

LA QUALITÀ DEL POLLINE NELL'IMPOLLINAZIONE DELL'ACTINIDIA POLLEN QUALITY FOR KIWIFRUIT POLLINATION

Gianni Tacconi, Fulvia Rizza.

CRA-GPG Centro di Ricerche per la Genomica e la Postgenomica Animale e Vegetale
via S.Protaso, 302, 29017 Fiorenzuola d'Arda, Piacenza, Italia, tacconig@yahoo.com



Il presente lavoro è stato selezionato come presentazione orale al 9° Convegno Nazionale Actinidia 2009: il testo e le foto sono fedeli agli atti pubblicati ed alla presentazione orale.

Parole chiave: germinabilità, energia germinativa, umidità, stress.

L'impollinazione dell'actinidia è una pratica agricola sempre più in uso nella moderna kiwi-coltura che abbia come obiettivo primario la qualità del prodotto, l'uniformità di pezzature e la certezza di una buona produzione. Il presupposto fondamentale affinché l'impollinazione abbia successo è disporre di polline di qualità ed una adeguata tecnica di raccolta e di distribuzione.

Il presente lavoro è volto pertanto lo studio dei parametri relativi alla qualità del polline, a partire dalla fase di raccolta fino alla sua distribuzione e conservazione (Fig. 1). Definire la qualità del polline solo in termini di germinabilità appare riduttivo: nel presente lavoro vengono considerati anche l'energia germinativa, l'uniformità di germinazione, l'umidità alla raccolta e la reazione a specifici test a microscopio. Tali parametri vengono valutati in diverse condizioni di raccolta, conservazione a breve e lungo termine e a diverse temperature, preparazione del polline e sistemi di impollinazione (sia a secco che a liquido), il tutto poi valutato anche in termini di pezzatura dei frutti, rapporto lunghezza-diametro e numero dei semi. Per esempio, un polline che abbia subito degli stress, quali temperature elevate alla raccolta, errate manipolazioni, conservazione non adeguata, elevata umidità durante la conservazione, evidenzia un calo delle sue performance soprattutto considerando i suddetti parametri più che in termini di riduzione della germinabilità. Analogamente la qualità del polline è migliore se questo viene raccolto con sistema di separazione a filtro rispetto alla separazione a ciclone.

Key words: germinability, humidity, germination energy, stress.

kiwifruit vine artificial pollination is nowadays a consolidate technique to increase kiwifruit quality and quantity. High quality pollen is basic for good results: consider pollen germinability is reductive, other parameters must be contemplate in order to evaluate pollen stresses and conservability. In this work we evaluate germinability, germination energy, humidity and reaction to specific microscope assay. We evaluate

these parameters under different condition of pollen harvesting, conservation at different temperature and time of temperature exposure, manipulation before and during pollination, different pollination systems (dry and wet). For example, stresses against pollen during harvest and manipulation result in germination energy decrease more than germinability decrease, analogously, about the harvest system, filter separation is more careful than cyclone separation. We considered also fruit size and seeds number observed under different pollination systems.

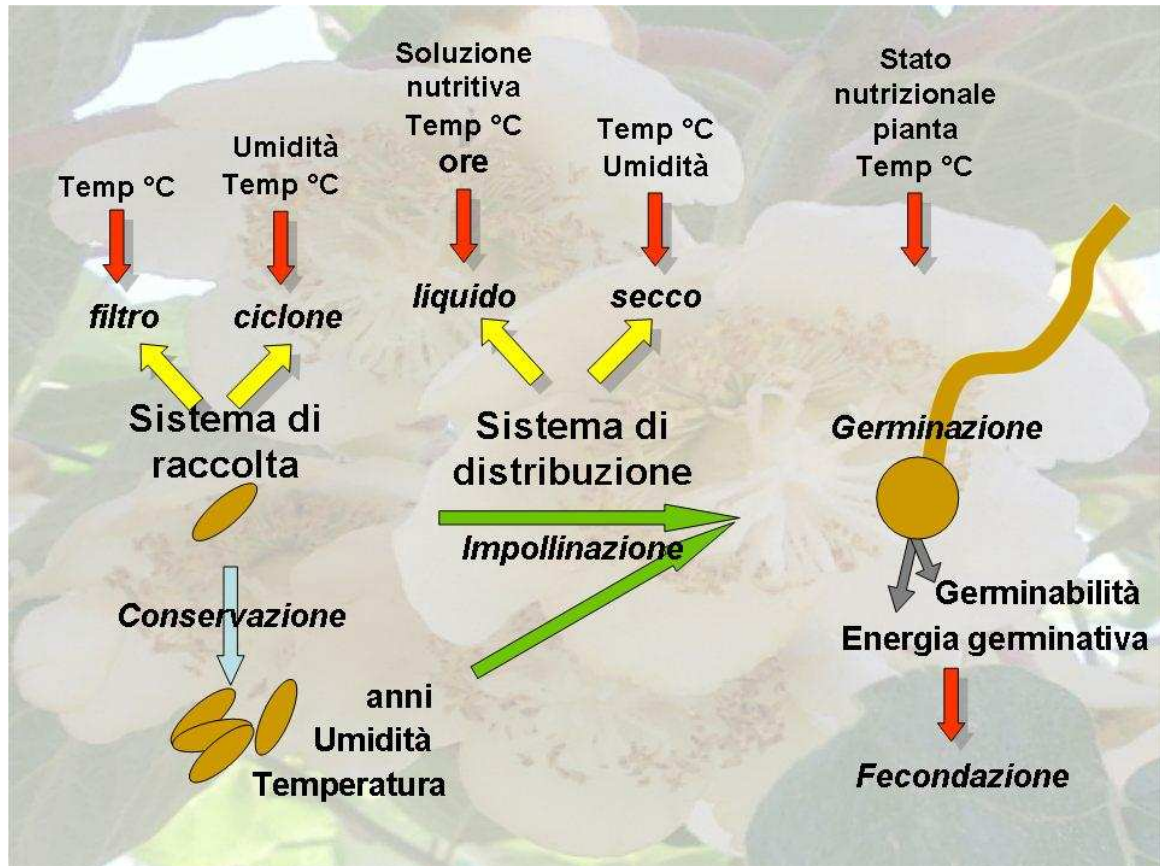


Figura 1 Schema di flusso delle principali fasi che vanno dalla raccolta del polline alla impollinazione e relativi punti critici analizzati nel presente lavoro

Introduzione.

