

L'approccio interdisciplinare nello studio dell'impollinazione delle Angiosperme

G. ARONNE, V. DE MICCO e M. GIOVANETTI

ABSTRACT - *The interdisciplinary approach in the study of pollination of Angiosperms* - As for other complex systems, the process of pollination cannot be explained just through the sum of its components. The analysis of each factor has to be processed by experimental methods, but focusing on an interdisciplinary and holistic approach. We provide a short introduction of the main historical steps that brought to the study of pollination and a synthesis of the current scientific paths adopted to investigate anemophilous and entomophilous pollen transport. The experimental standards so far developed to investigate wind efficiency in pollen transport and the role of floral traits in insect attraction are deeply described. We gave special attention to those methods adopted to estimate shapes, colours and odours of flowers, underlining the importance of understanding the basic cognitive processes employed by pollinators. Our survey, even if not comprising all the possible features of this wide topic, is meant as an input to approach it experimentally but keeping in mind the fact that its complexity yields crucial restrictions. For this reason, emphasis is given to underestimated factors that involves different disciplines as physics, chemistry, anatomy, neurobiology, behaviour; finally the importance of the interdisciplinary approach to get a comprehensive view is highlighted.

Key words: anemophily, entomophily, pollination

*Ricevuto il 16 Febbraio 2011
Accettato il 16 Maggio 2011*

INTRODUZIONE

Nell'ambito dei processi biologici, l'impollinazione delle Angiosperme è un sistema estremamente complesso, basato sulla fitta rete di interazioni tra organismi appartenenti alla stessa specie, a specie diverse e regni differenti. Nella maggior parte delle specie, il trasferimento di polline da un individuo all'altro si realizza da milioni di anni con stupefacente efficienza. Intricate interazioni tra fiori e pronubi si compiono continuamente con straordinari e raffinati meccanismi. Complessi processi di competizione tra specie vegetali che fioriscono simultaneamente si superano con apparente semplicità.

L'interazione tra piante ed animali nasce da esigenze diverse. Da un lato, le piante sono individui stanziali: l'impossibilità di movimento rende necessario l'uso di stratagemmi (generalmente un vettore, abiotico o biotico) per permettere ai gameti di allontanarsi dall'individuo che li ha prodotti e dar luogo alla riproduzione incrociata. I vantaggi dell'impollinazione incrociata hanno sicuramente costituito una spinta evolutiva che dalle prime angiosperme ermafrodi-

te ha portato ad un'elevata plasticità nei sistemi riproduttivi: piante con stami e pistilli su fiori e/o individui diversi, o con entrambi sul medesimo individuo ma con fasi funzionali asincrone, o con altre (tante altre) strategie capaci di ridurre la possibilità di autofecondazione. Dall'altro lato, gli animali, quando coinvolti nei processi d'impollinazione sono generalmente interessati al consumo di tessuti vegetali come fonte di cibo per sé e/o la progenie. Tra le diverse parti di una pianta, ovuli e polline hanno alto valore nutritivo in quanto particolarmente ricchi di proteine, carboidrati e lipidi. La relazione che si è creata, nel lungo corso dell'evoluzione, tra fiori ed animali è partita da un iniziale antagonismo e si è poi trasformata nell'attuale mutualismo.

L'impollinazione è quindi uno dei sistemi biologici più complessi: coinvolge infatti organismi differenti, che devono soddisfare esigenze diverse, inseriti in contesti ambientali che condizionano fortemente il raggiungimento degli obiettivi.

Quando un sistema presenta numerosi elementi che

interagiscono tra loro, quando le interazioni non sempre sono lineari e quando si verificano fenomeni emergenti, cioè non facilmente prevedibili e non desumibili dalla semplice sommatoria degli elementi, il sistema di definisce complesso.

In passato, lo studio di qualsiasi sistema complesso è stato affrontato in modo analitico, esaminando le diverse componenti in discipline scientifiche separate. Attualmente si protende ad affrontare l'analisi dei sistemi complessi riprendendo il concetto olistico descritto per la prima volta da SMUTS (1926). Con questo approccio, i sistemi complessi si esaminano applicando il metodo scientifico in un contesto interdisciplinare e tenendo presente che le caratteristiche di un fenomeno non possono essere spiegate esclusivamente tramite la somma delle sue componenti.

Anemofilia ed entomofilia sono i processi di trasporto del polline più diffusi. Tradizionalmente essi sono considerati alternativi e l'accertata osservazione di insetti attivi sui fiori di una specie, porta automaticamente ad escludere che essa possa essere impollinata dal vento. L'ambofilia (trasporto del polline sia tramite gli insetti sia tramite il vento) è un fenomeno descritto per poche specie, ma a seguito di mirate verifiche potrebbe risultare molto più diffuso.

Il processo di impollinazione delle piante è stato studiato con vari approcci metodologici. Il più immediato ed intuitivo consiste nell'osservazione e trascrizione di qualsiasi evento collegato all'attività riproduttiva della pianta (fiore in antesi) e, quando presente, del visitatore (consumatore di polline e/o nettare). Questo tipo di informazione è solitamente descrittivo, ha la sua origine negli albori dello studio dell'impollinazione, ma si è spesso dimostrato riduttivo o addirittura errato: ad esempio, non sempre il visitatore è anche impollinatore. Attualmente, sempre più frequentemente, a studi di tipo descrittivo si affiancano ricerche sperimentali raffinate. Nel caso di entomofilia, alcuni impollinatori appartenenti alla famiglia degli imenotteri (in particolare, ape da miele e bombo) essendo attratti da una gran varietà di fiori, più di altri insetti sono stati utilizzati per verificare sperimentalmente ipotesi scientifiche. Tuttavia, l'analisi sempre più dettagliata di singoli aspetti, pur evidenziando fattori altrimenti sottostimati, può allontanare il ricercatore dalla valutazione del fenomeno in un contesto più ampio.

Nei paragrafi che seguono, dopo una breve storia degli studi sull'impollinazione, si sintetizzano gli approcci sperimentali utilizzati attualmente per studiare i sistemi di trasporto del polline. Si riportano e discutono i metodi usati per analizzare le diverse caratteristiche del processo anemofilo; inoltre, per quanto riguarda l'entomofilia, si considerano gli aspetti relativi ai fenomeni di attrazione dei pronubi determinati dalle strutture floreali che coinvolgono in particolare la vista e l'olfatto degli insetti. Per tutti gli aspetti relativi alle ricompense che gli impollinatori ottengono dai fiori si rimanda a monografie specifiche tra cui quella recente di NICOLSON *et al.* (2007).

TAPPE DEGLI STUDI SULL'IMPOLLINAZIONE

Lo studio dei processi di impollinazione ha una storia antica. Da un lato, si può attribuire già a Teofrasto (373-287 a.C.) l'intuizione che le piante avessero una sessualità paragonabile a quella animale. Mentre dall'altro, Aristotele (384-322 a.c.) aveva notato che le visite delle api non erano casuali: fenomeno in seguito chiamato "costanza florale". Ci vorrà parecchio tempo però prima di comprendere la profonda connessione tra mondo vegetale e mondo animale. La prima ipotesi del polline quale elemento necessario alla produzione dei semi si deve al botanico inglese Nehemiah Grew, nel 1600. Nello stesso periodo furono condotti anche i primi esperimenti di rimozione di parti floreali (ad opera di R.J. Camerarius, che dimostrò così anche l'esistenza di specie ermafrodite, quasi contemporaneamente scoperte tra le lumache), e perfino di produzione di ibridi di piante ornamentali. Il risultato di questi esperimenti non venne però accolto con curiosità, ma piuttosto contestato e per un ulteriore mezzo secolo l'argomento non fu ulteriormente sviluppato. Solo intorno al 1750 venne finalmente accettata la sessualità nelle piante e si riscoprì l'importanza degli insetti per la loro riproduzione (P. Miller, 1691-1771). È J.G. Kölreuter che, nella seconda metà del 1700, dimostrò, attraverso vari esperimenti, la funzione degli insetti e scoprì l'esistenza del nettare. Egli intuì che questa secrezione zuccherina è l'elemento utilizzato dalle api per produrre il miele e comprese quindi l'importanza che il nettare può avere nell'attrarre gli impollinatori.

Alla fine del secolo C.K. Sprengel (1750-1816) descrisse le strutture floreali dedicate alla produzione e conservazione del nettare e formulò inoltre ipotesi sulle funzioni di corolla, profumo e colore dei fiori, sottolineando le differenti caratteristiche delle piante che affidano il loro polline al vento.

Per più di mezzo secolo questi lavori furono purtroppo poco considerati, specialmente in ambito botanico. L'interesse per la tematica ripartì nel 1800 con le osservazioni e le conseguenti pubblicazioni di C. Darwin. Il suo lavoro ispirò molti studiosi ed agli inizi del 1900 furono scritti, sia in tedesco sia in inglese, monografie che riuniscono le nozioni acquisite durante il secolo precedente; ma qui l'interesse per l'impollinazione nuovamente diminuì. Questo fu il secolo in cui nuove discipline presero il sopravvento, grazie soprattutto ai notevoli sviluppi in campo tecnologico: paleobotanica, morfologia, fisiologia, ma soprattutto genetica e citologia. Verso queste discipline si convogliò l'attenzione della maggior parte degli studiosi, anche perché era convinzione diffusa che dell'impollinazione si era capito ormai quasi tutto.

Durante il secolo scorso, botanici ed entomologi, più di altre categorie di ricercatori, hanno continuato a studiare l'impollinazione, sia come ricerca di base sia applicata, approfondendo unilateralmente gli aspetti più strettamente legati alle loro discipline. I primi si sono interessati al trasferimento del polline dalle

antere agli stimmi negli studi finalizzati alla biologia riproduttiva delle piante o al miglioramento delle produzioni agricole; i secondi hanno studiato l'impollinazione in quanto, per esempio, interessati all'etologia degli imenotteri o alla produzione di miele. Alla fine del 1900, l'opera di FAEGRI, VAN DER PIJL (1979) ha dato nuovo vigore a questi studi, stimolando altri ricercatori ad indagare sui processi di impollinazione alternando l'approccio metodologico delle misure in campo, generalmente utilizzato dagli ecologi, con quello sperimentale di laboratorio adottato dai biologi (JONES, LITTLE, 1983; REAL, 1983; DAFNI, 1992; KEARNS, INOUE, 1993; DAFNI *et al.*, 2005).

Attualmente, l'immagine del naturalista che trascorre intere giornate in un prato fiorito a seguire il volo di api e farfalle si adatta poco a descrivere i metodi di ricerca in questo campo; precise metodologie di studio sperimentale sono continuamente perfezionate ed interessano non solo la botanica e l'etologia, ma anche la chimica e la fisica. Il pensiero scientifico, attraverso la formulazione di ipotesi testabili e modelli matematici che riproducano casi osservati e generino ulteriori tesi di lavoro, è forse il miglior strumento di cui dispone il ricercatore contemporaneo ed è sempre più applicato anche allo studio dell'impollinazione.

