelli dell'area del Mediterraneo (Glyphis & Puttick, 1988; Lamont & Groom, 1998; Hanley & Lamont, 2001).

In conclusione, i nostri risultati mostrano che le plantule di *P. palinuri* hanno sviluppato una strategia di attecchimento che:

- a) regola l'assunzione di acqua attraverso i peli dell'ipocotile e dell'esodernide
- b) potrebbe permettere un supporto meccanico attraverso i peli dell'ipocotile
- c) accumula fenoli che potrebbero difendere la pianta contro la predazione animale

Queste caratteristiche, insieme all'assenza della dormienza, alla veloce germinazione e all'alta germinabilità dei semi (Harper, 1977; Young & Martens, 1991; Jones, Allen & Sharitz, 1997; Traveset *et al.* , 2001), possono essere considerate vantaggiose allo scopo di massimizzare il successo riproduttivo, l'attecchimento delle plantule e la sopravvivenza negli ambienti di tipo mediterraneo.

### **Riproduzione vegetativa**

La capacità di propagazione clonale è diffusa nelle piante a fiore (Harper, 1977) ed avviene attraverso una varietà di organi come rizomi, bulbi, stoloni e tuberi. La disposizione spaziale dei differenti genotipi in una popolazione è condizionata dalla modalità della loro diffusione vegetativa. In specie con un folto addensamento di piante, che si diffondono solo da un corto rizoma, gli individui più vicini appariranno quasi sempre allo stesso clone. In altre con una modalità di propagazione a più ampia diffusione gli individui di un singolo clone potrebbero diffondersi maggiormente ed essere interposte ad altre aventi genotipi diversi. I genotipi hanno la potenzialità di vita illimitata, anche se la vita di un singolo individuo clonale potrebbe essere fortemente

limitata dal variare delle condizioni ambientali.

### **Erosione genetica nelle piccole popolazioni clonali**

La riduzione delle popolazioni vegetali generalmente porta alla riduzione della variabilità genetica all'interno delle stesse. Le popolazioni piccole derivanti dalla frammentazione dell'habitat sono potenzialmente vulnerabili all'estinzione locale (Fischer & Stocklin, 1997). Le piccole popolazioni clonali, soprattutto quando il numero di genotipi è già inferiore al numero di individui all'interno di esse, sono soggette alla perdita di diversità genetica a causa dell'estinzione di alcuni genotipi attraverso la stocasticità ambientale o demografica, o per la competizione inter- o intra-specifica. La graduale perdita di genotipi da una popolazione per queste ragioni, può continuare fino a quando la popolazione diventa uniclonale (composta da un solo genotipo) e, infine, fino all'estinzione anche di quel genotipo. Viceversa, piccole popolazioni uniclonali potrebbero essere nate da un singolo seme e, di conseguenza, la popolazione mantenuta attraverso la propagazione vegetativa, potrebbe rappresentare l'inizio di una popolazione fondatrice di una specie in espansione. Sempre più studi stanno mettendo in evidenza che un elevato numero di specie clonali rare o minacciate, sono composte da un limitato numero di genotipi (Wilcock, 2001).

La struttura clonale di una popolazione (le dimensioni delle zone in cui questa è presente e il grado di dispersione della popolazione) può influenzare la modalità attraverso cui si manifesta la competizione, l'erbivoria e le malattie in una popolazione vegetale ma il fattore più critico è l'impatto che la struttura clonale può avere sul sistema riproduttivo e sulla fecondità della pianta (Godt & Hamrick, 1999). Via via che le piante si diffondono, gli individui, durante la fioritura, diventano sempre più circondati da fiori con lo stesso genotipo ed è probabile che aumenti l'auto-impollinazione tra di essi (geitonogamia). A causa degli elevati livelli di geitonogamia, le popolazioni clonali composte solo da pochi genotipi, sono soggette sia alla depressione da in-incestro se le specie sono auto-compatibili, oppure ad una riduzione del numero di semi prodotti se è auto-incompatibile, a causa della scarsità di accoppiamenti (Byers, 1995).

Anche se apparentemente le piante clonali potrebbero persistere in un sito indefinitivamente e non essere quindi esposte al rischio di estinzione, senza la produzione di semi, tali piante sono a rischio sia per la perdita dell'habitat sia per i cambiamenti ambientali. Le piante non hanno né la possibilità di scappare nello spazio (attraverso una dispersione a lunga distanza) né nel tempo (attraverso la dormienza dei

semi). Oltre ad aumentare la diversità genetica, la produzione dei semi libera i nuovi individui da eventuali virus o mutazioni deleterie (Richards, 1996).

Le prospettive a lungo termine per popolazioni di specie clonali, non possono essere buone perché i genotipi possono solo essere persi dalle popolazioni, per cui eventi stocastici, competizione con altre piante ed incapacità di adattarsi ai cambiamenti climatici. E' solo una questione di tempo prima che le popolazioni siano estinte. Anche se il processo di estinzione può essere lento, è comunque inevitabile (Wilcock & Neiland, 1998).

Vivere ad elevate altitudini è un'opportunità per le specie vegetali, perché le regioni alpine sono caratterizzate da dure condizioni ambientali. I periodi di crescita sono più brevi, che a basse quote, le risorse nutritive sono limitate e le piante sono esposte a forti venti o lunghi periodi di copertura nuvolosa (Barry, 1981; Körner, 2003a).

Le specie alpine sono adattate a queste severe condizioni climatiche (Körner, 2003b).

Tuttavia, la riproduzione sessuale può essere impedita, la fioritura e la produzione di semi possono essere un mezzo piuttosto rischioso ad elevate altitudini (Urbanska & Schütz, 1986; Körner, 2003a).

La riproduzione vegetativa è una via di fuga a questa situazione difficile perché aumenta di importanza all'aumentare dell'altitudine (Bliss, 1971; Young et al., 2002).

Molte specie di piante applicano strategie di crescita clonali per far fronte alle severe condizioni ambientali negli habitat alpini (Stöcklin & Bäumler, 1996; Klimes et al., 1997).

La riproduzione clonale comporta numerosi benefici per la diffusione della pianta; i rischi della riproduzione sessuale sono minimizzati; le risorse possono essere rese disponibili più facilmente, lo stabilizzarsi della progenie è supportato e la mortalità dei genet è ridotta. Comunque ci sono anche numerosi svantaggi della crescita vegetativa, inclusa la facilità di trasmissione di malattie e la riduzione di risorse necessarie per la riproduzione sessuale (Klimes *et al.*, 1997).

Le specie vegetali spesso combinano la riproduzione clonale e sessuale, così le specie clonali generalmente esibiscono un livello di variabilità genetica che è paragonabile con quello delle specie non clonali (Ellstrand & Roose, 1987; Widén, Cronberg & Widén, 1994).

Si può assumere che questo valga anche per le specie clonali alpine (Steinger, Körner & Schmid, 1996; Holderegger, Stehlik & Abbott, 2002), sebbene al momento solo pochi studi analizzano questa questione (Pluess & Stöcklin, 2004). La struttura genetica

spaziale entro popolazioni di piante è determinata generalmente dall'equilibrio tra la deriva genetica locale e il flusso genico attraverso la riproduzione sessuale (Heywood, 1991).

L'estensione della struttura genetica in una popolazione dipende dal contributo relativo della dispersione del polline e dei semi, dal livello di auto fecondazione, dalla disponibilità di compagni compatibili, dalla densità delle piante e dall'abbondanza degli impollinatori, come dagli adattamenti locali e dalla longevità delle specie (Stehlik & Holderegger, 2000).

Comunque, la propagazione clonale può anche contribuire al modello di struttura genetica, perché la disposizione non casuale dei cloni può aumentare accoppiamenti locali tra consanguinei (Heywood, 1991). Differenti proporzioni di riproduzioni vegetative e sessuali possono portare a modelli di distribuzione spaziale di piante singole.

In certi siti il numero di individui è elevato, con popolazioni contenenti centinaia di individui (osservazioni personali), comunque il numero di stazioni nelle quali si ritrova si è ridotto notevolmente.

Questo *trend*, insieme all'aumentata importanza dell'area per il turismo, sta comportando il rischio di estinzione per *P. palinuri*, a questo si deve aggiungere che non tutte le piante fioriscono durante il corso della loro vita e molte muoiono a causa di attività antropiche o mutate condizioni climatiche e microclimatiche (ad es. temperature elevate o aridità eccessiva).

La riduzione del numero e delle dimensioni delle popolazioni di una specie comporta la perdita di variabilità genetica dovuta agli effetti della deriva genetica e dell'*inbreeding* (Barrett & Kohn, 1991; Van Treuren *et al.*, 1991).

Per specie soggette a questi effetti, è importante campionare l'intero *range* di variabilità genetica rimasta entro la specie come preludio per conservare e di conseguenza introdurre/reintrodurre tale specie in appropriati siti altrove (Holsinger & Gottlieb, 1991). In questo contesto possiamo quindi chiederci:

- (1) Quale è la dimensione della diversità genetica di *P. palinuri* entro l'area di studio?
- (2) La specie si riproduce soprattutto clonalmente o per seme?
- (3) Esiste un modello genetico spaziale entro il *plot* e gli individui vicini sono più imparentati gli uni agli altri rispetto a campioni più distanti?

Gli studi effettuati sulla biologia di questa specie hanno permesso di individuare alcuni punti di criticità nel suo ciclo vitale. Alla luce dei risultati conseguiti altri aspetti

andrebbero indagati per completare il quadro autoecologico, simulare scenari di previsione nell'ottica di futuri cambiamenti globali e fornire suggerimenti pratici per una corretta gestione delle popolazioni esistenti.



### BIBLIOGRAFIA CAPITOLO 3

- AA. VV, (2000). *Saving the plants of Europe. European plant conservation strategy*. Planta Europa. Consiglio d'Europa.
- Abou-El-Enain MM. (2006). Chromosomal variability in the genus *Primula* (Primulaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **150**: 211–219.
- Ager A, Stettler R. (1983). Local variation in seeds of Ponderosa pine. *Canadian Journal of Botany* **61**: 1337-1344.
- Alwadi, H. and Richards, A.J. (1993) Primary Homostyly in *Primula* L subgenus *Sphondylia* (Duby) Rupr and the evolution of distyly in *Primula*. *New Phytol.* **124**, 329–338.
- Aronne G, De Micco V. (2004). Hypocotyl features of *Myrtus communis* (Myrtaceae): a many-sided strategy for possible enhancement of seedling establishment in the Mediterranean environment. *Botanical Journal of the Linnean Society* **145**: 195–202.
- Arroyo, M T. K., Primak, R., Armesto, J. (1982). Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of Central Chile. Pollination mechanisms and altitudinal variation. *American Journal of Botany*, **69**: 82-97.
- Athanasiou, A. and Shore, J.S. (1997) Morph-specific proteins in pollen and styles of distylous *Turnera* (Turneraceae). *Genetics*, **146**, 669–679.
- Athanasiou, A., Khosravi, D., Tamari, F. and Shore, J.S. (2003) Characterization and localization of short-specific polygalacturonase in distylous *Turnera subulata* (Turneraceae). *Am. J. Bot.* **90**, 675–682.
- Baker K., Richards A.J., Tremayne M. A. (1994). Fitness constraints on flower number, seed number and seed size in the heteromorphic species *Primula farinosa* L. and *Armeria*
- Baker, A. M., Barrett, S. C. H. & Thompson, J. D. (2000). Variation of pollen limitation in the early flowering Mediterranean geophyte *Narcissus assoanus* (Amaryllidaceae). *Oecologia* **124**: 529-535.
- Baker, H. G., Baker, I. (1979). Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. *Amer. J. Bot.*, 66(5): 591-600.
- Barret, S. C. H., (1990). The evolution and adaptive significance of heteromorphic incompatibility systems, The Plumbaginaceae. *Evolution*, **20**: 349-368.
- Barret, S. C. H., (1992). *Evolution and function of Heterostyly*. Monographs on Theoretical and Applied Genetics, 15. New York: Springer-Verlag. 279 pp.

- Barrett S. C. H. & Kohn J. R. (1991) Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: Falk D. A. & Holsinger K. E. (eds). *Genetics and Conservation of Rare Plants*, Oxford University Press, Oxford, pp. 3–30.
- Barrett S. C. H. & Kohn J. R. (1991). Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: Falk D. A. & Holsinger K. E. (eds). *Genetics and Conservation of Rare Plants*, Oxford University Press, Oxford, pp. 3–30.
- Barrett, S.C.H. & Kohn, J. (1991). The genetic and evolutionary consequences of small population size in plant: implications for conservation. In: *Genetics and Conservation of Rare Plants* (Eds. D. Falk & K.E. Holsinger), pp. 3-30. Oxford University Press.
- Barry NC. (1981). *Mountain weather and climate*. London: Methuen.
- Baskin, C. C. & Baskin, J. M. (1998). *Seed. Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, San Diego.
- Baskin, C. C. & Baskin, J. M. (1998). *Seed. Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, San Diego.
- Bassani, M., Pacini, E. & Franchi, G. G. (1994). Humidity stress responses in pollen of anemophilous and entomophilous species. *Grana* 33: 146-150.
- Bassani, M., Pacini, E. & Franchi, G. G. (1994). Humidity stress responses in pollen of anemophilous and entomophilous species. *Grana* 33: 146-150.
- Bateson, W. and Gregory, R.P. (1905) On the inheritance of heterostylism in *Primula*. *Proc. R. Soc. B. Lond.* **76**, 581–586.
- Bennett KD. (1997). *Evolution and ecology, the pace of life*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Bliss LC. (1971). Arctic and alpine plant life cycles. *Annual Review of Ecology and Systematics* **2**: 405–438.
- Briggs, D. & Walters, S. M., (1997). *Plant variation and evolution*, 3rd ed., Cambridge University Press, Cambridge (Chapter 7).
- Bruun HG. (1932). Cytological studies in *Primula* with special reference to the relation between the karyology and taxonomy of the genus. *Symbolae Botanicae Upsaliensis* **1**: 1–239.
- Byers, D. L. (1995). Pollen quantity and quality as explanations for low seed set in small populations exemplified by *Eupatorium* (Asteraceae). *American Journal of Botany* **82**: 1000-1006.

- Campbell, C. S., Famous, N. C. and Zuck, M. G., 1986: Pollination ecology of *Primula laurentiana* (Primulaceae) in Maine. *Rhodora*, 88: 253-260.
- Castro, J., Zamora, R., Hodar, J. A., Gomez, J. M. (2005). Ecology of seed germination of *Pinus sylvestris* L. at its southern, Mediterranean distribution range. *Invest. Agrar: Sist Recus. For.*, **14**(2): 143-152.
- Cavers P, Steel M. (1984). Patterns of change in seed weights over time on individual plants. *American Naturalist* **124**: 324-335.
- Chapin, F. S. III, (1980). The mineral nutrition of wild plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **11**: 233-260.
- Chapin, F. S. III, Schulze, E. D., Mooney, H. A. (1990). The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **21**: 423-447.
- Chaudhury, R. & Shivanna, K. R. (1987). Differential responses of *Pennisetum* and *Secale* pollen. *Phytomorphology* 37: 181-187.
- Chen CC, Gibson PB. (1973). Effect of temperature on pollen-tube growth in *Trifolium repens* after cross- and self-pollinations. *Crop Science* **13**: 563±566.
- Chiarugi A. (1941). Sul numero dei cromosomi della *Primula palinuri* Petagna. *Nuovo Giornale Botanico Italiano* **47**: 519– 520.
- Chiarugi A. (1952), *La Primula palinuri* Petagna, *il celebre endemismo della costa tirrenica della Lucania*. *N. G. Bot. It. N. S.*, **59**, 455-466.
- Chiarugi A. (1954a), *Primula palinuri* Pedagna. *Posizione sistematica e significato fitogeografico attraverso l'indagine citogenetica*. *Webbia*, **11**, 861-888.
- Chiarugi A. (1954b), *La poliploidia somatica nelle piante*. *Atti IX Congresso internazionale di genetica*. Bellagio, Parte I, 488-520.
- Chiarugi A. (1956). *Primula palinuri* Petagna – *Posizione sistematica e significato fitogeografico attraverso l'indagine citogenetica*. *Webbia* **11**: 861–888.
- Clements F. E. (1934) *The relict method in dynamic ecology*. *Jour. of Ecology*, **39**, 63-93.
- Cruden R. W. (1977). *Evolution*, **31**, 32.
- Dafni, A. (1992). *Pollination ecology: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford.
- Darwin, C. (1862) On the two forms or dimorphic conditions in the species of *Primula*, and on their remarkable sexual relations. *J. Proc. Linn. Soc. Bot.* **6**, 77–96.
- Darwin, C., (1877). *The Different Forms of Flowers and Plants of the Same Species*. London: John Murray. 352 pp.

- Davis P. H. (1951), *Cliff vegetation in the eastern Mediterranean*. The Jour. of Ecology, **22**, 40-68.
- Dowrick, V.P.J. (1956) Heterostyly and homostyly in *Primula obconica*. Heredity, **10**, 219–236.
- Ellstrand NC, Roose ML. (1987). Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *American Journal of Botany* **74**: 123–131.
- Ernst, A. (1933) Weitere Untersuchungen zur phananalyse zum fertilitatsproblem und zur genetik heterostyler Primeln. I. *Primula viscosa*. Arch. Julius Klaus Stift. Vererbungsforsch. Sozialanthropol. Rassenhyg. **8**, 1–215.
- Ernst, A. (1936) Weitere untersuchungen zur pha“nanalyse zum fertilita“ tsproblem und zur genetik heterostyler Primeln. II. *Primula hortensis*. Arch. Julius Klaus Stift. Vererbungsforsch. Sozialanthropol. Rassenhyg. **11**, 1–280.
- Ernst, A. (1955) Self-fertility in monomorphic *Primulas*. *Genetica*, **27**, 391–448.
- Faegri, K. and Van der Pijl, L. (1979). *The principles of Pollination Biology*. 2nd ed. London: William Clowes. 244 pp.
- Faivre, A. E. & McDade, L. A. (2001). Population -level variation in the expression of heterostyly in three species of Rubiaceae: Does reciprocal placement of anther ad stigmas characterize heterostyly?. *Am. J. Bot.* **88**: 841-853.
- Falk D. A. & Holsinger K. E. (1991). *Genetics and Conservation of Rare Plants*, Oxford University Press, Oxford, pp. 3–30.
- Feder N, O'Brien TP. (1968). Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany* **55**: 123–142.
- Fischer, M. & Stocklin, J. (1997). Local extinctions of plants in remnant of extensively used calcareous grassland 1950-1985. *Conservation Biology* **11**, 727-737.
- Francini E. e Messeri A. (1955), *L'isola di Marittimo nell'arcipelago delle Egadi e la sua vegetazione*. *Webbia*, **11**, 607-846.
- Frova C, Portaluppi P, Villa M, Gorla MS (1995). Sporophytic and gametophytic components of thermotolerance affected by pollen selection. *Journal of Heredity* **86**: 50±54.
- Frova C, Sarigola M. (1994). Quantitative trait loci (qtls) for pollen thermotolerance detected in maize. *Molecular General Genetics* **245**: 424±430.
- Ganders, F., (1979). The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany*, **17**: 607-635.
- Ganders, F., 1979: The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany*, **17**: 607-

635.

Garbari F. (1974). Cariologia, citogeografia, corologia della italiana e sui aspetti tassonomici. *Lavori della Societa Italiana di BioGeographyrafia* **4**: 111–123.

García D. (2001). Effects of seed dispersal on *Juniperus communis* recruitment on a Mediterranean mountain. *Journal of Vegetation Science* **12**: 839–848.

García-Fayos P, Verdú M. (1998). Soil seed bank, factors controlling germination and establishment of a Mediterranean shrub: *Pistacia lentiscus* L. *Acta Oecologica* **19**: 357–366.

Garcia-Fayos, P., Garcia-Ventoso, B., Cerdà, A. (2000). Limitations to plant establishment on eroded slopes in southeastern Spain. *J. Veg. Sci.*, **11**: 77-86.

Garcia-Fayos, P., Garcia-Ventoso, B., Cerdà, A. (2000). Limitations to plant establishment on eroded slopes in southeastern Spain. *J. Veg. Sci.*, **11**: 77-86. *Genetics* **39**: 123±126.

Geritz, S.A.H., (1995). Evolutionarily stable seed polymorphism and small scale spatial variation in seedling density. *Am. Nat.* **146**, 685–707.

Glyphis JP, Puttick GM. (1988). Phenolics in some Southern African mediterranean shrubland plants. *Phytochemistry* **27**: 743–751.

Godt, M. J. W. & Hamrick, J. L. (1999). Population genetic analysis of *Ellottia racemosa* (Ericaceae), a rare Georgia shrub. *Molecular Ecology* **8**: 75-82.

Gomez, J.M., (2004). Bigger is not always better: conflicting selective pressures on seed size in *Quercus ilex*. *Evolution* **58**, 71–80.

Griggs R. F. (1940) *The ecology of rare plants*. Bull. Torrey Bot. Club, **67**, 575-594.

Grime J. P., Mason G., Curtis A. V., Rodman J., Band S. R., Mowforth M. A. G., Neal A. M. & Shaw S. (1981). A comparative study of germination characteristics in a local flora. *Journal of Ecology* **69**: 1017–1059.

Grime, J. P. (1989). *Seed banks in ecological perspective*. Pp. XV-XXII. in: Leck, M A., Perker, V. T., Simpson, R. L. (eds.). Ecology of Soil Seed Bank. Academic Press, Dan Diego, USA.

Grime, J. P. (1989). *Seed banks in ecological perspective*. Pp. XV-XXII. in: Leck, M A., Perker, V. T., Simpson, R. L. (eds.). Ecology of Soil Seed Bank. Academic Press, Dan Diego, USA.

Grime, J. P., Mason, G., Curtis, A. V., Rodman, J., Band, S. R., Mowforth, M A. G., Neal, A., Shaw, S. (1981). A comparative study of germination characteristics in a local flora. *J. Ecol.*, **69**: 1017-1059.

- Hacker, J. B., Andrew, M. H., McIvor, J. B., Mott, J. J. (1984). Evaluation in contrasting climates of dormancy characteristics of seed of *Digitaria milaniana*. *J. Appl. Ecol.*, **21**: 961-969.
- Hanley ME, Lamont BB. (2001). Herbivory, serotiny and seedling defence in Western Australian Proteaceae. *Oecologia* **126**: 409–417.
- Hanley ME, Lamont BB. (2002). Relationship between physical and chemical attributes of congeneric seedlings: how important is seedling defence? *Functional Ecology* **16**: 216– 222.
- Hanley ME. (1998). Seedling herbivory, community composition and plant life history traits. *Perspective in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **1**: 409–417.
- Harder, L. D. & Berrett, S. C. H. (1996). Pollen dispersal and mating patterns in animal-pollinated plants. In: Lloyod, D. G. & Barrett, S. C. H. (Eds). *Floral Biology: Studies on Floral Evolution in Animal-Pollinated Plants*. Chapman & Hall, New York, pp. 140-190.
- Harper JL, Williams WT, Sagar GR. (1965). The behaviour of seeds in soil. Part 1. The heterogeneity of soil surface and its role in determining establishment of plants from seed. *Journal of Ecology* **53**: 273–286.
- Harper JL. (1977). *Population biology of plants*. London: Academic Press
- Hendrix S. (1984). Variation in seed weight and its effects on germination in *Pastinaca sativa* L. (Umbelliferae). *American Journal of Botany* **71**: 795-802.
- Herrera CM, Jordano P, Lúpez-Soria L, Amat J. (1994). Recruitment of a mast-fruiting, bird-dispersed tree: bridging frugivore activity and seedling establishment. *Ecological Monographs* **64**: 315–344.
- Herrera J. (1991). The reproductive biology of a riparian Mediterranean shrub, *Nerium oleander* L. (Apocynaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **106**: 147–172.
- Herrero, M. P. & Johnson, R. R. (1980). High temperature stress and pollen viability of maize. *Crop Sci.* **20**: 796-800.
- Heslop-Harrison, Y., Heslop-Harrison, J. and Shivanna, K.R. (1981) Heterostyly in *Primula*. 1. Fine-structural and cytochemical features of the stigma and style in *Primula vulgaris* Huds. *Protoplasma*, **107**, 171–187.
- Heywood J. S. (1993). Biparental inbreeding depression in the self-incompatible annual plant *Gaillardia pulchella* (Asteraceae). *American Journal of Botany* **80**: 545–550.
- Heywood SH. (1991). Spatial analysis of genetic variation in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* **22**: 335–355.

- Hiratsuka S, Tomita A. (1989). Incompatible pollen tube growth and protein composition in styles of Japanese pear following high temperature treatments. *Euphytica* **43**: 191±196.
- Holderegger R, Stehlik I, Abbott RJ. (2002). Molecular analysis of the Pleistocene history of *Saxifraga oppositifolia* in the Alps. *Molecular Ecology* **11**: 1409–1418.
- Holsinger & Gottlieb, 1991 ;
- Holsinger, K. E., and L. D. Gottlieb. (1991). Conservation of rare and endangered plants: principles and prospects. In *Genetics and Conservation of Rare Plants*, ed. D. A. Falk and K. E. Holsinger, pp. 195–208. New York: Oxford Univ. Press.
- Honsell E. (1961), *La diffusione di forme esaploidi di Primula palinuri Petagna in diverse stazioni della costa tirrenica da Palinuro a Scalea*, *Annali di Botanica*, **Vol XXVII**, Fasc. 1°, 135-144.
- Horvitz, C C. & Schemske, D. W. (1990). Spatiotemporal variation in insect mutualists of a neotropical herb. *Ecology*, **71**: 1085-1097.
- Hose E, Clarkson DT, Steudle E, Hartung W. (2001). The exodermis: a variable apoplastic barrier. *Journal of Experimental Botany* **52**: 2254–2264.
- Inouye, D. W., Saavedra, F. & Lee-Yang, W. (2003). Environmental influences on the phenology and abundance of flowering by *Androsace septentrionalis* (Primulaceae). *American Journal of Botany*, **90**: 905-910.
- Ishihama, F., Nakano, C., Ueno, S., Ajima, M., Tsumura, Y. & Washitani, I. (2003). Seed set and gene flow patterns in an experimental population of an endangered heterostylous herd with controlled local opposite-morph density. *Functional Ecology*, **17**: 680-689.
- Jensen W. A. (1962) *Botanical Histochemistry*. W. H. Freeman and Company. San Francisco and London: 96.
- Jones RH, Allen BP, Sharitz RR. (1997). Why do early emerging tree seedlings have survival advantages? A test using *Acer rubrum* (Aceraceae). *American Journal of Botany* **84**: 1714–1718.
- Journal of Vegetation Science* **14**: 141–143.
- Kearsley MJC, Whitam TG. (1989). Developmental changes in herbivory: implications for individuals and populations. *Ecology* **70**: 1040–1047.
- Kelso S. (1991). Taxonomy of *Primula* sections *Aleuritia* and *Armerina* in North America. *Rhodora* **93**: 67–99.
- Kevan, P. G. (1972) Insect pollination of high arctic flower. *Journal of Ecology*, **60**: 831-

847.

Kevan, P. G. and Baker, H. G. (1983). Insect as flower visitors and pollinator. *Annual Review of Entomology*, **28**: 82-87.

Khosravi, D., Yang, E.C.C., Siu, K.W.M. and Shore, J.S. (2004) High level of alpha-dioxygenase in short styles of distylous *Turnera* species. *Int. J. Plant Sci.* 165, 995–1006.

Klimes L, Klimesova J, Hendriks R, van Groenendal JM. (1997). Clonal plant architecture: a comparative analysis of form and function. In: de Kroon H, van Groenendal JM, eds. *The ecology and evolution of clonal plants*. Leiden: Backhuys, 1–29.

Körner C. (2003a). *Alpine plant life*. Berlin: Springer.

Körner C. (2003b). Limitation and stress – always or never ?

Kress A. (1963). Zytotaxonomische Untersuchungen an Primulaceen. *Phyton (Austria)* **10**: 225–236.

Kress A. (1989). *Primulaceen-Studien 10: Chromosomenzählungen an Verschiedenen Primulaceen*. Teil. C: *Primula, Sectio Auricula*. Munich: Gröbenzell.

La Valva V. e Ricciardi M. (1976-77) Flora e vegetazione dell'Isola di Dino (Calabria settentrionale). *Delpinoa* n. s. 18-19, 127-169.

Lamont BB, Groom PK. (1998). Seed and seedling biology of the woody-fruited Proteaceae. *Australian Journal of Botany* **46**: 387–406.

Lang G. 1994. *Quartäre Vegetationsgeschichte Europas*. Stuttgart: Gustav Fischer.

Lehtila, K. and Ehrlén, J. (2005). Seed size as an indicator of seed quality: a case study of *Primula veris*. *Acta Oecologica*, **28**: 207-212.

Levesque, C M and Burget, J. F. (1982). Insects (Diptera, Hymenoptera) associated with *Minuartia groenlandica* (Caryophyllaceae) on Mount Washington, New Hampshire, USA and their possible role as pollinators. *Artic and Alpine Research*, **14**: 117-124.

Lisci, M., Tanda, C. & Pacini, E. (1994). Pollination ecophysiology of *Mercurialis annua* L. (Euphorbiaceae), an anemophilous species flowering all year around. *Ann. Bot.*, **74**: 125-135.

Lyakh VA, Soroka AI. (1993). Influence of low temperature treatment of maize gametophyte in F" on structure and cold tolerance of resulting populations. *Maydica* **38**: 67±71.

Marshall D. L. (1990). Non-random mating in a wild radish, *Raphanus sativus*. *Plant*



*Species Biology* **5**: 143–156.

Marshall D. L. (1991). Non random mating in wild radish: variation in pollen donor success and effects of multiple paternity among one- to six-donor pollinations. *American Journal of Botany* **78**: 1401–1418.

Marshall D. L., Avritt J. J., Shaner M. & Saunders R. L. (2000) Effects of pollen load size and composition on pollen donor performance in wild radish, *Raphanus sativus* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **87**: 1619–1627.

Mast AR, Kelso S, Richards AJ, Lang DJ, Feller DM, Conti E. (2001). Phylogenetic relationships in *Primula* L. and related genera (Primulaceae) based on noncoding chloroplast DNA. *International Journal of Plant Science* **162**: 1381–1400.

Matsumura, C and Washimani, I. (2002). Heterostylous morph differences in pollen transfer and deposition patterns in *Primula sieboldii* on a visitation by a queen bumblebee, measured with semi-natural experimental system. *Plant Species Biology* **17**: 1-12

Mazer S, Snow A, Stanton M. (1986). Fertilization dynamics and parental effects upon fruit development in *Raphanus raphanistrum*: consequences for seed size variation. *American Journal of Botany* **73**: 500-511.

Mazer S. (1987). Parental effects on seed development and seed yield in *Raphanus raphanistrum*: implications for natural and sexual selection. *Evolution* **41**: 355-371.

Mazer SJ, Hultgard U. (1993). Variation and covariation among floral traits within and among four species of northern European *Primula* (Primulaceae). *American Journal of Botany* **75**: 474–256.

McKee, J. and Richards, A. J. (1998). The effect of Temperature on Reproduction of Five *Primula* Species. *Annals of Botany*, 82 (3): 359-374.

Méndez, M., (1997). Sources of variation in seed mass in *Arum italicum*. *Int. J. Plant Sci.* **158**, 298–305.

Meyer, S. E. & Allen, P. S. (1999). Ecological genetic of seeds germination regulation in *Bromus tectorum* L. Phenotypic variance among and within population. *Oecologia*, **120**: 27-34.

Moles, A.T., Ackerly, D.D., Webb, C.O., Tweddle, J.C., Dickie, J.B., Westoby, M., (2005). A brief history of seed size. *Science* **307**, 576–580.

Montalvo A. M. (1992) Relative success of self and outcross pollen comparing mixed- and single-donor pollinations in *Aquilegia caerulea*. *Evolution* **46**: 1181–1198.

Nepi, M and Pacini, E. (2007). Nectar production and presentation. In (S.W.

- Nicolson, M. Nepi, E. Pacini, Ed.) *Nectaries and nectar*. Springer Dordrecht, The Netherlands, pp.167-214.
- Nishihiro J. & Washitani I. (1998). Effects of population spatial structure on pollination and seed set of a clonal distylous plant, *Persicaria japonica* (Polygonaceae). *Journal of Plant Research* **111**: 547–555.
- Nordborg, M & Bergelson, J. (1999). The effect of seed and rosette cold treatment on germination and flowering time in some *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) ecotypes. *Am. J. Bot.*, **86**: 470-475.
- Ornduff, R. (1979) Pollen flow in a population of *Primula vulgaris*
- Ozenda P. (1995). L'endémisme au niveau de l'ensemble du Système alpin. *Acta Botanica Gallica* **142**: 753–762.
- Pacini E. e Franchi (1984). Reproduction of Mediterranean Plants. *Webbia* **38**: 93-103.
- Pacini, E. (1990). Harmomegathic characters of Pteridophyta spores and Spermatophyta pollen. *Plant Syst. Evol.* (Suppl. 5): 53-69.
- Pasonen H.-L., Pulkkinen P. & Kämpylä M. (2001). Do pollen donors with fastest-growing pollen tubes sire the best offspring in an anemophilous tree, *Betula pendula* (Betulaceae)? *American Journal of Botany* **88**: 854–860.
- Peterson CA. (1988). Exodermal Casparian bands: their significance for ion uptake by roots. *Physiologia Plantarum* **72**: 204–208.
- Piper, J.G. and Charlesworth, D. (1986) Breeding system evolution in *Primula vulgaris* and the role of reproductive assurance. *Heredity*, **56**, 207–217.
- Pirola A. (1961), L'associazione a *Scabiosa cretica* a Taormina (Sicilia Orientale). *Atti Ist. Bot. Lab. Critt. Univ. Pavia, Ser. 5*, **19**, 85-97.
- Pizzolongo P. (1963) *Note ecologiche e fitosociologiche su Primula palinuri* Pet. *Annali di Botanica*, **27**, fasc 3°, 451-467.
- Pluess AR, Stöcklin J. (2004). Population genetic diversity of the clonal plant *Geum reptans* (Rosaceae) in the Swiss Alps. *American Journal of Botany* **91**: 2013–2021.
- Polya L. (1961). Injury by soaking of *Populus alba* seeds. *Nature* **189**: 159–160.
- Qian H. (2002). A comparison of the taxonomic richness of temperate plants in East Asia and North America. *American Journal of Botany* **89**: 1818–1825.
- Quilichini, A. & Debussche, M. (2000). Seed dispersal and germination patterns in a rare Mediterranean island endemic (*Anchusa crispa* Viv., Boraginaceae). *Acta Oecol.*, **21**: 303-313.
- Ricciardi M. (1971), *Osservazioni fitogeografiche ed ecologiche sulla Primula palinuri*

- Pet.-Attuale distribuzione e possibilità di sopravvivenza*. Ann. Fac. Sci. Agr. Univ. Napoli. Serie IV, **5**: 51-60.
- Richards AJ. (1993). *Primula*. London: Batsford.
- Richards AJ. (2003). *Primula*, 2nd edn. Portland, Oregon: Timber Press.
- Richards, A. J. (1986). *Plant Breeding Systems*. London: Allen & Unwin.
- Ruzin SE. (1999). *Plant microtechnique and microscopy*. New York: Oxford University Press.
- Sakya SR, Joshi KK. (1990). Karyomorphological studies in some *Primula* species of Nepal Himalaya. *Cytologia* **55**: 571–579.
- Samson, D. A. & Werk, K. S. (1996). Size-dependent effects in the analysis of reproductive effort in plants. *American Naturalist*, **127**: 667-680.
- Schaal, Leverich & Rogstad, 1991
- Shivanna, K. R., Linskens, H. F. & Cresti, M. (1991). Responses of tobacco pollen to high humidity and heat stress: viability and germinability in vitro and in vivo. *Sex Plant Reprod.* **4**: 104-109.
- Smith WW, Fletcher HR. (1949). The genus *Primula*: sections *Cuneifolia*, *Floribundae*, *Parryi* and *Auricula*. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* **61**: 631–686. *Society of London Biology* **330**: 125–140.
- Spanowsky W. & Casper J. (1959), *Zur Chromosomenzahl von Primula palinuri Petagna*. Ber. dtsch. Bot. Ges., **72**, 180-182.
- Speranza S. (1997) - Prove di controllo guidato degli afidi del pomodoro da industria [*Myzus persicae* (Sulz.) e *Aphis fabae* (Scop.) (Homoptera: Aphididae)] e analisi qualitative della produzione nella zona litoranea dell'Alto Lazio - Agricoltura Ricerca (in stampa).
- Sprenger C. (1906), *Notizie sulla Primula palinuri rinvenuta al Capo Palinuro*. Boll. Soc. Bot. Ital., 116.
- Stanton M. (1984a). Seed variation in wild radish: effect of seed size on components of seedling and adult fitness. *Ecology* **65**: 1105-1112.
- Stanton M. (1984b). Developmental and genetic sources of seed weight variation in *Raphanus raphanistrum* L. (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **71**: 1090-1098.
- Stanton M. (1985). Seed size and emergence time within a stand of wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.): the establishment of a fitness hierarchy. *Oecologia* **67**: 524-531
- Stehlik I, Holderegger R. (2000). Spatial genetic structure and clonal diversity of

- Anemone nemorosa in late successional deciduous woodlands of Central Europe. *Journal of Ecology* **88**: 424–435.
- Steinger T, Körner C, Schmid B. (1996). Long-term persistence in a changing climate: DNA analysis suggests very old ages of clones of alpine *Carex curvula*. *Oecologia* **105**: 94–99.
- Stöcklin J, Bäumler E. (1996). Seed rain, seedling establishment and clonal growth strategies on a glacier foreland. *Journal of Vegetation Science* **9**: 45–56.
- Tamari, F. and Shore, J.S. (2006) Allelic variation for a short-specific polygalacturonase in *Turnera subulata*: is it associated with the degree of self-compatibility? *Int. J. Plant Sci.* **167**, 125–133.
- Thompson, L. M. (1975). Weather variability, climatic change, and grain production. *Science* **188**: 535-541.
- Traveset A, Riera N, Mas RE. (2001). Ecology of fruit-colour polymorphism in *Myrtus communis* and differential effects of birds and mammals on seed germination and seedling growth. *Functional Ecology* **89**: 749–760.
- Tremayne M.A., Richards A.J. (2000). Seed weight and seed number affect subsequent fitness in outcrossing and selfing *Primula* species. *New Phytol.*, **148**: 127-142.
- Tucci G. F., Ricciardi M. (1980), *Hexaploid population of Primula palinuri Petagna in some recently discovered stations from its Thyrranian range*. *Webbia* **34** (2): 637-641.
- Urbanska KM, Schütz M. (1986). Reproduction by seed in alpine plants and revegetation research above timber line. *Botanica Helvetica* **96**: 43–60.
- Valentine DH, Kress A. (1972). *Primula*. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore M, Valentine DH, Walters SM, Webb DA, eds. *Flora Europaea* 3. Cambridge: Cambridge University Press, 15–20.
- Van Treuren R. R. Bijlsma W. Van Delden N. J. Ouborg (1991). The significance of genetic erosion in the process of extinction. I. Genetic differentiation in *Salvia pratensis* and *Scabiosa columbaria* in relation to population size. *Heredity* **66**: 181-189.
- Vaughton, G., Ramsey, M., (1998). Sources and consequences of seed mass variation in *Banksia marginata* (Proteaceae). *J. Ecol.* **86**, 563–573.
- Vicidomini, S. & Campanelli, G. (2004). Biologia e distribuzione degli Xilocopini italiani (Hymenoptera: Apidae): nuovi dati sulla biologia di *Xilocopa violacea* L. e la distribuzione di *X. valga* (Gerstaecker, 1872) in Sud Italia. *Ann. Mus. Civ. Rovereto, Sez. Arc. St. Sci. Nat.*, **20**: 375-387.
- Vicidomini, S. (2007). Biologia di *Xilocopa violacea* (Linnè, 1758) (Hymenoptera:

- Apidae): repertorio floristico europeo. *Atti Mus. Civ. Stor. Nat. Trieste*, **53**: 71-86.
- Wanner H. (1943). Zur Karyologie der Gattung *Primula* L. Sektion *Auricula* Duby. *Planta* **33**: 635–652.
- Waser, N. M. (1983). The adaptive nature of floral traits: ideas and evidence. In real, L. (ed), *Pollination Biology*, New York: Academic Press, 242-277.
- Washitani, I, Okayama, Y., Sato, K., Takahashi, H. & Ohgushi, T. (1996). Spatial variation in female fertility related to interactions with flower consumers and pathogens in a forest metapopulation of *Primula sieboldii*. *Researches on Population Ecology*, **38**: 249-259.
- Watanabe, A., Goka, K. & Washitani, I (2003). Effects of population spatial structure on the quantity and quality of seed set by *Primula sieboldii* (Primulaceae). *Plant Species Biology*, **18**: 107-121.
- Watkinson AR. (1997). Plant population dynamics. In: Crawley MJ, ed. *Plant ecology*, 2nd edn. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 359–400.
- Wendelbo P. (1961). Studies in Primulaceae. II. An account of *Primula* subgenus *Sphondylia* (syn. sect. *Floribundae*) with a review of the subdivisions of the genus. *Arbok Universitetet, Bergen, Matematisk- Naturvitenskapelig* **11**: 1–46.
- Widén B, Cronberg C, Widén M. (1994). Genotypic diversity, molecular markers and spatial distribution of genets in clonal plants, a literature survey. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* **29**: 245–263.
- Wilcock, C. C. & Neiland, M. R. M.(1998). Reproductive characters as priority indicators for rare plant conservation. In: *Plant Europa Proceedings of the Second European Conference on the Conservation of Wild Plants* (ed. H. Synge & J. Akeroyd), pp. 221-230. Swedish Threatened Plants Unit & Plantlife.
- Wilcock, C. C. (2001). Maintenance and Recovery of Rare Clonal Plants: the Case of Twinflower (*Linna borealis* L.). *Bot. J. Scotl.* **54**(1), 121-131.
- Williams EG, Knox RB. (1982). Quantitative analysis of pollen tube growth in *Lycopersicon peruvianum*. *Journal of Palynology* **18**: 65±74.
- Winn A. (1988). Ecological and evolutionary consequences of seed size in *Prunella vulgaris*. *Ecology* **69**: 1537-1544.
- Winn A. (1991). Proximate and ultimate sources of within individual variation in seed mass in *Prunella vulgaris* (Lamiaceae). *American Journal of Botany* **78**: 361-371.
- Wolf L, Hainsworth F.R., Mercier T., Benjamin R. (1986). Seed size variation and pollinator uncertainty in *Ipomopsis aggregate* (Polemoniaceae). *Journal of Ecology* **74**:

361-371.

