

RICERCA DI INDICATORI DI TOLLERANZA DELLE PIANTE AI CAMBIAMENTI CLIMATICI

ENRICO BRUGNOLI (*), FEDERICA DI ORAZIO(*), LORETTA GRATANI (**), ANDREA SCARTAZZA(*)

*(CNR-IBAF, Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale, Porano, Terni)

** (Università degli Studi di Roma, Dipartimento di Biologia Vegetale)

INTRODUZIONE

I cambiamenti climatici causati da emissioni antropogeniche di gas serra avranno presumibilmente un impatto rilevante sulla fenologia e sulla produttività delle principali specie naturali e di interesse agricolo in molte regioni della terra. Nelle regioni mediterranee, l'aumento della temperatura e i cambiamenti del regime pluviometrico potrebbero determinare un incremento del rischio di desertificazione. L'individuazione di indicatori fisiologici che descrivano la risposta delle piante ai fattori climatici è di cruciale importanza per individuare specie, varietà e cultivars più tolleranti ai previsti cambiamenti globali.

Tra gli indicatori di tolleranza/resistenza alla siccità, gli isotopi stabili del carbonio offrono il vantaggio di essere basati su risposte fisiologiche e consentono la classificazione delle specie e dei genotipi in base alla loro efficienza d'uso idrico e produttività. La composizione in isotopi stabili del carbonio (δ) viene misurata tramite spettrometro di massa come deviazione del rapporto delle abbondanze isotopiche ($R = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$) del campione (R_p) rispetto a quello dello standard internazionale VPDB (R_s)

$$\delta^{13}\text{C} = R_p/R_s - 1$$

Le piante, durante la fotosintesi, discriminano contro l'isotopo pesante ${}^{13}\text{C}$ e, pertanto, i prodotti fotosintetici risultanti sono alleggeriti isotopicamente rispetto alla CO_2 atmosferica. Questo processo di discriminazione isotopica (Δ) avviene in due fasi, durante la diffusione di CO_2 fino ai cloroplasti e durante la carbossilazione enzimatica (Farquhar et al., 1982, Aust. J. Plant Phys. 9: 121-137). In termini più espliciti, nelle piante a fotosintesi C_3 la discriminazione è linearmente dipendente dal rapporto delle pressioni parziali di CO_2 intercellulare e atmosferica ed è quindi determinata dalla capacità fotosintetica e dal grado di apertura stomatica. Quindi, dallo studio della discriminazione isotopica del carbonio è possibile stimare il bilancio delle limitazioni stomatiche e biochimiche alla fotosintesi e degli effetti esercitati da stress ambientali sulla produttività delle piante. Inoltre, la discriminazione isotopica del carbonio (Δ) nelle piante a metabolismo C_3 è correlata inversamente con l'efficienza d'uso idrico (WUE) e può essere utilizzata per studiare le interazioni pianta-ambiente e per individuare genotipi tolleranti/resistenti a carenza idrica (per una review si veda

Brugnoli & Farquhar, 2000). Il vantaggio di questa metodologia è che la stima di WUE può essere effettuata precocemente allo stadio di plantula ed è molto rapida.

Gli isotopi stabili del carbonio e dell'ossigeno consentono inoltre lo studio qualitativo degli scambi atmosfera-vegetazione (Brugnoli & Farquhar, 2000, in *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*, R.C. Leegood, T.D. Sharkey, S. von Caemmerer (eds.) Kluwer Academic Publ., pp.399-434).

