

Villa, Rosalba Sebastiana (1983) *Ricerche sulla biologia di Arbutus unedo L. (Ericaceae) sviluppo e struttura del fiore e del frutto*. Bollettino della Società sarda di scienze naturali, Vol. 22 (1983(1982)), p. 247-258. ISSN 0392-6710.

<http://eprints.uniss.it/3314/>

VOL. XXII

S. S. S. N.

1983 (1982)

BOLLETTINO

della

SOCIETÀ SARDA
DI SCIENZE NATURALI

La Società Sarda di Scienze Naturali ha lo scopo d'incoraggiare e stimolare l'interesse per gli studi naturalistici, promuovere e sostenere tutte le iniziative atte alla conservazione dell'ambiente e costituire infine un Museo Naturalistico Sardo.

S.S.S.N.
SOCIETÀ SARDA di SCIENZE NATURALI

Via Muroli, 25 - 07100 Sassari.

CONSIGLIO DIRETTIVO (1980-1982)

Presidente: Franca Valsecchi.

Segretario: Bruno Corrias.

Consiglieri: Giovanni Cordella, Franca Dalmaso, Umberto Giordano, Maria Pala, Gavino Vaira.

Revisori dei Conti: Giancarlo Rodella, Ulisse Prota, Giovanni Maria Testa.

Collegio Probiviri: Giovanni Manunta, Vico Mossa, Enzo Sanfilippo.

Consulenti Editoriali per il XXII Volume:

Prof. Pier Virgilio ARRIGONI (Firenze)
Prof. Emilio BALDACCINI (Parma)
Prof. Antonello CROVETTI (Pisa)
Prof. Tullio DOLCHER (Sassari)
Prof. Anna FARINACCI (Roma)
Prof. Paolo Roberto FEDERICI (Sassari)
Prof. Alberto FIDANZA (Roma)
Prof. Nicole GOURBAULT (Parigi)
Prof. Elvidio LUPIA PALMIERI (Roma)
Prof. Enio NARDI (Firenze)
Prof. Mario SANGIORI (Roma)
Prof. Giuseppe SIRNA (Roma)
Prof. Livia TONOLLI (Pallanza)

Direttore Responsabile e Redattore
Prof. FRANCA VALSECCHI

Autorizzazione Tribunale di Sassari n. 70 del 29.V.1968

Ricerche sulla biologia di *Arbutus unedo* L. (*Ericaceae*): sviluppo e struttura del fiore e del frutto

ROSALBA VILLA

Istituto di Botanica dell'Università
Via Muroni 25, 07100 Sassari

Villa R., 1983 - A study on the biology of *Arbutus unedo* L. (*Ericaceae*): development and structure of the flower and fruit. Boll. Soc. Sarda Sci. Nat., 22: 247-258.

In this paper different aspects of *Arbutus unedo* floral morphology were taken into consideration.

The bud development was followed from its formation until anthesis. A particular attention was given to the ovary wall histological modification, observed with a light microscopy and a scanning microscopy, during its differentiation and fructification. Some histochemical tests were also done, on the ovary wall and on the fruit, to establish the substances distribution during growth.

KEY WORDS: *Ericaceae*, *Arbutus*, Floral morphology, Histochemistry.

INTRODUZIONE

In un precedente lavoro (VILLA, 1982) è stato descritto il ciclo riproduttivo di *Arbutus unedo* L. soprattutto relativamente ai tempi di fioritura e di fruttificazione: il ciclo è risultato biennale e la biennalità si realizza con lunghe pause di quiescenza nell'interno dell'ovulo, una estiva, nel corso dello sviluppo del fiore, l'altra invernale, durante la maturazione del frutto, quando lo zigoto resta quiescente per diversi mesi.

In questa seconda indagine si è esteso lo studio alla morfogenesi del fiore, dal suo inizio entro la gemma fino all'antesi, con particolare riguardo all'ovario e poi alle trasformazioni che questo subisce durante la fruttificazione.