Wolfe L. (1995). The genetics and ecology of seed size variation in a biennial plant, *Hydrophyllum appendiculatum* (Hydrophyllaceae). *Oecologia* **101**: 343-352.

Wong, K.C., Watanabe, M. and Hinata, K. (1994a) Fluorescence and scanning electron-microscopic study in self-incompatibility in distylous *Averrhoa carambola* L. Sex. Plant Reprod. **7**, 116–121.

Wong, K.C., Watanabe, M. and Hinata, K. (1994b) Protein profiles in pin and thrum floral organs of distylous *Averrhoa carambola* L. Sex. Plant Reprod. **7**, 107–115.

Young AG, Hill JH, Murray BG, Peakall R. (2002). Breeding system, genetic diversity and clonal structure in the subalpine forb *Rutidosia leiolepis* F. Muell. (Asteraceae). *Biological Conservation* **106**: 71–78.

Young JA, Evans RA. (1973). Mucilaginous seed coats. *Weed Science* **21**: 52–54.

Young JA, Martens E. (1991). Importance of hypocotyl hairs in germination of *Artemisia* seeds. *Journal of Range Management* **44**: 438–442.

Zhang J, Maun M. (1990). Seed size variation and its effects on seedling growth in *Agropyron psammophelum*. *Botanical Gazette* **151**: 106-113.

Zhang L, Kadereit JW. (2004). Classification of *Primula* Sect. *Auricula* (Primulaceae) based on two molecular data sets (ITS, AFLPs), morphology and geographical distribution. *Botanical Journal of the Linnean Society* **146**: 1–26.

## CAPITOLO 4 - *Daphne sericea* VAHL.

### 4. 1. INTRODUZIONE

#### **Ambienti mediterranei e biodiversità**

Gli ecosistemi mediterranei sono costituiti da ambienti molto eterogenei e differenziati tra loro, per cui sono considerati una grande riserva di biodiversità vegetale (Schönfelder e Schönfelder, 1996). Nella regione mediterranea esistono aree di eccezionale concentrazione di biodiversità ed elevata densità di specie endemiche chiamate *hot spots* (Médail e Quézel, 1997). La biodiversità in senso lato comprende la ricchezza in numero di specie di un determinato ecosistema ma anche la loro diversità genetica. L'importanza della variabilità genetica risiede nella capacità di una specie di adattarsi a condizioni ambientali in continua mutazione, di evolversi naturalmente, di perpetuarsi, ed è quindi di fondamentale importanza per la sua conservazione (Damiani, 2001). La variabilità genetica in una popolazione è assicurata da un'efficiente riproduzione sessuale che si attua attraverso varie fasi, ognuna delle quali molto delicata.

Il corretto funzionamento di tutto il ciclo biologico è fondamentale per garantire la riproduzione sessuale e, quindi, la conservazione della specie nel tempo. E' sufficiente, infatti, che una sola delle fasi venga in qualche modo alterata per avere una ripercussione negativa sull'efficienza della riproduzione (Franchi e Pacini, 1996). Ecco che allora, ambienti particolarmente difficili come quello mediterraneo, caratterizzato da periodi estivi di forte aridità e calura, possono notevolmente influenzare il successo della riproduzione sessuale (Pacini e Franchi, 1984; Franchi e Pacini, 1996).

I principali processi riproduttivi (fioritura, impollinazione, fecondazione, disseminazione, germinazione) avvengono al di fuori della stagione di massimo stress.

La maggior parte delle specie mediterranee fiorisce tra Aprile e Giugno con un ciclo riproduttivo breve (Pacini e Franchi, 1984; Quézel, 1985).

Tuttavia, dal punto di vista fenomorfológico, le specie mediterranee possono ricorrere ad un vasto *spectrum* di possibilità per portare a termine il ciclo vitale. Ciò consente una ottimizzazione delle risorse ambientali ed una competizione minima tra quelle specie

che condividono lo stesso *habitat* (Bussotti e Schirone, 2001).

Vista la crescente attenzione nei confronti della tutela e della conservazione degli ambienti naturali, e di quello mediterraneo in particolare, questi studi hanno lo scopo di indagare la biologia riproduttiva di *Daphne sericea* Vahl (Thymelaeaceae), una specie mediterranea che presenta un certo grado di vulnerabilità (Conti *et al.*, 1997).

In particolare, con il presente lavoro ci si è posti come principale obiettivo quello di studiare la biologia florale ed il successo riproduttivo di detta specie, inteso come numero di fiori che diventano frutti, focalizzando le ricerche su fenologia riproduttiva, produzione di nettare, impollinazione, successo riproduttivo dispersione dei semi, sporogenesi, gametogenesi, embriogenesi e vitalità dei semi.

Si stanno attualmente discutendo le possibili cause che hanno potuto determinare la vulnerabilità di *Daphne sericea*: cambiamenti climatici o microclimatici, frammentazione dell' *habitat*, distribuzione di tipo *patchiness*, problemi di *in-breeding*, difficoltà di germinazione ed attecchimento.

### **Descrizione della specie**

*Daphne sericea* Vahl. appartiene alla famiglia delle Thymelaeaceae che comprende piante legnose, raramente erbacee, con foglie spirali, raramente opposte e senza stipole; fiori in spighe od ombrelle, ermafroditi ed actinomorfi con asse a coppa o tubuloso. La famiglia annovera 40 generi con circa 500 specie diffuse in tutto il mondo soprattutto nelle aree temperate e subtropicali dell'Europa, dell'Africa settentrionale ed dell'Asia.

Le specie del genere *Daphne* sono note, sin dall'antichità, per le loro qualità farmacologiche, essenzialmente ematiche e vescicanti; si tratta però di piante molto velenose il cui uso è estremamente pericoloso. Molte specie vengono coltivate come arbusti ornamentali per i loro fiori profumati; nelle Indie vengono utilizzate per la fabbricazione di carte speciali. Diversi fattori hanno motivato lo studio biosistemico e corologico di questo gruppo e sono molte le problematiche emerse a causa della mancanza di monografie di riferimento e per le difficoltà di reperimento e studio di popolazioni naturali di alcune specie molto rare o ad areale relitto, ormai ridotte a pochissimi individui per stazione.

In alcuni casi sono state compiute indagini a livello biosistemico (morfologico, cariologico, anatomico), corologico e tassonomico (Urbani, 1991) sulle piante appartenenti a questo genere.



Boisser sinonimizza *Daphne sericea* Vahl., chiamata anche *Daphne oleifolia* Lam., con *Daphne collina* Smith, mentre Keissler (1898) e Halacsy (1904) tengono distinte le due entità.

Tenore (1830) distingue le due entità precisando che in Campania si trova *D. collina* Sm. e non *D. sericea* Vahl.

Pignatti (1982), invece, ritiene che *D. sericea* e *D. collina* siano la stessa specie e che esse si trovino in varie zone d'Italia caratterizzate da clima e vegetazioni molto differenti tra loro.

### **Distribuzione della specie**

*Daphne sericea* Vahl è stata classificata rara da Pignatti, in quanto è stata segnalata in passato in poche località della regione mediterranea orientale ed in Italia a Marittimo, nel Gargano, in Abruzzo presso Popoli e Sulmona, sulle Ponziane ed in alcune zone della macchia tirrenica, dalla maremma toscana al napoletano.

Tenore nel 1830 rese evidente il fatto di ritrovare questa specie sempre associata alla presenza di acqua ed in particolare presso le sponde dei ruscelli e nelle zone paludose. Considerata la vasta opera di bonifica dei litorali paludosi avvenuta attorno agli anni '50, si può ipotizzare che la distribuzione di questa specie, già limitata all'inizio del XX secolo, si sia ulteriormente e fortemente ridotta a causa delle opere di drenaggio dei suoli e, negli ultimi anni, a causa degli insediamenti turistici lungo la fascia litoranea dove le popolazioni residuali, costituite da pochi individui, mostrano una distribuzione di tipo *patchiness*.(a macchia).

*Daphne sericea* Vahl. si ritrova attualmente su rupi preferibilmente calcaree e su substrati sabbiosi, soprattutto lungo le coste (0-800 metri).

Gli ambienti sabbiosi costieri, caratterizzati da un delicato equilibrio dinamico, sono particolarmente minacciati dalle attività antropiche. Il cordone dunale, che in condizioni naturali caratterizza questi ambienti, è ormai da lungo tempo scomparso da tratti molto estesi delle nostre coste a causa di tre principali fattori: la fruizione turistica incondizionata, la costruzione di strutture edilizie e di reti viarie, il prelievo di sabbie dai bacini fluviali. La delicatezza di questi ecosistemi fa sì che una loro frammentazione anche parziale e localizzata, porti al progressivo degrado dell'intero sistema. I tagli nel cordone dunale più vicino al mare, provocati dall'apertura di passaggi verso la spiaggia, fanno sì che i venti salmastri e grandi masse di sabbie sciolte, non più frenati dalle strutture sabbiose consolidate della prima duna, si spostino nell'entroterra minando

l'integrità anche della vegetazione retrostante.

Le popolazioni residuali sono protette all'interno del Parco Regionale della Maremma (Provincia di Grosseto) e all'interno della Riserva Naturale di Castelvolturno (Provincia di Caserta), al fine di proteggere i pochi individui rimasti dalle devastanti intrusioni antropiche.

Misure di questo genere sono sufficienti soltanto ad evitare l'estinzione nel breve periodo degli individui già esistenti, ma non a garantire la conservazione delle specie nel lungo periodo.

Per raggiungere tale scopo è necessario avere a disposizione informazioni riguardanti le caratteristiche fenologiche ed il ciclo biologico delle specie d'interesse.

Il ciclo biologico delle specie a riproduzione gamica è costituito da diverse fasi, tutte fondamentali per il corretto funzionamento del ciclo riproduttivo e quindi per la conservazione delle specie nel tempo. E' sufficiente, infatti, che una sola delle fasi non sia attiva, o che venga in qualche modo alterata, per interrompere il ciclo, impedendo la riproduzione.

Il lavoro svolto è stato finalizzato allo studio del ciclo biologico di *Daphne sericea* Vahl perchè le informazioni relative alla sua autoecologia sono limitate.

Queste specifiche conoscenze potranno rappresentare il punto di partenza per un valido programma di conservazione e salvaguardia della specie.

## 4.2. MATERIALI E METODI

### Luogo di studio

Il ciclo biologico di *D. sericea* è stato studiato con analisi ed esperimenti sia in campo che in laboratorio.

La fenologia riproduttiva, lo sviluppo fiorale, la produzione di nettare, l'impollinazione, il successo riproduttivo e la dispersione dei semi sono state studiate con periodici monitoraggi in una popolazione di *Daphne sericea* Vahl nella zona retrodunale in località Collelungo, all'interno del Parco Regionale della Maremma (Provincia di Grosseto) e nella macchia mediterranea della Riserva Naturale di Castelvolturno (CE), sulla costa tirrenica a nord del Golfo di Napoli. In questo sito la specie è presente in pochi nuclei nella zona retrodunale della prima duna stabile, ma la presenza di insediamenti turistici determina su tutta l'area un forte degrado antropico.

Sporogenesi, gametogenesi, embriogenesi e vitalità dei semi sono state analizzate con vari metodi di laboratorio.

### Sviluppo e durata dei fiori

Il ciclo riproduttivo di *D. sericea* comincia all'inizio del mese di marzo, con lo sviluppo delle gemme fiorali, e si conclude nel mese di giugno, con la maturazione dei frutti.

Lo sviluppo fiorale è stato seguito in 30 fiori marcati allo stadio di boccio, di cui 15 appartenenti a piante esposte a pieno sole e 15 a piante ombreggiate da altra vegetazione. E' stato monitorato il succedersi dei vari stadi fiorali considerando i giorni che intercorrevano tra una fase e l'altra fino al raggiungimento della senescenza.

Gli stadi considerati sono i seguenti:

- I. *Stadio di boccio*: fiore chiuso;
- II. *Stadio giovane*: inizio dell'apertura della corolla, colorazione rosa intenso;
- III. *Stadio adulto*: fiore all'antesi, completa apertura della corolla color rosa intenso, polline arancione;
- IV. *Stadio senescente*: corolla progressivamente più pallida (da rosa pallido fino ad una colorazione tendente al giallo), antere giallo-bianche.

### **Morfologia florale**

Le analisi biometriche sono state effettuate su materiale prelevato in campo e trasportato in laboratorio ed hanno riguardato il numero di infiorescenze per ramo, il numero di fiori per infiorescenza e le dimensioni delle diverse parti del fiore.

### **Microsporogenesi**

La microsporogenesi è stata seguita prelevando le antere da gemme fiorali in diverse fasi di sviluppo ed osservandone il contenuto al microscopio a fluorescenza (Olympus BX 60 con filtro UV), previo trattamento con Blu di Anilina (Jensen, 1962).

### **Produzione di polline**

La produzione di polline è stata quantificata mediante conteggio del numero di granuli di polline all'interno di antere il più possibile prossime alla maturazione, ma non ancora aperte. Il metodo usato è quello di Dafni (1992).

Ogni antera è stata posta all'interno di una provetta nella quale sono stati aggiunti 0,3 ml di etanolo:acido acetico 3:1 (v:v); quindi l'antera è stata schiacciata per permetterne la sua completa apertura e la fuoriuscita del polline. La totale espulsione dei granuli è stata facilitata attraverso l'esposizione della provetta agli ultrasuoni per circa 5 minuti. È stato prelevato 1 µl della sospensione ben agitata ed è stato deposto su di un vetrino; i granuli presenti sono stati contati tramite osservazione microscopica. Infine, i residui dell'antera sono stati prelevati dal fondo della provetta ed osservati al microscopio per verificarne il completo svuotamento. Conoscendo il numero dei granuli per unità di volume e sapendo il volume totale della sospensione, si può risalire al numero dei granuli pollinici contenuti nell'antera.

I conteggi sono stati effettuati in 5 antere emergenti dal tubo corollino (ordine superiore di antere) e in 5 contenute entro il tubo corollino (ordine inferiore di antere). Per ogni antera sono stati effettuati 3 prelievi di 1 µl ciascuno per verificare la ripetitività dei conteggi.

### **Morfologia e citologia del polline**

La morfologia pollinica è stata studiata per mezzo del Microscopio elettronico a scansione (SEM).

Il polline è stato colorato con una soluzione di IKI (Iodio Ioduro di Potassio- LUGOL)

per mettere in evidenza l'eventuale presenza di amido come sostanza di riserva.

### **Vitalità del polline**

La vitalità del polline durante i vari stadi fiorali è stata valutata tramite il test DAB (diaminobenzidina), secondo le modalità indicate da Dafni (1992). Lo sviluppo di una colorazione bruno-rossastra indica la presenza dell'enzima perossidasi.

### **Numero di granuli di polline per antera**

Sono stati effettuati 16 conteggi per ognuno dei 3 stadi fiorali presi in considerazione (giovane, adulto e senescente) di cui 8 di polline proveniente da antere dell'ordine superiore e 8 da antere dell'ordine inferiore. Per ogni conteggio è stato censito il numero di granuli vitali su un totale di 100.

### **Recettività stigmaticca**

La recettività stigmaticca durante i vari stadi fiorali è stata valutata tramite il test DAB (diaminobenzidina), secondo le modalità indicate da Dafni (1992). Lo sviluppo di una colorazione bruno-rossastra indica la presenza dell'enzima perossidasi.

Gli stimmi sono stati posizionati sui vetrini con l'accortezza di non far reagire il DAB con la parte sezionata.

### **Macrosporogenesi – Fecondazione – Embriogenesi**

Durante il periodo di fioritura sono stati prelevati in maniera *random* ovari appartenenti a due stadi differenti:

1. Inizio dell'antesi
2. Fine fioritura

Questi sono stati tenuti per diversi giorni nel fissativo F.A.A. (Formaldeide, Acido acetico, Alcool etilico); successivamente sono stati disidratati con la serie di etanolo a concentrazioni crescenti (dal 50% fino al 95%). Ottenuta la disidratazione, i campioni sono stati inclusi nella resina JB4 (Polysciences, Germany). A questo punto sono stati sezionati con un microtomo rotativo, ottenendo sezioni longitudinali dello spessore di 5 micron. Parte delle sezioni ottenute sono state colorate con una soluzione acquosa di Blu di Toluidina allo 0,5% (Jensen, 1962) e montate in acqua distillata.

Le sezioni sono state osservate con un microscopio ottico a luce trasmessa (Olympus, Germany, BX 60) corredato di macchina fotografica digitale (Olympus, Germany, CAMEDIA C2000). Campioni di ovuli ed embrioni sono stati disidratati con la serie di

etanolo a concentrazioni crescenti fino al 100%; tali campioni sono stati poi seccati con il Critical Point Dryer, ricoperti di oro e quindi osservati e fotografati al microscopio elettronico a scansione (SEM).

Per verificare l'eventuale correlazione positiva tra lo sviluppo dell'ovario e l'avvenuta fecondazione, alla fine dell'antesi, sono stati prelevati quattro fiori dei quali sono state prese le misure del diametro trasversale e longitudinale massimo degli ovari.

Sugli stimmi di ciascun ovario è stato contato il numero di granuli pollinici germinati e non germinati ed è stata calcolata la correlazione tra percentuale di germinazione del polline e il volume di ciascun ovario.

### **Caratteristiche dei nettàri**

Campioni di nettàri sono stati separati dagli ovari sotto lo stereomicroscopio. Si è proceduto alla loro fissazione in glutaraldeide 5% in tampone fosfato (0,075 M, pH 6,9) e quindi alla loro disidratazione in una serie crescente di alcool etilico. Una parte dei campioni è stata sottoposta a *Critical Point Drying* (Balzers Union) e quindi coperta con un film di oro (spessore 20 nm) tramite vaporizzatore (Edwards) ed osservata con un microscopio a scansione Philips SEM XL20 .

La rimanente parte è stata inclusa in resina Technovit 7100 (Heraeus Kulzer GmbH).

Sezioni semifini (spessore 3-5  $\mu\text{m}$ ) sono state ottenute tramite un microtomo LKB 8800 e colorate con:

- 1) TBO come colorante generico;
- 2) PAS per i polisaccaridi insolubili;
- 3) Auramina- O per la cuticola;
- 4) DAPI per i nuclei.

Le metodologie di colorazione seguite sono quelle indicate da O' Brien e McCully (1983).

Le sezioni sono state osservate e fotografate ad un microscopio ottico ZEISS AXIOPHOT equipaggiato con sistema di epifluorescenza.

Campioni di polline sono stati osservati al microscopio elettronico a scansione previa vaporizzazione del film di oro. È stata inoltre evidenziata la presenza di *pollenkitt* e di amido rispettivamente mediante colorazione con Scarlet R e con reattivo di Lugol (O' Brien e McCully, 1983).

## Analisi del nettare

Le caratteristiche del nettare (volume prodotto, concentrazione e quantità totale di zuccheri) sono state valutate sia nel cosiddetto *standing crop*, ovvero in condizioni naturali in cui gli insetti avevano libero accesso ai fiori, sia in *protected crop*, in cui l'accesso da parte degli impollinatori era stato impedito tramite il posizionamento di cappucci di "voile". E' stata verificata inoltre l'influenza che l'età dei fiori e alcuni fattori ambientali, quali l'eventuale presenza di nubi e il tipo di esposizione della pianta (sole-ombra), possono avere sulle suddette caratteristiche del nettare.

Per quanto riguarda lo *standing crop* sono state utilizzate due piante di cui una esposta in pieno sole e l'altra in ombra. Il nettare è stato campionato da 44 fiori della pianta esposta in pieno sole e da 39 di quella in ombra. Gli stadi fiorali considerati sono stati: giovane ed adulto; 30 fiori allo stadio senescente sono stati analizzati ma risultati privi di nettare. E' stata presa in esame anche l'eventuale copertura nuvolosa (cielo coperto per oltre il 50%) per determinare se tale variabile influenza la produzione di nettare.

In condizioni di *protected crop* sono state utilizzate 4 piante, di cui 2 esposte al sole e 2 all'ombra. Da esse il nettare è stato prelevato da 487 fiori di cui 255 appartenenti a piante al sole e 232 appartenenti a piante ombreggiate. Anche in questo caso sono stati presi in considerazione i fattori "stadio florale" e "presenza-assenza di nubi" per studiarne l'influenza sulla produzione di nettare (volume, concentrazione e quantità totale di zuccheri). In questo caso, a differenza dello *standing crop*, sono stati presi in considerazione gli stadi fiorali giovane, adulto e senescente perché tutti presentavano differenti quantità di nettare.

Durante la raccolta e le analisi del nettare sono state registrate temperatura ed umidità relativa ad intervalli di un'ora. La temperatura è un parametro richiesto per effettuare le opportune correzioni ai valori della concentrazione degli zuccheri letti nel rifrattometro da campo, che è calibrato correttamente ad una temperatura di 20 °C.

Il nettare è stato prelevato dai fiori tramite capillari in vetro con calibrazione a 5 µl. Il volume è stato determinato misurando l'altezza del livello del nettare nel capillare su di un foglio di carta millimetrata ed applicando quindi la formula:

$$\text{volume } (\mu\text{l}) = l/L \times 5$$

dove l è l'altezza del livello del nettare (mm) nel capillare ed L è la lunghezza (mm) del capillare fino al segno di calibrazione.

La concentrazione del nettare (% in peso) è stata determinata mediante un rifrattometro

da campo adattato a piccole quantità di nettare (Stanley e Bellingham, mod. Eclipse, 0-50 °Brix) tenendo conto delle opportune correzioni legate alla temperatura ambientale. La quantità totale di zuccheri (mg di zuccheri totali per fiore) è stata quindi calcolata mediante la formula indicata da Bolten *et al.* (1979):

$$\text{zuccheri totali (mg)} = C/100 \times V \times D$$

dove C è la concentrazione letta al rifrattometro (% in peso), V il volume di nettare ( $\mu\text{l}$ ) e D la densità del saccarosio alla concentrazione osservata, desunta da Weast e Astle (1978-79).

### **Determinazione degli zuccheri nel nettare**

Il nettare di 5 fiori allo stadio adulto è stato prelevato mediante capillare e conservato a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  per effettuare successivamente la determinazione degli zuccheri in esso contenuti. Al momento dell'analisi il nettare è stato diluito 1:100 in acqua distillata e la determinazione è stata condotta mediante HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Come fase mobile è stata utilizzata una miscela acetonitrile:acqua 3:1 (v:v). La colonna era costituita da una fase aminopropilsilanica termostata a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ : i picchi venivano rivelati tramite un *Detector* ad indice di rifrazione (Waters 2410). Sono stati iniettati  $20\ \mu\text{l}$  di campione e soluzione standard. Il flusso della fase mobile è stato regolato a  $1\ \text{ml/min}$ . Per ogni campione sono state effettuate 3 serie di analisi per verificarne la ripetitività.

### **Misurazione del pH del nettare**

IL pH del nettare ai vari stadi fiorali è stato calcolato con un sensore di pH a stato solido.

### **Insetti impollinatori**

Per verificare il numero, la frequenza e il tipo di insetti che visitano i fiori di *Daphne sericea* sono stati effettuati 3 monitoraggi di un'ora ciascuno ripetuti per 3 giornate con cielo sereno nel periodo di massima fioritura di piante esposte al sole e all'ombra.

Durante le osservazioni sono stati annotati il numero e il tipo di insetti che visitavano i fiori in un'area di  $20 \times 20\ \text{cm}$  sulla superficie della pianta, individuando anche il tipo di sostanza raccolta dagli impollinatori (nettare o polline). Gli insetti sono stati catturati e quindi conservati in alcool etilico 80% per effettuare la loro successiva determinazione.



### **Prove di impollinazione manuale**

Sono state effettuate prove di impollinazione manuale: su dieci piante sono stati marcati sessanta fiori prima dell'antesi. Su ogni pianta venti fiori sono stati emasculati prima della deiscenza delle antere e successivamente impollinati con polline di altri individui, altri venti sono stati autoimpollinati e i rimanenti venti sono stati lasciati come controllo per permettere l'impollinazione naturale.

### **Produzione di fiori e frutti**

Sono state marcate e monitorate per tutto il tempo della fioritura (da Marzo a Maggio) 10 piante di *Daphne sericea*, di cui 5 al sole e 5 all'ombra. Per ognuna di esse sono state etichettate 5 infiorescenze terminali per determinare il numero totale di fiori prodotti nel periodo complessivo della fioritura. Sulle etichette veniva riportato di volta in volta il numero dei nuovi fiori, marcando i petali con un pennarello indelebile per esser certi di non contarli due volte. Le stesse infiorescenze sono servite anche per determinare il numero di frutti prodotti. Per non rischiare di avere delle sottostime, durante il periodo di fruttificazione (Maggio-Giugno), sono stati disposti dei cappucci di "voile" sulle infiorescenze osservate, in modo tale da raccogliere frutti eventualmente staccatisi dalla pianta madre. Il numero di frutti prodotti da ciascuna infiorescenza è stato determinato alla fine del periodo di fruttificazione (Maggio-Giugno).

### **Dispersione dei semi**

Per impedire agli eventuali agenti di dispersione il libero accesso ai frutti maturi, circa dieci piante sono state coperte, durante la fase di sviluppo dei frutti, con dei cappucci di garza con maglie aventi il diametro di 2-3 mm. Quando i frutti hanno raggiunto la fase di maturazione, i rami sono stati liberati e tra i rami delle diverse piante e sotto le stesse è stata posizionata una serie di trappole.

### **Vitalità dei semi**

Frutti maturi sono stati prelevati in campo, portati in laboratorio e mantenuti a temperatura ambiente fino al completo disseccamento della polpa. Successivamente i frutti sono stati privati dai residui della polpa disseccata ed i semi sono stati conservati a temperatura ambiente.

Per saggiare la vitalità dei semi di *D. sericea* è stato effettuato il test con i Sali di Tetrazolio. I semi sono stati posti ad imbibire in una capsula Petri su carta assorbente imbevuta in acqua per 24 ore.

I semi sono stati tagliati a metà in sezione longitudinale: una metà di ciascun seme è stata posta nella soluzione di Sali di Tetrazolio al buio per 90 minuti, l'altra metà è stata posta in acqua distillata. I semi vitali sottoposti a tale trattamento assumono una colorazione rosea.

### **Germinazione dei semi**

I semi di *D. sericea* sono stati posti a germinare secondo le seguenti modalità:

- I. In capsula di Petri (su carta assorbente imbevuta in acqua) e nel terreno
- II. Con pretrattamento a basse temperature in capsula di Petri e nel terreno
- III. Con pretrattamento a 120 °C per 90 minuti (simulando l'effetto termico di un incendio superficiale) in capsula di Petri e nel terreno
- IV. Con pretrattamento a basse temperature, previa scarificazione

### **Analisi statistica dei dati**

La normalità nella distribuzione dei dati e l'omogeneità della loro varianza sono state valutate rispettivamente con il test di Kolmogorov-Smirnov e il test di Leven. Nel caso in cui tali condizioni siano risultate soddisfatte sono stati utilizzati il test t per la comparazione tra due campioni o l'analisi della varianza (ANOVA) per la comparazione tra più di due campioni. Nel caso in cui, anche dopo eventuali trasformazioni, le suddette condizioni non siano risultate soddisfatte sono stati utilizzati i test non parametrici U di Mann-Whitney e l'ANOVA per ranghi di Kruskal-Wallis.

Tutte le analisi statistiche sono state condotte con il *Package* "Statistica 6.0" per Windows fissando il livello di significatività  $\alpha=0,05$ .

### 4.3. RISULTATI

#### Morfologia del fiore

I fiori di *Daphne sericea* sono monoclini e raggruppati in fascetti apicali in numero di 5-25. Il perianzio di ogni singolo fiore è bianco-lanoso, con tubo lungo circa 6 mm, mentre i 4 petali, che all'antesi assumono una colorazione rosa brillante, sono ovali con lacinie di 2,5 x 4 mm. I fiori sono molto profumati e provvisti di minuscole brattee caduche. L'ovario è libero e sormontato da un grosso stimma; gli stami sono in numero di 8, con antere giallo-arancione appena emergenti dal tubo. Le antere sono disposte su 8 filamenti, 4 più corti e 4 più lunghi (stami tetradinami); quelle dell'ordine inferiore restano nascoste insieme al pistillo all'interno del tubo corollino, mentre quelle dell'ordine superiore fuoriescono da esso. Le antere consistono di 4 logge.

L'ovario è supero e ricoperto da una densa peluria. Lo stimma, sessile, non fuoriesce dal tubo corollino date le piccole dimensioni dell'ovario; il massimo diametro longitudinale è mediamente 3,2 mm, mentre quello trasversale 1,6 mm.

Il diametro esterno della corolla è di  $10,4 \pm 0,5$  mm (media e deviazione standard); quello interno è di  $1,9 \pm 0,1$  mm (media e deviazione standard); infine, la lunghezza del tubo corollino è di  $8,1 \pm 0,5$  mm (media e deviazione standard).

Il numero medio di fiori per infiorescenza è 5,8, mentre il numero medio di infiorescenze per ramo è 2,19.

I bocci sono raggruppati in gruppi di 5 e, in ciascun gruppo, procedono sincronicamente nel loro sviluppo. Sulla medesima infiorescenza coesistono gruppi di fiori a diversi stadi di fioritura (Fig. 1, B). Addirittura, all'inizio della fruttificazione (metà Maggio) sono stati notati nella stessa infiorescenza bocci e frutti già pronti alla dispersione.

La fruttificazione è stata completata a metà Giugno.

#### Fenologia

La fioritura di *Daphne sericea* si protrae per alcuni mesi: i primi fiori sono stati osservati all'inizio di Marzo, mentre gli ultimi funzionali a metà Maggio.

La durata media dell'antesi in fiori appartenenti a piante esposte al sole è  $5,00 \pm 0,81$  giorni (media e deviazione standard) mentre in fiori di piante coperte da altra vegetazione è  $8,60 \pm 2,16$  giorni (media e deviazione standard).

La differenza è statisticamente significativa (test U di Mann Whitney,  $Z = -3,75$ ;

p=0,0001).

Quando i fiori iniziano ad aprirsi (stadio giovane), sia il colore della corolla (rosa acceso), sia il suo profumo intenso, sono fortemente attrattivi per molti tipi di insetti.

La colorazione vistosa permane fino alla completa distensione dei petali (stadio adulto), dopo di che comincia a farsi più pallida fino a diventare bianco-giallastra (stadio senescente) (Tab. 4.1).

La durata delle singole fasi è differente nei due gruppi di piante (sole-ombra).

L'emissione del profumo, sebbene meno intenso, permane a lungo fino allo stadio senescente.

Quando il fiore è impollinato appassisce ma non cade a terra; le infiorescenze restano così sulla pianta, mentre, al loro interno, si sviluppa una drupa carnosa che a maturità sguscerà fuori dal fiore essiccato (Fig. 4.1).

Il frutto si sviluppa velocemente dopo circa un mese e mezzo dall'impollinazione, assume progressivamente un colore che passa dal verde all'arancione pallido fino ad avere, a maturazione avvenuta, una colorazione arancione intenso. La porzione carnosa è di aspetto traslucido tanto da lasciar intravedere l'unico seme nero all'interno. A questo punto le dimensioni del frutto determinano la rottura della parte basale del calice florale appassito che cade a terra mentre i frutti maturi restano ancora per alcuni giorni sulla pianta (Fig. 4.1, D).

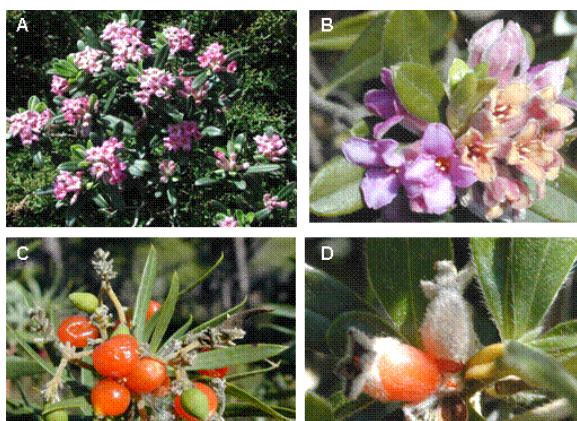


Fig. 4.1. Fiori e frutti di *Daphne sericea*. Arbusto fiorito (A) (aprile); particolare dell'infiorescenza con fiori a vari stadi di sviluppo (B); frutti a diversi stadi di maturazione (C) (maggio 2004); particolare del frutto che sguscia dal perianzio florale appassito (D).

Nel corso del monitoraggio fenologico è stato riscontrato che le gemme floreali si formano all'inizio del mese di marzo, mentre il periodo di fioritura comincia alla fine dello stesso mese, protraendosi fino alla fine del mese di aprile. Lo sviluppo dei nuovi germogli, così come la formazione dei frutti, avviene nel periodo che va da maggio a giugno; mese in cui i frutti stessi maturano.

Osservazioni condotte per più anni, durante tutte le stagioni, non hanno mai evidenziato la fase di germinazione dei semi e di attecchimento delle plantule.

### **Polline: morfologia, vitalità e produzione**

Dagli studi condotti al microscopio a fluorescenza si evince che in *Daphne sericea* la microsporogenesi si svolge normalmente.

Il polline di *Daphne sericea* è di colore arancione, ha una forma sferica (diametro 22  $\mu\text{m}$ ), è pantoporato e presenta esina subtectata, reticolata e psilata. Non sono evidenti differenze morfologiche apprezzabili tra i granuli pollinici dei due ordini di antere (superiori ed inferiori). Sulla superficie del polline è presente del *pollenkitt*, sostanza di origine sporofitica, ricca di lipidi, che conferisce al granulo pollinico notevole resistenza alla disidratazione.

All'interno del granulo si trova amido come sostanza di riserva.

La vitalità del polline si mantiene tra il 63 ed il 92% per tutta la durata del fiore. Non ci sono differenze significative tra i due ordini di antere (test di Mann-Whitney,  $Z=-1,072$ ;  $p=0,282$ ).

Dai conteggi effettuati risulta che il numero medio di granuli di polline per antera è  $4.220\pm 630$  nelle antere dell'ordine superiore e  $4.740\pm 321$  nelle antere dell'ordine inferiore. La differenza non è statisticamente significativa (test di Mann-Whitney,  $Z=-1,357$ ;  $p=0,174$ ).

Ciascun fiore produce in totale  $35.840\pm 4362$  granuli di polline.

Poiché nell'ovario si trova un solo ovulo, ne consegue che tale valore rappresenta anche il rapporto P/O (P = numero di granuli di polline, O = numero di ovuli). Valori del rapporto P/O così elevati ( $>2108$ ) sono stati messi in relazione con un sistema riproduttivo della pianta di tipo "xenogamia obbligata" (Cruden, 1977).

La correlazione tra la percentuale di polline germinato sullo stigma e il volume degli ovari è risultata altamente significativa ( $p<0,01$ ).

### **Recettività stigmaticca**

Le papille stigmaticche sono turgide in antesi, mentre si disidratano dopo qualche giorno.

L'applicazione del test DAB mostra che lo stigma è già recettivo quando il fiore è ancora in boccio. La colorazione marrone intenso risulta localizzata in alcune zone della superficie stigmaticca, stando ad indicare che non tutte le papille stigmaticche risultano recettive.

Con l'avanzare degli stadi fiorali la percentuale di superficie stigmaticca recettiva aumenta progressivamente fino a raggiungere il massimo allo stadio adulto. La recettività dello stadio senescente risulta pressoché simile a quella dello stadio giovane.

### **Macrosporogenesi-macrogametogenesi**

Dall'analisi anatomica degli ovari di *D. sericea* durante le fasi di macrosporogenesi e macrogametogenesi, si evince che generalmente l'ovario presenta un unico ovulo ortotropo.

Analizzando nei dettagli una sezione longitudinale mediana di un ovario ad inizio fioritura, procedendo dall'interno verso l'esterno, si vede il sacco embrionale in via di formazione, la nocella ben formata e perfettamente aderente al tegumento interno che precede il tegumento esterno; entrambi i tegumenti delimitano il micropilo. Infine, tra il tegumento esterno e la parete dell'ovario è possibile osservare una sottilissima zona di placenta.

L'analisi anatomica ha dimostrato che in molti fiori con corolla, stami e carpello morfologicamente ben formati l'ovario presenta due ovuli il cui sviluppo si è arrestato in due fasi diverse, ma comunque molto precoci.

In altri casi sono stati osservati ovari con un unico ovulo ortotropo con anomale invaginazioni; negli ovuli anormali i due tegumenti non sono ben distinguibili.

### **Fecondazione ed Embriogenesi**

Anche osservando le sezioni di ovari appartenenti allo stadio di "ovari a fine fioritura" è stato possibile individuare situazioni normali e situazioni anomale.

L'embrione in via di sviluppo è situato al polo micropilare del sacco embrionale che presenta l'endosperma secondario in via di differenziazione. Con il procedere dell'accrescimento, l'embrione assume la forma "a cuore", fino a raggiungere lo stadio in cui lo strato esterno del tegumento interno subisce il processo di lignificazione ed

assume una colorazione scura.

Anche in corrispondenza di questo stadio, in ovari dall'apparenza normale sono stati individuati ovuli a sviluppo anormale: in alcune sezioni è stata riscontrata una sorta di forma "a fiasco", in altre, invece, è evidente la formazione di un ovulo atrofico.

Dalle analisi anatomiche delle sezioni longitudinali mediane di ovari di *D. sericea* è possibile dedurre che, in genere, gli ovari della specie in esame hanno caratteristiche di sviluppo delle angiosperme. Nella specie in esame sono stati osservati anche ovari apparentemente normali, ma con ovuli deformi. Tali anomalie, riscontrate su buona parte degli ovari raccolti ed analizzati in laboratorio, rendono impossibile lo sviluppo del macrogametofito, provocano l'aborto dell'ovario, impedendo la formazione del frutto e quindi del seme.

Tuttavia un numero elevato di ovuli ben formati supera le altre fasi del ciclo fino a permettere la formazione di frutti maturi.

### nettario

Il nettario florale è un disco ipogino plurilobato fotosintetizzante in cui il nettare fuoriesce da stomi modificati che si ritrovano nell'epidermide della porzione interna del disco (Fig 4.2). Al di sopra dell'epidermide si trova uno spesso strato di cuticola. Ciascun lobo è costituito da un ammasso di cellule parenchimatiche in cui si approfonda un fascio conduttore composto da xilema e floema.

I fasci xilematici si ritrovano solo nella parte basale, mentre quelli floematici si ramificano nella porzione più periferica. Nel parenchima non è stato evidenziato amido a nessuno stadio di sviluppo.

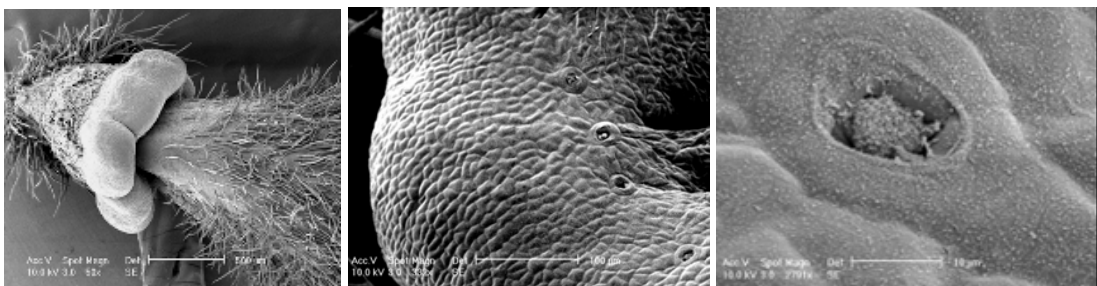


Fig . 4.2. Microfotografie al microscopio elettronico del nettario di *D. sericea*.

## Caratteristiche del nettare

### Standing Crop

Il fattore età del fiore (stadio giovane – stadio adulto) influisce significativamente sulle caratteristiche del nettare (Tab. 4.1). Il fiore allo stadio giovane presenta mediamente una quantità di nettare quasi doppia rispetto a quella del fiore allo stadio adulto. Ne consegue che la quantità totale di zuccheri risulta maggiore nei fiori allo stadio giovane nonostante presentino una minore concentrazione.

Il nettare non è mai stato ritrovato nei fiori allo stadio senescente.

Tab. 4.1. Effetto dell'età del fiore sul volume, la concentrazione e gli zuccheri totali del nettare prodotto in condizione di *standing crop* (Test t).

