

MIUR-PRIN 2010-2011 *TreeCity*

Progettare la città verde nell'era del cambiamento globale: funzioni degli alberi urbani e loro adattabilità nelle future condizioni climatiche (*TreeCity*)



RELAZIONI PRIMO E SECONDO ANNO DI ATTIVITA'

(Febbraio 2013-Luglio 2015)

A cura di Giacomo LORENZINI, coordinatore nazionale

INDICE

WP1: SISTEMI VEGETALI URBANI, UN LABORATORIO A CIELO APERTO PER VALUTARE LA QUALITÀ URBANA E LE CONDIZIONI DI STRESS	4
WP1 – UR: UNIROMA, UNIVERSITA’ “LA SAPIENZA” DI ROMA.....	4
WP1 – UR: UNIFI, UNIVERSITA’ DI PISA.....	12
WP1 – UR: UNIPA, UNIVERSITA’ DEGLI STUDI DI PALERMO	16
WP1 – UR: UNITUS, UNIVERSITA’ DEGLI STUDI DI TRIESTE.....	22
WP1 – UR: UNITUS, UNIVERSITA’ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA.....	29
WP2: IL CONTRIBUTO DEGLI ECOSISTEMI VEGETALI URBANI ALLA QUALITÀ DELLA VITA.....	30
WP2 – UR: UNICATT, UNIVERSITA’ CATTOLICA DEL SACRO CUORE DI BRESCIA	31
WP2 – UR: UNITUS, UNIVERSITA’ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA.....	51
WP2 – UR: UNIPA, UNIVERSITA’ DEGLI STUDI DI PALERMO	56
WP2 – UR: UNITS, UNIVERSITA’ DEGLI STUDI DI TRIESTE.....	59
WP2 – UR: UNIROMA, UNIVERSITA’ “LA SAPIENZA” DI ROMA.....	63
WP3: SIMULAZIONE DI UNO SCENARIO 2050 ATTRAVERSO L'APPLICAZIONE DI STRESS COMBINATI IN AMBIENTE CONTROLLATO.....	66
WP3 – UR: CNR FI, CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE DI FIRENZE	66
WP3 – UR: UNIFI, UNIVERSITA’ DEGLI STUDI DI FIRENZE	68
WP3 – UR: UNIFI, UNIVERSITA’ DI PISA.....	69
WP3 – UR: UNIROMA, UNIVERSITA’ “LA SAPIENZA” DI ROMA.....	76
WP3 – UR: UNICATT, UNIVERSITA’ CATTOLICA DEL SACRO CUORE DI BRESCIA	78
WP3: COLLABORAZIONE FRA UNICATT, UNITUS E UNIROMA.....	82
WP4: MODELLI INTEGRATI.....	93
WP4 – UR: UNITUS, UNIVERSITA’ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA.....	95
WP 4 – UR: UNICATT, UNIVERSITA’ CATTOLICA DEL SACRO CUORE DI BRESCIA ...	97

WP4 – UR: UNIROMA, UNIVERSITA’ “LA SAPIENZA DI ROMA”	101
WP5: DIVULGAZIONE	105

WP1: SISTEMI VEGETALI URBANI, UN LABORATORIO A CIELO APERTO PER VALUTARE LA QUALITÀ URBANA E LE CONDIZIONI DI STRESS

(Coordinatore: Prof. Fausto Manes)

L'obiettivo del WP1 è quello di monitorare le funzioni e le prestazioni di piante localizzate in siti strategici di città modello (e.g. Roma, Palermo) e aree analoghe di ambienti rurali/periurbani, in presenza di condizioni climatiche simili e di sufficiente uniformità in termini genetici del materiale vegetale. Indagini in pieno campo su licheni e alberi sono svolte al fine di caratterizzarne la risposta agli attuali parametri ambientali. Lo stato di salute di piante adulte, situate in differenti aree di indagine, quali Roma (urbana/periurbana) e Palermo (periurbana), sarà valutato nell'ottica di migliorare la qualità dell'aria e il benessere umano.

WP1 – UR: UNIROMA, UNIVERSITA' "LA SAPIENZA" DI ROMA

Responsabile: Prof. Fausto Manes

Le attività in campo sono state effettuate in due foreste a *Quercus ilex* L. situate all'interno di aree verdi dell'area metropolitana romana: la lecceta di una villa storica urbana (Villa Ada) e quella di una foresta periurbana (Tenuta Presidenziale di Castelporziano). In particolare, a Villa Ada sono stati selezionati due siti sperimentali a diverse distanze dalla Via Salaria (SS4), caratterizzata da elevato traffico veicolare. Il primo sito (VAs) è localizzato a 3m dalla strada, mentre il secondo (VA) è sito all'interno dell'area verde, a circa 300 m dalla strada. A Castelporziano, le misure ecofisiologiche e i campionamenti per le analisi fitochimiche sono stati effettuati nel sito di Grotta di Piastra (CP), in cui è anche localizzata la torre per misure micrometeorologiche gestita da UR-TUS (WP2).

L'attività svolta mira a comprendere se la foresta periurbana ha una maggiore funzionalità rispetto a quella urbana che deve far fronte ad una molteplicità di *stress* che si susseguono o sono contemporaneamente presenti (es. isola di calore; elevata concentrazione di inquinanti; impermeabilizzazione del suolo). I risultati ottenuti riguardo gli effetti degli *stress* sulle infrastrutture verdi in ambito urbano e periurbano, sono in corso di elaborazione al fine di parametrizzare modelli SVAT per quantificare l'influenza che gli stress abiotici hanno sulla fornitura di Servizi Ecosistemici nell'area metropolitana romana.

Nel corso della stagione vegetativa 2013-2014, su individui di *Q. ilex* nei due siti selezionati (CP; VA), sono state effettuate le seguenti analisi:

- Misure di scambi gassosi a livello fogliare. L'andamento giornaliero di fotosintesi netta (P_n , $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), conduttanza stomatica (g_s , $\text{mmolH}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), traspirazione fogliare (E , $\text{mmolH}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e respirazione al buio (R_D , $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), è stato misurato nei siti di VA e CP tramite lo strumento CIRAS 2 (PP-System, UK). Le misure sono state effettuate mensilmente

in giornate consecutive, in condizioni meteo stabili e quindi altamente confrontabili tra i due siti. Durante ciascun campionamento, sono stati effettuati 4 cicli di misure tra le 8:00 e le 18:00 circa, su foglie di sole di 4-8 individui per sito ($n = 30-35$ misure per ciclo).

- Misure di fluorescenza della clorofilla “a”. Le misure di fluorescenza sono state effettuate secondo due differenti modalità:

a) in campo, direttamente *in situ*, è stata misurata la fluorescenza fogliare diretta (“*prompt fluorescence*”, PF) con lo strumento portatile Handy PEA (Hansatech Instruments, Norfolk, UK). Le misure sono state effettuate parallelamente agli scambi gassosi, su foglie di sole preventivamente oscurate per 40 minuti tramite pinze fogliari. L’applicazione del JIP-test sulle misure di PF consentirà di derivare una costellazione di parametri, che danno informazioni sullo stato funzionale dell’organo fogliare prima che siano visibili danni macroscopici.

b) in laboratorio, *ex-situ*, su campioni di foglie di sole e di ombra prelevati a CP e lungo il transetto VAs-VA, è stata effettuata la misura simultanea della PF e dello stato redox del PSI (Modulated Reflection a 820 nm, MR), tramite il nuovo fluorimetro M-PEA (Multi-Function Plant Efficiency Analyser). I campioni fogliari, prelevati durante le giornate di misura degli scambi gassosi, sono stati trasportati in laboratorio all’interno di una borsa frigo, e conservati al buio per 24 ore prima della misura, consentendo così di eliminare l’effetto della fotoinibizione (sia la componente dinamica che cronica).

- Misure di potenziale idrico fogliare. Le misure sono state effettuate nei siti di CP e VA tramite camera di Scholander (PMS Instruments, Oregon, USA), nelle stesse date e sugli stessi individui campionati per gli scambi gassosi. Per ogni data, le misure sono state effettuate a mezzogiorno (Ψ_{MD}) in entrambi i siti, e prima dell’alba (Ψ_{PD}) per il primo anno, nel solo sito di CP.

- Misure di spettroradiometria a livello fogliare. Con cadenza stagionale (giugno-agosto-ottobre), nei siti di CP, VAs e VA sono state effettuate misure tramite lo strumento Fieldspec 3 (ASD inc., CA, USA), equipaggiato con Leaf Clip (ASD inc. CA, USA). Da queste misure verranno ricavati alcuni indici di riflettanza. Lo strumento misura la riflettanza nel range 400-1800 nm con una risoluzione nominale di 1nm. Dallo spettro di riflettanza sono stati ricavati un insieme di indici spettrali comunemente usati in letteratura per stimare proprietà funzionali e più comunemente la composizione chimica fogliare. La maggior parte della letteratura riporta modelli empirici o semi empirici utili per stimare in modo non distruttivo la composizione chimica fogliare con particolare attenzione al contenuto idrico, la clorofilla, i carotenoidi e antociani. In particolare gli indici “Photochemical reflectance index” (PRI) e i vari indici “fluorescence ratio” FR sono stati utilizzati per stimare rispettivamente lo stato di epo-ossidazione delle xantofille indici e stimare la fluorescenza delle clorofille. Il ciclo delle xantofille è largamente responsabile della dissipazione dell’energia luminosa in eccesso (quenching non-fotochimico). Pertanto questo

indice può essere utilizzato per valutare lo stato di *stress* della vegetazione. Gli indici FR invece fanno parte di una linea di ricerca relativamente nuova che tenta di stimare lo stato fisiologico della vegetazione in remoto utilizzando la fluorescenza della clorofilla. Questi indici, misurati a livello fogliare, sono stati correlati con il tasso di fotosintesi e con il quenching fotochimico misurato tramite fluorescenza modulata. Invece, in letteratura, non vengono riportate correlazioni fra questi indici e parametri ricavabili con il JIP-test su misure di fluorescenza diretta. A questo scopo, le misure di riflettanza sono state prese sulle stesse foglie su cui è stata misurata la fluorescenza fogliare dopo adattamento al buio.

- Osservazioni fenologiche. Sia a livello di individuo (Individual tree level, 15 alberi per sito) che di intero sito (Plot level), è stata valutata la presenza e l'estensione delle seguenti fasi: germogliamento primario e secondario, fioritura, viraggio e caduta delle foglie. Tutti i rilievi sono stati eseguiti utilizzando il protocollo già utilizzato nel programma di rilevamento fenologico UN-ECE-ICP-Forests (International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forests, <http://www.ICP-Forests.org>). Le osservazioni sono state condotte settimanalmente durante il periodo vegetativo (marzo-giugno e settembre-ottobre), e mensilmente negli altri periodi. Le uscite sono state effettuate da aprile a luglio 2013 e poi, successivamente, nei mesi di settembre e ottobre dello stesso anno. Nella fase iniziale del lavoro si è proceduto con l'installazione dei plot, cioè con la scelta delle aree di campionamento e, all'interno di ciascuna di esse, dei singoli individui arborei di *Q. ilex* da monitorare nelle uscite successive (15 per ciascuna stazione, segnati con vernice indelebile così da essere facilmente rintracciabili). I rilievi fenologici sono stati ripetuti anche nel 2014, nel periodo compreso tra aprile e giugno. Nella fase iniziale del lavoro, come per l'anno precedente, si è proceduto con l'installazione dei *plot* e, all'interno di ciascuna di esse, dei singoli individui di *Q. ilex* da monitorare nelle uscite successive. Nel caso dell'area di studio di Villa Ada il *plot* è rimasto invariato rispetto al 2013 e consta di 15 individui. Nell'area di studio di Castelporziano, invece, il *plot* ha subito variazioni rispetto all'anno precedente e consta, nel 2014, di 8 individui collocati in una radura non considerata in precedenza ma utilizzata, nell'anno in corso, per le analisi degli scambi gassosi. I 15 alberi valutati nel 2013 sono comunque stati monitorati a livello individuale (*Individual tree level*) anche se non inseriti nella valutazione a livello di *plot* (*Plot level*).

- Misure di morfometria fogliare. *Specific Leaf Area* (SLA, $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) e *Relative Water Content* (RWC) fogliare, sono stati monitorati mensilmente in tutti i siti sperimentali.

- Analisi di dati telerilevati da satellite. Cartografie di uso del suolo dell'Area Metropolitana Romana, precedentemente prodotte dalla UR-ROMA (Manes et al., 2012), sono in corso di revisione e aggiornamento sulla base della classificazione di una immagine Landsat TM5 (20 luglio 2009). Il riconoscimento delle diverse tipologie vegetazionali verrà inoltre supportato da rilievi floristico-vegetazionali di campo, sia nel parco urbano di Villa Ada che nella Tenuta Presidenziale di Castelporziano.

Risultati

L'analisi dei parametri ambientali mette in luce come le differenze tra i due siti di studio in termini di temperatura, umidità relativa e precipitazioni, sono più pronunciate nel 2013 rispetto al 2014. In particolare nel sito urbano di Villa Ada (VA) la temperatura media giornaliera durante il periodo estivo sale oltre i 30 °C, mentre nel sito periurbano di Castelporziano (CP) il valore più alto raggiunto è intorno a 26 °C. L'umidità relativa a VA diminuisce gradualmente durante la primavera, raggiungendo il valore più basso intorno al 40% a giugno e ad agosto in entrambi gli anni. Nell'area periurbana le fluttuazioni stagionali di RH sono meno pronunciate e i valori rimangono costantemente più alti del 55%. In entrambi gli anni, la quantità delle precipitazioni a VA è stata maggiore di quelle verificatesi a CP (2013: CP = 658,8 mm, VA = 1104,3 mm; 2014: CP = 947,2 mm, VA = 1089,4 mm). Anche la distribuzione delle precipitazioni cambia tra i due siti. Da aprile a settembre a VA si è avuto un +76% e +46% di precipitazioni rispetto a CP nel 2013 e nel 2014. Differenze tra siti sono evidenziabili anche esaminando i parametri microclimatici rilevati a livello fogliare dal CIRAS-2, durante i cicli giornalieri di scambi gassosi. Nel sito urbano il deficit di pressione di vapore (VPD) è più alto che nel sito periurbano durante sette delle undici date in cui sono stati effettuati i campionamenti, mentre per la temperatura media dell'aria questa differenza si riscontra in sei delle undici date di campionamento. Le differenze riscontrate si concentrano nel periodo tarda primavera e all'inizio dell'estate. Queste differenze nelle condizioni ambientali influenzano in una certa misura anche le fasi fenologiche dei due siti. Se consideriamo il *trend* mensile del germogliamento primario (G1) e secondario (G2) si nota che il G1 avviene contemporaneamente in entrambi i siti sia nel 2013 che nel 2014. Tuttavia, nel 2013 l'intensità di questa fenofase è stata più marcata a VA, dove il G1 è completo già a giugno, con 83% degli individui che ricadono nella classe 5 (intensità massima), rispetto al 53% nel sito di CP. Il G2 nel 2013 compare in entrambi i siti a luglio rimanendo attiva fino ad ottobre, e nel 2014 la fase G2 compare già a partire da maggio a Villa Ada e si conclude a luglio. Anche per questa fenofase la differenza tra siti è relativa all'intensità del fenomeno più che al periodo di comparsa. Infatti mentre a settembre 2013 a VA la fase è attiva nel 67% degli individui (60% in classe 2 e 7% in classe 3), a CP solo il 7% degli individui campionati mostra la presenza di un G2 con una bassa intensità (classe 2). La fioritura avviene tra aprile e maggio in entrambi gli anni, e non presenta differenze tra siti nel tempo della comparsa.

Il potenziale idrico fogliare misurato prima dell'alba, in assenza di traspirazione, conferisce informazioni sulla disponibilità idrica al suolo che risente non solo della quantità e distribuzione delle precipitazioni, ma anche delle pratiche di gestione a cui i due siti sono soggetti. Infatti nel sito di VA, durante il periodo che va da giugno a settembre, vengono effettuate irrigazioni periodiche, evitando in tal modo l'insorgere di condizioni di *stress* idrico pronunciato. A CP il valore minimo di Ψ_{PD} viene raggiunto a settembre 2013 ($-3,3 \pm 0,53$ MPa), e recupera valori ottimali a seguito delle precipitazioni autunnali del mese di ottobre. Durante l'inverno e la

primavera successiva (2014), Ψ_{PD} rimane pressoché costante e vicino al valore di 0, prima di diminuire nuovamente nel periodo estivo (settembre 2014), confermando la presenza di condizioni di *stress* idrico come nel 2013, in seguito all'assenza di precipitazioni e delle alte temperature estive. Il potenziale idrico misurato a mezzogiorno (Ψ_{MD}), può invece fornire informazioni sulla strategia di uso dell'acqua di *Q. ilex*. A CP diminuisce da giugno a settembre del 2014, rimanendo costante da maggio a luglio e raggiungendo un picco negativo in presenza di *stress* idrico (settembre 2014, $-3,3 \pm 0,24$ MPa). Nel sito urbano di VA il Ψ_{PD} è costantemente più elevato rispetto a CP, con valori compresi tra $-0,2$ e $-0,57$ MPa. Nel sito urbano inoltre il Ψ_{MD} non mostra un chiaro *trend* stagionale, oscillando intorno ad un valore di $-2,5$ MPa implicando una diversa strategia nell'uso dell'acqua da parte del leccio nel sito urbano. Infatti mentre a CP il leccio utilizza una strategia prettamente isoidrica, indicata dal fatto che la differenza tra Ψ_{MD} e Ψ_{PD} si riduce nel periodo estivo, a VA la differenza tra Ψ_{MD} e Ψ_{PD} è sempre elevata, implicando una strategia tendenzialmente anisoidrica. Nonostante a Villa Ada la disponibilità idrica non sia un fattore limitante, come evidenziato dai valori di Ψ_{PD} , la conduttanza stomatica in risposta ad elevati valori di VPD, si riduce evitando così che il Ψ_{MD} raggiunga valori che possono comportare il rischio embolia.

Per quanto riguarda gli scambi gassosi possiamo evidenziare come in entrambi i siti il picco di assimilazione (P_n) si registra a dicembre, ma ci sono differenze nel *trend* stagionale sia nel 2013 che nel 2014. In particolare a VA il minimo di P_n (circa -30% rispetto a CP) è stato misurato durante il periodo primaverile in entrambi gli anni (giugno e aprile 2013; maggio e giugno 2014). Nel sito di CP invece, i valori minimi di P_n si registrano nel periodo estivo, (settembre 2013, luglio e settembre 2014). La g_s a VA conferma in parte quanto visto con la P_n , con eccezione del fatto che il valore minimo è raggiunto a settembre 2014. Nel sito periurbano di CP, P_n e g_s mostrano un marcato *trend* stagionale e sia per il 2013 che 2014, il valore più elevato è stato misurato nel periodo aprile-giugno, diminuendo all'abbassarsi del potenziale idrico di *pre-dawn* ($\Psi_{PD} < -2$ MPa). L'efficienza di uso dell'acqua (WUE) è tendenzialmente più alta a CP che a VA. Per quanto riguarda la respirazione fogliare (R_D) a VA è maggiore a giugno e settembre 2013, maggio, giugno e settembre 2014. Inoltre presenta un massimo di R_D a maggio 2014 ($3,0 \pm 0,67$) e vi è una grande variazione tra il massimo e il minimo misurato ($0,36 \pm 0,1$), raggiunto a dicembre. Nel sito di CP invece la variazione stagionale di R_D è meno pronunciata raggiungendo un massimo di circa $2 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ a luglio 2013 e aprile 2014, e un minimo di $0,8 \pm 0,15 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ a dicembre. La differenza di R_D tra i siti può essere imputata a due fattori: la temperatura media giornaliera, che come mostrato in precedenza è tendenzialmente più elevata nel sito urbano, e il Q_{10} , pari a $1,32 \pm 0,2$ e $1,70 \pm 0,15$ per CP e VA rispettivamente. Quest'ultima differenza può avere delle implicazioni non trascurabili sul bilancio del carbonio nei due siti dato che a parità di temperatura, il leccio nella foresta urbana di VA, avrà tassi di respirazione maggiori a quelli di CP. Considerando le medie annuali dei parametri funzionali, possiamo notare come per entrambi gli anni i parametri considerati (P_n , E , R_D , WUE) siano più elevati nella foresta urbana di VA, ad eccezione della g_s , che non cambia tra i siti. È interessante

notare che anche se l'assimilazione è più elevata nel sito urbano, il *Leaf Carbon Balance* (rapporto tra P_n e R_D) non cambia tra i siti. La fluorescenza della clorofilla *a*, seguita dall'applicazione del *test* JIP, si rivela anche nel nostro caso di studio, un ottimo *tool* per discriminare l'effetto di *stress* che agiscono sulla vegetazione provocando aggiustamenti della funzionalità complessiva, anche prima della comparsa di danni visibili, o di limitazioni biochimiche all'apparato fotosintetico. F_v/F_m rimane costantemente più elevato in CP durante tutto il periodo sperimentale, tendenza che cambia a settembre 2013 e 2014, in coincidenza con un aumento della dissipazione dell'energia in entrata nei fotosistemi (DI_0/RC). Questa risposta funzionale è riconducibile alla presenza di *stress* idrico. È interessante notare come a VA questo parametro, che è noto aumentare in condizioni di *stress* per dissipare l'eccesso di energia in maniera non dannosa per l'apparato fotosintetico, sia generalmente più elevato che a CP, specialmente durante la primavera e l'estate per entrambi gli anni. Come emerge dai parametri ambientali, il periodo primaverile e quello dell'inizio dell'estate, è critico per la vegetazione urbana perché alle alte temperature si combina anche una bassa RH e un elevato VPD. Nonostante a VA la risorsa idrica non risulti limitante, la risposta stomatica alla elevata richiesta traspirativa determina una limitazione dell'assimilazione, rendendo quindi necessario un aggiustamento della funzionalità dei fotosistemi. Tuttavia, quando le temperature si abbassano e le condizioni ambientali ritornano ottimali (ottobre 2013-febbraio 2014) i parametri di fluorescenza considerati, evidenziano la persistenza di una condizione sub-ottimale nella foresta urbana. Dall'altra parte a CP i parametri di fluorescenza, in accordo con quanto emerso dalle misure di scambio gassoso, evidenziano la presenza di *stress* idrico a settembre 2013 e 2014, quando l'indice di performance complessiva (PI_{TOT}) diminuisce.