Lo sviluppo del fiore e la biologia fiorale delle *Ericaceae* è stata oggetto di numerosi studi, la maggior parte dei quali tendenti a risolvere i grossi problemi tassonomici che presenta la famiglia. Tra questi, alcuni hanno carattere più generale e riguardano di volta in volta particolari aspetti delle differenti parti del fiore trattate comparativamente in diversi generi (ARTOPOEUS, 1903; SAMUELSSON, 1913; HAGERUP, 1928; COPELAND, 1933). Altri sono più specifici e riguardano lo sviluppo del fiore di singoli generi quali *Arctostaphylos* (DOYEL, 1942), *Gaultheria* (CHOU, 1952) e *Clethra* (KAVALJIAN, 1952). Altri ancora trattano la morfogenesi di singole parti fiorali, quali gli stami e i meccanismi che regolano la discesa delle antere (PELTRISOT, 1904; MATTHEWS e KNOX, 1926; MATTHEWS e TAYLOR, 1926), lo sviluppo del gametofito femminile (PALSER, 1952; PACINI, 1969) e l'embriogenesi (VEILLET-BARTOSZEWSKA, 1963).

Alcuni lavori ancora, molto recenti (DORR, 1981; MIRICK e QUINN, 1981), riguardano lo studio della morfologia del fiore in rapporto ai processi di impollinazione. In nessuno di questi studi è stata presa in considerazione la fruttificazione.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato svolto su materiale proveniente da una zona nei pressi di Tempio, in Gallura. Per le osservazioni al Microscopio ottico è stato fissato con Carnoy o con Karpetschenko, quindi incluso in paraffina, sezionato a 20μ e colorato con Ematossilina Delafield.

Per le osservazioni al Microscopio elettronico a scansione, il materiale è stato fissato in glutaraldeide allo 0,2% in tampone Na cacodilato 0,1 M, postfissato con OsO_4 , quindi disidratato con CO_2 al Critical Point, metallizzato con oro palladio e osservato con un microscopio I.S.I. mod. DS-130.

Le osservazioni istochimiche sono state fatte su materiale fissato in glutaraldeide allo 0,2% in tampone Na cacodilato, postfissati in OsO_4 , quindi disidratato e incluso in resina Epon. È stato quindi sezionato a 3μ , e poi colorato. Per evidenziare i polisaccaridi insolubili è stata usata la reazione del PAS (Acido periodico e reagente di Schiff); per i lipidi il Sudan III o il Sudan nero; per le proteine totali la reazione con ninidrina e reagente di Schiff. Per

localizzare i tannini sono state fatte sezioni a fresco e colorate con una soluzione di solfato ferrico all'1% in HCl N. Per la lignina è stato usato il test specifico con una soluzione di floroglucina in HCl al 20%, su sezioni a fresco.

Anche per il PAS e per i lipidi sono state fatte ulteriori prove su sezioni a fresco.

ONTOGENESI FIORALE

I primi abbozzi delle gemme fiorali iniziano ad apparire nel mese di giugno e non aumentano di dimensioni per vari mesi, da giugno fino ad ottobre, periodo di inizio dell'antesi. Durante tutto questo periodo intervengono dei naturali fenomeni di differenziazione che portano dalla gemma fiorale al fiore ben formato e completo. Ciascuna gemma si origina sul rametto come una protuberanza arrotondata che viene presto chiusa da una grossa brattea provvista di peli ghiandolari all'interno. All'inizio le gemme piccolissime subiscono lievissimi cambiamenti che portano ad un aumento del diametro dell'apice meristematico che diviene molto grosso e largo prima che inizino i processi di differenziazione più tipici.

I primi elementi che prendono origine dalla parte più esterna dell'apice sono i cinque sepali; poco dopo sorge l'abbozzo della corolla, che si origina da un unico cerchio che si solleva dall'apice (Fig. 1-2).

