Atti Soc. Tosc. Sci. Nat., Mem., Serie B, **95** (1988)
pagg. 137-145, figg. 3

G. Braggio Morucchio (*), L. Cornara (*), E. Dellachà

GERMINAZIONE IN VITRO DEL POLLINE DI ESEMPLARI DI *PINUS PINASTER* AITON COLPITI DA *MATSOCOCCUS FEYTAUDI* DUC.

Riassunto — Il polline prelevato da esemplari di *Pinus pinaster* Aiton della Liguria occidentale colpiti dalla cocciniglia *Matsococcus feytaudi* Duc., è stato sottoposto a tests di fertilità. Le stesse prove sono state fatte su polline proveniente da esemplari non attaccati dal parassita. È risultato che il polline del pino malato, oltre a presentare una certa percentuale di granuli con anomalie morfologiche, ha una vitalità più bassa e un minor potere germinativo di quello sano.

Abstract — *In vitro germination of pollen of Pinus pinaster Aiton infected by Matsococcus feytaudi Duc.* The pollen drown out of samples of *Pinus pinaster* Aiton (West Liguria) infected by cochineal *Matsococcus feytaudi* Duc., was subjected to several tests of fertility. Also the pollen coming from samples which are not attacked by the parasite, was subjected to the same tests. It has been noticed that, in addition to showing a certain percentage of morphologically anomalous grains, the deseased maritime pine displays less vitality and less germination power than the sound one.

Key words — Pollen fertility - *Pinus pinaster* - West Liguria.

Introduzione

Molte pinete a pino marittimo della Liguria occidentale sono state distrutte o sono in via di distruzione per l'attacco di una cocciniglia (*Matsococcus feytaudi* Duc.) che, proveniente dalla Francia, si è diffusa nell'imperiese e si sta estendendo anche nelle provincie di Savona e di Genova.

Lo scopo di questa ricerca è l'osservazione della capacità germinativa del polline di *Pinus pinaster* Aiton colpito dal parassita, in confronto con quella del polline proveniente da esemplari sani.

(*) Istituto Botanico «Hanbury», Università di Genova, Corso Dogali 1/C.

I prelievi pollinici sono stati fatti in tre diverse località: a S. Romolo-Col di Rodi, in provincia di Imperia, in una zona pienamente colpita dalla malattia, ad Alpicella-Faie (Savona), in un ambiente ancora apparentemente sano e nell'Orto Botanico di Genova, sicuramente non raggiunto dalla cocciniglia.

Gli esemplari prescelti di pino marittimo dell'imperiese presentano rami con sintomi manifesti della malattia, come clorosi, arrossamento fogliare, defogliazione, e altri ancora intatti. Sono stati fatti prelievi di polline sia dai rami senza segni di sofferenza (esemplare IM/1), sia da rami malati (esemplare IM/2).

Nella stazione del savonese il polline è stato raccolto da un pino in ottime condizioni vegetative, comuni a tutti gli esemplari della zona, sottostante il parco del monte Beigua. È però da ricordare la vicinanza con la pineta di Sciarborasca-Cogoleto devastata da *Matsococcus feytaudi*: ciò potrebbe far supporre la presenza della cocciniglia, pur senza segni manifesti, anche ad Alpicella-Faie. La malattia infatti è molto difficile da diagnosticare durante i primi stadi perché non si registrano danni evidenti alle piante e il parassita vive in profondità nelle screpolature della corteccia. Solo dopo alcuni anni dal suo insediamento si manifestano i sintomi della malattia che porta alla morte dei pini colpiti (CORTE e PIERUCCETTI, 1981).

MATERIALI E METODI

Il polline raccolto da strobili maturi è stato sottoposto al test di vitalità con diacetato di fluoresceina (FDA) (HESLOP-HARRISON, 1970).