Lo studio della composizione isotopica $\delta^{18}\text{O}$ è molto promettente in ecofisiologia vegetale e le basi teoriche dei processi che determinano il contenuto di ^{18}O nelle piante è ormai chiarito (Farquhar et al. 1998, in *Stable Isotopes*, H. Griffiths (Ed.), BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp. 27-62). L'arricchimento in ^{18}O nelle foglie rispetto all'acqua assorbita è determinato dalla traspirazione, poiché molecole d'acqua contenenti ^{16}O evaporano più rapidamente rispetto a quelle contenenti ^{18}O . Pertanto, l'umidità relativa dell'atmosfera influenzando la velocità di traspirazione, modifica questo arricchimento ma, in particolare, è la conduttanza stomatica con la sua risposta all'ambiente che determina la velocità di traspirazione e l'arricchimento in ^{18}O dell'acqua fogliare. Questo segnale viene poi trasferito alla sostanza organica mediante reazioni di scambio isotopico tra acqua e CO_2 , nella reazione di idratazione catalizzata nelle foglie dall'enzima carbonico anidrasi. Conseguentemente, lo studio di $\delta^{18}\text{O}$ nella sostanza organica consente di valutare il grado di apertura stomatica e le risposte delle piante a variazioni di temperatura e umidità atmosferica.

L'analisi quantitativa degli stadi fenologici, in risposta a condizioni diverse di stress idrico e di temperatura, rappresenta un valido metodo per la valutazione della capacità produttiva delle specie e della loro adattabilità; la velocità di fotosintesi, che varia nel corso delle diverse fenofasi ed in risposta ai fattori di stress, può essere usata come indice di funzionalità (Anderson e Tomlinson 1998, *New Phytol.* 140: 477-491; Gratani et al. 2000, *Glob. Planet. Change* 24: 153-163).

Gli studi condotti in ecosistemi di tipo mediterraneo (Correia et al. 1992, *Ecol. Medit.* 18: 7-18; Gratani et al. 2000, *Glob. Planet. Change* 24: 153-163; Crescente et al. 2001, *Flora* 197: 2-9) mettono in evidenza come gli eventi fenologici siano condizionati in particolare dall'intensità e dalla lunghezza del periodo di aridità, che in tali ambienti esercitano un'elevata influenza selettiva. Tuttavia, poiché specie diverse mostrano risposte diverse ai fattori di stress, la correlazione fra la periodicità, la lunghezza delle fenofasi ed i fattori climatici fornisce indicazioni sulla loro capacità adattativa, consentendo di fare previsioni sulla futura presenza delle specie nel loro areale di distribuzione in relazione all'aumento dei fattori di stress (Santandreu e Lloret 1999, *Can. J. Bot.* 77: 734-743; Gratani et al. 2000, *Glob. Planet. Change* 24: 153-163; Osborne et al. 2000, *Plant Cell Environ.* 23: 701-710; Chidumayo 2001, *J. Veg. Sci.* 12: 347-354; Crescente et al. 2001, *Flora* 197: 2-9).

L'obiettivo principale di questo progetto di ricerca consiste nello studio e nell'individuazione di indicatori di tolleranza a stress ambientali, con particolare riferimento alla siccità ed alle elevate temperature, al fine di prevedere gli effetti dei mutamenti climatici causati dall'aumento di gas serra sulla produttività agricola. Tra gli indicatori presi in considerazione, particolare attenzione viene rivolta allo studio degli isotopi stabili del carbonio. Un ulteriore obiettivo è rappresentato dalla quantificazione delle influenze di temperatura e disponibilità idrica sulle diverse fasi fenologiche e sulla loro durata, in arbusti sempreverdi della macchia mediterranea ed in specie coltivate. La verifica delle relazioni esistenti fra intensità di stress idrico, attività fotosintetica, tasso relativo di crescita (RGR) e caratteristiche morfo-anatomiche, consentirà di formulare ipotesi sull'efficienza nell'uso delle risorse, sulla

capacità produttiva e sulla resistenza a stress. Si ritiene, inoltre, di arrivare all'individuazione di indici (funzionali e strutturali) utilizzabili per il monitoraggio.

