

Variabilità intraspecifica di uno spettro di tratti funzionali nelle piante arbustive del Mediterraneo in risposta all'aridità

Dott. Lorenzo Maria Iozia

1.0) Contesto:

Il Bacino del Mediterraneo è un hotspot di biodiversità vegetale (Medail & Quezel, 1997) il cui clima è caratterizzato da aridità estiva e inverni umidi, in cui anni più o meno piovosi si susseguono con un pattern imprevedibile (Zunzunegui et al. 2011). Il cambiamento climatico in atto sta esacerbando gli stress dovuti all'aridità, aumentandone l'intensità e la durata (Diffenbaugh et al. 2007; Gao et al. 2008). L'aridità caratterizza tutti gli ecosistemi mediterranei (Hoerling et al. 2012) e negli ultimi decenni ha superato in intensità qualunque periodo comparabile negli ultimi 900 anni (Cook et al. 2016). In risposta all'aridità, le specie mediterranee hanno evoluto strategie di fuga (*escape*), evitanza (*avoidance*) o tolleranza (*tolerance*) (Basu et al. 2016), che possono essere anche combinate tra loro e vanno a costituire le caratteristiche innate che permettono alle specie di sopravvivere agli stress ambientali. Queste strategie possono variare ampiamente sia a livello interspecifico che intraspecifico (Welles & Funk, 2020), quando diverse popolazioni sono soggette a diverse pressioni selettive. Le strategie si riflettono in caratteristiche fenologiche, morfologiche e fisiologiche dell'organismo, note come tratti funzionali, che sono definiti come qualsiasi caratteristica misurabile a livello di individuo che può influenzare indirettamente la fitness delle piante attraverso i suoi effetti sulla crescita, sulla riproduzione e sulla sopravvivenza (Violle et al. 2007).

Per molto tempo lo studio della variazione dei tratti funzionali in risposta ai fattori di stress si è focalizzata sul piano interspecifico, trascurando la variabilità intraspecifica. Quest'ultima può esprimersi su tre livelli: I) variabilità tra le popolazioni, II) variabilità tra gli individui all'interno di una popolazione; III) variabilità all'interno degli individui (Albert et al. 2011). La variabilità intraspecifica è determinata da due meccanismi: la plasticità fenotipica e il differenziamento genetico. La plasticità fenotipica, che è definita come la capacità di un dato genotipo di esprimere fenotipi diversi in diverse condizioni ambientali (Bradshaw 1965), esprime la capacità di acclimatazione di una data specie, un processo reversibile. Il differenziamento genetico è invece il risultato di processi evolutivi dipendenti dalla selezione naturale ed assume un valore adattativo rispetto ad un determinato ambiente, un processo irreversibile (Weis et al. 2010). In risposta ai cambiamenti ambientali questi meccanismi potrebbero agire su una scala temporale e spaziale diversa. In particolare, le variazioni intraspecifiche dei tratti potrebbero essere prima di natura fenotipica e poi di natura genotipica. (Garnier & Grigulis, 2016).

Le piante possono mostrare un ampio grado di variabilità intraspecifica nella loro risposta agli stress (Jung et al. 2010, Siefert et al. 2015). Negli ultimi tempi lo studio della variabilità intraspecifica ha assunto una particolare rilevanza in quanto diversi studi sottolineano che, nella risposta ai cambiamenti ambientali, la variabilità intraspecifica potrebbe eguagliare o persino superare in importanza la variabilità interspecifica, soprattutto su una scala spaziale ridotta (Albert et al. 2011). Nonostante il grande interesse che l'argomento ha suscitato negli ultimi anni (Lavorel & Garnier, 2002; Funk et al. 2017; Weiss & Ray, 2019), molti studi sui tratti funzionali a scala ridotta assumono ancora che la variabilità intraspecifica sia un fenomeno biologico trascurabile (Funk et al. 2017). Da qui l'esigenza di incrementare gli studi in tale ambito anche al fine di implementare i database globali di tratti funzionali come TRY (Kattge et al. 2020; Fraser et al. 2020).