<i>Età del fiore</i>	<b>Media giovane</b>	<b>Media adulto</b>	<b>valore t</b>	<b>gl</b>	<b>p</b>	<b>N giovane</b>	<b>N adulto</b>
<b>Volume (µl)</b>	0,995	0,516	2,995	42	0,00459	29	15
<b>Concentrazione (%)</b>	28,829	35,856	-4,438	36	0,00008	27	11
<b>Zuccheri Tot. (mg)</b>	0,343	0,251	2,169	36	0,03675	27	11

L'ANOVA a due vie ha evidenziato un effetto significativo dei fattori esposizione e presenza di nubi, nonché della loro interazione, sul volume di nettare (Tab. 4.2).

I fiori delle piante esposte al sole presentano un maggior volume di nettare ( $0,83\pm 0,55$  µl) rispetto ai fiori di piante ombreggiate ( $0,53\pm 0,44$  µl). In presenza di nubi la produzione di nettare è inferiore rispetto alla condizione di cielo sereno ( $0,653\pm 0,445$  vs.  $0,936\pm 0,429$  µl). In maniera più dettagliata (Fig. 4.3), l'esposizione delle piante (sole-ombra) è ininfluente sul volume del nettare quando non c'è copertura nuvolosa, ma importante nel caso opposto. La nuvolosità, infatti, diminuisce significativamente la quantità di nettare prodotto solo nelle piante all'ombra, rispetto sia a quelle al sole sia alle stesse all'ombra ma in assenza di nubi.

Da notare che tale analisi è valida solo per i fiori giovani, poiché non sono disponibili dati per i fiori adulti di piante ombreggiate.



Tab. 4.2. Effetto delle variabili esposizione (sole-ombra), nubi (presenza-assenza) e della loro interazione sul volume di nettare prodotto in condizione di *standing crop* (ANOVA fattoriale a due vie).

<i>Volume del nettare</i>	SS	Gradi di libertà	MS	F	p
<b>Esposizione</b>	2,604	1	2,604	14,10	0,00037
<b>Nubi</b>	1,297	1	1,297	7,031	0,01008
<b>Esposiz*Nubi</b>	0,838	1	0,838	4,540	0,03695
<b>Errore</b>	11,813	64	0,184		

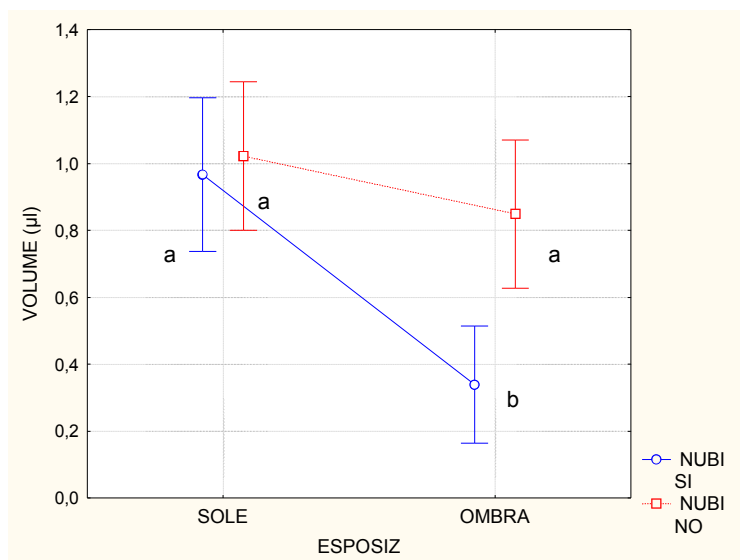


Fig. 4.3. Volume di nettare prodotto in condizione di *standing crop* in funzione dell'esposizione e della presenza di nubi. Le barre verticali indicano intervalli di confidenza al 0,95 e la diversità di lettere medie significativamente differenti ( $p < 0,05$ ).

Rispetto alla concentrazione e alla quantità totale di zuccheri del nettare, solamente il fattore esposizione (sole-ombra) mostra un effetto significativo (Fig. 4.4).

In particolare, le piante al sole producono un nettare più concentrato e con una maggiore quantità di zuccheri totali (Fig. 4.4.).

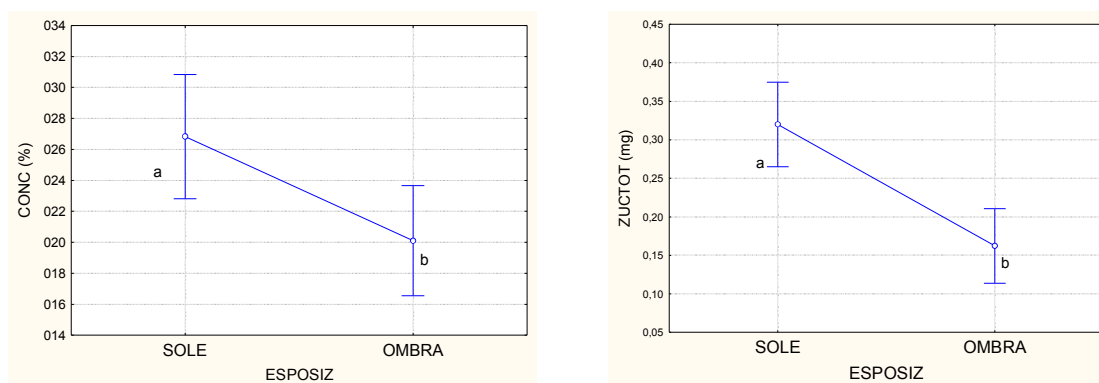


Fig. 4.4. Concentrazione e quantità totale di zuccheri del nettare prodotto in condizione di *standing crop* in funzione dell'esposizione. Le barre verticali indicano intervalli di confidenza al 0,95 e la diversità di lettere medie significativamente differenti ( $p < 0,05$ ).

#### Protected crop

Il fattore età del fiore mostra un effetto significativo sul volume, la concentrazione e gli zuccheri totali del nettare. La quantità di nettare aumenta dallo stadio giovane a quello adulto e diminuisce passando dallo stadio adulto a quello senescente (ANOVA per Ranghi Kruskal-Wallis  $H=150,32$ ;  $p=0,0000$ ) (Fig. 4.5).

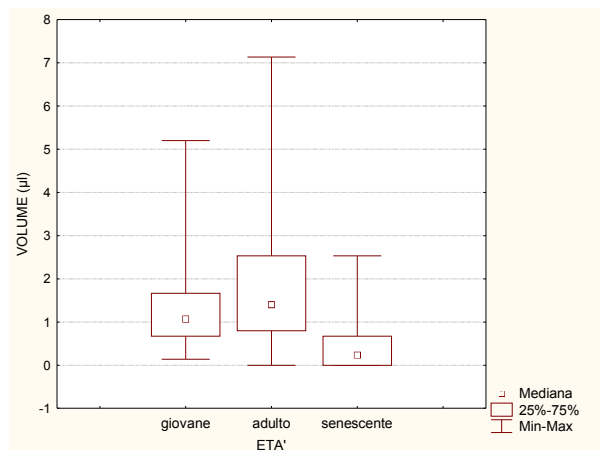


Fig. 4.5 Volume di nettare prodotto in *protected crop* in funzione dell' età del fiore (stadio giovane, adulto e senescente).

La concentrazione del nettare aumenta progressivamente con l'avanzare dell'età del fiore (ANOVA per Ranghi Kruskal-Wallis  $H=154,409$ ;  $p=0,0000$ ) (Fig. 4.6.).

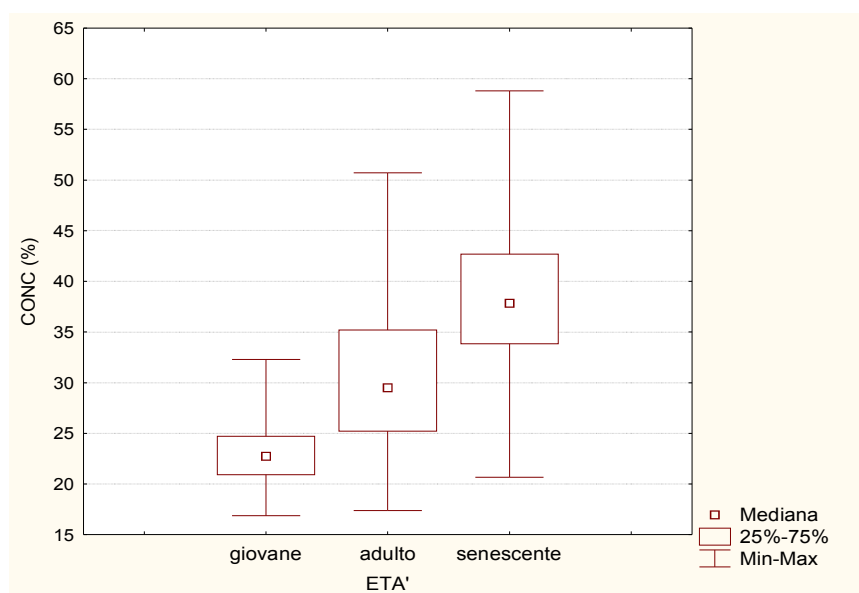


Fig. 4.6. Concentrazione del nettare prodotto in condizione di *protected crop* in funzione dell'età del fiore (stadio giovane, adulto e senescente).

La quantità di zuccheri totali mostra lo stesso andamento del volume di nettare ( $H=59,956$ ;  $p=0,0000$ ) (Fig. 4.7).

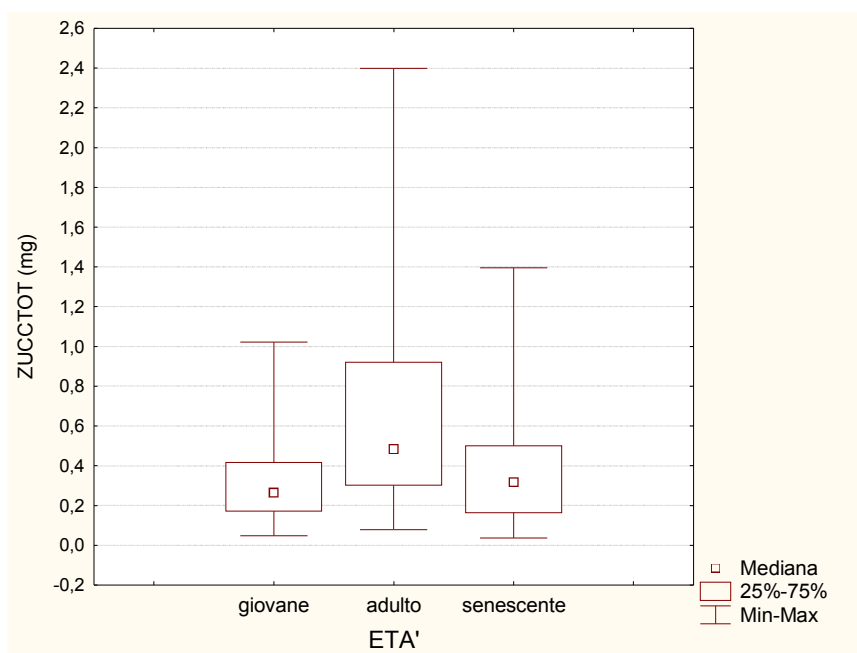


Fig. 4.7. Quantità di zuccheri totali del nettare prodotto in condizione di *protected crop* in funzione dell'età del fiore (stadio giovane, adulto e senescente).

L'esposizione delle piante (sole-ombra) ha ugualmente un effetto significativo sul volume, la concentrazione e la quantità totale di zuccheri del nettare. Le piante al sole producono un maggior volume di nettare, con maggiore concentrazione e quindi anche maggiore quantità totale di zuccheri (Tab. 4.3).

Tab. 4.3. Effetto della variabile esposizione (sole-ombra) sul volume, la concentrazione e la quantità di zuccheri totali del nettare prodotto in condizione di *protected crop* (Test U di Mann-Whitney).

<i>Esposizione</i>	<b>Mediana sole</b>	<b>Mediana ombra</b>	<b>U</b>	<b>Z</b>	<b>p-level</b>	<b>N sole</b>	<b>N ombra</b>
<b>Volume (µl)</b>	1,06	0,96	24581	3,22	0,00127	255	232
<b>Concentraz. (%)</b>	28,72	26,50	17973	2,40	0,01616	216	193
<b>Zuccheri Tot (mg)</b>	0,43	0,34	15959	4,09	0,00004	216	193

La presenza-assenza di nubi mostra un effetto significativo solo sulla concentrazione del nettare e sulla quantità di zuccheri totali. La concentrazione è maggiore in assenza di nubi così come la quantità di zuccheri totali (Tab. 4.4).

Tab. 4.4. Effetto della variabile presenza-assenza di nubi sul volume, la concentrazione e la quantità di zuccheri totali del nettare prodotto in condizione di *protected crop*. (Test U di Mann-Whitney).

<i>Nubi</i>	<b>Mediana Nubi no</b>	<b>Mediana Nubi si</b>	<b>U</b>	<b>Z</b>	<b>p-level</b>	<b>N Nubi no</b>	<b>N Nubi si</b>
<b>Volume (µl)</b>	1,00	1,06	27198	0,926	0,354302	289	198
<b>Concentraz. (%)</b>	30,78	25,78	14846	4,779	0,000002	233	176
<b>Zuccheri Tot (mg)</b>	0,40	0,33	17643	2,417	0,015648	233	176

La quantità totale di zuccheri del nettare prodotto da fiori allo stadio giovane e adulto, di piante esposte in pieno sole, è risultato significativamente maggiore rispetto a quello di piante ombreggiate, l'effetto dell'esposizione non è significativo nei fiori senescenti (Tab. 4.5).

Tab. 4.5. Effetto della variabile esposizione (sole-ombra) sulla quantità di zuccheri totali nei fiori giovani, adulti e senescenti in condizione di *protected crop* (Test U di Mann-Whitney).

Eposizione.	Mediana sole	Mediana ombra	U	Z	p-level	N sole	N ombra
Zuccheri tot. fiore giovane	0,34	0,21	812	3,947	0,00007	57	51
Zuccheri tot. fiore adulto	0,70	0,46	4937	3,496	0,00047	119	113
Zuccheri tot. fiore senescente	0,32	0,27	516	0,771	0,44014	40	29

Considerando anche la variabile assenza-presenza di nubi risulta che la quantità totale di zuccheri del nettare prodotto dai fiori giovani, di piante esposte al sole, è maggiore rispetto a quelli di piante in ombra solo in presenza di nubi. Esaminando fiori allo stadio adulto le differenze sono sempre significative sia in assenza che in presenza di nubi.

#### **Confronto tra “standing crop” e “protected crop”**

Il confronto delle caratteristiche del nettare in *protected* e *standing crop*, relativamente agli stadi giovane ed adulto, ha evidenziato differenze significative per quanto riguarda il volume prodotto e la quantità totale di zuccheri (Tab. 4.6). In particolare, nel *protected crop* i fiori mostrano una quantità di nettare maggiore e, non essendoci differenze significative nella concentrazione, anche una maggiore quantità totale di zuccheri.

Tab. 4.6. L'esclusione degli impollinatori (condizione di *protected crop*) mostra un effetto significativo sul volume del nettare e sulla quantità totale di zuccheri, non sulla concentrazione del nettare secreto (Test U di Mann-Whitney).

	Mediana protected	Mediana standing	U	Z	p-level	N protec	N stand
<b>Volume</b>	1,00	0,60	6831	7,484	0,0000	349	83
<b>Concentrazione</b>	27,89	27,30	12831	1,280	0,2004	340	83
<b>Zuccheri tot.</b>	0,39	0,19	6383	7,737	0,0000	340	83

E' interessante notare che nello *standing crop* il volume del nettare ritrovato allo stadio giovane risulta maggiore rispetto a quello del fiore adulto mentre nel *protected crop* il volume maggiore si ritrova nel fiore adulto (come diretta conseguenza della presenza dei cappucci di "voile" che impediscono l'attività bottinatrice degli insetti).

#### **Determinazione degli zuccheri del nettare**

La determinazione degli zuccheri del nettare per HPLC ha evidenziato la presenza di saccarosio, glucosio e fruttosio rispettivamente alle seguenti concentrazioni (mg/ml):  $382 \pm 65,96$ ;  $17,56 \pm 13,89$ ;  $19,38 \pm 13,94$  (media e deviazione standard).

Il rapporto S/G+F risulta  $14,96 \pm 8,63$ .

#### **Determinazione del pH del nettare**

Il valore medio del pH del nettare prelevato dai fiori ai vari stadi è risultato  $4,5 \pm 0,6$ .

#### **Produzione di fiori e frutti**

La produzione di fiori è significativamente maggiore nelle piante esposte al sole rispetto a quelle all'ombra (20,00 vs. 10,00;  $p = 0,0053$ , Test U di Mann-Whitney), così come la produzione di frutti (7,00 vs. 3,00;  $p = 0,0400$ , Test U di Mann-Whitney). Tuttavia non vi è una differenza significativa per quanto riguarda la percentuale di fruttificazione, cioè il rapporto F/f (F = frutti, f = fiori) che risulta circa il 33% per entrambe le esposizioni ( $0,331$  al sole vs.  $0,339$  all'ombra;  $p = 0,879$ , Test t).

I frutti maturano nel mese di Giugno, sono bacche di forma ovale, con dimensioni di circa 1 x 0,5 cm.

L'esocarpo, sottile e membranoso, è di colore rosso, il mesocarpo è succulento e l'endocarpo è rappresentato da un sottile strato di cellule. All'interno del frutto si trova un sottilissimo strato gelatinoso derivante dalla placenta, all'interno del quale è immerso il seme. E' ricoperto da un sottile tegumento esterno di colore chiaro e consistenza membranacea e dal sottostante tegumento interno di colore scuro e significativo.

### **Impollinazione**

Dalle prove di impollinazione manuale eseguite in campo, è risultato che in seguito all'autoimpollinazione non è stato ottenuto nessun frutto maturo, mentre effettuando l'impollinazione incrociata si è ottenuta una percentuale di frutti maturi simile a quella ottenuta con l'impollinazione naturale (Fig. 4.8).

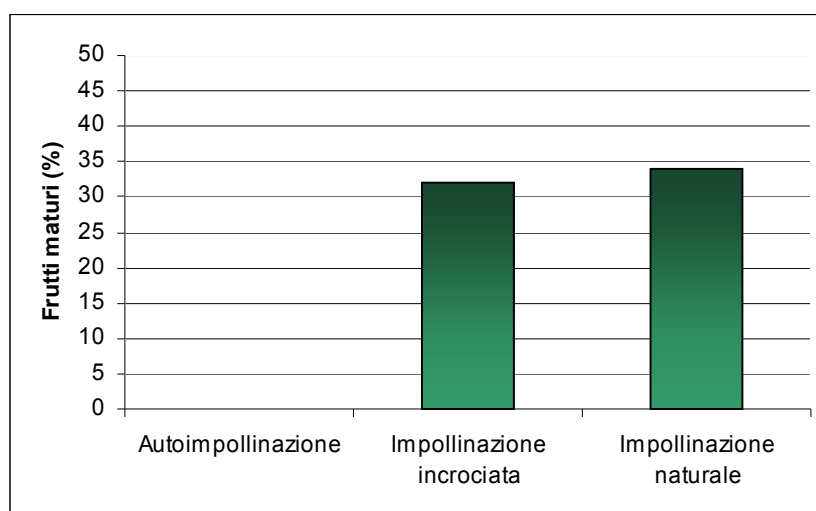


Fig. 4.8. Risultati degli esperimenti di impollinazione manuale di *D. sericea*.

Verificato il successo dell'impollinazione naturale (che risulta addirittura leggermente superiore a quella manuale), si è proceduto a determinare i vettori di polline.

### **Impollinatori diurni**

Le osservazioni effettuate sulle piante presenti all'interno del Parco Regionale della Maremma (Gr) hanno messo in evidenza che i fiori di *Daphne sericea* vengono visitati da impollinatori che raccolgono sia polline che nettare. Sebbene sui fiori di *Daphne sericea* siano stati osservati molti insetti, solo alcuni di essi sembrano svolgere un importante ruolo nell'impollinazione. In particolare, la presenza degli imenotteri (*Apis*



*mellifera*, *Bombus lucorum*, *Xilocopa violacea*) è risultata dominante (circa il 49%) rispetto a quella delle altre famiglie: lepidotteri (26%, *Gonepteryx rhamnii*), coleotteri (21%, *Oxythyrea funesta*, *Meligethes sp.*) e ditteri (2%, *Alophora hemiptera*). Alcuni visitatori sono mostrati in Fig. 4.9.

Le api bottinano il nettare ed il polline. I coleotteri, dato il loro apparato boccale masticatore, bottinano solo il polline. Mosche e formiche raccolgono esclusivamente nettare. Dalle osservazioni è risultato che molti insetti, fra cui le api ed i bombi, riuscivano a “forzare” il fiore in boccio per poter accedere per primi alle ricompense; in questo caso è stato interessante constatare la funzionalità di stigmi ed antere e la presenza di nettare nei fiori ancora in boccio. Alcuni visitatori erano estremamente piccoli ed è stato necessario utilizzare cappucci di tessuto a maglie piccole in modo da poterli escludere per verificare l’eventuale capacità di autoimpollinazione.

Gli impollinatori diurni, soprattutto api (*Apis mellifera*) e bombi (*Bombus lucorum*), hanno mostrato una maggiore frequenza di visite nei confronti delle piante esposte in piena luce, rispetto a quelle in ombra (2,5 vs. 0,5 visite/ora), soprattutto durante le ore centrali della giornata.



Fig. 4.9. Insetti visitatori dei fiori di *Daphne sericea* all'interno del Parco Regionale della Maremma (Gr). *Apis mellifera* (A); *Bombus lucorum* (B); dittero (C); *Gonepteryx rhamnii* (D); *Xylocopa violacea* (E); *Alophora hemiptera* (F); *Meligethes* sp.(G); *Oxythyrea funesta* (H).

### **Impollinatori notturni**

Le continue e ripetute osservazioni dirette effettuate durante il giorno nella macchia mediterranea della Riserva Naturale di Castelvoturno (CE) hanno dimostrato che i fiori non venivano visitati da alcun agente impollinatore diurno. Tuttavia, l'osservazione dell'inizio dell'antesi ed il concomitante aumento dell'intensità dell'aroma florale al crepuscolo, hanno suggerito di verificare l'eventuale presenza di pronubi notturni. Mediante osservazioni notturne si è riusciti a verificare che i lepidotteri notturni appartenenti al genere *Agrotis* sono attivi impollinatori di questa specie (Fig. 4.10). Questi, alla ricerca del nettare, inseriscono la lunga spiritromba impregnata di polline nel tubo corollino di *D. sericea*, raggiungendo lo stamma sessile del piccolo ovario, situato alla base, determinando involontariamente l'impollinazione.



Fig. 4.10. Impollinatore notturno di *D. sericea*.

### **Dispersione**

I frutti maturano senza problemi e se vengono protetti mediante cappucci di garza che ne impediscono la sottrazione, rimangono maturi sui rami per diversi giorni, successivamente si disidratano e cadono al suolo.

Osservazioni dirette e la posa di trappole sulle piante della Riserva Naturale di Castelvoturno, hanno portato ad ipotizzare che uccelli appartenenti alla sottofamiglia dei *Fringillidae*, in particolare alla specie *Carduelis chloris*, possano essere i probabili agenti della dispersione.

Le osservazioni effettuate sulle piante presenti all'interno del Parco Regionale della Maremma hanno evidenziato che quando i frutti cadono a terra (perchè non sono stati mangiati dagli uccelli), le formiche li trasportano verso il nido, comportandosi come agenti di dispersione, anche se a breve distanza.

### Vitalità e germinazione dei semi

In quasi tutti i semi raccolti e successivamente aperti in laboratorio, è stato visto che in essi è presente endosperma secondario, ben turgido e di colore bianco, all'interno del quale è immerso un embrione morfologicamente normale e di dimensioni di circa 2 x 1 mm. Si possono distinguere i due cotiledoni che andranno a costituire le foglie embrionali e l'ipocotile dal quale si sviluppa la radichetta (Fig. 4.11).

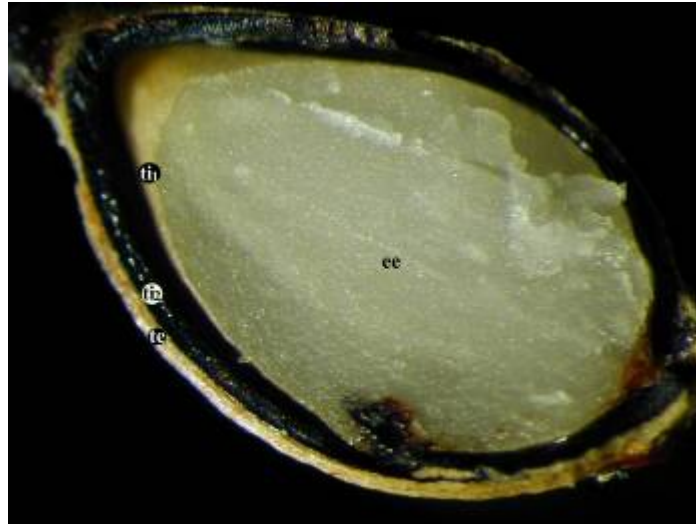


Fig. 4.11. Sezione longitudinale mediana del seme di *D. sericea*; ee, embrione immerso nell'endosperma; ti, tegumento seminale interno; te, tegumento seminale esterno.

La vitalità dei semi è stata saggiata mediante il test effettuato con i Sali di tetrazolio. I risultati di questi test hanno dimostrato che gli embrioni sono vitali, dal momento che assumono una colorazione rosea (Fig. 4.12).

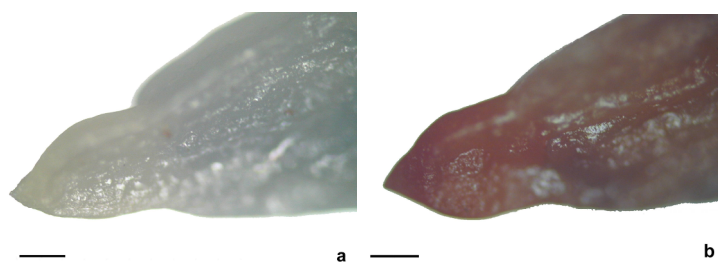


Fig.4.12. Microfotografia dell'embrione di *D. sericea* prima e dopo il trattamento con i Sali di tetrazolio. Le barre di riferimento corrispondono a 200 micron.

Per le prove di germinazione i risultati sono i seguenti:

- I. In capsula Petri su carta assorbente al buio e nel terreno non c'è stata germinazione;
- II. Con pretrattamento a 120 °C per 90 minuti, sia in capsula Petri che nel terreno, non c'è stata germinazione;
- III. Con pretrattamento a basse temperature in capsula petri e nel terreno non c'è stata germinazione;
- IV. Con pretrattamento a basse temperature, scarificazione e in capsula Petri non c'è stata germinazione;
- V. Nel terreno, previa scarificazione, non c'è stata germinazione;
- VI. In seguito alla collocazione dei semi scarificati in capsula Petri è stato riscontrato un inizio di germinazione, i due cotiledoni si sono distesi, ma poi né l'apice radicale, né quello vegetativo si sono sviluppati.

#### 4.4. DISCUSSIONE

##### Struttura del nettario

Il termine nettario non si riferisce ad una ben definita struttura anatomica perché ne esistono differenti tipi con differente origine anatomica (Pacini *et al.*, 2003). Possono essere invece definiti dal punto di vista ecologico come tessuti specializzati nel produrre sostanze che attraggono gli animali (Nepi *et al.*, 1996a). Il nettario florale di *Daphne sericea* è qui descritto per la prima volta; si presenta come un disco disposto attorno alla base dell'ovario ed appartiene quindi ad una delle classi morfologiche più frequenti descritte da Fahn (1979). La secrezione del nettare avviene nella parte del nettario rivolta verso l'ovario dove sono presenti degli stomi attraverso i quali il nettare fuoriesce. La modalità di secrezione attraverso stomi modificati che rimangono sempre aperti, è comune a molte altre specie (Fahn, 1979; Davis e Gunning, 1992; Nepi *et al.*, 1996b). La presenza di numerosi peli alla base dell'ovario, ovvero nella zona in cui si accumula il nettare, può contribuire a ridurre l'evaporazione della componente acquosa del nettare oltre che a favorirne la risalita lungo il tubo corollino. Inoltre, la dislocazione del nettario stesso alla base del tubo corollino conferisce una certa protezione contro l'evaporazione. La concentrazione degli zuccheri è mediamente più bassa nel nettare di fiori di forma tubulare ed inoltre in essi si ritrova prevalentemente un nettare ricco in saccarosio in contrapposizione a nettari ben esposti all'ambiente esterno in cui il nettare è maggiormente concentrato e di solito ricco in monosaccaridi (Percival, 1961; Corbet *et al.*, 1979).

I risultati da noi ottenuti per *D. sericea* confermano questa tendenza.

La componente zuccherina del nettare può avere differente origine (Pacini *et al.*, 2003):

- 1) derivare direttamente dall'attività fotosintetica del parenchima nettario nel caso in cui esso sia fotosintetizzante;
- 2) derivare dall'idrolisi dell'amido immagazzinato nelle cellule del parenchima nettario non fotosintetizzante. L'amido immagazzinato nelle fasi pre-secretorie deriva dalla fotosintesi effettuata in altre parti della pianta nei giorni precedenti la secrezione del nettare.

Nel primo caso la produzione di nettare può essere influenzata dalle condizioni climatiche contingenti, nel secondo caso invece risente anche delle condizioni climatiche dei giorni antecedenti la secrezione.

Le due differenti modalità di produzione della componente zuccherina del nettare sono in genere correlate con il suo tasso di secrezione. Quando tale parametro è basso (poco nettare prodotto in un lungo periodo di tempo) prevale in genere la prima modalità. Nel caso in cui il tasso di produzione sia alto (molto nettare in poco tempo) si attua la seconda modalità (Pacini *et al.*, 2003; Nepi *et al.*, 1996a). Le osservazioni effettuate sul nettario di *Daphne sericea* hanno evidenziato che non vi è accumulo di amido ed il nettare deriva direttamente dall'attività fotosintetica del parenchima nettario, che ha infatti una colorazione verde. Ciò è in accordo con quanto precedentemente detto riguardo al tasso di secrezione del nettare. Infatti, il fiore di *D. sericea* produce un volume di nettare relativamente basso (mai superiore ai 4,5 µl) e la secrezione si prolunga per 5-9 giorni. Questa caratteristica spiega inoltre la maggiore produzione di nettare osservata nelle giornate di cielo sereno rispetto a quelle con presenza di copertura nuvolosa.

### **Composizione del nettare**

La composizione del nettare secreto mostra un'ampia variabilità interspecifica legata a fattori genetici ed ecologici (Fahn, 1979; Baker e Baker, 1983a, b) mentre più limitata sembra essere la variabilità intraspecifica legata a fattori fisiologici ed ambientali (Baker e Baker, 1983b).

I principali componenti del nettare sono zuccheri (glucosio, fruttosio e saccarosio) ma possono essere presenti in quantità assai minore anche proteine, lipidi, aminoacidi (Baker e Baker, 1983a). In base alla diversa quantità relativa degli zuccheri presenti, espressa dal rapporto S/G+F (dove S = quantità di saccarosio in g; G = quantità di glucosio in g; F = quantità di fruttosio in g), Baker e Baker (1983b) classificano il nettare in quattro classi: 1) S/G+F < 0,1 glucosio-fruttosio dominanti. 2) S/G+F tra 0,1-0,499 glucosio-fruttosio abbondanti. 3) S/G+F tra 0,5-0,99 saccarosio-abbondante. 4) S/G+F > 0,999 saccarosio-dominante. Secondo tale classificazione il nettare di *D. sericea* appartiene alla classe saccarosio-dominante in quanto il rapporto S/G+F è di 14,96±8,63. Gli stessi autori mettono in relazione il valore di questo rapporto con le differenti tipologie di impollinatori. In particolare, nettari saccarosio-dominanti sembrano essere quelli preferiti da “*long tongued bees*” (lunghezza della ligula > 6 mm) e dalle farfalle, sia diurne che notturne. Le osservazioni sugli impollinatori di *D. sericea* confermano pienamente tale correlazione, infatti nelle piante del Parco Regionale della Maremma (Gr), il 75% delle visite avviene ad opera di farfalle diurne ed imenotteri tra

cui *Bombus lucorum* e *Xylocopa violacea* appartengono alla classe “long tongued bees”. *Apis mellifera*, la cui ligula ha una lunghezza di circa 6 mm, non mostra una particolare preferenza per una categoria di nettare, essa comunque raccoglie anche il polline di *D. sericea*.

Le osservazioni effettuate nella macchia mediterranea della Riserva Naturale di Castelvoturno (CE) hanno dimostrato che i fiori venivano visitati da lepidotteri notturni appartenenti al genere *Agrotis*. Questi ultimi, alla ricerca del nettare, inseriscono la lunga spiritromba impregnata di polline nel tubo corollino di *D. sericea*, raggiungendo lo stimma sessile del piccolo ovario, situato alla base, determinando involontariamente l'impollinazione. La lunghezza del tubo corollino di *D. sericea* è molto simile a quella della spiritromba dei lepidotteri del genere *Agrotis*.

Le differenze riscontrate tra i due siti relativamente al numero di impollinatori diurni, potrebbero essere spiegate considerando che sono due ambienti diversi.

I valori di pH riscontrati nel nettare sono ampiamente variabili da 2,8 in *Strelitzia reginae* a 10 in *Viburnum costaricanum* (Baker e Baker, 1983a,b), ma nella maggior parte dei casi si ritrovano valori al di sotto della neutralità, così come osservato anche in *D. sericea* (pH 4,5).

### **Produzione di nettare**

La produzione di nettare, intesa come volume prodotto, concentrazione e quindi quantità totale di zuccheri mostra un'elevata variabilità intraspecifica legata a fattori ambientali (Fahn, 1979; Cruden *et al.*, 1983; Marden, 1984; Freeman e Head, 1990; Wyatt *et al.*, 1992) e fisiologici della pianta (Gottsberger *et al.*, 1990; Petanidou *et al.*, 1996). Il presente studio ha rilevato che le caratteristiche del nettare di *D. sericea* sono significativamente influenzate dalle condizioni climatiche, microclimatiche e dallo stadio florale. In giorni con cielo sereno la concentrazione del nettare, così come la quantità totale di zuccheri, è maggiore rispetto a giorni con copertura nuvolosa, mentre non si evidenziano differenze significative per quanto riguarda il volume. Nelle giornate di sole, quindi, la maggiore potenzialità fotosintetica determina un maggiore investimento energetico nella produzione di nettare. Tuttavia il nettare in condizioni di cielo sereno subisce una più intensa evaporazione dovuta a valori più alti di temperatura (22-30 °C con cielo sereno, 15-19 °C con copertura nuvolosa) e a valori più bassi di umidità relativa (30-45% con cielo sereno, 39-71% con copertura nuvolosa). Il maggior tasso di evaporazione rende non significativa la differenza nel volume di nettare



prodotto in assenza-presenza di nubi. Correlazioni tra concentrazione del nettare, RH e temperatura sono state evidenziate in numerose altre specie (Corbet *et al.*, 1979; Jakobsen e Kristjansson, 1994; Petanidou *et al.*, 1996; Búrquez e Corbet, 1998; Nicolson e Nepi, 2004). In contrasto con quanto avviene per *D. sericea*, che mostra il tasso di produzione di nettare relativamente basso di *D. sericea*, rende questa specie molto più suscettibile agli effetti dei parametri ambientali rispetto a quelle piante che hanno un elevato tasso di secrezione (Búrquez e Corbet, 1998; Nicolson e Nepi, 2004). Per quanto riguarda l'effetto delle caratteristiche microclimatiche, è stata evidenziata una significativa influenza dell'esposizione della pianta alla luce su volume, concentrazione e quantità totale di zuccheri: piante esposte in pieno sole mostrano valori maggiori di tutte e tre le variabili rispetto a piante coperte da sovrastante vegetazione. Se ne deduce che le piante ombreggiate investono una minore quantità di energia nella produzione di nettare, intesa come quantità totale di zuccheri, in quanto ricevono una minore quantità di radiazione luminosa e quindi possiedono livelli inferiori di fotosintesi rispetto alle piante in pieno sole. In alcune piante è stato dimostrato che un'alta percentuale di materiali neofotosintetizzati può essere devoluta alla produzione di nettare (Southwick, 1984; Pyke, 1991) e che una riduzione, naturale o indotta, dell'attività fotosintetica determina una diminuzione nella produzione di nettare (Búrquez e Corbet, 1998 e referenze in esso contenute).

È interessante notare che l'effetto dell'esposizione ad una ridotta radiazione luminosa è differente nei tre stadi fiorali esaminati in *D. sericea*. Tale effetto è significativo negli stadi fiorali giovane ed adulto ma non nello stadio senescente che mostra un tasso di secrezione assai ridotto, come evidenziato dal minore volume di nettare ritrovato in tali fiori in condizione di *protected crop*.

Così come in altre specie (Nepi *et al.*, 2001; Nicolson e Nepi, 2004), anche in *D. sericea* è evidente un significativo effetto dell'età del fiore sulle caratteristiche del nettare. Il volume del nettare aumenta fino allo stadio adulto e diminuisce allo stadio senescente, mentre la concentrazione aumenta progressivamente. Questo andamento risulta dall'interazione tra tasso di secrezione del nettare ed evaporazione: l'alto tasso di secrezione che caratterizza gli stadi fiorali giovane ed adulto compensa ampiamente l'evaporazione, quindi il volume di nettare aumenta; nello stadio senescente, invece, il ridotto tasso di secrezione non compensa l'evaporazione ed il volume di nettare diminuisce contemporaneamente ad un incremento della concentrazione.

La quantità totale di zuccheri mostra lo stesso andamento del volume: aumenta dallo

stadio giovane allo stadio adulto e diminuisce allo stadio senescente. Questo ultimo aspetto ci fa ipotizzare un processo di riassorbimento della componente zuccherina durante lo stadio senescente. Nicolson e Nepi (2004) riportano gli stessi andamenti di volume, concentrazione e zuccheri totali nei differenti stadi fiorali di *Aloe castanea* ed ipotizzano ugualmente un processo di riassorbimento. Bieleski e Redgwell (1980) hanno ipotizzato un movimento bidirezionale degli zuccheri: a) dal nettario all'esterno e b) dall'esterno verso l'interno grazie al processo di riassorbimento che gioca un ruolo significativo nella composizione finale del nettare. In *Daphne sericea* è ipotizzabile che il processo di riassorbimento avvenga anche negli stadi fiorali giovane ed adulto, ma che in questo caso risulti mascherato dall'alto tasso di secrezione che caratterizza questi stadi.

### **Impollinazione**

Il colore sgargiante della corolla, la produzione di nettare, la presenza di profumo e le dimensioni del fiore stesso, evidenziano in *Daphne sericea* una chiara sindrome da impollinazione entomofila (Faegri e Van der Pijl, 1979).

Le caratteristiche dell'involucro florale sono direttamente collegate al tipo di impollinazione e, nel caso di quella entomofila, al tipo di insetto (Strasburger, 1982).

Come già discusso precedentemente la composizione del nettare può essere correlata con gli impollinatori: l'elevato rapporto S/G+F riscontrato in *D. sericea* è tipico del nettare raccolto da "long-tongued bees" e da farfalle.

Inoltre, il fiore presenta un tubo corollino la cui lunghezza è molto simile a quella della spiritromba dei lepidotteri (tra cui quelli del genere *Agrotis*).

Anche la concentrazione degli zuccheri nel nettare della maggior parte delle piante riflette i gusti degli impollinatori e le limitazioni fisiche legate al loro apparato boccale. I nettari di fiori impollinati da api tendono ad avere concentrazioni zuccherine più alte di fiori impollinati da altri animali (Baker, 1975) ed *Apis mellifera* preferisce concentrazioni di zuccheri dal 30 al 50% (Waller, 1972). I nettari della maggior parte dei fiori impollinati da farfalle cadono nel range del 15-25%: la velocità di estrazione del nettare è meccanicamente limitata a concentrazioni superiori a causa della maggiore viscosità del nettare stesso (Kingsolver e Daniel, 1979).

Il nettare di *D. sericea* mostra una concentrazione di  $28,42 \pm 7,59\%$ , intermedia quindi ai due range sopra indicati. E' da tenere in considerazione, inoltre, che lo stadio senescente, caratterizzato da colorazione pallida, intenso profumo, presenza di polline

vitale, stigma recettivo e presenza di nettare, possa svolgere un importante ruolo nell'attrarre impollinatori notturni. Aronne e Wilcock (1996) hanno infatti osservato farfalle notturne del genere *Agrotis* visitare frequentemente i fiori di *D. sericea*. L'alta concentrazione del nettare dei fiori senescenti (fino a circa il 60%) è apparentemente in contrasto con la visita da parte di insetti che preferiscono un nettare poco viscoso e quindi con una concentrazione relativamente bassa. Tuttavia è da tenere in considerazione che:

- 1) le farfalle, così come anche imenotteri e ditteri, possono diluire il nettare con la propria saliva (Kevan e Baker, 1983);
- 2) il nettare può diluirsi durante le ore serali e notturne come conseguenza dell'aumento di umidità relativa. Secondo Corbet *et al.* (1979) un nettare con una concentrazione zuccherina del 60% è in equilibrio con un valore di RH del 90%: valori superiori determinano assorbimento di acqua dall'ambiente circostante.

Da quanto esposto sopra si deduce che la sindrome florale di *D. sericea* è intermedia tra la melittofilia, psicofilia e falenofilia e che quindi non c'è una vera specializzazione nel sistema di impollinazione.