Le misure di riflettanza fogliare sono state elaborate per calcolare alcuni indici vegetazionali fra cui il PRI, il FRI e il FRII. Le misure PRI, indice operante sulla lunghezza di assorbimento della xantofilla, sono in accordo con le misure di fluorescenza diretta e in particolare con i parametri che ci danno informazioni sulla dissipazione dell'energia luminosa in eccesso come DI_0/RC o di Kn , che tipicamente aumentano durante i periodi di *stress*. Tra PRI e questi parametri è stata trovata una correlazione di $r=0,59$ ($p < 0,05$), confermando come gli indici di fluorescenza riescano ad inquadrare l'attività del ciclo delle xantofille responsabile della dissipazione di energia in eccesso durante episodi di carenza idrica. Più interessante per gli sviluppi futuri, la correlazione fra il FRII, calcolato usando le lunghezze d'onda di assorbimento e di ri-emissione sotto forma di fluorescenza, della clorofilla, e il PI_{TOT} ($r=0.54$, $p < 0.02$). Dato che numerosi lavori presenti in letteratura hanno dimostrato come il PI_{TOT} è un parametro efficace per inquadrare il cambiamento della funzionalità di numerose specie vegetali, per diverse tipologie di *stress*, la correlazione tra un indice di riflettanza rilevabile anche al livello di chioma e il PI_{TOT} , può essere utile per ottenere mappe di distribuzione sullo stato di funzionalità della vegetazione su larga scala.

Le misure di SLA effettuate nel 2013, a cadenza mensile, non hanno evidenziato differenze nell'indice di sclerofillia al livello fogliare. Il RWC presenta una lieve diminuzione durante il periodo estivo (Agosto-Settembre 2013 e 2014) nel sito di Castelporziano dove lo *stress* idrico è più pronunciato, ma non scende mai al di sotto del 80%. Questo ci conferma che *Q. ilex* è una specie prettamente isoidrica.

Il confronto tra i siti CP e VA e il sito urbano in prossimità della strada ad elevato traffico veicolare (VAs) è stato valutato attraverso le misure di fluorescenza della clorofilla *a*. Analizzando i parametri ricavati dal JIP *test* che ci danno informazioni sia sulla performance complessiva dei fotosistemi (PI_{TOT}), sia su come l'energia viene dissipata, sono state evidenziate importanti differenze funzionali tra siti. Il PI_{TOT} del sito VAs non risente di variazioni stagionali, ed è costantemente più basso rispetto a quello misurato nella foresta urbana e periurbana. Nel sito periurbano la diminuzione di questo indice funzionale permane anche dopo 12 h di adattamento al buio con un concomitante aumento dell'energia dissipata per via non fotochimica (processi di foto-inibizione), in concomitanza con fenomeni di *stress* idrico. Per verificare quanto la funzionalità di *Q. ilex* nel sito VAs risentisse dell'esposizione (condizione di irradianza nel sito VAs è fortemente influenzata dall'ombreggiamento degli edifici circostanti), nei siti di CP e VA sono state campionate le foglie d'ombra. Sebbene i valori e i *trend* delle foglie d'ombra di CP e VA si avvicinino maggiormente ai valori misurati per VAs, confermando una dipendenza della funzionalità dei fotosistemi dalla tipologia di foglia in esame (foglia di sole-foglia d'ombra), le differenze con il sito in prossimità della strada persistono, in quanto quest'ultimo presenta sempre una minore funzionalità.

- Analisi di Cromatografia su Strato Sottile ad Alta Prestazione (HPTLC, strumento CAMAG, Muttenz, Switzerland). Su foglie di *Q. ilex*, prelevate stagionalmente (maggio-agosto-settembre) a CP e lungo il transetto VAs-VA, sono state effettuate analisi HPTLC al fine di determinare il contenuto di metaboliti secondari. I campionamenti sono stati effettuati su almeno 4 individui per sito, sia su foglie dell'anno precedente (ove disponibili) che su foglie nuove, considerando inoltre foglie di sole e foglie d'ombra per valutare l'effetto dell'esposizione. Per ogni campione sono stati estratti in Etanolo a 70° 2,50g di foglie essiccate (in stufa) per 48 ore a temperatura ambiente. L'estratto secco è stato ripreso con metanolo in modo da ottenere una concertazione di 60g/mL o 30mg/mL. L'estratto così diluito è stato usato per le analisi HPTLC. Le lastre sono state analizzate in diverse condizioni per uno *screening* più approfondito delle sostanze presenti. In una prima fase ci si è concentrati sulla messa a punto di un protocollo di estrazione e di valutazione della tipologia di analisi più idonea alla realizzazione di valutazioni quali-quantitative.

L'obiettivo delle analisi chimiche è stato quello di evidenziare le differenze della produzione metabolica in individui della stessa specie sottoposti a diverse condizioni ambientali. In base a quanto riportato in letteratura sono stati scelti dei *marker* la cui variabilità quali-quantitativa dipende da fattori ambientali. I metaboliti secondari presi in considerazione sono Catechina,

Epigallocatechina e Acido Clorogenico. Tali metaboliti secondari, infatti sono considerati mediatori chimici tra la pianta e l'ambiente.

In base ai dati ottenuti si può affermare che vi sono delle differenze di tipo quantitativo piuttosto che qualitativo tra i campioni prelevati nei mesi di Maggio, Agosto e Settembre. Il contenuto delle sostanze polifenoliche di nostro interesse risulta aumentare allontanandosi dalla Via Salaria (SS4), caratterizzata da elevato traffico veicolare. I campioni prelevati nel sito periurbano di Castelporziano presentano un contenuto maggiore di tali sostanze rispetto a quelli prelevati nel sito urbano di Villa Ada, e in quest'ultimo il contenuto diminuisce nei campioni raccolti vicino alla strada. Tutte le analisi confermano che la produzione di catechine e delle altre sostanze di natura fenolica risentono in maniera significativa dell'esposizione. Infatti, nelle foglie d'ombra la produzione di fenoli risulta molto ridotta.

Dal confronto tra le foglie dell'anno precedente (ove disponibili) e foglie nuove risulta evidente come i tre metaboliti *marker* variano in base all'età delle foglie. Il contenuto di Acido Clorogenico risulta essere maggiore nelle foglie nuove rispetto dell'anno precedente. Il contenuto di Catechine invece varia notevolmente tra i siti di raccolta. La produzione di questo metabolita risulta scarsa per i campioni prelevati a Villa Ada in prossimità della strada, mentre raggiunge un livello massimo nelle foglie vecchie prelevate nel sito interno alla Villa. Nel sito di Castelporziano le foglie nuove presentano un maggior contenuto di catechine rispetto ad entrambi i siti di Villa Ada. Il contenuto di Epigallocatechina è notevolmente influenzato dal periodo di raccolta: infatti le foglie nuove presentano un quantitativo maggiore di questo metabolita rispetto alle foglie dell'anno precedente.

Prodotti della Ricerca

Congressi:

- XXIII Congresso SItE - Ancona, 16-18 settembre 2013. “Il Progetto PRIN “TreeCity”: Servizi Ecosistemici offerti dal verde urbano e cambiamento globale nell'area metropolitana romana”. Fusaro L., Salvatori E., Mereu S., Silli V., Scassellati E., Toniolo C., Nicoletti M., Abbate G., Manes F. *Poster e abstract*
- XXIV Congresso SItE, 15-17 Settembre 2014. Infrastrutture verdi nell'area metropolitana romana: relazioni tra funzionalità della vegetazione e miglioramento della qualità dell'aria. Fusaro L., Salvatori E., Mereu S., Marando F., Abbate G., Scassellati E., Manes F. 2014. *Presentazione orale e abstract*.
- 28th Task Force Meeting ICP Vegetation. 3-5 febbraio 2015, Roma, Italia. “Ecophysiological response of *Quercus ilex* L. in urban and peri-urban forests of Rome: an Ecosystem Services perspective”. Fusaro L., Salvatori E., Mereu S., Marando F., Abbate G., Scassellati E., Manes F. *Presentazione orale e abstract*.

- 28th Task Force Meeting ICP Vegetation. 3-5 febbraio 2015, Roma, Italia. “Green infrastructures and ecosystem services: different vegetation types and air quality improvement in the metropolitan area of Rome”. Manes F., Salvatori E., Fusaro L., Blasi C., Munafò M., Ricci A., Silli V., Ciancarella L. *Presentazione orale e abstract*.

Articoli scientifici:

- Ecophysiological response of *Quercus ilex* L. in urban and peri-urban forests of Rome: an Ecosystem Services perspective. *In progress*
- Manes F., Salvatori E., 2014. Ecosystem Services of urban trees: The case of Rome. *Agrochimica*, 58 (3), 222-233.
- Fusaro L., Salvatori E., Mereu S., Silli V., Bernardini A., Tinelli A., Manes F., (in press). Researches in Castelporziano test site: ecophysiological studies on Mediterranean vegetation in a changing environment. *Rendiconti Lincei*, DOI: 10.1007/s12210-014-0374-1.

Tesi di laurea e laurea magistrale:

- “Impatto di stress ambientali sulle funzioni ecosistemiche in foreste urbane e periurbane: analisi della risposta ecofisiologica di *Quercus ilex* L. nell’area metropolitana romana per la caratterizzazione di servizi ecosistemici”. Federica Marando, *Ecobiologia*, Università La Sapienza (LM)
- “Il Servizio Ecosistemico di miglioramento della qualità dell’aria fornito dal verde urbano: uno studio condotto nell’area metropolitana di Roma”. Silvia Cocuccioni, *Scienze Ambientali*, Università La Sapienza. (L).
- “Studi recenti delle attività di *Quercus ilex* L.”. Federica Carosi - Farmacia, Università La Sapienza (L).

WP1 – UR: UNIPI, UNIVERSITA’ DI PISA

Responsabile: Prof. Giacomo Lorenzini

Nel quadro della collaborazione tra le unità operative UR-PI e UR-TS, questi primi due anni di studio si sono concentrati sui seguenti ambiti di indagine:

1. valutazione dello *stress* idrico in *Quercus ilex* L. lungo un transetto nord ovest-sud est (NO-SE) nella città di Trieste;

2. sperimentazioni preliminari di laboratorio che hanno come oggetto l'approfondimento di aspetti peculiari dell'ecofisiologia di *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, specie *target* per i trapianti.
3. Valutazione, mediante campionatori passivi, dei livelli di ozono nelle città di Udine e Trieste (estate 2014) e conseguente impatto su *F. caperata*.

1- All'interno di quattro aree verdi urbane di Trieste sono stati individuati altrettanti siti di campionamento disposti lungo un transetto NO-SE. I quattro siti di studio sono stati prescelti sulla base della presenza di tre o più individui di *Q. ilex*, specie modello scelta per la sperimentazione. I siti si differenziano in base alle caratteristiche microclimatiche [misure di temperatura e umidità relativa continue sono state effettuate mediante *data logger*, EL-USB, (*Laskar Electronics Inc.*)], differente livello di impermeabilizzazione del suolo circostante (quantificata mediante analisi grafica di immagini tratte da *Google Earth*) e diversa distanza sia dal mare che dal centro cittadino. Una quinta area, situata nel comune di Muggia, a sud di Trieste, è stata abbandonata dopo due mesi dall'inizio della sperimentazione per il venir meno dell'autorizzazione da parte del proprietario del fondo.

Le misure ecofisiologiche sono state effettuate nel periodo compreso tra maggio e settembre 2013 su almeno tre individui in ogni sito. Allo scopo di quantificare lo stato idrico delle piante ed evidenziare eventuali differenze tra i siti, sono stati misurati con cadenza mensile i parametri fisiologici più strettamente correlati alle condizioni di *deficit* idrico del suolo e della pianta: potenziale dell'acqua della foglia prima dell'alba, potenziale minimo diurno dell'acqua della foglia e il corrispondente potenziale xilematico (mediante camera a pressione, mod. 1505D, *PMS Instruments*, Albany, USA), conduttanza fogliare al vapore acqueo (mediante porometro a stato stazionario, C1, *Decagon Devices*, Pullman, USA) e perdita percentuale di conduttività idraulica dei rami di due anni di età (mediante flussometro di massa, *Xylem Embolism Meter*, *Bronkhorst*, Montigny-Les-Cormeilles, France). Per ognuno dei quattro siti si è proceduto inoltre all'elaborazione di curve di vulnerabilità dei rami di due anni di età mediante la tecnica della disidratazione su banco. L'efficienza degli apparati fotosintetici è stata valutata mediante misurazioni di fluorescenza della clorofilla *a* (Handy PEA, *Hansatech*, Norfolk, UK). A fine sperimentazione sono state effettuate anche misure di parametri anatomici come: diametro del lume dei vasi xilematici, densità del legno, dei vasi xilematici, delle venature fogliari, stomatica etc.

In ogni sito è stato inoltre effettuato un campionamento di foglie in corrispondenza dei giorni più caldi della stagione vegetativa (6 e 7 agosto 2013), caratterizzati anche dalla maggiore concentrazione di O₃ nelle ore centrali della giornata. Il materiale campionato è stato in parte devitalizzato in microonde, seccato in stufa a 70 °C per 24 h, macinato in mortaio di agata e spedito a ISO 4 s.n.c. (Pavia) per la quantificazione del $\delta^{13}\text{C}$.

Un'aliquota del suddetto materiale è stata preventivamente congelata in azoto liquido e conservata a -80 °C e successivamente inviata presso i laboratori del Dipartimento di Scienze

Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali dell'Università di Pisa (UR-PI) allo scopo di valutare i principali meccanismi di osmoregolazione ed alcuni dei sistemi antiossidanti (enzimatici e non) del tessuto fogliare. In particolare, si è proceduto alla determinazione mediante tecniche spettrofotometriche, spettrofluorimetriche e cromatografiche di (i) livelli delle ROS (nello specifico O_2^- ed acqua H_2O_2), (ii) attività dei principali enzimi (quali superossido dismutasi, guaiacolo perossidasi e catalasi) coinvolti nella risposta allo *stress* ossidativo, (iii) contenuto di composti aventi un forte potere antiossidante (quali fenoli, pigmenti fotosintetici e accessori), (iv) capacità antiossidante totale [tramite il saggio della riduzione del 2,2-difenil-1-picrilidrazile radicalico (DPPH)], (v) stato d'integrità delle membrane (mediante la stima della MDA), (vi) contenuto di prolina, (vii) determinazione del contenuto in carboidrati non strutturali. Al momento i risultati ottenuti sono in fase di elaborazione e di indagine statistica.

2- Al fine di approfondire alcuni aspetti dell'ecofisiologia di *F. caperata* – la specie lichenica che è stata selezionata per i trapianti e per le successive fumigazioni in camere controllate - è stata avviata una serie di sperimentazioni di laboratorio che prevede l'esposizione di campioni lichenici in camere chiuse a diverse umidità relative. I primi dati mostrano che con umidità relative superiori all'80% si ha attivazione del metabolismo anche in assenza di idratazione diretta con acqua liquida: i valori di fluorescenza indicano un rapporto diretto tra aumento dell'umidità relativa e aumento dell'attività degli apparati fotosintetici. La seconda sperimentazione - tuttora in corso - servirà ad approfondire le tempistiche di attivazione degli apparati fotosintetici in queste condizioni. Questi dati sono essenziali sia nella stesura del protocollo definitivo per i trapianti lichenici sia nella successiva analisi dei dati.

Ad integrazione delle indagini ecofisiologiche, nei laboratori dell'UR-PI, sono stati condotti esperimenti volti a valutare l'effetto di differenti umidità relative sull'integrità delle membrane della specie campione *F. caperata*. Porzioni di tallo del lichene sono stati esposti per una settimana a tre U.R. (~100%, ~90%, ~76%), 20 ± 1 °C, 19 ± 2 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con un ciclo luce/buio di 12/12 ore. Prima di essere stoccati a -20 °C, i campioni hanno subito differenti trattamenti al buio: congelamento rapido (direttamente a -20 °C), congelamento lento (3 ore a 0-4 °C); essiccazione rapida (in *silica gel* per 24 h) o lenta (3 h a temperatura ambiente e successivamente in *silica gel* per 24 h). I campioni sono stati macinati in azoto liquido, e quindi sono stati determinati i contenuti in MDA e pigmenti fotosintetici accessori, previa messa a punto di protocolli specifici. Per i campioni sottoposti ad UR di 76% o 90%, le modalità di trattamento pre-stoccaggio non determinava sostanziali alterazioni a carico dell'indice di perossidazione lipidica; in essi tuttavia la rapidità di congelamento/essiccazione determinava maggiori livelli di DEPS. L'essiccazione sembra invece deprimere i livelli delle xantofille coinvolte. I campioni esposti al 100% di UR subivano un'alta perossidazione lipidica in tutti i trattamenti, ad eccezione dell'essiccazione lenta. Essi comunque con il congelamento sembrano accumulare più xantofille, soprattutto nelle forme de-epossidate (verificandosi un incremento in DEPS).

I risultati confermano che i diversi regimi di UR possono influire sulle risposte fisiologiche di *F. caperata* e verosimilmente sull'attivazione di meccanismi di difesa, quali il ciclo delle xantofille, in risposta alla riduzione più o meno repentina della temperatura e/o dello stato idrico.

3- La valutazione dei livelli di ozono nei siti di studio delle città di Trieste e di Udine è stata effettuata mediante l'esposizione di campionatori passivi Radiello® provvisti di cartuccia adsorbente formata da un tubo in polietilene microporoso riempito di gel di silice rivestito di 4,4'-dipiridiletilene e chiuso, ad una estremità, da un tappo in PTFE. Durante l'esposizione, l'ozonolisi del 4,4'-dipiridiletilene in ambiente acido conduce a 4-piridilaldeide. La produzione di 4-piridilaldeide è specifica dell'ozono; non interferiscono né gli ossidi di azoto né i composti organici, incluse le aldeidi. Il gel di silice assicura la costante presenza d'acqua, essenziale al completamento dell'ozonolisi. Al termine dell'esposizione, in laboratorio, la 4-piridilaldeide è stata condensata con 3-metil-2-benzotiazolinone idrazone (MBTH) per produrre la corrispondente azide, colorata in giallo. L'assorbanza della soluzione è stata letta allo spettrofotometro a 430 nm.

I campioni di *F. caperata* utilizzati per i trapianti nelle due città di Trieste e Udine e destinati all'analisi del contenuto in pigmenti fotosintetici e alla stima del contenuto di MDA, sono stati raccolti dai siti di esposizione in condizioni di tempo secco, successivamente stoccati a -20°C e quindi trasferiti ai laboratori del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali dell'Università di Pisa (UR-PI). Qui i campioni sono stati macinati in azoto liquido e successivamente liofilizzati prima di subire le specifiche estrazioni.

In particolare, per la determinazione del contenuto in MDA i campioni sono stati estratti in TCA 0,1% e gli estratti sono stati incubati con una soluzione di TBA 0,5% in TCA 20% per 30 minuti a 95°C. La reazione è stata arrestata in bagno ghiaccio e si è proceduto, mediante spettrofotometro, alla quantificazione del prodotto di reazione (TBA-MDA) che assorbe fortemente a 532 nm. La correzione della torbidità non specifica è stata ottenuta sottraendo alle letture di assorbanza a 532 nm quelle effettuate a 600 nm.

I pigmenti fotosintetici sono stati determinati all'HPLC su estratti in DMSO, con aggiunta di CaCO₃ per limitare la feofitinizzazione della clorofilla. Gli estratti, centrifugati e filtrati, sono stati iniettati in HPLC con colonna C18 reverse phase (Dionex Acclaim 120. 4,6 mm diametro interno x 150 mm di lunghezza) e programma di eluizione a gradiente, con fase mobile consistente in due soluzioni: acetonitrile/metanolo 75/25 v/v e metanolo/etilacetato 68/32 v/v.

Prodotti della ricerca

Congressi:

- Bove F., Campanella A., Bertuzzi S., Tretiach M., 2014. Analisi di MDA e pigmenti sui licheni epifiti: un nuovo approccio sperimentale. XXVII Convegno annuale Società Lichenologica Italiana, Montecatini Terme (Italia) 15-17 ottobre. *Poster*.

Articoli scientifici:

- Pellegrini E., Bertuzzi S., Candotto Carniel F., Lorenzini G., Nali C., Tretiach M., 2014. Ozone tolerance in lichens: a possible explanation from biochemical to physiological level using *Flavoparmelia caperata* as test organism. *Journal of Plant Physiology*, 171: 1514-1523.

WP1 – UR: UNIPA, UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PALERMO

Responsabile: Dott. Vittorio Farina

Le attività di ricerca condotte dell'U.O. di Palermo riguardano il Task 1A - “*Performance*” *fisiologiche della piante e indicatori di stress*. In particolare, la sperimentazione è stata incentrata sulla risposta fisiologica di giovani piante di *Quercus ilex* L. allevate in vaso, sottoposte a *stress* idrico e salino, successivamente trasferite in ambiente periurbano. Parallelamente ne è stato studiato lo stato di micorrizzazione e delle comunità fungine endofitiche in relazione ai trattamenti di *stress*. Di seguito si riportano, in dettaglio, le attività svolte.