2.0) Obiettivi:

L'obiettivo di questo Dottorato di Ricerca è esaminare il ruolo della variabilità intraspecifica dei tratti funzionali di alcune specie legnose mediterranee nella risposta all'aridità. Lo studio sarà condotto all'interno del Lazio, una regione con un'ampia varietà di paesaggi e contesti climatici. Le specie selezionate sono ampiamente diffuse nel bacino del Mediterraneo: *Quercus ilex* L., *Cistus salviifolius* L., *Phyllirea latifolia* L. e *Pistacia lentiscus* L.. La loro scelta permette anche un confronto sulla base della loro storia evolutiva tra specie evolute in un contesto mediterraneo (*Q. ilex* e *C. salviifolius*), e specie evolute in un contesto premediterraneo (*P. latifolia* e *P. lentiscus*) (Gratani & Varone, 2004). Le popolazioni di queste specie verranno selezionate lungo un gradiente pluviometrico per approssimare un gradiente di aridità. La risposta delle specie (adattamento) e delle popolazioni (acclimatazione vs. adattamento) al gradiente verranno caratterizzate analizzando i tratti funzionali a livello di pianta (tratti strutturali, fenologici e pattern di allocazione della biomassa) e della foglia (tratti morfologici, anatomici, fisiologici e produzione di metaboliti secondari di interesse ecologico).

3.0) Metodi:

Il progetto è suddiviso in tre moduli, corrispondenti ai tre anni del dottorato, durante i quali condurrò sia studi *in situ* che *ex situ*. Un piano dettagliato per lo svolgimento delle attività è illustrato in figura 1.

- **Modulo 1: Raccolta dati 05/21-07/21**

Analisi *in situ* dei tratti morfologici, anatomici, strutturali, e produzione dei metaboliti secondari di interesse ecologico per tutte le specie e popolazioni considerate. I tratti funzionali delle specie verranno campionati seguendo protocolli standardizzati (Cornelissen et al. 2003; Pérez-Harguindeguy et al. 2013).

- **Modulo 2: Raccolta dati 05/22-07/22**

Crescita *ex situ* di piante da semi raccolti in campo, analisi e modellizzazione della crescita (RGR) e di tratti di carattere morfologico, fenologico, anatomico e strutturale delle specie considerate cresciute in diverse condizioni di disponibilità idrica (100%, 75%, 50% rispetto a quelle ottimali riportate in letteratura (e.g. Poorter et al. 2010)) in più repliche.

- **Modulo 3: Raccolta dati 05/23-07/23**

Studio dei tratti fisiologici, dei pattern di allocazione della biomassa, e dei metaboliti secondari di interesse ecologico sulle piante cresciute durante il secondo modulo.

3.1) Protocollo di scelta delle popolazioni:

Sarà impiegato il database GBIF (*Global Biodiversity Information Facility*; Telenius, 2011) per ottenere i dati di distribuzione delle specie, e i database Worldclim (Fick & Hijmans, 2017) e Envirem (Title & Bemmels, 2018) per ottenere i *raster* bioclimatici contenenti le informazioni climatiche e ambientali.

Tramite il software R le coordinate di presenza delle specie verranno filtrate (attraverso il pacchetto *CoordinateCleaner*; Zizka et al. 2019) e raggruppate via *cluster analysis*. Successivamente impiegherò lo stesso software per estrapolare i valori climatici corrispondenti alle diverse popolazioni e le userò per identificare le popolazioni lungo il gradiente così ottenuto.

3.2) Protocolli di misurazione:

- **Tratti morfologici, fenologici e fisiologici:**

I tassi fotosintetici, di respirazione e la conduttanza stomatica saranno misurati utilizzando un analizzatore portatile di CO₂ a sistema aperto, equipaggiato con una camera fogliare (PLC, Parkinson Leaf Chamber).

Per misurare la fluorescenza della clorofilla sarà utilizzato un fluorimetro portatile.

Il contenuto in azoto della foglia (LNC) verrà misurato tramite digestione di Kjeldahl (Muñoz-Huerta et al. 2013).

Lo spessore della lamina fogliare verrà misurato con un calibro.

Saranno determinati, inoltre, i seguenti indici morfologici fogliari: la massa fogliare per area (LMA) misurata calcolando il rapporto tra peso secco della foglia e area fogliare; il contenuto in peso secco della foglia (LDMC) ottenuto dal rapporto tra il peso secco della foglia e il suo peso a saturazione di acqua; la densità specifica del fusto (WD) ottenuta dal rapporto tra peso secco del ramo e volume della stessa sezione in condizioni idratate. Durante la crescita *ex situ* le piante verranno anche monitorate nella longevità fogliare e nell'altezza totale della pianta.