Gli insetti diurni tendono a compiere un maggior numero di visite alle piante in pieno sole nei cui fiori trovano una maggiore quantità di nettare rispetto a quelle in ombra. Le stesse piante producono fascetti apicali con un numero maggiore di fiori ed è stato dimostrato che la maggiore densità florale comporta una spesa energetica minore durante l'attività di foraggiamento da parte degli insetti (Zimmerman, 1990). L'esposizione al sole consente loro un risparmio energetico legato ad un "riscaldamento" antecedente il volo, tipico degli insetti. Inoltre, anche la maggiore luminosità che caratterizza le piante in pieno sole, facilita il volo e l'attività degli impollinatori diurni (Pacini, 1995).

Nonostante la notevole differenza nel numero di visite da parte di insetti diurni, la percentuale di fruttificazione è di circa il 33% sia nelle piante al sole che in quelle in ombra. La maggiore durata dell'antesi florale nelle piante in ombra (8,6 vs. 5 giorni nelle piante al sole) non sembra essere sufficiente a compensare la minore frequenza di visita come invece dimostrato in *Cyclamen persicum* (Eisikowitch *et al.*, 2004). E' quindi ipotizzabile che siano gli impollinatori notturni a visitare più frequentemente le piante all'ombra dove, data la minore frequenza di visita degli impollinatori diurni, trovano un'adeguata quantità di nettare. In molti studi effettuati su piante in cui era stata osservata un'impollinazione sia diurna che notturna, quest'ultima è sempre risultata

positiva ai fini del successo riproduttivo delle specie (Guitiàn *et al.*, 1993; Groman e Pellmyr, 1999; Young, 2002).

Inoltre, è stato riportato che le corolle di colore rosa sono particolarmente visibili agli insetti dopo il crepuscolo e che il profumo di questi fiori è massimo di sera.

Le riserve dei granuli di polline possono essere costituite da oli, zuccheri o amido. Generalmente il polline contenente amido è tipico delle piante ad impollinazione anemofila, mentre nelle specie ad impollinazione entomofila il polline contiene soprattutto zuccheri o lipidi. Secondo Baker & Baker (1979), in linea di massima, i granuli che contengono amido hanno un diametro maggiore rispetto a quelli che contengono altre sostanze di riserva. *D. sericea* presenta amido all'interno dei granuli di polline, che mostrano un diametro mediamente superiore rispetto alle altre specie di angiosperme. Stanley e Linskens (1974) sostengono che il polline delle specie ad impollinazione anemofila è meno nutriente rispetto a quello delle specie ad impollinazione entomofila. Il polline di *D. sericea*, quindi, contenendo amido non è tra quelli più nutrienti. Una spiegazione a questo potrebbe essere che il suo principale impollinatore, il lepidottero notturno del genere *Agrotis*, non si alimenta di polline che quindi, nel corso dell'evoluzione non è stato soggetto al miglioramento delle sue caratteristiche nutrizionali. Nonostante ciò, grazie alla sua lunga spiritromba impregnata di polline, riesce a raggiungere lo stamma sessile del piccolo ovario situato alla base del fiore tubuliforme, compiendo così l'impollinazione.

### **Dispersione dei semi**

In *D. sericea* è indubbio che i semi siano dispersi, in quanto tutti i frutti sono prelevati dalle piante appena raggiunta la fase di maturazione. Gli agenti responsabili della dispersione sono uccelli appartenenti alla famiglia dei Fringillidae, specie *Carduelis chloris*.

Il ritrovamento dei semi solo nel terreno prelevato sotto i cespugli, e non nelle zone tra un cespuglio ed un altro, si spiegherebbe con le caratteristiche comportamentali di questi uccelli che vivono nidificando tra i cespugli; da qui raggiungono i frutti maturi (non visibili dall'alto della pianta a causa del nuovo sviluppo vegetativo) risalendo i rami dal basso verso l'alto.

Nell'ambiente mediterraneo gli uccelli stanziali o migratori sono particolarmente attratti da molti frutti carnosì e vistosi, di colore rosso-arancione, come quelli della *Daphne sericea*. Nel caso di elevata disponibilità e varietà di frutti, l'avifauna sceglie quelli con

un solo seme (monospermi) che contengono relativamente più polpa (Herrera, 1981). Negli ecosistemi di tipo mediterraneo del Sud Africa e dell'Australia Sud-Occidentale è da sempre noto il ruolo delle formiche nella dispersione del seme (disseminazione mirmecocora): l'azione di questi insetti è spesso più importante di quella dei vertebrati e rappresenta un adattamento alla carenza di nutrimento dei suoli. Studi recenti hanno dimostrato che anche nella macchia mediterranea i semi di molte specie, la cui disseminazione si riteneva dovuta principalmente all'avifauna, vengono dispersi pure da formiche (Aronne e Wilcock, 1994) e ciò è stato osservato anche in *D. sericea* durante il presente studio. Tuttavia è da considerare che la dispersione da parte delle formiche avviene a breve distanza (Pacini, 1995) e questo potrebbe essere correlato con la distribuzione di tipo *patchiness* delle popolazioni di *D. sericea*.

E' molto probabile che tale distribuzione possa indurre gli impollinatori a visitare piante della stessa popolazione diminuendo così il flusso genico inter-popolazione e la variabilità genetica intra-popolazione. Secondo Bernardello *et al.* (2004) un sistema riproduttivo autoincompatibile, come quello di *D. sericea* (Romano *et al.*, 2002), insieme ad una ridotta variabilità genetica e ad una diminuita dimensione della popolazione, sono minacce alla sopravvivenza di una specie.

### **Biologia della conservazione - Conclusioni**

A causa del suo ruolo fondamentale nel successo riproduttivo, nel livello e nella distribuzione della variabilità genetica, il sistema riproduttivo condiziona la salute di una popolazione e il suo mantenimento (Gaudeul e Till-Bottraud, 2004). Il mantenimento di una popolazione è fortemente influenzato sia da meccanismi demografici che genetici. Questi due tipi di meccanismi non agiscono indipendentemente l'uno dall'altro, ma, piuttosto, interagiscono ed il sistema riproduttivo si trova alla loro interfaccia: il successo riproduttivo determina in parte la velocità di crescita della popolazione mentre il flusso genetico attraverso il polline e i semi influenza il livello e la distribuzione della variabilità genetica (Gaudeul e Till-Bottraud, 2004). La capacità di dispersione ha conseguenze sia a livello individuale, attraverso il coefficiente di in-incestro (*inbreeding*) e la possibile depressione da in-incestro, che a livello di popolazione attraverso il potenziale evolutivo. Perciò, dal momento che il sistema riproduttivo determina i parametri fondamentali sia qualitativi (genetici) che quantitativi (demografici), la caratterizzazione della biologia riproduttiva delle specie a rischio fornisce un'informazione fondamentale per suggerire opportune strategie di

conservazione.

Il successo riproduttivo di *D. sericea*, inteso come percentuale di fiori che maturano frutti, evidenziato in questo studio (circa il 33%) è considerato relativamente buono se paragonato con altre specie perenni e può essere considerato indicativo di una sufficiente attività degli impollinatori (Eisikowitch *et al.*, 2004).

I risultati degli esperimenti di impollinazione manuale hanno permesso di stabilire che *D. sericea* è una specie autoincompatibile e che la percentuale di fiori impollinati manualmente in grado di sviluppare frutti è simile a quella dei fiori impollinati naturalmente, pertanto la specie non è affetta da carenza di impollinazione.

Soltanto una piccola parte degli ovari prelevati e analizzati all'inizio e alla fine della fioritura ha mostrato di contenere ovuli deformati che impediscono la formazione del frutto e quindi del seme.

Caratteristiche legate al sistema riproduttivo che possono influenzare negativamente il mantenimento e l'espansione delle popolazioni sembrano quindi da ricercare più nei meccanismi di dispersione e germinazione dei semi di *D. sericea* di cui si hanno scarse informazioni. Precedenti indagini compiute sulla stessa popolazione di *D. sericea* presso il Parco Regionale della Maremma (Gr), hanno evidenziato una elevata vitalità dei semi prodotti (95%) (Mugnaini *et al.*, 2004). Nonostante i semi siano, per la maggior parte, ben formati e dotati di embrioni vitali, quindi potenzialmente in grado di sviluppare nuove piantine, non sono tuttavia capaci di germinare facilmente né in campo, in ambiente naturale, né in laboratorio, in ambiente controllato. Avendo rilevato un presunto inizio di germinazione nei semi scarificati, si potrebbe ipotizzare che la struttura del tegumento seminale impedisca la germinazione del seme e quindi la riproduzione della specie in esame (Romano *et al.*, 2002).

I semi di *Daphne* sono considerati profondamente dormienti ed hanno bisogno di pre-trattamenti chimici e fisici per poter germinare in condizioni sperimentali (Piotto *et al.*, 2001).

Prove sperimentali condotte su semi di altre specie hanno dimostrato che gli animali possono scarificare i semi nel loro intestino agevolando così la germinazione (Howe & Smallwood, 1982). E' probabile che anche i semi di *D. sericea*, passando attraverso l'apparato digerente degli uccelli, nel tentativo di essere digeriti, subiscano una scarificazione naturale ed accidentale, dopo di che arrivano al terreno. L'assenza di plantule osservata in campo potrebbe essere messa in relazione al fatto che in passato (prima della realizzazione delle opere di bonifica sia nel Parco Naturale della Maremma

che nella Riserva Naturale di Castelvolturno), le piante di *D. sericea* crescevano in un ambiente molto diverso da quello attuale, per la presenza di acqua superficiale che poteva influire sulla germinazione dei semi e sull'attecchimento delle plantule. E' probabile che attualmente, questi semi, cadendo in un substrato sabbioso ed estremamente asciutto durante il periodo di maturazione dei frutti, non trovino le condizioni idonee per la germinazione e la successiva fase di attecchimento delle plantule.

### **Individuazione della fase critica**

Attraverso questo studio è stato accertato che la fase critica del ciclo riproduttivo di *D. sericea* è la germinazione dei semi e il successivo attecchimento delle plantule. Di conseguenza i piani di intervento per la conservazione di questa specie a lungo termine devono prevedere azioni finalizzate al superamento di tale fase, valutando l'influenza dei fattori ambientali su tali processi fondamentali.

Oltre alle difficoltà di germinazione dei semi ed attecchimento delle plantule, altre possibili cause che hanno potuto determinare la vulnerabilità di *Daphne sericea* sono: cambiamenti climatici o microclimatici, frammentazione dell'*habitat*, distribuzione di tipo *patchiness*, problemi di *in-breeding*.

#### **BIBLIOGRAFIA CAPITOLO 4**

- Aronne, G. (1999). Effect of relative humidity and temperature stress on pollen viability of *Cistus incanus* L. and *Myrtus communis* L. *Grana*, 38: 364-367.
- Aronne, G., Martinez-Pallè, E. (1998). Autoecologia e conservazione di *Daphne sericea* Vahl (Thymeleaceae). *Atti del 93° Congresso della Società Botanica Italiana*, 1-3 ottobre, p. 96.
- Aronne, G., Wilcock, C. C. (1994). First evidence of myrmecochory in fleshly-fruited shrubs of the Mediterranean region. *New Phytologist* **124**: 781-788.
- Aronne, G., Wilcock, C. C. (1994). Reproductive characteristics and breeding system of shrubs of the Mediterranean region. *Functional Ecology*, 8: 69-76.
- Aronne, G., Wilcock, C. C. (1996). Floral biology of *Daphne sericea* Vahl (Thymelaeaceae), a rare species of the Mediterranean shrublands. Proceedings of the International Congress Reproductive Biology 96, Kew (UK). pag. 26.
- Aronne, G., Wilcock, C. C. (1997). Reproductive phenology in Mediterranean MACchia Vegetation. *Lagascalia*, 19 (1-2): 445-454.
- Baker H. G., Baker, I. (1983b). Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. In: Jones, C. E., Little, R. J. (eds.) *Handbook of Experimental Pollination Biology*. Scientific and Academic Edition, Van Nostrand Reinhold, New York. pp. 117-141.
- Baker, H. G. (1975). Sugar concentrations in nectars from hummingbird flowers. *Biotropica* **7**: 37-41.
- Baker, H. G., Baker, I. (1979). Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. *Amer. J. Bot.*, 66(5): 591-600.
- Baker, H. G., Baker, I. (1983a). A brief historical review of the chemistry of floral nectar. In: Bentley, B., Elias, T. (eds.) *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York. pp. 126-152.
- Bernardello, G., Aguilar, R., Anderson, J. (2004). The reproductive biology of *Sophora fernandeziana* (Leguminosae), a vulnerable endemic species from Isla Robinson Crusoe. *American Journal of Botany* **2**: 198-206.
- Bielesky, R. L., Redgwell, R. J. (1980). Sorbitol metabolism in nectaries from flowers of Rosaceae. *Australian Journal of Plant Physiology* **7**: 15-25.
- Bolten, A. B., Feinsinger, P., Baker, H. G., Baker, I. (1979). On the Calculation of Sugar



- Concentration in Flower Nectar. *Oecologia (Berl.)* **41**: 301-304.
- Buonanno, M., Esposito, A., Mazzoleni, S. (1993). La vegetazione della Riserva Naturale di Castelvoturno (CE). *Giorn. Bot. It.* 126:178.
- Burquéz, A., Corbet, S. A. (1998). Dynamics of production and exploitation of nectar: lessons from *Impatiens glandulifera* Royle. In: Bahadur, B. (ed.) *Nectary biology*. Dattsons, J.L. Nehru Marg, Sadar, Nagpur, India. pp.130-152.
- Bussotti, F., Schirone, B. (2001). La vegetazione mediterranea. In: Piotto, B., Di Noi, A. (eds.) *Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea*. ANPA, Roma. pp. 17-23.
- Conti, F., Manzi, A., Pedrotti, F. (1997). *Liste rosse regionali delle piante d' Italia*. Università degli Studi di Camerino, Camerino.
- Corbet, S. A., Willmer, P. G., Beament, J. W. L., Unwin, D. M., Prys-Jones, O. E. (1979). Post- secretory determinants of sugar concentration in nectar. *Plant Cell and Environment* **2**: 293-303.
- Cruden R. W. (1979). Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* **31**: 32-46.
- Cruden, R. W., Hermann, S. M., Peterson, S. (1983). Patterns of nectar production and plant-animal coevolution. In: Bentley, B., Elias, T. (eds.) *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York. pp. 80-125.
- Dafni, A. (1992). *Pollination ecology, a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Damiani, G. (2001). Presentazione al volume: Piotto, B., Di Noi, A. (eds.) *Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea*. ANPA, Roma. pp. 12-16.
- Davis, A. R., Gunning, B. E. S. (1992). The modified stomata of the floral nectary of *Vicia faba* L. Development, anatomy and ultrastructure. *Protoplasma* **166**:134-152.
- Eisikowitch, D., Schwartz, R., Dafni, A. (2004). Who pollinate *Cyclamen persicum* in Israel?. XI Optima Meeting. Beograd 5-11. IX. 2004. Abstack. pag. 36.
- Faegri, K., Van der Pijl, (1979). *The principles of pollination ecology*. Third revised edition. Pergamon Press, Oxford.
- Fahn, A. (1979). *Secretory tissues in plants*. Academic Press, London.
- Franchi, G. G., Pacini, E. (1996). Types of pollination and seed dispersal in Mediterranean plants. *Giornale Botanico Italiano* **130**: 579-585.

- Francini, E., Messeri, A. (1955). L'isola di Marettimo nell'arcipelago delle Egadi e la sua vegetazione. *Webbia*, vol. XI, pp.607-845.
- Freeman, C. E., Head, K. C. (1990). Temperature and sucrose composition of floral nectars in *Ipomopsis longiflora* under field conditions. *Southwestern Naturalist* **35**: 423-426.
- Gaudeul, M., Till-Bottraud, I. (2004). Reproductive Ecology of the Endangered Alpine Species *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae): Phenology, Gene dispersal and Reproductive Success. *Annals of Botany* **93**: 711-721.
- Gottesberger, G., Arnold, T., Linskens, H. F. (1990). Variations in floral nectar amino acids with ageing of flowers, pollen contamination, and flower damage. *Israel Journal of Botany* **39**: 167-176.
- Groman, J.D., Pellmyr, O., (1999). The pollination biology of *Manfreda virginica* (Agavaceae): relative contribution of diurnal and nocturnal visitors. *Oikos* **87**: 373-381.
- Guitàn, P., Guitàn, J., Navarro, L. (1993). Pollen transfer and diurnal versus nocturnal pollination in *Lonicera etrusca*. *Acta Oecologica* **14**: 219-227.
- Herrera, C. M. (1981). Fruit variation and competition for dispersers in natural population of *Smilax aspera*. *Oikos* **36**: 51-58.
- Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y. (1970). Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluoresceina diacetate. *Stain Technol.*, 45: 115-120.
- Heslop-Harrison, Y., Shivanna, K. R. (1977). The receptive surface of the angiosperm stigma. *Annals of Botany*, 41, 913-922.
- Howe, H. F., Smallwood, J. (1982). Ecology of seed dispersal. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 13: 201-228.
- Jakobsen, H. B., Kristjansson, K. (1994). Influence of Temperature and Floret Age on Nectar Secretion in *Trifolium repens* L. *Annals of Botany* **74**: 327-334.
- Jensen, W. A. (1962). *Botanical histochemistry. Principle and practice*. W. H. Freeman & Company, San Francisco, CA, USA.
- Kevan, P. G., Baker, H. G. (1983). Insects as flower visitors and pollinators. *Annual Review of Entomology*. **28**: 407-453.
- Kingsolver, J. G., Daniel T. L. (1979). On the mechanics and energetic of nectar feeding in butterflies. *Journal of Theoretical Biology* **76**: 167-179.
- Marden, J. H. (1984). Intrapopulation variation in nectar secretion in *Impatiens capensis*. *Oecologia* **63**: 418-422.

- Médail, F., Quézel, P. (1997). Hot-spots analysis for conservation of plants biodiversity in the Mediterranean basin. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **84**: 112-127.
- Mugnaini, S., Nepi, M., Cresti, L., Pacini, E. (2004). I cicli riproduttivi. Report di Ricerca.
- Nepi, M., Ciampolini, F., Pacini, E. (1996a). Development and Ultrastructure of *Cucurbita pepo* Nectaries of Male flowers. *Annals of Botany* **78**: 95-104.
- Nepi, M., Guarnieri, M., Pacini E. (2001). Nectar secretion, reabsorption, and sugar composition in male and female flowers of *Cucurbita Pepo*. *International Journal of Plant Science* **162**: 353-358.
- Nepi, M., Pacini, E., Willemse, M. T. M. (1996b). Nectary Biology of *Cucurbita pepo*: ecophysiological aspects. *Acta Botanica Neerlandica* **45**: 41-54.
- Nicolson, S. W., Nepi, M. (2004). Dilute nectar in dry atmospheres: nectar secretion patterns in *Aloe castanea* (Asphodeceaceae). *International Journal of Plant Sciences*: in press.
- O' Brien, T. P., McCully, M. E. (1983). *The study of plant structure-Principles and selected methods*. Thermacarphi Pty. Ltd., Melbourne.
- Pacini, E. (1995). Ecologia della riproduzione. In: Pignatti, S. (ed.) *Ecologia vegetale*. UTET. Torino. pp. 199-215.
- Pacini, E., Franchi, G. G. (1984). Reproduction in Mediterranean plants. *Webbia* **38**: 93-103.
- Pacini, E., Nepi, M., Ciampolini, F. (1995). Il nettare e l'impollinazione. *Le Scienze* **321**: 64-70.
- Pacini, E., Nepi, M., Vesprini, J. L. (2003). Nectary biodiversity-a short review. *Plant Systematics and Evolution* **238**: 7-21.
- Percival, M. S. (1961). Types of nectar in angiosperms. *New Phytologist* **60**: 235-281.
- Petanidou, T., Van Laere, A. J., Smets, E. (1996). Change in floral nectar components from fresh to senescent flowers of *Capparis spinosa* (Capparidaceae), a nocturnally flowering Mediterranean shrub. *Plant Systematics and Evolution* **199**: 79-92.
- Pignatti S. (1982). *Flora d'Italia*. Edagricole, Bologna.
- Piotto, B. *et al.* (2001). Schede informative sulla propagazione per seme degli alberi e degli arbusti più diffusi della flora mediterranea. In: Piotto, B., Di Noi, A. (eds.) *Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea*. ANPA, Roma. pp. 110-167.
- Pyke, G. (1991). What does it cost a plant to produce floral nectar? *Nature* **350**: 58-59.

- Quèzel, P. (1985). Definition of the Mediterranean region and the origin of the flora. In: Gomez-Campo, C. (ed.) *Plant conservation in the Mediterranean area*. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht. pp. 9-24.
- Romano, R., Aronne, G., Martinez-Pallé, E. (2002). Ciclo biologico della specie rara *Daphne sericea* Vahl: studio delle fasi critiche per la pianificazione di interventi di conservazione. Giornate Scientifiche del Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la Vita. Facoltà di Medicina e Chirurgia, Farmacia, Medicina Veterinaria e Agraria, Portici (NA), 6-7 giugno. pag. 498.
- Schönfelder, I., Schönfelder, P. (1996). *La flora mediterranea*. De Agostini, Novara.
- Southwick, E. E. (1984). Photosynthate allocation to floral nectar: a neglected energy investment. *Ecology* **65**: 1775-1779.
- Stanley, R. G., Linskens, H. F. (1974). *Pollen: Biology, biochemistry, Management*. Springer-Verlag.
- Tenore, M. (1830). *Flor. Neapol.*, 4: 176-177.
- Waller, G. D. (1972). Evaluating responses of honey bees to sugar solutions using an artificial flower feeder. *Annual Entomology Review of American Society* **65**: 857-862.
- Weast, R. C., Astle, M. J. (1978-79). *Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Wilcock, C. C. (1994). *Pollination Biology and Conservation*. A review for Scottish National Heritage, Edinburg.
- Wyatt, R., Broyles, S. B., Derda, G. S. (1992). Environmental influences on nectar production in milkweeds (*Asclepias siriaca* and *A. exaltata*). *American Journal of Botany* **79**: 636-642.
- Young, H. J. (2002). Diurnal and nocturnal pollination of *Silene alba* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany* **89**: 433-440.
- Zimmerman, M. (1990). Nectar production, flowering phenology and strategies for pollination. In: Lovett-Doust, J., Lovett-Doust, L. (eds.) *Plant reproductive ecology*. Oxford University Press, New York. pp.157-178.

## CAPITOLO 5 - *Arbutus unedo* L.

### 5. 1. INTRODUZIONE

I processi riproduttivi delle specie vegetali sono influenzati da molti fattori, tra i quali la mancanza di impollinazione, la predazione di frutti e di semi, la limitazione delle risorse e le condizioni climatiche avverse (Stephenson, 1981).

La fioritura, in alcune specie, è favorita dallo stress idrico (Alvim, 1960; Slatyer, 1974; Kowithayakorn & Humphreys, 1987); mentre in altre è inibita fino a quando non si raggiungono idonee disponibilità di acqua nel suolo (Bronchart, 1962).

La carenza idrica influisce enormemente anche sulla crescita e sulla differenziazione (Turner & Kramer, 1980). In specie ad ampia distribuzione, la produzione di frutti e di semi viene anche influenzata dalla latitudine (Lacey, 1984).

*Arbutus unedo* L. è stata scelta come specie oggetto di studio per il suo lungo periodo riproduttivo (circa 12 mesi) e per la sua ampia distribuzione (si trova dalle coste ai piedi degli Appennini, Pignatti, 1982).

La biologia riproduttiva di *Arbutus unedo* è stata studiata al fine di verificare se i fattori climatici esercitano una pressione selettiva che spinge questa specie ad avere una fioritura tardo-autunnale e un basso successo riproduttivo raggiunto al termine di un periodo di formazione dei frutti lungo più di un anno

#### **Origine e distribuzione della specie**

*Arbutus unedo* L., è una specie originaria delle regioni costiere mediterranee (Fig. 5.1), dall'Europa meridionale all'Asia occidentale e Africa settentrionale, caratterizzate da clima mite ed aridità estiva. Insieme a numerose altre specie arboree ed arbustive tipiche della macchia mediterranea (*Quercus suber* L., *Quercus ilex* L., *Olea oleaster* L., *Myrtus communis* L., *Erica arborea* L.) caratterizza il paesaggio mediterraneo dal livello del mare sino all'alta collina dei 700-1000 metri. In Italia, *A. unedo* è vegeta naturalmente ad un' altitudine di 500 m. s.l.m., sebbene possa trovarsi fino ai 1200 metri in alcune aree del Sud. È presente spontaneamente in diversi tipi di suolo, anche se preferisce i substrati sciolti e subacidi e le aree soleggiate non soggette a gelate.

In Italia formazioni pure di *Arbutus unedo* L. si incontrano nell'estrema Liguria di

Levante, nei colli interni tra Grosseto e Siena e in vasti tratti della Sardegna. E' presente inoltre in Sicilia, Corsica e molte Isole minori (Pignatti, 1982).



Fig. 5.1. Distribuzione di *Arbutus unedo* L.

### **Descrizione della specie**

*Arbutus unedo* L., conosciuto comunemente come Corbezzolo, appartiene alla famiglia delle Ericaceae ed è un arbusto sempreverde della macchia mediterranea alto fino ad un massimo di 12 metri.

E' una sclerofilla che cresce sui pendii rocciosi e sui suoli acidi. Forma spesso macchie, isolate o insieme ad altre specie vegetali, solo occasionalmente forma densi boschi. Si tratta di una specie di grande importanza per le dinamiche della vegetazione perché cresce rapidamente dopo gli incendi.

La chioma è densa, tondeggiante, un po' disordinata e verde scuro lucido.

Il tronco, diritto, obliquo o sinuoso, densamente ramificato, presenta una scorza sottile, finemente e regolarmente desquamata in lunghe e strette placche verticali di colore bruno rossastro.

La corteccia dei rami giovani è rossiccia e vellutata, successivamente più scura e desquamata.

Le foglie persistenti, alterne, coriacee, dotate di breve picciolo rosato, hanno una lamina

obvato-ellittica, con la massima larghezza nella metà superiore. L'apice si presenta acuminato, la base arrotondato-cuneata e il margine regolarmente seghettato. La pagina superiore è lucida, verde scuro con nervature bianche, quella inferiore sublucida, verde chiaro. Possono essere lunghe fino a 10 cm.

E' una specie monoica che fiorisce in autunno inverno, da settembre a gennaio e fruttifica tra settembre e novembre dell'anno successivo, contemporaneamente alla nuova fioritura.

Il ciclo fenologico di *Arbutus unedo* L. è piuttosto lento, protraendosi per circa due anni (Fig. 5.2). Durante questo periodo si osserva un susseguirsi di tre stadi ben distinti nel tempo: di boccioli, di antesi, di fruttificazione, che portano, alla fine del secondo anno, alla completa maturazione del frutto.

I primi boccioli florali iniziano a formarsi a metà giugno e rimangono in uno stato di apparente quiescenza per diversi mesi, da giugno fino ad ottobre, periodo in cui inizia l'antesi che continua talvolta fino ai primi di gennaio. I fiori, quindi, compaiono da ottobre a gennaio e si presentano organizzati in pannocchie corimbose pendule al termine dei rami.

Sono ermafroditi, gamopetali, hanno lunghezza di circa 1 cm e larghezza di circa 5 mm, corolla bianco-rosato lucida, urceolata con calice a 5 brevi lacinie.

Non tutti i fiori di un' infiorescenza si aprono contemporaneamente; al contrario la fioritura è scalare e molto lenta per cui nel secondo anno, sulla stessa infiorescenza, si trovano contemporaneamente boccioli ancora chiusi, fiori aperti e anche piccoli frutti negli ultimi mesi della fioritura. La corolla è precocemente caduca e presto compaiono gli ovari in vari stadi di sviluppo.

In questo stadio di sviluppo post-fecondativo dell'ovario, si ha un rallentamento dei processi di sviluppo che quasi sospendono per alcuni mesi, da novembre fino a maggio; segue la ripresa dei processi di fruttificazione che si svolgono lentamente e si giunge alla completa maturazione del frutto dopo altri sei mesi.

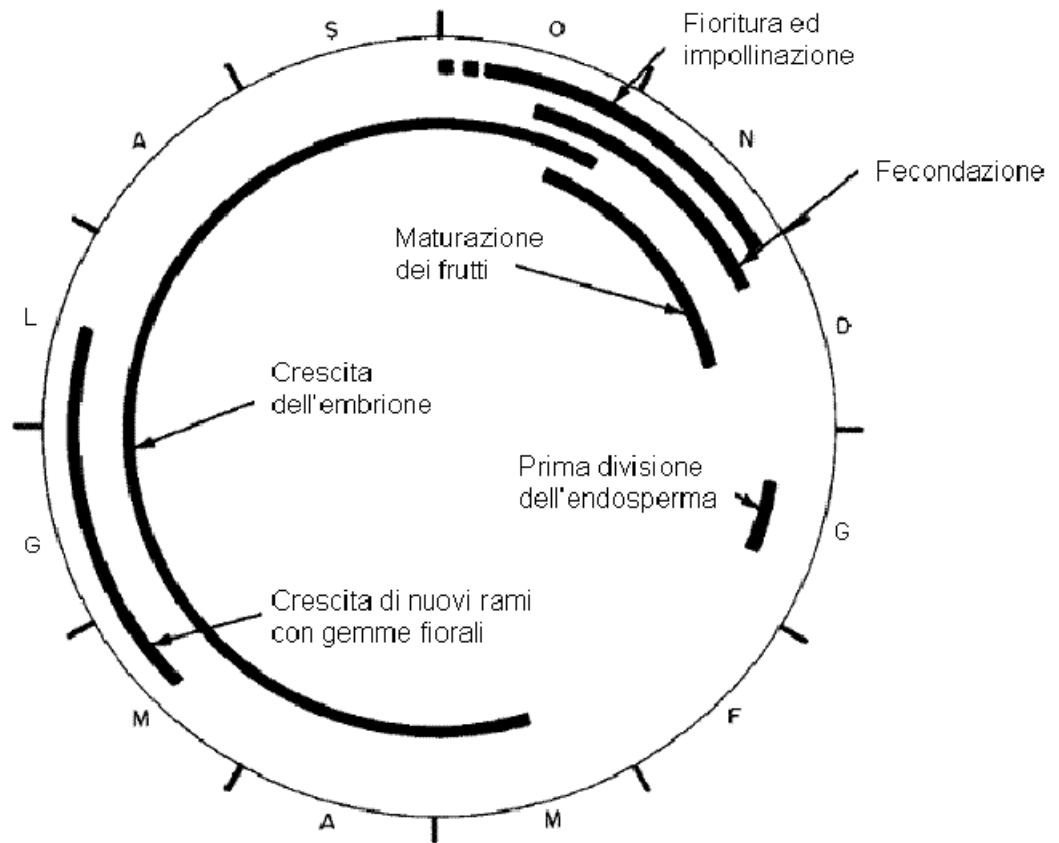


Fig. 5.2. Principali eventi del ciclo riproduttivo di *Arbutus unedo* L. (modificato da Chiarucci *et al.*, 1992)

### Scopo

Lo scopo di questo lavoro consiste nello studiare le cause dello scarso successo riproduttivo di *Arbutus unedo* L., verificare il suo adattamento all'ambiente mediterraneo e valutare il possibile effetto dei cambiamenti climatici sulla biologia riproduttiva di questa specie.



## 5. 2. MATERIALI E METODI

La biologia riproduttiva di *Arbutus unedo* L. è stata studiata con analisi ed esperimenti sia in campo che in laboratorio.

### **Aree di studio**

Le osservazioni in pieno campo sono state condotte presso il Parco Gussone, Portici (Napoli) in un'area caratterizzata dalla presenza della macchia mediterranea (40° 49'N, 14°20'E), a 26 metri slm, in un territorio fertile dal clima tipicamente mediterraneo con precipitazioni annuali di circa 1000 mm concentrate soprattutto in autunno e in inverno e seguite da un'estate secca.

Un secondo sito è stato individuato presso Murlo (43°10' N. 11 °23' E), parte Sud-Ovest della provincia di Siena a cavallo delle vallate del Merse, dell'Arbia e dell'Ombrone. Di natura prettamente collinare (altitudine media 300 metri slm.) è in massima parte ricoperto da una vegetazione con caratteristiche peculiari della macchia mediterranea. La temperatura è mite con una media annua di 13,8° C.

La fenologia riproduttiva, l'impollinazione e l'analisi del successo riproduttivo sono state studiate con periodici monitoraggi direttamente in campo dove sono stati anche condotti esperimenti di diradamento per verificare alcune ipotesi riguardanti le cause del basso successo riproduttivo.

Fiori resi inaccessibili agli insetti mediante il posizionamento di cappucci di "voile", sono stati raccolti per valutare la reale produzione di nettare.

La stima delle quantità di nettare prodotta è stata effettuata in laboratorio.

La recettività dello stimma durante i vari stadi fiorali, la vitalità del polline in diverse condizioni di temperatura ed umidità relativa, l'osservazione microscopica della germinazione del polline, la stima del numero di granuli di polline per antera sono state analizzate con diverse metodologie in laboratorio, come anche prove di germinazione dei semi a diverse temperature.

## **Morfologia florale**

Le analisi sulla morfologia florale sono state effettuate su materiale prelevato in campo e trasportato in laboratorio, avendo cura di scegliere da 5 differenti piante, infiorescenze che presentavano un diverso grado di apertura del fiore.

Sulle medesime piante sono state marcate 10 infiorescenze per pianta che mostravano tutti i fiori ancora completamente chiusi per poter studiare la morfologia del fiore appena aperto nei giorni successivi. Parte dei fiori prelevati sono stati trasferiti in laboratorio per effettuare microfotografie delle diverse parti floreali allo stereomicroscopio su cui è stata montata una fotocamera digitale (CAMEDIA C4040, Olympus, Germania).

Un prelievo *random* di fiori dalle 10 piante ha consentito di effettuare studi sulla disposizione degli ovuli nell'ovario.

## **Fenologia**

Durante il periodo ottobre-novembre 2006 la fenologia è stata monitorata su 10 piante con cadenza inizialmente giornaliera e poi settimanale durante tutto il periodo di fioritura nell'area del Parco Gussone.

Per stimare la durata della fioritura sono stati marcati 10 fiori per ognuna delle 5 piante, su cui sono state effettuate osservazioni con cadenza giornaliera dal momento dell'apertura fino alla caduta della corolla. È stato monitorato il succedersi dei vari stadi floreali considerando i giorni che intercorrevano tra una fase e l'altra fino al raggiungimento della senescenza.

La fase di produzione di fiori e frutti è stata monitorata ad iniziare dall'inizio della fioritura (ottobre-novembre 2006) su 10 piante di *Arbutus unedo* L. Per ognuna di esse sono state etichettate 5 infiorescenze per determinare il numero totale di fiori prodotti. Sulle etichette veniva riportato di volta in volta il numero dei nuovi fiori, marcando ogni corolla con un pennarello indelebile. Per non rischiare di avere delle sottostime, durante il periodo di fruttificazione (ottobre 2007) sono stati disposti dei cappucci di "voile" sulle infiorescenze osservate, in modo tale da raccogliere frutti eventualmente staccatisi dalla pianta madre o impedirne la sottrazione da parte di agenti di disseminazione (uccelli). Il numero di frutti prodotti da ciascuna infiorescenza è stato determinato dopo un anno, alla fine del periodo di fruttificazione (novembre 2007).

### **Recettività dello stigma**

Sono stati prelevati fiori a diverso stadio di antesi e su questi sono stati staccati gli stigmi sui quali è stato eseguito il test enzimatico DAB (diaminobenzidina), secondo le modalità indicate da Dafni (1992).

Lo sviluppo di una colorazione bruno-rossastra indica la presenza dell'enzima perossidasi.

Gli stigmi sono stati disposti sui vetrini con l'accortezza di non far reagire il DAB con la parte sezionata. Quindi, si è passati ad osservare gli stigmi con un microscopio ottico a luce trasmessa (Olympus, Germany, BX 60) per una prima descrizione qualitativa e per scegliere le sezioni da fotografare con una macchina fotografica digitale (CAMEDIA C4040, Olympus)

### **Stima del numero di granuli di polline per antera**

La produzione di polline è stata quantificata mediante conteggio del numero di granuli di polline all'interno di antere il più possibile prossime alla maturazione, ma non ancora aperte. Il metodo usato è quello di Dafni (1992).

Ogni antera è stata posta all'interno di una provetta nella quale sono stati aggiunti 0,3 ml di etanolo:acido acetico 3:1 (v:v); quindi l'antera è stata schiacciata per permetterne la sua completa apertura e la fuoriuscita del polline.

E' stato prelevato 1 µl della sospensione ben agitata ed è stato deposto su di un vetrino; i granuli presenti sono stati contati tramite osservazione microscopica (Olympus, Germany, BX 60). Infine, i residui dell'antera sono stati prelevati dal fondo della provetta ed osservati al microscopio per verificarne il completo svuotamento. Conoscendo il numero dei granuli per unità di volume e sapendo il volume totale della sospensione, si può risalire al numero dei granuli pollinici contenuti nell'antera.

I conteggi sono stati effettuati in 5 antere e per ognuna di esse sono stati effettuati 3 prelievi di 1 µl ciascuno per verificare la ripetitività dei conteggi.

### **Numero di ovuli per fiore**

Il numero di ovuli per ovario e quindi per fiore (essendo presente 1 ovario per fiore) è stato stimato nei fiori che si trovavano in piena antesi, secondo la procedura consigliata da Dafni (1992).

Il pistillo è stato tagliato longitudinalmente con un taglierino su di un vetrino e colorato con lattofenolo cotton-blu.

La conta degli ovuli è stata effettuata sotto lo stereomicroscopio OLYMPUS SZX9, JAPAN.

### **Rilascio del polline**

Fiori dei 7 diversi stadi di *Arbutus unedo* L. individuati sono stati separati e sottoposti ad un certo scuotimento al di sopra di un vetrino da microscopio per verificare l'eventuale fuoriuscita di polline dagli stessi (con l'obiettivo di capire la possibilità o meno di una impollinazione di tipo anemofilo).

Ovviamente sono stati esclusi da questa prova i fiori degli stadi fiorali iniziali che mostravano la corolla ancora completamente chiusa.

### **Sostanze di riserva nel polline**

Campioni di polline prelevati da antere in fase di deiscenza sono stati posti sui vetrini in precedenza ricoperti da una goccia di soluzione IKI (LUGOL) ed esaminati al microscopio ottico (Olympus, Germany, BX 60). Si è utilizzato polline appena liberato dalle antere per essere certi che fosse maturo.

### **Vitalità del polline durante i diversi stadi fiorali**

Sono state prelevate antere dai 7 diversi stadi individuati nel fiore di *Arbutus unedo* e si è proceduto alla valutazione della vitalità del polline mediante il test enzimatico DAB (diamminobenzidasi).

### **Effetto combinato di temperatura ed umidità relativa**

Campioni di polline sono stati prelevati da antere in fase di deiscenza e sistemati in capsule di Petri a 3 diverse condizioni di umidità e temperatura.

I due parametri temperatura ed umidità sono stati combinati insieme per verificare il loro effetto integrato sulla vitalità del polline.

Per ottenere un'umidità relativa dello 0% le capsule di Petri sono state preparate ponendo sul fondo gel di silice. L'umidità relativa del 48% è stata creata utilizzando una soluzione satura in acqua di NaI, mentre quella del 100% ponendo sul fondo della capsula di Petri acqua distillata.

Sono state preparate 9 capsule di Petri, 3 per ciascuna delle 3 diverse condizioni di umidità relativa.

Tre capsule di Petri con differenti condizioni di umidità sono state poste in termostato alla temperatura di 25 °C, 3 in frigorifero a 4 °C e 3 in stufa a 38 °C.

Ad intervalli di tempo stabiliti (tempo zero, 1 ora e 4 ore), dalle capsule è stata prelevata un'aliquota di polline su cui è stata determinata la vitalità attraverso l'uso del test DAB.

Sono stati effettuati 3 conteggi per ciascun vetrino.

La percentuale di vitalità dei granuli di polline è stata calcolata come rapporto tra i granuli vitali e il totale dei granuli contati.

Tutti i dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica (ANOVA).

### **Germinazione del polline**

Per l'analisi della germinabilità del polline è stato preparato un substrato utilizzando 5 ml di soluzione di “*Brewbaker and Kwack's*” ai quali sono stati aggiunti 0,3 grammi di Agar, 45 ml di acqua e 7,5 grammi di saccarosio.

Prima della germinazione, campioni di polline sono stati sistemati in capsule di Petri a 3 diverse condizioni di umidità (0-48-100%) e temperatura (4-25-38 °C). Al tempo zero, dopo 1 ora e dopo 4 ore, un'aliquota del campione di polline è stata prelevata e posta sul substrato preparato in precedenza e lasciato per 5 ore a 25 °C per permetterne la germinazione.

La successiva osservazione microscopica ha consentito la conta dei pollini germinati, ovvero quelli che presentavano tubetti pollinici pari almeno al diametro della tetrade pollinica.

### **Ricerca degli agenti impollinatori**

La ricerca degli agenti impollinatori è stata effettuata in campo durante l'intero periodo della fioritura, effettuando osservazioni in diverse fasce orarie.

Per verificare il numero, la frequenza e il tipo di insetti che visitano i fiori di *Arbutus unedo* L. sono stati effettuati 3 monitoraggi di un'ora ciascuno ripetuti per 3 giornate con cielo sereno nel periodo di massima fioritura.

Durante le osservazioni sono stati annotati il numero e il tipo di insetti che visitavano i fiori in un'area di 20x20 cm sulla superficie della pianta, individuando anche il tipo di sostanza raccolta dagli impollinatori (nettare o polline).