Successivamente nella gemma incominciano ad emergere più internamente delle piccole protuberanze che dapprima si allungano notevolmente e poi si curvano dando origine agli stami, nei quali in uno stadio molto precoce, nel mese di giugno, sono già distinguibili il filamento e l'antera (Fig. 3-4). Il tessuto archesporiale si differenzia nelle antere molto precocemente, per cui nel mese di agosto abbiamo degli stami già completamente formati. La formazione del polline procede lentamente ma senza pause apprezzabili e si completa nel mese di settembre prima dell'organizzazione dell'ovulo.

In seguito, in uno strato più interno dell'apice iniziano a formarsi i carpelli. Dapprima se ne formano cinque ben separati tra di loro (Fig. 5-6); questi poi si allargano e vanno gradualmente ad

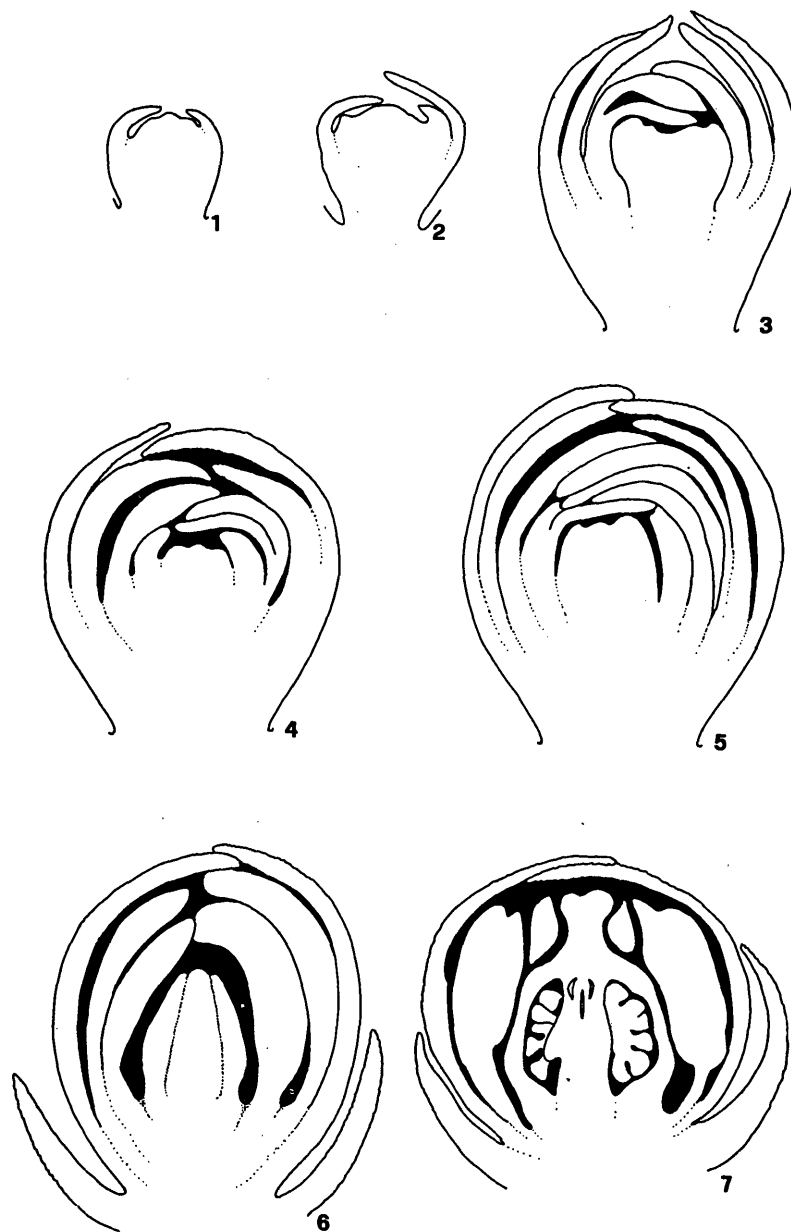


Tavola 1 - Sezioni longitudinali di gemme fiorali in varie fasi di sviluppo.
Fig. 1-2-3-4-5 (x 63); Fig. 6 (x 32); Fig. 7 (x 22).

unirsi fino a formare un unico ovario, la parte superiore del quale si allunga nello stilo.