Stress idrico

La sperimentazione è iniziata sulle piante di leccio di due anni ottenute da seme prelevato in un areale definito dell'ambiente boschivo siciliano. Le piante, travasate in vasi di sette litri di volume, su substrato caratterizzato da una miscela composta da 70% sabbia, 20% torba bionda e 10% terra rossa, sono state poste in ambiente protetto. Dopo una prima fase di acclimatamento alle condizioni microclimatiche, sono state avviate le prove sperimentali di *stress* idrico.

Gli obiettivi della prova sono stati quelli di studiare la risposta delle piante in condizioni di *stress* idrico, sia lieve e forte, che breve e prolungato. Per quanto concerne il primo obiettivo la prova è stata articolata secondo lo schema seguente:

- Controllo (CC): piante mantenute costantemente alla Capacità di campo (100% ADM);
- Lieve *Stress* (LS): ripristino della CC una volta raggiunta la soglia del 60% della ADM;
- Forte *Stress* (FS): ripristino della CC una volta raggiunta la soglia del 30% della ADM.

Ad inizio prova è stato effettuato un campionamento distruttivo per la determinazione dei principali parametri biometrici quali: altezza, diametro, numero di foglie e peso della biomassa vegetale.

Il contenuto idrico del substrato è stato monitorato con cadenza giornaliera mediante uso di FDR Wet Sensor della Delta T Devices. Mensilmente è stata effettuata una concimazione azotata con

somministrazione di 50 ml di soluzione contenente N sotto forma di solfato di ammonio in ragione di 5 ppm. Sempre con cadenza mensile sono stati rilevati i seguenti parametri: allungamento del germoglio, SPAD (Soil Plant Analysis Development), scambi gassosi, WUE_{ph} . Con cadenza trimestrale sono stati determinati, invece, i seguenti parametri: RWC, potenziale fogliare (*steam water potential*), WUE_{dw} , allungamento del germoglio (RGR), fluorescenza, Fv/F0, curva di risposta alla luce.

Parallelamente è stato effettuato un campionamento distruttivo per la determinazione della sostanza secca delle diverse componenti della pianta, della superficie fogliare e dei fotosintetati.

Per quanto riguarda il secondo obiettivo lo schema sperimentale è stato così articolato

- Controllo: piante mantenute costantemente alla Capacità di campo (100% ADM);
- *Stress* breve (SB): ripristino alla CC una volta raggiunta la soglia di intervento del 60% della ADM.
- *Stress* prolungato (SP): portare al 60% della CC una volta raggiunta la soglia di intervento del 30% della ADM.

Il monitoraggio dei parametri è stato effettuato seguendo lo schema utilizzato per la prova di *stress* idrico lieve e forte.

Le prove hanno avuto una durata di 9 mesi. Da una prima analisi dei risultati si evince una chiara tolleranza del *Quercus ilex* allo *stress* idrico. In particolare sia in condizioni di *stress* lieve (LS) che forte (FS) la pianta presenta differenze statisticamente valide sia in termini di altezza che di superficie fogliare mentre la ripartizione della biomassa non sembra essere influenzata dalle condizioni di ridotta disponibilità idrica se non nel rapporto chioma/radice. Questo può essere dovuto ad una caratteristica intrinseca della pianta che non permette di evidenziare sostanziali differenze in termini di accumulo di biomassa in una prova in vaso di durata inferiore ad due cicli vegetativi.

Tale caratteristica del *Quercus ilex* viene confermata in condizioni di *stress* breve (SB) o prolungato (SP) dove le differenze in termini di biomassa non risultano statisticamente significative.

In entrambe le prove lo stato idrico della pianta non viene influenzato dalle condizioni in prova evidenziando la capacità da parte della pianta di attivare sistemi di tolleranza in grado di garantire un ottimale stato idrico anche in carenza di acqua nel suolo.

Seppur ancora non completa, l'analisi dei dati ha permesso di evidenziare una netta tolleranza della specie allo *stress* idrico soprattutto quando questo risulta essere di lieve entità e prolungato nel tempo.

Stress salino

Lo studio ha riguardato la risposta a livelli crescenti di concentrazione di NaCl nell'acqua di irrigazione di semenzali di *Quercus ilex* di due anni. Le piante, ottenute da seme, sono state travasate in contenitori da 3 litri, su substrato composto da 70% sabbia e per il 30% da terra rossa. Il trattamento ha visto l'applicazione di acque di irrigazione con concentrazioni crescenti di cloruro di sodio (NaCl) in ragione di 50, 100 e 200 mM di NaCl per litro, mentre le piante di controllo sono state irrigate con acqua senza aggiunta di sale. In seguito alle operazioni di travaso ed al periodo di adattamento alle condizioni di serra, è stato effettuato un campionamento distruttivo iniziale, mentre un distruttivo finale è stato effettuato dopo 90 giorni dall'inizio della prova. In ogni campionamento la pianta è stata estratta dal vaso, privata del substrato; sono stati quindi separati apparati radicali, parti legnose e foglie, determinandone così i seguenti parametri: peso fresco e peso secco; sostanza secca (stimata come differenza tra il peso fresco ed il peso secco determinato in stufa a 60°C per 48 ore); SPAD (*Soil Plant Analysis Development*); SLA (*Specific Leaf Area*); numero foglie e superficie fogliare (mediante il sistema d'analisi di immagini WinDias). Parallelamente sono stati effettuati i seguenti rilievi fisiologici: RWC (*Relative Water Content*); potenziale idrico del rametto; scambi gassosi (con misuratore di tipo "LI COR LI-6400 XT", dotato di *Leaf Chamber Fluorometer* per la determinazione della fluorescenza). La sperimentazione è stata condotta in un arco temporale di 5 mesi.

La risposta di *Quercus ilex* allo *stress* salino ha evidenziato come il peso secco radicale decresce all'aumentare dello *stress* salino, rispetto alla tesi di controllo. Allo stesso modo questo è stato riscontrato nelle parti legnose e nell'apparato fogliare, dove è stato registrato un decremento ancora più netto (del 60%) nella tesi con 200 mM di NaCl per litro rispetto alla tesi di 50 mM di NaCl per litro. Tuttavia, in termini di sostanza secca, dal confronto delle tesi "200" e dalla tesi di controllo, non viene evidenziata alcuna differenza sulle frazioni radicali e sulle parti legnose, mentre si denota una differenza nella sostanza secca delle foglie. Rispetto alla tesi di controllo, il numero delle foglie in condizioni di ridotta presenza di NaCl (50 mM per litro) non evidenzia alcuna differenza. Le piante sottoposte a maggiori condizioni di *stress* reagiscono, invece, con una evidente riduzione dell'apparato fogliare; in particolare, tale decremento risulta del 30% e 50%, rispettivamente nelle tesi "100" e "200" mM di NaCl per litro. Anche la superficie fogliare totale per pianta decresce con l'aumento della concentrazione salina con un evidente correlazione tra concentrazione di sali e distensione della lamina fogliare. Nella tesi maggiormente stressata si evidenzia una riduzione del 65% rispetto al valore della tesi meno stressata ed un ridottissimo incremento rispetto alle fasi iniziali della prova. Tale comportamento evidenzia una ridotta emissione di foglie con una limitata distensione della lamina fogliare. L'indice di SPAD evidenzia, anche in questo caso, una stretta correlazione tra concentrazione salina e diminuzione del contenuto in clorofilla. Per quanto riguarda il RWC, l'assenza di differenze statisticamente significative tra i trattamenti evidenzia la capacità da parte della pianta di una osmo-regolazione ottimale, probabilmente legata alla sintesi di osmoliti a partire dalla traslocazione di sostanze di

riserva presenti nel legno. Anche per quanto riguarda l'indice SLA, non sono state evidenziate delle differenze significative. L'analisi degli scambi gassosi ha evidenziato una stretta relazione tra la concentrazione salina ed il tasso fotosintetico. In particolare, nelle piante sottoposte a maggiore *stress*, i valori di fotosintesi netta e traspirazione fogliare sono stati tendenzialmente più bassi. La stessa analisi ha altresì evidenziato come all'intensificarsi dello *stress* salino la pianta di *Quercus ilex* reagisce attraverso una progressiva riduzione di traspirazione e del tasso fotosintetico.

Stato di micorrizzazione e comunità fungine endofitiche

Parallelamente ai trattamenti di *stress* idrico e salino, è stata studiata la risposta delle piante anche in funzione delle popolazioni endofitiche fungine e dello stato di micorrizzazione.

Per quanto concerne la valutazione dei microrganismi fungini endofiti in piante di *Quercus ilex* apparentemente sane, sono stati effettuati saggi d'isolamento da piantine provenienti direttamente dal vivaio, prelevando foglie e rametti per ciascun semenzale. In particolare, gli organi vegetali, previa sterilizzazione superficiale e frazionamento, sono stati posti ad incubare in piastre Petri con substrato agarizzato (PDA) a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ e al buio per sette giorni. Si è proceduto quindi all'identificazione morfologica delle colonie fungine ottenute, avviando anche lo studio molecolare (estrazione del DNA, amplificazione PCR e sequenziamento della regione ITS del rDNA). Inoltre, sono stati calcolati i seguenti parametri per la quantificazione della colonizzazione endofitica:

- Frequenze d'isolamento di ciascun fungo da tutti i frammenti campionati $FI = (Nif/Ntf) \times 100$, dove Nif è il numero di colonie di ogni fungo ottenuto, mentre Ntf è il numero totale di isolamenti testati x 100;
- Frequenze d'isolamento relative ad ogni organo considerato $FI^1 = (Nif/Ntf) \times 100$, dove Nif è il numero di colonie di ogni fungo ottenuto da ciascun organo, mentre Ntf è il numero totale di frammenti incubati per ciascun organo x 100;
- Grado di colonizzazione totale $TCR = (Ntf_{\geq 1}/Ntf) \times 100$, dove $Ntf_{\geq 1}$ è il numero totale di frammenti da cui si è originato ≥ 1 isolato, mentre Ntf è il numero totale di frammenti incubati;
- Grado di colonizzazione totale per ciascun organo $CR = (Ntf_{\geq 1}/Ntf) \times 100$, dove $Ntf_{\geq 1}$ è il numero totale di frammenti di ciascun organo da cui si è originato ≥ 1 isolato, mentre Ntf è il numero totale di frammenti di ciascun organo incubati;
- Endofita fungino dominante $DE = (FI^1 / \sum FI^1) \times 100$, dove FI^1 è la frequenza d'isolamento relativa all'endofita dominante di ciascun organo, mentre $\sum FI^1$ è la sommatoria delle frequenze d'isolamento di tutta la comunità di endofiti isolati per ciascun organo.

Sono state pertanto ottenute 171 colonie da 810 frammenti, con un valore di TCR pari al 21%. Riguardo a ciascun organo, sono state isolate 153 colonie dalle foglie e 18 dai rametti, ottenendo

valori di CR pari a 37.7% e 4.4%, rispettivamente. Sono stati identificate 11 specie fungine: tra queste *Alternaria alternata*, *Bjerkandera adusta* e un micelio sterile erano comuni in entrambi i tessuti; *Gnomoniopsis* sp., *Septoria* sp., *Stagonosporopsis cucurbitacearum* sono state trovate soltanto nelle foglie; *Biscogniauxia nummularia*, *Diaporthe chamaeropsis*, *Neosetophoma samarorum*, *Peziza varia*, *Phoma pinodella* esclusivamente nei rametti. Il valore di FI variava da 0.4% fino a 16.7%; in dettaglio, *B. nummularia*, *B. adusta*, *D. chamaeropsis*, *Gnomoniopsis* sp., *N. samarorum*, *P. varia*, *S. cucurbitacearum* hanno mostrato i valori percentuali più bassi, mentre il micelio sterile il più elevato. Inoltre, la FI¹ del micelio sterile nelle foglie appariva il valore percentuale più alto (33%), risultando anche il DE di quell'organo (84.5%); per *A. alternata* e *Septoria* sp. le percentuali di FI¹ erano drasticamente ridotte (rispettivamente 2.5% e 1.7%), fino ad attestarsi al di sotto dell'1% per tutti gli altri. Di contro, la FI¹ dei rametti si è mantenuta costantemente sotto l'1%, ad eccezione di *A. alternata* (1%) e *P. pinodella* (1.2%), quest'ultimo risultante il DE dell'organo (20.7%).

Riguardo lo stato ectomicorrizico dei semenzali di leccio, i campioni radicali sono stati selezionati in modo casuale (tot 30 cm radice/semenzale) e sciacquati delicatamente sotto acqua corrente. L'entità della micorrizzazione è stata valutata attraverso il conteggio degli apici micorrizici, mediante osservazione allo stereo microscopio LSV 11 (Zeiss); inoltre è stata determinata la percentuale di apici micorrizzati vitali rispetto al numero totale di apici colonizzati presenti. E' stata condotta, quindi, una prima identificazione di ogni morfotipo micorrizico, in accordo con gli atlanti delle forme micorriziche di Agerer. I campioni analizzati mostravano un totale di 393 apici radicali colonizzati, di cui solo 128 vitali (32%). Tutti gli apici testati sono stati identificati come appartenenti a due differenti morfotipi, in particolare 104 di essi (81%) appartenenti al Morfotipo 1 (M1) e 24 (19%) al Morfotipo 2 (M2). Entrambi risultavano caratterizzati da ramificazione assente, con apici cilindrici e dritti senza strutture esterne (rizomorfe e cistidi). La morfologia del mantello di M1 era caratterizzata dal colore nero e dalla superficie densamente granulosa, mentre per il M2 appariva marrone, liscia e lucente. Inoltre, osservazioni condotte al microscopio ottico (Axioskop – Zeiss) mostravano per M1, in alcune cellule del mantello, numerose gocce di diversa grandezza distintive del mantello di tipo N; di contro, il mantello di M2 era caratterizzato da cellule angolari al di sopra di una rete ifale, tipica del tipo P.

Nell'ambito dei trattamenti di *stress* idrico, per la valutazione della composizione quantitativa e qualitativa della popolazione fungina endofita, sono stati effettuati saggi d'isolamento da foglie e rametti di semenzali sottoposti ai differenti trattamenti di *stress* idrico. Risulta attualmente in corso l'identificazione morfologica e molecolare delle colonie fungine isolate e il calcolo dei parametri per la quantificazione della colonizzazione endofitica.

In merito allo stato ectomicorrizico, sono stati impiegati campioni radicali selezionati in modo casuale da semenzali rappresentativi per ciascun trattamento, seguendo le stesse metodologie già descritte. Relativamente ai semenzali del trattamento LS, i campioni radicali analizzati

mostravano un totale di 2208 apici colonizzati, dei quali solo il 30% vitali. Tutti gli apici testati sono stati distinti nei 2 differenti morfotipi, in particolare il 67% appartenenti a M1 e il 33% a M2. Riguardo il trattamento FS, gli apici colonizzati risultavano 5555, di cui il 45% ancora attivi; di questi, il 60% erano ascrivibili a M1, mentre il 40% a M2. Infine, le radici del CC mostravano 3300 apici colonizzati, di cui il 30% attivi. Come in precedenza, sono stati riscontrati i morfotipi M1 e M2, con una percentuale di apici pari, rispettivamente, a 83 e 17%. L'identificazione molecolare dei suddetti morfotipi è in corso di definizione.

A questa fase è seguito un campionamento durante e alla fine delle due prove di *stress* idrico per valutare le eventuali correlazioni tra micorizzazione e risposta biometrica e fisiologica delle piante.

Relativamente alla sperimentazione su *Nerium oleander*, sono stati allestiti saggi d'inoculazione artificiale impiegando propaguli di *Glomeromycota* sia endemici che commerciali (contenenti spore di *Glomus intraradices*). I risultati hanno evidenziato, indipendentemente dal tipo di inoculo impiegato, una limitata colonizzazione in tutte le piante saggiate.

Esaurita la fase di studio in vaso, le piante sottoposte a *stress* idrico sono state trapiantate in pieno campo in ambiente periurbano all'interno del parco della Fossa della Garofala (PA) per valutare la risposta vegetativa in funzione dei diversi livelli di *stress* subiti. I rilievi, tuttora in corso, riguardano la quantificazione della biomassa e della produttività primaria netta della parte epigea e la valutazione della fotosintesi netta.

Prodotti della ricerca

Congressi:

- G. Gianguzzi, M. Militello, G. Gugliuzza e V. Farina. Effetti dello stress salino su piante di *Quercus ilex* L. allevate in vivaio. XII Convegno AISSA. Università degli Studi di Sassari Dipartimento di Agraria, 6-7 novembre 2014
- G. Piazza, M. Militello, L. Torta, G. Gugliuzza, V. Farina, S. Burruano. Osservazioni preliminari sullo stato di micorizzazione in semenzali di quercus ilex l. sottoposti a stress idrico. Giornate tecniche SOI 2015: substrati di coltivazione per le produzioni ortoflorofrutticole e vivaistiche, 27-28 maggio 2015, Pescia.
- G. Piazza, L. Torta, S. Burruano, G. Liguori, G. Gugliuzza, M. Militello e V. Farina. Osservazioni preliminari sull'impiego di funghi arbuscolo micorrizici su piante di oleandro (*Nerium oleander*) e citrange (*Citrus sinensis* × *poncirus trifoliata* or *C. sinensis* × *C. trifoliata*) in ambito vivaistico. Giornate Tecniche SOI: biostimolanti, corroboranti, induttori di resistenza e micronutrienti nelle colture ortoflorofrutticole, 29-30 maggio 2014, Ancona.

- G. Piazza, S. Lo Piccolo, L. Torta, and S. Burruano (2014). Preliminary observations on fungal endophytic community and mycorrhizal status in symptomless *Quercus ilex* seedlings. In XX Convegno Nazionale Società Italiana di Patologia Vegetale (S.I.Pa.V), Pisa.

Tesi di laurea Magistrale:

- ‘Effetti dello stress salino su piante di *Quercus ilex* L. allevate in vivaio’. Giuseppe Gianguzzi, LM Scienze delle produzioni e delle tecnologie agrarie - Progettazione e gestione di parchi e giardini, Università di Palermo.

WP1 – UR: UNITUS, UNIVERSITA’ DEGLI STUDI DI TRIESTE

Responsabile: Prof. Mauro Tretiach

Le attività di UR-TS, svolte in parziale collaborazione con UR-PI, in questi primi due anni di studio si sono concentrate sui seguenti ambiti di indagine:

1. valutazione dei fattori di rischio legati allo *stress* idrico in alberature urbane a *Quercus ilex* L. lungo un transetto nord ovest-sud est (NO-SE) nella città di Trieste;
2. sperimentazioni preliminari di laboratorio che hanno come oggetto l’approfondimento di aspetti peculiari dell’ecofisiologia di *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, specie *target* per i trapianti;
3. trapianti lichenici di *F. caperata* in due città, Trieste e Udine, con differenti fonti inquinanti e diverso mesoclima;
4. caratterizzazione della risposta trascrittomica del fotobionte *Trebouxia* allo stress foto-ossidativo.

1- All’interno di quattro aree verdi urbane di Trieste sono stati individuati altrettanti siti di campionamento disposti lungo un transetto NO-SE. I quattro siti di studio sono stati prescelti in base alla presenza di tre o più individui di *Q. ilex*, specie modello scelta per la sperimentazione. I siti si differenziano in base alle caratteristiche microclimatiche [misure di temperatura (T) e umidità relativa (U.R.) continue sono state effettuate mediante *data logger*, EL-USB (*Laskar Electronics Inc.*)], differente livello di impermeabilizzazione del suolo circostante (quantificata mediante analisi grafica di immagini tratte da *Google Earth*) e diversa distanza sia dal mare che dal centro cittadino. Una quinta area, situata nel comune di Muggia, a sud di Trieste, è stata abbandonata dopo due mesi dall’inizio della sperimentazione per il venir meno dell’autorizzazione da parte del proprietario del fondo.

Le misure ecofisiologiche sono state effettuate nel periodo compreso tra maggio e settembre 2013 su almeno tre individui in ogni sito. Allo scopo di quantificare lo stato idrico delle piante ed evidenziare eventuali differenze tra siti, sono stati misurati con cadenza mensile i parametri fisiologici più strettamente correlati alle condizioni di *deficit* idrico del suolo e della pianta:

potenziale dell'acqua della foglia prima dell'alba, potenziale minimo diurno dell'acqua della foglia e il corrispondente potenziale xilematico (mediante camera a pressione, mod. 1505D, PMS *Instruments*), conduttanza fogliare al vapore acqueo (mediante porometro a stato stazionario, C1, *Decagon Devices*) e perdita percentuale di conduttività idraulica dei rami di due anni di età (mediante flussometro di massa, *Xylem Embolism Meter*, *Bronkhorst*). Per ognuno dei quattro siti si è proceduto inoltre all'elaborazione di curve di vulnerabilità dei rami di due anni di età mediante la tecnica della disidratazione su banco. L'efficienza degli apparati fotosintetici è stata valutata mediante misurazioni di fluorescenza della clorofilla *a* (Handy PEA, *Hansatech*). A fine sperimentazione sono state effettuate anche misure di parametri anatomici come: diametro del lume dei vasi xilematici, densità del legno, dei vasi xilematici, delle venature fogliari, densità stomatica etc.

In ogni sito è stato inoltre effettuato un campionamento di foglie in corrispondenza dei giorni più caldi della stagione vegetativa (6 e 7 agosto 2013), caratterizzati anche dalla maggiore concentrazione di O₃ nelle ore centrali della giornata. Il materiale campionato è stato in parte devitalizzato in microonde, seccato in stufa a 70 °C per 24 h, macinato in mortaio di agata e spedito a ISO 4 s.n.c. (Pavia) per la quantificazione del $\delta^{13}\text{C}$.

Un'aliquota del suddetto materiale è stata preventivamente congelata in azoto liquido e conservata a -80 °C e successivamente inviata presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali dell'Università di Pisa (UR-PI) allo scopo di valutare i principali meccanismi di osmoregolazione ed alcuni dei sistemi antiossidanti (enzimatici e non) del tessuto fogliare (per ulteriori specifiche sulle ricerche effettuate, si rimanda alla relazione di quella UR). Al momento i risultati ottenuti sono in fase di elaborazione e di indagine statistica.