### **Impollinazione manuale**

Per le prove di impollinazione sono state scelte 5 piante e per ognuna individuate 4 infiorescenze.

Nell'ambito di ciascuna pianta le 4 infiorescenze sono state marcate e monitorate al fine di ottenere diverse informazioni.

La prima infiorescenza è stata lasciata libera per verificare l'eventuale impollinazione entomofila (controllo).

La seconda infiorescenza è stata coperta con un cappuccio di garza (maglie 2x2 mm, tali da far passare aria e luce ma da impedire il libero accesso da parte degli insetti) per verificare la possibile autoimpollinazione.

La terza infiorescenza è servita come prova di impollinazione incrociata con polline di un altro individuo e successivamente isolata mediante cappuccio di garza.

La quarta infiorescenza è stata impollinata manualmente con polline dello stesso individuo e successivamente isolata con un cappuccio.

Dopo una settimana, fiori provenienti dalle diverse infiorescenze sono stati trasportati in laboratorio e lasciati per un giorno in idrossido di sodio al 5%, per ammorbidire i tessuti e consentirne l'esame.

Il successivo trattamento con blu di anilina (Jensen, 1962) ha consentito di verificare l'eventuale crescita del tubetto pollinico lungo lo stilo mediante l'osservazione al microscopio a fluorescenza (BX60, Olympus, Hamburg, Germania).

### **Produzione di nettare**

La quantità di nettare prodotto (volume in  $\mu\text{l}$ ) è stata valutata sia nel cosiddetto *standing crop*, ovvero in condizioni naturali in cui gli insetti avevano libero accesso ai fiori, sia in *protected crop*, in cui l'accesso da parte degli impollinatori era stato impedito tramite il posizionamento di cappucci di "voile".

Per quanto riguarda lo *standing crop* sono state utilizzate 5 piante. Il nettare è stato campionato da 50 fiori. In condizioni di *protected crop* sono state utilizzate 5 piante. Da esse il nettare è stato prelevato da 50 fiori.

Il nettare è stato prelevato dai fiori tramite capillari in vetro con calibrazione a 5  $\mu\text{l}$ . Il volume è stato determinato misurando l'altezza del livello del nettare nel capillare su di un foglio di carta millimetrata ed applicando quindi la formula:

$$\text{volume } (\mu\text{l}) = l/L \times 5$$

dove  $l$  è l'altezza del livello del nettare (mm) nel capillare ed  $L$  è la lunghezza (mm) del capillare fino al segno di calibrazione.

### **Morfologia del frutto**

Sia dal sito del Parco Gussone, Portici (Napoli) che dal sito di Murlo (Siena) è stato raccolto un campione rappresentativo di 30 frutti maturi (varie dimensioni, raccolta *random* da 5 diverse piante per sito) per indagare sul numero medio di semi e sulla sua possibile correlazione con il diametro medio dei frutti.

Tali analisi sono state condotte in laboratorio.

### **Successo riproduttivo**

Il successo riproduttivo di una specie generalmente si misura come la percentuale di fiori che diventano frutti. Poiché il ciclo riproduttivo del Corbezzolo ha una durata di oltre 12 mesi, il successo riproduttivo è stato stimato confrontando, nell'ambito di ciascuna pianta il numero medio di fiori prodotti nell'autunno 2007 con il numero medio di frutti maturi sviluppati a partire dall'autunno 2006. A tal fine su 3 piante sono state effettuate analisi biometriche quali in numero di ramificazioni per infiorescenza, fiori per ramificazione, fiori per infiorescenza e frutti per infiorescenza.

I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica (ANOVA).

### **Esperimento di diradamento**

A partire dall' 8 novembre 2006, presso il Parco Gussone, Portici (Napoli), sono state monitorate 50 infiorescenze di controllo (5 infiorescenze su 10 piante diverse) per valutare la percentuale di successo riproduttivo in condizioni naturali. Tale monitoraggio è proseguito con cadenza quindicinale, protraendosi fino all'autunno 2007 ed è servito per valutare la percentuale di successo riproduttivo in condizioni naturali.

Parallelamente, il 27 novembre 2006, per verificare la possibilità di fenomeni di limitazione delle risorse disponibili per la riproduzione da parte della pianta madre, sono stati effettuati esperimenti di diradamento di fiori che presentavano l'ovario ingrossato su 100 diverse infiorescenze (10 infiorescenze su 10 piante diverse). Da ciascuna infiorescenza etichettata e oggetto del monitoraggio quindicinale sono stati recisi tutti i fiori fecondati tranne uno scelto in maniera *random* e localizzato in posizioni diverse nell'infiorescenza.

### **Produzione dei frutti nell'ambito dell'infiorescenza**

Osservando la posizione di 84 frutti di controllo nell'ambito dell'infiorescenza è stato possibile valutare la frequenza di frutti posizionati nell'asse centrale o nell'asse secondario come pure la presenza nella zona apicale, intermedia o basale

dell'infiorescenza stessa.

Le stesse osservazioni relative al posizionamento dei frutti sono state effettuate nell'esperimento di diradamento in cui sono stati monitorati 61 frutti e la relativa posizione nell'ambito nell'infiorescenza.

### **Germinazione dei semi**

La raccolta dei frutti da cui estrarre i semi è stata effettuata alla fine di ottobre 2007 dalle piante disponibili nel Parco Gussone, Portici (Napoli) e nei colli attorno a Murlo (Siena).

I numerosi frutti raccolti sono stati successivamente trasportati nel Laboratorio di Botanica ed Ecologia Riproduttiva dove si è effettuato il protocollo di estrazione dei semi come suggerito dal manuale ANPA "*Propagazione per seme di alberi ed arbusti della flora mediterranea*".

.Dopo il periodo di stratificazione al freddo per 30-60 giorni, i semi, che per germinare necessitano di luce oltre che di ossigeno, richiedono una temperatura prossima ai 15°C. Occorre inoltre assicurarsi di aver ben separato i singoli semi dalla polpa (normalmente passano dal tratto digerente degli uccelli).

I semi sono stati conservati in frigorifero a 4°C per circa 2 mesi, poi posti a germinare in un substrato di Agar 0,5% in capsule Petri ad una temperatura prossima ai 20 °C.

Una parte dei semi è stata posta a germinare senza essere sottoposta a stratificazione fredda.

Alcuni semi sono stati mantenuti in gel di silice e pesati in gruppi di 10, 30 e 50.

Il peso è stato effettuato utilizzando una bilancia di precisione E42S-B, Gibertini.



### 5. 3. RISULTATI

#### Morfologia florale

I fiori compaiono da ottobre a gennaio e si presentano organizzati in pannocchie corimbose pendule al termine dei rami.

Sono ermafroditi, gamopetali, hanno lunghezza di circa 1 cm e larghezza di circa 5 mm, corolla bianco-rosato lucida, urceolata con calice a 5 brevi lacinie (Fig. 5.3).



Fig. 5.3. Fiori di *Arbutus unedo* organizzati in pannocchie corimbose pendule.

Data la scalarità della fioritura, sulla stessa infiorescenza si trovano contemporaneamente fiori in vari stadi dalle caratteristiche morfologiche differenti.

La durata della fioritura di un singolo fiore è mediamente 7 giorni.

E' possibile individuare 7 diversi stadi fenologici (Fig. 5.4).



Fig. 5.4. Sette diversi stadi fenologici individuabili nel fiore di *Arbutus unedo*.

L'analisi allo stereomicroscopio ha permesso di raccogliere informazioni più dettagliate sulla morfologia del fiore in relazione ai singoli stadi.

Gli stami, in numero di 10 per fiore, hanno una conformazione caratteristica costituita da un filamento bianco tomentoso, in particolare negli stadi 3 e 4, in cui le antere si presentano inizialmente di un debole colore rosa, poi rosso corallo, infine ruggine e terminano con 2 appendici bianche corniformi.

Tali appendici si presentano nelle prime 3 fasi di sviluppo, con la porzione apicale rivolta verso il basso, allo stadio 4, invece, si evidenzia una rotazione delle antere che rende ancora più visibili le 2 appendici.

Nello stadio 5 le antere sono completamente ruotate verso l'alto ma ancora del tutto chiuse.

Nella fase successiva, invece, le antere si presentano leggermente dischiuse nella porzione apicale.

Nell'ultimo stadio, infine, le antere divenute di colore rosso scuro, sono completamente aperte e nel loro interno è possibile trovare ancora qualche granulo di polline.

Analizzando più in dettaglio il pistillo, esso presenta in tutte le fasi di sviluppo del fiore, porzioni dalle diverse sfumature del verde (Fig. 5.4).

Stimma e nettario, situato alla base dell'ovario, sono dello stesso colore verde scuro, ovario, calice e pedicello florale, invece, sono color verde chiaro, stilo verde pallido quasi bianco.

Lo stimma è umido e turgido in antesi, mentre si disidrata dopo qualche giorno.

L'ovario è supero e diviso in 5 logge, la disposizione degli ovuli al suo interno è assile con un numero di 8-10 per loculo.

### **Numero di granuli di polline, numero di ovuli e P/O**

Ogni antera forma mediamente  $342 \pm 55$  granuli di polline. Avendo ciascun fiore 10 antere il numero di granuli di polline per fiore è poco meno di 3500.

L'unico ovario presente in ciascun fiore contiene mediamente  $47,6 \pm 6,7$  ovuli.

Pertanto il rapporto Polline/Ovuli è pari a 72.

I dati ottenuti sono stati utilizzati anche per stimare un indice di *outcrossing* (OCI). Questo indice è stato calcolato come somma di 3 diversi valori per 3 caratteristiche del fiore (Cruden, 1979).

1) diametro del fiore

fino ad 1 mm =0

1-2 mm	=1
2-6 mm	=2 (valore utilizzato per <i>Arbutus unedo</i> )
>6 mm	=3

2) Separazione temporale tra deiscenza delle antere e recettività dello stigma  
Omogamia, proteroginia=0 (valore utilizzato per *Arbutus unedo*)

Protandria=1

3) Posizione spaziale di stigma e antere

Stesso livello=0

Separati spazialmente=1 (valore utilizzato per *Arbutus unedo*)

Secondo questo metodo il valore dell'indice corrisponde a quattro livelli di *outcrossing*

0= Cleistogamia

1= Autogamia obbligata

2= Autogamia facoltativa

3= Auto-compatibile, eventuale e parziale richiesta di impollinatori

4= Parzialmente Autocompatibile, Outcrossing, richiesta di impollinatori.

In *Arbutus unedo* il valore di OCI è pari a 3; pertanto corrisponde al profilo di una specie auto-compatibile con eventuale e parziale richiesta di impollinatori.

Secondo Cruden, la stima del livello di Outcrossing può essere stimato anche attraverso il rapporto P/O secondo quanto di seguito riportato:

- P/O = 2,7-5,4 cleistogamia
- P/O = 18,1-39 autogamia obbligata
- P/O = 31,9-396 autogamia facoltativa
- P/O = 244,7-2588 xenogamia facoltativa
- P/O = 2108-195525 xenogamia obbligata

Poiché il rapporto P/O in *Arbutus unedo* è 72, anche secondo questo modello la specie risulta essere autogamia facoltativa.

### **Sostanze di riserva e dimensioni del polline**

Dalle osservazioni microscopiche effettuate a seguito delle analisi con appositi reagenti (IKI) è risultato essere presente amido come sostanza di riserva contenuta all'interno dei granuli pollinici.

Il diametro equatoriale medio del polline è di circa 50  $\mu\text{m}$ .

### **Recettività dello stamma**

Gli stammi di fiori appartenenti agli stadi dal 1° al 5° sono risultati negativi al test enzimatico, quindi non recettivi.

In realtà lo stamma presenta una parziale recettività già al 3°-4° stadio (fiore chiuso) ma la massima superficie recettiva risulta essere allo stadio 6°-7°.

La recettività comincia a riscontrarsi solo nella penultima fase di sviluppo del fiore e diviene più marcata nell'ultima.

Al sesto stadio di sviluppo lo stamma risulta recettivo solo ai lati per poi estendersi debolmente a tutta la superficie.

Nel settimo e ultimo stadio di sviluppo florale, invece, risulta evidente una recettività più marcata che riguarda tutta la superficie stammatica.

### **Vitalità del polline**

Il polline inizia ad essere vitale alla deiscenza delle antere (stadio 4° e 5°) e si mantiene tale fino alla completa liberazione delle stesse (stadio 7°).

Nel 1°-2°-3° stadio il polline non è vitale poiché non si è ancora del tutto ben formato.

Prima di sottoporre i granuli pollinici alle 3 diverse condizioni di temperatura (4 °C, 25 °C e 38 °C) ed umidità relativa (0%, 48% e 100%), è stata calcolata la vitalità del polline alla deiscenza delle antere sia mediante il test enzimatico DAB (diamminobenzidasi) che attraverso la reazione fluorocromatica (FCR).

Da questa prima osservazione è emersa una vitalità del polline elevata (90%).

Dopo 1 ora la vitalità del polline è massima a 25 °C e minima a 38 °C. Dopo 4 ore la percentuale di vitalità diminuisce all'aumentare della temperatura e dell'umidità relativa, con un picco minimo a 38 °C e al 100% di umidità relativa. Dopo 7 ore questo *trend* risulta ancora più evidente (Fig.5.5).

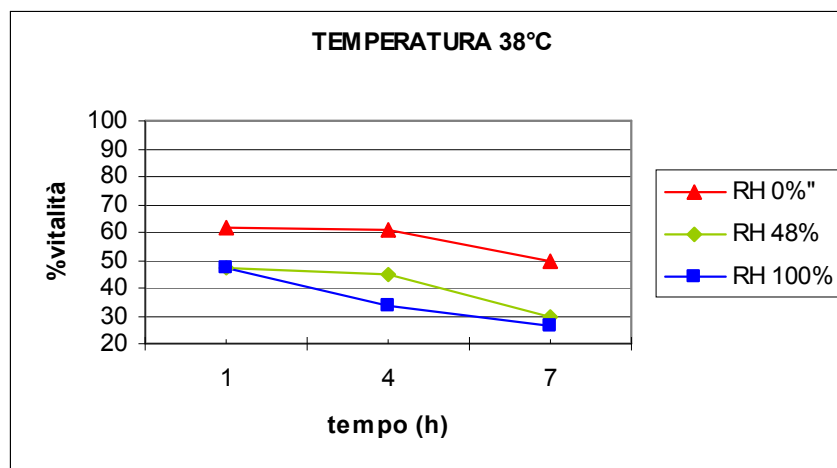
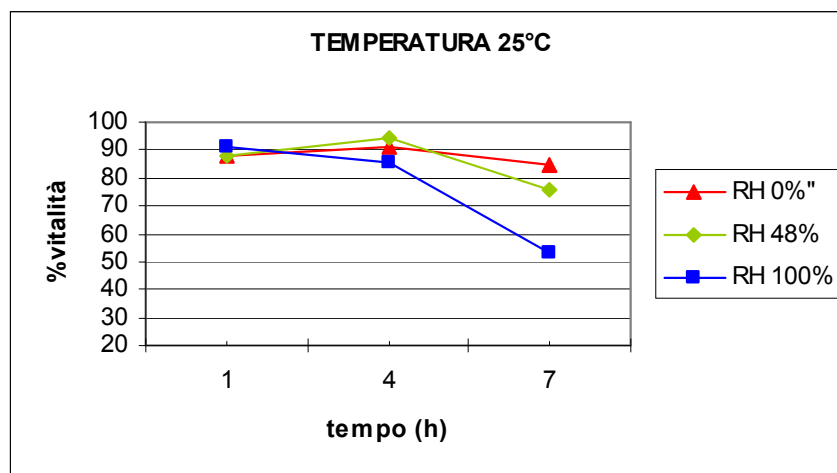
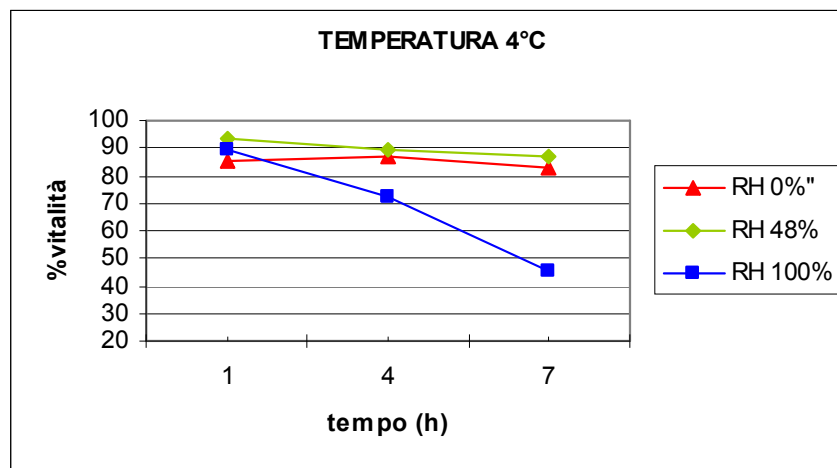


Fig. 5.5. Vitalità del polline (%) di *Arbutus unedo* sottoposto per 1, 4 e 7 ore a tre diverse condizioni di temperatura (4-25-38 °C) e 3 diverse condizioni di umidità relativa (0-48-100%).

Il polline di *Arbutus unedo* L., quindi, risulta maggiormente vitale ad una temperatura compresa tra i 4 e i 25 °C ed un'umidità relativa del 0- 48%, risentendo negativamente di temperature ed umidità relative elevate.

Il fattore temperatura sembra incidere maggiormente sulla vitalità del polline rispetto al fattore umidità relativa, anche se l'effetto integrato dei due fattori risulta avere una maggiore influenza.

### **Rilascio del polline**

Il fiore presenta quindi contemporaneamente polline vitale e stimma recettivo ma il polline del medesimo fiore ha delle difficoltà a cadere sopra lo stimma poiché rimane adeso ed intrappolato tra i peli dei filamenti e della parte interna della corolla.

Seppur ben scosso (simulando l'azione di un vento molto forte), il fiore non libera facilmente il polline, come si è potuto dimostrare in laboratorio scuotendo sopra a dei vetrini infiorescenze portanti fiori aperti.

### **Germinabilità del polline**

Dall'osservazione delle tetradi polliniche al microscopio ottico è emerso che quelle lasciate a temperatura ed umidità ambientali presentano una germinabilità del 42% (controllo).

Il polline sottoposto alle 3 diverse condizioni di temperatura ed umidità relativa mostra complessivamente una diminuzione della germinabilità con il trascorrere del tempo (Fig.5.6.).

Tale diminuzione è più lieve alla temperatura di 24 °C mentre risulta drastica a 38 °C dove si riscontrano i valori più bassi.

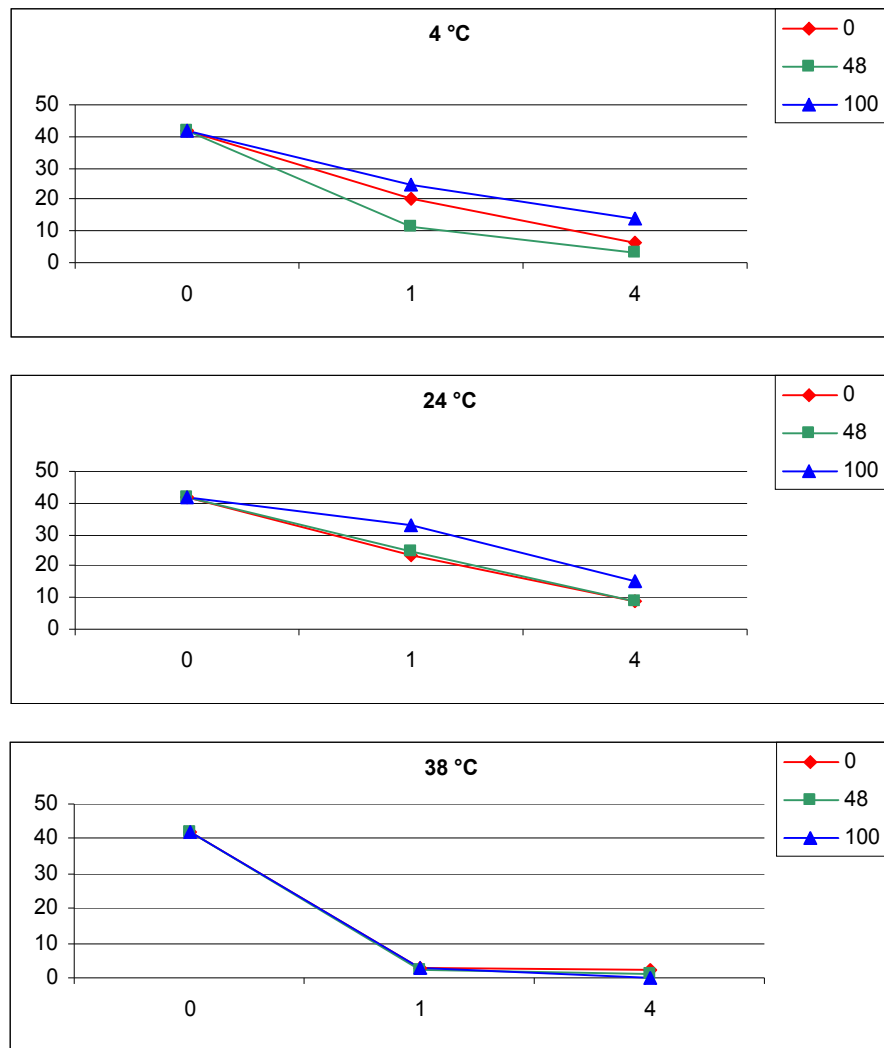


Fig. 5.6. Germinabilità del polline (%) di *Arbutus unedo* sottoposto per 1 e 4 ore a tre diverse condizioni di temperatura (4-24-38 °C) e 3 diverse condizioni di umidità relativa (0-48-100%).

Anche per la germinabilità si può dire che il polline resiste bene a basse temperature mentre risultano dannose quelle più elevate.

La condizione ottimale è quella con una temperatura prossima ai 25 °C e un'umidità relativa del 100%.

### Produzione di nettare

Dalle analisi sulle quantità di nettare prodotte da ciascun fiore protetto mediante cappucci di “voile” (per impedirne il prelievo da parte degli insetti), è emersa una produzione media di  $0,42 \pm 0,16$   $\mu\text{l}$  di nettare per fiore, mentre dalle analisi del nettare presente nei fiori lasciati liberi di essere visitati dagli insetti (*standing crop*), non si è ritrovato nettare.

### **Ricerca degli agenti impollinatori**

Già dalle prime osservazioni, soprattutto al mattino presto e con temperature al di sopra dei 10 °C, è stato possibile ritrovare sulle piante insetti pronubi.

Questi sono stati identificati come imenotteri sociali appartenenti ai generi *Apis mellifera* L. e *Bombus terrestris* L.

Entrambi sono dotati di apparato boccale provvisto di ligula. *Apis mellifera* viene attratta dai fiori nella ricerca del nettare, principale fonte di sostentamento insieme al polline. Osservazioni in campo sulle modalità di “manipolazione” del fiore e meccanismo di raccolta delle ricompense, hanno dimostrato che questi imenotteri si aggrappano con le zampe alle infiorescenze e dirigono la ligula all’interno del fiore, verso il nettario. Durante la raccolta di nettare si imbrattano zampe e addome di polline ed è proprio mentre succhiano il nettare da un fiore all’altro che si fanno veicoli di polline che si deposita sullo stimma, assicurando così l’impollinazione.

### **Impollinazione manuale**

IL trattamento per 24 in idrossido di sodio e la successiva colorazione con blu di anilina, hanno consentito di osservare al microscopio ottico a fluorescenza stimmi e stili dei fiori autoimpollinati e incrociati. I campioni istologici di entrambi i trattamenti presentavano molti tubetti pollinici all’interno, i fiori risultano quindi autocompatibili.

Nei fiori isolati mediante garza e mai impollinati manualmente, seguendo la medesima procedura di analisi, non sono stati ritrovati granuli pollinici sullo stimma né tubetti pollinici nello stilo. Di conseguenza, in questa specie, il processo di auto-impollinazione in natura difficilmente si verifica

### **Morfologia del frutto e caratteristiche dei semi**

Il frutto compare da settembre a novembre dell’anno successivo e, dapprima verde, assume tutti i toni del giallo fino al rosso acceso a maturità raggiunta.

E’ una bacca globosa, da 4 a 8 grammi, edule, lungamente picciolata, con epicarpo ricoperto in maniera caratteristica di granulazioni che gli conferiscono l’aspetto di una fragola. Per questo motivo gli anglosassoni lo indicano comunemente come “albero delle fragole”.

La polpa del frutto maturo è gialla e succosa. Dalle indagini effettuate risulta che il diametro medio dei frutti è  $1,88 \pm 0,38$  cm. Il numero medio di semi nei frutti è risultato  $19 \pm 9,12$ .



Anche se apparentemente, frutti più grandi contengono un maggiore numero di semi, la relazione tra il diametro dei frutti e il numero dei semi, forse a causa del numero ridotto di campioni analizzati, non è risultata statisticamente significativa ( $R^2=0,56$ ) (Fig. 5.7).

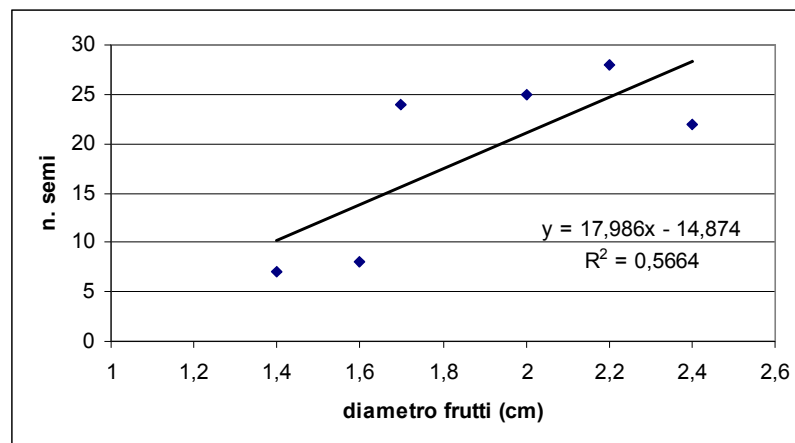


Fig. 5.7. Correlazione tra diametro dei frutti di *Arbutus unedo* e numero di semi in essi contenuti.

I semi sono ellittici, lunghi 2-3 mm, di colore marrone chiaro. Il peso medio di un singolo seme è risultato essere  $1,98 \pm 0,11$  mg.

### **Successo riproduttivo**

Dalle elaborazioni dei dati raccolti in campo risulta che ogni pianta produce in media  $4,38 \pm 2,08$  ramificazioni per infiorescenza,  $3,89 \pm 1,44$  fiori per ramificazione,  $33,29 \pm 11,7$  fiori per infiorescenza e solo  $1,13 \pm 1,04$  frutti per infruttescenza.

La stima del successo riproduttivo ottenuta sulla base dei dati raccolti in campo e considerata come la percentuale di fiori che sviluppano frutti maturi è risultata pari a circa il 3%.

### Esperimento di diradamento

Mettendo a confronto i risultati di questo monitoraggio, durato circa un anno, è emerso che la percentuale di successo riproduttivo nell'esperimento di diradamento è stata circa del 50% vs. 3% di quella di controllo dimostrando che, dopo l'impollinazione, la probabilità del singolo ovario di svilupparsi in frutto aumenta al diminuire dei fiori presenti sull'infiorescenza (Fig. 5.8)

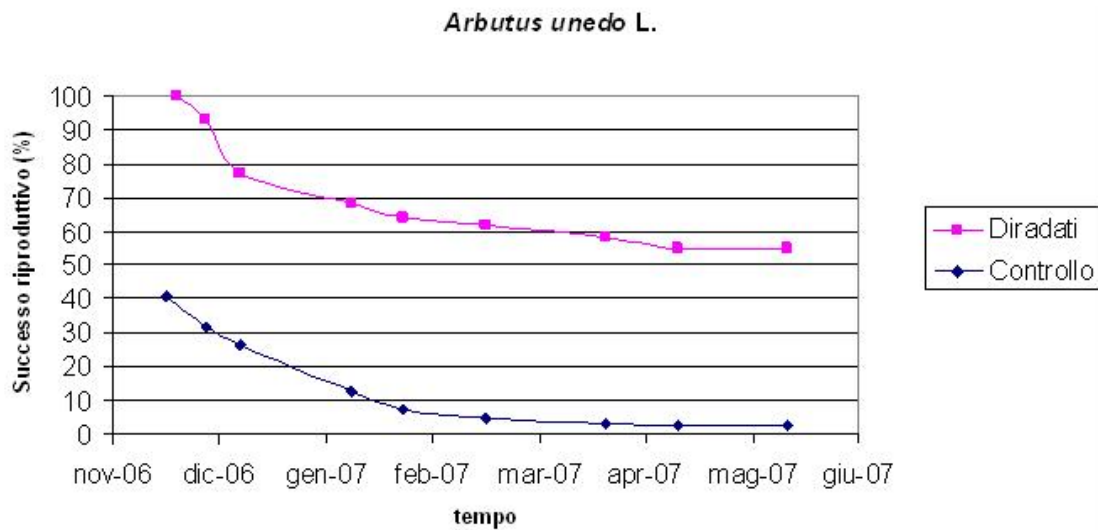


Fig. 5.8. Percentuale di successo riproduttivo di *Arbutus unedo* nel controllo e nell'esperimento di diradamento.

I frutti si sono sviluppati quasi esclusivamente nella posizione apicale dell'infiorescenza, sia nelle piante di controllo che in quelle utilizzate per l'esperimento di diradamento (Fig. 5.9).

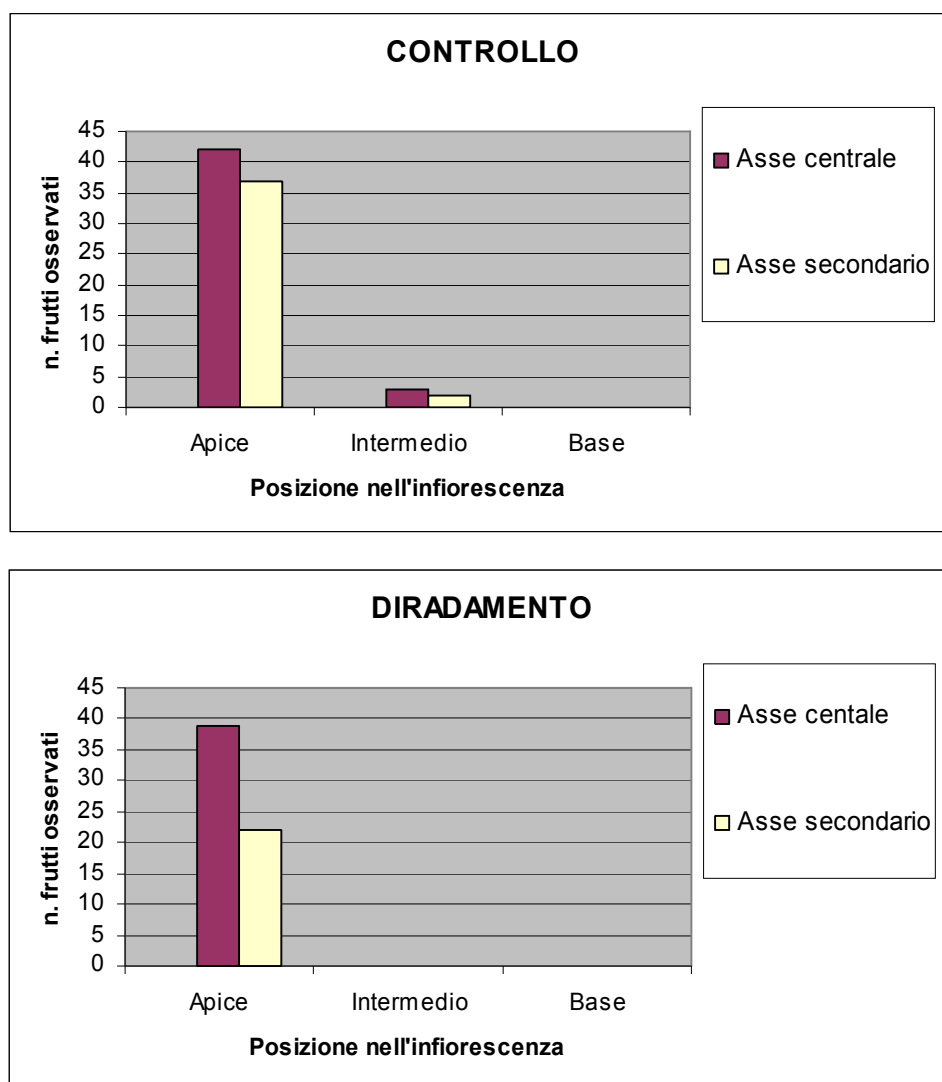


Fig. 5.9. Posizione dei frutti di *Arbutus unedo* sviluppatasi all'interno dell'infiorescenza, sia nel controllo (grafico in alto) che nell'esperimento di diradamento (grafico in basso).

### Germinazione dei semi

La germinabilità dei semi stratificati a freddo è risultata del 58%, mentre semi posti a germinare senza trattamenti non sono germinati. La germinazione si completa dopo 40 giorni.

## 5. 4. DISCUSSIONE

### Fenologia

Il riposo vegetativo, le foglie piccole e coriacee, il portamento arbustivo, la fioritura invernale, insieme alla notevole capacità di ripresa vegetativa dopo un incendio, fanno di *Arbutus unedo* L. una specie adattata all' ecosistema di tipo mediterraneo.

.Nel Corbezzolo lo sviluppo dell' infiorescenza ha inizio a metà giugno e si protrae fino ad ottobre, determinando una fioritura tipicamente invernale.

Le caratteristiche riproduttive e il sistema di riproduzione delle specie della macchia mediterranea del Sud Italia sono state studiate in relazione al clima Mediterraneo a all'origine evolutiva della loro flora. Tali specie non hanno adottato un unico meccanismo riproduttivo. Come evidenziato da Aronne e Wilcock (1997), tra le specie entomofile esistono due diversi modi di riprodursi, il gruppo di dioiche con piccoli fiori, frutti carnosi con uno o pochi semi, specie che si riproducono vegetativamente ed il gruppo ermafrodita con vistosi fiori, frutti secchi e molti semi, che si riproducono in modo non vegetativo.

*Arbutus unedo* si inserisce in questo ultimo gruppo, differendo soltanto per una delle combinazioni del carattere, infatti possiede dei frutti carnosi piuttosto che secchi.

C'è una grande percentuale di questo gruppo di specie nella macchia e nella gariga rispetto alla foresta di sclerofille che potrebbe anche suggerire una capacità di adattamento in un ambiente ancora più ostile.

Tuttavia in un ulteriore studio di Aronne e Wilcock (1994) sulla fenologia riproduttiva della macchia mediterranea, è emerso che mentre la maggior parte delle specie presentano fioritura e sviluppo dell' ovario concentrati nei mesi primaverili, *Arbutus unedo* ha una fioritura invernale ed uno sviluppo dell' ovario che si protrae per tutto l' arco dell' anno portando a maturare i frutti contemporaneamente alla nuova fioritura.

Quindi, mentre per le prime specie si può parlare di un vero e proprio adattamento al clima mediterraneo, in quanto la concentrazione delle fasi critiche in primavera permette di evitare il forte caldo estivo ed il freddo invernale, nella riproduzione di *Arbutus unedo* si riscontra per lo più una forma di sopravvivenza.

Questo è spiegato dal fatto che malgrado il Corbezzolo oggi sia diffusissimo negli ambienti a clima mediterraneo, non è originario di tali zone. Reperti fossili di *Arbutus unedo* sono stati ritrovati in un carotaggio effettuato in un sedimento torboso risalente al Cretaceo, nel Golfo di Porto Conte (Bertolani-Marchetti, 1964) a 85 cm di profondità,

indicando con ciò che il Corbezzolo era presente in Sardegna già nel Terziario, quando il clima era di tipo Tropicale.

E' normalmente accettato che la sclerofillia sia una risposta adattativa al deficit idrico estivo tipico dei climi mediterranei, ma va osservato che le specie sclerofille non sono esclusive di tali ambienti. E' stata avanzata l'ipotesi che l'*habitus* sclerofillico delle specie mediterranee sia derivato da strutture anatomiche di tipo laurofillico proprio di specie differenziatosi in ambienti umidi e solo più tardi acclimatate a climi più aridi (De Lillis 1991).

### **Morfologia fiorale**

Le fitte infiorescenze di *Arbutus unedo* rappresentano un mezzo attraverso il quale i suoi piccoli fiori possono rendersi visibili agli insetti anche da lontano.

La presenza di stami e carpelli sullo stesso fiore serve a rendere ogni visita d'insetto più efficace perché ogni volta esso prende il polline e lo deposita.

Il nettario è posizionato alla base dell'ovario in modo che l'insetto debba necessariamente venire in contatto con le antere che liberano il polline e successivamente con lo stimma sul quale esso va a depositarsi.

Questa posizione, però, rende il nettario non visitabile agevolmente, perché poco visibile, ecco perché probabilmente il fiore rende visibile la sua strada colorando le sue parti in tinte diverse le une dalle altre. Il nettario, infatti, è di un intenso colore verde, diversamente dallo stilo quasi bianco e dalle antere rosse.

Quando però il fiore non è ancora pronto per l'impollinazione presenta sul fondo della corolla una folta peluria, formata dai filamenti degli stami a protezione del nettario.

Quando invece è recettivo, le appendici corniformi delle antere permettono una maggiore vibrazione delle antere quando queste vengono urtate dagli insetti e quindi un rilascio più efficiente del polline. Questo meccanismo conosciuto con il termine di sonicazione o *buzz pollination* (impollinazione per vibrazione) è tipico di specie di origine tropicale ed è eseguita da imenotteri del genere *Bombus* e *Xylocopa* (King e Buchmann, 2003).

Data la particolare conformazione del fiore, a corolla tubulosa, i punti di appoggio risultano difficoltosi per alcuni insetti, quindi sembra che anziché facilitarne l'attività, cerchino quasi di ostacolarne la visita.

In realtà ciò costituisce un mezzo opportuno, messo in atto dalla pianta, per selezionare e scegliere quegli insetti che meglio possono esplicare i loro compiti nei processi di

impollinazione, escludendo altri meno fedeli e manifestanti scarse garanzie di rendimento.

Così facendo, affidano il loro nettare ad insetti capaci di bottinarlo in maniera delicata e senza procurare una sia pur minima deturpazione di alcuna parte fiorale, perché dotati di lunghe proboscidi e di apparati succhiatori filiformi adeguati alla lunghezza del tubo ed in grado di raggiungere il fondo.

In tal senso la specie ha ottenuto un duplice vantaggio:

1. Selezionare i tipi di insetti, eliminando quelli che non sono utili all'impollinazione ed evitando i rischi di una inutile dispersione di polline-
2. Aumentare le possibilità che questo possa essere depositato specificamente sui fiori della stessa specie.

E' logico infatti supporre che questi siano invogliati a visitare più frequentemente i fiori tubulosi, laddove possono trovare nettare incontaminato e raggiungibile da altri.

Infine, dal momento che il numero di insetti pronubi osservati sulle piante è scarso, la fioritura scalare presentata dalle infiorescenze di *Arbutus unedo* può essere spiegata oltre che come una forma di protezione da eventuali condizioni atmosferiche sfavorevoli, come una strategia atta ad evitare la competizione tra i fiori e garantire a tutti l'impollinazione. In altre parole, se tutti i fiori si aprissero contemporaneamente, un freddo o una pioggia improvvisi o l'assenza di pronubi, comprometterebbe seriamente la riproduzione della pianta.

### **Recettività dello stigma**

La maggior parte delle specie ermafrodite, pur essendo teoricamente in grado di autofecondarsi, trae vantaggio nel ricevere polline da individui della medesima specie, ma con differente genotipo.

Il riassortimento genetico nelle piante figlie consente una loro migliore variabilità ed adattabilità (De Nettancourt 1977)

La prevenzione dell'autofecondazione può realizzarsi a vari livelli durante le fasi riproduttive, che vanno dall'apertura dei fiori alle prime divisioni dello zigote e con vari meccanismi, alcuni del tutto particolari, altri comuni alla prevenzione della fecondazione con polline di altre specie.

Fra questi meccanismi troviamo il fenomeno della proterandria e proteroginia. Quando i fiori presentano entrambi i sessi non è detto che questi siano recettivi contemporaneamente. le sfasature nei periodi di recettività determinano differenti

possibilità di incrocio.

Indispensabile per la riuscita dell'autofecondazione, invece, è la sincronia degli ultimi eventi dello sviluppo di androceo e gineceo, dispersione del polline e recettività dello stamma.

Nel fiore ermafrodita di *Arbutus unedo*, la recettività dello stamma coincide esattamente con l'apertura delle antere e la dispersione del polline.

Per questa specie è da escludere un fenomeno di proterandria o proteroginia ad ostacolo dell'autofecondazione.

### **Vitalità del polline**

Studiando il successo riproduttivo ed in generale la riproduzione di determinate specie non si può prescindere dall'analizzare gli effetti di temperatura ed umidità relativa sulla vitalità del polline.

Il trasporto del polline effettuato dai pronubi non è sufficiente a garantire la fecondazione e quindi lo sviluppo uniforme del frutto. Per garantire la crescita del tubetto pollinico lungo lo stilo è necessario che il polline trasportato sullo stamma sia vitale e che lo stamma stesso sia recettivo.

Dalla deiscenza delle antere, infatti, il polline subisce una flessione naturale della vitalità, che può essere influenzata da fattori quali Temperatura ed Umidità Relativa (Herrero & Johnson 1980), oltre che dal semplice invecchiamento e dalla composizione chimica dell'atmosfera (Comtois e Perfetto, 1996).