Nella superficie interna dell'ovario, lungo le linee di fusione dei carpelli, si ha un'intensa moltiplicazione cellulare che ne determina l'accrescimento verso l'interno. In tal modo i carpelli si saldano tra loro formando cinque compartimenti a sé stanti. In seguito dalla placenta si iniziano a formare, come piccoli mammelloncini, gli ovuli, che rimangono indifferenziati fino al mese di settembre, periodo in cui si organizza la nocella e si sviluppa il tegumento; durante questo sviluppo gli ovuli vanno assumendo il loro orientamento definitivo divenendo anatropi.

La gemma fiorale raggiunge così la sua completa formazione dopo vari mesi di fenomeni di differenziazione, ed è formata da antere con polline maturo, un unico ovario pentacarpellare, una corolla gamopetala con un piccolo calice di cinque pezzi (Fig. 7). Dopo tale periodo la gemma si ingrandisce notevolmente e raggiunge rapidamente l'antesi verso ottobre.

MODIFICAZIONI A CARICO DELLA PARETE DELL'OVARIO

a) *al microscopio ottico*

Dopo i processi di differenziazione che hanno portato alla formazione di una gemma completa e ben formata, già nella gemma ancora chiusa, iniziano profonde modificazioni della parete dell'ovario, mutamenti che si accentueranno man mano che esso si avvia, in seguito all'impollinazione e alla fecondazione, verso la sua maturazione e trasformazione in frutto.

La parete dell'ovario è dapprima costituita da uno strato di epidermide e da parenchima sottostante (Fig. 8). In seguito, per un intenso processo di divisione cellulare a carico degli strati più esterni del parenchima, con fusi mitotici orientati in vario modo, assume un aspetto ondulato per la formazione di protuberanze che diventano sempre più evidenti durante lo sviluppo dell'ovario (Fig. 9-10-11). In uno stadio di differenziazione più avanzata alcune cellule parenchimatiche della zona apicale delle protuberanze, sottostante l'epidermide, si ingrandiscono notevolmente e assumono funzione di accumulo (Fig. 12). La figura 13 dà una visione