La percentuale di pavimentazione impermeabile intorno agli alberi sembra essere correlata con il crescente stress idrico in *Q. ilex*, ed in particolare (i) con una riduzione dei ratei di scambio gassoso e (ii) con un maggiore rischio di embolia e in generale di vulnerabilità alla cavitazione. Ciò suggerisce da un lato che la tipologia e la percentuale di pavimentazione in ambiente cittadino possono influenzare lo stress idrico degli alberi (e questo dato può essere utile nella pianificazione degli interventi sul verde urbano), dall'altro i dati raccolti consentono di identificare le misure di conduttanza xilematica quali un ottimo strumento per raggiungere una piena comprensione delle risposte degli alberi urbani ai cambiamenti climatici.

I risultati di queste indagini sono state oggetto di pubblicazione [Savi *et al.*, 2015].

2- Al fine di approfondire alcuni aspetti dell'ecofisiologia di *F. caperata*, la specie lichenica che è stata selezionata per i trapianti, è stata avviata una serie di sperimentazioni di laboratorio che ha previsto l'esposizione di campioni lichenici in camere chiuse a diverse U.R. I risultati dimostrano che con U.R. superiori all'80% si ha l'attivazione del metabolismo anche in assenza di idratazione diretta con acqua liquida: i valori di fluorescenza (misurati con un fluorimetro

Mini-PAM, Walz) indicano un rapporto diretto tra l'aumento dell' U.R. e l'attività degli apparati fotosintetici. Una seconda sperimentazione è poi servita ad approfondire le tempistiche di attivazione degli apparati fotosintetici nelle condizioni precedentemente testate.

Ad integrazione delle indagini ecofisiologiche, presso i laboratori dell'UR-PI sono stati condotti esperimenti volti a valutare l'effetto di differenti U.R. sull'integrità delle membrane della medesima specie campione, ma per ulteriori specifiche sulle ricerche effettuate, si rimanda alla relazione di quella UR. Tutti i dati ottenuti sono stati essenziali per la stesura dei protocolli da applicarsi ai trapianti lichenici, e sono stati quindi di notevole importanza per la successiva fase (ambito di indagine "3").

3- Dopo una attenta disamina della situazione ambientale, effettuata a Trieste, Udine e nelle relative provincie attraverso sopralluoghi in diverse stagioni e momenti della giornata, nonché mediante l'esposizione di sensori data logger, EL-USB-2 (*Laskar Electronics Inc.*), per misurare in continuo la T e l'U.R., sono stati selezionati 10 siti di esposizione. Otto di essi (quattro per ciascuna città) sono stati scelti in zone urbanizzate e due, più periferici, rappresentano il controllo. In tali siti sono stati successivamente effettuati dei trapianti lichenici in due periodi dell'anno (febbraio-marzo e luglio-agosto 2014) per la verifica degli effetti delle condizioni climatiche e degli inquinanti sulla specie lichenica target *F. caperata*.

Porzioni di talli lichenici sono stati raccolti in un sito lontano da fonti note d'inquinamento del Carso Classico (Trieste) in una serie di campagne di campionamento effettuate nel novembre del 2013 che hanno permesso di accumulare sufficiente materiale per le esposizioni invernali ed estive. I campioni, dopo essere stati attentamente puliti e preparati, sono stati esposti su tronchi di tiglio (*Tilia sp.*).

Durante le settimane di esposizione, al fine di verificare le reali differenze microclimatiche nelle zone prese in esame, in ciascuno dei siti sono stati esposti due *data logger* precedentemente descritti e sono state inoltre effettuate ulteriori misure di luminosità, sia dirette - attraverso radiometri con sonda per luce PAR HD 2302.0 (*Delta Ohm*) - sia indirette attraverso foto *fish eye* della copertura della chioma che sono poi state elaborate attraverso appositi programmi. I dati relativi agli inquinanti sono stati invece ricavati (i) dalle centraline di monitoraggio della qualità dell'aria gestite da ARPA-FVG che sono prossime ai siti stessi e (ii) mediante l'esposizione di campionatori passivi (Radiello, *Fondazione Salvatore Maugeri IRCCS*) per l'O₃ effettuata nel periodo più caldo dell'estate.

Immediatamente prima e dopo l'esposizione dei campioni lichenici, sono state effettuate (i) le misure di efficienza degli apparati fotosintetici (misurazioni di fluorescenza della clorofilla *a* effettuate con un fluorimetro Mini-PAM, Walz); parallelamente è stato esposto anche il materiale selezionato per le analisi (ii) del rilascio di potassio per determinare l'integrità delle membrane (effettuate presso il Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche dell'Università di Trieste

), e (iii) dei pigmenti fotosintetici e del contenuto di malondialdeide (attualmente in corso presso l'UR-PI).

I dati microclimatici raccolti confermano l'esistenza di un gradiente di U.R. dell'aria lungo i transetti individuati, che permette quindi di testare correttamente le ipotesi alla base della sperimentazione. Dai risultati delle analisi di fluorescenza e dell'integrità delle membrane si evidenzia che i fattori determinanti nella risposta di *F. caperata* alle condizioni di esposizione sembrano essere legati alle condizioni microclimatiche dei siti. Tuttavia, l'ipotesi secondo la quale l'aumento di temperatura e di episodi di siccità previsti da alcuni scenari per i prossimi decenni (Horizon 2050) nei periodi estivi alle nostre latitudini non si è potuta testare in quanto l'estate del 2014 si è rivelata, a differenza delle precedenti, particolarmente fredda e piovosa. Infatti, dopo le esposizioni, i campioni lichenici hanno mostrato una vitalità molto elevata e, contrariamente a quanto ci si aspettava, questa è risultata superiore a quella osservata dopo le esposizioni invernali.

Si prevede dunque di ripetere le esposizioni nel corso dell'estate del 2015. A questo fine nell'autunno 2014, sono state eseguite nuovamente sia la raccolta che la pulizia di ulteriori campioni di licheni.

Nel contempo, sono proseguite le ricerche bibliografiche sugli effetti delle sostanze inquinanti sulla simbiosi lichenica, e sono state completate le elaborazioni di precedenti indagini sugli effetti dell'ozono in dipendenza dell'idratazione, i cui risultati sono stati quindi oggetto di pubblicazione [Pellegrini *et al.* 2014, Bertuzzi *et al.*, submitted].

4- Lo scopo principale della ricerca è di creare la base per studi di trascrittomico in campo lichenologico, con particolare riferimento ai fotobionti. È stato infatti sviluppato un database di geni trascritti in un fotobionte del genere *Trebouxia*, il più frequente partner fotosintetico della simbiosi lichenica.

L'RNA è stato isolato sia da colture in condizioni ottimali sia da altre sottoposte a condizioni di *stress* foto-ossidativo per i fenomeni indotti dal disseccamento in condizioni controllate. Colture axeniche ottenute da talli di *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale e identificate molecolarmente e ultrastrutturalmente come *T. gelatinosa* Archibald sono state coltivate su terreno solido "TM" (*Trebouxia* Medium) a 20°C e 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con un ciclo di luce/buio di 14/10 ore. È stato estratto l'RNA da singole colonie idratate 30 giorni dopo il loro inoculo, da altre sottoposte ad una lenta disidratazione che è stata protratta per 10 ore e infine da colonie reidratate e mantenute alla luce per 12 ore. I campioni sono stati sottoposti ad RNA *sequencing*, producendo un totale di circa 250 milioni di frammenti con strategia *paired-end*. Da questi è stato costruito l'assemblaggio *de novo* e 19601 *contigs* sono stati utilizzati per la successiva analisi di espressione genica.

Un'analisi statistica sui valori di espressione ha permesso di individuare gruppi di geni differenzialmente espressi in funzione della disidratazione o della successiva reidratazione, fornendo informazioni importanti per la comprensione di questi processi. In particolare è stato possibile osservare che il genoma della specie *target* è molto compatto, simile in dimensioni a quello di altre Trebouxiphyceae (c. 10.000 geni). Il trascrittoma alla fine della fase di disidratazione è ancora molto simile a quello espresso in condizioni normali, mentre i cambiamenti più importanti intervengono dopo la reidratazione, con la riattivazione del metabolismo cellulare. A seguito della reidratazione vengono sovraespressi geni responsabili per la produzione di “*Heat Shock Proteins*”; allo stesso tempo vengono sottoespressi molti geni responsabili per vari processi fotosintetici. Il modello di comportamento di *Trebouxia* mostra delle analogie con quello di altri organismi peciloidrici, in particolare con quello del muschio *Tortula ruralis* (Hedw.) Gaert., Meyer and Scherb, ma è anche caratterizzato da importanti differenze, in particolare è stata identificata una famiglia altamente diversificata di *Desiccation-Related Proteins* dalla funzione ancora largamente sconosciuta, che è stata analizzata anche dal punto di vista filogenetico e che sarà oggetto di ulteriori indagini.

La fase successiva della ricerca si è proposta di validare i cambiamenti di espressione dei geni identificati con il sequenziamento del trascrittoma. È stato quindi allestito un nuovo esperimento in cui colonie del fotobionte *T. gelatinosa* Archibald sono state sottoposte a disidratazione e reidratazione con le stesse modalità del precedente. In più, per monitorare le variazioni, sono stati presi in considerazione 4 momenti durante la disidratazione e 4 durante la reidratazione. Tutti i campioni sono stati prodotti in triplicato.

È stato inoltre calcolato il RWC (*relative water content*) in tutti i *time-point* per monitorare l'andamento del contenuto idrico che è passato dal 492% del controllo al 10% dopo 9 h di disidratazione per tornare al 435% dopo 12 h di reidratazione.

Tra i trascritti prodotti con la tecnica RNA-seq sono stati scelti 16 geni tra i più informativi e che riguardassero diversi aspetti delle modificazioni indotte dallo stress a livello di e.g. fotosintesi, stress ossidativo, composizione della parete cellulare, espressione di classi geniche come le DRP (*Desiccation Related Protein*) e i chaperoni molecolari (*Heat Shock Proteins*).

Con il programma Primer3 (<http://primer3.ut.ee>) sono stati disegnati gli oligonucleotidi da usare come inneschi (*primer*) per l'amplificazione delle sequenze di interesse. La tecnica molecolare utilizzata in questa fase è stata l'amplificazione quantitativa dei geni bersaglio e di riferimento su mRNA retro trascritto (RT-qPCR).

Dopo l'estrazione e la retro trascrizione dell'RNA dei campioni si è poi passati alla fase di qRT-PCR in triplicato tecnico per valutare i cambiamenti di espressione genica, relativamente ai geni normalizzatori che invece sono costitutivamente espressi.

I primi risultati hanno evidenziato come i geni con maggiore variazione di espressione abbiano la loro massima differenza tra la 9° ora della disidratazione e la 3° ora della reidratazione, sebbene con valori assoluti minori rispetto all'esperimento precedente, per una diversa sensibilità della tecnica.

L'analisi del comportamento di questo *pool* di trascritti coinvolti in funzioni chiave è il primo passo per la messa a punto di un *set* validato di geni coinvolti nello *stress* idrico ed è importante per una determinazione puntuale dei trascritti a loro associati.

Si affronteranno a breve approcci basati su sequenziamenti massivi; in particolare l'analisi delle sequenze verrà effettuata con Ion PGM™ Sequencer (*Life Technologies*). Un'interessante opportunità è quella offerta dalla creazione di librerie genomiche delle sequenze adiacenti all'estremità 3' dell'RNA poliadenilato, quindi un approccio di analisi globale del trascrittoma. Con questo sistema, viene generato un solo tipo di frammento per trascritto. Rispetto ad approcci basati su ibridazione di sonde (*microarray*) o sull'amplificazione (RT-PCR), il vantaggio di questo metodo è rappresentato dalla possibilità di quantificare in modo assoluto la quantità di mRNA, ampliando numero e rappresentatività delle informazioni.

Specifici biomarcatori così individuati potranno essere usati come referenza per studi di espressione in diversi tipi di stress ambientali.

Sono già stati allestiti ulteriori campioni per valutare l'espressione genica in colture sottoposte a diversi livelli di stimolazione in condizioni controllate come cicli luce/buio, esposizione a regimi luminosi crescenti, concentrazioni crescenti di Cadmio, che verranno analizzati alla luce dei nuovi risultati per approfondire la nostra conoscenza sui meccanismi di risposta allo *stress*.

Prodotti della ricerca

Congressi:

- Candotto Carniel F., Bidussi M., Tretiach M. (2013). Effetti del regime luminoso di crescita sulle capacità antiossidanti di licheni epifiti. . In: Munzi S. (a cura di), XXVI congresso della Società Lichenologica Italiana, Piacenza, 2-4 ottobre 2013, Not. Soc. Lich. Ital. 26: 18. *Presentazione orale e abstract*.
- Montagner A., Candotto Carniel F., De Moro G., Gerdol M., Manfrin C., Muggia L., Pallavicini A., Tretiach M. (2013). Analisi trascrittomiche dell'apofotobionte *Trebouxia gelatinosa* sottoposto a processi di disidratazione e reidratazione. In: Munzi S. (a cura di), XXVI congresso della Società Lichenologica Italiana, Piacenza, 2-4 ottobre 2013, Not. Soc. Lich. Ital. 26: 22. *Presentazione orale e abstract*.
- Montagner A., Gerdol M., Candotto Carniel F., De Moro G., Manfrin C., Muggia L., Pallavicini A., Tretiach M. (2014). Transcriptomic analysis of the lichen-forming alga

Trebouxia gelatinosa subjected to dehydration and rehydration processes. In: New Frontiers in Anhydrobiosis, Program and Abstracts, Pornichet (France), March 23-27, 2014, p. 78. *Poster*

- Kodnik D., Bertuzzi S., Bove F., Nali C., Lorenzini G., Panepinto F., Pellegrini E., Tretiach M. (2014). Effetti combinati del mesoclima urbano e degli inquinanti aerodiffusi sul lichene epifita *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale. In: Munzi S. (a cura di), XXVII congresso della Società Lichenologica Italiana, Montecatini Terme, 15-17 ottobre 2014, Not. Soc. Lich. Ital. 27: 20. *Presentazione orale e abstract*.
- Bove F., Campanella A., Bertuzzi S., Tretiach M. (2014). Analisi di MDA e pigmenti sui licheni epifiti: un nuovo approccio sperimentale. In: Munzi S. (a cura di), XXVII congresso della Società Lichenologica Italiana, Montecatini Terme, 15-17 ottobre 2014, Not. Soc. Lich. Ital. 27: 38. *Poster e abstract*.

Articoli scientifici:

- Pellegrini E., Bertuzzi S., Candotto Carniel F., Lorenzini G., Nali C., Tretiach M., 2014. Ozone tolerance in lichens: a possible explanation from biochemical to physiological level using *Flavoparmelia caperata* as test organism. *Journal of Plant Physiology* 171: 1514-1523. Doi: 10.1016/j.jplph.2014.06.017.
- Savi T., Bertuzzi S., Branca S., Tretiach M., Nardini A., 2015. Drought-induced xylem cavitation and hydraulic deterioration: risk factors for urban trees under climate change? *New Phytologist* 1106-1116. Doi: 10.1111/nph.13112.
- Bertuzzi S., Pellegrini E., Candotto Carniel F., Lorenzini G., Tretiach M., Nali C. Ozone tolerance of lichens is related to the AsA and GSH based ROS scavenging systems. *Planta*, submitted (15/04/2015).

Tesi di laurea e laurea magistrale:

- “Relazioni idriche e vulnerabilità ai cambiamenti climatici degli alberi in ambiente urbano: il caso di *Quercus ilex* L. nella città di Trieste” – Salvatore Branca, LM di Biologia ambientale, Università di Trieste.
- “Transcriptomic analysis of the lichen apophotobiont *Trebouxia gelatinosa* Archibald in response to dehydration and rehydration processes”. - Alice Montagner; relatore: Mauro Tretiach; correlatori: Fabio Candotto Carniel, Marco Gerdol, Lia Angela Ghirardelli; LM di Biologia ambientale, Università di Trieste. Premio migliore tesi della Società Lichenologica Italiana (comunicazione del 06/06/2014).

WP1 – UR: UNITUS, UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA

Responsabile: Dott.ssa Elena Kuzminsky

Nell'ambito del WP1 il gruppo di ricerca UR-TUS ha effettuato curve di risposta dell'assimilazione al variare della CO₂ sottostomatica per valutare il cambiamento stagionale di parametri funzionali come l'efficienza di carbossilazione della RuBisCo ($V_{c_{max}}$, mol m⁻² s⁻¹), il punto di compensazione (Γ , ppm) e la resa quantica apparente (Φ , mol). Tali misure, effettuate su piante di *Quercus ilex* L. nel sito sperimentale PRIN limitrofo alla torre di monitoraggio all'interno della Tenuta Presidenziale di Castelporziano, verranno usate per parametrizzare un modello *multi-layer* al fine di stimare come le diverse parti della chioma contribuiscono al flusso di O₃, e quindi alla rimozione di questo inquinante da parte della vegetazione. I parametri ricavati presentano un *trend* stagionale che risente dell'aridità estiva (luglio- settembre 2014), e delle alte temperature riscontrate in questo periodo.

Nell'ambito della collaborazione tra le unità di ricerca UR-TUS ha fornito a UR-ROMA, dati ambientali e di concentrazione di O₃ acquisiti dalla stazione di monitoraggio presente all'interno della Tenuta Presidenziale, propedeutici all'analisi delle misure ecofisiologiche effettuate mensilmente da UR-ROMA nel sito sperimentale della foresta periurbana di Castelporziano.

WP2: IL CONTRIBUTO DEGLI ECOSISTEMI VEGETALI URBANI ALLA QUALITÀ DELLA VITA

(Coordinatore: Prof. Giacomo Gerosa)

A. Stato di avanzamento

La Tabella sottostante riporta visivamente la sintesi delle attività previste per il WP2 che sono state iniziate, già svolte o tuttora in corso. Le attività lasciate in chiaro non hanno ancora avuto inizio o per difficoltà logistiche o perché previste a partire dal terzo anno.

In questo secondo anno di attività tutti i 4 *task* sono stati oggetto di una cospicua attività di ricerca da parte di tutti i gruppi. Circa l'85% dell'attività prevista dopo la rimodulazione del progetto è tutt'ora in corso o addirittura completata. Lo stesso dicasi per le attività aggiunte su base volontaria.

Notevole è stata anche, in questo anno, l'attività di disseminazione e la produzione scientifica di valorizzazione dei risultati ottenuti in questo progetto.

Tabella 1 – Stato di avanzamento del WP2 in relazione agli obiettivi prefissati nel *kick-off meeting* del 7/2/2013. Sono evidenziate in grigio le attività che sono iniziate e tuttora in corso

<i>Task</i>	Descrizione	Cosa si farà <i>(Attività rimodulata)</i>	Cosa si farà in più <i>(Aggiunte volontarie)</i>
T2a	Micrometeorologia dei flussi di materia ed energia Effetti su microclima urbano Effetti su licheni	Flussi di CO ₂ , H ₂ O, O ₃ ed energia 1 Torre periurbana a Roma Misure di gradiente di T+UR in urbano e parco: TS, MN, RM Osservazioni e trapianti lichenici a RM, MN, TS.	Flussi di polveri su torre foresta periurbana di Castelporziano (RM). 1 Torre periurbana a MN Misure di O ₃ in parco urbano a Roma
T2b	Flussi di CO ₂ da suolo	Flussi CO ₂ da suolo urbano a PA	Flussi CO ₂ da suolo urbano a RM

	(Soil respiration)	Flussi CO ₂ con camere automatiche in perturbano a RM e MN	
T2c	VOC e NO _x	Caratterizzazione VOC e NO _x a RM parco urbano e periurbano	Possibili misure di flusso VOC in perturbano a RM
T2d	Istopatologia del danno	Caratterizzazione danni fogliari su campioni provenienti dai siti di RM, MN, PA	Caratterizzazione dei metalli con XRF in alcuni campioni da RM, MN, PA Caratterizzazione del danno da esposizione controllata di leccio in OTC

B. Resoconto delle singole Unità di Ricerca

WP2 – UR: UNICATT, UNIVERSITA' CATTOLICA DEL SACRO CUORE DI BRESCIA

Responsabile: Prof. Giacomo Gerosa

TASK 2A

MICROMETEOROLOGIA DEI FLUSSI DI MATERIA ED ENERGIA

La campagna di misura PRIN TREEcity è iniziata a maggio 2013, è proseguita durante il 2014 ed è attualmente ancora in corso. Le misure di alcuni parametri, tuttavia, sono iniziate già da Gennaio 2013 e sono di seguito riportate per completezza. Sono stati monitorati i flussi verticali di ozono, biossido di carbonio, acqua ed energia tra il Parco periurbano del Bosco della Fontana (Mantova) e l'atmosfera.

Nella porzione meridionale del parco è presente un ponteggio-torre di 41 m di altezza che è stato adibito a sistema di monitoraggio micrometeorologico. Sulla sommità della torre è stato allestito un sistema per la rilevazione dei flussi verticali di gas (CO₂, O₃, H₂O) ed energia (radiazione, calore) costituito da un anemometro ultrasonico triassiale (Metek USA-1), da un analizzatore veloce di CO₂ ed acqua (LiCor 7500A), da un igrometro veloce al *kripto* (Campbell KH20) e da un analizzatore rapido di ozono di nostra fabbricazione (Ecometrics COFA). Il *target* di cumarina richiesto da quest'ultimo per la rilevazione rapida dell'ozono è stato sostituito ogni 5 giorni con nuovo target preozonato per un'ora e trenta a 100 ppb di O₃. Lungo l'altezza dell'intera torre sono stati allestiti 4 punti di prelievo dell'aria (2 m, 18 m, 30 m, 41 m) per la caratterizzazione del profilo verticale *intra-canopy* di CO₂, O₃, NO ed NO₂. I campioni d'aria prelevati ciclicamente dai 4 livelli sono convogliati, tramite un sistema di pompe e di valvole

solenoidali, ad un analizzatore all'infrarosso di CO₂ (Vaisala GMP343), ad uno spettrofotometro UV per l'ozono (Environnement 42M) e ad un analizzatore di NO_x a chemiluminescenza (Thermo Environmental Instr. 42C).