Questo perché il polline maturo, pronto per essere rilasciato dalla pianta, è disidratato e di conseguenza altamente igroscopico, cosicché può assorbire l'umidità dall'atmosfera e se questa contiene inquinanti, il polline assieme all'acqua assorbe anche queste sostanze che possono influenzare la sua vitalità. (Comtois 1994).

Essendo il polline un essere vivente è esposto all'influenza di tutti quei fattori biotici e abiotici che ne condizionano la capacità di sviluppare un normale gametofito. Particolarmente sensibile è la fase che va dalla fuoriuscita dalle antere al raggiungimento dello stamma, dove il polline è generalmente esposto a notevoli variazioni di temperatura ed umidità che si ripercuotono sulla durata della sua vitalità e, conseguentemente, sulla sua capacità fecondante.

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.

La tolleranza ad umidità relative alte e basse è altamente variabile tra le specie (Bassani et al. 1994) e sono state individuate differenti risposte della membrana plasmatica all'RH nell'ambito di piante dello stesso gruppo ma che vivono in diversi habitat (Chaudhury & Shivanna 1987). Secondo Shivanna *et al.* (1991) l'idratazione del polline sembra attivare alcuni processi fisiologici che rendono il polline suscettibile agli stress termici.

Il contenuto in acqua dei granuli di polline dal momento della formazione a quello della germinazione non è costante. I granuli di polline si disidratano prima della dispersione, sono in equilibrio con l'ambiente durante la dispersione ed assorbono acqua dallo stimma dopo l'atterraggio (Pacini 1990).

Il volume dei granuli di polline è positivamente correlato con l'RH (Lisci et al. 1994); inoltre i cambiamenti di volume sono legati alla vitalità del polline (Bassani et al. 1994). Entro il microhabitat del fiore, RH e T potrebbero essere diversi da quelli dell'ambiente esterno (a meno che la corolla non sia piatta e le antere bene esposte all'ambiente esterno).

I risultati ottenuti sul polline di *Arbutus unedo*, hanno evidenziato che la sua vitalità diminuisce velocemente dal momento del rilascio delle antere, ed inoltre è risultata particolarmente ostacolata da alte temperature e alta umidità dell'ambiente in cui viene liberato.

Il fatto che la vitalità di *Arbutus unedo* si conservi maggiormente in condizioni di basse temperature conferma l'ipotesi che la pianta non sia adattata al clima mediterraneo. Pertanto invece di fiorire in primavera o estate, riesce a sopravvivere negli ambienti mediterranei relegando la fioritura in un periodo piuttosto ostile all'attività dei pronubi.

### **Germinazione del polline**

Dall'interazione tra polline e stimma si possono avere tre differenti risposte: a) accettazione se il polline è compatibile, b) rifiuto se il polline è autoincompatibile, c) rifiuto perché il polline è di una diversa specie.

Come risultato del rifiuto si possono avere non solo una mancanza di idratazione o di emissione del tubetto, ma anche un impedimento meccanico al suo sviluppo (formazione di una barriera di callosio nella papilla stomatica da penetrare), una cessazione della crescita nello stilo, oppure uno scoppio all'apice del tubetto.

Se il polline è accettato, per germinare ha bisogno di determinate condizioni ambientali:

– *soluzione acquosa* con elevata pressione osmotica per evitare una turgescenza troppo



rapida nel granulo di polline

- *sorgente di energia*, di norma rappresentata da uno zucchero
- *elementi minerali*, in particolare boro e calcio
- *temperatura*, l'optimum termico, generalmente per le piante delle zone temperate è situato tra i 20 °C e i 30 °C, al di sotto di 5 °C ed al di sopra dei 30 °C non si ha germinazione, perché la crescita del tubetto pollinico viene rapidamente bloccata.

In *Arbutus unedo* il polline arrivato sugli stimmi nelle condizioni atmosferiche del luogo in cui è stato disperso, germina normalmente, emettendo un tubetto pollinico che si allunga senza impedimenti all'interno dello stilo.

Questo significa che l'interazione polline-stimma è positiva e non viene a mancare nessuna delle condizioni ambientali sopra citate.

Anche la capacità di germinazione pollinica però diminuisce velocemente dalla deiscenza dell'antera in poi, ed è influenzata da variazioni di temperatura ed umidità, risultando minacciata soprattutto da alte temperature e bassa umidità.

### **Sostanze di riserva nel polline**

Il polline di corbezzolo è ricco di amido. Baker e Baker (1983) hanno mostrato che i granuli di polline privi di amido (che contengono molti lipidi come sostanze di riserva) sono tipici dell'impollinazione ad opera di api, soprattutto quando non viene offerta dal fiore altra ricompensa. Granuli contenenti molto amido (con pochi lipidi) sono tipici di specie che sono autoimpollinate, impollinate dal vento o dai Lepidotteri o dagli uccelli. La presenza di amido comunque, rende più rapida la fase di germinazione e questo può essere un vantaggio in condizioni di clima avverso.

### **Impollinazione**

L'obiettivo principale di una pianta, per riprodursi, è far sì che il polline vada a depositarsi sullo stimma, ma proprio su quello della stessa specie, poiché è legge naturale che su quello di altre specie non sia fertile.

L'intensità dell'impollinazione ha una grande importanza. Una buona impollinazione, infatti, aumenta la resistenza dei frutti all'aridità e le loro dimensioni, migliorandone inoltre la conformazione.

Le caratteristiche organolettiche e la capacità di conservazione dei frutti possono essere così considerevolmente migliorate (Greatti-Zoratti-Jérôme Trouillier 1997).

## **Agenti impollinatori**

Le piante anemofile, dal momento che le correnti aeree ed altre condizioni atmosferiche rendono piuttosto aleatoria la possibilità che il polline raggiunga i pistilli di piante della stessa specie, producono grandi quantità di polline leggerissimo e di piccole dimensioni. Al contrario delle anemogame, le piante zoogame producono una limitata quantità di polline, essendo l'impollinazione più mirata.

In *Arbutus unedo* è stata riscontrata una piccola quantità di polline per singolo fiore; tale osservazione ha fornito una ulteriore conferma che per questa specie l'impollinazione è entomofila.

*Apis mellifera*, è un imenottero sociale lungo fino a 1,5 cm, la sua attività di impollinatore si svolge al di sopra dei 10 °C ed è provvisto di un apparato boccale dotato di ligula, così che nella raccolta del nettare l'ape inserisce nel calice florale la ligula e lambisce e aspira il nettare.

*Bombus terrestris*, altro imenottero appartenente alla famiglia degli Apidi, può essere lungo fino a 2,8 cm, il suo corpo è tozzo e peloso, ornato da strisce gialle, nere e bianche.

Il Bombo bottina con temperature fino a 10 °C, vento, pioggia e calore lo arrestano completamente. E' dotato di un apparato boccale provvisto di corta ligula, quindi non adatto a tutti i tipi di fiori.

Anche se la morfologia dei fiori meglio si adatta ad una impollinazione con sonicazione tipica del genere *bombus*, sia le api da miele sia i bombi giocano un ruolo fondamentale per favorire l'impollinazione del Corbezzolo. Inoltre, questi imenotteri visitano un elevato numero di fiori ogni giorno, mostrano "fedeltà" ad una specie dall'inizio alla fine delle fioritura, dal momento che, una volta trovata una buona fonte di nettare continuano a visitare quella specie fino a che il nettare non sarà più disponibile.

Il nettare è la principale fonte di carboidrati per le api da miele. I principali componenti sono zuccheri, ma possono essere presenti in quantità assai minore anche proteine, lipidi, amminoacidi (Baker & Baker 1983).

Alcune piante offrono come ricompensa solo polline o solo nettare (Faegri e Van der Pijl 1979). Il corbezzolo, invece, offre entrambi i prodotti; di conseguenza, considerato che ogni ape bottinatrice tende a raccogliere un solo tipo di ricompensa, la pianta si assicura una elevata probabilità di essere visitata da più api.

Petanidou e Vokou (1990) hanno evidenziato che, negli ecosistemi mediterranei, le piante entomofile producono polline a maggior contenuto energetico rispetto alle specie

anemofile. Le piante entomofile che offrono polline e nettare come ricompensa utilizzano quindi una maggiore quantità di energia; tale maggiore investimento garantisce, comunque, un maggior successo riproduttivo in questo particolare ambiente. Dalla raccolta del nettare da parte delle api, si ottiene il miele, definito come la sostanza zuccherina prodotta dalle api a partire dal nettare che esse arricchiscono di sostanze provenienti dal loro corpo, trasformano, depongono nei favi degli alveari e fanno maturare (Ricciardelli D'Albore e Persano Oddo 1978).

Il miele di Corbezzolo è considerato tra i più pregiati della vegetazione mediterranea. Si tratta di un miele uniflorale, ha colore ambrato con tonalità grigio-verdi, un odore pungente ed un caratteristico gusto amaro che insieme alla difficoltà di produzione ne fanno un miele raro e costoso.

Un produzione significativa di miele uniflorale di Corbezzolo infatti, si ottiene esclusivamente in Sardegna. In alcune zone della Maremma grossetana è ugualmente possibile produrne, ma la resa è fortemente influenzata dalle condizioni climatiche all'epoca di fioritura.

### **Impollinazione manuale**

Durante le prove di impollinazione di *Arbutus unedo*, è emerso che gli unici fiori che non presentano granuli pollinici sullo stimma, né tubetti pollinici nello stilo, sono quelli tenuti isolati e lasciati liberi di autoimpollinarsi.

I meccanismi di prevenzione dell'autoimpollinazione, in fiori ermafroditi, distinti a seconda del tempo e del modo in cui si realizzano, sono proterandria e proteroginia, velocità di idratazione dei granuli, autoincompatibilità eteromorfa ed omomorfa.

Dalle precedenti analisi sulla vitalità del polline e recettività dello stimma, si è potuto escludere un fenomeno di maturazione differenziata degli organi riproduttori. L'indagine sulla germinabilità, poi, ha mostrato come l'interazione tra polline e stimma sia positiva, quindi il polline riesce ad idratarsi e germina regolarmente.

Non esiste per il Corbezzolo il caso di incompatibilità eteromorfa, essendo la morfologia dei fiori e dei granuli pollinici identica per tutti gli esemplari della specie.

Infine è da escludere anche un'incompatibilità omomorfa, determinata biochimicamente, poiché nel caso di autoimpollinazione manuale, i tubetti pollinici si sono sviluppati regolarmente nello stilo.

I risultati ottenuti, quindi, possono spiegarsi solo con un adattamento della pianta atto a favorire l'incrocio, infatti, il fiore di Corbezzolo è tipicamente rivolto verso il basso,

quindi il polline uscendo dall'antera difficilmente cade sullo stamma, a meno che non intervenga lo scuotimento provocato da un insetto.

### **Successo riproduttivo**

Il successo riproduttivo di una specie è strettamente dipendente dal corretto funzionamento del processo di impollinazione.

Per *Arbutus unedo* si può parlare di scarso successo riproduttivo dal momento che solo il 2,9% dei fiori sviluppa frutti maturi, risultato che trova conferme anche in precedente lavoro di Chiarucci e Pacini (1989), dove gli autori riportavano una frequenza di 2-1 frutti per infruttescenza.

Non si riscontra nessuna anomalia nelle fasi successive alla dispersione del polline, il numero ridotto di impollinatori non sembra compromettere l'impollinazione dal momento che le osservazioni di tutti i fiori appartenenti ad una infiorescenza, hanno mostrato polline sullo stamma e tubetti germinati lungo lo stilo.

Inoltre il fiore è autocompatibile anche se raramente si autoimpollina.

I semi, una volta formati, germinano con gli opportuni trattamenti di stratificazione fredda (vernalizzazione) ed accurata pulizia della polpa, ma senza trattamenti non si è avuta alcuna germinazione.

Informazioni presenti nei manuali di germinazione (APAT, Piotto) riportano per *Arbutus undedo* L., una germinabilità medio-alta dei semi, con valori che oscillano dal 60 al 90%.

Tra le cause della bassa percentuale di successo riproduttivo si deve considerare l'evenienza di una limitazione del fenomeno di impollinazione (che si è visto essere necessaria affinché si sviluppi il frutto) dovuta a vari fattori:

– Sicuramente la fioritura invernale di *Arbutus unedo* L. limita l'attività degli insetti. L'ape infatti bottina solo al di sopra dei 10 °C, mentre malgrado il bombo preferisca basse temperature, la sua attività si blocca in presenza di pioggia e vento.

– Il fiore di *Arbutus unedo* L. è molto selettivo data la sua morfologia, quindi risulta accessibile solo a queste due specie di insetti.

– La scelta dei fiori da visitare non dipende soltanto dal colore, ma anche dall'odore. Sembra infatti che il nettare di cui le api si nutrono emani per loro un profumo irresistibile e che esse riescano perciò a riconoscere i fiori più ricchi di questa sostanza zuccherina grazie a dei recettori olfattivi situati sulle antenne.

Tuttavia i dati raccolti fanno escludere che questa sia la fase critica del basso successo

riproduttivo.

Altre ipotesi potrebbero essere legate alle fasi post-impollinazione tra cui la competizione tra gametofiti nello stilo o la presenza di difficoltà nelle fasi di fecondazione che sono sensibili alle variazioni di temperatura. Infatti, Villa (1982), afferma che dalle indagini morfologiche la maggior parte degli ovari di corbezzolo presenti in un'infiorescenza, non si trasforma in frutto, ma cade prima della maturazione. Nonostante l'impossibilità di sviluppo dell'ovulo in seme, però, le pareti dell'ovario si ingrossano notevolmente. Questo fa pensare che, pur non essendo avvenuta la fecondazione, le pareti carpellari si sviluppino ugualmente in seguito allo stimolo dal polline allo stigma, ma che poi l'ovario non riesca a raggiungere la completa maturazione tipica delle piante a partenocarpia completa.

Se però si considerano i risultati dell'esperimento di diradamento post-fioritura, (che ha permesso di aumentare da 2,9% a 50% il numero di fiori diventati frutti) è lecito ipotizzare che di fatto . siano le limitate risorse della pianta madre a porre dei limiti allo sviluppo dei frutti di questa specie.

In molte Angiosperme, lo sviluppo dei semi è lo stadio del ciclo vitale con la maggiore mortalità, a parte la fase gametica (Sutherland, 1986). La quantità e la qualità del polline, la disponibilità delle risorse, la predazione dei semi e dei frutti e le condizioni climatiche sono fattori esterni che possono determinare le dimensioni e le caratteristiche dei frutti (Stephenson, 1981; Sutherland, 1986; Guitian, 1993; Holland, Bronstein, & DeAngelis, 2004). Il microambiente materno dove si sviluppano i frutti e i semi (Bawa & Webb, 1984; Niesenbaum, 1999), come anche la prevalenza del tessuto materno nei frutti e nei tegumenti del seme (Haig & Westoby, 1988a, b), fanno in modo che la pianta madre attui un forte controllo sulla produzione di frutti e di semi. Dal momento che in natura le risorse sono limitate, l'investimento materno nella produzione di frutti freschi carnosì, come in *A. unedo*, deve essere fatto scegliendo il modo migliore di allocare le risorse. Lloyd (1980) ipotizza una regolazione sequenziale che può avvenire in stadi successivi, in cui ognuno sia in grado di porre dei limiti a quello successivo:

- 1) Controllo del numero dei fiori che si sviluppano fino all'antesi
- 2) Controllo della produzione degli ovari
- 3) Regolazione della maturazione dei frutti e dei semi.

Nelle specie ermafrodite, l'inizio della fioritura comporta una scelta contemporanea, da parte della pianta madre, del numero dei fiori e degli ovari, quindi la maggiore regolazione avviene nella fase di fioritura e di formazione di frutti. Questa regolazione

sequenziale può essere vantaggiosa quando non sia possibile prevedere la disponibilità di risorse da parte della pianta madre in stadi precoci di sviluppo, specialmente in specie con frutti freschi ed energeticamente dispendiosi. Questo è il caso di specie di zone temperate, dal momento che le condizioni di fioritura e sviluppo dei frutti non sono prevedibili nel momento della formazione delle gemme fiorali o alla fine della stagione riproduttiva precedente (Agren, 1988; Elmqvist, Agren, & Tunlid, 1988). Il numero di frutti e di semi che si svilupperanno (l'esito del successo riproduttivo) dipenderà da come ciascuna fase verrà condizionata dai fattori ambientali e dalla disponibilità delle risorse (Tamura & Hiura, 1998; Sperens, 1999; Medrano, Guitian, & Guitian, 2000).

La produzione di fiori in *surplus* può essere spiegata con varie ipotesi.

a) L' "ipotesi di attrazione" considera la presenza di molti fiori un modo per attrarre un maggior numero di impollinatori (Schemske, 1980; Stephenson, 1981), non solo per aumentare le probabilità di fecondazione ma anche per aumentare la probabilità di ricevere adeguate combinazioni di granuli pollinici. Infatti, spesso non è solo la quantità di polline a determinare il successo riproduttivo, ma anche la sua qualità. In un lavoro di Banuelos e Obeso (2003), è stato messo in evidenza che fiori che ricevono polline da più piante hanno una maggiore probabilità di sviluppare frutti e i frutti prodotti sono più grandi.

b) L' "ipotesi di copertura dai rischi" spiega il *surplus* di fiori prodotti come un modo per far fronte a condizioni ambientali imprevedibili durante la fioritura e la fruttificazione (Stephenson, 1981; Aker, 1982; Ehrlen, 1991).

c) L' "ipotesi dell'aborto selettivo" mette in relazione la riduzione della discendenza con una regolazione della qualità della prole (Stephenson, 1981; Kozlowsky & Stearns, 1989). Infine, il legame tra fratelli e la pianta madre e tra i fratelli stessi, può influenzare il numero finale di frutti e di semi a causa del conflitto genitori-prole e della rivalità tra fratelli (Uma Shaanker, Ganeshiah, & Bawa, 1988; Mock & Parker, 1997). Ad ogni modo sembrano esserci una o più cause evolutive che spieghino la produzione soprannumeraria di fiori, in modo tale che il costo della produzione dei fiori sia controbilanciato dai benefici acquisiti dalla pianta madre (Banuelos, 2004).

Lamont (1983) ha messo in evidenza che le attuali temperature caratteristiche, insieme al tipo di precipitazioni, impongono problemi di assunzione di nutrienti in tutti gli ecosistemi di tipo mediterraneo.

Sebbene *Arbutus unedo* L. sia una tipica specie stenomediterranea, sembra risentire fortemente dell'aridità in anni molto secchi, soprattutto nell'ultimo periodo di

maturazione dei frutti (Chiarucci *et al.*, 1992).

Uno studio di Chiarucci *et al.* (1992) ha messo in evidenza l'influenza del clima sulla maturazione dei frutti. E' emerso che l'aridità concentrata nel periodo estivo determina una minore biomassa dei frutti e una maturazione meno uniforme dei semi. Sebbene sia emerso che l'influenza del clima sulla maturazione dei frutti sia più forte nel periodo più arido dell'anno (periodo estivo), esso esercita una notevole influenza durante l'intero anno. E' stato infatti messo in evidenza che il peso fresco e secco dei frutti e il numero di semi per frutto, dipendono dalla quantità di pioggia totale nelle diverse stagioni e dalla temperatura media delle stagioni (Chiarucci *et al.*, 1992).

Dalla valutazione complessiva delle informazioni raccolte sul processo riproduttivo di questa specie, si può ipotizzare che, considerata la stagione poco favorevole alla fioritura e la notevole lunghezza del periodo che intercorre tra la fioritura e la dispersione dei semi, il corbezzolo, abbia selezionato una strategia specifica: per far fronte alle imprevedibili cause di riduzione degli ovari in via di sviluppo, produce fiori in eccesso e stabilisce successivamente su quali e quanti degli ovari sopravvissuti avviare le fasi di sviluppo e maturazione energeticamente più onerose.

In conclusione, dalle indagini di campo e di laboratorio condotte sulle diverse fasi del processo riproduttivo di *Arbutus unedo* L., sono emerse nuove informazioni sulle strategie di adattamento e biologia riproduttiva della specie:

- *Arbutus unedo* L. non è perfettamente adattato all'ambiente mediterraneo: sopravvive alle estati caldo-aride di queste regioni concentrando la fioritura e la dispersione dei frutti in autunno inverno e di conseguenza presentando un ciclo riproduttivo lungo circa un anno.
- La fioritura è scalare ed avviene con il susseguirsi di 7 stadi dalle caratteristiche morfologiche differenti.
- Lo sviluppo di stimma e polline è sincrono.
- Vitalità e germinabilità del polline tollerano basse temperature mentre risentono di quelle elevate, rendendo così la specie particolarmente vulnerabile ai cambiamenti climatici globali che prevedono aumenti sensibili delle temperature-
- Il fiore è autocompatibile ma raramente si autoimpollina e quindi richiede l'intervento dei pronubi per sviluppare frutti.
- L'impollinazione è entomofila e gli insetti pronubi sono *Apis mellifera* e *Bombus terrestris*.
- I frutti attraggono agenti biotici che ne disperdono i semi.

– Presenta un basso successo riproduttivo (<3%) controllato dalla pianta madre in funzione delle risorse disponibili.

Questi studi, in vista dei cambiamenti climatici globali che non prevedono solo aumenti delle temperature ma anche degli eventi climatici estremi, con ulteriori approfondimenti possono fornire informazioni utili allo sviluppo di modelli di previsione.



## BIBLIOGRAFIA CAPITOLO 5

- Agren, J. (1988). Between-year variation in flowering and fruit set in frost-prone and frost-sheltered populations of dioecious *Rubus chamaemorus* L. *Oecologia*, 76, 175–183.
- Aker, C. L. (1982). Regulation of flower, fruit and seed production by a monocarpic perennial *Yucca whipplei*. *Journal of Ecology*, 70, 357–372.
- Alexander, L. V., Zhang, X., Peterson, T. C., Caesar, J., Gleason, B., Tank, A. M. G. K., Haylock, M., Collins, D., Trewin, B., Rahimzadeh, F., Tagipour, A., Kumar, K. R., Revadekar, J., Griffiths, G., Vincent, L., Stephenson, D. B., Burn, J., Aguilar, E., Brunet, M., Taylor, M., New, M., Zhai, P.,
- Alvim P.T., (1960). Moisture stress as a requirement for flowering of coffee. *Science* **132**: 354.
- 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., & Wilcock C. C. (1994). Reproductive characteristics and breeding system of shrubs of the Mediterranean region. *Functional Ecology* 8, 69-76.
- Aronne G., & Wilcock C. C. (1997). Reproductive Phenology in Mediterranean macchia vegetation. *Lagascalia* **19** (1-2): 445-454.
- Baker G. G., Baker I.(1983). A brief historical review of the chemistry of floral nectar. In (Bentley B., Elias T. eds). *The biology of nectarines*. Columbia University Press, New York. pp.126-152.
- Banfi E., Consolino F. (2000). *La flora mediterranea. Conoscere, riconoscere e osservare tutte le piante mediterranee più diffuse*. Istituto Geografico DeAgostini.
- Banfi E., Consolino F. (2001). *Alberi. Conoscere e riconoscere tutte le specie più diffuse di alberi spontanei e ornamentali*. Istituto Geografico DeAgostini.
- Banelos, M. J., & Obeso, J. R. (2003). Maternal provisioning, sibling rivalry and seed mass variability in the dioecious shrub *Rhamnus alpinus*. *Evolutionary Ecology*, 17, 19–31.
- Banelos, M. J., & Obeso, J. R. (2004). How is fruit production regulated in the dioecious fleshy-fruited shrub *Rhamnus alpinus*?. *Basic and Applied Ecology* 6: 249-259.
- Bawa, K. S., & Webb, C. J. (1984). Flower, fruit and seed abortion in tropical forest trees: implications for the evolution of paternal and maternal reproductive patterns.

- American Journal of Botany, 71, 736–751.
- Bertolani Marchetti D. (1964). Ricerche palinologiche in sedimenti torbosi a Porto Conte, presso Alghero (Sardegna). Arch. Bot. Biogeogr. Ital., 40: 222-226.
- Bronchart R. (1962). Influence d'une perte en eau disponible du sol sur la mise a fleurs de *Geophila renaris*. De Wild. et Th. Dur. *Archives de l'Institut de Botanique*, **29**: 1195-1215.
- Bussotti F., Schirone B. (2001). La vegetazione mediterranea. Propagazione di alberi e arbusti della flora mediterranea. Manuale ANPA n. 43 del 21.02.98.
- Canadell J., Lopez-Soria L., 1998. Lignotuber reserves support regrowth following clipping of two Mediterranean shrubs. *Functional ecology*, 12 (1): 31-38.
- Chessa I., Nieddu G., Tsipouridis C., 1998. Analisi in situ di biotipi di corbezzolo (*Arbutus unedo* L.) selezionati in Sardegna e in Grecia. Atti del IV Convegno Nazionale Biodiversità, Alghero, 8-11 settembre 1998: 789-792.
- Chiarucci L., Pacini E. (1989). Reproductive efficiency of *Arbutus unedo* L. in five different Tuscan environments. *Giornale Botanico Italiano* Vol. 123, suppl. 1.
- Comtois, P. (1994). Airborne pollen dispersal and survival on Mount Sutton (Canada). *Aerobiologia*, 10: 31-37.
- Comtois, P., Perfetto, A. (1996). Airbone pollen viability: meteorological and air pollution determinants. Atti del VII Congresso Nazionale dell'Associazione Italiana di Aerobiologia, Firenze: 97.
- Convegno Nazionale su "Biodiversità: Tecnologie - Qualità", Reggio Calabria 16-17 giugno: 491-494.
- Cresti, M., Del Casino, C. (2003). Fiore e riproduzione sessuale. *Biologia vegetale*, Zanichelli.
- Cruden R. W. (1977). *Evolution*, **31**, 32.
- Dafni, A. (1992). *Pollination ecology: a practical approach*. Oxford University Press. New York.
- Dauguet J.C., Foucher J.P., 1982. Les flavonoides de *Arbutus unedo* L. (Ericaceae). *Plantes medicinales et phytotherapie*, 16 (3): 185-191.
- De Lillis, M. (1991). An ecomorfological study of the evergreen leaf *Braun-Blanquetia* 7: 1-126.
- De Maria , G. (1988). *Il mondo dei fiori-come vivono, dove vivono*. Sagep Editrice. Genova.
- De Nettancourt, D. (1977). *Incompatibilità in Angiosperms*. Springer-Verlag, Berlino.

- Deidda P., Mulas M., 1999. Due specie frutticole minori per una frutticoltura sostenibile: *Myrtus communis* L. e *Arbutus unedo* L. Risultati di alcune ricerche condotte in Sardegna (Italia). Actas del Congreso Europeo de Agricultura Sostenible en ambientes mediterraneos, Badajoz-Merida, 22-25 de marzo: 50-54.
- Di Castri, F, Mooney, H. A. (eds) (1973). Mediterranean. Type Ecosystem. Origin and structure. Ecological studies 7. Springer. Berlin.
- EEA (2007), Climate Change and Water Adaptation Issues, EEA Technical report No 2/2007, European Environmental Agency, Luxembourg: Office for Official Publications of the European
- Elmqvist, T., ( Agren, J., & Tunlid, A. (1988). Sexual dimorphism and between-year variation in flowering, fruit set and pollinator behaviour in a boreal willow. *Oikos*, 53, 58–66.
- Frei, C.; Schöl., R.; Fukutome, S.; Schmidli, J. and Vidale, P. L. (2006), Future change of precipitation extremes in Europe: an intercomparison of scenarios from regional climate models. *Journal of Geophysical Research*, 111. 117–128.
- Giorgi, F., X. Bi, et al. (2004), Mean interannual and trends in a regional climate change experiment over Europe. II: Climate Change scenarios (2071-2100). *Climate Dynamics* 23.
- Giovannetti M., Lioi L., 1990. The mycorrhizal status of *Arbutus unedo* in relation to compatible and incompatible fungi. *Canadian Journal of Botany*, Vol. 68 (6): 1239-1244.
- Guitian, J. (1993). Why *Prunus mahaleb* (Rosaceae) produces more flowers than fruits? *American Journal of Botany*, 80, 1305–1309.
- Haig, D. M., & Westoby, M. (1988a). Inclusive fitness, seed resources, and maternal care. In J. Lovett-Doust, & L. Lovett-Doust (Eds.), *Plant reproductive ecology, patterns and strategies* (pp. 60–79). New York, Oxford: Oxford University Press.
- Haig, D. M., & Westoby, M. (1988b). On limits of seed production. *American Naturalist*, 131, 757–759.
- Haylock, M., Goodess, C. (2004), Interannual variability of European extreme winter rainfall and links with mean large-scale circulation. *International Journal of Climatology*, 24, 759–776.
- Herrera C. M. (1987). Vertebrate-dispersed plants of the Iberian peninsula: a study of fruit characteristics. *Ecological Monographs*, 57(4): 305-331.
- Herrero, M. P, Jonson, R. R. (1980). *Crop science* 20, 796-800.

- Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y. (1970). Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technol.*
- Holland, J. N., Bronstein, J. L., & DeAngelis, D. L. (2004). Testing hypotheses for excess flower production and low fruit-to-flower ratios in a pollinating seed-consuming mutualism. *Oikos*, 105, 633–640.
- IPCC (2007a), *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Summary for Policymakers. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel*
- IPCC (2007b), *Climate Change 2007: The Physical Science. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.*
- IPCC (2007c), *Climate change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Working Group II Contribution to the IPCC. IPCC Fourth Assessment Report.*
- Jansen, W. A. (1962). *Botanical histochemistry. Principle and practise.* W. H. Freeman & Company, San Francisco, CA, USA.
- Jona, R. (1992). *Biologia florale e di fruttificazione. Frutticoltura generale.* Reda.
- JRC (2005) *Climate Change and the European Water Dimension.* Ed. S. Eisenreich S. JRC.
- Keeley, J. E., Zedler, P. J. (1978). Reproduction of chaparral shrubs after fire: a comparison of sprouting and seedling strategies. *Am. Nat.* 99: 142-161.
- King Marcus J.; Buchmann Stephen L. (2003.) Floral sonication by bees: Mesosomal vibration by *Bombus* and *Xylocopa*, but not *Apis* (Hymenoptera: Apidae), ejects pollen from poricidal anthers. *Journal of the Kansas Entomological Society* 76: 295-305
- Klein Tank, A. (2004), *Changing Temperature and Precipitation Extremes in Europe's Climate of the 20th Century.* PhD thesis, Utrecht University.
- Klein Tank, A.; Wijngaard, J., van Engelen, A. (2002), *Climate in Europe. Assessment of observed daily temperature and precipitation extremes.* European Climate Assessment.
- Knuth P. (1909). *Handbook of flower pollination*, III. Clarendon Press. Oxford.
- Kowithayakorn L, Humphrey L.R. (1987). Influence of water stress on flowering and seed production of *Macroptilium atropurpureum* cv. Siratro. *Annals of Botany* 59: 55 1-557.
- Kozlowsky, J., & Stearns, S. C. (1989). Hypothesis for the production of excess

- zygotes: models of bet-hedging and selective abortion. *Evolution*, 43, 1369–1377.
- La Viola F., Forleo L.R., Marvulli M., 2004. Effetti dell'epoca di semina e di un trattamento a bassa temperatura sulla germinazione di *Arbutus unedo*. Atti VII Giornate Scientifiche SOI (Napoli, 4-6 maggio 2004).
- Lacey E.P. (1984). Seed mortality in *Daucus carota* population: latitudinal effects. *American Journal of Botany*, 71(9): 1175-1182.
- Lamont, B. B., (1983). Strategies for maximizing nutrient uptake in two Mediterranean ecosystems of low nutrient status.- In Kruger, F. J., Mitchell, D. T., Jarvis, J. U. M., (Eds): *Mediterranean-type ecosystems: the role of nutrients*, pp. 246-273.-*Ecological studies* 43.-Berlin: Springer.
- Laser, K. D., Lersten, N. R. (1972). Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile Angiosperm. *Bot. Rev.* 38: 425-454.
- Leone, U. (1997). Economia ambientale e globalizzazione della desertificazione. Atti del Primo Seminario Nazionale sulla Lotta alla desertificazione, 4 giugno 1997, Roma. In corso di stampa.
- Lloyd, D. G. (1980). Sexual strategies in plants. I. A hypothesis of serial adjustment of maternal investment during one reproductive session. *New Phytologist*, 86, 69–79.
- Lopez Bermudez, F., Albaladejo, J. (1990). Factores ambientales en la degradación del suelo en el area mediterranea. In (Albaladejo, J., Stocking M. A., Diaz, E., eds) *Degradación y regeneración del suelo en condiciones ambientales mediterraneas*, CSIC, Madrid. (Consejo Superior de Investigaciones Científicas). pp. 15-45.
- Lorenzetti, F., Falcinelli, M., Veronesi, F. (1994) Miglioramento genetico nelle piante agrarie. Edagricole.
- Lorenzi R., Ceccarelli N., 1979. Rizogenesi e ciclo vegetativo in *Arbutus unedo* e *Camellia japonica*. *Rivista di Ortoflorofrutticoltura Italiana*, 63: 291-302.
- Margaris, N.S., (1980). Structure and dynamics of Mediterranean-type vegetation. *Portugaliae Acta Biologica* 16: 45-58.
- Marquis, R. J. (1992). A bite is a bite is a bite? Constraints on response to folivory in *Piper arieianum* (Piperaceae). *Ecology*, 73, 143–152.
- Mazzoleni, S. (1989). Fire and Mediterranean plants: germination responses to heat exposure. *Annals of Botany* 47: 227-233.
- Mazzoleni, S., Aronne, G. (1993). Introduzione all'ecologia degli incendi.
- Mazzoleni, S., Pizzolongo, P. (1990). Post-fire regeneration patterns of Mediterranean shrubs in the Campania region, Southern Italy. In (Goldammer, J. G, Jenkins, M. J., eds)

- Fire in Ecosystem dynamics. Proceedings of the third international symposium on fire ecology. Freiburg, May, 1989. SPB Academic Publishing, The Hague. pp. 43-51.
- Medrano, M., Guitián, P., & Guitián, J. (2000). Patterns of fruit and seed set within inflorescences of *Pancreaticum maritimum* (Amaryllidaceae): non uniform pollination, resource limitation, or architectural effects. *American Journal of Botany*, 87, 493–501.
- Meehl, G.A., Tebaldi, C. (2004), More intense, more frequent, and longer lasting heatwaves in the 21st century. *Science*, 305, 994–997.
- Mereti M., Grigoriadou K., Nanos G.D., 2002. Micropropagation of the strawberry tree, *Arbutus unedo* L.. *Scientia horticultrae*, 93 (2): 143- 148.
- Mesleard F., Lepart J., 1989. Continuous basal sprouting from lignotuber: *Arbutus unedo* L. and *Erica arborea* L., as woody Mediterranean examples. *Oecologia*. 80 (1): 127-131.
- Mesleard F., Lepart J., 1991. Germination and seedling dynamics of *Arbutus unedo* and *Erica arborea* on Corsica. *Journal of vegetation science*, 2 (2): 155-164.
- Minelli, A. (2002). La macchia mediterranea-formazioni sempreverdi costiere. Quaderni habitat. Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio. Museo Friulano di Storia Naturale-Comune di Udine.
- Moberg, A., Jones, P. D. (2005), Trends in indices for extremes in daily temperature and precipitation in central and western Europe 1901–99. *International Journal of Climatology*, 25, 1149–1171.
- Mock, D. W., & Parker, G. A. (1997). The evolution of sibling rivalry. In R. M. May, & P. H. Harvey (Eds.), *Oxford series in ecology and evolution*. Oxford: Oxford University Press.
- Morini S., Fiaschi G., 2000. In vitro propagation of strawberry tree. *Agr. Med.* vol. 130: 240-246.
- Morini S., Fiaschi G., D'Onofrio C., 2003. Indagini sulla propagazione per talea di alcune specie arbustive della macchia mediterranea. *Italus Hortus* 10 (6):52-59.
- Mugnai S., Vernieri P., Malorgio F., Serra G., Tognoni F., 2004.
- Mulas M., Brigaglia N., Cani M.R., 1997. Osservazioni preliminari sul germoplasma spontaneo di corbezzolo (*Arbutus unedo* L.) per la selezione di ecotipi con frutti adatti al consumo fresco.
- Naveh, A. (1974). Effects of fire in the Mediterranean region in Kozlowskit T e Ahlgren C. E. (eds). *Fire ecosystem* Acad. Press. New York pp 401-434.
- Naveh, Z. (1975). Conservation, restoration and research priorities for Mediterranean

- uplands threatened by global change. In (Moreno, M. J. & Oechel, W., eds) *Global Change and Mediterranean-type ecosystem*. Ecological studies 117. Springer, New York. pp. 482-507.
- Naveh, Z. (1975). The evolutionary significance of fire in the Mediterranean region. *Vegetatio* 29: 199-208.
- Nieddu G., Chessa I., 2002. Corbezzolo. In: *I fruttiferi minori in Europa* (a cura di Elvio Bellini), Edizioni L'Informatore Agrario, Verona.
- Niesenbaum, R. A. (1999). The effect of pollen load size and donor diversity on pollen performance, selective abortion, and progeny vigor in *Mirabilis jalapa* (Nyctaginaceae). *American Journal of Botany*, 86, 261–268.
- on Climate Change.
- Pacini E. (1969). Embryology of *Arbutus unedo* L., *Giornale Botanico Italiano*, **103**: 623-624.
- Pacini, E.(1997). Tapetum character states: analytical keys for tapetum types and activities. *Canadian Journal of Botany* **75**: 1448-1459.
- Pacini, E., Nepi, M., Ciampolini, F. (1995). Il nettare e l'impollinazione. *Le Scienze* n. 321, maggio 1995.
- Pearce, D. (1993). *Un'economia verde per il pianeta*. Il Mulino. Bologna.
- Perria, R. (1999). Il Corbezzolo (*Arbutus unedo*): caratterizzazione e comportamento in vitro di un fruttifero minore della Machhia Mediterranea. Dipartimento di Ortoflorofruitticoltura-Facoltà di Agraria-Università degli Studi di Firenze.
- Persano Oddo, L., Piana, L., Sabatini, A. G. (2001). *Conoscere il miele-guida all'analisi sensoriale*.
- Petanidou, F., Vokou, D., (1990). Pollination and pollen energetics in mediterranean ecosystem. *American Journal of Botany* **77**: 986-992.
- Piccini, C., Piotto, B. (2001). Il degrado della vegetazione mediterranea. Propagazione di alberi ed arbusti della flora mediterranea. Manuale ANPA n. 43 del 21.02.98.
- Pignatti, S. (1982). *Flora d'Italia*. Edagricole, Bologna.
- Prima, G. D., Mincione, B. (1997). *Biodiversità: Tecnologia-Qualità*. Atti del 3° Convegno Nazionale. Laruffa Editore.
- Proctor, M. C. F. (1978). Insect Pollination Syndromes in a Evolutionary Context. In Richards A. J. (ed.) *The pollination of flowers by insects*. Academic Press, London, pp. 105-116.
- Quezél, P. (1995). *Le flore du basin méditerranéen: origine, mise en place, endémisme*.

*Ecologia Mediterranea* **21**: 19-39.

Räisänen, J., Hansson, U., et al. (2004), European climate in the late 21st century: regional simulations with two driving global models and two forcing scenarios, *Climate Dynamics* 22.

Raven, P. H., Evert, R. F., Eichorn, S. E. (1986). *Biologia delle piante*. Zanichelli.

Ricciardelli D'Albore, G. (1998). *Mediterranean melissopalynology*. Università degli Studi di Perugia.

Ricciardelli D'Albore, G., Persano Oddo, L. (1978). *Flora apistica italiana*. Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria. Roma.

Romano, B., Fringuelli, G. (1982). *Botanica generale. La procreazione dei vegetali e organografia degli apparati procreativi*. Galeno Editrice-Perugia.

Rusticucci, M., Vazquez-Aguirre, J. L. (2006), Global observed changes in daily climate extremes of temperature and precipitation. *Journal of Geophysical Research*, 111, 1–22.

Schär, C., Vidale, P. L., et al. (2004), The role of increasing temperature variability in European summer heatwaves. *Nature* 427.

Schemske, D. W. (1980). Evolution of floral display in the orchid *Brassavola nodosa*. *Evolution*, 34, 489–493.

Schonfelder, I., Schonfelder, P. (1996). *La flora mediterranea*. DeAgostini, Novara.

Schröter, D., Acosta-Michlik L, Arnell A.W., Araújo M.B., Badeck F., Bakker M. Bondeau A., Bugmann H., Carter T., de la Vega-Leinert A.C., et al. 2005. ATEAM Final Detailed report 2004, related to overall project duration, Potsdam Institute for Climate Impact Research, 139p.

Slatyer R.O., (1974). Effects of water stress on plant morphogenesis. In: *Plant Morphogenesis as the Basis for Scientific Management of Range Resources*. Miscellaneous Publication 1271, US Department of Agriculture: 3-13.

Soro A., Paxton R.J., 1999. The strawberry tree: a significant source of nectar around the Mediterranean basin. *Bee world*, 80 (3): 140-144.

Sperens, U. (1999). Long-term variation in, and effects of fertiliser addition on, flower, fruit and seed production in the tree *Sorbus aucuparia* (Rosaceae). *Ecography*, 20, 521–534.

Stephenson A.G. (1981). Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annual Review of Ecology and Systematic*, **12**: 253-279.

Stephenson, A. G. (1981). Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 12, 253–279.