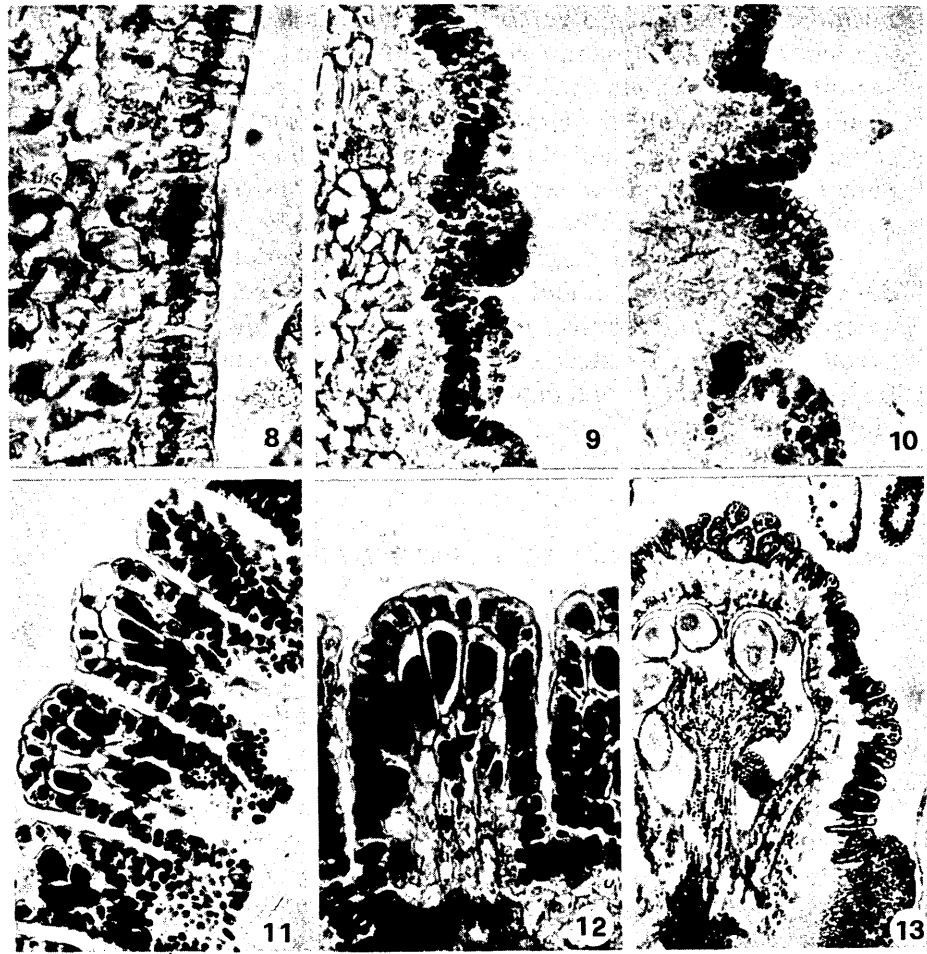


Tavola 2 - Modificazioni istologiche della parete dell'ovario durante la sua differenziazione.
Fig. 8-9-10-11 (x 145); Fig. 12 (x 215); Fig. 13 (x 30).

complessiva dell'ovario con queste protuberanze nei primi stadi del suo sviluppo.

b) *al microscopio elettronico a scansione*

I processi di trasformazione a carico della parete dell'ovario, dalla sua formazione dentro la gemma fino alla sua completa trasformazione in frutto, sono stati osservati con un microscopio elettronico a scansione.

All'interno della gemma che ha appena completato la sua differenziazione, sulla parete esterna dell'ovario che ha dapprima una superficie completamente liscia, si formano dei solchi che lo attraversano in senso longitudinale, dalla base dello stilo fino al ricettacolo (Fig. 13). In seguito le cellule si dividono in tutte le direzioni, per cui si formano delle protuberanze che in un primo tempo hanno tutte la stessa grandezza e solo nell'ovario piú grosso e ancor piú nel frutto maturo si diversificano, alcune divenendo fino a quattro volte piú grosse delle altre (Fig. 14-15-16). Come si è detto precedentemente, all'interno delle piú grosse si ha un'intensa attività di accumulo da parte delle sue cellule.

PROVE ISTOCHIMICHE DURANTE LA DIFFERENZIAZIONE
DELL'OVARIO

Le evidenti modificazioni istologiche, visibili al microscopio, che avvengono a carico della parete dell'ovario ci hanno indotto ad indagare piú a fondo sulla variazione della concentrazione e distribuzione delle sostanze all'interno delle sue cellule, per cercare di interpretare su basi istochimiche il suo sviluppo.

Sono state perciò fatte prove per polisaccaridi insolubili, proteine totali, lipidi, tannini, lignina in ovari in diverso grado di sviluppo fino alla loro completa trasformazione in frutto.

a) *Reazione con acido periodico e reagente di Schiff per polisaccaridi insolubili (PAS)*

La colorazione col reagente di Schiff ha dato delle risposte variabili secondo il grado di maturazione dell'ovario. In quello appena differenziato, nella gemma ancora chiusa, il PAS ha colorato uni-