Alla base della torre è stato installato un sistema automatico di 4 camere "statiche" (Ecometrics SASSFLUX) per la misura in continuo dei flussi di CO₂ dal suolo. Ciascuna camera, chiudendosi ciclicamente su una porzione di suolo di 40x 40 cm², rileva la velocità di accumulo o di scomparsa della CO₂ nell'aria intrappolata e si riapre dopo meno di 3 minuti.

Sono state inoltre installate lungo la torre e alla base di questa sonde per misure ancillari del profilo di temperatura e umidità (DeltaOhm HD9008, agli stessi 4 livelli del profilo delle specie chimiche), di temperatura e umidità del soprassuolo (Campbell 50Y, +20 cm), di temperatura del suolo (Pt100, a -20 cm), di contenuto idrico del suolo (Campbell CS616, a -30 cm), di flusso termico nel suolo (Hukseflux HFP01SC), di radiazione diretta e diffusa sopra la *canopy* (DeltaT BF5), di radiazione fotosinteticamente attiva incidente e riflessa sopra la *canopy* (DeltaOhm LPPAR01), di radiazione sotto la *canopy* (LiCOR 190sz, a +20 cm), di radiazione netta (Kipp&Zonen NRlite), di bagnatura fogliare (Campbell 207) e di precipitazione (Young 52202).

L'anemometro ultrasonico e la strumentazione veloce del piano sommitale sono campionati da un programma proprietario (UNICATT Seddy3bav) alla velocità di 20 Hz ed i relativi dati memorizzati ogni mezzora in appositi files. L'enorme massa di data viene poi processata con un programma proprietario (UNICATT CalcolaEddyconLag) per la derivazione, mezzora dopo mezzora, dei flussi verticali con la tecnica nota come *Eddy Covariance*. Il calcolo *-human assisted-* è effettuato mediante *despiking* e *linear detrending* delle serie temporali, il calcolo delle covarianze, l'individuazione del *time-lag* che massimizza la covarianza tra la componente verticale del vento *w* e la specie chimica analizzata, la rotazione della matrice delle covarianze (prime due rotazioni di McMillen) e la conversione dei flussi cinematici in unità fisiche. I campioni che non soddisfano i criteri di stazionarietà (*max-lag* > 3 s) sono esclusi e i rimanenti dati vanno a costituire il database delle misure di flusso per le successive analisi.

Le concentrazioni delle specie chimiche lungo il profilo verticale sono campionate ogni mezzora per 5 minuti a livello (a cui si aggiungono 2.5 minuti di "lavaggio" tubi per ogni livello) ed il valor medio delle misure di ciascun livello viene quindi memorizzato in un apposito file. I sensori ancillari sono campionati ogni 30 secondi da due *data-loggers* (Campbell CR10x con multiplexer AM416) ed il valor medio delle misure di ciascun parametro viene memorizzato ogni mezzora per compatibilità con le altre serie dati. Il sistema SASSFLUX acquisisce la concentrazione di CO₂ ogni secondo per tutti i 3 minuti di chiusura di ciascuna camera. Se si tiene conto dei tempi di movimentazione meccanica e "lavaggio" tubi pre- e post chiusura, il sistema consente di campionare tre volte ciascuna camera in un'ora. I dati vengono poi elaborati manualmente per derivare, singolarmente, le curve di accumulo in ciascuna camera e ottenere i flussi di CO₂ in unità fisiche. A partire da fine Ottobre 2013 in due delle quattro camere

SASSFLUX sono stati posti dei rametti in decomposizione. Tali rametti, periodicamente pesati, a cadenza settimanale sono posti alternativamente dentro e fuori le due camere selezionate (una settimana dentro e una fuori), in modo da valutare l'effetto differenziale della decomposizione del legno sul bilancio complessivo dei flussi di CO₂ dal suolo.

Il database con il calcolo dei flussi semi-orari di energia e materia (CO₂, H₂O, O₃) è disponibile per i dati raccolti a partire dalla fine di Aprile 2013 fino a Dicembre 2014. Lo stesso vale per il *database* con il calcolo dei flussi di CO₂ dal suolo, per quello con le concentrazioni verticali delle specie chimiche (O₃, NO_x, CO₂) e per quello dei parametri ancillari (inclusi i flussi di energia). Le serie dati appaiono sufficientemente complete, malgrado alcuni periodi di fermo dovuti a guasti.

Le analisi effettuate ad oggi sui dati comprendono il calcolo dello *storage* di ozono nella *canopy*, la partizione dei flussi di O₃ nelle componenti stomatica e non-stomatica, il calcolo della dose fitotossica di O₃ assorbita dalle piante (POD1), la ricerca di relazioni tra flussi stomatici di O₃ e flussi di CO₂ (NEE) e lo studio dei primi profili medi verticali di O₃, NO, NO₂ e CO₂.

La frazione di ozono che penetra negli stomi è stata stimata utilizzando come tracciante i flussi di vapore acqueo e invertendo la ben nota equazione di Penman-Monteith per ottenere la conduttanza stomatica della *canopy* al vapore acqueo sotto l'assunto della chiusura del bilancio energetico superficiale (peraltro verificata in modo soddisfacente). La conduttanza stomatica all'ozono è stata poi ottenuta dalla conduttanza al vapore acqueo rapportando le rispettive diffusività dell'ozono e del vapore acqueo in aria. Quindi il flusso stomatico di ozono è stato ottenuto moltiplicando la conduttanza così ottenuta per la concentrazione di ozono presente all'altezza del *sink* apparente di ozono ($d+z_0'$) pari a $(\frac{2}{3}+1/10)$ dell'altezza media della *canopy*. Tale concentrazione è ottenuta per analogia elettrica immaginando la deposizione di ozono come il flusso di una corrente in un circuito resistivo dove la differenza di potenziale è data dalla differenza di concentrazione tra l'ozono presente all'altezza di misura e quella presente nel mesofillo fogliare (=0 ppb), e le resistenze sono date dall'opposizione che incontra l'ozono ad attraversare tutti gli strati d'aria dal punto di misura fin dentro la foglia. Queste resistenze sono la resistenza aerodinamica R_a -legata alla turbolenza e alla stabilità atmosferica-, la resistenza sublaminaire R_b -legata all'attraversamento dello strato limite fogliare-, la resistenza stomatica all'ozono R_s -legata alla penetrazione nella cavità sottostomatica- e la resistenza non stomatica R_{ns} , legata alla deposizione dell'O₃ su tutte le superfici non traspiranti, al suolo e al suo consumo per reazioni chimiche in fase gassosa.

R_a ed R_b vengono calcolate a partire dai parametri di turbolenza atmosferica ricavabili dall'anemometro ultrasonico, R_s è calcolata come sopra esposto ed R_{ns} è ottenuta come residuo dalla resistenza totale alla deposizione R_{tot} (misurata) tenendo conto delle regole di composizione delle resistenze in parallelo.

I primi risultati rivelano che il bosco periurbano rappresenta un *sink* rilevante per l'ozono troposferico, sia in estate che – sorprendentemente – in inverno, quando le piante dominanti hanno perso le foglie. In media la rimozione mensile di ozono ammonta a 5.4 kg ha^{-1} con un totale annuo superiore ai 64.7 kg ha^{-1} per il 2013 e di 57.5 kg ha^{-1} per il 2014 (4.8 kg ha^{-1} mensili).

A tali livelli ci si dovrebbe attendere una risposta negativa da parte della vegetazione, risposta che però non appare evidente. Valutando tuttavia la chiusura del bilancio del carbonio a livello di ecosistema attraverso 'analisi dei flussi verticali di CO_2 (il NEE) è risultato che il parco periurbano si è comportato da emettitore netto di CO_2 ($+192 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-2}$ nel 2013) anziché da *carbon sink* o da *carbon-neutral* come ci si sarebbe atteso da un parco maturo.

Tale risultato può essere dovuto ad una molteplicità di cause, quali la variabilità interannuale dovuta ai fattori climatici o il particolare regime di gestione delle necromasse che non vengono rimosse dal almeno 20 anni per una precisa scelta di conservazione. Oppure può essere la spia di uno stato di *stress* complessivo dell'ecosistema, magari dovuto ad un fattore abiotico come l'ozono. Una risposta precisa non esiste, tuttavia è stata osservata una certa limitazione dell'assorbimento istantaneo netto di CO_2 da parte dell'ecosistema quando i flussi stomatici di ozono superano le $4 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Queste considerazioni sottolineano l'importanza di effettuare misure di flussi continuative e su base pluriennale, ben oltre gli orizzonti temporali del presente progetto.

Su base annuale la quantità di ozono rimossa per via non-stomatica è risultata circa l'85% dell'ozono ricevuto dal parco, un'enorme servizio ecosistemico se si considera che questa quota di ozono è rimossa senza causare danni alla vegetazione.

L'analisi preliminare del profilo degli NO_x ed il calcolo dei relativi flussi rivelano che circa il 50% della deposizione non-stomatica osservata a Bosco Fontana è dovuta alla rimozione per via chimica dell'ozono nello spazio *intra-canopy* da parte dell' NO emesso dal suolo, mentre circa il 44% è dovuto alla distruzione dell'ozono sulle superfici non traspiranti (rami, cuticole, suolo). La quota rimanente (circa il 6%) potrebbe essere attribuita alla reazione con i composti organici volatili, isoprene in primis.

L'analisi dei profili di O_3 ha infine permesso di individuare un processo di *storage* temporaneo di ozono nello spazio *intra-canopy*. Il flusso di *storage* –che ha somma zero su base giornaliera– è in grado di spiegare il *pattern* giornaliero della deposizione non-stomatica ed in particolare il forte picco presente nella prima parte della mattinata. La considerazione dello *storage* si rivela una premessa indispensabile per la comprensione dei processi chimico-fisici che governano la deposizione non stomatica di ozono.

Le Figure mostrano uno spaccato delle misure ottenute nel periodo 2013-2014. Sono riportati i flussi di CO_2 di evapotraspirazione e di calore sensibile, di ozono. Per convenzione i flussi

vengono ritenuti positivi quando uscenti dall'ecosistema verso l'alto, mentre sono negativi quando sono diretti dall'atmosfera verso l'ecosistema, cioè entranti. La Figura 1 presenta l'andamento annuale dei flussi di CO₂ per il periodo compreso tra gennaio 2103 e dicembre 2014. I flussi positivi sono colorati in rosso e si hanno quando i processi respiratori dominano su quelli fotosintetici; i flussi negativi sono colorati in verde e si hanno quando domina la respirazione eterotrofa ed autotrofa. L'ecosistema si comporta da assorbitore di CO₂ nei mesi in cui è presente la vegetazione (da aprile a metà ottobre) e da emettitore nei mesi invernali. Da notare come la concentrazione di CO₂ in atmosfera (linea azzurra tratteggiata) subisca solo deboli variazioni anche a fronte di flussi verticali molto intensi.

La Figura 2 rivela come i flussi evapotraspirativi siano piuttosto intensi e sovrastino i pur consistenti flussi termici, anch'essi uscenti verso l'atmosfera nelle ore diurne e solo debolmente entranti nelle ore notturne nell'ecosistema, il quale, riscaldato dall'energia solare, dissipa gran parte dell'energia ricevuta come calore sensibile e come calore latente di evaporazione, una strategia indispensabile per mantenere il proprio stato termico entro limiti accettabili. L'emissione di vapore acqueo per via traspirativa inoltre rivela un'intensa attività stomatica da parte delle piante, e dunque fotosintetica.

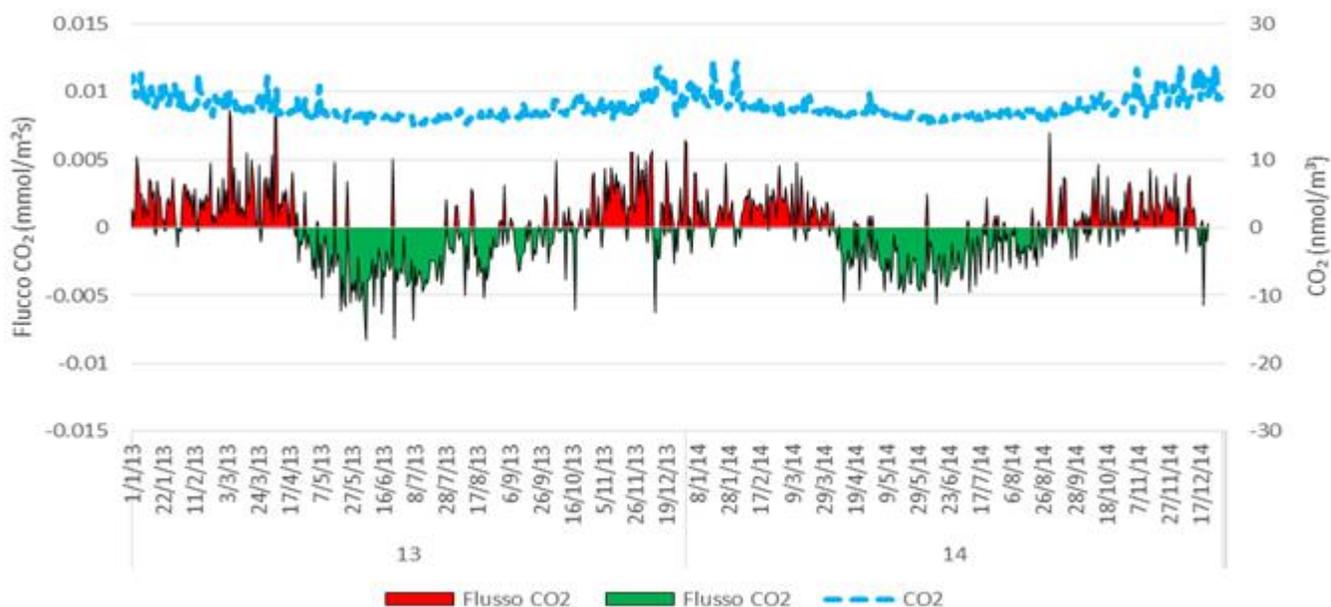


Figura 1 – Andamento annuale del flusso di CO₂ (Medie giornaliere). La curva del flusso (NEE: *Net Ecosystem Exchange*) è colorata in verde quando l'ecosistema si comporta da assorbitore netto di CO₂ (predominanza della fotosintesi sulla respirazione) e in rosso quando l'ecosistema si comporta da emettitore (predominanza della respirazione autotrofa ed eterotrofa sulla fotosintesi). La curva tratteggiata in alto rappresenta l'andamento delle concentrazioni ambientali di CO₂ espresse in mmol m⁻³ (asse verticale destro)

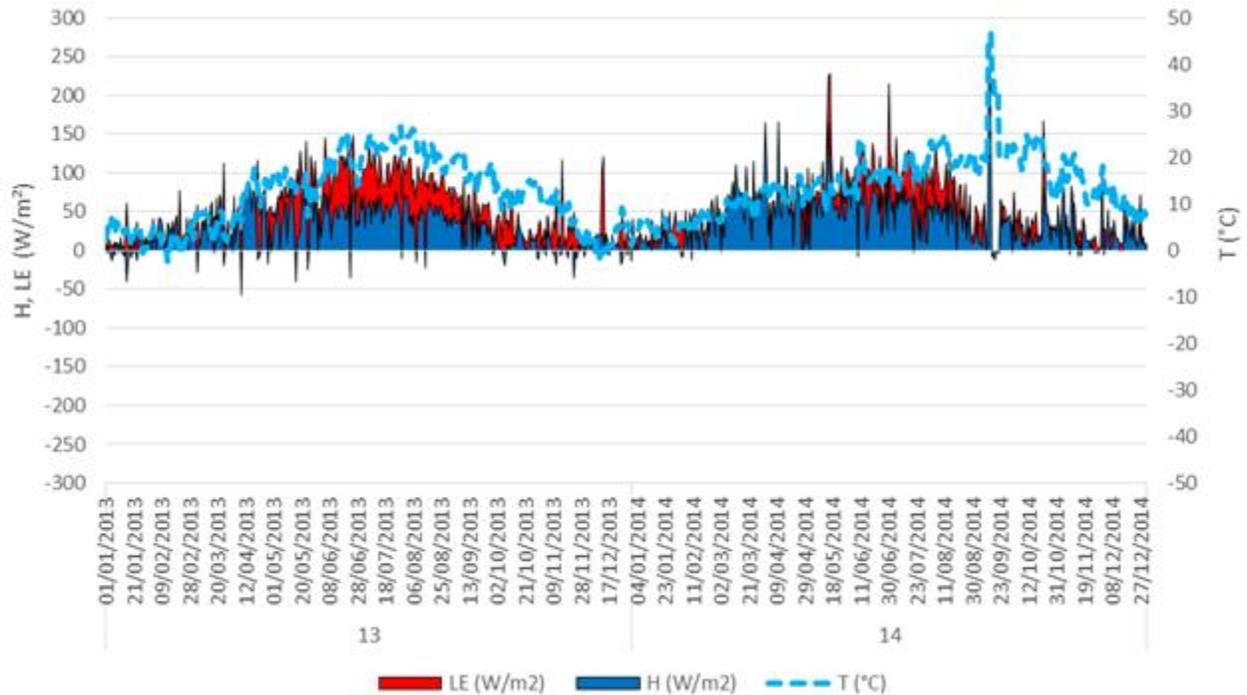


Figura 2 – Andamento annuale dei flussi di H e LE (medie giornaliere da gennaio 2013 a dicembre 2014) La curva tratteggiata in alto rappresenta l'andamento della temperatura. I flussi sono positivi quando diretti dal Bosco verso l'atmosfera. H indica il flusso di calore sensibile (*Hentalpy*), LE il flusso di calore latente di evaporazione (ovvero il flusso d'acqua evapotraspirata) e T indica la temperatura dell'aria a 42 m d'altezza (asse verticale destro).

I flussi di ozono (Figura 3) sono invece quasi sempre negativi, ad indicare come la foresta agisca da *sink* netto per questo inquinante che viene dunque rimosso attivamente dall'atmosfera. Poiché l'ozono è un gas fortemente fitotossico questo servizio ecosistemico ha un prezzo per la vegetazione che lo attua. Tale prezzo si esplica nel consumo di parte dei fotosintetati per la difesa antiossidante ed un aumento della respirazione basale. Quando il potenziale di detossificazione viene sovrastato, l'ozono inizia a causare danni a livello cellulare e subcellulare che possono manifestarsi con scompensi di tipo fisiologico fino alla comparsa di veri e propri sintomi fogliari. L'intensità del danno può essere valutata solo attraverso il calcolo della dose stomatica di ozono, la quale richiede una procedura di partizione dei flussi piuttosto lunga e complessa che è tuttora in corso. La curva sovrastante riporta le concentrazioni atmosferiche di ozono i cui valori sono leggibili sull'asse verticale destro. È il caso di notare come valori superiori a 90 ppb ($\cong 180 \mu\text{g}/\text{m}^3$) costituiscano uno sfioramento del livello di attenzione stabilito dalla normativa.

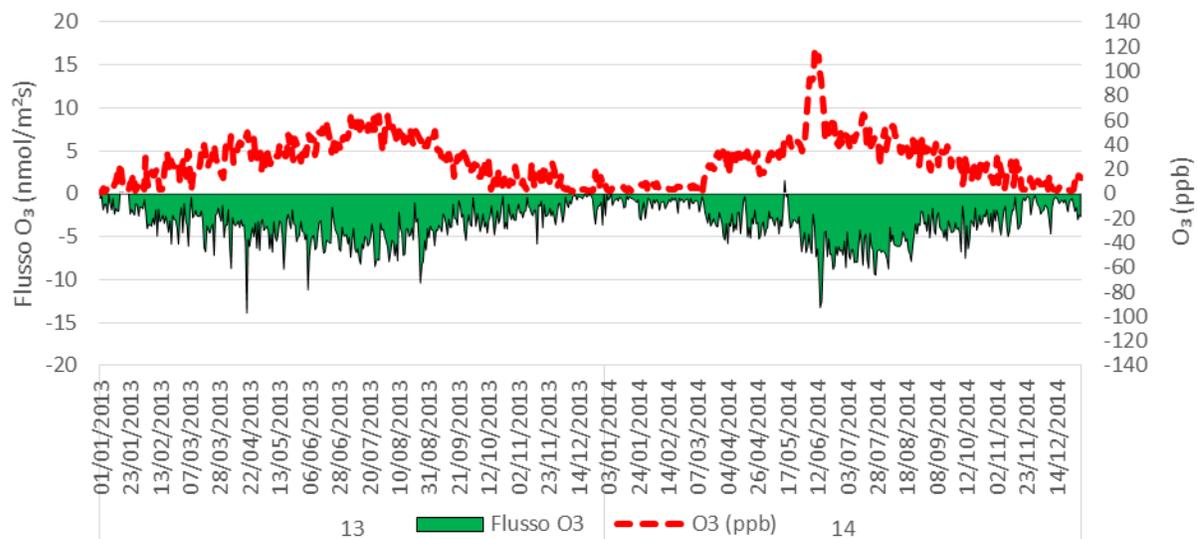
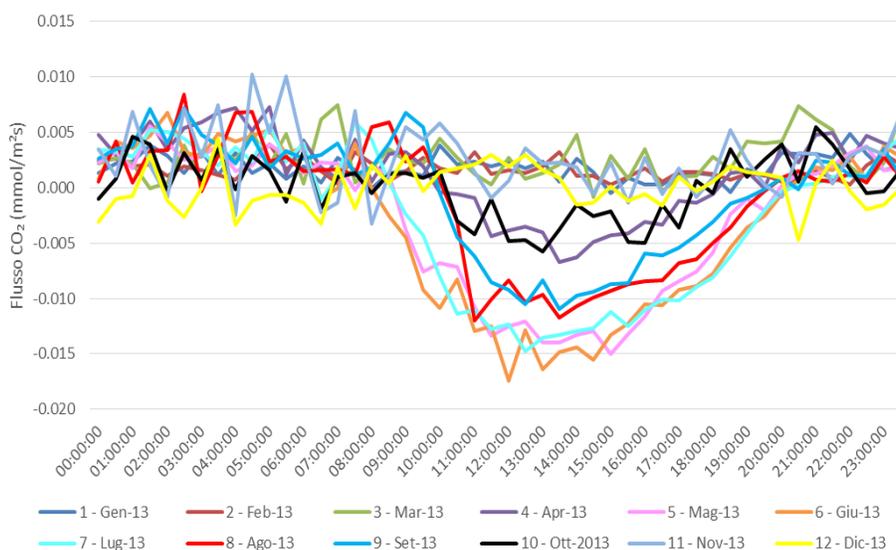


Figura 3 – Andamento annuale dei flussi di ozono (medie giornaliere da gennaio 2013 a dicembre 2014). I flussi sono negativi quando diretti dall’atmosfera verso il Bosco. La curva sovrastante indica la concentrazione di ozono a 42 m d’altezza (asse verticale destro).