MATERIALI E METODI

Le ricerche sono state indirizzate a specie della vegetazione naturale e coltivate, in diversi siti sperimentali. Vista l'importanza per la produttività agraria e per la loro ampia diffusione sul territorio nazionale, particolare attenzione è stata rivolta alle principali colture cerealicole (frumento tenero, frumento duro ed orzo). I siti sperimentali, caratterizzati da un punto di vista climatico ed isotopico, sono stati selezionati lungo un gradiente naturale di aridità. Le analisi isotopiche sono state eseguite sulle cariossidi di numerosi genotipi delle suddette specie collezionati nei campi sperimentali di Orvieto (orzo, frumento tenero e duro), Perugia (frumento tenero e duro), Fiorenzuola d'Arda (orzo), Barrafranca (frumento tenero e duro), Castel di Judica (frumento duro) e Caltagirone (frumento duro). Sono state analizzate per la composizione degli isotopi del carbonio ($\delta^{13}\text{C}$) le cariossidi prodotte nell'anno 2001 e 2002. Ove disponibili, sono state catalogate e studiate le cariossidi conservate da produzioni di diversi anni precedenti. In particolare, grazie alla collaborazione con il Dipartimento di Agronomia dell'Università di Perugia è stato possibile analizzare serie storiche di cariossidi di frumento tenero e duro risalenti al secolo scorso.

Le cariossidi sono state finemente macinate. Un'aliquota del campione (circa 1 mg) viene posta in una capsula e analizzata per la composizione in isotopi stabili. A tal fine il campione viene combusto in un analizzatore elementare (NA1500, Carlo Erba, Milano, Italia) e la CO_2 così prodotta, dopo separazione cromatografica, viene immessa nello spettrometro di massa per isotopi stabili in flusso continuo di elio (Micromass, SIRA II, Middlewich, UK). La discriminazione isotopica (Δ) viene calcolata come

$$\Delta = (\delta_a - \delta_p) / (1 + \delta_p)$$

ove δ_a e δ_p rappresentano rispettivamente le composizioni isotopiche della CO_2 atmosferica e del materiale vegetale. I valori di δ_a vengono misurati mediante analisi della CO_2 atmosferica, purificata mediante trappole criogeniche, da campioni di aria collezionati in contenitore evacuati di 2 litri. Nel caso di serie storiche di cariossidi, il valore di δ_a è stato dedotto dai valori disponibili in letteratura relativamente ad analisi dirette e/o a misure effettuate sull'aria intrappolata in carote di ghiaccio (Friedli et al., 1986, Nature 324:237-238; Brugnoli & Farquhar, 2000).

Altri esperimenti sono stati condotti in campo (Castelporziano, Roma) ed in condizioni controllate presso il Dipartimento di Biologia vegetale dell'Università di Roma "La Sapienza". Il clima dell'area di Castelporziano è di tipo Mediterraneo: la piovosità totale media annua è di 689 mm e la temperatura media annua è di 15.9°C (dati della Stazione Meteorologica di Castelporziano relativi al periodo 1987-2000). La temperatura media massima del mese più caldo (Agosto) è di 31.2 °C e la temperatura media minima del mese più freddo (Febbraio) è 3.2°C. La maggior parte della piovosità annua è distribuita in autunno e in inverno. In estate (Maggio-Settembre) si registra una forte diminuzione dell'umidità del suolo (del 61%).

Le misure di potenziale idrico sono effettuate mediante camera a pressione di Scholander ed il contenuto relativo di acqua delle foglie (RWC) viene determinato dal

rapporto (Peso Fresco – Peso Secco / Peso a Saturazione – Peso Secco) (Lo Gullo e Salleo 1988, *New Phytol.* 108: 267-276).

La fotosintesi netta, la conduttanza stomatica, la traspirazione e la temperatura fogliare vengono misurate mediante un analizzatore di scambi gassosi portatile (ADC LCA4) munito di un sistema di regolazione per il PAR, la temperatura e la CO₂. L'efficienza nell'uso dell'acqua (WUE), viene calcolata dall'ammontare del carbonio acquisito per quantità di acqua perduta (μmol di CO₂ fissate per mol di H₂O utilizzate; Larcher 1995, *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag, Berlin). Questi dati vengono comparati con la stima di WUE ottenuta mediante analisi isotopiche, su campioni di foglie collezionati dopo la misura degli scambi gassosi fotosintetici.