IMPOLLINAZIONE ANEMOFILA

Caratteri associati e fattori che la influenzano

Per lungo tempo l'impollinazione anemofila è stata considerata essenzialmente un fenomeno di tipo stocastico che coinvolge la produzione ed il rilascio di grandi quantità di polline (FAEGRI, VAN DER PIJL, 1979). Studi approfonditi di biologia ed ecologia hanno invece riconosciuto il ruolo fondamentale svolto dai principi di fluidodinamica nei fenomeni di rilascio e dispersione del polline, nonché nella sua intercettazione da parte delle strutture riproduttive. In tal senso, analogamente al concetto di coevoluzione tra piante ed impollinatori, sono state sviluppate teorie sull'evoluzione dei caratteri morfologici delle strutture riproduttive anche sotto la spinta di fenomeni di adattamento ai principi aerodinamici (ACKERMAN, 2000). Lo stesso polline delle specie anemofile è caratterizzato da una serie di caratteri che ne favoriscono la diffusione attraverso le correnti d'aria, tra cui: presenza di granuli isolati e di dimensioni ridotte, forma sferica, superficie liscia, esina semplice con aperture ridotte (PACINI, HESSE, 2004). Questi granuli sono in genere prodotti in elevate quantità (Fig. 1), sono rilasciati da antere ben esposte e presentano vitalità/germinabilità breve (PACINI, *et al.*, 1997). I fiori, riuniti in infiorescenze ad amanto e spighe, sono caratterizzati da perianzio ridotto e poco evidente, stimmi esposti, lunghi e piumosi, numero ridotto di ovuli. La presenza di fiori diclini ed il dioicismo sono piuttosto diffusi tra le specie anemofile. La separazione spaziale dei due tipi di gameti limita, fino ad evitare del tutto (specie dioiche), la possibilità di autoimpollinazione.



Fig. 1

Nuvola di polline che si allontana dai fiori di *Phillyrea latifolia* L.

Pollen cloud leaving flowers of *Phillyrea latifolia* L.

Al di là di alcuni casi studio ben dettagliati, generalmente mancano informazioni sperimentali sui meccanismi che regolano l'impollinazione anemofila delle diverse specie. È accertato però che la dispersione del polline attraverso il vento è influenzata da molteplici fattori tra cui la velocità del vento, fenomeni di turbolenza, quantità di polline rilasciato, massa e forma dei granuli, velocità dei pollini, ecc. Non sorprende quindi che la fioritura ed il rilascio del polline nelle specie anemofile tendano ad essere strettamente correlate ad alcune condizioni fisiche tra cui la stagione e specifici momenti della giornata caratterizzati da determinate condizioni di insolazione e umidità (WHITEHEAD, 1983). Quest'ultima gioca un ruolo fondamentale nel rilascio del polline (generalmente favorito da condizioni asciutte) e nel mantenimento della sua vitalità (ARONNE, 1999). In alcune specie, il momento di inizio e la durata del rilascio del polline possono essere previste con una certa precisione, tanto che possono essere stabiliti dei veri e propri calendari molto utili in campo medico nel caso di pollini allergenici.

Se da un lato sono numerosi i fattori che influenzano il rilascio del polline, bisogna anche considerare che altrettanto numerosi sono i fattori che influiscono sulla probabilità che il polline rilasciato arrivi al posto giusto, nel momento giusto, ovvero su stimmi conspecifici in fase recettiva. È abbastanza intuitivo come tale probabilità dipenda fondamentalmente: dal polline rilasciato, dalle condizioni atmosferiche, dal tipo di vegetazione che circonda la sorgente di polline e dalle proprietà delle superfici recettive. Relativamente al polline, le proprietà che hanno maggiore importanza sono la quantità di granuli rilasciati e la velocità di sedimentazione (dipendente da dimensioni, forma, presenza di particolari appendici, ecc.). Per quanto riguarda i fenomeni atmosferici, il

ruolo maggiore è riconosciuto alla velocità del vento, alla viscosità dell'aria, alla presenza di fenomeni di turbolenza ed all'azione di lavaggio dell'atmosfera esercitata dalla pioggia. Grande influenza può essere esercitata anche dal tipo di vegetazione che circonda la sorgente di polline, poiché determina il tipo e la quantità di strutture che possono intercettare i granuli. Infine, anche l'estensione e le proprietà adesive ed aerodinamiche delle superfici recettive, come la velocità di cattura del polline, svolgono un ruolo rilevante.

Data l'importanza dei fattori ambientali sul rilascio del polline e sulla probabilità che questo sia intercettato dalle strutture recettive, va da sé che quando si studia l'anemofilia, bisogna prestare particolare attenzione ad una serie di parametri quali ad esempio l'ora del giorno, temperatura ed umidità dell'aria, velocità e direzione del vento, intensità luminosa, condizioni di ombreggiamento, ecc.

Approccio metodologico

Per stabilire se in una specie il vento agisce sul trasporto del polline come vettore unico (anemofilia) o in combinazione con vettori biotici (ambofilia), oltre all'accertamento della presenza di morfologie fiorali e caratteri pollinici specifici è necessario effettuare una verifica sperimentale. Per raggiungere questo obiettivo si possono utilizzare diversi metodi. Alcuni di essi si basano sull'isolamento dei fiori da possibili visite di impollinatori attraverso la copertura con strutture specifiche; altri sull'osservazione della presenza di polline su vetrini trappola posti a varie distanze dai fiori sottoposti a correnti d'aria uniformi (ARONNE *et al.*, 1993).

Osservazione delle caratteristiche del polline trasportato dal vento

Una prima semplice analisi riguarda lo studio della morfologia pollinica. L'importanza dell'analisi morfologica si basa sul principio che specifici insiemi di caratteri del polline possano essere associati a determinate sindromi di impollinazione. Per rendersi conto della diversità morfologica del polline di specie anemofile e di quello di specie entomofile, basta raccogliere in campo polline o fiori/infiorescenze di specie che presentano diverse sindromi di impollinazione e trasferirlo in laboratorio per l'osservazione al microscopio ottico a luce trasmessa. I caratteri principali da evidenziare sono: forma, caratteristiche dell'esina, presenza di "pollenkitt", ecc. [Per i dettagli si rimanda a ERDTMANN (1969) e KEARNS, INOUE (1993)]. L'assenza del pollenkitt, ad esempio, può essere indicazione di impollinazione anemofila e determina la tendenza dei granuli pollinici a disperdersi singolarmente senza aggregarsi in gruppi (PACINI, FRANCHI, 1998). Se è vero però che il polline delle specie anemofile ha la più bassa tendenza all'aggregazione, mentre quello delle zoofile tende ad aggregarsi più facilmente, bisogna considerare la possibile interferenza di altri fattori come il numero di giorni passato dal rilascio del polline dalle antere: nel

tempo infatti il pollenkitt tende a disidratarsi determinando una minore capacità di aggregazione anche in granuli di specie zoofile. Le unità di dispersione del polline possono essere analizzate con appositi sistemi che permettono di osservare al microscopio i pattern di aggregazione dei granuli. A questo parametro si può aggiungere la misura della velocità di sedimentazione del polline attraverso l'utilizzo di semplici apparati, che consentono il passaggio del polline attraverso tubi di lunghezze standard alla cui estremità inferiore è posta una piattaforma rotante a velocità nota e che alloggia vetrini trattati con materiale adesivo (DI GIOVANNI *et al.*, 1995). Analizzando i vetrini al microscopio, è possibile determinare il numero di granuli pollinici presenti singolarmente o a gruppi per unità di superficie, registrare il tempo impiegato dai granuli ad attraversare il tubo e visualizzare i risultati in grafici. Un altro parametro importante da tenere in considerazione è la stima quantitativa della sorgente di impollinazione. Si tratta di una misura demografica dell'attività staminifera di una data popolazione di piante in una regione specifica. Può essere propriamente quantificata in riferimento ad un'area appositamente delimitata, attraverso formule che tengono conto del numero di steli con strutture riproduttive presenti nell'area, del numero di Unità Riproduttive (per es. fiori), del numero di antere per fiore e del numero di granuli pollinici per antera (DAFNI, 1992).

Tecniche basate sull'isolamento dei fiori

L'isolamento dei fiori è un approccio spesso utilizzato per valutare la velocità di cattura del polline da parte degli organi recettivi. Le superfici recettive devono essere protette dal contatto con altri pollini prima che inizi lo studio, ma anche dopo che il periodo di osservazione stabilito è terminato. Tuttavia, le superfici devono essere esposte per un tempo sufficiente affinché il polline giunto sugli stimmi vi aderisca bene e germi in modo da eliminare il rischio che i granuli vengano rimossi accidentalmente durante le operazioni di campionamento e preparazione dei campioni per l'osservazione al microscopio. La prima operazione si esegue prima che inizi il periodo di recettività degli stimmi e prevede l'isolamento dei fiori con strutture da rimuovere in momenti specifici e per durate diverse. Successivamente, ad intervalli di tempo prestabiliti si raccolgono gli stimmi per osservarli al microscopio e contare il numero di granuli che vi hanno aderito e/o che hanno iniziato a sviluppare il tubetto pollinico. Per accertare l'effettivo verificarsi dell'impollinazione anemofila, l'isolamento dei fiori dovrebbe essere eseguito con apparati e materiale che escludano l'azione degli impollinatori, ma consentano l'entrata di polline trasportato dal vento. La produzione di semi ottenuta con questo trattamento potrà essere confrontata con quella che si ha quando il fiore è contemporaneamente esposto o celato ad entrambe le sorgenti di impollinazione, in modo da verificare l'eventuale produzione di semi per apomissia (SACCHI, PRICE,

1988). In alcuni casi, è necessario emasculare il fiore in modo da escludere l'autoimpollinazione. Sono stati descritti diversi sistemi per escludere l'azione degli insetti impollinatori, quali ad esempio l'applicazione di fogli di acetato trasparente, di ritagli di bottiglie di plastica o bustine di materiale plastico, da sagomare intorno ai fiori ed in cui creare delle aperture sigillate da retine per permettere il passaggio del polline (KEVAN, 1972; ARROYO, SQUEO, 1987). Per escludere anche il passaggio del polline trasportato dal vento è possibile utilizzare semplicemente sacchetti di cotone o di carta (ARROYO, SQUEO, 1987; SACCHI, PRICE, 1988). Nella scelta dei materiali da utilizzare bisogna prediligere quelli che consentono di mantenere umidità e temperatura del fiore il più possibile simili alle condizioni naturali. Per verificare se il polline entra nei contenitori utilizzati è consigliabile inserire in alcuni di essi dei vetrini ricoperti con gel e materiali adesivi (per es. glicerolo, silicone, ecc.) in modo da contare al microscopio il numero di granuli di polline intercettati e di confrontarlo col numero di granuli depositati in vetrini di controllo non coperti da alcun filtro (SACCHI, PRICE, 1988). Considerata la complessità dei fenomeni di gamia e compatibilità che possono interferire con l'impollinazione anemofila, ulteriori verifiche sperimentali devono essere pianificate in funzione degli obiettivi specifici del lavoro.

Verifica dell'effettivo trasporto del polline da parte del vento

Per accertare che il polline di una pianta sia trasportato dal vento ed a quali distanze, è possibile fare ricorso a svariati metodi, alcuni piuttosto semplici, altri più sofisticati che si basano su strumenti molto utilizzati soprattutto in campo medico per lo studio della diffusione di pollini allergenici.