La Figura 4 a,b,c riporta l’andamento medio giornaliero del flusso di CO₂ nei mesi di misura (2013-2014). Si può notare in generale come l’ecosistema assorba CO₂ di giorno (valori negativi di flusso) ed emetta CO₂ di notte (valori di flusso positivi). L’assorbimento netto di CO₂, dovuto alla predominanza dei processi fotosintetici su quelli respiratori, ha raggiunto la massima intensità in maggio 2013 (i.e. il valore negativo più basso) mentre l’emissione di CO₂, risultato della respirazione autotrofa ed eterotrofa, ha presentato un valore pressoché costante nei sei mesi di misura.



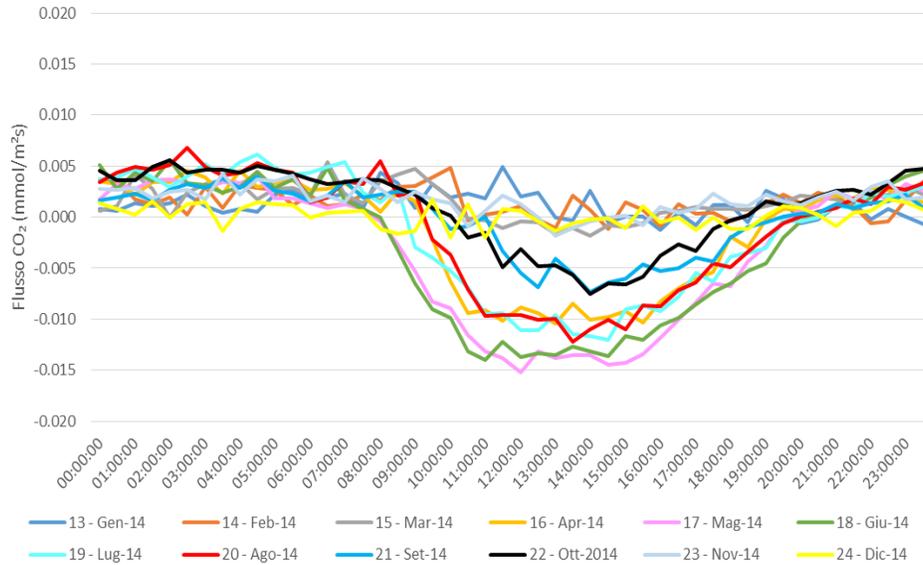


Figura 4 - Evoluzione media giornaliera del flusso di CO₂ sopra il Bosco della Fontananel 2013 (a) e nel 2014 (b).

I flussi termici (Figura 5 a-b) si sono rivelati massimi a luglio nel 2013 e a marzo nel 2014 con valori medi di 200 W m⁻² nelle ore centrali del giorno per poi decrescere gradualmente al procedere della stagione. È interessante notare che i flussi termici sono negativi la notte ad indicare una temperatura notturna della foresta minore dell'aria sovrastante.

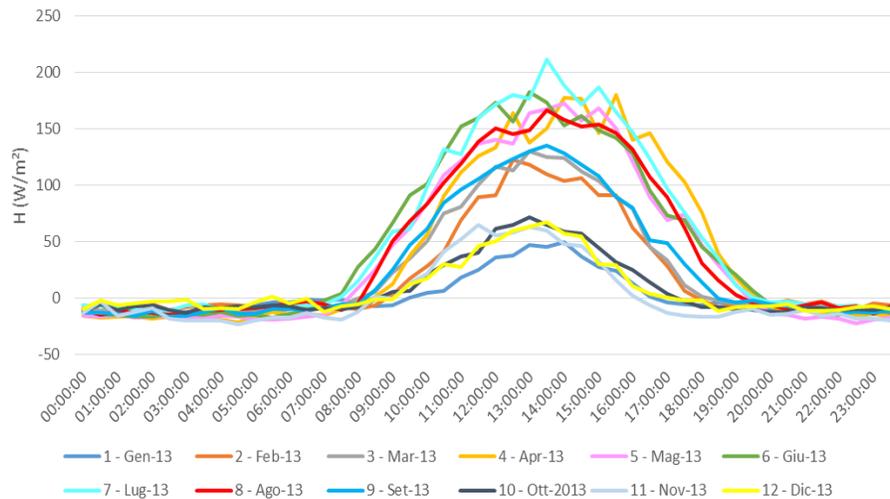


Figura 5 ab - Evoluzione media giornaliera dei flussi termici nel 2013 (a) e nel 2014 (b) sopra il Bosco della Fontana.

I flussi evapotraspirativi (Figura 6 ab) seguono lo stesso andamento ma con valori più intensi in valore assoluto. Le massime perdite d'acqua si hanno in luglio sia nel 2013 che nel 2014 con

valori medi di 300 W m^{-2} nelle ore centrali del giorno. L'evapotraspirazione decresce regolarmente al procedere della stagione. Da notare come nei mesi estivi la foresta si comporti da emettitore di vapore verso l'atmosfera anche nelle ore notturne, mentre in autunno, di notte, l'ecosistema riceve umidità dall'atmosfera sovrastante.

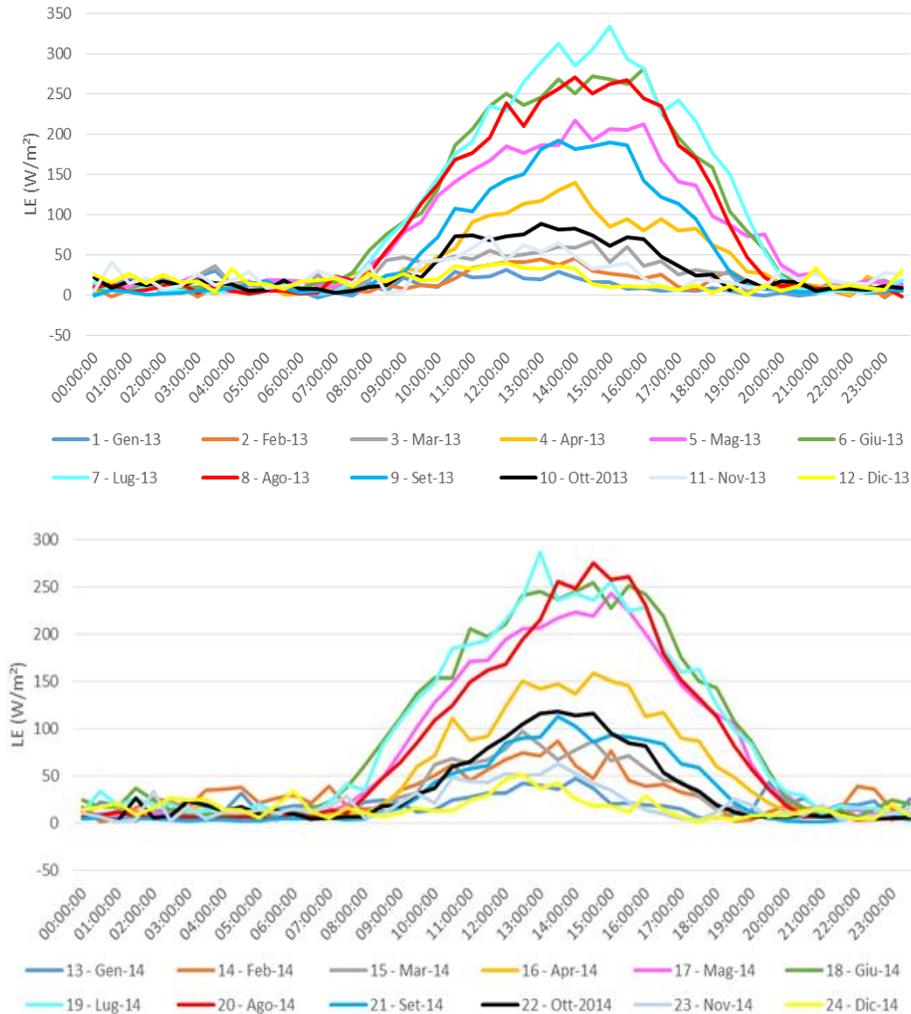
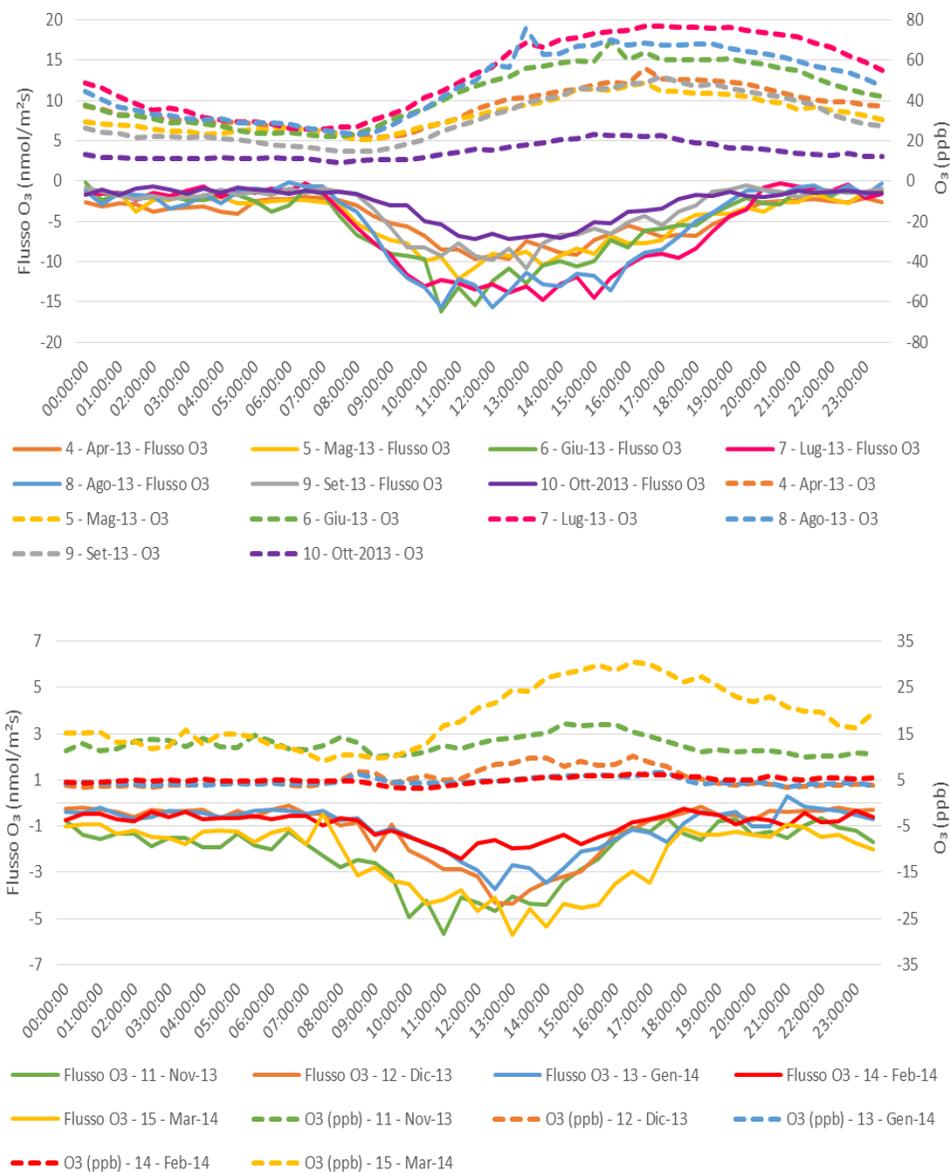


Figura 6ab - Evoluzione media giornaliera dei flussi evapotraspirativi nel 2013 (a) e nel 2014 (b) sopra il Bosco della Fontana.

I flussi di ozono (Figura 7) hanno mostrato il classico andamento a campana rovesciata, con un massimo di deposizione (il valore più basso) localizzato nelle ore centrali del giorno. Il mese che ha visto i flussi di ozono più intensi sono stati Agosto nel 2013 e Giugno nel 2014. Le concentrazioni di ozono hanno avuto un andamento pressoché sovrapponibile in Giugno e Agosto. Le massime diurne pari in media a circa 70 ppb si hanno nelle ore pomeridiane. Le concentrazioni atmosferiche di questo inquinante sono crollate a valori medi inferiori a 20 ppb nei mesi invernali. Valori così bassi sono da ricondurre all'aumento delle emissioni di NO da parte dei generatori termici ed all'assenza di nuova produzione fotochimica.

È interessante notare come, pur a fronte di basse concentrazioni ambientali, la deposizione autunnale di ozono sulla foresta (il flusso di O₃) si mantenga elevata nelle ore centrali del giorno. Ancora, è interessante osservare come la deposizione notturna di O₃ sia pressoché identica in tutte le stagioni. Il confronto tra i flussi estivi – in presenza di foglie - e quelli autunnali – con piante spoglie – consente di stimare in circa il 50% il contributo delle superfici non traspiranti alla rimozione di ozono, un processo che viene complessivamente denominato ‘rimozione non-stomatica’ di ozono.



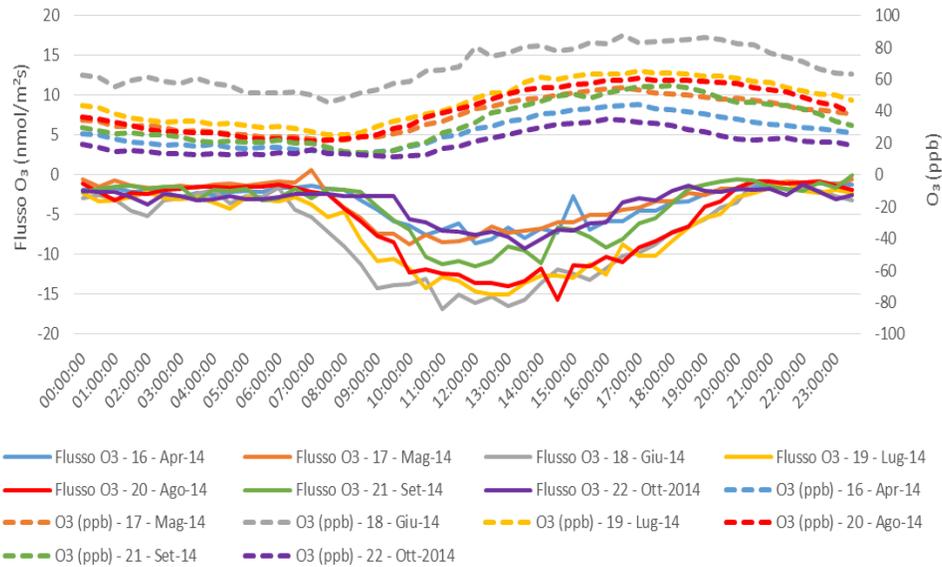


Figura 7a-b-c- Evoluzione media giornaliera dei flussi di ozono (linee continue) e delle concentrazioni di ozono (linee tratteggiate) a 42 metri sopra il Bosco della Fontana; a-aprile 2013-ottobre 2013, b-novembre 2013-marzo 2014, c-aprile 2014-ottobre 2014.

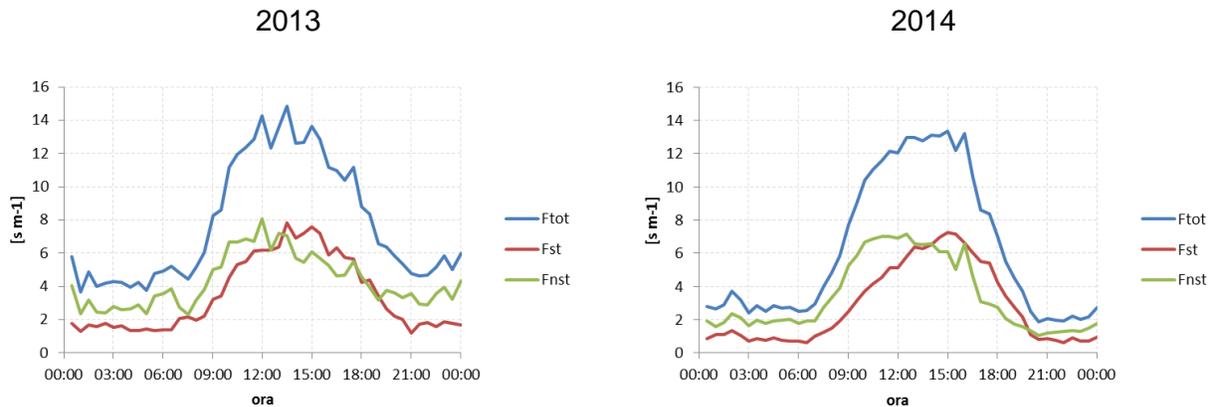


Figura 8- Evoluzione media giornaliera dei flussi stomatico (FStom), non stomatico (FnonStom) e totale (Ftot) nel 2013 e nel 2014

In Figura 8 si possono osservare gli andamenti delle simulazioni effettuate utilizzando un modello *single layer* basato su un approccio *big-leaf*. Gli andamenti nei due anni sono stati simili con flussi notturni leggermente più alti nel 2013. In entrambi i casi i flussi totali hanno avuto un picco intorno alle 14 nmol O₃ m⁻²s⁻¹ nelle ore centrali della giornata, mentre la deposizione non stomatica ha avuto un massimo nel mattino intorno alle 7 nmol O₃ m⁻²s⁻¹. Il flusso stomatico ha mostrato per entrambi gli anni un picco verso le 15:00, raggiungendo le 8 nmol O₃ m⁻²s⁻¹. La frazione assorbita per via stomatica è stata compresa tra il 40% ed il 50% in entrambi gli anni, leggermente maggiore nel 2013 (45%) rispetto al 2014 (42%).

In Figura 9 si può osservare un esempio degli andamenti mensili dei flussi di ozono partizionati tra stomatici e non stomatici per alcuni mesi del 2013. I flussi totali depositati sull'ecosistema sono stati più alti a luglio con picchi nelle ore centrali della giornata fino a oltre $20 \text{ nmol O}_3 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ mentre a giugno e ad agosto si sono attestati intorno alle $15 \text{ nmol O}_3 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ sempre nella stessa parte della giornata, per poi decrescere a valori tra $10 \text{ nmol O}_3 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $15 \text{ nmol O}_3 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a settembre e a valori inferiori a $10 \text{ nmol O}_3 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a ottobre. La diminuzione delle deposizioni è legata sia alla diminuzione della concentrazione di ozono in aria che alla diminuzione della turbolenza.

Il flusso stomatico, la cui stima è legata all'evapotraspirazione mostra un andamento a campana simile a quello dei flussi di calore latente, con valori più alti a luglio nelle ore centrali della giornata (sopra le $10 \text{ nmol O}_3 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ con picchi fino a quasi $15 \text{ nmol O}_3 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), in giugno e agosto sono state raggiunte quasi le $10 \text{ nmol O}_3 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ mentre a settembre e ottobre le deposizioni stomatiche sono diminuite sensibilmente, intorno a $5 \text{ nmol O}_3 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, sia per gli stessi motivi che hanno portato alla diminuzione dei flussi totali (meno ozono in aria e meno turbolenza), sia per la riduzione dell'attività stomatica all'approssimarsi dell'autunno.

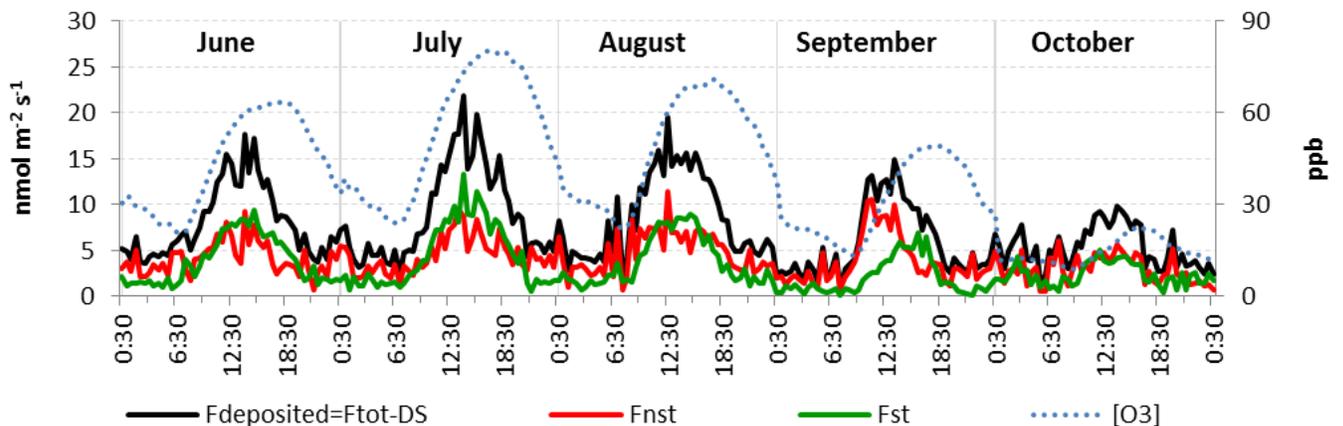


Figura 9 – Andamento medio giornaliero mensile dei flussi stomatico (FStom), non stomatico (FnonStom) di deposizione (Fdeposited) e della concentrazione di ozono ([O3]) (aprile-ottobre 2013).