- **Tratti anatomici e strutturali:**

Lo spessore della parete tangenziale esterna dell'epidermide fogliare, lo spessore medio della parete cellulare dell'epidermide fogliare, la proporzione di spazi intercellulari nel mesofillo, lo spessore della cuticola, il calibro della componente floematica e xilematica, la sclerificazione dei vasi xilari, e la densità stomatica verranno ottenuti in microscopia. L'indice di area stomatica sarà misurato come il prodotto tra la lunghezza media degli stomi e la densità stomatica (Ashton & Berlyn, 1994).

- **Pattern di allocazione della biomassa:**

Per quanto riguarda le frazioni di allocazione della biomassa, verrà misurato il peso secco di foglie, radici e fusto e queste misure verranno impiegate per misurare la percentuale di peso secco allocato a ciascun compartimento (rispetto al peso secco dell'intero organismo). I rapporti allometrici tra i compartimenti verranno misurati tramite i rapporti tra la sezione epigea e ipogea della pianta (*root/shoot*) e quelli tra foglie e radici (*leaf/root*).

- **Produzione di metaboliti secondari di interesse ecologico**

La determinazione di terpeni, fenoli e flavonoidi totali verrà ottenuta tramite quantificazione spettrofotometrica (Ainsworth & Gillespie, 2007; Sun et al. 2011; Edeoga et al. 2005).

3.3)Analisi statistica:

I dati raccolti verranno analizzati attraverso l'analisi delle componenti principali (PCA) per la determinazione degli spettri dei tratti, mentre per identificare differenze significative tra le popolazioni, verranno impiegate le regressioni, sia generalizzate sia ad assi maggiori ridotti, e l'analisi della varianza.

4.0)Potenziali risultati e applicazioni:

L'ipotesi di questo progetto è che la variabilità intraspecifica tra le popolazioni studiate sia significativa, il che implica la rottura del comune assunto secondo il quale il suo ruolo ecologico sia trascurabile. In questo scenario esistono diverse possibilità, a seconda che la variabilità si osservi solo *in situ* o anche in condizioni sperimentali. Nel caso in cui le popolazioni mostrino variabilità intraspecifica *in situ* ma non *ex situ*, potremmo trovarci di fronte a un caso di acclimatazione dovuta alla plasticità fenotipica, e dunque qualunque popolazione tra quelle in esame esprimerebbe gli stessi tratti se posta in condizioni comuni di aridità. Nel caso in cui, invece, la variabilità intraspecifica tra le popolazioni venisse mantenuta anche in condizioni sperimentali *ex situ*, potrebbe effettivamente dipendere da un adattamento a livello genetico, e staremmo dunque osservando diversi ecotipi.

I risultati di questo studio potrebbero sviluppare diverse applicazioni, sia pratiche che concettuali. Dal punto di vista pratico, conoscendo meglio gli adattamenti delle singole popolazioni, potremmo ad esempio selezionare con maggiore consapevolezza le popolazioni da cui raccogliere gli individui scelti per le operazioni di riforestazione. Dal punto di vista concettuale, alla base di futuri studi, potremmo scegliere ad esempio se considerare oppure no le diverse popolazioni presenti all'interno di una regione come unità distinte su cui produrre modelli di distribuzione, anche in funzione di studi volti a individuare quali popolazioni rischiano di scomparire e quali no.

Fasi principali del progetto:

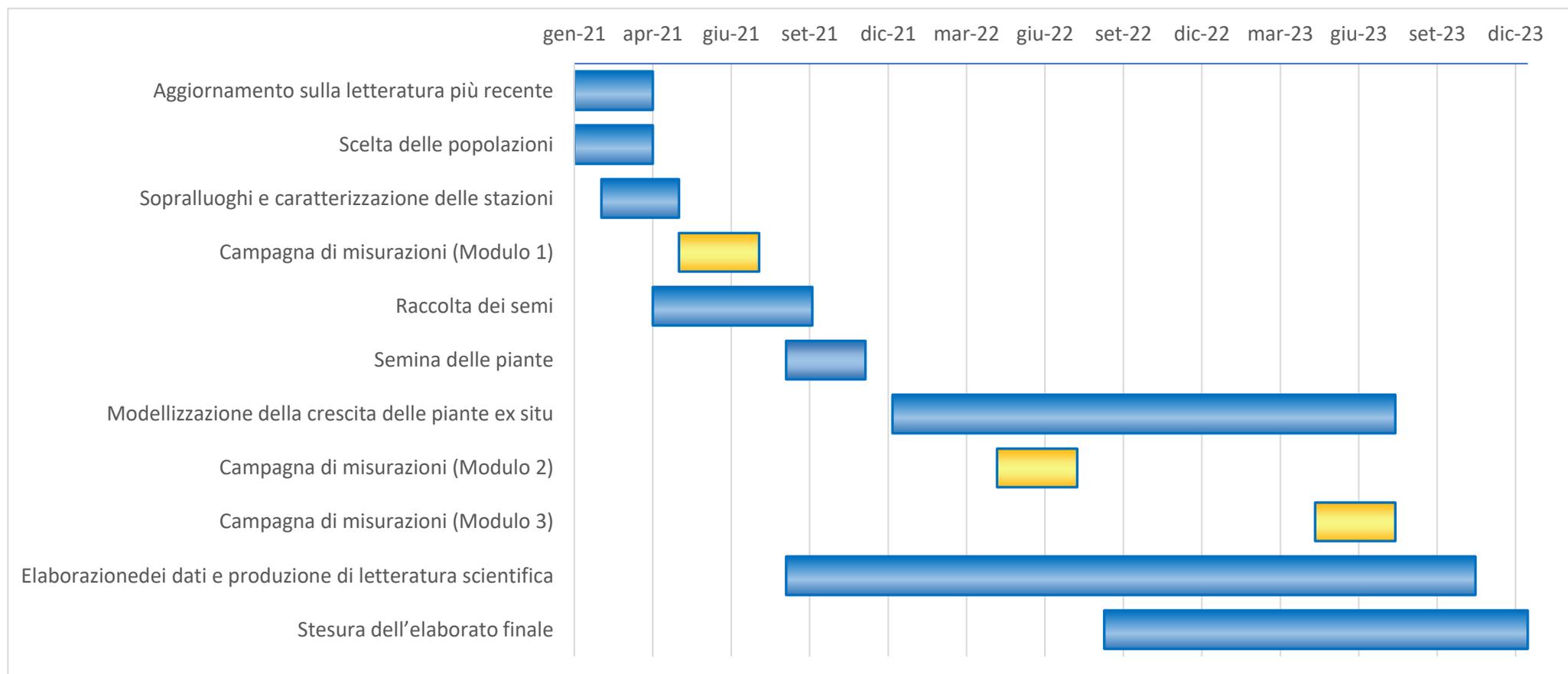


Figura 1: Diagramma di Gantt che illustra le attività principali che svolgerò durante il dottorato. Le barre in giallo evidenziano i tre moduli di raccolta dati che avverranno tra maggio e luglio del 2021, 2022 e 2023, rispettivamente.

Bibliografia:

- Medail, F., & Quezel, P. (1997). Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean Basin. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 112-127.
- Zunzunegui, M., Barradas, M. C. D., Ain-Lhout, F., Alvarez-Cansino, L., Esquivias, M. P., & Novo, F. G. (2011). Seasonal physiological plasticity and recovery capacity after summer stress in Mediterranean scrub communities. *Plant Ecology*, 212(1), 127-142.
- Diffenbaugh, N. S., Pal, J. S., Giorgi, F., & Gao, X. (2007). Heat stress intensification in the Mediterranean climate change hotspot. *Geophysical Research Letters*, 34(11).
- Gao, X., & Giorgi, F. (2008). Increased aridity in the Mediterranean region under greenhouse gas forcing estimated from high resolution simulations with a regional climate model. *Global and Planetary Change*, 62(3-4), 195-209.
- Hoerling, M., Eischeid, J., Perlwitz, J., Quan, X., Zhang, T., & Pegion, P. (2012). On the increased frequency of Mediterranean drought. *Journal of climate*, 25(6), 2146-2161.
- Cook, B. I., Anchukaitis, K. J., Touchan, R., Meko, D. M., & Cook, E. R. (2016). Spatiotemporal drought variability in the Mediterranean over the last 900 years. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 121(5), 2060-2074.
- Basu, S., Ramegowda, V., Kumar, A., & Pereira, A. (2016). Plant adaptation to drought stress. *F1000Research*, 5.
- Welles, S. R., & Funk, J. L. (2020). Patterns of intraspecific trait variation along an aridity gradient suggest both drought escape and drought tolerance strategies in an invasive herb. *Annals of Botany*.
- Violle, C., Navas, M. L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., & Garnier, E. (2007). Let the concept of trait be functional! *Oikos*, 116(5), 882-892.
- Albert, C. H., Grassein, F., Schurr, F. M., Vieilledent, G., & Violle, C. (2011). When and how should intraspecific variability be considered in trait-based plant ecology? *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 13(3), 217-225.
- Bradshaw, A. D. (1965). Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in genetics*, 13(1), 115-155.
- Weis, V. M. (2010). The susceptibility and resilience of corals to thermal stress: adaptation, acclimatization or both? *Molecular Ecology*, 19(8), 1515-1517.
- Garnier, E., Navas, M. L., & Grigulis, K. (2016). *Plant functional diversity: organism traits, community structure, and ecosystem properties*. Oxford University Press.
- Jung, V., Violle, C., Mondy, C., Hoffmann, L., & Muller, S. (2010). Intraspecific variability and trait-based community assembly. *Journal of ecology*, 98(5), 1134-1140.
- Siefert, A., Violle, C., Chalmandrier, L., Albert, C. H., Taudiere, A., Fajardo, A., ... & Wardle, D. A. (2015). A global meta-analysis of the relative extent of intraspecific trait variation in plant communities. *Ecology letters*, 18(12), 1406-1419.
- Funk, J. L., Larson, J. E., Ames, G. M., Butterfield, B. J., Cavender-Bares, J., Firn, J., ... & Wright, J. (2017). Revisiting the Holy Grail: using plant functional traits to understand ecological processes. *Biological Reviews*, 92(2), 1156-1173.
- Weiss, K. C., & Ray, C. A. (2019). Unifying functional trait approaches to understand the assemblage of ecological communities: synthesizing taxonomic divides. *Ecography*, 42(12), 2012-2020.
- Lavorel, S., & Garnier, E. (2002). Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Functional ecology*, 16(5), 545-556.
- Kattge, J., Bönisch, G., Díaz, S., Lavorel, S., Prentice, I. C., Leadley, P., ... & Cuntz, M. (2020). TRY plant trait database—enhanced coverage and open access. *Global change biology*, 26(1), 119-188.