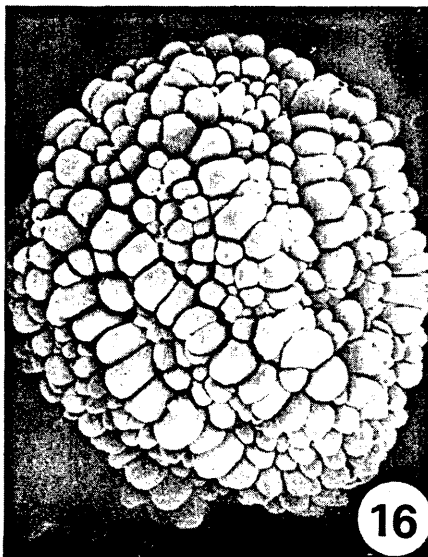
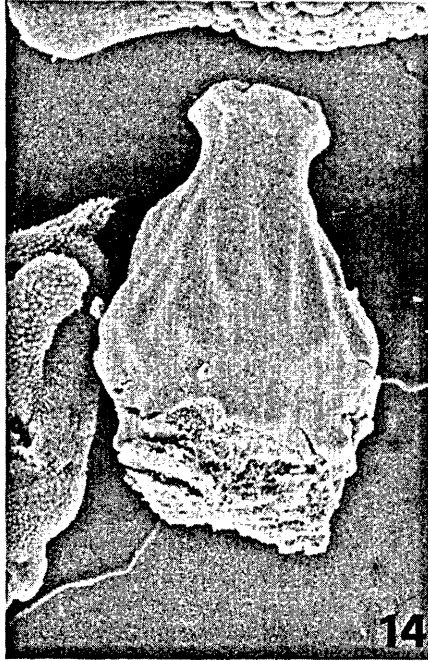


Tavola 3 - Modificazioni al SEM della parete dell'ovario durante la fruttificazione.
Fig. 14 (x 2600); Fig. 15 (x 1689); Fig. 16 (x 806); Fig. 17 (x 3730).

camente le pareti delle cellule. Solo in uno stadio seguente e ancor più nell'ovario già fecondato, sono state chiaramente messe in evidenza sostanze altamente PAS positive nei vacuoli dei primi tre quattro strati di parenchima al di sotto dell'epidermide dell'ovario. Queste diminuiscono negli strati di parenchima localizzati più internamente e scompaiono nel frutto immaturo.

b) *Reazione con Sudan III e Sudan nero per lipidi*

Le riserve lipidiche, dall'esame con queste colorazioni, risultano piuttosto scarse nell'ovario; sono piuttosto evidenti nell'ovario molto piccolo, sotto forma di goccioline nere e sono più abbondanti nel parenchima sottostante l'epidermide, mentre diminuiscono nelle zone interne. I lipidi sembrano scomparire man mano che l'ovario si differenzia e si accresce e mancano completamente quando esso ha raggiunto, all'antesi la sua definitiva grandezza e durante la maturazione del frutto.

Il Sudan ha messo in evidenza una grossa cuticola sull'epidermide, che si ispessisce sempre più man mano che l'ovario si trasforma in frutto.

c) *Reazione con ninidrina e reagente di Schiff per proteine totali*

Questa reazione per le sostanze proteiche ha dato delle risposte simili al PAS per i polisaccaridi insolubili. Le zone più fortemente positive sono risultate ugualmente i primi strati di parenchima sotto l'epidermide. Anche le proteine sembrano scomparire man mano che procede la maturazione dell'ovario.

d) *Reazione con floroglucina per lignina*

Le prove effettuate con floroglucina hanno messo in evidenza un gran numero di sclereidi, isolate o riunite in piccoli gruppi sparsi in tutto il frutto e più abbondanti in quello maturo.

e) *Reazione al solfato ferrico per tannini*

La reazione specifica per mettere in evidenza i tannini ha dato delle risposte ben precise. Essi sono presenti solo negli strati più esterni del parenchima e appaiono, in presenza di solfato ferrico, sotto forma di precipitati bleu scuri nell'ovario in sviluppo; essi poi aumentano sempre più fino ad occupare completamente il lu-

me cellulare. In questo stadio i tannini sono quindi il costituente principale e sostituiscono o mascherano le sostanze PAS positive e proteiche che si trovavano nelle stesse cellule in uno stadio precedente di differenziazione dell'ovario. Con la maturazione del frutto l'intensità di colore data dalla reazione con sali di ferro diminuisce fino a scomparire nel frutto maturo.

La variazione delle sostanze durante la maturazione dell'ovario viene riportata nella Tab. 1.