La dose fitotossica (POD1) ricevuta dalle piante nella stagione vegetativa 2013 è stata di 39 mmol m^{-2} nel 2013 e di 27 mmol m^{-2} nel 2014, valori piuttosto alti se rapportati ai livelli critici di flusso indicati dall'UNECE per la protezione della vegetazione (4 mmol m^{-2} riferiti a faggio e betulla, le specie prese a riferimento dall'UN/ECE per le latifoglie generiche).

In Figura 10 sono mostrati gli andamenti dei flussi totali cumulati e dell'indice POD1 per entrambi gli anni. Nel 2013 il bosco ha rimosso $64.6 \text{ kg O}_3 \text{ ha}^{-1}$ dei quali solo il 30% per via stomatica ($19 \text{ kg O}_3 \text{ ha}^{-1}$) mentre nel 2014 questa percentuale è scesa al 23% ($13 \text{ kg O}_3 \text{ ha}^{-1}$ per via stomatica e $57.5 \text{ kg O}_3 \text{ ha}^{-1}$ complessivi fornendo così un importante servizio ecosistemico).

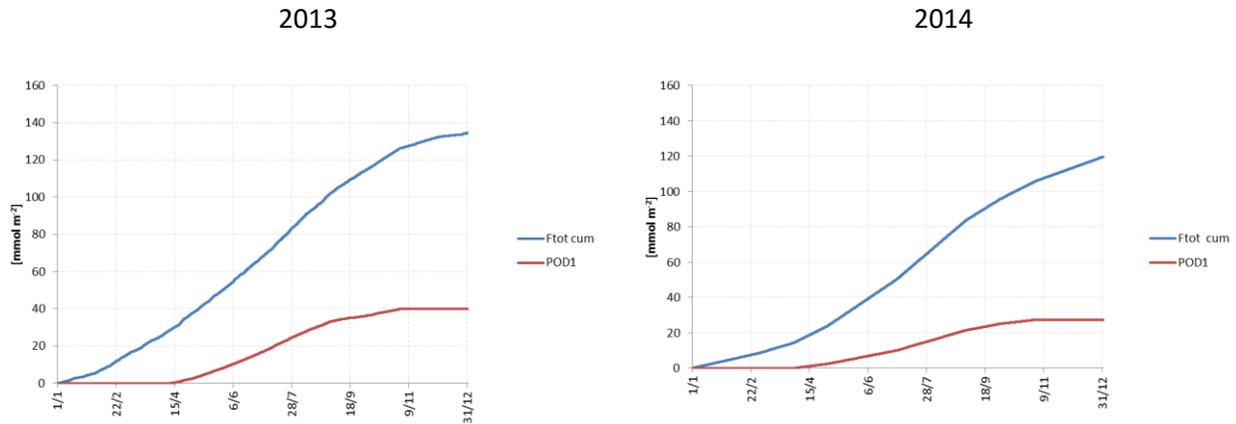


Figura 10 Andamento annuale dei flussi totali cumulati e dell'indice POD1 cumulato, il grafico di destra è riferito al 2013 quello di sinistra al 2014

EFFETTI SU MICROCLIMA URBANO

Gli effetti sul microclima della RNO di “Bosco della Fontana” sono stati valutati confrontando le temperature a 2 metri dal suolo misurate alla torre con le temperature di tre stazioni di ARPA Lombardia: due situate in città (Mantova S.Agnese e Mantova Cerese) e la terza situata ai margini della RNO. Inoltre è stata calcolato l'indice *humidex* (H), definito da Masterson & Richardson (1979) come:

$$H = T + \frac{5}{9} (e - 10)$$

dove T è la temperatura in Celsius ed e è la tensione di vapore dell'acqua in hPa. L'indice Humidex viene comunemente chiamato temperatura percepita, benché non ci sia una vera e propria base fisica per appoggiare questa affermazione e vi siano ancora varie critiche a riguardo, esso consente un approccio - sia pur semplicistico - al problema della valutazione soggettiva della sensazione di caldo afoso. Come si può notare dalla Figura 11 la temperatura registrata alla torre nel periodo vegetativo (aprile – ottobre) di entrambi gli anni essa risulta sempre inferiore a quella delle altre tre stazioni, in media da 1.3 a 2.1 °C se la media è calcolata su tutto il giorno e questa differenza aumenta se si considerano solo le ore centrali del giorno (10-18): si va dai 2.5 °C di differenza dalla stazione situata ai confini del bosco ai 2.7 e 2.8°C di differenza osservati con le stazioni situate in città (Tabella 1).

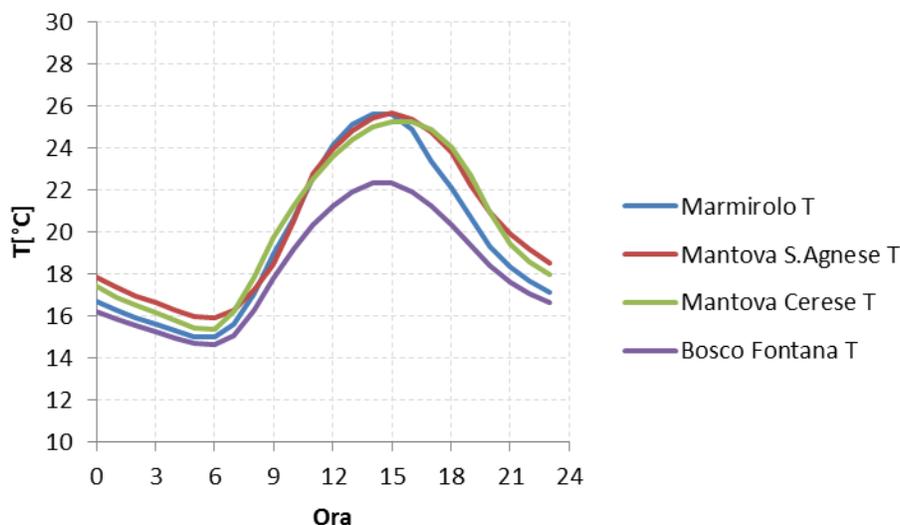


Figura 11– Andamento medio giornaliero mensile delle temperature nel periodo aprile-ottobre di entrambi gli anni presso le quattro stazioni di misura considerate: la linea blu rappresenta la temperatura misura presso la stazione ARPA Lombardia di Marmiolo situata al confine della RNO, la linea rossa rappresenta la temperatura misura presso la stazione di Mantova S.Agnese (stazione urbana), la linea verde rappresenta la temperatura misura presso la stazione ARPA di Mantova Cerese (stazione urbana) e la linea viola rappresenta la temperatura misura presso la torre micrometeorologica.

Tabella 2– Temperature medie giornaliere, temperature medie nelle ore 10-18, indice *Humidex* medio giornaliero e indice *Humidex* medio nelle ore 10-18, nel periodo aprile-ottobre di entrambi gli anni presso le quattro stazioni di misura considerate.

stazione	T (media giornaliera) [°C]	T (ore centrali) [°C]	Humidex (media giornaliera)	Humidex (ore centrali)
Marmiolo	19.5	23.3	24.1	28.3
Mantova S.Agnese	20.3	23.5	24.7	28.0
Mantova Cerese	20.1	23.6	24.2	27.6
Bosco Fontana	18.2	20.8	23.0	26.3

Anche l'indice *Humidex* conferma i benefici apportati dal Bosco sul microclima locale, con i valori più bassi in assoluto misurati presso la torre micrometeorologica, tuttavia è interessante notare come questi effetti praticamente siano nulli già al limitare del bosco. Infatti i valori dell'indice *Humidex* calcolati sui dati sottochioma registrati presso la torre sono inferiori di 1-2 punti rispetto alle altre tre stazioni ma quelli della stazione ARPA situata ai confini della riserva sono confrontabili con quelli delle stazioni urbane (Tabella 2). Tuttavia è interessante notare in Figura 13 come l'indice *Humidex* della stazione ARPA ai confini della riserva sia maggiore delle stazioni urbane nelle ore centrali della giornata (10-16) mentre risulta essere inferiore nel tardo

pomeriggio. Questa variazione nel tardo pomeriggio potrebbe essere legata ad una inversione termica che si crea nel bosco e che porta i suoi benefici anche nelle immediate vicinanze.

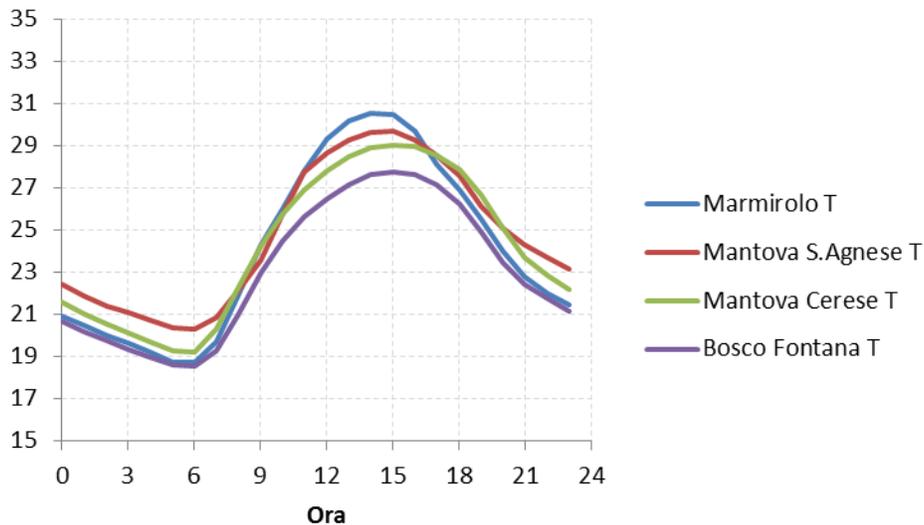


Figura 12 – Andamento medio giornaliero mensile dell'indice *Humidex* nel periodo aprile-ottobre di entrambi gli anni presso le quattro stazioni di misura considerate: la linea blu è riferita alle misure presso la stazione ARPA Lombardia di Marmiolo situata al confine della RNO, la linea rossa è riferita alle misure presso la stazione di Mantova S.Agnese (stazione urbana), la linea verde è riferita alle misure presso la stazione ARPA di Mantova Cerese (stazione urbana) e la linea viola è riferita alle misure presso la torre micrometeorologica

TASK 2B

FLUSSI DI CO₂ DA SUOLO

I flussi di emissione di CO₂ dal suolo sono stati misurati con la tecnica delle *static enclosures* per mezzo di un sistema di 4 camere automatiche denominato SASSFLUX.

In

Figura 13 sono mostrati i flussi di CO₂ (medie giornaliere) dal suolo misurati a Bosco Fontana nel 2013. I flussi sono fortemente stagionali essendo legati all'attività microbica del suolo con valori invernali molto bassi, un incremento primaverile e una forte emissione estiva che decresce in autunno. Le emissioni estive hanno raggiunto anche picchi molto elevati per singola camera raggiungendo anche le 24 $\text{umol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e considerando tutte e quattro le camere di misura sono state mediamente intorno alle 8 $\text{umol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (

Figura 13). Le emissioni totali sono state pari a 1.5 kg C m^{-2} .

Le quattro camere utilizzate hanno mostrato una variabilità che può essere spiegata dalla vicinanza con radici e dal suolo del sito di misura: esso infatti risulta molto eterogeneo con una forte presenza di materiale sassoso e ghiaioso nei primi strati.

La relazione tra emissioni di CO₂ dal suolo e temperatura del suolo a due profondità (5 e 30 cm) è mostrata in Figura 14 dove si può osservare come la correlazione, espressa come R², sia simile per entrambe le misure di temperatura. Si può inoltre notare come per i valori più bassi di temperatura si siano verificate sia emissioni molto basse, meno di 1 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ ma anche da 4 a 6 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹.

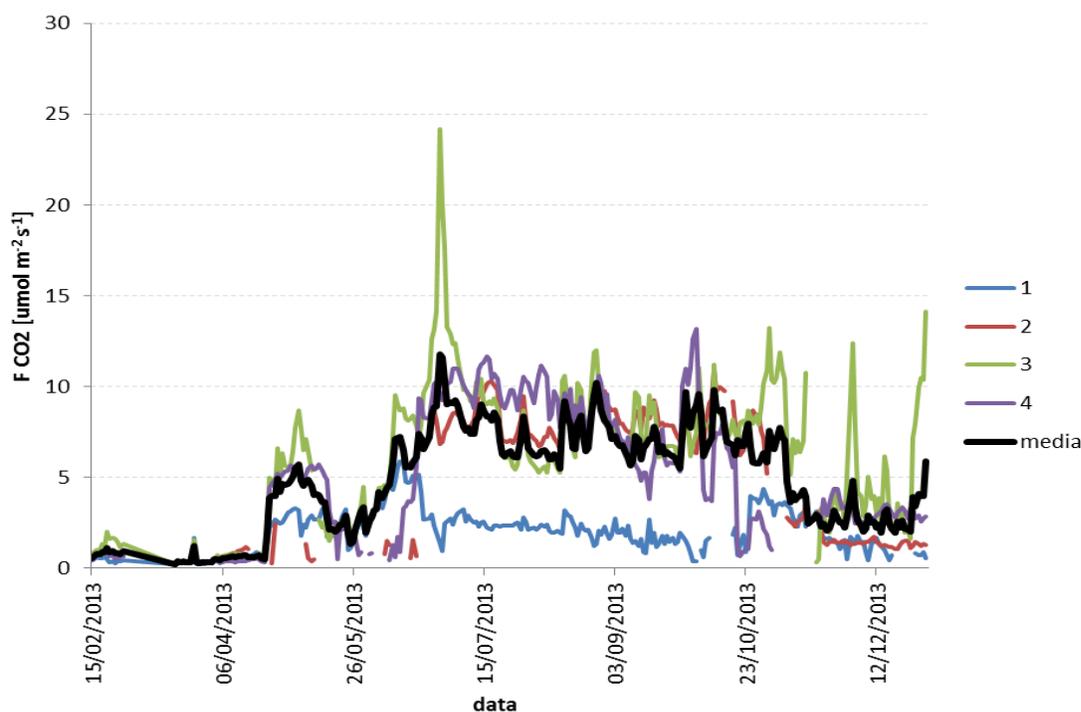


Figura 13 - Medie giornaliere delle emissioni di CO₂ dal suolo presso Bosco Fontana, andamento nelle 4 camere e media delle 4 camere.

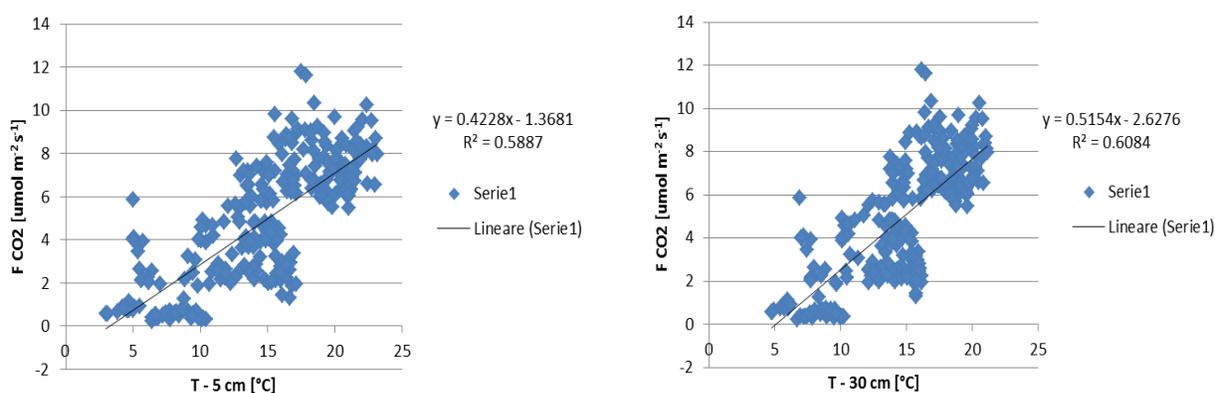


Figura 14 - Relazione tra emissioni di CO₂ dal suolo e temperatura del suolo a 5 cm di profondità (grafico di sinistra) e temperatura del suolo a 30 cm di profondità (grafico di destra).

TASK 2CNO_x e VOC

I flussi di NO_x sono stati determinati con la tecnica del gradiente aerodinamico a partire dai profili sopra chioma delle concentrazioni di questi composti misurate a 41m e 30m d'altezza.

I flussi di NO_x hanno mostrato un marcato comportamento stagionale. Nei mesi estivi la foresta si è comportata da sink netto di NO atmosferico (Figura 15), mentre al contrario si è mostrata un emettitore netto di NO₂. Poiché il flusso di NO₂ uscente verso l'atmosfera è maggiore del flusso di deposizione di NO, c'è da supporre che parte dell'NO₂ emesso venga dalla conversione sottocanopy dell'NO emesso dal suolo a NO₂ ad opera dell'ozono ($\text{NO} + \text{O}_3 \rightarrow \text{NO}_2 + \text{O}_2$). Questo NO₂ va ad aggiungersi a quello che si forma sopra la chioma in seguito ad analoga reazione in fase gassosa dell'NO depositato con l'ozono. Entrambi i flussi sopra-*canopy* di NO ed O₃ sono flussi discendenti, come è da attendersi dalla reazione di *gas-phase titration* che vede questi composti tra i reagenti che scompaiono. Il flusso di NO₂ è invece uscente, come è da attendersi da un composto che compare tra i prodotti della sopraccitata reazione.

In totale nei trimestre estivo la foresta ha ricevuto 0.891 kg N ha⁻¹ come NO, mentre ne ha emessi 4,358 kg N ha⁻¹ come NO₂, per una perdita totale di azoto di circa 3,5 kg N ha⁻¹, il tutto calcolato a STP (1 atm, 25°C).

Nei mesi autunnali (e si suppone anche in quelli invernali) (Figura 16), i flussi di NO dalla foresta si fanno uscenti verso l'atmosfera e quelli di NO₂ diventano più erratici vista la scarsità di ozono. Evidentemente la mancanza di foglie nei mesi autunnali fa in modo che l'efflusso di NO dal suolo si renda percepibile fin sopra la chioma.

In totale nel trimestre autunnale la foresta ha emesso 2,108 kg N ha⁻¹ come NO e 1,357 kg N ha⁻¹ come NO₂, per una perdita totale di azoto di circa 3,5 kg N ha⁻¹, il tutto calcolato a STP (1 atm, 25°C). È interessante come la perdita netta di azoto si mantenga costante sia d'estate che d'autunno.

Evidentemente, vista la sua collocazione periurbana in un'area ad alta intensità agricola, la foresta è sottoposta ad un carico eccessivo di azoto (nitrati delle falde, deposizioni umide, deposizioni secche di ammoniaca) che riequilibra rimettendolo verso l'atmosfera (Figura 17).