Generalmente la “bontà” del polline viene descritta in base alla sua germinabilità, tuttavia questa non è in realtà sufficiente a distinguere tra un polline buono per la fecondazione ed uno con scarse attitudini. Abbiamo infatti confrontato diversi campioni di polline considerando per essi diversi parametri: germinabilità, energia germinativa ovvero velocità di allungamento del tubetto pollinico (fase di crescita *log*), latenza iniziale (fase *lag* ovvero tempo necessario prima che inizi la germinazione), durata della crescita, umidità alla raccolta, conservabilità. Le analisi sono state inoltre effettuate valutando l’influenza di alcuni parametri ambientali quali la temperatura ed il mezzo di crescita.

Il polline oltre a germinare deve essere in grado di crescere dallo stigma, lungo lo stilo, fino all’ovario: generalmente il tubetto pollinico impiega almeno 12 ore dalla sua germinazione per arrivare all’ovario (fig. 1). Un “buon” polline deve quindi avere una

elevata germinabilità, alta energia germinativa per crescere velocemente e raggiungere l'ovario prima di esaurire le sue energie.

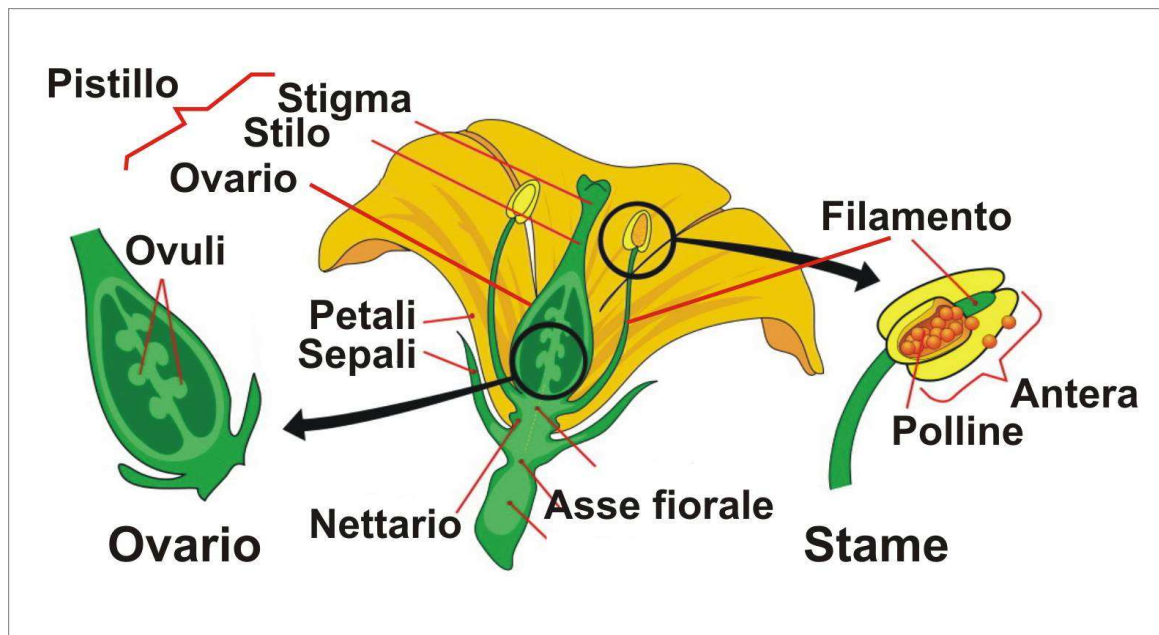


Figura 2 Rappresentazione schematica delle parti di un fiore simile a quello di actinidia

Nel presente lavoro non sono stati considerati gli aspetti fitosanitari e di diffusione delle malattie legati alla raccolta e distribuzione del polline (ad esempio batteriosi) dato il recente insorgere del problema: appare comunque ragionevole non utilizzare polline raccolto da zone infette.

Materiali e metodi

Materiale vegetale

La sperimentazione è stata eseguita su *Actinidia deliciosa* cultivar Hayward e piante maschili cv. Tumuri nell'azienda agricola Tacconi Lorenzo di Palazzolo, Verona, su impianto realizzato nel 1982, allevato a pergoleta sesto 4,5 x 3 m, con maschio a cordone permanente sospeso al centro dell'interfilare (fig. 3).



Figura 3 Azienda presso la quale sono stati effettuati gli esperimenti, da notare la particolare disposizione del cordone maschile al centro dell'interfilare (Az. Agr. Tacconi Lorenzo, Palazzolo di Sona, Verona)

Parametri di misura.

La germinabilità è stata misurata campionando almeno 100 granuli pollinici a microscopio ed è espressa in percentuale considerando germinati quelli con tubetto pollinico fuoriuscito di almeno una volta il diametro del granello idratato (indicato come D. ovvero circa circa 30 micron μm). L'energia germinativa è l'allungamento del tubetto pollinico, espresso in diametro del granello, nell'unità di tempo. L'umidità è il rapporto tra la differenza tra il peso fresco ed il peso secco diviso il peso fresco. Il peso secco è ottenuto dopo essiccazione a 105°C fino a peso costante. Le osservazioni sono state fatte con microscopio Olympus BX51 a 200 ingrandimenti con telecamera Olympus DP50 collegata a computer (fig. 4). Le misure delle lunghezze del tubetto sono state fatte con il software UTHSCSA ImageTool.