	Polisac- caridi	Proteine	Lipidi	Tannini	Antociani
Gemma giovane	—	—	+	—	—
Gemma prima antesi	+	+	(+)	+	—
Gemma dopo antesi	++	++	—	++	—
Frutto immaturo	—	—	—	+++	—
Frutto maturo	—	—	—	—	+++

Tab. 1 -Variazione delle sostanze contenute nello strato subepidermico dell'ovario durante la sua maturazione.
Simbologia: — = assenti; (+), +, ++, +++, gradi di abbondanza delle sostanze.

CONCLUSIONI

Lo sviluppo della gemma di *Arbutus unedo* corrisponde a quelli descritti per altre *Ericaceae*: *Arctiostaphylos* (DOYLE, 1942), *Clethra* (KAVALJIAN, 1952) e *Gaultheria* (CHOU, 1952) e più in generale dimostra chiaramente i caratteri considerati più tipici per la famiglia secondo MAHESHWARI (1950) e PALSER (1959).

Molto particolare appare invece il processo di fruttificazione che porta alla caratteristica bacca verrucosa di questa specie. Già nella gemme compaiono delle modificazioni istologiche a carico della parete dell'ovario, soprattutto nelle cellule sottostanti l'epidermide esterna: queste cellule si ingrandiscono molto venendo a costituire uno strato molto caratteristico. Con alcune semplici prove istochimiche si è rilevato che questo strato parenchimatico

situato sotto l'epidermide rappresenta una zona di intensa attività metabolica: nel corso della formazione dell'ovario e della sua trasformazione in frutto il contenuto delle sostanze in queste cellule varia in modo molto rilevante. Come si vede nella tab. 1 nel fiore ancora chiuso in questo strato predominano polisaccaridi e proteine, che vanno poi diminuendo e sono sostituite da una ingente quantità di tannini man mano che ci si avvia, dopo la fecondazione, alla maturazione del frutto. Nelle ultime fasi della maturazione però i tannini decrescono fino a scomparire del tutto. Nel frutto maturo le cellule che contenevano i tannini appaiono in sezioni a fresco, ricche di antociani che impartiscono il color rosso alla parte più esterna del frutto. Il colore arancio degli strati più interni del parenchima è dato invece dalla presenza di molti piccoli cromoplasti.

La presenza di tannini nel frutto immaturo si può presumere sia utile come difesa dalla voracità degli animali nel periodo in cui i semi non si sono ancora sviluppati.

Un accumulo di tannini e poi una loro scomparsa durante la fruttificazione può essere un fatto piuttosto generale. Delle citazioni bibliografiche in proposito sono riportate da REEVE (1959) in un lavoro dove l'autore descrive una localizzazione di tannini durante la maturazione delle pesche e ne discute le possibili correlazioni biochimiche: i tannini comincerebbero ad accumularsi quando inizia la lignificazione dell'endocarpo e la distensione delle cellule del mesocarpo; gli ammassi di sostanze tanniche si dileguano nelle ultime fasi della maturazione del pericarpo e potrebbero essere una fonte di materiale per la formazione delle sostanze pectiche della parete.

Anche l'accumulo di tannini nelle cellule subepidermiche dell'ovario di *Arbutus* corrisponde al periodo di distensione cellulare nel frutto e all'inizio dei processi di lignificazione che qui appaiono limitati alla formazione di sclereidi isolate o in piccoli gruppi; la scomparsa dei tannini potrebbe essere in relazione con la formazione delle sostanze più caratteristiche del frutto maturo: zuccheri e sostanze aromatiche.

RIASSUNTO

In questo lavoro viene preso in esame lo sviluppo del fiore di *Arbutus unedo* L., dalla sua formazione fino all'antesi. In particolare l'attenzione è stata concentrata

sulle modificazioni istologiche, osservate al microscopio ottico e al microscopio elettronico a scansione, che subisce la parete dell'ovario durante la sua differenziazione e trasformazione in frutto. Sono state fatte inoltre, sempre sulla parete dell'ovario e sul frutto, alcune prove istochimiche per stabilire la distribuzione delle sostanze durante il suo sviluppo.