Secondo i protocolli più semplici, è consigliabile disporre vetrini ricoperti con materiale adesivo a distanze prestabilite da una potenziale sorgente di polline per analizzarli dopo un certo numero di giorni al microscopio. I vetrini possono essere disposti in "trappole" costituite da piattaforme specificamente progettate dal punto di vista aerodinamico, che alloggiavano i vetrini orizzontalmente oppure verticalmente (per es. il catturatore Durham, la trappola Tauber). Accanto a semplici vetrini, possono essere utilizzate anche altre strutture adesive sagomate in modo che simulino le dimensioni e le forme delle infiorescenze. Tuttavia, nell'interpretazione dei risultati bisogna tener conto dell'influenza di fenomeni aerodinamici che nell'impollinazione anemofila giocano un ruolo fondamentale e differente in funzione della struttura intercettata (NIKLAS, 1985a).

Metodologie più accurate prevedono l'utilizzo di campionatori di aria che possono analizzare volumi di aria stabiliti (SACCHI, PRICE, 1988). Esempi di campionatori elettrici sono Rotorods, Burkard e Hirst. Il primo è uno strumento che permette la rotazione di strutture coperte di materiale adesivo in modo da catturare il polline presente nell'aria. La velocità di rotazione molto elevata rende trascurabile

l'influenza della velocità del vento. Questo strumento permette una misura piuttosto accurata della diversità e quantità di polline per unità di volume dell'aria (DI GIOVANNI *et al.*, 1996). I campionatori del tipo Burkard e Hirst risucchiano volumi noti di aria dall'esterno e la convogliano a contatto con le superfici adesive che possono essere costituite da vetrini coperti di materiale adesivo oppure di un nastro adesivo montati su tamburo. Quest'ultimo ruota a velocità nota, può essere rimosso ed in genere compie un giro completo in una settimana. Esso viene periodicamente rimosso per osservare al microscopio i pollini raccolti.

Aspetti bio-meccanici possono anche essere presi in considerazione attraverso l'osservazione delle traiettorie che i granuli di polline seguono in tunnel in cui sono create correnti d'aria artificiali (NIKLAS, 1984, 1985b, 1985c; NIKLAS, BUCHMANN, 1988).

IMPOLLINAZIONE ENTOMOFILA

Lo studio dell'impollinazione zoofila dovrebbe essere affrontato sia dal punto di vista della pianta sia dal punto di vista degli animali coinvolti (Fig. 2).

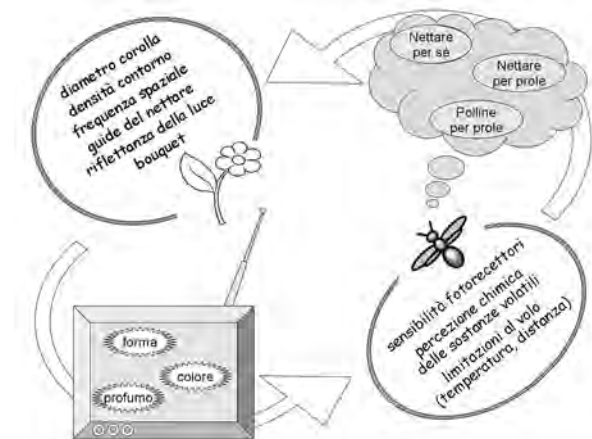


Fig. 2

Rappresentazione schematica dell'interazione pianta-pronubo: da una parte, la pianta pubblicizza se stessa attraverso una serie di elementi attrattivi, dall'altra l'interesse del pronubo è ben mirato. Su entrambi influiscono una serie di fattori eco-fisiologici che favoriscono/limitano l'interazione.

Schematic illustration of the plant-pollinator interaction: on one side, the plant advertises itself through some attractive elements, on the other the pollinator has specific interests. On both, plant and pollinator, ecophysiological factors influence/limit the interaction.

Per una completa comprensione del fenomeno è importante conoscere le strategie di attrazione evolute nei fiori, ma non si può prescindere dal considerare che gli impollinatori effettuano la visita del fiore per soddisfare le loro esigenze biologiche (per es. nutrizionali) e che il grado di percezione dei segnali emessi dai fiori dipende dalle caratteristiche di questi

animali. La maggior parte degli studi sperimentali sui fenomeni di attrazione fiore-pronubo è stata condotta su imenotteri (in particolare sull'ape domestica e sui bombi), mentre sono spesso scarse le informazioni disponibili per altri impollinatori, quali ad esempio ditteri e lepidotteri.

Nei paragrafi che seguono, sono illustrati brevemente i principali caratteri fiorali che attraggono gli insetti impollinatori e sono riportate alcune tecniche sperimentali per affrontarne lo studio. In particolare, si analizzano quelli che determinano un'attrazione visiva e quelli che esercitano un richiamo olfattivo. Anche se per comodità si tende a studiare separatamente i diversi segnali emessi dai fiori, è importante ribadire che gli impollinatori percepiscono tutti i segnali contemporaneamente e che differenti combinazioni possono portare risultati differenti anche in momenti diversi della giornata.

Attrazione visiva

Come quantificare dimensioni e forma di un fiore

I caratteri dimensione e forma dei fiori, sebbene apparentemente di facile intuizione, non sono semplici da quantificare in modo oggettivo. Per quanto riguarda la dimensione del fiore, bisogna prima di tutto considerare che il fiore come unità morfologica non necessariamente coincide con l'unità ecologica/funzionale. Le infiorescenze ad esempio possono essere considerate insieme di unità morfologiche costituenti un'unica unità funzionale; tuttavia, la percezione da parte dell'impollinatore di una singola unità o di un insieme di più unità non è solo funzione della grandezza dei fiori ma piuttosto della loro vicinanza. Per superare questo problema, si può considerare il singolo fiore di una infiorescenza come unità funzionale quando la distanza dagli altri supera le dimensioni del fiore stesso. A tal fine, si può fare riferimento a parametri semplici (per es. diametro della corolla, lunghezza del tubo corollino), o combinazioni di parametri (per es. lunghezza media del petalo moltiplicata per la sua larghezza). Questi metodi non tengono conto della forma del fiore e della dimensione delle superfici che realmente svolgono funzione di attrazione; pertanto, non sono sufficienti per studi comparativi. Per confrontare fiori di forma e dimensioni differenti, si può considerare la *proiezione planare* del fiore rispetto all'angolo di approccio dell'impollinatore, parametro che dipende non solo dalla forma del fiore, ma anche dal grado di apertura e dall'angolazione dalla quale è osservato (DAFNI, 1994). Secondo questo parametro, appare semplicistico considerare una corolla actinomorfa come una struttura a simmetria radiale per definizione. Per lungo tempo, la proiezione planare del fiore è stata stimata a partire da misure lineari delle parti fiorali e assimilando le differenti parti fiorali o l'intero fiore a figure geometriche ad esso circoscritte. Questo approccio comporta necessariamente errori di sovrastima di diversa entità in funzione della forma geometrica utilizzata e della forma del fiore misurato. Con l'avvento dei sistemi di analisi d'immagine digitale, questi errori di misurazione sono

stati minimizzati poiché è possibile misurare facilmente la superficie ed il perimetro di fiori dalla forma irregolare. Dal rapporto tra il perimetro della proiezione planare del fiore e la sua superficie si ricava la *densità del contorno* di un fiore anche riconosciuta come *intensità di una figura* (HERTZ 1933; DAFNI *et al.*, 1997). Questo parametro sembra giocare un ruolo ecologico molto importante: a parità di dimensioni e di altre caratteristiche, un fiore con un numero maggiore di petali è caratterizzato da un potere di attrazione più elevato rispetto ad uno con meno petali quindi dalla forma meno frastagliata (Fig. 3). In questa analisi non bisogna trascurare la distanza dell'impollinatore: fiori di dimensioni e forma simile possono apparire con differente intensità se posti a distanze diverse. Altro parametro collegato alla densità del contorno è la *frequenza spaziale* definita come il numero di contorni di fiori che si intercettano lungo un transetto in una area specifica (DAFNI *et al.*, 1997).

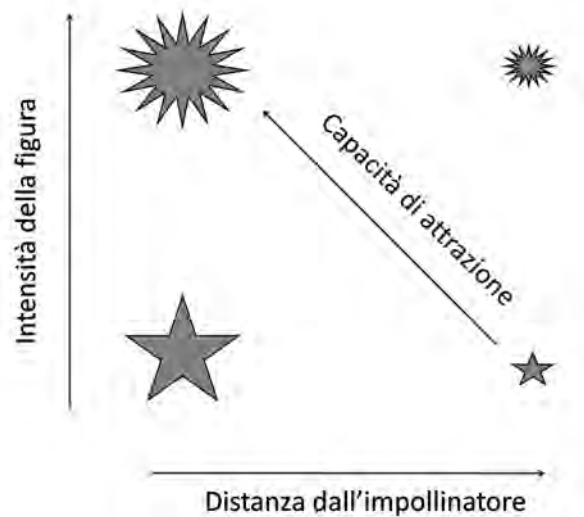


Fig. 3

Rappresentazione schematica di come la capacità di attrazione di un fiore è direttamente proporzionale alla densità del contorno di un fiore, ma diminuisce all'aumentare della distanza dall'impollinatore.

Schematic view representing that flower attractiveness is directly proportional to figure intensity, but is lowered by increasing distance from the pollinators.

Come valutare il ruolo di dimensioni e forma di un fiore nell'attrazione degli impollinatori

La valutazione dell'importanza delle dimensioni e della forma di un fiore per l'attrazione degli impollinatori è stata affrontata principalmente con metodi basati sull'utilizzo di modelli artificiali, più raramente con prove sperimentali basate su fiori.

Anche se semplici da utilizzare, il problema principale dei modelli è che si tende a far riferimento ad un fiore simmetrico ideale, che in condizioni naturali è veramente raro da trovare anche nel caso di corolle

actinomorfe viste da varie angolazioni (DAFNI, KEVAN, 1997). La maggior parte dei modelli utilizzati sono in bianco e nero, lontani quindi dalle condizioni naturali (WEHNER, 1981; LEHRER, 1993; SRINIVASAN, 1993), mentre nel caso dei modelli a colori non è semplice considerare l'interferenza che possono avere variazioni di luminosità (LEHRER, BISCHOF, 1995; GIURFA *et al.*, 1996). La posizione e l'orientamento dei modelli in campo possono avere un'influenza non facilmente quantificabile. I modelli possono essere trattati con soluzioni zuccherine in modo da offrire una ricompensa ai visitatori, ricompensa che però interferisce col ruolo di attrazione di forma e dimensioni del modello. Inoltre, specialmente negli studi sull'ape domestica, è richiesta una sorta di addestramento degli insetti che altrimenti non sarebbero attratti dai modelli che non offrono alcuna ricompensa.

Relativamente alle prove sperimentali con fiori, l'approccio tradizionalmente utilizzato prevede l'osservazione delle variazioni del comportamento degli impollinatori dopo aver causato il cambiamento di forma ai fiori attraverso l'eliminazione di porzioni di organi fiorali oppure l'aggiunta di parti artificiali. Si tratta di esperimenti semplici da eseguire e che consentono anche di individuare la capacità di attrazione specifica di alcune parti fiorali. Tuttavia, questo approccio ha anche numerosi svantaggi tra cui l'interferenza con stimoli olfattivi aggiuntivi che possono essere conseguenti alla mutilazione del fiore oppure all'aggiunta di parti colorate artificialmente. Bisogna anche considerare che la rimozione di alcune parti fiorali può rendere il fiore più appetibile quando le ricompense diventano più facilmente accessibili.