La velocità relativa di crescita (RGR) viene calcolata dal rapporto $(\ln l_2 - \ln l_1) / (t_2 - t_1)$; King 1997, *Tree Physiol.* 17: 251-258), dove l = lunghezza del germoglio e t = tempo. La superficie fogliare (picciolo escluso) viene misurata usando il sistema di analisi di immagini Delta-T Devices, LTD (UK) ed il peso secco fogliare dopo permanenza in stufa a 80°C fino al raggiungimento del peso costante. L'anatomia fogliare viene determinata al microscopio ottico (Eclipse E400, Nikon Instruments, JP) su porzioni fogliari prive di nervature.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Approcci Isotopici allo studio della Produttività e della tolleranza/resistenza

Le analisi della composizione isotopica $\delta^{13}\text{C}$ sulle cariossidi di cereali hanno evidenziato differenze significative nella discriminazione isotopica del carbonio (Δ) sia tra siti sperimentali che tra i differenti anni in studio. In particolare, confrontando i valori di Δ in cariossidi di frumento duro di differenti annate e località è stata osservata una variazione in Δ da valori di 12-14 ‰ per il sito di Barrafranca a valori intorno al 17-18 ‰ per il sito di Orvieto, con Castel di Judica e Caltagirone mostranti valori intermedi. Tale variazione in Δ è risultata positivamente associata alla variazione di produttività ($r=0.93$). Una relazione positiva è stata osservata tra i valori medi di Δ delle località e l'indice di aridità di De Martonne, calcolato in funzione della sommatoria delle precipitazioni e delle temperature medie del periodo tra ottobre e dicembre ($r=0.79$). Tale risultato mette in evidenza come la relazione positiva tra Δ e produttività sia determinata in parte dall'andamento termo-pluviometrico durante il periodo autunno-invernale, essendo quest'ultimo molto probabilmente rilevante nel determinare la disponibilità idrica per la coltura durante la fase di spigatura-maturazione della granella. Sulla base della relazione inversa tra Δ ed efficienza d'uso idrico, è possibile concludere che una marcata diminuzione in Δ nei genotipi di frumento duro coltivati in ambienti aridi, è associata ad un sostanziale aumento d'efficienza d'uso idrico. Nelle due località con indice di aridità estremo (Barrafranca e Orvieto) è stata studiata la relazione tra discriminazione isotopica e produttività media delle varietà in comune ai due siti. Una correlazione positiva è stata osservata tra Δ e produttività nel sito sperimentale di Barrafranca ($r=0.58$) e Orvieto ($r=0.51$). Questa relazione indica che i genotipi più produttivi sono caratterizzati da maggiore conduttanza stomatica e, quindi, maggiore tasso fotosintetico. Mentre questo risultato può essere prevedibile per siti meno aridi, il risultato è inatteso per i siti più aridi. Ciò indica che l'adattamento a condizioni di scarsa disponibilità idrica comporta caratteri fisiologici e morfologici complessi, che richiedono ulteriori approfondimenti.

Similmente gli esperimenti condotti su frumento tenero (*Triticum aestivum* L.) hanno rivelato una relazione positiva tra produttività e Δ tra i diversi siti in studio. Tuttavia, mentre la relazione positiva era mantenuta per le varietà in comune nel sito di Orvieto ($r=0.54$), ciò non si verificava a Barrafranca. Questo risultato mette in evidenza una diversa risposta fisiologica e produttiva del frumento tenero rispetto a quello duro in condizioni di ridotta disponibilità idrica. Nonostante questo differente risultato, comparando i valori di discriminazione di genotipi comuni alle due prove sperimentali, si è ottenuta una correlazione positiva. Ciò evidenzia la stabilità del carattere Δ in diverse condizioni ambientali: genotipi a più elevato valore di Δ in condizioni di elevata aridità mostrano Δ relativamente più elevato anche in condizioni più miti. Occorre notare però che i valori assoluti di Δ differiscono sensibilmente tra stazioni sperimentali diverse. Questi dati confermano la validità della discriminazione isotopica per caratterizzare alcuni scenari a diverso grado di aridità e vulnerabilità e, al tempo stesso, fornire un indice per la classificazione di specie e cultivars in relazione alla produttività ed alla tolleranza alla siccità.