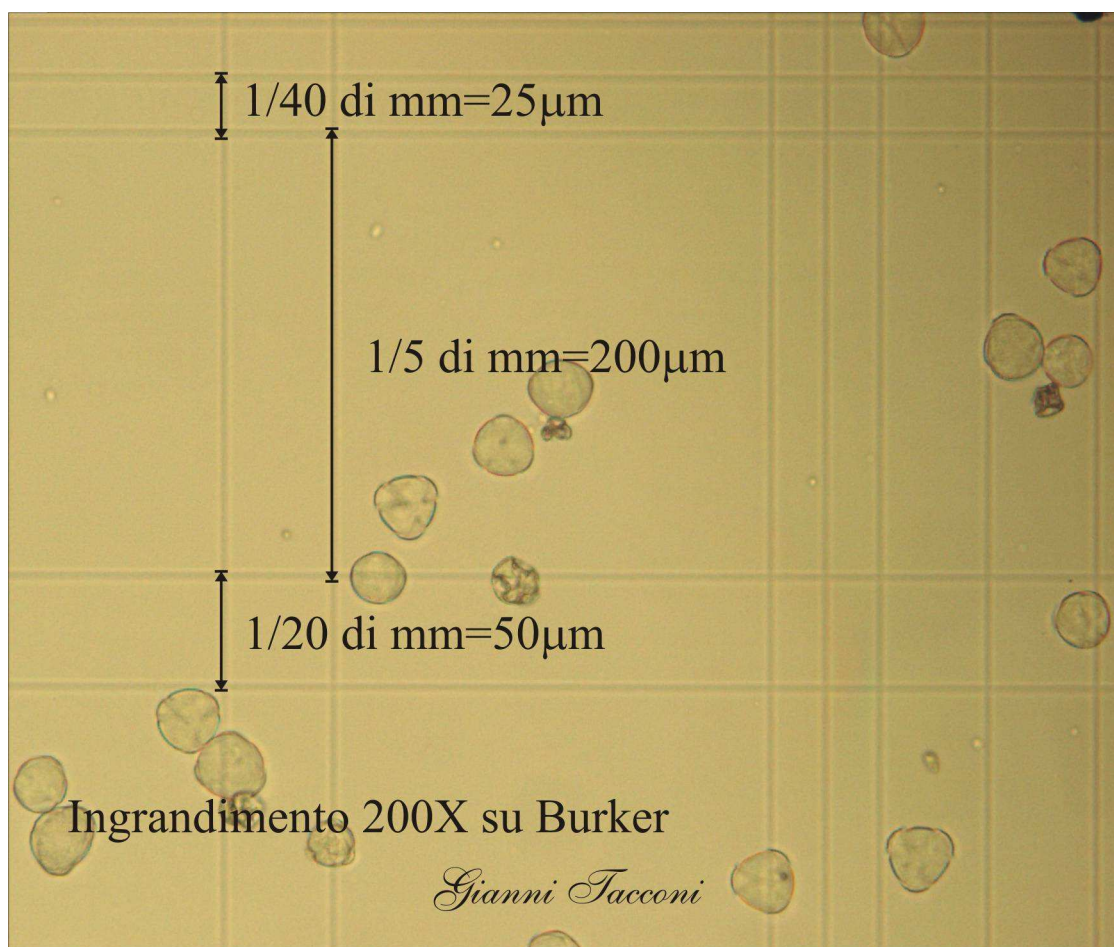


Figura 4 Granuli pollinici di actinidia idratati visti a microscopio: in base al reticolo disegnato sul vetrino si può stabilire il diametro dei granuli che è di circa 10-12 micron (o millesimi di millimetro).

Substrati di germinazione.

Per testare le condizioni di germinazione in vitro è stata confrontata la germinazione di due campioni di polline su sette diversi substrati agarizzati. I substrati contenevano: solo 1) acqua, 2) saccarosio 85g/l (soluzione standard), 3) Soluzione Biotac 20ml/l, 4) Soluzione Gomma arabica, 5) Soluzione Biotac più Gomma arabica, 6) PollenAid 20ml/l 7) Soluzione Biotac 40ml/l. La germinazione è stata osservata ad intervalli di circa 1 ora per 15 ore per ogni campione sempre nello stesso campo visivo al microscopio. La germinazione è stata fatta alla temperatura costante di 20°C in cella di crescita Sanyo Fitotron (Sanyo Gallenkamp PLC, Loughborough, U.K.) con umidità prossima al 100% e con luce fredda; i due campioni di polline sono stati raccolti con due sistemi diversi: separatore a filtro AspiraPolline e separatore a ciclone AspiraPollineMini (Biotac, Palazzolo, Verona, www.biotac.135.com). Le osservazioni sono state fatte con microscopio Olympus BX51 a 200 ingrandimenti con telecamera Olympus DP50 collegata a computer.

Temperature di germinazione.

La germinazione a temperature diverse è stata fatta con uno stesso polline (campione raccolto con AspiraPolline Biotac nel 2008) sul substrato standard (saccarosio 85g/l) effettuando una foto dello stesso campo visivo a microscopio ogni minuto per 14 ore. Le temperature considerate sono state: 18°C, 24°C, 30°C.

Conservazione del polline.

È stata valutato il calo di vitalità del polline in polvere esposto a diverse temperature per tempi diversi: a 6°C per 3, 6, 12 giorni, 20°C e 24°C per 12, 24, 48 ore e 28°C e 32 °C per 2, 4, 8 ore. È stata valutata la conservabilità di uno stesso campione di polline a -18°C fino a 6 anni.

Sistemi di raccolta.