- Stott, P. A.; Stone, D. A., Allen, M. R. (2004), Human contribution to the European heatwave of 2003. *Nature*, 432, 610–614.
- Sutherland, S. (1986). Patterns of fruit set: what controls fruit-flower ratios in plants? *Evolution*, 40,
- Tamura, S., & Hiura, T. (1998). Proximate factors affecting fruit set and seed mass of *Styrax obassia* in a masting year. *Ecoscience*, 5, 100–107.
- Turner N.C., Kramer P.J., (eds), (1980). *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress*. New York: Wiley Interscience.
- Uma Shaanker, R., Ganeshiah, K. N., & Bawa, K. S. (1988). Parent–offspring conflict, sibling rivalry, and brood size patterns in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 19, 177–205.
- Valutazione della crescita in arbusti ornamentali soggetti a limitazione idrica. Atti VII Giornate Scientifiche SOI (Napoli, 4-6 Maggio 2004).
- Vidrich V., Moretti P., Fusi P., 1980. Variazioni stagionali del contenuto di tannini in *Quercus ilex* L. e *Arbutus unedo* L.. *L'Italia forestale e montana*, 35 (6): 267-273.
- Vila M., Weiner J., Terradas J., 1994. Effect of local competition on resprouting of *Arbutus unedo* after clipping. *Journal of vegetation science*, 5 (2): 145-152.
- Villa, R. (1982). Ricerche sulla biologia di *Arbutus unedo* L. (Ericaceae): ciclo di sviluppo. Istituto di Botanica dell'Università di Sassari. *Boll. Soc. Sarda Sci. Nat.*, **21**: 307-309.

## **CAPITOLO 6 *Robinia pseudoacacia* L. : BIOLOGIA FIORALE E PRODUZIONE DI NETTARE DI UNA DELLE PRINCIPALI SPECIE DI INTERESSE APISTICO IN EUROPA**

### **6.1 INTRODUZIONE**

La diversità biologica o biodiversità, che costituisce l'insieme di geni, specie ed ecosistemi presenti sulla Terra, è il prodotto di centinaia di milioni di anni di evoluzione ed è fondamentale per il funzionamento di tutti gli ecosistemi presenti sul pianeta. I dati disponibili mostrano che le attività umane stanno portando ad una perdita della biodiversità del pianeta e tale tendenza si accentuerà con l'ulteriore incremento della popolazione umana e del conseguente sviluppo economico (Tolba, 1992). Le piante esotiche invasive contribuiscono a ridurre la diversità biologica a livello mondiale. Le vie della migrazione oggi sono infinite. Ogni barriera biogeografica è superata infatti con la globalizzazione del commercio e con l'uso dei moderni mezzi di trasporto. L'immissione volontaria o casuale di piante in ambienti diversi da quello di origine impoverisce in genere gli ecosistemi perché i nuovi elementi, privi di controllo da parte di predatori, parassiti e competitori, spesso prendono il posto delle specie spontanee e si diffondono velocemente, rompendo equilibri ecologici che si sono stabiliti nel corso di centinaia di anni. Molte piante, come gli alberi da frutto e da legname, i cereali e i legumi, sono state introdotte in Europa prevalentemente dall'Asia e dall'Africa. Assieme alle piante coltivate sono state diffuse le prime infestanti. Al seguito di merci asiatiche e africane sono arrivate, e arrivano tuttora, diverse piante selvatiche invasive, mentre molto più rara in genere è l'introduzione di piante infestanti australiane e neozelandesi. Frutti e ortaggi come il mais, il pomodoro, il peperone, i fagioli, le fragole giganti, la patata sono stati importati dal continente americano, ma la loro lontananza genetica con le piante selvatiche europee ha impedito ibridazioni spontanee con queste e la fragilità delle diverse *cultivar* importate ne impedisce tuttora la diffusione incontrollata. Molte altre piante americane importate volontariamente o casualmente hanno invece dimostrato alte potenzialità di diffusione e si riproducono abbondantemente negli ambienti coltivati e naturali.

Il genere *Robinia* è di origine americana: nel nostro continente è presente solo la "falsa acacia", cioè la *Robinia pseudoacacia* L. La robinia è oggi la specie esotica più diffusa in Italia ed in Europa. In Italia presenta un'ampia distribuzione in una fascia altimetrica che va dal livello del mare fino a più di 1.000 metri (oltre 1.500 nel sud). È una specie rustica, con minime esigenze, climaticamente mesofila ma capace di sopportare la siccità estiva. Da molti è ritenuta una pianta infestante, poiché, a causa della sua forza pollonifera, rigetta abbondantemente se ripetutamente tagliata, prendendo il sopravvento sulle specie locali. Fiorisce in primavera per un breve periodo. Questa specie arborea, originaria dell'America del Nord, è la pianta esotica più coltivata al mondo per la produzione di legno e miele, nonché per la riforestazione di aree degradate. L'inserimento della robinia nelle fitocenosi naturali o seminaturali, sia esso avvenuto attraverso pratiche antropiche o diffusione spontanea, ha provocato la costituzione di boschi monospecifici, in cui la neofita ha assunto un ruolo dominante e fortemente competitivo nei confronti delle specie autoctone, sostituendosi ad esse nella formazione di comunità forestali tipicamente accompagnate, nel sottobosco, da un corteggio floristico ruderale e nitrofilo. È una specie rustica, con minime esigenze, climaticamente mesofila ma capace di sopportare la siccità estiva. Affermandosi nei terreni poveri e degradati migliora il suolo grazie all'azione di fissazione dell'azoto. A causa della sua forza pollonifera, rigetta abbondantemente se ripetutamente tagliata, prendendo il sopravvento sulle specie locali. Col suo ampio apparato ipogeo è efficace nelle opere di consolidamento delle pendici franose ed instabili.

La produzione di miele di *Robinia pseudoacacia* L. in Italia non riesce a soddisfare la domanda di mercato e deve competere con le importazioni dai Paesi dell'Est Europeo o dalla Cina. Gli apicoltori italiani, inoltre, sono consapevoli che le caratteristiche di questo miele possono facilmente essere alterate da nettari di altre specie raccolti dalle api a causa della brevità della fioritura di *R. pseudoacacia* e dell'inadeguata conoscenza delle altre risorse nettariifere sul territorio.

L'importanza di poter valutare il "potenziale mellifero" di una specie risiede essenzialmente in due aspetti:

- 1) la possibilità, da parte dell'apicoltore, di individuare, in una data zona, le specie con potenziale mellifero più alto e quindi di dislocare gli alveari in consorzi floristici di maggiore produttività;
- 2) la possibilità di inserire nelle normali pratiche agronomiche e forestali, oltre alle specie comunemente impiegate, anche altre di sicuro interesse apistico.

Il miele di *Robinia pseudoacacia* L. è apprezzato sul mercato per la sua fluidità, dovuta all'alta concentrazione di fruttosio (55-60%) che generalmente ne impedisce la cristallizzazione.

Il colore è giallo paglierino chiarissimo, il sapore delicato e poco acido e l'odore debole e leggermente florale. È relativamente povero in sali minerali e in polline.

Le pregiate caratteristiche del miele puro possono essere facilmente alterate, oltre che dall'andamento stagionale, dalla presenza di altri nettari o da errate pratiche produttive. Dati sulla fioritura e la produzione di nettare di *R. pseudoacacia* L sono stati raccolti per alcune varietà in Ungheria, mentre non sono disponibili per gli ambienti in Italia. I dati sui flussi di produzione di nettare durante la stagione apistica sono importanti per valutare le produzioni potenziali dei diversi tipi di miele di un territorio e fornire le basi per definire il carico ottimale di alveari per unità di superficie e razionalizzare la transumanza nelle aree oggetto di studio. In Italia viene prodotto soprattutto nella zona prealpina e in Toscana, ma se ne raccolgono partite di discreta purezza anche in molte altre regioni (per esempio Emilia Romagna, Abruzzo e Campania).

Questo lavoro si inserisce nella tematica generale finalizzata alla raccolta di informazioni di biologia florale e flussi nettariiferi delle principali specie di interesse apistico in Italia con osservazioni e campionamenti direttamente in campo. I dati sui flussi di produzione di nettare durante la stagione apistica sono importanti per valutare le produzioni potenziali dei diversi tipi di miele di un territorio e fornire le basi per definire il carico ottimale di alveari per unità di superficie e razionalizzare la transumanza nelle aree oggetto di studio.

## **6. 2. MATERIALI E METODI**

Le specie nettariifere sono generalmente studiate secondo le seguenti metodiche:

- a) Fenologia del fiore: contrassegnando un certo numero di fiori prima dell'antesi, si calcola la durata media della vita di un fiore, dall'apertura della corolla fino alla caduta dei petali o all'avvizzimento degli organi.
- b) Calcolo dell'investimento a ettaro: nel caso di una specie perenne legnosa, stabilite le dimensioni medie, si calcola il numero medio di fiori presenti nell'arco dell'intera fioritura per una pianta e quindi il numero di piante in un ettaro di monocoltura; per le piante erbacee il dato si ottiene delimitando cinque parcelle di 1 m<sup>2</sup> nelle quali si

contano i fiori, riportando poi il valore medio a un ettaro.

c) Studio della secrezione nettariana: di ogni pianta si coprono con sacchetti di *voile* gruppi di fiori dai quali si preleva il nettare secreto mediante microcapillari per valutare la secrezione nettariana in ogni fase di vita del fiore.

d) Calcolo del potenziale mellifero: conoscendo il numero di fiori presente in un ettaro e la quantità di nettare prodotto da ciascun fiore nella sua vita, e considerando che gli zuccheri entrano a far parte della composizione media del miele in ragione dell'80% (cioè 0,8 kg zuccheri = 1 kg miele), si applica la seguente formula:

$$\text{kg miele/ha} = \text{kg zucchero/ha} \times 100/80$$

Il valore così calcolato non tiene conto di tutti quegli eventi negativi che tendono ad abbassarlo (condizioni climatiche sfavorevoli ecc.) né può ovviamente fornire previsioni dirette sulla quantità di miele che l'apicoltore può realmente ottenere: su questa incidono, infatti, vari fattori quali l'appetibilità della specie, la concorrenza di altri pronubi (diurni e notturni), il consumo di miele da parte della colonia stessa per la propria alimentazione, lo sfruttamento più o meno oculato della coltura (numero di arnie per ettaro e loro disposizione), ecc.

Quando la quantità teorica massima di miele ottenibile da un ettaro di coltura non è nota, devono in ogni modo essere indicati per ogni specie i mg di nettare prodotti dal singolo fiore: da questo valore, con i calcoli descritti, si può risalire al potenziale mellifero/ha (Ricciardelli D'Albore e Intoppa, 1979).

### **Biologia florale**

Nella fioritura del singolo fiore di robinia sono stati individuati i seguenti stadi fenologici:

fiore chiuso

pre-antesi

1° giorno di antesi

2° giorno di antesi

3° giorno di antesi

4° giorno di antesi

5° giorno di antesi

6° giorno di antesi

### **Recettività dello stimma**

La recettività dello stimma durante i vari stadi fiorali è stata testata attraverso l'uso del test enzimatico DAB (diamminobenzidasi) che rileva la presenza della Perossidasi secondo la procedura suggerita da Dafni (1992).

Lo sviluppo di una colorazione bruno-rossastra indica la presenza dell'enzima perossidasi.

### **Vitalità del polline**

La vitalità del polline ai vari stadi fiorali è stata valutata tramite il test DAB (diaminobenzidina), secondo le modalità indicate da Dafni (1992).

Il reagente può essere usato per indicare nello stesso preparato la recettività dello stimma come la vitalità dei granuli di polline.

### **Produzione di polline**

La produzione di polline è stata quantificata mediante conteggio del numero di granuli di polline all'interno di 10 antere il più possibile prossime alla maturazione, ma non ancora aperte. Il metodo usato è quello di Dafni (1992).

Ogni antera è stata posta all'interno di una provetta nella quale sono stati aggiunti 0,3 ml di etanolo:acido acetico 3:1 (v:v); quindi l'antera è stata schiacciata per permetterne la sua completa apertura e la fuoriuscita del polline. È stato prelevato 1  $\mu$ l della sospensione ben agitata ed è stato deposto su di un vetrino; i granuli presenti sono stati contati tramite osservazione microscopica. Infine, i residui dell'antera sono stati prelevati dal fondo della provetta ed osservati al microscopio per verificarne il completo svuotamento. Conoscendo il numero dei granuli per unità di volume e sapendo il volume totale della sospensione, si può risalire al numero dei granuli pollinici contenuti nell'antera.

### **Biometria del fiore**

Sono state scelte 6 piante di robinia e per ognuna di esse sono stati contati i fiori presenti per infiorescenza. Il conteggio è stato effettuato in 10 infiorescenze per pianta.

### **Flusso nettario**

Nella stagione 2006, per valutare la quantità di nettare prodotta da ogni singolo fiore in funzione dello stadio fenologico e l'andamento nel tasso di secrezione del nettare stesso sono state scelte 2 popolazioni di *Robinia pseudoacacia* L: una a circa 100 m s.l.m. (Sito 1, Parco Gussone, Portici) ed una a quota 900 m (Sito 2, Vesuvio). Queste diverse postazioni hanno consentito di eseguire 2 studi in momenti diversi. Ciò ha permesso di verificare la variabilità tra popolazioni della stessa specie in siti diversi, a quote diverse e in periodi di fioritura diversi (le piante a quota 900 m hanno avuto una fioritura molto posticipata protrandosi fino alla prima settimana di Giugno).

Per ogni popolazione sono state scelte almeno 5 piante e su ognuna sono stati posti 10 cappucci di *voile* per poter valutare la reale produzione di nettare impedendo l'accesso agli impollinatori. Tali cappucci sono stati scelti in modo che avessero maglie sufficientemente larghe da far passare luce ed aria ma che allo stesso tempo impedissero l'accesso ai pronubi. Con ciascun cappuccio è stata coperta una infiorescenza con fiori ancora chiusi.

All'interno dell'infiorescenza sono stati marcati i fiori al primo giorno di antesi, di questi una parte è stata presa per analizzare volume, concentrazione e quantità totale di zuccheri nel nettare e una parte lasciata per avere dati relativi agli stadi fiorali successivi. Ogni giorno sono stati prelevati fiori a stadi fenologici diversi avendo cura di marcare quelli che rimanevano sulla pianta per i giorni successivi.

In questo modo è stato possibile individuare la durata dei fiori, lo stadio di massima produzione di nettare, l'andamento generale del tasso di secrezione e i valori medi di volume, concentrazione e quantità totale di zuccheri di un elevato numero di fiori.

Le analisi quantitative sul nettare sono state effettuate in laboratorio.

Per il prelievo del nettare sono stati utilizzati microcapillari monouso INTRA MARK (Blau Brand) dalla capacità di 1-5 microlitri.

Grazie all'uso dei microcapillari e della carta millimetrata è stato possibile risalire al volume di nettare di ogni singolo fiore.

Subito dopo aver ottenuto questo dato, il nettare così prelevato è stato analizzato mediante il rifrattometro di ABBE da banco per poterne determinare l'esatta concentrazione.

Una volta ottenuti entrambi i valori di volume e concentrazione è stato possibile valutare la quantità totale di zuccheri prodotta da ogni singolo fiore, il dato più interessante perchè prescinde da alcune variabili ambientali quali temperatura ed umidità relativa che

possono influire sul volume e concentrazione ma non alterano la quantità totale di zuccheri secreti.

Per ottenere questo dato è stata applicata la seguente formula:

$$\text{Zuccheri totali (mg)} = \text{Concentrazione (\%)} / 100 * \text{Volume (\mu l)} * \text{Densità}$$

Il valore della densità si ricava da specifiche tabelle sulla base dei valori di concentrazione (Dafni, 1992).

Nel Sito 1 sono state scelte 6 piante e disposti 10 cappucci per pianta in modo da avere una notevole quantità di fiori. E' stato analizzato il nettare di 300 fiori a vari stadi di sviluppo florale.

Sul Vesuvio a quota 900 m (Sito 2) sono state individuate le ultime piante ancora all'inizio della fioritura (prima settimana di Giugno) e analizzato il nettare di 90 fiori a vari stadi di sviluppo. In questo caso i cappucci sono stati posti in numero variabile da una pianta ad un'altra sulla base della disponibilità delle infiorescenze portanti fiori ancora chiusi.

Le analisi sulla quantità di nettare secreto dalla Robinia sono state eseguite sia durante il picco di fioritura (prima metà di Maggio) che alla fine della fioritura stessa (prima settimana di Giugno) per poter valutare l'eventuale variabilità tra luoghi diversi e momenti di fioritura diversi (con differenti condizioni climatiche).

Dalle analisi effettuate è emerso il *trend* di secrezione durante i vari stadi fiorali.

### **Determinazione degli zuccheri nel nettare**

Il nettare di 5 fiori allo stadio adulto è stato prelevato mediante i microcapillari e conservato a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  per eseguire in seguito la determinazione degli zuccheri in esso contenuti. Al momento delle analisi il nettare è stato diluito 1:100 in acqua distillata e la determinazione è stata condotta mediante HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Come fase mobile è stata utilizzata una miscela acetonitrile:acqua 3:1 (v:v). La colonna era costituita da una fase aminopropilsilanica termostata a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ : i picchi sono stati rivelati tramite un Detector ad indice di rifrazione (Waters 2410). Sono stati iniettati 20  $\mu\text{l}$  di campione e soluzione standard. Il flusso della fase mobile è stato regolato a 1 ml/min. Per ogni campione sono state fatte 3 serie di analisi per verificarne la ripetitività.



### 6. 3. RISULTATI

#### Biologia florale

In *Robinia pseudoacacia* L. la fioritura avviene su grappoli penduli di fiori portati da sottili peduncoli con corolla papilionacea: il calice è composto da cinque lobi e la corolla da petali larghi, arrotondati verso il margine libero. Il vessillo è verdastro al centro. Il colore dei petali è generalmente bianco, ma può essere anche rosato. L'androceo è formato da 10 stami diadelfi (Fig. 6.1).



Fig. 6.1. Fiore di *Robinia pseudoacacia* in visione laterale.

Il nettare è prodotto nel fondo del fiore, alla base del tubo formato dagli stami ed è facilmente accessibile agli insetti, in particolare agli imenotteri del genere *Bombus*, che riescono ad “aprire” il fiore con il loro robusto corpo. Le api, tra cui anche quelle da miele (*Apis mellifera*), trovano maggiori difficoltà a raggiungere il nettare quindi generalmente, visitano fiori senescenti che oppongono minor resistenza allo spostamento dei petali.

Il frutto è un legume contenente da tre a dieci semi.

La fioritura della specie ha inizio nella seconda metà di Aprile, e alle quote più elevate, si è protrae fino alla prima settimana di Giugno. Il picco della fioritura si raggiunge nel mese di Maggio. Il fiore, raggiunta l’antesi, mostra una durata media di 6-7 giorni, dopo di che diventa senescente (Fig. 6.2).



Fig. 6. 2. Fiori di *Robinia pseudoacacia* a differenti stadi di sviluppo: da sinistra a destra:

Fiore chiuso; pre-antesi: si inizia a separare il vessillo dalla carena; 3° giorno di antesi: le ali non sono molto separate dalla carena e il vessillo è ben disteso; 5° giorno di antesi: i vari pezzi fiorali (carena, ali e vessillo) sono ben distesi e separati l'uno dall'altro; fiore senescente: il pistillo emerge dalla carena, le ali e il vessillo tendono ad un colore giallo e sono grinzosi.

### **Produzione di polline**

Le antere (in numero di 10) si aprono quando il fiore è ancora chiuso e producono mediamente  $569 \pm 71$  granuli di polline (media  $\pm$  deviazione standard).

Ogni fiore produce in media  $5690 \pm 710$  granuli di polline.

### **Biometria del fiore**

Ogni infiorescenza è costituita mediamente da  $28,60 \pm 5,44$  fiori (valore medio  $\pm$  deviazione standard).

### **Vitalità del polline e recettività stigmatica**

Il polline è vitale prima della completa antesi del fiore, mentre la recettività dello stigma è massima allo stadio fenologico senescente. Pertanto il fiore è proterandro.

### **Flusso nettario**

Nel Sito 1, individuato a Portici, (fioritura della prima metà di Maggio 2005) il volume del nettare secreto aumenta con il progredire degli stadi fiorali.

Fiori ancora chiusi non producono nettare. Il volume medio del nettare secreto allo stadio di pre-antesi è  $0,56 \mu\text{l}$ , al 1° giorno di antesi  $1,74 \mu\text{l}$ , al 2° giorno di antesi  $1,86 \mu\text{l}$ , al 3° giorno di antesi  $3,15 \mu\text{l}$  e al 6° e ultimo giorno di antesi  $3,86 \mu\text{l}$ .

La quantità di nettare tende ad aumentare progressivamente con il progredire degli stadi fiorali, fino a raggiungere la massima secrezione il 6° giorno di apertura del fiore, cui fa seguito la senescenza (Fig. 6.3).

Nel Sito 2, individuato sul Vesuvio a quota 900 metri s.l.m, sono state individuate le ultime piante ancora in fioritura (prima settimana di Giugno) ed anche in questo caso sono state analizzate la quantità (volume, espresso in  $\mu\text{l}$ ) e la qualità (concentrazione, espressa in %) del nettare secreto.

Com'è evidenziato dal grafico in Fig. 6.3, anche in questo sito la quantità di nettare secreta tende progressivamente ad aumentare con il progredire degli stadi fiorali: fiori ancora chiusi non producono nettare, il volume medio del nettare secreto allo stadio di pre-antesi è  $0,32 \mu\text{l}$ , al 1° giorno di antesi  $1,43 \mu\text{l}$ , al 2° giorno di antesi  $1,83 \mu\text{l}$  e al 6° e ultimo giorno di antesi  $1,92 \mu\text{l}$ .

La quantità di nettare tende ad aumentare progressivamente con il progredire degli stadi fiorali, fino a raggiungere la massima secrezione il 6° giorno di apertura del fiore, cui fa seguito la senescenza.

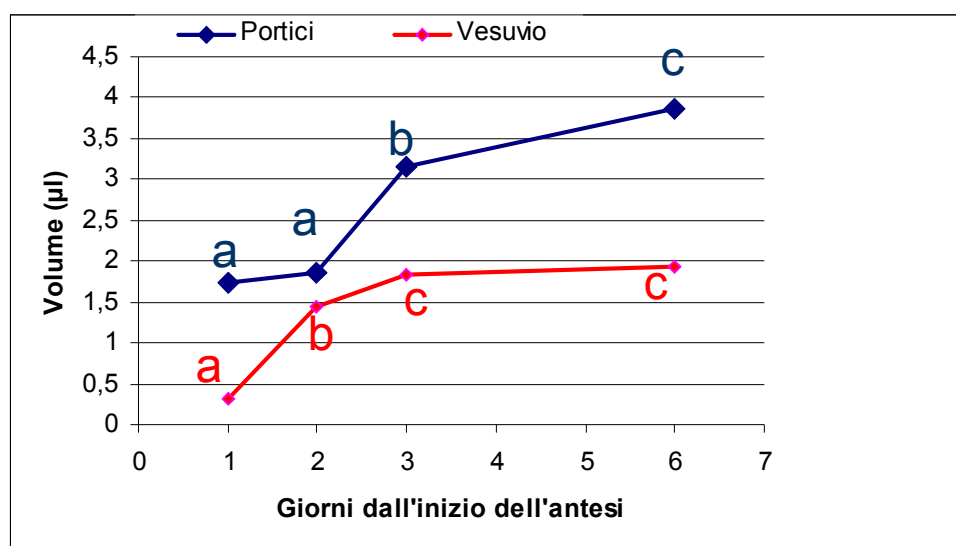


Fig. 6.3. Volume medio di nettare secreto dai singoli fiori di *Robinia pseudoacacia* in funzione degli stadi fiorali nei due siti. A lettere diverse corrispondono valori statisticamente differenti ( $p < 0,05$ ).

L'andamento della concentrazione zuccherina espressa in % (mg zucchero/ 100 mg di soluzione) del nettare prelevato dai fiori di Robinia nei due Siti è riportato in Fig. 6.4.

La concentrazione del nettare tende ad aumentare con l'avanzamento degli stadi fiorali anche se è molto suscettibile agli eventi climatici: elevati valori di umidità relativa ed eventi di pioggia diminuiscono tale valore determinando una diluizione del nettare

stesso, mentre elevate temperature, bassi valori umidità relativa e vento molto forte tendono a favorire l'evaporazione aumentandone la concentrazione.

La concentrazione del nettare secreto dalle piante site sul Vesuvio tende ad aumentare progressivamente con l'avanzamento degli stadi fiorali fino a raggiungere un valore del 60% nel fiore al 6° e ultimo giorno di antesi.

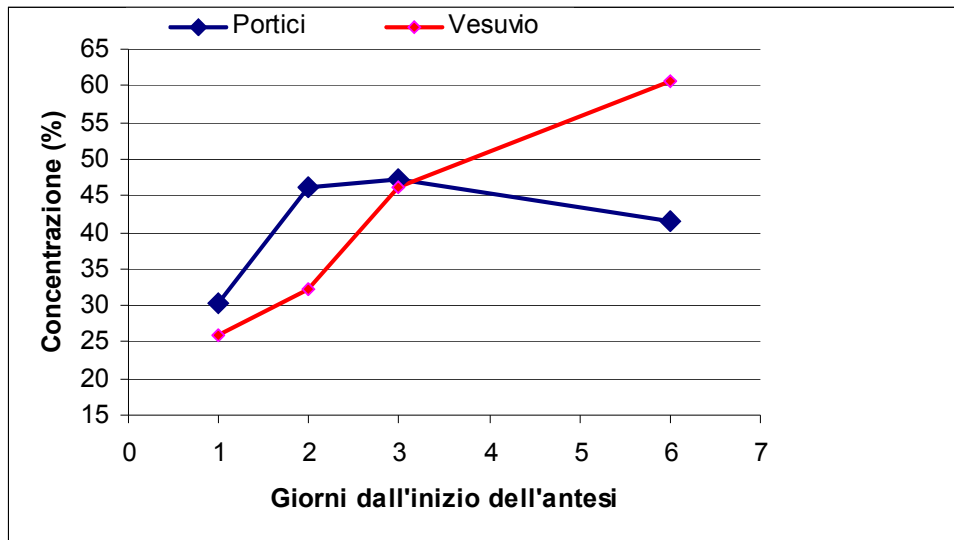


Fig. 6.4. Concentrazione media del nettare secreto dai singoli fiori di *Robinia pseudoacacia* in funzione degli stadi fiorali nei due siti. A lettere diverse corrispondono valori statisticamente differenti ( $p < 0,05$ ).

Per poter prescindere dagli eventi climatici e meteorologici (temperatura, umidità relativa, vento, pioggia, ecc.), è necessario considerare la quantità totale di zuccheri prodotti (mg) nei singoli fiori nel corso dei diversi stadi fiorali, valore che fornisce il reale investimento della pianta nella produzione di nettare.

È stata quindi calcolata la secrezione degli zuccheri totali nei diversi stadi fiorali di robinia nei due siti.

Come emerge chiaramente dal grafico in Fig. 6.5, gli zuccheri totali del nettare aumentano progressivamente con il progredire degli stadi fiorali, indipendentemente dalle oscillazioni dei valori di concentrazione riportati nelle figure precedenti.

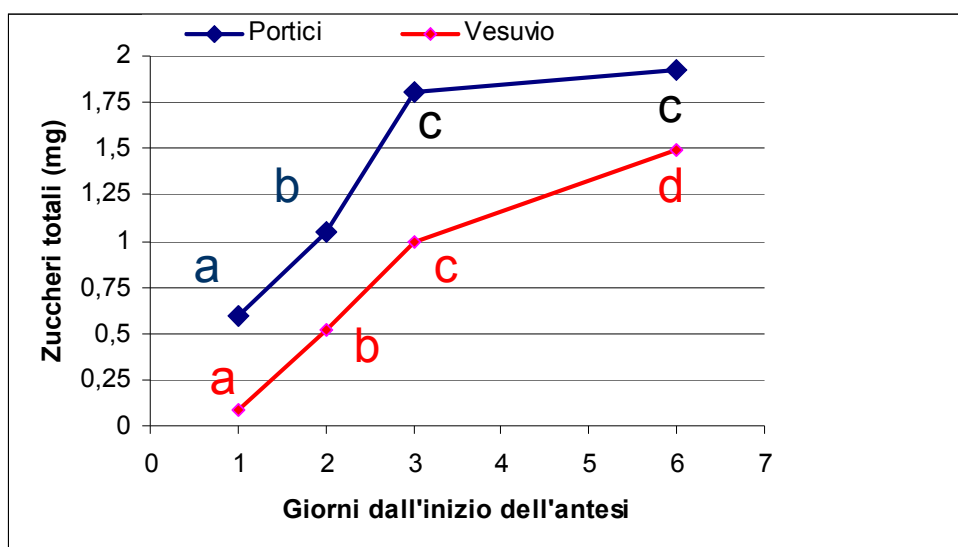


Fig. 6.5. Quantità media di zuccheri totali del nettare secreto dai singoli fiori di *Robinia pseudoacacia* in funzione degli stadi fiorali nei due siti. A lettere diverse corrispondono valori statisticamente differenti ( $p < 0,05$ ).

### Composizione del nettare

L'analisi chimica mediante HPLC ha permesso di caratterizzare anche qualitativamente il nettare di *Robinia pseudoacacia* L.

Il saccarosio è presente in 8,82 mg/ml, il glucosio in 210 mg/ml e il fruttosio in 265 mg/ml (Fig. 6.6).

Il nettare di *Robinia pseudoacacia* L. risulta "glucosio-fruttosio dominante", come si evince dal rapporto  $S/G+F=0,02$ .

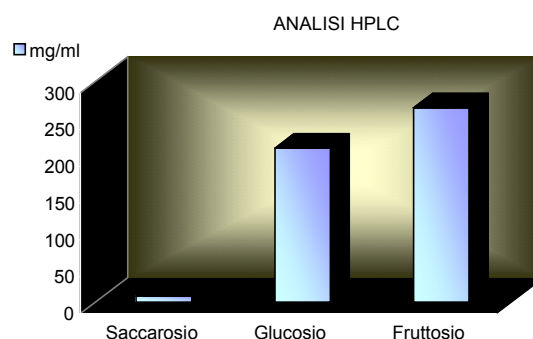


Fig. 6.6. Quantità (mg/ml) dei principali zuccheri presenti nel nettare di *Robinia pseudoacacia* L.

## 6. 4. DISCUSSIONE

### Nettare e miele

Il miele è stato definito “la sostanza zuccherina prodotta dalle api a partire dal nettare, dalla melata e da altre materie zuccherine che esse raccolgono su vegetali viventi, arricchiscono di sostanze provenienti dal loro corpo, trasformano, depongono nei favi e fanno maturare”.

Come indica tale definizione, le materie prime da cui il miele trae origine sono essenzialmente nettare e melata. La quantità di miele che le api possono ricavare da una fioritura dipende, oltre che dall'estensione della fioritura stessa, dalla quantità di nettare prodotto e dalla sua concentrazione zuccherina, entrambi fattori suscettibili di enormi variazioni da una specie all'altra: la quantità può andare infatti da meno di 0,1 mg (singolo fiorellino di Trifoglio) a oltre 1 g (*Liriodendron* L.) e la concentrazione zuccherina dal 2% a oltre il 60%. Le api prediligono le specie che offrono maggiori quantità di nettare, ma richiedono altresì che la concentrazione sia relativamente elevata, almeno superiore al 15%. Importante è anche l'accessibilità dei nettarii: alcune specie, infatti, pur essendo nettariifere, hanno una conformazione florale che non rende agevole il bottinaggio; se ad esempio un fiore tubuloso è molto lungo la ligula dell'ape non può raggiungere il fondo del calice dove il nettare è raccolto, mentre ciò è possibile, ad esempio, per quella di molte specie di bombi e di Anthophoridae (Ricciardelli D'Albore & Intoppa, 2000).

Come per il polline, anche per il nettare l'entità della raccolta per arnia è in linea di massima proporzionale alla robustezza e alla consistenza numerica della colonia e segue nel corso dell'anno un andamento che è correlato con la situazione climatica e floristica. Anzi in questo caso il fattore “clima” è di importanza ancora più rilevante in quanto influisce direttamente sulla secrezione nettariifera: se i valori di umidità relativa si innalzano oltre un certo limite, la produzione di nettare è elevata, ma esso è anche più diluito e per ottenere la stessa quantità di miele le api devono svolgere un lavoro maggiore.

Il raggio d'azione della bottinatrice di nettare è molto più ampio di quello della bottinatrice di polline: normalmente, infatti, può estendersi fino a 3 km e in condizioni particolari questo valore può essere largamente superato. Il raggio di volo degli altri apoidei, esclusi i bombi che possono volare per distanze di rilevanti, è in genere

limitato, circoscritto a poca distanza dal nido, da poche decine di metri a 200-300 m.. Il liquido succhiato attraverso la proboscide, dopo essere passato nella faringe e nell'esofago, giunge alla "borsa melaria", dove si raccoglie, rimanendovi finché l'ape bottinatrice, completato il carico, non fa ritorno in arnia.

La borsa melaria è una dilatazione sacciforme dell'esofago, ha una capacità di circa 50-60  $\mu$ l ed è separata dal resto del canale alimentare da una particolare valvola a forma di imbuto che si protende al suo interno; questa valvola, che prende il nome di "proventricolo", è formata da quattro lobi che si chiudono a croce e ha la duplice funzione di trattenere il liquido accumulato nella borsa. Inoltre essa ha il compito di filtrare il nettare destinato ad essere immagazzinato allontanandone gli eventuali agenti inquinanti (come ad esempio spore di *nosema* e di peste), e riducendo anche notevolmente la quantità di granuli pollinici originariamente presenti nel nettare. Poiché tutta l'operazione si svolge nel corso del volo di rientro della bottinatrice, a seconda che la sorgente nettarifera sia più o meno lontana dall'arnia, sarà più o meno grande la quantità di polline eliminata dal nettare; questo spiega le differenze a volte considerevoli che possono riscontrarsi nel contenuto pollinico di mieli aventi la stessa origine botanica (Pinzauti, 2000).

### **Composizione del nettare**

La composizione del nettare secreto mostra un'ampia variabilità interspecifica legata a fattori genetici ed ecologici (Fahn, 1979; Baker e Baker, 1983a, b) mentre più limitata sembra essere la variabilità intraspecifica legata a fattori fisiologici ed ambientali (Baker e Baker, 1983b).

In base alla diversa quantità relativa degli zuccheri presenti, espressa dal rapporto S/G+F (dove S= quantità di saccarosio in g; G= quantità di glucosio in g; F= quantità di fruttosio in g), Baker e Baker (1983b) classificano il nettare in quattro classi: 1) S/G+F < 0,1 glucosio-fruttosio dominanti. 2) S/G+F tra 0,1-0,499 glucosio-fruttosio abbondanti. 3) S/G+F tra 0,5-0,99 saccarosio-abbondante. 4) S/G+F > 0,999 saccarosio-dominante. Secondo tale classificazione il nettare di *Robinia pseudoacacia* L. appartiene alla classe glucosio-fruttosio dominante poiché il rapporto S/G+F è 0,02.

Il valore di tale rapporto è messo in relazione con le differenti tipologie di impollinatori. In particolare, nettari esoso-dominanti sembrano essere quelli preferiti da "short tongued bees" (lunghezza della ligula < 6 mm), quali imenotteri del genere *Bombus* ed *Apis*.

Confrontando i valori concernenti il volume di nettare secreto si evince che il trend di

secrezione è il medesimo per entrambi i siti anche se le piante sul Vesuvio producono mediamente quantità di nettare inferiori. Ciò potrebbe essere imputabile al periodo di fioritura molto posticipato (prima metà giugno vs. seconda metà aprile) e alla conseguente influenza del fattore temperatura sull'evaporazione del nettare.

La concentrazione del nettare secreto sul Vesuvio tende ad aumentare progressivamente con l'avanzamento degli stadi fiorali fino a raggiungere un valore del 60% nel fiore al 6° e ultimo giorno di antesi. Questo valore, confrontato con quello trovato per la robinia all'inizio della fioritura (massimo 47%), giustifica l'ipotesi dell'influenza della temperatura sul nettare secreto da piante che fioriscono molto più tardi (prima metà giugno vs. seconda metà aprile).

La quantità totale di zuccheri aumenta progressivamente fino a raggiungere il massimo al 6° giorno di antesi in entrambi i siti.

Da un'analisi complessiva dei dati ottenuti si può affermare che le modalità e le quantità di produzione di nettare delle piante di robinia sono state piuttosto simili sia all'inizio che alla fine della fioritura, indipendentemente dall'altitudine.

I dati sui flussi di produzione di nettari durante la stagione apistica sono importanti per valutare le produzioni potenziali dei diversi tipi di miele di un territorio e fornire le basi per definire il carico ottimale di alveari per unità di superficie e razionalizzare la transumanza nelle aree oggetto di studio. (Ricciardelli D'Arbore & Intoppa, 1979).

Uno degli scopi di questo studio è iniziare la raccolta di informazioni di biologia florale e flussi nettariiferi su alcune delle principali specie di interesse apistico.

La produzione di miele di robinia in Italia non riesce a soddisfare la domanda di mercato e deve competere con le importazioni dai Paesi dell'Est Europeo o dalla Cina. I risultati di questi studi di botanica applicata, assieme alla stima del numero di fiori per ettaro, consentono di stabilire il potenziale mellifero di un dato territorio. Queste informazioni, sintetizzate in Carte tematiche, sono necessarie per lo sviluppo dell'apicoltura, un'attività produttiva che, se ben pianificata, permette la valorizzazione delle aree marginali attraverso l'uso sostenibile delle risorse ambientali.



## BIBLIOGRAFIA CAPITOLO 6

- Baker, H. G., Baker, I. (1983a). A brief historical review of the chemistry of floral nectar. In: Bentley, B., Elias, T. (eds.) *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York. pp. 126-152.
- Baker H. G., Baker, I. (1983b). Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. In: Jones, C. E., Little, R. J. (eds.) *Handbook of Experimental Pollination Biology*. Scientific and Academic Edition, Van Nostrand Reinhold, New York. pp. 117-141.
- Cruden R. W., Hermann, S. M., Peterson, S., (1983). *Pattern of nectar production and plant-pollinator coevolution*. In: *The biology of nectaries*. Barbara Bentley and Thomas Elias, editors Columbia University Press, New York, 80-125.
- Dafni, A., (1992). *Pollination Ecology. A Practical Approach*. Oxford University Press Inc. New York.
- Davis A. R., Gunning, B. E. S. (1992). *The modified stomata of the floral nectary of Vicia faba L. Development, anatomy and ultrastructure*. *Protoplasma* 166: 134-152.
- Dietz, F. (1966). *Über den Einfluss der Umweltfaktoren auf den Tagesgang der Nektarsekretion*. Diss. Bonn.
- Fahn, A., (1979). *Secretory tissues in plants*. London: Academic Press.
- Mazzone, P., Persano Oddo, L. (a cura di), (2003). *Apicoltura e mieli della Campania*. Regione Campania, Assessorato all'Agricoltura.
- Pinzauti, M., (1986). *The influence of the wind on nectar secretion from the melon and on the flight of bees: the use of an artificial wind-break*. *Apidologie* 17 (1):63-72.
- Pinzauti, M., (2000). *Api e impollinazione*. Regione Toscana. Firenze.
- Ricciardelli D'Albore, G. Intoppa, F. (2000). *Fiori e api. La flora visitata dalle api e dagli altri Apoidei in Europa*. Calderini, Edagricole, Bologna.
- Ricciardelli D'Albore, G. Intoppa, F., (1979). *Sul potenziale mellifero di alcune piante spontanee e coltivate*. *Annali Istituti Sperimentale Zoologia. Agraria*. VI: 103-109.
- Tolba, M. K. (1992). *Saving our Planet*. London: Chapman and Hall.
- Waller, G. D., (1972). *Evaluating responses of honey bees to sugar solutions using an artificial flower feeder*. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 65: 857-862.
- Ziegler, H., (1968). *La sécrétion du nectar*. In Chauvin R. *Traité de Biologie de L'Abeille* Masson et cie. Paris III: 218-248.

## CAPITOLO 7 Citrus SPP.

### 7.1. INTRODUZIONE

#### **Miglioramento delle produzioni di agrumi, di miele di agrumi e tutela della biodiversità**

Questo studio si inserisce nella tematica relativa alla valorizzazione delle produzioni locali ed è indirizzato principalmente a fornire utili indicazioni relative al potenziale mellifero delle specie studiate, per ottimizzare la produzione di miele come prodotto tipico di una determinata zona. Avendo a disposizione dati relativi alle quantità di nettare prodotto, gli apicoltori saranno in grado di gestire al meglio le colonie e massimizzare la produzione di miele.

Va comunque sottolineato, anche se qui non si approfondisce questo tipo di indagine, il ruolo delle api nel servizio di impollinazione, in funzione della tutela della biodiversità mediante l'uso di sistemi eco-compatibili. È stato infatti dimostrato che l'uso delle api come agenti di impollinazione determina l'aumento dei raccolti e il miglioramento della loro qualità.

Alcune varietà di Citrus sono auto-compatibili anche se è sperimentalmente dimostrato che l'impollinazione incrociata aumenta il numero e la qualità dei frutti (determinando un aumento del numero dei semi) (McGregor, 1976).

Un crescente numero di varietà richiede l'impollinazione incrociata, perchè è auto-incompatibile (Levin, 1970).

In questo caso le api da miele sono il mezzo più efficiente ed economico per assicurare raccolti adeguati e di buona qualità (Reuther *et al.*, 1968).

Le varietà di *Citrus lemon* sembrano trarre molti benefici dall'impollinazione, sia come quantità che come qualità dei frutti prodotti. (Sanford, 1985).