Colore di un fiore e sua percezione

Da più di due secoli è riconosciuto il ruolo del colore dei fiori nella capacità di attrazione degli impollinatori. Particolari colori e loro combinazioni possono infatti indicare la presenza e la localizzazione di una ricompensa: è il caso delle "guide del nettare" descritte per la prima volta da Christian Konrad Sprengel nel 1793. Più recentemente, è stato evidenziato che determinati gruppi di impollinatori sono attratti in modo particolare da specifici colori (KEVAN, 1983).

Oltre alle tecniche analitiche (per es. cromatografia) che si basano sulla caratterizzazione dei pigmenti estratti dai fiori, numerosi altri metodi sono stati proposti ed utilizzati per "misurare" il colore di un fiore e per valutarne il ruolo nell'attrazione degli impollinatori. Si tratta di metodi sorti dalla necessità di standardizzare e rendere replicabile la misura di una proprietà talmente istintiva e naturale da risultare facilmente oggetto di valutazioni inquinata da una forte soggettività, dovuta alla percezione stessa del colore da parte dell'osservatore. La maggior parte delle tecniche normalmente utilizzate richiedono che i fiori vengano recisi dalla pianta e talvolta che vengano trasportati in laboratorio. In

genere, queste operazioni non comportano problemi poiché il colore dei fiori può rimanere invariato anche per molte ore. Nel caso sia necessario trasportare i fiori, è opportuno prevenirne il disseccamento racchiudendoli in sacchetti di plastica sigillati in cui sia stata nebulizzata dell'acqua. Tali sacchetti devono essere tenuti lontani da fonti di calore. Prima di riportare alcuni esempi delle metodologie più utilizzate, è importante sottolineare quali sono i fenomeni che possono far variare il colore del fiore e la sua percezione.

La capacità di attrazione degli impollinatori da parte del colore di un fiore dipende non solo dal colore stesso, che può variare in relazione a numerosi fattori intrinseci ed estrinseci, ma anche dalle caratteristiche dello spettro visivo degli impollinatori.

Relativamente alle cause di variabilità intrinseca dei fiori, è accertato che il colore varia con l'età del fiore stesso. Difatti, variazioni di colore, talvolta impercettibili per l'occhio umano, si possono verificare nel corso delle diverse fasi riproduttive. Dal punto di vista ecologico, queste variazioni sono estremamente importanti poiché sono generalmente legate alla maggiore o minore disponibilità di ricompense ed hanno lo scopo di attrarre gli impollinatori proprio quando gli organi fiorali sono recettivi (WEISS, 2001). Tra i fattori ambientali che possono influenzare la percezione del colore di un fiore, rilevanti sono le condizioni di illuminazione, il contrasto con fiori di specie differenti contemporaneamente in fioritura ed in generale con i colori dello sfondo (CHITTKA *et al.*, 1994). Infine, la percezione dei colori è strettamente dipendente dall'osservatore. La maggior parte degli impollinatori ha una capacità visiva che si estende dall'ultravioletto fino alle lunghezze d'onda del rosso dello spettro elettromagnetico. Conoscere il tipo di recettori spettrali alla base del sistema visivo degli impollinatori, ad esempio sapere se si tratta di sistemi di-, tri- (per es. nelle api) o tetra- e policromatici (per es. nei lepidotteri), è fondamentale per l'applicazione delle metodologie di quantificazione del colore di un fiore negli studi di impollinazione.

Come definire il colore di un fiore

Nonostante la percezione del colore vari nei diversi gruppi di animali, può essere comunque utile cercare di quantificare il colore di un fiore facendo riferimento alla sensibilità dell'occhio umano che però non tiene conto della componente ultravioletta. Per standardizzare la descrizione del colore si può certamente fare riferimento a parametri come tinta, saturazione e luminosità. Tuttavia, un metodo molto più immediato prevede la valutazione del colore attraverso il confronto del fiore stesso con carte colorimetriche standard che abbiano un numero elevato di campioni di colori. Le carte normalmente utilizzate in orticoltura sono caratterizzate da una codifica numerica di ciascun colore, accompagnata da nomi standardizzati in varie lingue con esempi di alcuni fiori. Esempi di carte colorimetriche sono riportati in

TUCKER *et al.* (1991). L'utilizzo delle carte colorimetriche rappresenta un metodo rapido per l'analisi di un numero elevato di campioni. Tuttavia, l'utilizzo di diversi tipi di carte da diversi autori può essere motivo di confusione.

Un parametro più oggettivo che può essere preso in considerazione è la riflettanza della luce. Tale parametro, è stato proposto da REESE, BARROWS (1980) e dimostra come l'attività delle api varia a seconda dell'esposizione dei versanti, a parità di altre condizioni ambientali. Per la valutazione della riflettanza, si utilizzano apparecchi fotografici equipaggiati con filtri, o combinazioni di filtri, caratterizzati da lunghezze d'onda specifiche che corrispondono ai pigmenti dello spettro visivo delle diverse classi di impollinatori. I fiori o parti di essi sono quindi fotografati dal "punto di vista" dell'impollinatore e messi a confronto, a patto che il sistema fotografico sia calibrato. In genere, il fiore si fotografa con una serie di filtri monocromatici, caratterizzati da un intervallo ristretto di lunghezze d'onda, insieme ad una scala di grigio i cui valori sono calibrati in equivalenti di riflettanza percentuale. La riflettanza dei fiori si valuta facendo un confronto visivo con la scala di grigio. Per i dettagli sui filtri monocromatici, sul loro significato e sul loro utilizzo si può fare riferimento al lavoro di KEVAN (1983). Considerato che molti impollinatori percepiscono anche le lunghezze d'onda dell'ultravioletto, la riflettanza dell'ultravioletto può essere quantificata con tecniche fotografiche analoghe, naturalmente utilizzando appositi filtri.

Un'altra tecnica fotografica, piuttosto complessa anche se economica, è stata proposta da MCCREA, LEVY (1983) e permette di riportare la componente ultravioletta visibile agli insetti in colori visibili all'uomo. Il riconoscimento dell'importanza della riflettanza nell'ultravioletto ai fini dell'interazione fiore/insetto risale al 1950 quando Daumer riuscì a dimostrare il significato biologico dei pattern fiorali visibili nell'ultravioletto, utilizzati dagli insetti come guide per la localizzazione delle ricompense (JONES, BUCKMANN, 1974).

Anche se semplice da mettere in pratica e poco costosa, l'analisi fotografica richiede molta attenzione. Punti critici sono l'impostazione dell'esposizione e la selezione delle pellicole e delle lenti in funzione delle lunghezze d'onda da fotografare, poiché scelte sbagliate possono determinare l'insorgenza di artefatti. Inoltre, bisogna prestare molta attenzione nella messa a fuoco, soprattutto nel caso di lunghezze d'onda brevi: la luce dall'ultravioletto al blu passando attraverso le lenti della fotocamera viene rifratta in modo che le immagini sono riprodotte su un piano focale diverso da quello corrispondente alle altre lunghezze d'onda. Ancora una volta, si ribadisce l'importanza di avere sempre una scala di grigio di riferimento nell'inquadratura in modo da evitare errori di interpretazione dovuti all'interferenza dello sfondo e delle condizioni di illuminazione. Sarebbe preferibile fotografare i fiori con uno sfondo nero, in condizioni di luce diffusa allo scopo di ridurre riflessi ed ombre che possono rendere di difficile interpre-

tazione la fotografia. Negli ultimi anni, l'analisi fotografica tradizionale è stata affiancata dai sistemi digitali. In questo caso, l'attendibilità delle immagini ottenute dipende strettamente da precisione ed accuratezza degli apparati utilizzati poiché quelli più semplici ed economici possono non essere sufficientemente sensibili e possono generare errori nell'interpretazione delle immagini. I sistemi fotografici possono essere anche sostituiti da videocamere.

L'analisi fotografica può essere affiancata da un metodo quantitativo che richiede l'utilizzo di spettrofotometri a raggio singolo o doppio. Nel primo caso, i fiori devono essere sistemati su una superficie piana, ad una distanza specifica dalla sonda ed in determinate condizioni di illuminazione. Queste ed altre condizioni devono essere standardizzate in modo da utilizzare sempre le stesse per campioni diversi e per lo standard di colore bianco. I valori di riflettanza infatti sono sempre espressi in riferimento ad uno standard noto che viene generalmente misurato all'inizio di ogni analisi. Inoltre, le misure sono sempre accompagnate da una misura al buio per escludere eventuali segnali di fondo dello strumento. Per la spettrometria a doppio raggio si utilizzano gli spettrofotometri normalmente utilizzati in laboratorio per misurare la trasmittanza o l'assorbanza di matrici liquide disposte in appositi contenitori trasparenti. Nel caso specifico, però, tali apparecchi sono equipaggiati anche di speciali strutture, camere sferoidali rivestite di materiale capace di riflettere le lunghezze d'onda dall'ultravioletto al vicino infrarosso. Queste camere sono dotate di due porte: una in cui inserire l'oggetto/fiore da misurare, l'altro in cui si inserisce lo standard bianco. La luce che entra nella camera sferoidale è riflessa e diffusa dalle pareti della camera, dallo standard bianco e dall'oggetto da studiare. Lo strumento quindi misura le proprietà spettrali della luce alterata dall'oggetto d'interesse.

A questo punto si vuole sottolineare che conoscere lo spettro di riflessione di un fiore non è sufficiente, ma tale informazione dovrebbe essere integrata dalle curve di sensibilità spettrale dei recettori di colore posseduti dai diversi impollinatori. Ulteriore complicazione risiede nel fatto che la sensibilità dei fotorecettori degli impollinatori varia sensibilmente in funzione di quanto i fotorecettori stessi sono stimolati. Ad esempio, in condizioni di scarsa illuminazione, i fotorecettori possono diventare più sensibili. Per far fronte a tali problemi sono state proposte formule e funzioni per calcolare fattori di sensibilità e gli spettri di riflettanza standard (WYSZECKI, STILES, 1982; CHITTKA *et al.*, 1994; CHITTKA, 1996). I metodi spettrofotometrici, già utilizzati per valutare il colore degli insetti, successivamente applicati ai fiori, consentono di generare una curva di riflettanza spettrale che riporta per ciascuna lunghezza d'onda la percentuale di luce riflessa. Si tratta di tecniche che richiedono attrezzature specifiche, interfacciate con computer dedicati in cui i dati possano essere digitalizzati e conservati automaticamente in fogli di calcolo.