Campioni diversi sono stati analizzati su due diversi substrati (saccarosio 85g/l e PollenAid 20ml/l) osservando la germinazione ad intervalli di 1 ora per 14 ore per ogni campione sempre nello stesso campo visivo al microscopio. Questi erano campioni di polline derivanti da raccolte fatte nel 2008 e nel 2009 in condizioni rispettivamente di elevata umidità e temperature medie e bassa umidità e temperature elevate. I campioni sono stati raccolti con due diversi sistemi di raccolta (fig. 5) prelevando il polline dalle medesime piante ed estratti dalla macchina e riposti a 4°C ogni 45 minuti. Un sistema si basa sulla separazione del polline attraverso un filtro a tela, di materiale polimerico, aspirato con un ventilatore ad alta prevalenza e portata azionato da trattore agricola (macchina AspiraPolline, Biotac) mentre l'altro sistema si basa sulla separazione a ciclone, costruito in materiale polimerico, del polline aspirato grazie ad un aspiratore/soffiatore a scoppio (Stihl BG86 su macchina AspiraPollineMini, Biotac).



Figura 5 Macchine per la raccolta del polline usate negli esperimenti.

Sistemi di impollinazione.

Sono stati valutati anche due sistemi di impollinazione. Le prove di impollinazione sono state fatte in tre annate su 3 filari da circa 100 metri con 2 repliche, con le stesse dosi di polline (800 g/ha) distribuiti in 2 passaggi (in piena fioritura ed a inizio caduta petali), confrontando due macchine manuali: una a impollinazione liquida (SpruzzaPolline, Biotac, fig. 6) ed una ad impollinazione a secco con polline puro (SoffiaPolline, Biotac, fig. 7). Per ciascuna replica sono stati valutati i pesi medi e il numero di frutti sotto i 70 g di 3 campioni di circa 100 frutti per replica.



Figura 6 Attrezzatura utilizzata nelle prove di impollinazione in umido (SpruzzaPolline Biotac) in azione sotto pergoletta (Az. Agr. Bertucco, Palazzolo di Sona, Verona)



Figura 7 Attrezzatura utilizzata nelle prove di impollinazione a secco con polline puro e con indicazione delle relative parti e comandi (SoffiaPolline Biotac).

Risultati e discussione

Substrati di germinazione e sistemi di raccolta.

I diversi substrati usati in vitro posso dare utili indicazioni per le sospensioni di polline nel caso dell'impollinazione a liquido. I 7 diversi substrati hanno mostrato un diverso tempo di inizio della germinazione (ore) con lunghezze dei tubetti pollinici (D.) variabili su una percentuale diversa di granuli pollinici (%), rispettivamente sul campione raccolto con sistema a filtro e con sistema a ciclone (schema riassuntivo in fig. 8):

1. acqua nessuna germinazione anche dopo 15 ore
2. saccarosio 85g/l la germinazione è iniziata dopo 2.15 ore 1,1 D. nel 22% dei granuli e 0,9 D. nel 8% dei granuli;
3. Soluzione Biotac 20ml/l con germinazione dopo 1 ora ma più significativa dopo 2 ore con 1,9 D. nel 60% e 1,4 D. nel 20% dei granuli;
4. Soluzione Gomma arabica nessuna germinazione anche dopo 15 ore;
5. Soluzione Biotac più Gomma arabica nessuna germinazione anche dopo 15 ore (effetto inibente di quest'ultima);
6. soluzione PollenAid 20ml/l germinazione dopo soli 40 minuti, a 2.15 ore mostra 3,3D. nel 86% dei granuli e 3D. nel 63%;
7. Soluzione Biotac 40ml/l germinazione entro 1 ora, a 2.15 ore mostra 2,9D. nel 74% dei granuli e 2,7D. nel 58%;

Da questi esperimenti si evince come i substrati l'acqua da sola (1) non favorisca la germinazione ed anzi la gomma arabica (4 e 5) la inibisca. Vanno bene i substrati 3, 6, 7 anche se il 6 potrebbe stimolare una germinazione troppo precoce rispetto ai tempi di distribuzione a liquido del polline in campo (circa 1 ora): se il polline germina rischia di rovinarsi nell'uscire degli ugelli del mezzo di distribuzione.

La germinazione dopo 12 ore appare (parallelamente a quanto descritto sopra) nel substrato:

- 2 saccarosio 85g/l crescita 4,1D. nel 63% dei granuli , 2,5D. nel 43%
- 3 Soluzione Biotac 20ml/l con germinazione 8,5D. nel 95%, 5,6D nel 72%
- 6 PollenAid 20ml/l con germinazione circa 12D. nel 95%, circa 10D. nel 88%
- 7 Soluzione Biotac 40ml/l con germinazione circa 12D. nel 94%, circa 10D. nel 88%

La germinazione è massimizzata con le soluzioni Soluzione Biotac e PollenAid, con una velocità di crescita leggermente superiori nei substrati 6 e 7. Nella impollinazione a liquido per favorire la germinazione il polline può essere quindi rispeso in una soluzione contenente la Soluzione Biotac o la PollenAid.