La germinabilità è stata valutata con due diversi substrati germinativi:

S1: H_3BO_3 100 mg/l; $Ca\ Cl_2 \cdot 2\ H_2O$ 200 mg/l; $Mg\ SO_4 \cdot 7\ H_2O$ 200 mg/l; KNO_3 100 mg/l; saccarosio 100 g/l (BREWBAKER e KWACK, 1963 modif. da YANG, 1986).

S2: H_2O distillata; saccarosio 150 g/l.

Il polline è stato incubato in termostato a 26-28°C, in quantità sufficiente da creare l'«effetto popolazione» (BREWBAKER e MAJUMDERS, 1961). Si sono considerati germinati i granuli con tubetto pollinico lungo almeno il doppio del diametro pollinico (BAR-SHALOM e MATTSON, 1977) e sono stati fatti i controlli sulla germinabilità ogni 24 ore per più giorni consecutivi. Tutte le osservazioni sono state effettuate su un minimo di 250 granuli e, oltre alla percentuale dei germinati, si è annotata anche quella dei granuli con più di un tu-

betto pollinico o con tubetto ramificato. Sono state misurate le lunghezze massime raggiunte dai tubetti pollinici e sono state calcolate le dimensioni (diametro maggiore e minore in visione polare) dei granuli provenienti dalle diverse stazioni e le percentuali dei granuli anomali.

Risultati

La vitalità con FDA è risultata elevata in tutti i campioni, con un solo valore inferiore al 90% (esemplare IM/1).

Orto Botanico	(GE)	91,9%
Alpicella - Faie	(SV)	91,3%
S. Romolo - Col di Rodi	(IM/1)	83,2%
S. Romolo - Col di Rodi	(IM/2)	90,9%

Per quanto riguarda la germinabilità, i valori percentuali che compaiono nella fig. 1 evidenziano che il substrato più idoneo per

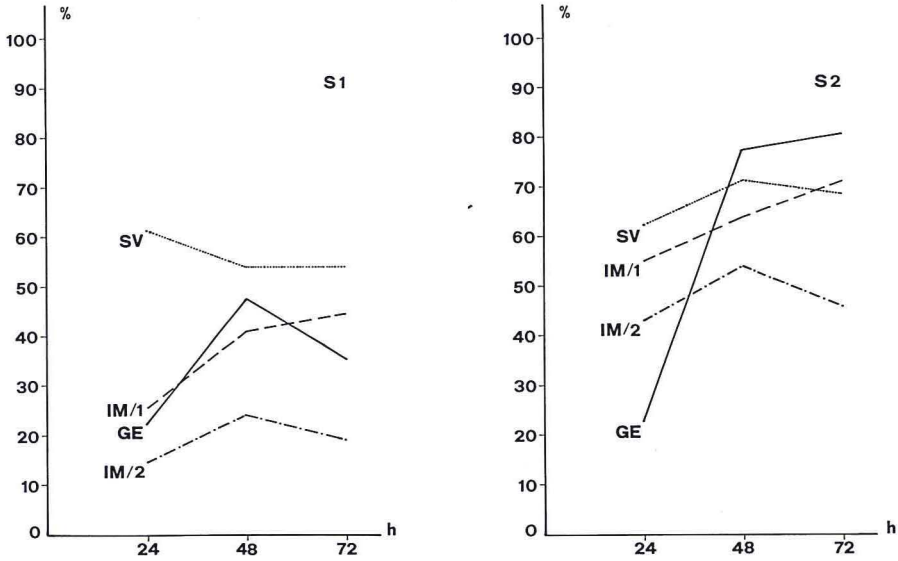

Fig. 1 - Germinazione del polline di *Pinus pinaster* Aiton.

raggiungere la più elevata germinazione è S2 (acqua e saccarosio 15%). La percentuale massima di germinazione viene raggiunta entro 48 o 72 ore dall'incubazione, dopo di che si ha un calo dovuto all'esplosione dei tubetti, quindi solo i primi tre giorni dopo l'incubazione danno risultati significativi.