Dalle nostre osservazioni istologiche, strutturali e istochimiche è risultato che: lo sviluppo del fiore di *Arbutus unedo* corrisponde a quello già descritto in altre *Ericaceae*; l'ovario e ancor più il frutto durante la loro differenziazione subiscono notevoli modificazioni istologiche a livello dei primi strati di parenchima sottostanti l'epidermide, che assumono la funzione di un parenchima di accumulo; in seguito a prove istochimiche è risultato che il parenchima accumula tannini che diventano sempre più abbondanti man mano che procede lo sviluppo, mentre altre sostanze (polisaccaridi, proteine) sembrano scomparire durante la maturazione. I tannini nel frutto completamente maturo vengono sostituiti da antociani.

PAROLE CHIAVE: *Ericaceae*, *Arbutus*, Morfologia florale, Istochimica.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- ARTOPOEUS A., 1903 - Ueber den Bau und die Oeffnungsweise der Antheren und die Entwicklung der Samen der Erikaceen. *Flora*, **92**: 309-345.
- CHOU Y.L., 1952 - Floral morphology of three species of *Gaultheria*. *Bot. Gaz.*, **114**: 198-221.
- COPELAND H.F., 1933 - The development of seeds in certain *Ericales*. *Amer. J. Bot.*, **20**: 513-517.
- DORR J.L., 1981 - The pollination ecology of *Zenobia* (*Ericaceae*). *Amer. J. Bot.*, **68**(10): 1325-1332.
- DOYEL B.E., 1942 - Some feature of the structure of *Arctostaphylos viscida*. *Amer. J. Bot.*, **29**: 254-259.
- HAGERUP O., 1928 - Morphological and cytological studies of the *Bicornes*. *Dansk. Bot. Arkiv.*, **6**: 1-26.
- KAVALJAN L.G., 1952 - The floral morphology of *Clethra alnifolia* with some notes on *C. acuminata* and *C. arborea*. *Bot. Gaz.*, **113**: 392-413.
- MAHESHWARI P., 1950 - *An introduction to the embryology of Angiosperms*: 357-374. McGraw-Hill Book Company. New York.
- MATTHEWS J.R., KNOX E.M., 1926 - The comparative morphology of the stamen in *Ericaceae*. *Trans. Proc. Bot. Edimburgh*, **29**: 243-281.
- MATTHEWS J.R., TAYLOR G., 1926 - The structure of development of the stamen in *Erica hirtiflora*. *Trans. Proc. Bot. Soc. Edimburgh*, **29**: 235-242.
- MIRICK J., QUINN J.A., 1981 - Some observation on the reproductive biology of *Gaultheria procumbens*. *Amer. J. Bot.*, **68**: 1298-1305.
- PACINI E., 1969 - Embryology of *Arbutus unedo* L. *Gior. Bot. Ital.*, **103**: 623-624.
- PALSER B.F., 1952 - Studies of floral morphology in the *Ericales*. II. Megasporogenesis and megagametophyte development in the *Andromedae*. *Bot. Gaz.*, **114**: 33-52.
- PALSER B.F., 1959 - Some aspects of embryology in the *Ericales*. *Recent advances in Botany*, **1**: 685-689.
- PELTRISOT C.H., 1904 - Développement et structure de la graine chez les Ericacées. *Jour. Bot.*, **18**: 309-367; 386-402.
- REEVE R.N., 1959 - Histological and histochemical changes in developing and ripening peaches. I. The catechol tannins. *Amer. J. Bot.*, **46**: 210-217.
- SAMUELSSON G., 1913 - Studien über die Entwicklungsgeschichte einiger Bicornestypen. Ein Beitrag zur Kenntnis der systematischen Stellung der Diapensiaceen und Empetraceen. *Svensk. Bot. Tidskr.*, **7**: 97-188.
- VEILLET-BARTOSZEWSKA M., 1963 - Recherches embryogéniques sur les *Ericales*. Comparaison avec les *Primulales*. Thèse. Paris.
- VILLA R., 1982 - Ricerche sulla biologia di *Arbutus unedo* L. (*Ericaceae*): ciclo di sviluppo. *Boll. Soc. Sarda Sci. Nat.*, **21**: 309-317.