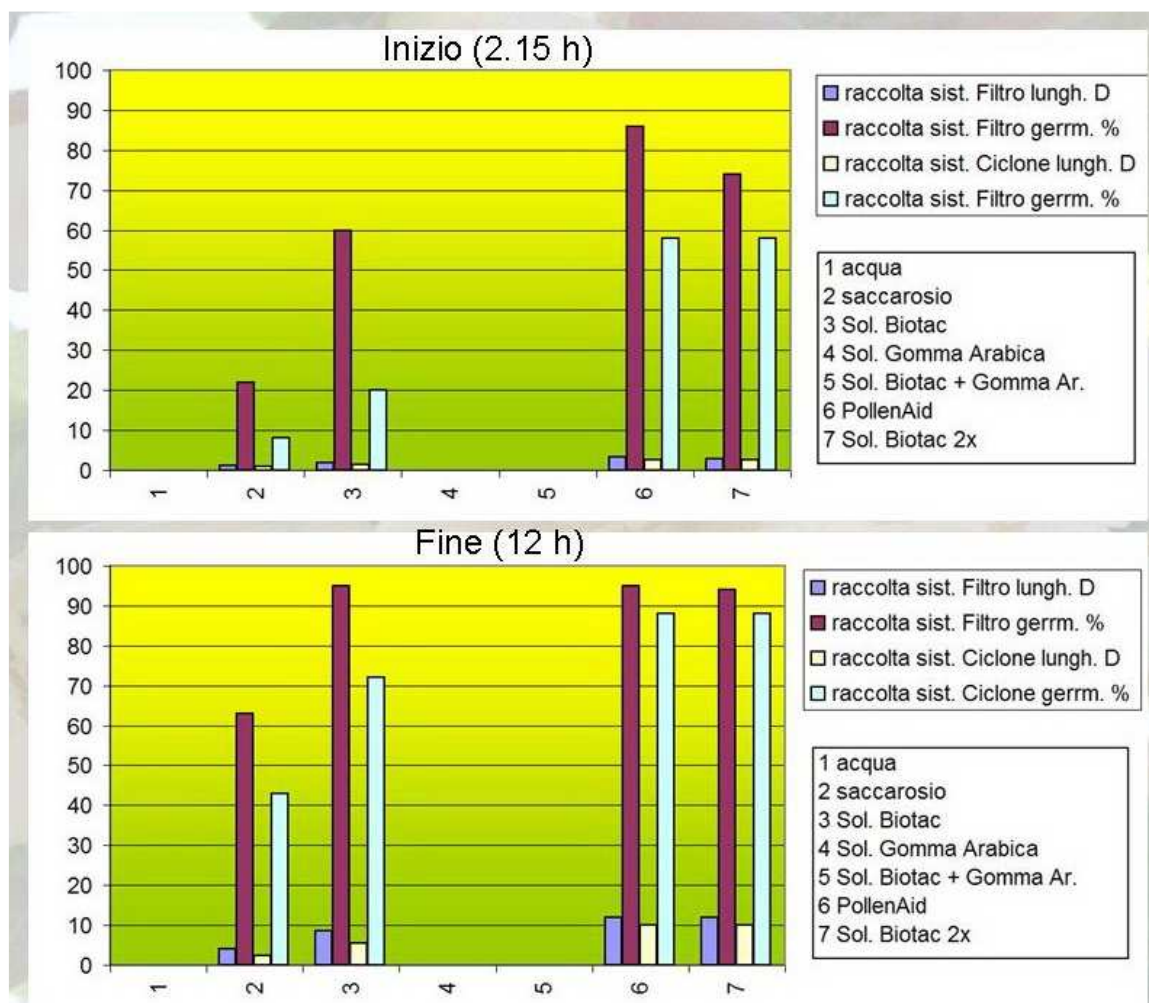


Figura 8 Schema riassuntivo dell'analisi della germinabilità del polline in 7 diverse soluzioni nutritive a 2,15 ore ed a 12 ore. Sono confrontati inoltre polline raccolto con sistema di separazione a filtri (barre blu e viola) e con sistema di separazione a ciclone (barre rosa e azzurro).

Riguardo alla valutazione della germinabilità, le analisi fatte mostrano come il risultato possa variare a seconda del substrato usato e a seconda del momento in cui si fa l'osservazione (non deve essere troppo precoce). Inoltre un substrato troppo nutriente (es. 6) potrebbe sovrastimare la reale germinabilità che si avrebbe *in vivo* (in campo) mentre invece un substrato meno "stimolante" (es. 2) sarebbe più utile in quanto mette in risalto una eventuale debolezza (minore energia germinativa) del polline. In altre parole, in condizioni leggermente restrittive si vede meglio la "bontà" del polline.

Dalle analisi si deduce anche che il polline raccolto con il sistema di separazione a filtro sia leggermente "più forte" di quello raccolto con il sistema a ciclone il quale risulta in una certa misura con minore energia germinativa ed con una germinabilità leggermente inferiore. Probabilmente nella separazione a ciclone il principio fisico stesso della separazione provoca un lieve riscaldamento del polline e quindi una certa perdita di performance (fig. 9). Il polline entrando nel separatore a ciclone viene spinto dalla forza centrifuga verso le pareti il cui attrito ne rallenta il moto e ne permette in effetti la separazione per gravità sul fondo. Nel sistema di separazione a filtro (macchina AspiraPolline Biotac) invece il polline aspirato si adagia sulle pareti del filtro e vi rimane appressato dal passaggio dell'aria in depressione, senza provocarne attriti e

surriscaldamenti (fig. 9). Inoltre la temperatura interna della macchina risulta inferiore alla temperatura esterna (5-8 °C in meno) a causa della depressione, per cui il polline si trova in condizioni migliori che all'esterno.