Nella fig. 2 è rappresentata la crescita dei tubetti pollinici; S2 risulta il medium più adatto anche nel caso dell'allungamento dei tubetti, che generalmente raggiungono la massima lunghezza nell'arco di 48 ore. Successivamente la curva scende in concomitanza con la rottura dei tubetti.

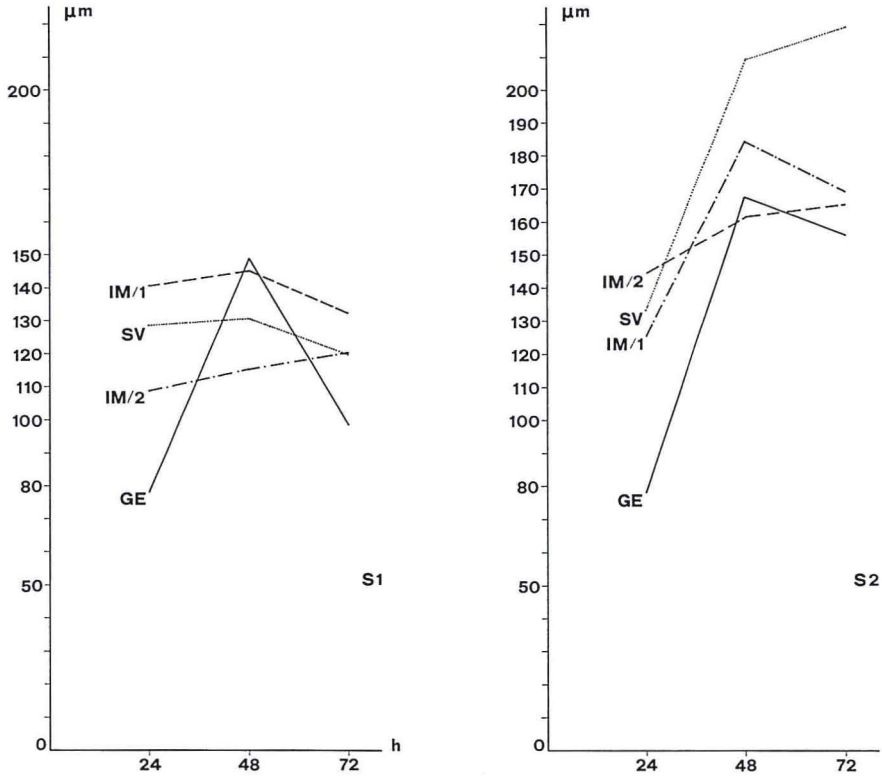

Fig. 2 - Crescita dei tubetti pollinici.

La presenza di granuli con due o raramente più tubetti pollinici e con tubetti variamente ramificati (Fig. 3) è stata riscontrata in tutti i campioni esaminati e la percentuale con la quale compaiono non sembra relazionabile con il substrato germinativo, né con la provenienza.