Come valutare il ruolo del colore di un fiore nell'attrazione degli impollinatori: il caso specifico delle api

Allo scopo di valutare come il colore di un fiore possa attirare l'attenzione degli impollinatori, un passo fondamentale è capire come essi percepiscono i diversi colori. Per fare questo, è stato introdotto il concetto di "disposizione spaziale dei colori" (*colour space*), indicato anche come diagramma cromatico. Si tratta di una rappresentazione grafica della percezione del colore di un animale in cui ciascun punto ha come coordinate i colori; pertanto, lo specifico posizionamento nello spazio è dipendente dalla capacità di distinguere quei colori da parte dell'animale (WYSZECKI, STILES, 1982; CHITTKA, WASER, 1997). Per molti anni, l'attenzione è stata concentrata sull'individuazione del diagramma cromatico che meglio rappresenta la percezione dei colori nelle api. I modelli più diffusi e più affidabili sono: il triangolo dei colori (*Colour triangle*), la codifica dei colori opposti (COC – *Colour Opponent Coding*) e l'esagono dei colori (*Colour Hexagon*). Il triangolo dei colori definisce uno spazio triangolare ai cui vertici si trovano i tre fotorecettori di colore delle api tricromatiche (UV, blu e verde). Il centro acromatico del triangolo è il punto in cui per definizione giace il colore dello sfondo. I punti del perimetro sono quelli caratterizzati da due sole componenti di colore. Ogni oggetto che si posiziona nel triangolo è caratterizzato da due coordinate che possono essere calcolate con apposite formule. Lo spazio COC per le api è stato definito da MENZEL, BACKHAUS (1989) e BACKHAUS (1991) con un approccio che tiene conto non solo delle proprietà fisiche del colore, ma anche di aspetti neurofisiologici e comportamentali dell'impollinatore. In particolare, questi autori considerano che i segnali dei fotorecettori sono integrati per mezzo di due tipi di processi, che chiamano dei colori opposti e definiscono gli assi principali del diagramma. Anche in questo caso sono definite alcune formule per il calcolo delle coordinate degli oggetti da riportare nel grafico. Infine, l'esagono dei colori non è altro che la proiezione di uno spazio di colori tridimensionale i cui assi corrispondono ai segnali dei fotorecettori dell'UV, blu e verde. Lo spazio esagonale è quindi diviso in 7 settori: UV-verde, UV, UV-blu, blu, blu-verde, verde, incolore. In questo caso, non sono fatte ipotesi di nessun tipo sui fenomeni neurofisiologici del cervello dell'impollinatore, ma il posizionamento di un punto in uno dei settori è definito da una serie di equazioni che prendono in considerazione solo i segnali dei tre fotorecettori. Esistono in letteratura molti altri modelli che cercano di spiegare la percezione del colore non solo nelle api ma anche in altri animali, compreso l'uomo; per maggiori approfondimenti si rimanda a testi specializzati.

Attrazione olfattiva

Gli odori emessi dai fiori giocano un ruolo fondamentale nell'interazione piante/animali e possono rappresentare segnali, in modo più o meno specializzato, della presenza di cibo, di un luogo sicuro in cui

deporre le uova oppure della possibilità di riprodursi. Il segnale olfattivo può essere percepito a lunga distanza, nel caso di fiori molto profumati, oppure può essere percepito appena nelle vicinanze del fiore, nel caso di aromi molto leggeri. Il segnale olfattivo è, nella maggioranza dei casi, connesso alla presenza di una ricompensa nutrizionale. Infatti, la maggior parte degli impollinatori visitano i fiori per raccogliere polline, nettare, olii e/o altri essudati. Si arriva a livelli di specializzazione tali che nei fiori che offrono una ricompensa, la presenza di uno specifico odore: a) fornisce l'identificazione della specie fiorita, b) indica il momento in cui si ha la massima disponibilità di polline, nettare e/o altri essudati, c) può attrarre l'impollinatore verso fiori più vecchi che non hanno più ricompense a disposizione, ma che sono ancora recettivi (DOBSON, BERGSTRÖM, 2000; RAGUSO, 2001). Quando la specializzazione è tale da creare una sorta di fedeltà degli impollinatori nei confronti di alcune specie di fiori, sono stati rilevati sistemi che ottimizzano l'efficienza del processo di impollinazione. I fiori che non offrono ricompense di tipo nutrizionale agli impollinatori, possono comunque emettere sostanze odorose che segnalano la presenza di altri tipi di ricompense. Oltre ai casi in cui i fiori producono odori che attraggono alcuni insetti per la deposizione delle uova, ben noti sono gli esempi di quelli che mimano la produzione di feromoni sessuali emessi dalla femmina di alcuni insetti in modo che il maschio, attratto dal segnale sessuale ed aiutato da quello morfologico e visivo, compia l'impollinazione nel tentativo di copulare. I livelli di specializzazione arrivano al punto che alcuni fiori già impollinati variano l'emissione di sostanze volatili simulando l'odore di femmine di insetti che si sono già accoppiate in modo da dirigere i maschi verso fiori non ancora impollinati (SCHIESTIL, AYASSE, 2001).

Il profumo può essere emesso da tutti gli organi floreali, solo dai petali, oppure solo dagli antofilli fertili, spesso associati a specifici tessuti ghiandolari, noti come osmofori, in modo da creare specifici pattern spaziali di aroma tra i diversi organi floreali, comunemente indicati come "guide del profumo". Anche il polline emette specifici odori (DOBSON, BERGSTRÖM, 2000). Il profumo può essere prodotto e rilasciato continuamente durante la vita del fiore, oppure può essere emesso in particolari momenti, legati alla fertilità degli organi floreali e talvolta collegati anche all'aumento della temperatura del fiore (SEYMOUR, SCHULZEN-MOTEL, 1997).

Il profumo di un fiore può derivare dall'emissione di un unico composto volatile oppure, più spesso, dalla combinazione di centinaia di sostanze che variano a seconda della specie e ne costituiscono il *bouquet*. I composti responsabili degli odori dei fiori possono essere classificati in diversi gruppi: derivati degli acidi grassi, terpenoidi, benzenoidi, ecc. Esistono anche fiori descritti come privi di odore. Tuttavia, non tutti sono d'accordo sull'esistenza di fiori inodori: la mancata percezione dell'odore può essere semplicemente dovuta all'applicazione di metodologie che utilizzano

tecnologie non abbastanza sensibili. Nella scelta della metodologia per “misurare” l’odore di un fiore, bisogna quindi non solo tener conto del fatto che le molecole responsabili dell’odore di un fiore possono appartenere a diverse classi di composti chimici, ma anche considerare le soglie di percezione degli strumenti utilizzati. Bisogna inoltre considerare che il *bouquet* di sostanze volatili emesse dai fiori non varia soltanto in funzione della specie: esiste infatti un’elevata variabilità tra parti fiorali di uno stesso fiore, tra fiori diversi della stessa pianta, tra piante diverse di una stessa popolazione e tra popolazioni diverse. Risulta quindi di fondamentale importanza analizzare sempre un numero elevato di campioni di fiori in modo da valutare anche eventuali differenze dovute all’effetto di peculiari condizioni ambientali.

Di seguito sono riportati alcuni esempi di metodologie, e le problematiche ad esse associate, per verificare il ruolo di attrazione giocato dai profumi dei fiori, con riferimento sia alle osservazioni del comportamento degli impollinatori, sia alle analisi chimiche delle sostanze responsabili dell’odore.

Percezione dell’odore di un fiore: come studiare il comportamento dell’impollinatore

La valutazione del ruolo che l’odore di un fiore ha nell’attrazione degli impollinatori è spesso resa difficile dall’interazione con altri stimoli, principalmente quelli visivi (per es. colore, forma, grandezza). Le metodologie utilizzate si basano sull’osservazione del comportamento dell’impollinatore in risposta agli stimoli olfattivi che possono essere proposti in campo e/o in laboratorio su diversi tipi di materiali. Per valutare la capacità di attrazione esercitata da un fiore per mezzo dei soli stimoli olfattivi, si procede generalmente racchiudendo i fiori in sacchetti di carta non trasparente, con dei fori appositamente disposti per permettere all’odore di espandersi in tutte le direzioni. In genere, il volo a zigzag dell’insetto verso l’oggetto coperto è indice di attrazione olfattiva. Quando invece, si vuole testare la capacità attrattiva per mezzo dei soli stimoli visivi, è possibile racchiudere ermeticamente i fiori in involucri trasparenti. L’esperimento si completa con lo studio del comportamento dell’impollinatore verso fiori non coperti in alcun modo. Confrontando il comportamento dell’insetto nelle varie condizioni, è possibile valutare l’importanza relativa dei due tipi di stimolo. Si tratta di esperimenti semplici da realizzare sia in campo sia in laboratorio, che possono precedere analisi più specifiche (GALEN *et al.*, 1987). Per studiare quali organi fiorali sono attivi nell’attrazione degli impollinatori, un’evoluzione di questo tipo di esperimenti può prevedere la rimozione di alcuni organi fiorali in una determinata area naturale in modo da osservare il comportamento degli insetti nei confronti dei fiori modificati rispetto a quelli normali (DOBSON *et al.*, 1999).

Altra metodologia prevede l’utilizzo di modelli di fiori a cui applicare l’odore artificialmente. Questo approccio, che può essere condotto sia in campo sia

in laboratorio, offre il vantaggio di poter provare l’effetto di più di un composto volatile singolarmente e/o di specifiche miscele di composti. Pur richiedendo che il modello utilizzato venga frequentemente “ricaricato” di profumo, ulteriori vantaggi sono la possibilità di poter combinare anche test per valutare l’effetto di altri stimoli e l’eliminazione di tutti i problemi legati alla variabilità naturale dell’odore dei fiori in natura (PELLMYR *et al.*, 1990).

Spesso si utilizzano i test di preferenza in cui singoli impollinatori sono posti contemporaneamente di fronte a più di due campioni (sorgenti di stimolo olfattivo) in modo da indurli a compiere delle scelte (ANDERSSON, DOBSON, 2003). In questi esperimenti, il campione può essere rappresentato da fiori freschi, parti di fiori, polline, carta da filtro impregnata di specifiche sostanze, oppure altri “oggetti” che sono posti in tubi di vetro schermati con carta, in modo da escludere gli stimoli visivi, e coperti da tessuto permeabile che possa far diffondere l’odore. Utilizzando questo approccio sperimentale si deve comunque tenere presente che le scelte possono essere influenzate da vari parametri tra cui l’età, il sesso e l’esperienza dell’impollinatore stesso. Se applicato in laboratorio, questo approccio risente del fatto che il comportamento dell’impollinatore in ambiente controllato può essere diverso da quello in ambiente naturale. L’utilizzo di tubi a forma di Y in cui l’impollinatore è posto di fronte ad un “bivio” rappresenta un buon test quantitativo per valutare l’attrazione relativa esercitata da due sorgenti di odore (o da una sorgente di odore rispetto ad un controllo che ne è privo). Questo metodo, generalmente applicato nel caso di insetti di piccole dimensioni, può dare buoni risultati anche se l’insetto può soltanto camminare nel tubo in quanto non riesce a volare (TAKABAYASHI, DICKE, 1992).

Più sofisticati sono gli esperimenti che prevedono lo studio del comportamento in volo di insetti all’interno di gallerie del vento in cui possono essere poste, oltre che sorgenti di determinati odori, anche sorgenti di altri tipi di stimolo. In questi esperimenti, le condizioni di luce e velocità del flusso d’aria dovrebbero essere impostate quanto più vicine alle condizioni naturali. Anche in questo caso il volo a zigzag è indice di attrazione olfattiva, mentre un volo apparentemente senza meta, intervallato da frequenti interruzioni, è indice di mancanza di percezione di stimoli olfattivi. Questo approccio è utilizzato principalmente nello studio del comportamento dei lepidotteri e di altri insetti che si orientano principalmente per mezzo di stimoli olfattivi anche a distanze elevate (HAYNES *et al.*, 1991; PLEPYS *et al.*, 2002).