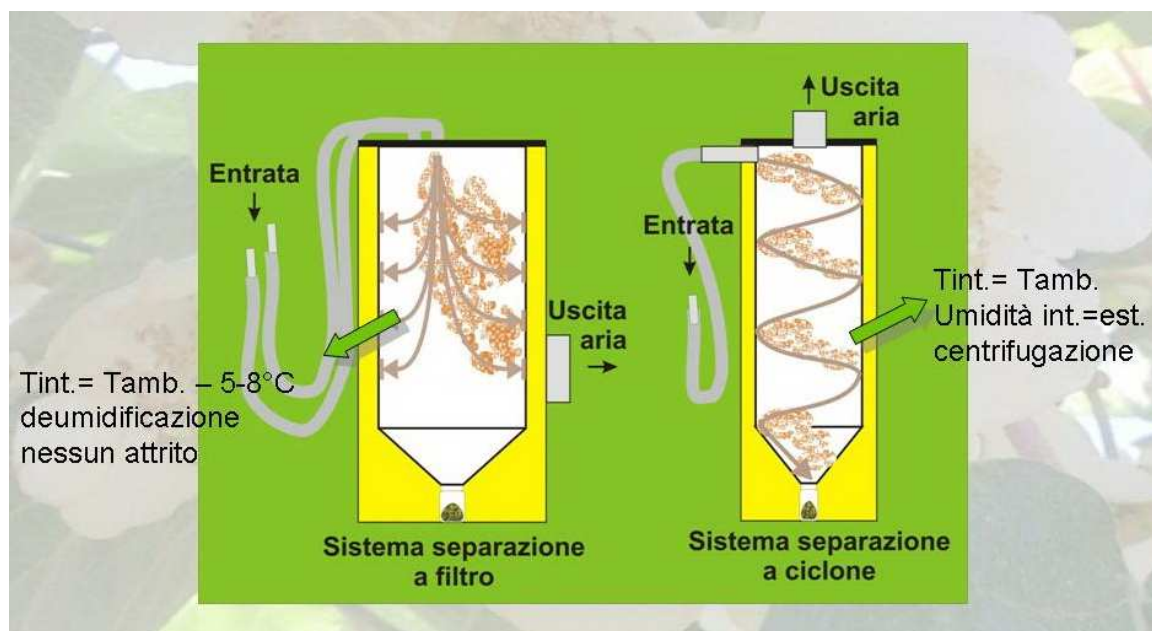


Figura 9 Rappresentazione schematica del principio di funzionamento dei due sistemi di separazione del polline e relativi punti critici.

Riguardo all'annata di raccolta in entrambi i sistemi di raccolta la germinabilità è risultata maggiore nel 2008 (circa 5% in più) rispetto al 2009, probabilmente per le temperature elevate a cui era esposto il polline, sia sulla pianta che durante la raccolta, nel 2009. I dati climatici infatti, per la zona di Verona (dati meteo aeroporto di Villafranca) nella terza settimana di maggio erano rispettivamente nel 2008 e 2009: media delle temperature massime 21,1 e 29,9, media totale 17,6 e 22,9, umidità media totale 85,6 e 63,9, media dei valori minimi 55,3 e 25,9.

Riguardo l'umidità alla raccolta, con il sistema a filtro è risultata sia nel 2008 che nel 2009 del 9-11%, mentre con il sistema a ciclone è stata del 16-19% nel 2008 e del 14-19% nel 2009 (fig. 10). La differenza, maggiore nel 2008, è dovuta al sistema di separazione: nel sistema a filtro la depressione e il calo della temperatura interne alla macchina fa condensare l'umidità presente attorno al polline la quale viene allontanata del continuo flusso d'aria, mentre nel sistema a ciclone il polline cade direttamente sul fondo senza essere "ventilato".

		3° sett. Maggio 2008		3° sett. Maggio 2009	
		Filtro	Ciclone	Filtro	Ciclone
Polline	Umidità %	9-11	16-25	9-11	14-19
Ambiente	T°C max	21,1		29,9	
	T°C media	17,6		22,9	
	UR% media	85,6		63,9	
	UR% min.	55,3		25,9	

Figura 10 Schema che evidenzia il contenuto di umidità del polline a seconda del metodo di raccolta (con separazione a filtri od a ciclone) in due annate con umidità e temperature ambientali contrastanti

Temperature di germinazione

La germinazione avviene a tutte le temperature testate anche se il periodo di latenza risulta ridotto a temperature superiori: a 18 °C inizia a germinare dopo circa 2.30 ore e continua a crescere per 14 ore fino a 18-20 volte il suo diametro (D.) (Fig. 11), a 24 °C germina dopo 1.30 ore per 8.30 ore fino a 13-15D., a 30°C inizia a germinare dopo 40 minuti e cresce per circa 5 ore fino a 12-13D.

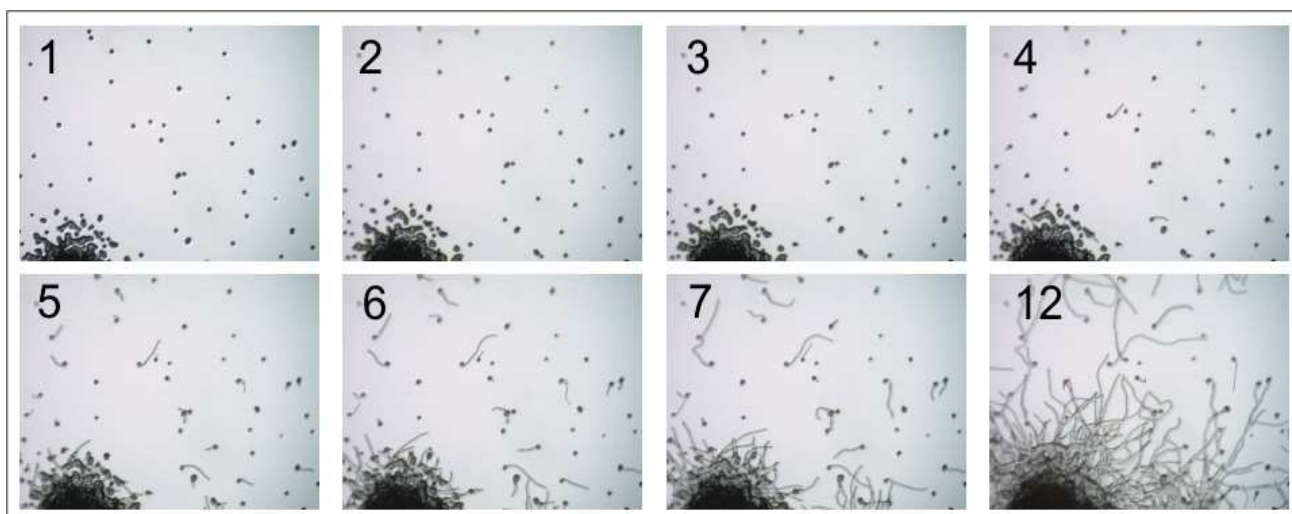


Figura 11 Germinazione del polline a 18°C per 15 ore: il numero indica le ore di germinazione: non tutti i granuli pollinici iniziano e germinare contemporaneamente e non tutti si allungano allo stesso modo.