Le varietà di *Citrus sinensis* (arancio dolce), che spesso vengono indicate come specie ad "anni alterni di produzione" (Moss, 1971), in realtà producono regolarmente ogni anno se impollinate mediante api da miele.

Molte varietà di *Citrus deliciosa*, sono auto-incompatibili e richiedono quindi l'impollinazione per produrre frutti. (Krezdorn, 1970).

Si può quindi concludere che le api da miele (*Apis mellifera*) sono senza dubbio importanti nell'impollinazione del genere *Citrus*, sebbene alcune varietà traggano più benefici rispetto ad altre. Inoltre, grazie alle elevate risorse nettariifere (che in questo studio vengono analizzate), dai fiori di del genere *Citrus* è possibile ricavare il miele di agrumi.

### **Descrizione delle specie**

Le diverse specie di *Citrus* (arancio, limone, mandarino, bergamotto, cedro, pompelmo ecc.) sono alberelli sempreverdi (2-6 m), con foglie a lamina ovoidale-ellittica, fiori a corolla biancastra con sfumature rosate in alcune specie, e intensamente profumati. I fiori di *Citrus* sono monoclini.

Il frutto è rappresentato da un esperidio; nelle diverse specie se ne consuma l'endocarpo (arancio, mandarino, limone, pompelmo) o se ne utilizza l'epicarpo (buccia) per l'estrazione di essenze aromatiche (bergamotto).

Sono specie originarie dell'Asia e sono coltivate in Italia nelle regioni meridionali e insulari (0 - 600 m), dove il clima è tale da consentirne lo sviluppo (fascia dell'*Oleo-Ceratonium*).

La fioritura avviene tra aprile - ottobre (gennaio - dicembre per *C. limon*, limone).

### **Miele di agrumi: aree di produzione e caratteristiche organolettiche**

Il miele di agrumi rappresenta uno dei prodotti uniflorali più conosciuti ed apprezzati nel Mondo intero. In Italia è secondo, per diffusione nei punti vendita e nelle preferenze del consumatore, solo al miele di *Robinia pseudoacacia*.

Pur essendo la coltivazione degli agrumi diffusa in tutto il Mondo, nelle zone a clima mediterraneo e tropicale, la produzione di miele uniflorale ha luogo soprattutto dove questa cultura assume carattere intensivo e la fioritura avviene in un periodo definito (e non protratto, e quindi sovrapposto ad altre fioriture, come spesso avviene ai tropici); in particolare sono note le produzioni di Messico, California, Florida, Israele, Spagna e Italia. Nel nostro paese si ottengono mieli di agrumi principalmente in Sicilia e Calabria, ma anche Puglia, Basilicata, Campania, Sardegna e Lazio rientrano nelle regioni produttrici.

In Italia non vengono generalmente importati mieli di agrumi di altra provenienza, ma nel mondo sono note le produzioni di Spagna, Israele, California e Messico. (Mazzone & Persano Oddo, 2003).

Le caratteristiche organolettiche del prodotto sono le seguenti: colore molto chiaro, da quasi incolore a giallo paglierino quando liquido e da bianco a beige chiaro nel cristallizzato, odore intenso, simile a quello dei fiori dai quali proviene, sapore normalmente dolce con leggera acidità, aroma molto intenso, floreale, simile all'odore, ma di tipo più fresco, con tendenza al fruttato. La tendenza a cristallizzare è di livello medio.

Si tratta di uno dei mieli uniflorali più apprezzati per l'intensità e la finezza dell'aroma. Alcune delle varietà di agrumi comunemente coltivate hanno fiori che producono pochissimo polline (o non ne producono affatto): il miele che ne proviene, quindi, contiene un numero di granuli pollinici estremamente ridotto. Il tradizionale sistema di identificazione dell'origine botanica attraverso l'analisi pollinica è quindi poco efficace, per questi prodotti. Le particolarità compositive e organolettiche permettono però di confermare o smentire l'origine dichiarata nella maggior parte dei casi. La necessità di disporre di sistemi di controllo facilmente interpretabili ha indotto a cercare elementi del miele di agrumi che potessero servire da marcatori dell'origine. Sono perciò oggi conosciute alcune sostanze che sono presenti in maniera esclusiva (o quasi) nel miele di agrumi; tra questi un componente dell'aroma (metilantranilato), un flavonoide (esperetina), la caffeina. A livello dei parametri fisico-chimici tradizionali il miele di agrumi è caratterizzato da valori molto bassi di indice diastatico, acidità, conducibilità elettrica e colore. In Italia il miele di agrumi più comunemente prodotto è quello di arancio o di agrumi misti: più rari i mieli di un'unica varietà diversa dall'arancio (limone, mandarino, bergamotto, cedro); in Israele sono noti mieli di pompelmo, in Corsica, i mieli di clementino. I mieli di agrumi formano una famiglia di prodotti piuttosto simili tra di loro e le differenze che si riscontrano tra mieli di diversa origine sono imputabili alla flora di accompagnamento o alle tecniche di produzioni usate che non alla varietà di agrume bottinata. Poiché il miele di agrumi è caratterizzato da un indice diastatico molto basso, di frequente inferiore a 8, il limite legale di idrossimetilfurfurale (HMF), applicato in base alla L. 753/82, è di 15 mg/kg come massimo: questo significa che il tempo di commercializzazione per questo prodotto è molto inferiore rispetto ad altri mieli (per i quali si applica il limite di HMF di 40 mg/kg.) (Tavola rotonda igp del miele di agrumi d'Italia, n.3 del 2003).

### **Scopo della ricerca**

L'obiettivo di queste ricerche è quello di fornire informazioni utili alla distribuzione degli alveari negli agrumeti e alla loro gestione, al fine di ottimizzare sia il servizio di impollinazione offerto dalle api (per la produzione di adeguati raccolti) sia la produzione di miele come prodotto tipico locale di una determinata zona..

A tal fine sono stati perseguite due strade. Gli studi di biologia florale degli agrumi sono stati finalizzati al raggiungimento di due obiettivi principali:

- 1) confrontare morfologia florale, durata della fioritura e produzione di nettare (“potenziale mellifero”) tra le 3 specie principali di agrumi: arancio, mandarino e limone;
- 2) confrontare la morfologia florale e le produzioni di nettare di due *cultivar* di limone DOP della costiera amalfitana e della costiera sorrentina.

## 7. 2. MATERIALI E METODI

### Confronto tra specie

Sono state scelte piante appartenenti alle tre diverse specie di agrumi (arancio, limone e mandarino) presenti presso il Parco Gussone (Portici, Napoli) in modo da evitare differenze dovute a caratteristiche microclimatiche.

### Biologia florale

Durante la fioritura, nei singoli fiori di ognuna delle tre specie, sono stati individuati i seguenti stadi fenologici:

- Stadio 0 fiore chiuso
- Stadio 1 pre-antesi
- Stadio 2 1° giorno di antesi
- Stadio 3 2° giorno di antesi

Per poter individuare tali stadi i singoli fiori sono stati marcati sui petali con pennarelli indelebili a partire dal primo giorno di antesi fino al raggiungimento della senescenza del fiore (2° giorno di antesi) caratterizzata dalla caduta dei petali e da una colorazione delle antere tendente al bianco.

### Flusso nettario

Per confrontare le produzioni di nettare delle tre specie ed evitare la difficile valutazione delle differenze determinate dai parametri ambientali e culturali, le misure sono state effettuate campionando fiori provenienti da piante coltivate nello stesso sito (Parco Gussone, Portici, Napoli). Più precisamente, per valutare la quantità di nettare prodotta da ogni singolo fiore in funzione dello stadio fenologico e l'andamento nel tasso di secrezione del nettare stesso, sono state scelte 8 piante di arancio, 5 di mandarino e 5 di limone coltivate tutte nello stesso sito.

Per ogni pianta sono stati posti 10 cappucci di *voile* per poter valutare la reale produzione di nettare impedendo l'accesso agli impollinatori.

Questi cappucci sono stati scelti perchè dotati di maglie di 2-3 mm che, sebbene impedissero l'accesso agli insetti, non creavano problemi al fiore facendo passare liberamente luce ed aria. Il rischio poteva essere quello di creare condizioni

microclimatiche diverse nel microsito attorno al fiore.

Con ciascun cappuccio sono stati coperti 2-3 fiori ancora chiusi.

Sono stati marcati i fiori al primo giorno di antesi, di questi una parte è stata presa per analizzare volume, concentrazione e quantità totale di zuccheri nel nettare e una parte è stata lasciata per avere dati relativi agli stadi successivi. Ogni giorno sono stati prelevati fiori a stadi diversi avendo cura di marcare quelli che rimanevano sulla pianta per i giorni successivi.

In questo modo è stato possibile individuare la durata dei fiori, lo stadio di massima produzione di nettare, l'andamento generale del tasso di secrezione e i valori medi di volume, concentrazione e quantità totale di zuccheri di un elevato numero di fiori.

E' stato possibile valutare la variabilità tra fiori della stessa pianta, tra fiori di piante diverse ma appartenenti alla stessa popolazione.

Le analisi quantitative sul nettare sono state effettuate in laboratorio.

I fiori opportunamente marcati e prelevati dalle piante sono stati trasferiti in laboratorio e subito analizzati.

I metodi utilizzati per il prelievo del nettare, la misura del volume, l'analisi della concentrazione ed il calcolo degli zuccheri totali per fiore sono quelli suggeriti da Dafni (1992).

Per il prelievo del nettare sono stati utilizzati microcapillari monouso INTRA MARK (Blau Brand) dalla capacità di 1-5 microlitri.

Grazie all'uso dei microcapillari e della carta millimetrata è stato possibile risalire al volume di nettare di ogni singolo fiore.

Subito dopo aver ottenuto questo dato, il nettare così prelevato è stato analizzato mediante il rifrattometro di ABBE da banco per poterne determinare l'esatta concentrazione.

Una volta ottenuti entrambi i valori di volume e concentrazione è stato possibile valutare la quantità totale di zuccheri prodotta da ogni singolo fiore, il dato più interessante perchè prescinde da alcune variabili ambientali quali temperatura ed umidità relativa che possono influire sul volume e concentrazione ma non alterano la quantità totale di zuccheri secreti.

Per ottenere questo dato è stata applicata la seguente formula:

$$\text{Zuccheri totali (mg)} = \text{Concentrazione (\%)} / 100 * \text{Volume (\mu l)} * \text{Densità}$$

Il valore della densità si ricava da specifiche tabelle sulla base dei valori di concentrazione (Dafni, 1992).

Complessivamente è stato analizzato il nettare di 77 fiori di arancio a vari stadi di sviluppo florale, quello di 60 fiori di mandarino e di 140 fiori di limone.

### **Confronto tra *cultivar* di limone**

Per il limone sono state condotte osservazioni di campo ed analisi di laboratorio mirati ad evidenziare eventuali differenze quantitative e qualitative tra la varietà “*Ovale*” di Sorrento e “*Sfusato*” Amalfitano. A tal fine sono stati selezionate due stazioni sperimentali una a Massa Lubrense per la varietà “*Ovale*” di Sorrento ed una a Maiori per la varietà “*Sfusato*” Amalfitano.

### **Composizione del nettare delle 2 varietà di limone**

Il nettare di 5 fiori allo stadio adulto per ciascuna delle 2 varietà è stato prelevato mediante i microcapillari e conservato a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  per eseguire in seguito la determinazione degli zuccheri in esso contenuti. Al momento delle analisi il nettare è stato diluito 1:100 in acqua distillata e la determinazione è stata condotta mediante HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Come fase mobile è stata utilizzata una miscela acetonitrile:acqua 3:1 (v:v). La colonna era costituita da una fase aminopropilsilanica termostata a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ : i picchi sono stati rivelati tramite un Detector ad indice di rifrazione (Waters 2410). Sono stati iniettati 20  $\mu\text{l}$  di campione e soluzione standard. Il flusso della fase mobile è stato regolato a 1 ml/min. Per ogni campione sono state fatte 3 serie di analisi per verificarne la ripetitività.



### 7. 3. RISULTATI

#### Confronto tra specie

##### Biologia florale

Ogni fiore di agrume si compone di un calice, di una corolla, di un verticillo di stami e di un pistillo, in cui l'ovario è inserito su un disco nettario (Fig. 7.1).



Fig. 7.1. Fiore di *Citrus limon*.

I fiori sono grandi nell'arancio amaro, di dimensioni medie nell'arancio dolce e nel limone, piccoli nel mandarino, nonostante la notevole variabilità di dimensioni non solo tra una varietà e l'altra, ma considerando piante diverse e annate diverse.

Nell'ambito dell'arancio, pur essendo profumati in entrambe le specie (*Citrus aurantium L.* e *Citrus sinensis L.*), i fiori di quello amaro emanano un profumo più intenso. Sono solitari o riuniti in fascetti o in piccoli grappoli ascellari, hanno perianzio di cinque sepali con lobi calicini arrotondati. Il numero degli stami è pari a quattro volte il numero dei petali. L'ovario è supero, costituito da nove-quindici carpelli.

I fiori di limone (*Citrus limon L.*) sono isolati, talvolta accoppiati in mazzetti, piuttosto grandi, localizzati all'ascella delle foglie, di colore bianco sfumato di rosso porpora.

Le cultivar di limone analizzate sono rifioventi; in altre parole hanno una fioritura lunga quasi tutto l'anno seppure con un picco in giugno. Di conseguenza contemporaneamente sulla stessa pianta ci sono fiori e frutti in diversi stadi di maturazione.

Le antere normali sono di colore giallo brillante, quando i granelli di polline sono maturi. Le antere nelle quali lo sviluppo del polline è alterato, hanno colore giallo pallido e se non si formano granelli di polline, le antere sono di colore crema pallido o bianco ed in questo caso, in genere, sono indeiscenti.

La deiscenza delle antere anormali avviene in ogni metà di essa attraverso una fenditura longitudinale, che si verifica nella zona di unione dei due lobi di ogni metà di antera.

### Flusso nettario

Dall'analisi dei dati emerge che il singolo fiore di mandarino produce mediamente 3,77  $\mu$ l di nettare contro gli 11,28  $\mu$ l del limone e i 23,30  $\mu$ l dell'arancio (Fig 7.2).

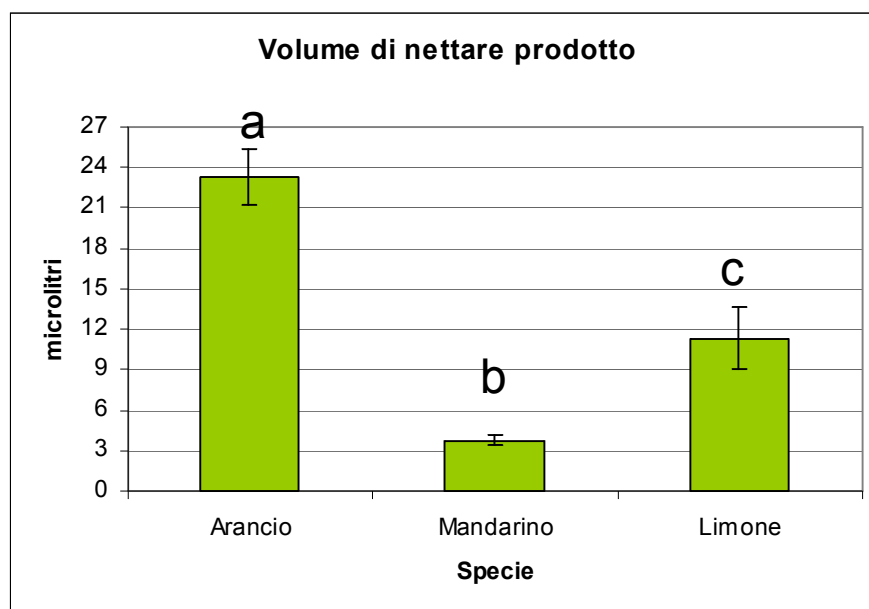


Fig. 7.2. Volumi medi di nettare secrete dalle 3 specie di agrumi studiate. Le barre indicano l'errore standard. A lettere diverse corrispondono valori statisticamente differenti ( $p < 0,05$ ).

Nonostante la maggiore quantità di nettare ritrovata nei fiori di arancio la concentrazione media del nettare analizzato è risultata essere 18,59%, notevolmente inferiore rispetto a quella del mandarino (35,89%) e del limone (28,23%) (Fig.7.3).

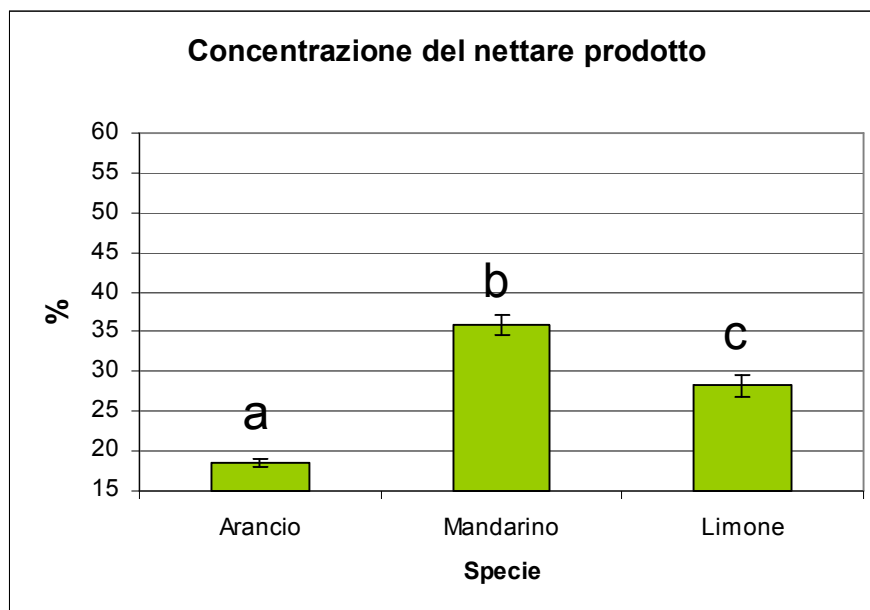


Fig. 7.3. Concentrazioni di zucchero medie del nettare secreto dalle 3 specie di agrumi studiate. Le barre indicano l'errore standard. A lettere diverse corrispondono valori statisticamente differenti ( $p < 0,05$ ).

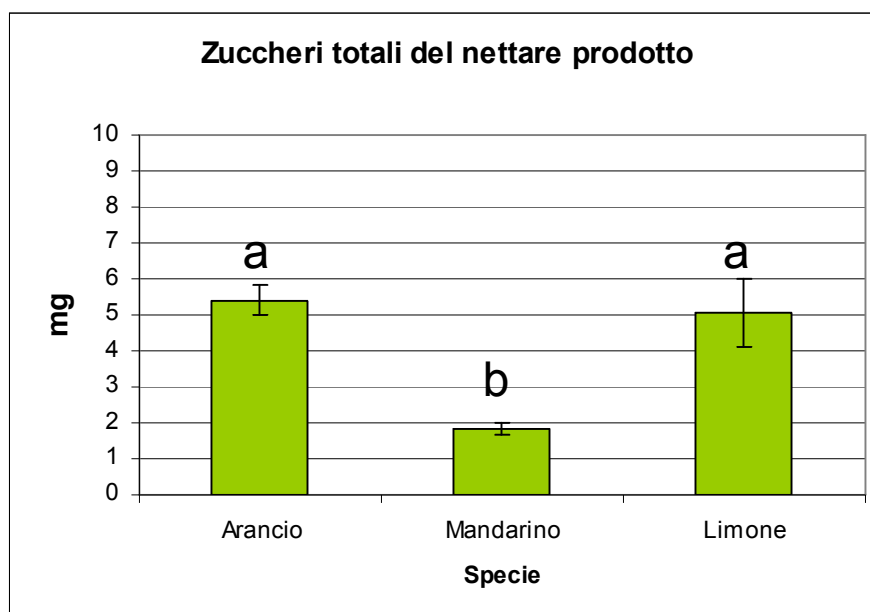


Fig. 7.4. Zuccheri totali medi secreti dalle 3 specie di agrumi studiate. Le barre indicano l'errore standard. A lettere diverse corrispondono valori statisticamente differenti ( $p < 0,05$ ).

Se si considera la quantità di zuccheri totali per fiore, limone ed arancio ne producono quantità simili mentre il mandarino una quantità significativamente minore (Fig. 7.4).

### Confronto tra *cultivar* di limone

In entrambe le *cv* sono state identificate 4 tipologie di fiori differenti, come riportato in fig. 7.5.



Fig. 7.5. Fiori di *Citrus limon*: a) Fiori normali; b) Fiori staminiferi (solo con antere); c) Fiori con antere bianche; d) Fiori rotondi e viola.

I fiori normali producono sia polline sia nettare; quelli staminiferi non presentando il pistillo mancano di nettario; quelli con antere bianche presentano nettare ma non polline perchè risultano maschio-sterili; quelli rotondi e viola sono fiori con una iperproduzione di stami ma che rimangono sempre racchiusi nei petali.

Nella fig. 7.6 si riporta la distribuzione percentuale delle diverse tipologie di fiore nelle due *cv* di limone analizzate.

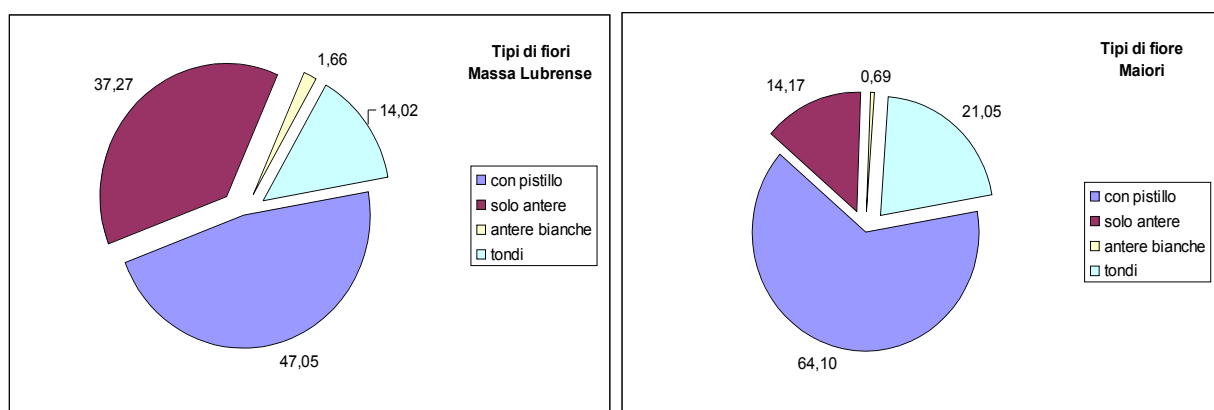


Fig. 7.6. Percentuale delle diverse tipologie fiorali individuate nei limoneti di Massa Lubrense e Maiori.

Per quanto riguarda le differenze quantitative tra la varietà “Ovale” di Sorrento e “Sfusato” Amalfitano, i risultati ottenuti mostrano che non esiste una differenza

statisticamente significativa per quanto riguarda la quantità di nettare prodotta (8,53 vs.7,74  $\mu$ l), come riportato in fig. 7.7.

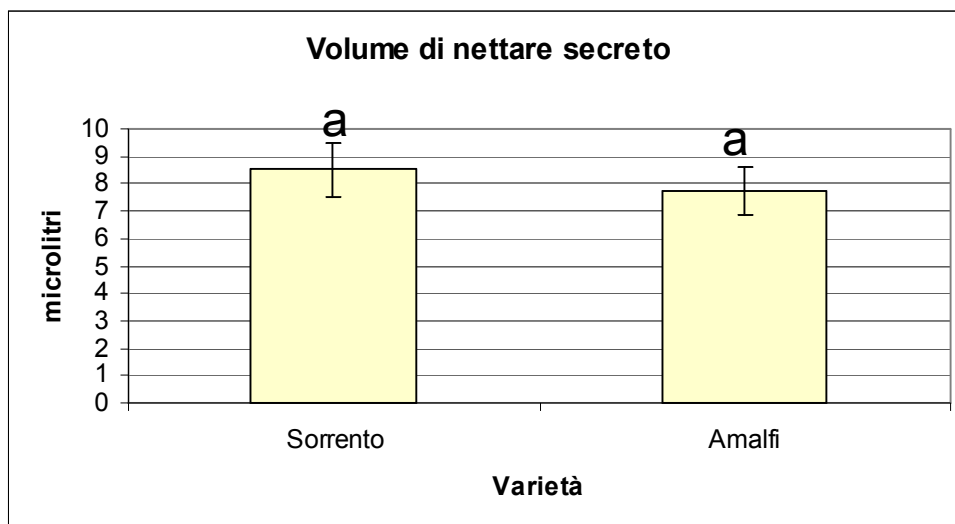


Fig. 7.7. Quantità di nettare secreto dalle 2 varietà di limone studiate. A lettere diverse corrispondono valori statisticamente differenti ( $p < 0,05$ ).

Per quanto riguarda le differenze qualitative tra la varietà “*Ovale*” di Sorrento e “*Sfusato*” Amalfitano, i risultati ottenuti mostrano che esiste una differenza statisticamente significativa per quanto riguarda la concentrazione del nettare prodotto. Il nettare della varietà “*Sfusato*” Amalfitano mostra una concentrazione maggiore rispetto alla varietà “*Ovale*” di Sorrento (30% vs. 25%), come riportato in fig. 7.8.

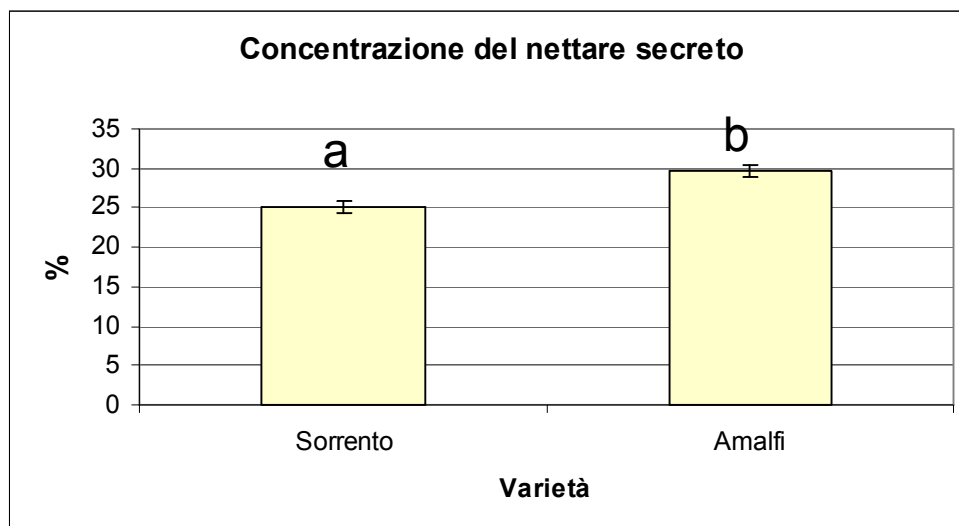


Fig. 7.8. Concentrazione del nettare secreto dalle 2 varietà di limone studiate. A lettere diverse corrispondono valori statisticamente differenti ( $p < 0,05$ ).

Valutando infine le differenze nella produzione di zuccheri totali delle due differenti varietà, emerge che non esistono differenze statisticamente significative tra la varietà "Ovale" di Sorrento e "Sfusato" Amalfitano (2,68 vs. 2,90 mg).

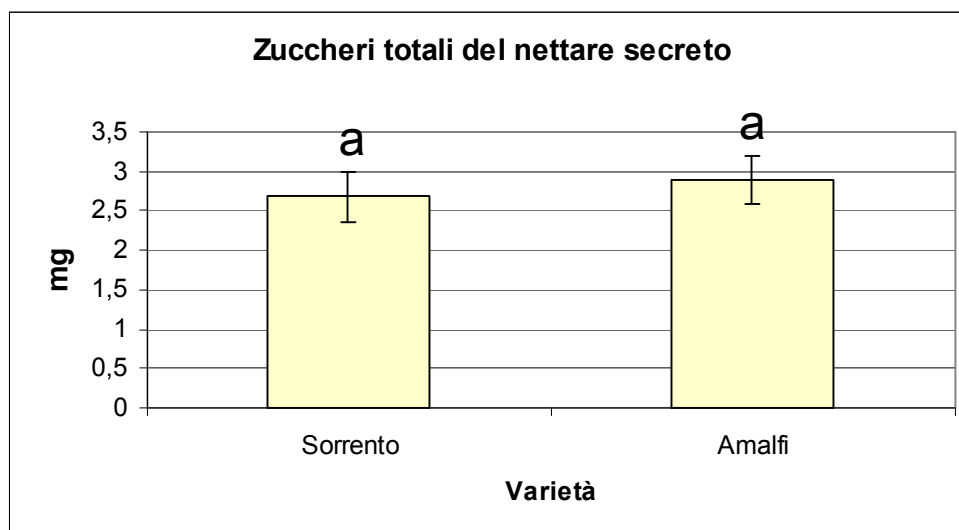


Fig. 7.9. Quantità totale di zuccheri secreti dalle 2 varietà di limone studiate. A lettere diverse corrispondono valori statisticamente differenti ( $p < 0,05$ ).

### Composizione del nettare delle 2 varietà di limone

I risultati delle analisi HPLC effettuate sul nettare delle 2 varietà di limone, sono riportati nella tab. 7.1. Per entrambe le varietà studiate, la quantità di saccarosio è molto più bassa di quella degli zuccheri monosaccaridi. Tra glucosio e fruttosio in entrambi i casi le differenze sono minime e la quantità di fruttosio è leggermente superiore.

Tab. 7.1. Quantità di saccarosio, glucosio, fruttosio e stachiosio (espresse in mg/ml) presenti nel nettare delle due varietà.

	Saccarosio	Glucosio	Fruttosio	Stachiosio
Limone var. Amalfi	16,8	134	152	9,55
Limone var. Sorrento	18,5	142	155	11,7

#### 7. 4. DISCUSSIONE

L'importanza di poter valutare il "potenziale mellifero" di una specie risiede essenzialmente in due aspetti:

- 1) la possibilità, da parte dell'apicoltore, di individuare, in una data zona, le specie con potenziale mellifero più alto e quindi di dislocare gli alveari in consorzi floristici di maggiore produttività;
- 2) la possibilità di inserire nelle normali pratiche agronomiche e forestali, oltre alle specie comunemente impiegate, anche altre di sicuro interesse apistico.

Il "potenziale mellifero" dei fiori di *Citrus* è molto buono.

Per le tre specie il massimo tasso di secrezione si raggiunge al momento dell'antesi. I singoli fiori delle 3 specie producono volumi di nettare significativamente differenti.

Nonostante i valori medi di volume e concentrazione siano significativamente diversi, avendo tra loro andamenti opposti, quando si confrontano le quantità di zuccheri totali delle 3 specie di agrumi, emerge che non esistono differenze significative tra arancio e limone; solo il mandarino produce una quantità media di zuccheri per fiore significativamente inferiore rispetto alle precedenti 2 specie.

In termini di quantità di miele, la minore produttività, dei limoneti rispetto agli aranceti, generalmente lamentata dagli apicoltori, è quindi da imputare al minore numero di fiori per pianta sviluppati dai limoni rispetto agli aranci ed anche alla maggiore viscosità del nettare dei primi che, quando va oltre certi limiti, richiede un maggiore sforzo di suzione da parte di *Apis mellifera* durante il prelievo.

Relativamente alla quantità e qualità del nettare prodotto, i risultati ottenuti hanno messo in evidenza che non esistono differenze statisticamente significative tra il volume di nettare secreto dalle 2 varietà di limone. Anche se la concentrazione è risultata significativamente inferiore nella varietà di Sorrento rispetto a quella di Amalfi, la quantità totale di zuccheri nel nettare secreto dalle 2 varietà di limone non presenta differenze statisticamente significative.

Le indicazioni fornite devono però essere verificate per più anni consecutivi, supportate dall'esperienza di apicoltori e allevatori di agrumi e si deve prendere in considerazione anche l'influenza che i fattori ambientali esercitano sulla produzione di nettare.

Nella prima parte del secolo scorso, fino alla fine degli anni '60, vari studi sono stati condotti sulla biologia florale delle specie di interesse apistico specialmente in Europa



centro-orientale. Dalle osservazioni che questi ricercatori hanno riportato in letteratura si evince che la quantità di nettare secreto:

- è minima quando il rapporto tra temperatura dell'aria e temperatura del terreno è uguale a 1; aumenta se questo rapporto è inferiore a 1 ed è massima quando esso è maggiore di 1 (Dietz, 1966);
- è in funzione diretta della luce (Schuel, 1963; Dietz, 1966);
- dipende dalla composizione del terreno (Bogojavlenskij, Rozov, Tereschenko, 1936);
- è maggiore, per una medesima specie, quanto maggiore è l'altitudine (Bonnier, 1878);
- dipende dalla fenologia del fiore: aumenta durante l'antesi, prolungandosi in seguito a visite di insetti e diminuisce poi progressivamente; vi sono comunque eccezioni a questo tipo di comportamento e, in alcuni casi, essa è maggiore all'inizio della fioritura di una specie (Boetius, 1948);
- dipende dalla posizione del fiore sulla pianta (Andrejev, 1927);
- è influenzata dal fenomeno del riassorbimento da parte della pianta (Ziegler 1968);

Anche la percentuale di zuccheri presente nel nettare secreto subisce l'influenza di vari fattori:

- la quantità di zucchero secreta è inversamente proporzionale al grado di umidità dell'aria (Dietz, 1966);
- la temperatura dell'aria agisce direttamente sul grado di concentrazione degli zuccheri nel nettare (Rozov, 1963; Dietz, 1966);
- in ambiente ventilato il nettare tende a concentrarsi; questo fenomeno è legato anche alla conformazione e alla posizione dei nettarii (Dietz, 1966);
- il nettare è più concentrato alla fine della fioritura di una specie, pur diminuendo quantitativamente (Boetius, 1948).

Per quanto la maggior parte di queste osservazioni siano frutto di osservazioni descrittive e non di esperimenti controllati è evidente che i fattori che influenzano la produzione di nettare da parte delle piante sono tali e così numerosi da allargare notevolmente il campo di variabilità del fenomeno; pertanto, al fine di ottenere dati generalizzabili, è necessario che le indagini seguano ogni singola specie vegetale per almeno un triennio, sempre nello stesso luogo, confidando che le variazioni succedutesi nell'ambiente pedoclimatico nell'arco di tempo considerato ne offrano alla fine un aspetto sufficientemente mediato.

È necessario inoltre precisare che nelle ricerche condotte in pieno campo, avendo a che fare con l'inestricabile interazione di tutti i fattori suddetti (e molto probabilmente di

altri ancora), si deve forzatamente prescindere dalla singola azione di ciascuno di essi e accettare come rappresentativo il valore medio ottenuto dalla loro influenza concomitante. Si ritiene che i dati così ottenuti possano considerarsi sufficientemente validi per esprimere la produttività nettarifera media di una specie vegetale e per attribuirle un determinato potenziale mellifero.

### **Situazione attuale e prospettive economiche**

Il miele d'agrumi rappresenta una delle produzioni più significative dell'Italia meridionale (500-600 tonnellate all'anno) e anche a livello del mercato nazionale costituisce una quota importante (10% dei volumi di vendita al dettaglio). La superficie coltivata ad agrumi in Italia, pur in regressione, rappresenta comunque una superficie non trascurabile del territorio (178.000 ettari) e interessa le regioni meridionali (Campania, Basilicata, Puglia, Calabria) e insulari (Sicilia e Sardegna) e un piccolo lembo della regione Lazio (Fondi, Formia): Sicilia e Calabria assieme rappresentano l'85% della superficie. Le caratteristiche dell'agroecosistema agrumeto, con un elevato numero di specie vegetali e animali associate a questo tipo di coltura, si presta bene a coltivazione con sistemi di lotta integrata e biologica. Nel mondo i paesi che producono le maggiori quantità di agrumi sono: Brasile, Stati Uniti, Cina, Messico, Spagna, Italia e Israele. Sul mercato mondiale del miele sono presenti mieli uniflorali di agrumi provenienti soprattutto da Spagna, Israele, California e Messico. Il miele italiano di agrumi si differenzia da quello di provenienza estera, mentre, all'interno delle diverse zone di produzione nazionale, le differenze non sono tali da permettere una sicura distinzione in caso di controllo di campioni di origine ignota. Le sue caratteristiche peculiari (colore chiaro, profumo e aroma florale) lo rendono un miele molto apprezzato dal consumatore.

Una serie di motivi rendono la strada dell'IGP interessante quale mezzo di valorizzazione del miele di agrumi d'Italia:

- L'importanza che la produzione del miele di agrumi ha per l'Italia e in particolare per il Sud;
- Il valore economico complessivo di tale produzione, che può giustificare l'intraprendere un meccanismo di valorizzazione complesso;
- L'apprezzamento che il consumatore dimostra per le caratteristiche di questo prodotto;
- La tendenza, da parte del consumatore, a privilegiare sempre di più la specificità dei prodotti alimentari;

- La sostanziale differenza del miele di agrumi italiano rispetto a quelli prodotti negli altri paesi, e in particolare in Spagna;
- La sostanziale similitudine ed indistinguibilità, dal punto di vista analitico, dei mieli di agrumi delle diverse zone d'Italia.

L'uso di una denominazione territoriale così ampia non deve essere visto come un annullamento delle specificità locali o microambientali, che possono invece essere recuperate con un'opportuna regolamentazione nell'ambito del disciplinare.

L'innesco di un processo di valorizzazione complesso come la costituzione di una DOP o IGP richiede la convergenza di volontà e risorse molto diverse, per un obiettivo che può apparire lontano.

I produttori devono attivare un processo di valorizzazione del prodotto ed essere i responsabili delle scelte da operare, mentre la ricerca ha il compito di mettere in evidenza gli elementi di specificità delle produzioni da valorizzare.

I risultati di questi studi di biologia florale delle principali specie nettariifere di interesse apistico, assumono una notevole importanza applicata al settore produttivo. Essi infatti costituiscono un primo insieme di dati finalizzati a migliorare la qualità delle produzioni di miele e a stabilire il livello di produzione potenziale di miele un determinato territorio e a stabilire il carico massimo di alveari da poter tenere in un'area.

## BIBLIOGRAFIA CAPITOLO 7

- Andrejev, V. N. (1927). *Kvoprosn o priênach, opredeljajuscich medosbor (kolieestvo nektara v svjari s sveliênoj nekternikov) Iz rabot Charkovskoj oblastnoj opytnoj stancii pêelo vodstva.*
- Boetius, J. (1948). *Ueber den Verlauf der Nektarabsonderung einiger Nutzpflanzen. Z. vergl. Physiol.* 28:254.
- Bogojavlenskij, S.G., Rozov, S. A., Tereschenko, A. K. (1936). *Bdzlozapilenija jak prijom agrotechniki sonjasnika. Derzavnjie vydaviietvp kolgospnoj i ragosnoj literatury URSS Kiev. Charkov.*
- Bonnier, G. (1878). *Les nectaries. Etude critique anatomique et physiologique. Ann.d. Sci. Natur. Sér. Bot., Tome 8.*
- Dafni, A., (1992). *Pollination Ecology. A Pratical Approach.* Oxford University Press Inc. New York.
- Dietz, F. (1966). *Über den Einfluss der Umweltfaktoren auf den Tagesgang der Nektarsekretion.* Diss. Bonn.
- Krezdorn, A. H. (1970). Pollination requirements of *Citrus*. In the Indispensable Pollinators, *Ark. Agr. Ext. Serv. Misc. Pub.* 127, pp. 211-218.
- Levin, M. (1970). Whither pollination-research and practice. In the Indispensable Pollinators, *Ark. Agr. Ext. Serv. Misc. Pub.* 127, pp. 1-4.
- Mazzone, P., Persano Oddo, L. (a cura di), (2003). *Apicoltura e mieli della Campania.* Regione Campania, Assessorato all'Agricoltura.
- McGregor, S.E. (1976). *Insect Pollination of Cultivated Crop Plants. Agriculture Handbook 496, USDA-ARS, 395 pp.*
- Moss, G.I. (1971). Effect of fruit on flowering in relation to biennial bearing in sweet orange (*Citrus sinensis*). *Journ. Hort. Sci.* 46:177-184.
- Pinzauti, M., (1986). *The influence of the wind on nectar secretion from the melon and on the flight of bees: the use of an artificial wind-break.* *Apidologie* 17 (1):63-72.
- Pinzauti, M., (2000). *Api e impollinazione.* Regione Toscana. Firenze.
- Reuther, W., Batchelor, L.D., and H.J. Webber. (1968). *The Citrus Industry.* University of California Press, Berkeley and Los Angeles.
- Ricciardelli D'Albore, G. Intoppa, F. (2000). *Fiori e api. La flora visitata dalle api e dagli altri Apoidei in Europa.* Calderini, Edagricole, Bologna.

- Ricciardelli D'Albore, G. Intoppa, F., (1979). *Sul potenziale mellifero di alcune piante spontanee e coltivate*. Annali Istituti Sperimentale Zoologia. Agraria. VI: 103-109.
- Rozov, S. A. (1963). *Sur la méthode de l'étude de la productivité des nectare des plantes*. XIX Congrès d'Apimondia, Praga, pp. 652-657.
- Sanford, M.T. (1985). Symbiosis: the Florida citrus-bee industry connection. *The Citrus Industry*, May, pp. 64-65
- Schuel, R. W. (1963). *L'influence des facteurs extérieurs sur la production du nectar*. XIX Congrès d'Apimondia, Praga, pp.686-693.
- Ziegler, H., (1968). *La sécrétion du nectar*. In Chauvin R. *Traité de Biologie de L'Abeille* Masson et cie. Paris III: 218-248.