Ancor più complessi sono gli esperimenti di condizionamento (apprendimento associativo) che prevedono proprio una sorta di condizionamento dell’impollinatore a cui si cerca di insegnare preventivamente a riconoscere alcuni odori e collegarli a specifiche ricompense. Questi esperimenti forniscono una buona misura di quanto un insetto sia capace di imparare a riconoscere composti volatili singoli oppure in miscela. Gli stimoli olfattivi possono esse-

re combinati anche con altri stimoli in design sperimentali che prevedano test sempre più complessi. Si tratta tuttavia di esperimenti che funzionano bene con insetti che possono essere facilmente ammaestrati come le api da miele e i bombi (WALLER *et al.*, 1972; PHAM-DELEGUE *et al.*, 1986).

Infine, un approccio più quantitativo prevede la combinazione di tecniche gas-cromatografiche con l'elettro-antennografia (GC-EAD). Si tratta di una tecnica molto sofisticata che si basa sulle risposte elettro-fisiologiche dell'insetto e che permette di individuare con esattezza le componenti fisiologicamente attive tra tutte le molecole presenti nel bouquet (Fig. 4) (SCHIESTL, AYASSE, 2002; STENSMYR *et al.*, 2002; SALZMANN *et al.*, 2007; STÖKL *et al.*, 2010). Tuttavia, poiché le sostanze che stimolano la reazione dell'antenna dell'insetto non necessariamente corrispondono al segnale attrattivo, questo metodo deve essere utilizzato in combinazione con altri.

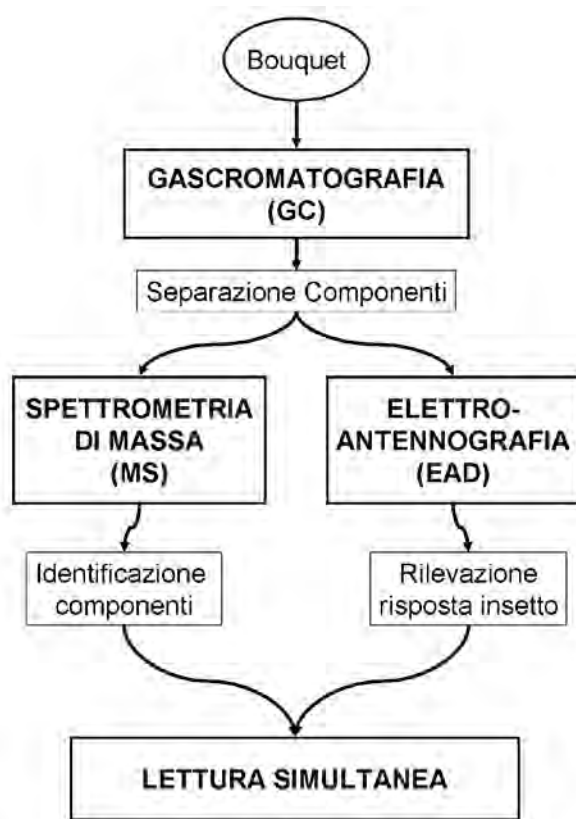


Fig. 4

Schema dell'identificazione di quelle componenti volatili del fiore che stimolano una risposta da parte del pronubo, attraverso l'utilizzo di tecniche gas-cromatografiche (GC) abbinate a spettrometria di massa (MS) e ad elettro-antennografia (EAD).

Flow chart of the identification of the floral volatile compounds that elicit a response by the pollinator, using gas chromatographic (GC) techniques matched with mass spectrometry (MS) and electroantennographic signals (EAD).

Misura dell'odore di un fiore: i metodi analitici

La quantificazione dell'odore emesso da un fiore prevede tre momenti fondamentali: a) la localizzazione delle parti floreali che emettono le sostanze odorose, b) la raccolta di tali sostanze, c) la loro analisi intesa sia come identificazione dei principali composti chimici sia come valutazione della velocità con cui essi sono emessi. Le varie fasi di lavoro, benché intuitive, possono essere di difficile attuazione e controllo per una serie di motivi. Prima di tutto, l'odore è generato da sostanze volatili che richiedono particolari accorgimenti per essere campionate. Inoltre, la composizione chimica può variare in funzione degli organi floreali, dello stadio fenologico e delle condizioni ambientali. Di conseguenza, ogni sperimentazione deve essere ben pianificata allo scopo di prevedere più controlli e la giusta calibrazione degli standard da utilizzare nelle diverse analisi. Anche se negli ultimi anni si è assistito ad un significativo miglioramento delle tecniche analitiche delle componenti volatili, soprattutto per quanto riguarda riproducibilità e sensibilità, è sempre consigliabile applicare contemporaneamente più di un approccio.

Il primo passo per l'analisi degli odori floreali riguarda l'individuazione delle parti che esalano le sostanze volatili. Mentre in alcuni casi, è l'intero fiore ad emettere odore, in altri casi ci possono essere tessuti ghiandolari specializzati, gli osmofori, localizzati su specifici organi. Un primo semplicistico, ma pur efficace, approccio per identificare le sorgenti di odore prevede: la dissezione del fiore, la separazione e la conservazione degli organi floreali in provette da sigillare in modo da far accumulare l'odore, l'analisi olfattiva sensoriale dello spazio di testa delle provette da parte di un panel di volontari abituati a questo tipo di valutazioni (D'ARCY *et al.*, 1990). L'analisi sensoriale dovrebbe essere ripetuta su più fiori per comprendere la variabilità naturale. Metodo meno soggettivo, è la colorazione delle parti floreali dissezionate con rosso neutro, un colorante utilizzato in istologia per mettere in evidenza i tessuti ghiandolari. In questo caso, bisogna stare attenti a valutare se le parti che rispondono positivamente alla colorazione sono realmente tessuti ghiandolari poiché questo colorante reagisce positivamente anche con il pollenkitt ed in generale con gli oli volatili che possono essere presenti a livello di tutti i tessuti danneggiati. Essendo inoltre un colorante solubile in acqua, tutti i punti in cui l'epidermide è stata danneggiata potrebbero dare origine a falsi positivi. Infine, il contrasto di colore non è facilmente apprezzabile nei fiori di colore scuro.

Una volta individuate le parti floreali che emettono sostanze odorose, queste devono essere concentrate e campionate. Si possono utilizzare camere di vario materiale (per es. vetro silanizzato, plexiglas, teflon, ecc.), che vengono generalmente indicate come camere per lo spazio di testa (*headspace chambre*), in cui le sostanze volatili possono essere concentrate con metodi statici o dinamici. Nel primo caso, una volta raggiunto l'equilibrio tra le emissioni floreali e lo spa-

zio di testa della camera, l'aria viene aspirata direttamente con una siringa o viene adsorbita attraverso una fibra a microestrazione in fase solida (*solid-phase microextraction* - SPME) per le successive analisi gascromatografiche. Con queste tecniche, i tempi ottimali per il raggiungimento dell'equilibrio nello spazio di testa e per l'esposizione delle fibre dovrebbe essere determinato sperimentalmente per ciascun fiore o parte fiorale analizzata. I metodi dinamici prevedono invece il passaggio dell'aria attraverso contenitori in cui sono inseriti fiori/parti fiorali, parti vegetative, oltre che controlli con sola aria, collegati tra loro e ad una pompa da vuoto in modo specifico per creare correnti d'aria alla velocità desiderata, che permettono l'adsorbimento delle componenti fiorali volatili su speciali cartucce equipaggiate con polimeri assorbenti. Anche in questo caso, le sostanze volatili desorbite dalle cartucce sono sottoposte a gas-cromatografia. [Per i dettagli su queste tecniche, su vantaggi e svantaggi dei diversi materiali adsorbenti e sui solventi per l'eluizione delle sostanze volatili catturate, si rimanda a pubblicazioni specializzate tra cui: AGELOPOULOS, PICKETT (1998) e RAGUSO, PELLMYR (1998)].

La caratterizzazione delle componenti volatili raccolte è infine eseguita attraverso gas-cromatografia che consente di ottenere cromatogrammi dalla cui analisi si possono separare i picchi delle diverse sostanze ed ottenere anche informazioni quantitative attraverso il confronto con standard interni. Con questa tecnica, i campioni derivanti dalla stessa specie, o in generale da uno stesso campionamento, dovrebbero essere analizzati durante la stessa sessione di lavoro per minimizzare eventuali errori riconducibili a variazioni di sensibilità delle apparecchiature utilizzate. Allo stesso tempo, bisognerebbe analizzare anche campioni di parti vegetative, o semplicemente di aria, allo scopo di utilizzare i relativi cromatogrammi per escludere il rumore di fondo o picchi di eventuali contaminanti presenti. Una volta separati i picchi con tecniche cromatografiche, sarebbe desiderabile anche identificarli per mezzo di sistemi più o meno complessi che sono capaci di individuare sostanze note. Nel caso però di sostanze volatili non ancora note, le analisi gascromatografiche devono essere accompagnate dalla spettrometria di massa (ADAMS, 2001).

Analisi delle componenti volatili di un fiore: elementi di variabilità

L'odore dei fiori è dato da migliaia di componenti volatili diverse. Basti pensare che i risultati delle analisi condotte dal 1966 al 2001 sulle componenti volatili emesse da fiori di 930 *taxa* hanno evidenziato circa 1550 composti differenti. La maggior parte di essi appartiene a tre classi principali: composti alifatici, benzenoidi e terpenoidi. Alcuni composti contengono anche azoto e zolfo. Lo studio di queste componenti volatili è reso complesso dall'incredibile variabilità che si può osservare in natura tra fiori di specie diverse e dall'altrettanto elevata variabilità che

esiste tra fiori diversi nell'ambito di una stessa specie o addirittura della stessa pianta. Considerata questa variabilità, è fondamentale eseguire le analisi su un numero di campioni rappresentativo dell'intera popolazione. Soprattutto negli studi di tipo comparativo, affinché i risultati siano affidabili, è importante standardizzare sia i metodi di campionamento sia le procedure analitiche delle componenti volatili. Conoscere quali sono le fonti di variabilità può aiutare ad eseguire il campionamento in modo appropriato allo scopo di evitare di introdurre errori nella valutazione.

Una prima fonte di variabilità è legata alle differenze nell'emissione degli odori tra fiori ancora attaccati alla pianta e quelli recisi, anche se le opinioni sull'entità di eventuali differenze sono spesso contrastanti (MOOKHERJEE *et al.*, 1990; LOUGHRIN *et al.*, 1993). Per quanto riguarda la variabilità interna al fiore, le componenti volatili dovrebbero essere raccolte sia da fiori interi, sia dai singoli organi dopo aver dissezionato il fiore stesso. In questo caso, si potrebbero apprezzare eventuali differenze sia qualitative che quantitative tra le differenti parti fiorali. È noto infatti che molte specie che attraggono gli insetti per mezzo di ricompense presentano l'androceo ed il polline stesso che emettono in modo differente rispetto alle altre parti fiorali (DOBSON, BERGSTRÖM, 2000). Relativamente alla variabilità tra fiori all'interno della stessa pianta, essa è dovuta ad una serie di fattori tra cui l'età del fiore, la posizione all'interno di eventuali infiorescenze, ma anche la maturità sessuale e lo stato di impollinazione (SCHIELTL, AYASSE, 2001). Infine, alcune specie presentano anche una sorta di ciclicità con cui emettono le sostanze odorose, regolata da fattori ambientali come fotoperiodo, temperatura e disponibilità idrica oppure dai ritmi circadiani (HANSTED *et al.*, 1994; HELSPER *et al.*, 1998).