Questo indica che la temperatura elevata accelera la germinazione ma fa allungare poco il tubetto pollinico: probabilmente le temperature elevate provocano uno stress sul polline che tende a morire o ad esaurire più rapidamente la sua energia (fig. 12). Nella pratica dell'impollinazione si dovrebbero quindi evitare le temperature superiori ai 24°C-26°C durante l'impollinazione.

Test rapidi per la valutazione della germinabilità quali la colorazione con carminio acetico non ha dimostrato la possibilità di distinguere il polline vivo da quello morto.

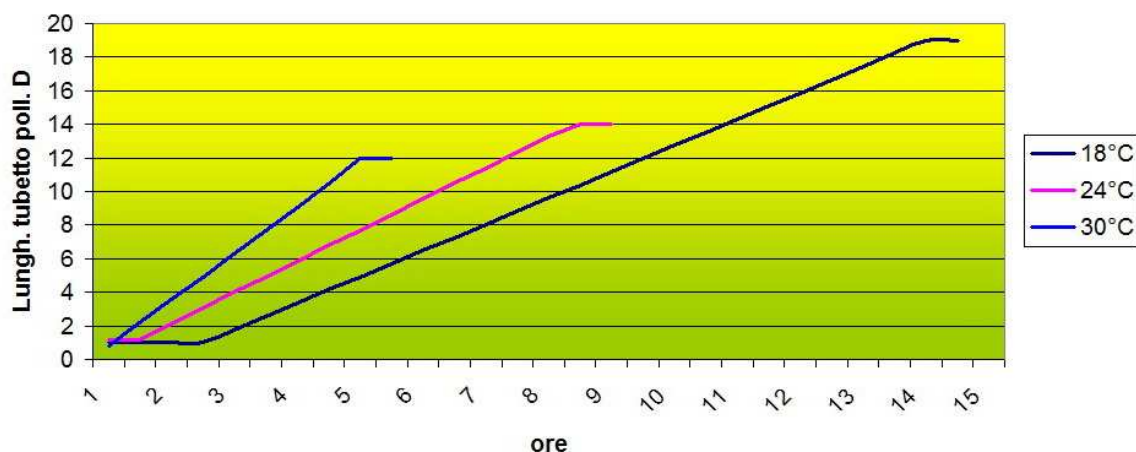


Figura 12 Analisi della velocità di allungamento del tubetto pollinico a diverse temperature: a temperature basse cresce lentamente ma per diverse ore, a temperature elevate cresce rapidamente ma per poco tempo rimanendo “corto”.

Conservazione del polline.

Dalle analisi fatte sulla germinabilità osservata dopo esposizione ad una data temperatura si è visto che: il polline non perde germinabilità ed energia germinativa se viene mantenuto per alcuni giorni a 6°C (ad esempio in frigorifero per 6-7 giorni), mentre perde circa il 2-3 % all’ora a 20°C, con un calo lento nelle prime ore ma che aumenta esponenzialmente dopo le 24 ore; a 28 o 32°C il calo è molto maggiore, fino a perdere il 10-12 % all’ora dopo poche ore di esposizione ad alta temperatura. Questo indica che durante la raccolta il polline deve essere protetto dal calore e riposto in frigorifero nel più breve tempo possibile. Può invece essere mantenuto alcuni giorni a 4°C, ad esempio durante i giorni che vanno dalla raccolta del polline all’impollinazione (circa 5-7 giorni) dopo dei quali conviene riporlo a -18°C.

A -18°C il polline si mantiene inalterato per anni: il polline raccolto nel 2003 con l’AspiraPolline Biotac aveva l’87% di germinabilità, nel 2009 aveva il 73% con un calo maggiore negli ultimi anni mentre nei primi era quasi nullo (fig. 13), anche se solo negli ultimi due anni è stata presa in considerazione la valutazione dell’energia germinativa e della latenza di germinazione. Il polline quindi si può conservare in congelatore a -18 - -20°C per almeno 3 anni senza perdite. Questo risultato è stato ottenuto utilizzando polline raccolto con sistema a filtro con bassa umidità (10,5%), mentre recenti risultati indicano come un polline congelato ad umidità elevata (16-20%) non mantenga le sue performance dopo congelamento.

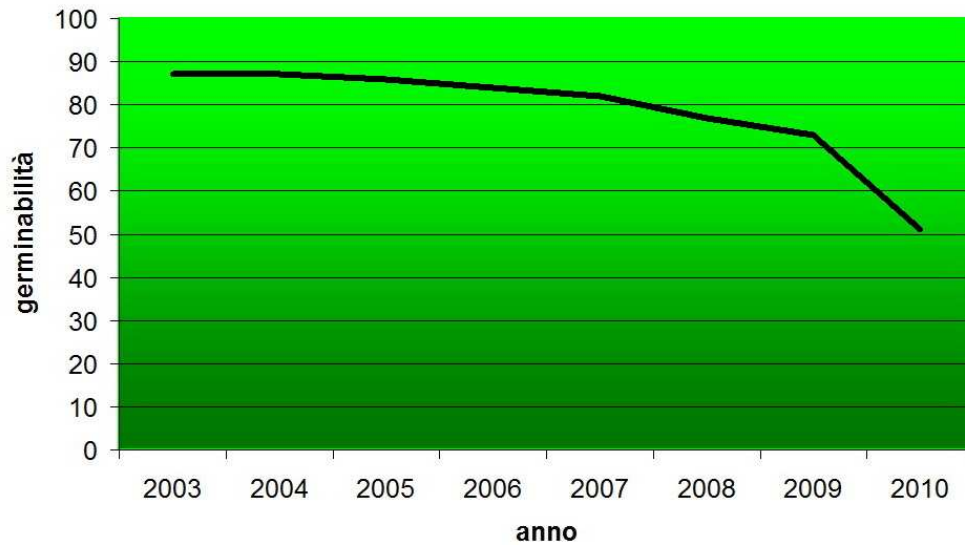


Figura 13 Conservabilità a -18°C del polline raccolto nel 2003: la germinabilità inizia a diminuire dopo 3 anni.