- Fraser, L. H. (2020). TRY—A plant trait database of databases. *Global Change Biology*, 26(1), 189-190.
- Gratani, L., & Varone, L. (2004). Adaptive photosynthetic strategies of the Mediterranean maquis species according to their origin. *Photosynthetica*, 42(2), 551-558.
- Cornelissen, J. H. C., Lavorel, S., Garnier, E., Díaz, S., Buchmann, N., Gurvich, D. E., ... & Poorter, H. (2003). A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*, 51(4), 335-380.
- Pérez-Harguindeguy, N., Diaz, S., Gamier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., ... & Cornelissen, J. H. C. (2013). New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* 61. 167-234.
- Poorter, H., Niinemets, Ü., Walter, A., Fiorani, F., & Schurr, U. (2010). A method to construct dose–response curves for a wide range of environmental factors and plant traits by means of a meta-analysis of phenotypic data. *Journal of Experimental Botany*, 61(8), 2043-2055.
- Telenius, A. (2011). Biodiversity information goes public: GBIF at your service. *Nordic Journal of Botany*, 29(3), 378-381.
- Fick, S. E., & Hijmans, R. J. (2017). WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International journal of climatology*, 37(12), 4302-4315.
- Title, P. O., & Bemmels, J. B. (2018). ENVIREM: an expanded set of bioclimatic and topographic variables increases flexibility and improves performance of ecological niche modeling. *Ecography*, 41(2), 291-307.
- Zizka, A., Silvestro, D., Andermann, T., Azevedo, J., Duarte Ritter, C., Edler, D., ... & Antonelli, A. (2019). CoordinateCleaner: Standardized cleaning of occurrence records from biological collection databases. *Methods in Ecology and Evolution*, 10(5), 744-751.
- Muñoz-Huerta, R. F., Guevara-Gonzalez, R. G., Contreras-Medina, L. M., Torres-Pacheco, I., Prado-Olivarez, J., & Ocampo-Velazquez, R. V. (2013). A review of methods for sensing the nitrogen status in plants: advantages, disadvantages and recent advances. *Sensors*, 13(8), 10823-10843.
- Ashton, P. M. S., & Berlyn, G. P. (1994). A comparison of leaf physiology and anatomy of *Quercus* (section *Erythrobalanus*-Fagaceae) species in different light environments. *American Journal of Botany*, 81(5), 589-597.
- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature protocols*, 2(4), 875-877.
- Sun, L., Zhang, J., Lu, X., Zhang, L., & Zhang, Y. (2011). Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food and chemical toxicology*, 49(10), 2689-2696.
- Edeoga, H. O., Okwu, D. E., & Mbaebie, B. O. (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African journal of biotechnology*, 4(7), 685-688.