Ruolo dello studio del comportamento dell'impollinatore

Nello studio delle interazioni tra fiore ed insetto impollinatore, per una valida impostazione delle prove sperimentali e per la corretta interpretazione dei risultati ottenuti, è necessario un approccio interdisciplinare che dia ampio spazio alle conoscenze del comportamento dei pronubi coinvolti. I principi alla base dei test di comportamento degli impollinatori si fondano essenzialmente su risposte neuro-fisiologiche di individui, dei quali dovremmo già in parte conoscere il ciclo biologico e possibilmente i comportamenti legati all'acquisizione delle risorse. Sia nel caso di impollinatori per i quali esiste una ben documentata letteratura, sia per quelli meno noti, bisogna tenere presente che ogni specie di insetto ha caratteristiche comportamentali proprie ed un modo specifico di interagire con i fiori, che dipendono da numerosi fattori intrinseci ed estrinseci. Alcuni di questi, come ad esempio i bisogni nutrizionali e la distribuzione spaziale e temporale delle risorse, possono essere molto diversi se l'impollinatore è: a) un'ape da miele, ovvero una specie sociale la cui ricerca di cibo è un'attività di collaborazione tra più individui

(CALDERONE, JOHNSON, 2002; GOULSON *et al.*, 2007); b) un'ape solitaria, in cui ogni femmina è individualmente responsabile sia della ricerca di cibo sia di altre attività legate alla propria riproduzione (GIOVANETTI, LASSO, 2005; LARSSON, FRANZÉN, 2007); c) un lepidottero o un dittero che cercano cibo per la propria sopravvivenza. Altri fattori invece, come habitat, condizioni di illuminazione, temperatura ed umidità dell'aria, possono determinare effetti simili su specie diverse di impollinatori (WILLMER, STONE, 1997; BORREL, MEDEIROS, 2004; BEIL *et al.*, 2008). Un altro fattore che può influenzare gli impollinatori di una data specie, e la loro efficienza, è la competizione per la medesima risorsa (GIOVANETTI *et al.*, 2006; GREENLEAF, KREMEN, 2006).

Nel caso in cui tra i visitatori vi siano quegli imenotteri sociali che si prestano alla manipolazione sperimentale, gli studi possono essere approfonditi ulteriormente, come descritto in precedenza. I comportamenti osservati in impollinatori studiati in ambiente controllato, come ad esempio gabbie e camere di crescita, non necessariamente corrispondono a quelli che si avrebbero in condizioni naturali. Tuttavia, le osservazioni in ambiente controllato offrono il vantaggio di poter separare ed analizzare singolarmente stimoli di diverso tipo. Alcuni insetti, tra cui api da miele e bombi, dopo la visita, lasciano una marcatura che interferisce con le sostanze volatili emesse dal fiore interferendo sulla percezione dell'odore da parte del visitatore successivo (GOULSON, 2000): questo può costituire un problema, per esempio, nell'interpretazione di dati raccolti in campo. Un altro aspetto da non trascurare riguarda le abilità di apprendimento. Ciascun individuo dovrebbe essere sottoposto ad un solo esperimento in quanto le informazioni apprese durante la prima esperienza potrebbero influenzare il risultato dei test successivi. È pertanto sempre più diffuso l'uso di individui senza esperienza pregressa, *naïve*, (per es. LUNAU *et al.*, 1996). Nell'interpretazione dei dati di esperimenti con insetti catturati in campo si deve quindi tenere sempre presente che non si può sapere se lo stesso individuo ha già maturato precedenti esperienze. Infine, anche nell'ambito di una stessa specie esiste una certa variabilità nel comportamento di individui diversi; di conseguenza nei test un campione significativo non dovrebbe contare meno di 10-30 individui.

Uno studio sull'interazione fiore-insetto impollinatore dovrebbe: a) identificare i visitatori e accertare sperimentalmente il successo della loro visita, in termini di efficienza di trasferimento del polline e b) conoscere la tipologia di interesse dell'impollinatore nei confronti del fiore (per es.: se procura cibo per sé o per la progenie, raccoglie nettare e/o polline) per meglio interpretare dati quali frequenza delle visite, abilità manipolativa del fiore, costanza florale. Infine i risultati dovrebbero essere inseriti in un contesto più ampio che valuti l'importanza dell'interazione tra pianta e impollinatore per la sopravvivenza a medio e lungo termine di una o entrambe le specie (GIOVANETTI *et al.*, 2007).

In conclusione, è evidente che lo studio del complesso processo di impollinazione non può limitarsi alla descrizione dei fenomeni osservati, ma deve ricorrere sempre ad un approccio di tipo sperimentale. Inoltre, sia nella fase di pianificazione degli esperimenti sia in quella di interpretazione dei dati raccolti, si deve affrontare il processo nella sua complessità e prendere in esame i diversi aspetti con un approccio interdisciplinare, possibilmente utilizzando sistemi di tipo olistico.

LETTERATURA CITATA

- ACKERMANN J.D., 2000 – *Abiotic pollen and pollination: ecological, functional, and evolutionary perspectives*. Plant Syst. Evol., 222: 167-185.
- ADAMS R.P., 2001 – *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadruple mass spectroscopy*. 3rd Ed. Allured Publishing Co., New York, New York, USA.
- AGELOPOULOS N.G., PICKETT J.A., 1998 – *Head space analysis ecology: effects of different sampling methods on ratios of volatile compounds present in head space sample*. J. Chem. Ecol., 24: 1161-1172.
- ANDERSON S., DOBSON H.E.M., 2003 – *Behavioral foraging responses by the butterfly Heliconius melpomene to Lantana camara floral scent*. J. Chem. Ecol., 29: 2303-2318.
- ARONNE G., 1999 – *Effects of relative humidity and temperature stress on pollen of Cistus incanus L. and Myrtus communis L.* Grana, 38: 364-367.
- ARONNE G., WILCOCK C.C., PIZZOLONGO P., 1993 – *Pollination biology and sexual differentiation of Ostrya alba L. (Santalaceae) in the Mediterranean*. Plant Syst. Evol., 188: 1-16.
- ARROYO M.T.K., SQUEO F.A., 1987 – *Experimental detection of anemophily in Pernettya mucronata (Ericaceae) in Western Patagonia, Chile*. Bot. Jahrbüch. Syst., Pflanzenges. Pflanzengeogr., 108: 537-546.
- BACKHAUS W., 1991 – *Color opponent coding in the visual system of the honeybee*. Vision Res., 31: 1381-1397.
- BEIL M., HORN H., SCHWABE A., 2008 – *Analysis of pollen loads in a wild bee community (Hymenoptera, Apidae) - a method for elucidating habitat use and foraging distances*. Apidologie, 39: 456-467.
- BORRELL B.J., MEDEIROS M.J., 2004 – *Thermal stability and muscle efficiency in hovering orchid bees (Apidae: Euglossinae)*. J. Exp. Biol., 207: 2925-2933.
- CALDERONE N.W., JOHNSON B.R., 2002 – *The within-nest behaviour of honeybee pollen foragers in colonies with a high or low need for pollen*. Anim. Behav., 63: 749-758.
- CHITTKA L., 1996 – *Optimal sets of color receptors and opponent processes for coding of natural objects in insect vision*. J. Theor. Biol., 181: 179-196.
- CHITTKA L., SHMIDA A., TROJE N., MENZEL R., 1994 – *Ultraviolet as a component of flower reflection, and the color perception of Hymenoptera*. Vision Res., 34: 1489-1508.
- CHITTKA L., WASER N.M., 1997 – *Why red flowers are not invisible for bees?* Israel J. Plant Sci., 45: 169-183.
- D'ARCY W.G., D'ARCY N., KEATING R.C., 1990 – *Scented anthers in the Solanaceae*. Rhodora, 92: 50-53.
- DAFNI A., 1992 – *Pollination ecology: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- , 1994 – *Notes on side advertisement in flowers*. Funct. Ecol., 8: 136-138.
- DAFNI A., KEVAN P.G., 1997 – *Flower size and shape and*