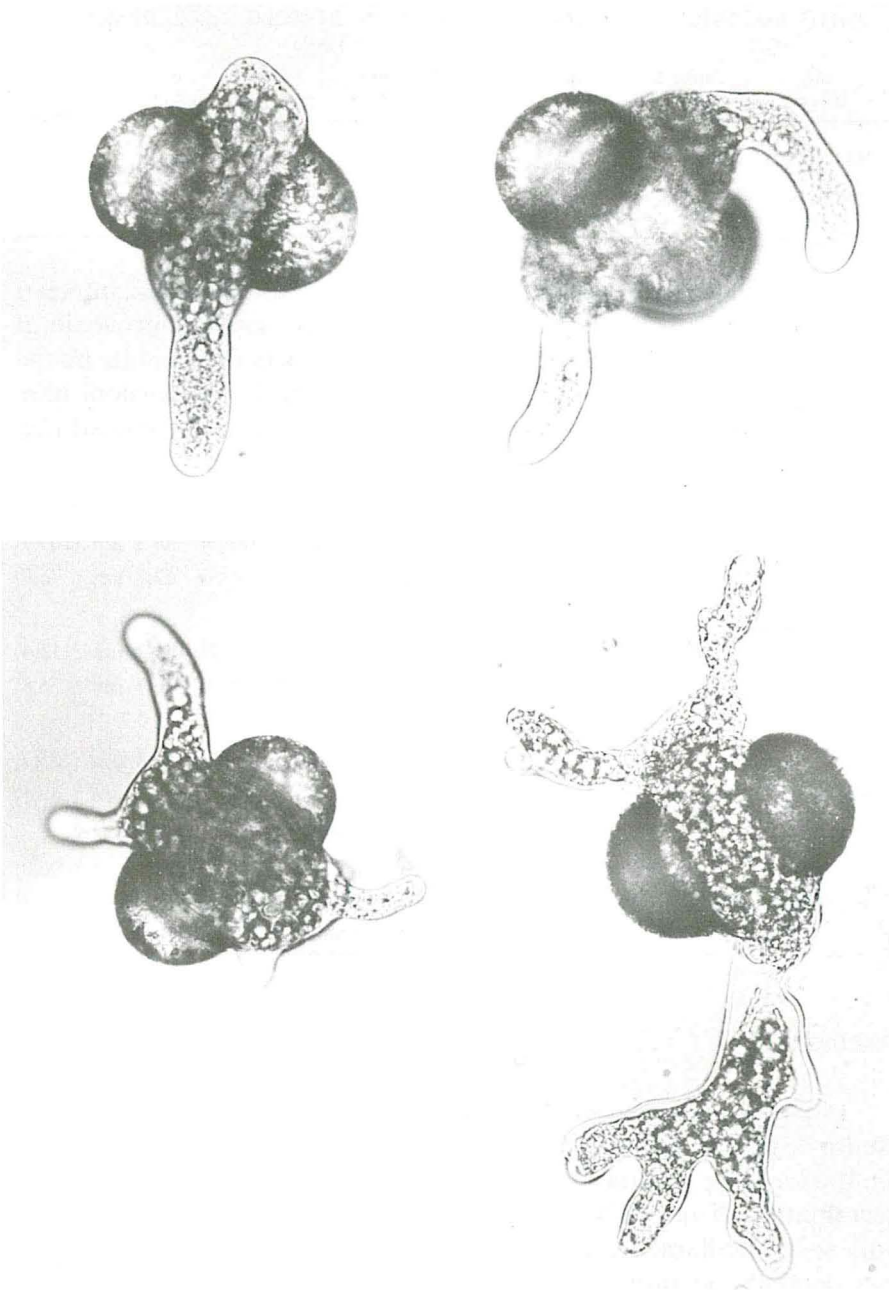

Fig. 3 - Polline germinato di *Pinus pinaster* Aiton.

ORTO BOTANICO (GE)		ALPICELLA - FAIE (SV)		S. ROMOLO - COL DI RODI (IM/1)		(IM/2)	
più tubetti	tubetti ramificati	più tubetti	tubetti ramificati	più tubetti	tubetti ramificati	più tubetti	tubetti ramificati
S1: 28,1%	—	18,2%	12,1%	42,6%	10,3%	92,3%	35,9%
S2: 26,3%	5,3%	26,8%	7,7%	24,0%	5,5%	32,2%	11,9%

Le dimensioni del polline prelevato dagli esemplari non infettati dalla cocciniglia sono molto simili a quelle dei granuli provenienti da vari popolamenti a pino marittimo della Liguria occidentale (Arobba, 1979). Invece il polline degli esemplari malati ha dimensioni inferiori e alcuni granuli sono monosaccati, subsaccati o ipersaccati (Accorsi *et al.*, 1978).