Una indagine di lungo periodo è stata avviata in collaborazione con l'Università di Perugia. Sono state collezionate ed analizzate cariossidi di genotipi di frumento tenero e duro coltivati presso i campi sperimentali di Perugia dalla fine del secolo XIX fino alla fine del XX secolo. Le cariossidi analizzate erano prodotte nell'anno di riferimento e portano quindi un segnale isotopico direttamente riferibile a quell'anno, sia per influenze ambientali che per produttività vegetale. I risultati sono stati comparati con i valori di composizione isotopica dei genotipi coltivati nei campi sperimentali di Perugia in anni più recenti. Le analisi hanno mostrato variazioni tra le composizioni isotopiche delle cariossidi prodotte nella prima metà del XX secolo e di quelle prodotte negli anni recenti di circa il 4‰. Questa variazione in composizione isotopica del carbonio delle cariossidi può essere almeno parzialmente attribuita al cambiamento di concentrazione e composizione isotopica della CO₂ atmosferica verificatosi durante il XX secolo. Tuttavia, i valori calcolati della discriminazione isotopica Δ , che sono indipendenti dalla composizione della CO₂ atmosferica, mostrano un incremento sensibile nel tempo. Ciò indica un aumento progressivo del rapporto delle pressioni parziali intercellulare e atmosferica di CO₂ nei cereali in studio. Per chiarire l'effetto di tale incremento sulla produttività agraria della coltura di frumento, valori di Δ e produttività di alcune varietà di frumento tenero coltivate in provincia di Perugia nel 1955 sono stati comparati con quelli di varietà coltivate nel 2001. I dati preliminari indicano una relazione positiva tra Δ e produttività, con le varietà del 1955 mostrandoci valori medi tendenzialmente più bassi rispetto alle varietà del 2001. Questo incremento in Δ e produttività può trovare diverse spiegazioni possibili: la selezione varietale, l'incremento di CO₂ atmosferica e le tecniche colturali. Il miglioramento genetico, selezionando per genotipi a più elevata produttività e/o a ciclo breve (varietà precoci), potrebbe aver condotto ad una inconsapevole selezione di genotipi a più elevato Δ ; d'altra parte l'incremento di CO₂ atmosferica potrebbe aver provocato una risposta a "feedback" della capacità fotosintetica o della conduttanza stomatica. Inoltre, la modificazione delle tecniche colturali (lavorazioni dei terreni, concimazioni minerali ecc.) può anch'essa aver influenzato l'efficienza fotosintetica e d'uso delle risorse nei cereali in studio.

Al fine di verificare queste ipotesi, si procederà all'analisi completa delle relazioni esistenti tra composizione isotopica delle cariossidi, produttività agraria e caratteristiche climatiche dei periodi presi in considerazione. Inoltre, l'analisi della composizione in isotopi stabili dell'ossigeno, tuttora in corso di svolgimento, consentirà di separare gli effetti stomatici rispetto a quelli causati da variazioni di capacità fotosintetica. Queste indagini forniranno indicazioni sul ruolo dei cambiamenti

climatici e del breeding sulla produttività e sulle caratteristiche fisiologiche e fotosintetiche delle cultivars in studio.

Studio degli effetti sulla fenologia

L'elaborazione dei dati su *Quercus ilex* L., nella macchia mediterranea, ha permesso di evidenziare le temperature favorevoli per l'accumulo di biomassa e la risposte alle elevate temperature.