- their implications in pollination.* Israel J. Plant Sci., 45: 201-211.
- DAFNI A., KEVAN P.G., HUSBAND B.C., 2005 – *Practical pollination biology.* Enviroquest, Ltd., Cambridge, Ontario, Canada.
- DAFNI A., LEHRER M., KEVAN P.G., 1997 – *Spatial flower parameters and insect spatial vision.* Biol. Rev., 72: 239-282.
- DI GIOVANNI F., KEVAN P.G., CARON G.-É., 1996 – *Estimating the timing of maximum pollen release from jack pine (Pinus banksiana Lamb.) in northern Ontario.* For. Chron., 72: 166-169.
- DI GIOVANNI F., KEVAN P.G., NASR M.E., 1995 – *The variability in settling velocities of some pollen and spores.* Grana, 34: 39-44.
- DOBSON H.E.M., BERGSTRÖM G., 2000 – *Ecology and evolution of pollen odors.* Plant Syst. Evol., 222: 63-87.
- DOBSON H.E.M., DANIELSON E.M., VAN-WESEF I.D., 1999 – *Pollen odours chemicals as modulators of bumblebees foraging on Rosa rugosa Thunb. (Rosaceae).* Plant Species Biol., 14: 153-166.
- ERDTMANN G., 1969 – *Handbook of palynology.* Munksgaard, Copenhagen, Denmark.
- FAEGRI K., VAN DER PIJL L., 1979 – *The principles of pollination ecology.* 2nd Edition. Pergamon Press, Oxford.
- GALEN C., ZIMMER K.A., NEWPORT M.E., 1987 – *Pollination in floral scent morphs of Polemonium viscosum: a mechanism for disruptive selection on flower size.* Evolution, 41: 599-606.
- GIOVANETTI M., CERVERA J.C., ANDRADE J.L., 2007 – *Pollinators of an endemic and endangered species, Mammillaria gaumeri (Cactaceae), in its natural habitat (coastal dune) and in a botanical garden.* Madroño, 54(4): 286-292.
- GIOVANETTI M., LASSO E., 2005 – *Body size, loading capacity and rate of reproduction in the communal bee Andrena agillissima (Hymenoptera; Andrenidae).* Apidologie, 36: 439-447.
- GIOVANETTI M., LUPPINO S., ZOLA R., 2006 – *Preliminary note on the relative frequencies of two bees on wild Brassicaceae: oligolectic Andrena agillissima vs. polylectic Apis mellifera.* Bull. Insectol., 59(2): 53-56.
- GIURFA M., VOROBYEV M., KEVAN P.G., MENZEL R., 1996 – *Detection of coloured stimuli by honeybees: minimum visual angles and receptor specific contrasts.* J. Comp. Physiol. A, 178: 699-710.
- GOULSON D., 2000 – *Are insects flower constant because they use search images to find flowers?* Oikos, 88: 547-552.
- GOULSON D., CRUISE J.L., SPARROW K.R., HARRIS A.J., PARK K.J., TINSLEY M.C., GILBURN A.S., 2007 – *Choosing rewarding flowers; perceptual limitations and innate preferences influence decision making in bumblebees and honeybees.* Behav. Ecol. Sociobiol., 61: 1523-1529.
- GREENLEAF S.S., KREMEN C., 2006 – *Wild bee species increase tomato production and respond differently to surrounding land use in Northern California.* Biol. Conserv., 133: 81-87.
- HANSTED L., JAKOBSON H.B., OLSEN C.E., 1994 – *Influence of temperature on the rhythmic emission of volatiles from Ribes nigrum flowers in situ.* Plant. Cell Environm., 17: 1069-1072.
- HAYNES K.F., ZHAO J.A., LATIF A., 1991 – *Identification of floral compounds from Abelia grandiflora that stimulate upwind flight in cabbage looper moths.* J. Chem. Ecol., 17: 637-646.
- HELSPER J.P.F.G., DAVIES J.A., BOUWMEESTER H.J., KROL A.F., VAN KAMPEN M.H., 1998 – *Circadian rhythmicity in emission of volatile compounds by flowers of Rosa hybrida L. cv. Honesty.* Planta, 207: 88-95.
- HERTZ M., 1933 – *Über figurale Intensitäten und Qualitäten in der optischen Wahrnehmung der Biene.* Biol. Zentralbl., 53: 10-40.
- JONES C.E., BUCHMANN S.L., 1974 – *Ultraviolet floral patterns as functional orientation cues in hymenopterous pollination systems.* Anim. Behav., 22: 481-485.
- KEARNS C.A., INOUE D.W., 1993 – *Techniques for pollination biologists.* University Press of Colorado, Niwot, Colorado, USA.
- KEVAN P.G., 1972 – *Insect pollination of high arctic flowers.* J. Ecol., 60(3): 831-847.
- , 1983 – *Floral colors through the insect eye: what they are and what they mean.* In: JONES C.E., LITTLE R.J. (Eds.), *Handbook of experimental pollination biology.* Scientific and Academic Editions. Van Nostrand Reinhold Company, New York, USA.
- LARSSON M., FRANZÉN M., 2007 – *Critical resource levels of pollen for the declining bee Andrena hattorfiana (Hymenoptera, Andrenidae).* Biol. Conserv., 134(3): 405-414.
- LEHRER M., 1993 – *Parallel processing of motion, colour and shape in the visual system of the honeybee.* In: WEISE K. (Ed.), *Arthropod sensory systems:* 266-272. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- LEHRER M., BISHOP S., 1995 – *Detection of model flowers by honeybees: the role of chromatic and achromatic contrast.* Naturwissenschaften, 82: 145-147.
- LOUGHRIN G.H., HAMILTON-KEMP T.R., BURTON H.R., ANDERSEN R.A., 1993 – *Effects of diurnal sampling on the head space composition of detached Nicotiana suaveolens flowers.* Phytochemistry, 32: 1417-1419.
- LUNAU K., WACHT S., CHITTKA L., 1996 – *Colour choices of naive bumble bees and their implications for colour perception.* J. Comp. Physiol. A, 178: 477-489.
- MCCREA K.D., LEVY M., 1983 – *Photographic visualization of floral colors as perceived by honeybee pollinators.* Am. J. Bot., 70(3): 369-375.
- MENZEL R., BACKHAUS W., 1989 – *Color vision honeybees: phenomena and physiological mechanisms.* In: STAVENGA D., HARDIE R. (Eds.), *Facets of vision:* 281-297. Springer Berlin, Germany.
- MOOKHERJEE B.D., TRENKLE R.W., WILSON R.A., 1990 – *The chemistry of flowers, fruits and species: live vs. dead a new dimension in fragrance research.* Pure Appl. Chem., 62: 1357-1364.
- NICOLSON S.W., NEPI M., PACINI E. (Eds.), 2007 – *Nectararies and Nectar.* Springer, Dordrecht, NL.
- NIKLAS K.J., 1984 – *The motion of windborne pollen grains around conifer ovulate cones: implications on wind pollination.* Am. J. Bot., 71(3): 356-374.
- , 1985a – *The aerodynamics of wind pollination.* Bot. Rev., 51(3): 328-386.
- , 1985b – *Wind pollination – a study in controlled chaos.* Am. Scientist, 73: 462-470.
- , 1985c – *Wind pollination of Taxus cuspidata.* Am. J. Bot., 72(1): 1-13.
- NIKLAS K.J., BUCHMANN S.L., 1988 – *Aerobiology and pollen capture of orchard-grown Pistacia vera (Anacardiaceae).* Am. J. Bot., 75(12): 1813-1829.
- PACINI E., FRANCHI G.G., 1998 – *Pollen dispersal units, gynoeceum and pollination.* In: OWENS S.J., RUNDAL P.I. (Eds.), *Reproductive Biology:* 183-195. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- PACINI E., FRANCHI G.G., LISCI M., NEPI M., 1997 – *Pollen Viability Related to Type of Pollination in Six Angiosperm Species.* Ann. Bot., 80: 83-87
- PACINI E., HESSE M., 2004 – *Cytophysiology of pollen pres-*

- entation and dispersal. *Flora*, 199: 273-285.
- PELLMYR O., THIEN L.B., BERGSTRÖM G., GROTH I., 1990 – *Pollination of New Caledonian Winteraceae: opportunistic shifts or parallel radiation with their pollinator*. *Plant Syst. Evol.*, 173: 143-157.
- PHAM-DELEGUE M.H., MASSON C., ETIEVANT P., AZAR M., 1986 – *Selective olfactory choices of the honeybee among some flower aromas: a study by combined olfactory conditioning and chemical analysis*. *J. Chem. Ecol.*, 12: 781-793.
- PLEPYS D., IBARRA F., FRANCKE W., LÖFSTEDT C., 2002 – *Odour mediated nectar foraging in the silver Y moth Autographa gamma L. (Lepidoptera: Noctuidae): behavioral and electrophysiological responses to floral volatiles*. *Oikos*, 99: 75-82.
- RAGUSO R.A., 2001 – *Floral scent, olfaction and scent driven foraging behavior*. In: CHITTKA L., THOMPSON J.D. (Eds.), *Cognitive ecology of pollination*: 83-105. University Press, Cambridge, UK.
- RAGUSO R.A., PELLMYR O., 1998 – *Dynamic head space analysis of floral volatiles: a comparison of methods*. *Oikos*, 81: 238-254.
- REAL L. (Ed.), 1983 – *Pollination biology*. Academic Press, Orlando, Florida, USA.
- REESE C.S.L., BARROWS E.M., 1980 – *Co-evolution of Claytonia virginica (Portulacaceae) and its main native pollinator, Andrena erigeniae (Andrenidae)*. *Proc. Entomol. Soc. Washington*, 82: 685-694.
- SACCHI C.F., PRICE P.W., 1988 – *Pollination of the arroyo willow, Salix lasiolepis: role of insects and wind*. *Am. J. Bot.*, 75(9): 1387-1393.
- SALZMANN C.C., NARDELLA A.M., COZZOLINO S.M., SCHIESTL F.P., 2007 – *Variability in floral scent in rewarding and deceptive orchids: the signature of pollinator-imposed selection?* *Ann. Bot.*, 100: 757-765.
- SCHIESTL F.P., AYASSE M., 2001 – *Post-pollination emission of repellent compound in a sexually deceptive orchid: a new mechanism of maximizing reproductive success*. *Oecologia*, 126: 531-534.
- , 2002 – *Do changes in floral odor cause speciation in sexually deceptive orchids?* *Plant Syst. Evol.*, 234: 111-119.
- SEYMOUR R.S., SCHULZEN-MOTEL P., 1997 – *Heat-producing flowers*. *Endeavour*, 21: 125-129.
- SMUTS J.C., 1926 – *Holism and evolution*. MacMillan, London, UK.
- SRINIVASAN M.V., 1993 – *How insects infer range from visual motion*. In: MILES F.A., WALLMAN J. (Eds.), *Visual motion and its role in the stabilization of the gaze*: 139-156. Elsevier, Amsterdam, NL.
- STENSMYR M.C., URRU I., COLLU I., CELANDER M., HANSSON B.S., ANGIOY A.M., 2002 – *Pollination: Rotting smell of dead-horse arum florets*. *Nature*, 420: 625-626.
- STÖKL J., STRUTZ A., DAFNI A., SVATOS A., DOUBSKY J., KNADEN M., SACHSE M., HANSSON B.S., STENSMYR M.C., 2010 – *A deceptive pollination system targeting drosophilids through olfactory mimicry of yeast*. *Curr. Biol.*, 20: 1846-1852.
- TAKABAYASHI J., DICKE M., 1992 – *Response of predatory mites with different rearing histories to volatiles of unfested plants*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 64: 187-193.
- TUCKER A.O., MACIARIELLO M.J., TUCKER S.S., 1991 – *A survey of color charts for biological descriptions*. *Taxon*, 40: 201-214.
- WALLER G.D., CARPENTER E.W., ZIEHL O.A., 1972 – *Potassium in onion nectar and its probable effect on attractiveness of onion flowers to honey bees*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 97: 535-539.
- WEHNER R., 1981 – *Spatial vision in arthropods*. In: AUTRUM H. (Ed.), *Comparative physiology and evolution of vision in invertebrates*: 287-616. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- WEISS M.R., 2001 – *Vision and learning in some neglected pollinators: beetles, flies, moths, and butterflies*. In: CHITTKA L., THOMPSON J.D. (Eds.), *Cognitive ecology of pollination*: 171-190. University Press, Cambridge, UK.
- WHITEHEAD D.R., 1983 – *Wind pollination: some ecological and evolutionary perspectives*. In: REAL L. (Ed.), *Pollination biology*: 97-108.
- WILLMER P., STONE G., 1997 – *Temperature and water relations in desert bees*. *J. Th. Biol.*, 22(6): 453-465.
- WYSZECKI G., STILES W.S., 1982 – *Color science: concepts and methods, quantitative data and formula*. Wiley, New York, New York, USA.

RIASSUNTO - Come per altri sistemi complessi, il processo di impollinazione non può essere spiegato esclusivamente tramite la somma delle sue componenti. Pertanto, lo studio analitico dei diversi aspetti deve essere affrontato con il metodo sperimentale, ma svolto con un approccio interdisciplinare e possibilmente olistico. Nel testo si riporta una breve storia degli studi sull'impollinazione ed una ampia sintesi dell'attuale approccio scientifico utilizzato per studiare i sistemi di trasporto del polline anemofilo ed entomofilo. Si descrivono le metodologie esistenti per valutare con test sperimentali il ruolo del vento nel trasporto del polline e le caratteristiche dei fiori nel fenomeno di attrazione degli insetti. Particolare attenzione è rivolta ai metodi sviluppati per stimare forme, colori e odori dei fiori, sottolineando l'importanza di comprendere i processi cognitivi di base messi in atto dagli impollinatori. Questa sintesi, pur non occupandosi di tutti gli aspetti analizzabili in quest'ampia tematica, vuole essere uno stimolo ad affrontarla sperimentalmente, tenendo presente che l'intrinseca complessità pone importanti limiti di cui bisogna esser consci. Per questa ragione, si enfatizzano aspetti spesso sottostimati il cui studio coinvolge altre discipline quali la fisica, la chimica, l'anatomia, la neurobiologia e l'etologia; infine si sottolinea l'importanza della collaborazione interdisciplinare per ottenere una visione d'insieme.

AUTORI

Giovanna Aronne, Veronica De Micco, Manuela Giovanetti, Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale, Università di Napoli Federico II, Via Università 100, 80055 Portici (Napoli)