ORTO BOTANICO (GE)	diametro maggiore	(84,5)	94,5 µm (103,7)
	diametro minore	(49,9)	62,7 µm (76,8)
	% granuli anomali		—
ALPICELLA - FAIE (SV)	diametro maggiore	(92,2)	100,2 µm (111,4)
	diametro minore	(49,9)	66,7 µm (76,8)
	% granuli anomali		0,7
S. ROMOLO - COL DI RODI (IM/1)	diametro maggiore	(84,5)	90,5 µm (103,7)
	diametro minore	(57,6)	62,3 µm (69,1)
	% granuli anomali		4,0
S. ROMOLO - COL DI RODI (IM/2)	diametro maggiore	(61,4)	79,9 µm (96,0)
	diametro minore	(34,6)	55,3 µm (69,1)
	% granuli anomali		4,3

Discussione

Dall'elaborazione dei dati ottenuti risulta che il polline proveniente dagli esemplari di S. Romolo-Col di Rodi (IM/1 e IM/2) colpiti da *Matsococcus feytaudi* ha una vitalità più bassa e un minor potere germinativo di quello proveniente da esemplari sani. Inoltre i granuli sono mediamente più piccoli rispetto a quelli di confronto e una percentuale superiore al 4% mostra anomalie morfologiche, assenti o quasi negli altri esemplari in esame. La presenza di pollini anomali in piante malate è stata osservata anche in castagni (Accor-

SI e MANFREDINI, 1981) e in cipressi (ACCORSI e DALLAI, 1984) affetti da cancro.

Nell'ambito dei due campioni prelevati nell'imperiese si può osservare che il polline proveniente dal ramo IM/2, più manifestamente colpito dalla cocciniglia, è meno germinabile (54,2%) di quello proveniente dal ramo IM/1, in migliori condizioni vegetative. La percentuale di polline germinato in IM/1 (71,4%) si avvicina invece a quella degli esemplari sani (SV: 73,9%; GE: 80,7%) (Fig. 1).

Si può pertanto supporre che la fertilità pollinica venga in un primo tempo mantenuta anche in seguito all'attacco del parassita, per poi diminuire quando le condizioni vegetative vengono compromesse, con fuoriuscita di resina dal tronco e comparsa di clorosi e arrossamento fogliare seguiti da seccume e defogliazione.

Il calo del potere germinativo è stato evidenziato anche per pollini provenienti da ambienti inquinati (CELA RENZONI, VIEGI e STEFANI, 1983) o sottoposti artificialmente ai più comuni agenti inquinanti (SIDHU, 1983; O' CONNOR, ASHFORD e SPEDDING, 1987; RAY e DAS GUPTA, 1987; WERTHEIM e CRAKER, 1988, ecc.).

Si tratta evidentemente di risposte delle piante a situazioni di sofferenza di origine diversa, ma che si ripercuotono ugualmente sull'attività riproduttiva.

Il polline proveniente dall'Orto Botanico di Genova (GE) raggiunge nel substrato S2 il più alto tasso di germinazione in assoluto, però impiega da 48 a 72 ore per raggiungerlo. Invece il polline prelevato ad Alpicella Faie (SV) già 24 ore dopo l'incubazione raggiunge percentuali elevate di germinabilità che poi si mantengono abbastanza costanti nelle successive 48-72 ore (Fig. 1). Inoltre in questo campione (substrato S2) si ha la massima crescita dei tubetti pollinici, che raggiungono una lunghezza di circa 220 μm.

Nel complesso si può quindi riconoscere al polline SV una fertilità maggiore che a quello GE. Ciò potrebbe trovare spiegazione nelle condizioni ambientali di Alpicella-Faie, più favorevoli al pino marittimo di quelle di un centro urbano come Genova. Si potrebbe anche avanzare una seconda ipotesi, forse azzardata, ma non impossibile, cioè che la cocciniglia *Matsococcus feytaudi*, sicuramente presente nella vicina pineta di Sciarborasca-Cogoleto, abbia già aggredito i pini marittimi di questa zona. Di conseguenza la maggiore fertilità pollinica potrebbe essere una prima reazione delle piante all'attacco del parassita. Osservazioni e studi successivi potranno fornire ulteriori indicazioni a questo proposito.