L'attività vegetativa di *Quercus ilex* L. è concentrata in brevi periodi dell'anno, quando le temperature favorevoli determinano alti tassi fotosintetici. A Castelporziano l'apertura delle gemme si è registrata alla fine di Aprile, quando la temperatura media minima è di 8°C e la temperatura media massima intorno ai 18°C. Le velocità di allungamento dei germogli più elevate sono state registrate in Maggio e l'allungamento si è concluso alla fine di Giugno quando la temperatura media massima superava i 26°C. A Settembre, normalmente si osserva una ripresa vegetativa. La temperatura risulta essere il fattore che maggiormente condiziona l'inizio e la durata del periodo di attività vegetativa. In particolare un severo e prolungato stress idrico condiziona l'emissione dei nuovi germogli, riduce la loro lunghezza e la superficie fogliare totale, anticipa la senescenza fogliare, con una ricaduta negativa sulla produttività. La produzione stagionale di biomassa in *Quercus ilex* dipende, infatti, dalla possibilità di accumulo delle risorse nel corso dell'anno e qualsiasi fattore che riduce la fissazione fotosintetica può ridurre la produttività. I periodi favorevoli per l'acquisizione del carbonio a Castelporziano sono Febbraio-Giugno ed Ottobre-Dicembre, quando le temperature fogliari sono comprese fra 14 e 28 °C (90-100% del valore massimo di fotosintesi) e quando l'umidità del suolo si avvicina ai valori massimi. L'attività fotosintetica si riduce drasticamente (quasi il 50% del massimo) durante il periodo di aridità estiva, determinando una scarsa disponibilità di carbonio per l'accrescimento. Un lungo periodo di aridità potrebbe determinare una incidenza negativa sulla produttività. Si è osservata una variazione significativa ($P < 0.01$) fra i tassi netti di fotosintesi dei germogli, delle foglie del primo e quelle del secondo anno (in media maggiore del 52% nei germogli rispetto alle foglie di 1 anno e del 119% rispetto alle foglie di 2 anni). Valutando la percentuale dei tre tipi di foglie in arbusti rappresentativi della popolazione sarà possibile calcolare, nel corso del proseguimento degli studi, il tasso medio di fotosintesi netta nel corso dell'anno; la differenza di attività, nei periodi ottimali ed in quelli di aridità, consentirà di definire l'incidenza sulla produttività potenziale.

La traspirazione ha mostrato un aumento significativo ($P < 0.01$) del 22% durante l'aridità, sebbene ci sia una riduzione della conduttanza stomatica (42% del massimo). I germogli mostrano valori di traspirazione più elevati del 28% rispetto alle foglie mature. Anche in questo caso sarà possibile definire i costi di mantenimento delle foglie (in termini di acqua e di carbonio) e valutare le possibili incidenze dell'aumento di temperatura sulla vita media fogliare, parametro essenziale per definire la strategia adattativa delle specie al cambiamento climatico e, quindi, la loro possibilità di persistenza. Si potrebbe arrivare alla realizzazione di un modello previsionale di produttività in ambienti caratterizzati da differente disponibilità idrica o deficit di saturazione di vapore.

Lo studio condotto sull'andamento della variazione dei dati morfologici fogliari nel corso dell'anno ha mostrato significative ($P < 0.05$) differenze fra la massa fogliare specifica (LMA), il contenuto relativo di acqua (RWC), la densità tissutale (LTD) e lo spessore totale fogliare (SP) nel periodo ottimale ed in quello di aridità, con una riduzione del 9% del RWC ed un aumento del 29% del LMA nel periodo di aridità.

Analisi più mirate ed uno studio delle relazioni struttura-funzionamento in risposta ai dati climatici consentirà di arrivare alla determinazione di indicatori di tolleranza a stress ambientali ed in particolare a stress da aridità.

I risultati ottenuti ancorché parziali offrono prospettive molto promettenti per l'individuazione di indici di tolleranza a siccità. Tuttavia, ulteriori esperimenti sugli isotopi dell'ossigeno e le correlazioni tra composizione isotopica e fenologia contribuiranno a chiarire gli effetti dei cambiamenti climatici sulla produttività agricola.