Sistemi di impollinazione

I due sistemi di impollinazione sono stati valutati nelle annate dal 2007 al 2009. Entrambi hanno portato ad un aumento di circa il 15% del peso medio del frutto rispetto al libero impollinato (da 83-88 g a 99-105g nell'impollinato, fig. 14) con un notevole calo del numero di frutti sotto i 70 g (dal 15% al 1% nell'impollinato). I due sistemi differiscono sostanzialmente per le modalità d'uso e per l'operatività: il sistema a liquido (Spruzza Polline, fig. 6) necessita della preparazione della sospensione e la distribuzione, a mezzo di aria compressa necessaria per la nebulizzazione, distribuisce circa 15 l/ha di soluzione in circa 4 ore (un operatore), mentre la distribuzione a secco (SoffiaPolline) opera a circa 1.20 ore/ha (fig. 7). A liquido la distribuzione è stata fatta durante tutto l'arco della giornata eccetto nelle ore con temperature superiori ai 25°C mentre a secco si è operato solo al mattino con umidità dell'aria superiore al 85% (dalle ore 5 alle 9 circa).

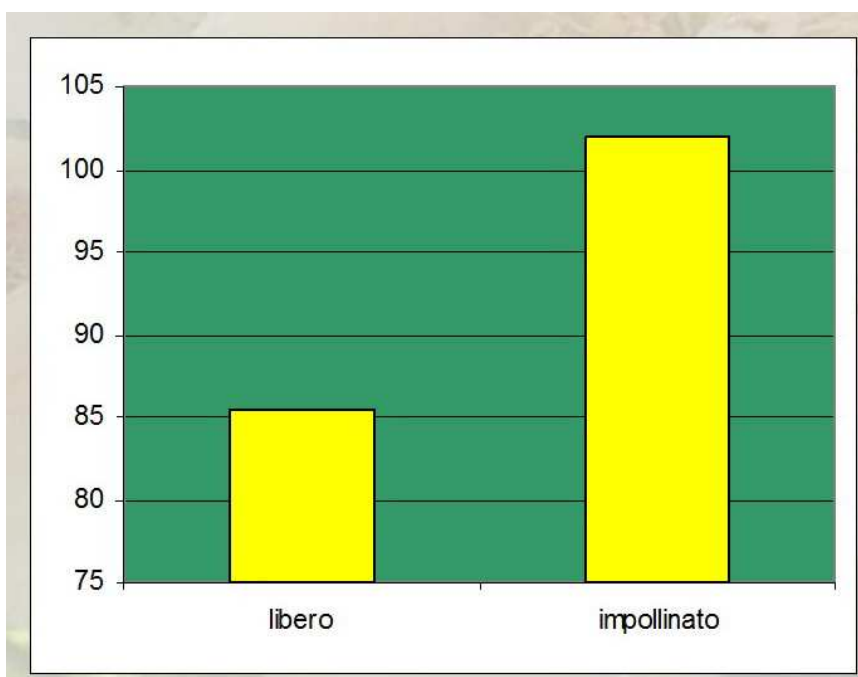


Figura 14 Peso medio dei frutti (in grammi) alla raccolta senza impollinazione di supporto (libero impollinato) e con impollinazione sia a liquido che a secco (impollinato).

Conclusioni

Oltre alla germinabilità del polline è importante valutare altri parametri quali la sua energia germinativa: un buon l'allungamento del tubo pollinico è importante perché avvenga la fecondazione. Per esempio, un polline che abbia subito degli stress, quali temperature elevate alla raccolta, errate manipolazioni, conservazione non adeguata, elevata umidità durante la conservazione, evidenzia un calo delle sue performance (Antognoni et al., 2004) soprattutto considerando i suddetti parametri più che in termini di riduzione della germinabilità. Analogamente la qualità del polline è migliore se questo viene raccolto con sistema di separazione a filtro rispetto alla separazione a ciclone poiché si ha una deumidificazione del polline e minori attriti e surriscaldamento dello stesso. Nella distribuzione, quella localizzata con strumentazioni manuali (generalmente più efficiente di quella meccanica) risultano validi sia il sistema in umido che a secco, questo ultimo è indubbiamente più rapido.

Bibliografia

- ANTOIGNONI F., OVIDI E., TADDEI A.R., GAMBELLINI G., SPERANZA A.. 2004. In vitro pollen tube growth reveals the cytotoxic potential of the flavonols, quercetin and rutin. *Altern. Lab Anim* (32):79-90.
- BALESTRA G. M., MAZZAGLIA A., QUATTRUCCI A., RENZI M., ROSSETTI A.. 2009. Current status of bacterial canker spread on kiwifruit in Italy. *Australasian Plant Disease Notes* (4): 34–36
- GAUDE,T., MCCORMICK S.. 1999. Signaling in pollen-pistil interactions. *Semin. Cell Dev. Biol.* (10):139-147.
- RIZZA F., PAGANI D., FALAVIGNA A.. 1998. Caratterizzazione fisiologica di genotipi di pomodoro per la tolleranza a basse temperature. *Italus Hortus* (5):3-8.

PALMER-JONES T, CLINCH PC. 1974. Observations on the pollination of Chinese gooseberries variety Hayward. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* (2):455–458.