Ringraziamenti

Ringraziamo il Prof. E. Martini per la segnalazione delle stazioni a pino marittimo più significative ai fini della ricerca e per la collaborazione nei sopralluoghi. Siamo grate alla Signora S. Placereani Calestani per l'efficiente assistenza tecnica.

BIBLIOGRAFIA

ACCORSI C.A., BANDINI MAZZANTI M., FORLANI L. (1978) - Modello di schede palinologiche di pini italiani. *Arch. Bot. Biogeogr. Ital.*, **54** (3/4), 65-102.

ACCORSI C.A., DALLAI D. (1984) - Morfobiometria del polline di *Cupressus sempervirens* L. in individui sani e in individui colpiti da *Seiridium cardinale* Wag. *Giorn. Bot. Ital.*, **118**, suppl. 2, 39-40.

ACCORSI C.A., MANFREDINI R. (1981) - Aumento di granuli pollinici anomali e infiorescenze maschili anomale in castagni colpiti dal «cancro della corteccia». *Inform. Fitopatol.*, **3**, 17-22.

AROBBA D. (1979) - Determinazione di *Pinus halepensis* Miller e *Pinus pinaster* Aiton. *Arch. Bot. Biogeogr. Ital.*, **55** (3), 83-92.

BAR-SHALOM D., MATTSON O. (1977) - Mode of hydration, an important factor in the germination of trinucleate pollen grains. *Bot. Tidssk.*, **71**, 245-251.

BRAGGIO MORUCCHIO G., CORNARA L. (1987) - Vitalità e germinabilità del polline di *Strelitzia reginae* Ait. (Musaceae). Conv. Gruppo Palinol. Soc. Bot. Ital. Modena, 28/29 settembre 1987.

BREWBAKER J.L., KWACK B.H. (1963) - The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Amer. J. Bot.*, **50** (9), 859-865.

BREWBAKER J.L., MAJUMDER S.K. (1961) - Cultural studies of the pollen population effect and the self-incompatibility inhibition. *Amer. J. Bot.*, **48** (6), 457-464.

CELA RENZONI G., VIEGI L., STEFANI A. (1983) - Germinazione in vitro di polline di *Pinus pinea* L. di diversa provenienza. *Giorn. Bot. Ital.*, **117**, suppl. 1, 192-193.

CORTE A., PIERUCCETTI G. (1981) - Malattie del bosco: loro prevenzione e cura. Atti Convegno per la difesa del bosco in Liguria, 6-9 maggio 1981, 58-64.

HESLOP-HARRISON J., HESLOP-HARRISON Y. (1970) - Evaluation of pollen viability by enzimatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technol.*, **45** (3), 115-120.

O' CONNOR C.J., ASHFORD K.P., SPEDDING D.J. (1987) - Germination and metabolism of *Pinus radiata* pollen in the presence of sulfur dioxide. *J. Plant Physiol.*, **126**, 373-378.

OWENS J.G., BLAKE M.D. (1984) - The pollination mechanism of Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Can. J. Bot.*, **62**, 1136-1148.

RAY M., DAS GUPTA K. (1987) - Effects of polluted water on pollen germination and pollen tube growth. *Bangladesh J. Bot.*, **16** (2), 165-171.

SIDHU S.S. (1983) - Effects of simulated acid rain on pollen germination and pollen tube growth of white spruce (*Picea glauca*). *Can. J. Bot.*, **61**, 3095-3099.

WERTHEIM F.S., CRAKER L.E. (1988) - Effects of acid rain on Corn silks and pollen germination. *J. Envir. Qual.*, **17**, 135-138.

YANG H.Y. (1986) - Fluorescein diacetate used as a vital stain for labelling living pollen tubes. *Plant Science,* **44**, 59-63.

(*ms. pres. il 6 settembre 1988; ult. bozze il 20 febbraio 1989*)