Figura 15 – Evoluzione media giornaliera dei flussi di NOx al *top-canopy* nel trimestre estivo (luglio, agosto, settembre 2013)

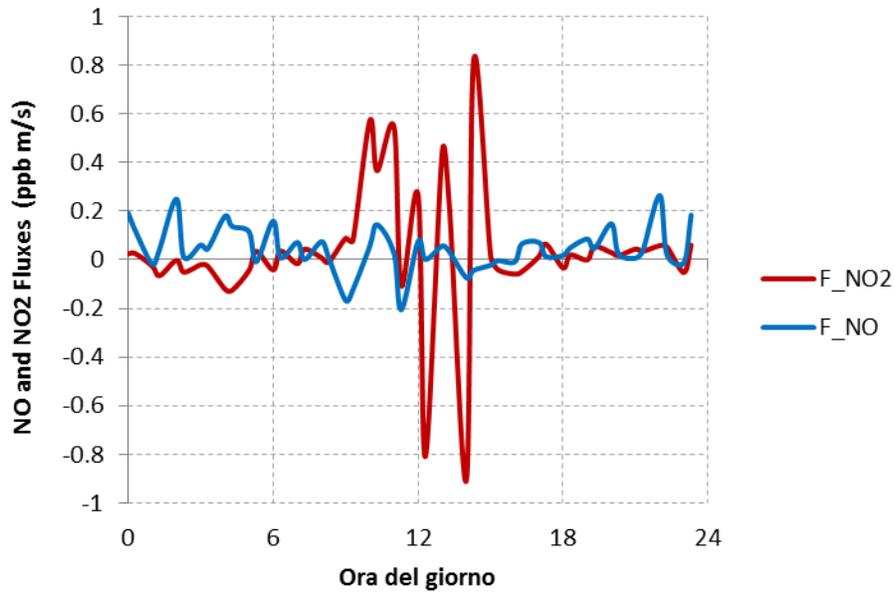


Figura 16 – Evoluzione media giornaliera dei flussi di NOx al *top-canopy* nel trimestre autunnale (ottobre, novembre, dicembre 2013)

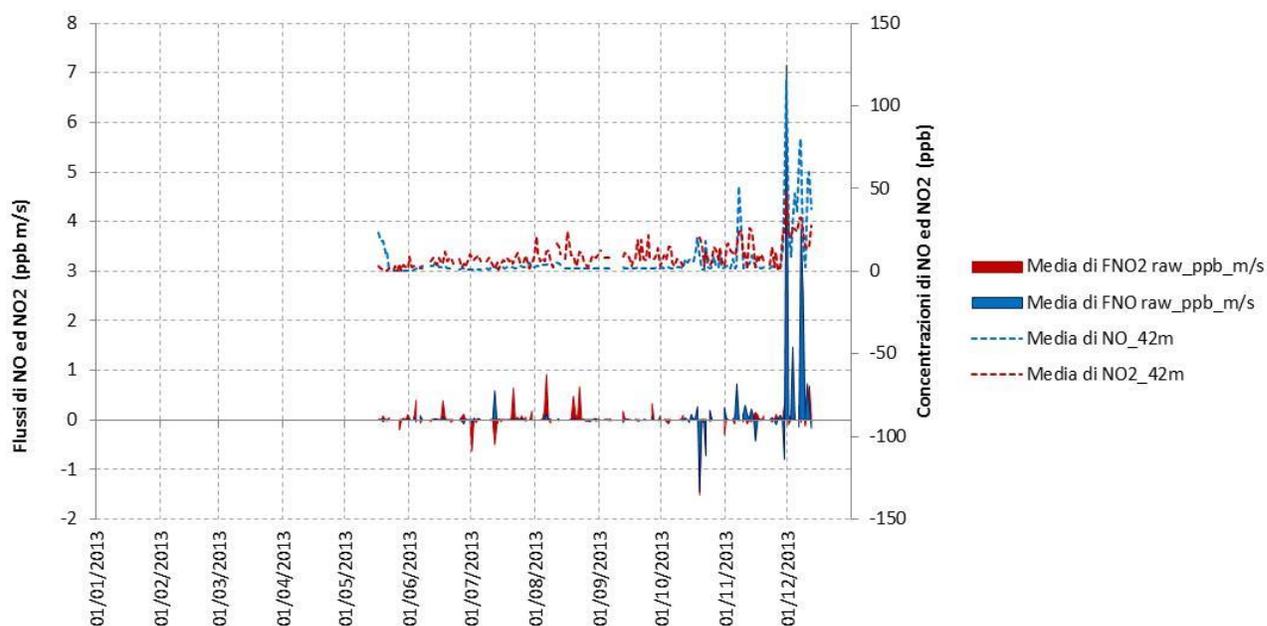


Figura 17 – Flussi medi giornalieri di NOx e concentrazioni medie di NOx al *top* della *canopy* (42m)

Prodotti della ricerca

Congressi:

- Finco A., Marzuoli R., Monga R., Gerosa G., 2014. Ozone fluxes to agricultural and forest ecosystems. Max Plank Institute for Biogeochemistry, Jena (D), 12 June 2014. Invited lecture
- Gerosa G., 2014. Plants in the city and their gaseous exchanges with the atmosphere. 1st International Workshop "Plant physiology in the urban environment", Pisa 23/6/2014, invited lecture
- Marzuoli R., Monga R., Finco A. and Gerosa G., 2014. Stomatal conductance, photosynthesis and growth response of Hornbeam and Oak young trees after a two-years treatment with ozone and nitrogen addition. CAPERMED Committee on Air Pollution Effects Research on Mediterranean Ecosystems, Lisbon 3-4 July 2014, poster
- Marzuoli R., Monga R., Finco A. , Fusaro L., Salvatori E., Fares S., Kuzminsky E., Manes F. and Gerosa G., 2014. Biomass response of young Holmoak trees after one season of ozone treatment in well watered condition. CAPERMED Committee on Air Pollution Effects Research on Mediterranean Ecosystems, Lisbon 3-4 July 2014, poster
- Marzuoli R., Gerosa G., Finco A., Monga R., 2014. How does forest plants will respond to increased nitrogen deposition and tropospheric ozone in cc scenarios? Photosynthesis

and biomass production of fumigated oak and hornbeam saplings in Italy. General Conference ECLAIRE Budapest 29/9-30/9/2014, presentazione a invito

- Gerosa G., Marzuoli R., Monga R., Hardersen S., Gorian F., Minari E. and Finco A. 2014. How great is the ozone removal by a mature forest? Which is the biological cost of this important ecosystem service? Open Science Conference, Budapest 1/10-2/10/2014, presentazione a invito
- Gerosa G., A. Finco, R. Marzuoli, M. Gotti, R. Gasche, S.Fares, M. Coyle, B. Loubet, E. Nemiz, 2014. Ozone flux profile at the Bosco Fontana site during the ECLAIRE joint field campaign. Open Science Conference, Budapest 1/10-2/10/2014, poster
- Marzuoli R., Monga R., Finco A., Fusaro L., Salvatori E., Fares S., Kuzminsky E., Manes F. and Gerosa G., 2014. Biomass response of young Holmoak trees after one season of ozone treatment in well watered condition. Open Science Conference, Budapest 1/10-2/10/2014, poster
- Gerosa G., Marzuoli R., Monga R., Finco A., 2014. Effects of ozone and nitrogen deposition in young trees of hornbeam and oak. Results from the ECLAIRE experiments in Italy, Open Science Conference, Budapest 1/10-2/10/2014, poster
- Ferrara R.M., Loubet B., Carozzi M., Decuq C., Durand B., Rossi R., Palumbo A.D., Stellacci A.M., Campi P., Vitti C., Martinelli N., Fornaro F., Mastrangelo M., Introna M., Sanitate N., Cesareo V., Casulli V., Di Tommasi P., Magliulo V., Vuolo R., Gerosa G., Finco A., Marzuoli R., Rana G. 2014. Overview of an experiment to evaluate Nitrogen dynamic after green manure in Mediterranean semi-arid environment, Open Science Conference, Budapest 1/10-2/10/2014, poster
- Gerosa G., Riccardo M., Monga R., Finco A., 2014. “And vegetation? Uptake and effects of a paradigmatic air pollutant on plants”, AIRweek 2014, “Air Quality, Health and Ecosystems”, 10 November 2014, Brescia, presentazione a invito
- Finco A., Gerosa G., Marzuoli R., Coyle M. and Neimitz E., 2015. Above and below canopy ozone flux measurements at bosco fontana site. Implications for modeling and risk assessment. ICP Vegetation, Roma 3-5/1/2015, presentazione orale
- Gerosa G., Marzuoli R., Monga R., Finco A., 2015. Ozone and nitrogen effects in oak and hornbeam young trees after two years of treatments. ICP Vegetation, Roma 3-5/1/2015, presentazione orale
- Gerosa G., Marzuoli R., Finco A., Monga R., Fusaro L., Salvatori E., Fares S., Kuzminsky E., Manes F., 2015. A Dose-Response Relationship for young Holmoak trees

exposed to different levels of ozone during one growing season. CP Vegetation, Roma 3-5/1/2015, poster

- Gerosa G., Finco A., Marzuoli R., Coyle M., Nemitz E., 2015. Eddy covariance measurements of ozone fluxes at 4 levels above and within a forest canopy in the Po valley (Italy), EGU 2015, Vienna, 12-17/4/2015
- Gerosa G., Marzuoli R., Finco A., On the sensitivity decay of the cumarine targets for fast ozone measurements. Implications for the estimation of the instrumental zero and flux calculations, EGU 2015, Vienna, 12-17/4/2015

Articoli scientifici:

- G. Gerosa, A. Finco, M. Chiesa, R. Marzuoli, 2014. Plants in the city and their gaseous exchanges with the atmosphere. A possible way to estimate the air pollutant removal by plants and the related biological cost. *Agrochimica* 58 (n. 3), 269-289
- Pollastrini M, Desotgiu R, Camin F, Ziller L, Gerosa G, Marzuoli R, Bussotti F, 2014. Severe drought events increase the sensitivity to ozone on poplar Clones. *Environmental and Experimental Botany*, 94-104
- Ferretti M, Bussotti F, Cristofolini F, Cristofori A, Gottardini E, Rocchini D, Finco A, Marzuoli R, Gerosa G, 2014. Some remarks on “New functions for estimating AOT40 from ozone passive sampling” by De Marco et al. (2014). *Atmospheric Environment* 98, 707-710

Tesi

- Mariapaola Gotti, 2014. Profilo flussi di ozono in canopy forestale. Problematiche connesse alla verifica qualità dato e ipotesi stazionarietà flusso costante. Tesi magistrale presso la Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Università Cattolica del Sacro Cuore, Brescia 26 Settembre 2014
- Michela Scalvenzi, 2015. Resistenza del suolo nudo alla deposizione di ozono. Tesi magistrale presso la Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Università Cattolica del Sacro Cuore, Brescia 27 Aprile 2015

WP2 – UR: UNITUS, UNIVERSITA’ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA

Responsabile: Dott.ssa Elena Kuzminsky

TASK 2A

MICROMETEOROLOGIA DEI FLUSSI DI MATERIA ED ENERGIA

A partire da febbraio 2013, un insieme di parametri meteorologici (temperatura dell'aria e del suolo, umidità relativa, precipitazioni, direzione e velocità del vento, umidità del suolo, bagnatura fogliare) vengono raccolti con risoluzione semioraria presso il sito sperimentale “Grotta di Piastra” all'interno della tenuta presidenziale di Castelporziano, una lecceta costiera Mediterranea di ambiente periurbano data la vicinanza con la città di Roma. I dati meteorologici raccolti con sensori disposti su vari livelli disposti su una torre micrometeorologica servono per spiegare ed interpretare i flussi di energia e materia misurati con la tecnica *Eddy Covariance*. In particolare, flussi di carbonio e vapore acqueo vengono misurati con analizzatore ad infrarossi (Licor mod. 7200), mentre flussi di ozono vengono misurati con un analizzatore NOAA a chemiluminescenza accoppiato ad un analizzatore UV (mod. thermo scientific). I dati vengono registrati in continuo al fine di ottenere una serie storica in grado di mettere in correlazione i flussi misurati con le caratteristiche climatiche e le concentrazioni di ossidanti atmosferici (O_3 e NO_x). Abbiamo stimato per il 2013 uno scambio netto di CO_2 (NEE-Net Ecosystem Exchange) pari a 760 g(C) m^{-2} , il che sottolinea una forte capacità di *sink* di carbonio per questa lecceta mediterranea che risente poco dello *stress* idrico grazie ad un livello di falda superficiale che garantisce approvvigionamento idrico all'apparato radicale anche durante le stagioni notoriamente più siccitose. Nel 2014 invece, l'estate meno siccitosa ha portato ad un incremento dell'assorbimento di carbonio con valori di poco superiori ai 790 g(C) m^{-2} (valori ancora da confermare). Attività modellistica è stata incentrata sulla determinazione della GPP (*Gross Primary Production*) assimilabile alla capacità fotosintetica a livello di *canopy*, mentre modelli sono stati utilizzati per effettuare una partizione dei principali *sinks* di ozono nella foresta Mediterranea: suolo, stomi e cuticole. L'articolo pubblicato nel 2014 sulla rivista Agr. For. Met. riporta come gli stomi rivestano un contributo preponderante nella rimozione di ozono, mentre il suolo e le cuticole contribuiscono fino al 30% del flusso totale di ozono, che raggiunge livelli fino a $-12 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in primavera. Le misure sottochioma con la tecnica *Eddy Covariance* si sono dimostrate utili al fine di misurare direttamente il contributo del suolo alla rimozione di ozono. Uno studio in corso mette in relazione la GPP con i flussi stomatici di ozono al fine di valutare l'eventuale danno. I risultati delle analisi statistiche verranno valutati a breve.

TASK 2B

FLUSSI DI CO_2 DA SUOLO E RADICI

Flussi di CO_2 da suolo sono stati misurati mediante uso di collari a partire da maggio 2014 e sono ancora in corso. Il protocollo prevede misure settimanali su 15 collari distribuiti all'interno del “*footprint*”, ovvero l'area sorgente che determina i flussi a livello ecosistemico misurati con *Eddy Covariance* sopra le chiome. Un buon accordo tra le misure di flussi sottochioma effettuate grazie ad una seconda torre micrometeorologica e i valori puntiformi misurati al suolo è stato raggiunto, sebbene i valori di respirazione tra i diversi collari differiscono a causa

dell'eterogeneità del suolo. Analisi delle comunità microbiche grazie alla collaborazione con i colleghi del CRA RPS sono state svolte per spiegare i fattori di eterogeneità osservati. Un articolo che mette in relazione tali misure è stato sottoposto alla rivista *Science of the Total Environment*.

TASK 2C

DETERMINAZIONE DI VOC BIOGENICI E ANTROPOGENICI E ALTRI GAS REATTIVI (NO_x)

La caratterizzazione di VOC emessi da specie urbane ma anche dei processi di deposizione di VOC di natura antropogenica ha avuto inizio nel gennaio 2014. Una seconda campagna è stata effettuata nel mese di luglio 2014- Grazie alla collaborazione con il CNR IBAF è stato installato presso il sito sperimentale un PTRMS, potente spettrometro in grado di misurare ad elevata risoluzione temporale un vasto *range* di VOC tra cui isoprenoidi (isoprene e monoterpeni), OVOC (metanolo, acetaldeide e acetone) e VOC aromatici (benzene, toluene e xilene). Grazie ad un sistema di elettrovalvole realizzato per campionare gas a diverse altezze dal suolo fin sopra le chiome, si è riusciti a caratterizzare il profilo verticale dei VOC. Attività modellistica basata sui principi di modello lagrangiano ha permesso di stimare i flussi a partire dalle concentrazioni. Le campagne sperimentali hanno portato alla luce la capacità della foresta Mediterranea di emettere monoterpeni (circa 1 nmol m⁻²s⁻¹) specialmente nel periodo estivo, quando le condizioni di luminosità e temperatura sono ottimali per la produzione di questi composti volatili. Un confronto tra flussi misurati con *Eddy Covariance* e flussi modellati è stato effettuato. I flussi modellati risultano leggermente sovrastimati quando non si tiene conto della reattività dei monoterpeni. Un articolo è in fase di preparazione. Attraverso una collaborazione con il CNR IBAF, i lecci di Castelporziano sono stati studiati in laboratorio. Grazie all'utilizzo di cuvette per scambi gassosi è stato stimato che le foglie di leccio riescono a sottrarre dall'atmosfera rilevanti quantità di prodotti di ossidazione del VOC (Methyl-vinyl-ketone e Methacrolein), il che suggerisce che le piante hanno un ruolo attivo nel modificare la composizione chimica dell'atmosfera. I risultati hanno trovato grande consenso nella comunità scientifica, e sono stati pubblicati sulla rivista "*Environmental Science & Technology*".

TASK 2D

ISTOPATOLOGIA DEL DANNO DA STRESS

Al termine del secondo anno di progetto, dopo aver dato seguito a molte prove sperimentali per la messa a punto di un metodo di estrazione dei nuclei di foglie mature di leccio, già segnalate nella relazione del I anno di attività, si riporta di seguito una breve sintesi di quanto fatto e in dettaglio le condizioni che hanno consentito di ottenere dei nuclei vitali da sottoporre a *Comet assay*.

Al fine di estrarre nuclei da foglie di leccio, specie sclerofilla particolarmente difficile da trattare, sono stati confrontati metodi meccanici, chimici ed enzimatici. Come materiale di partenza sono state testate foglie completamente sviluppate, prelevate da semenzali in vivaio o da piante adulte situate in differenti punti della città di Viterbo. Le foglie, una volta sterilizzate con alcool etilico al 70 % per 1 minuto, sono state sottoposte alle varie prove sperimentali sia allo stato fresco o dopo essere state congelate a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; l'età della foglia variava da 2-3 mesi ad un anno dall'emissione. Per ogni metodo impiegato è stato approntato anche un esperimento in parallelo con foglie di piante modello per cui quel metodo era stato messo a punto (*Vicia faba* per il metodo meccanico, *Tamarix africana* per il metodo chimico e *Cydonia oblonga* per il primo metodo enzimatico). Nessuno dei metodi precedenti ha avuto esiti positivi utilizzando foglie di leccio, nonostante i vetrini delle piante modello dessero risultati positivi. La non idoneità dei vetrini di leccio dipendeva o da un numero estremamente limitato di nuclei estratti per ottenere un'analisi quantitativa del danno (servono almeno 100 nuclei nel vetrino da sottoporre al saggio Comet) o dalla presenza dei tricomi e di un eccesso di residuo cellulare, che impedivano la lettura del vetrino al microscopio a fluorescenza.

Nel secondo anno di attività è stato perfezionato un metodo di rimozione dei tricomi: raschiatura gentile della pagina inferiore della foglia con lametta monouso per microtomo fredda utilizzando foglie congelate, successivo congelamento in azoto liquido ed infine agitazione per 2-3 minuti con *vortex* delle foglie congelate inserite in un provetta Falcon da 50 ml con polvere di ghiaccio secco. Inoltre, è stato messo a punto un nuovo metodo di estrazione enzimatica modificandolo a partire da un protocollo per l'estrazione di protoplasti da tessuti fogliari di *Quercus acutissima* (Wakita et al., 1992). I migliori risultati, in termini di numero e qualità dei protoplasti estratti, sono stati ottenuti macerando con una soluzione enzimatica contenente Cellulase "Onozuka" RS (2%) e Macerozyme (1%). La digestione è stata condotta per 48 ore a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ al buio i tessuti fogliari di leccio ridotti in pezzi in presenza di antibiotico (Claforan), dopo aver sottoposto il materiale ad un trattamento di vuoto molto delicato per favorire l'infiltrazione della soluzione di macerazione.

La *Comet assay* è stata condotta in accordo con Tice (2000). I protoplasti isolati sono stati sospesi in 5 microlitri di tampone PBS (1X). Dopo un trattamento di lisi della membrana è stata eseguita una corsa elettroforetica a 25 V e 300 mA per 20 minuti a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. I nucleoidi sono stati colorati con etidio bromuro (20 $\mu\text{g/ml}$) ed esaminati ad un analizzatore automatico di immagini (Comet Assay III, Perceptive Instruments, UK) collegato al microscopio a fluorescenza (Axioskop 2, Zeiss, Germania). ad un ingrandimento di 400x.

Dopo la messa a punto di questo metodo sperimentale nel corso del terzo anno verranno processati I campioni di leccio prelevati nell'esperimento presso il sito sperimentale di Curno come precedentemente dichiarato.

Prodotti della ricerca

Congressi:

- Fares, S. “Interazioni tra ecosistemi forestali mediterranei ed inquinamento urbano: rimozione di inquinanti dell’aria e impatto sull’assimilazione di carbonio”. Primo incontro su gli impatti dell’inquinamento atmosferico sugli ecosistemi naturali e antropici. ENEA, Roma, 23-24 gennaio 2014.
- Fares, S. “Ball-Berry vs Jarvis approaches to model stomatal ozone deposition in Mediterranean forests: validation using the test sites of Castelporziano and San Rossore forests.” 27th Task Force Meeting of the ICP Vegetation”. Parigi, Francia, 28-30 gennaio 2014.
- Fares S. Measuring and modeling ozone fluxes in Mediterranean forest ecosystems in Italy. 9th Air Pollution and Global Change Symposium Monterey, CA, USA 11-06-2014.
- Fares S. BVOC emissions and tropospheric ozone removal from crop and forest species. Presentazione su invito presso la sede del centro di Ricerca CzechGlobe, Brno, Repubblica Ceca. 07-09/01/2015.
- Fares S. Multiple interactions between anthropogenic pollutants, greenhouse gases and biogenic volatile organic compounds in a Holm oak peri-urban forest. Presentazione orale al meeting IUFRO 2015 International Congress on forest health. Nizza, 01-05 giugno 2015.
- Kuzminsky E., Meschini R., Silvestri C., Terzoli S., Pavani L., Scarascia-Mugnozza G. Convegno Internazionale IUFRO “Tree Biotechnology” Firenze 8-12 giugno 2015. Sessione Poster. “Protoplast isolation from leaf tissues of holm oak, a new tool for the study of DNA integrity”.

Articoli scientifici:

- Fares S., Paoletti E., Loreto F., Brillì F. 2015. Bi-directional flux of methyl vinyl ketone and methacrolein in trees with different isoprenoid emission under realistic ambient concentrations. *Environ. Sci. Technol.* doi: 10.1021/acs.est.5b00673. (IF=5.25).
- Fares S., Savi F., Muller J., Matteucci G., Paoletti, E. 2014. Simultaneous measurements of above and below canopy ozone fluxes help partitioning ozone deposition between its various sinks in a Mediterranean Oak Forest. *Agricultural and Forest Meteorology* 198-199: 181-191. doi:10.1016/j.agrformet.2014.08.014 (IF=3.89)

- Fares S., Loreto F. 2014. Isoprenoid emissions by the Mediterranean vegetation in Castelporziano. Accepted by Rendiconti lincei. DOI 10.1007/s12210-014-0331-z (IF=0.75)
- Savi, F., Fares, S., 2014. Ozone dynamics in a Mediterranean Holm oak forest: comparison among transition periods characterized by different amounts of precipitation. *Annals Of Silvicultural Research* 38, 1–6.

Tesi di laurea e laurea magistrale

- Tesi di Laurea magistrale della studentessa Liliana Pavani. Università degli Studi della Tuscia. Corso di Laurea Magistrale in “Scienze Forestali e Ambientali” (Classe LM-73), anno accademico 2013/14. “*Quercus ilex* L. nelle città del futuro. Comet assay, un saggio per la stima del danno al DNA in tessuti fogliari”. Relatore: Dr. Elena Kuzminsky, Correlatori: Dr. Roberta Meschini e Dr. Serena Terzoli.

WP2 – UR: UNIPA, UNIVERSITA’ DEGLI STUDI DI PALERMO

Responsabile: Dott. Vittorio Farina

TASK 2B

FLUSSI DI CO₂ DA SUOLO E RADICI

Le attività di ricerca condotte dell’U.R. di Palermo riguardano principalmente il Task 2B - Flussi di CO₂ da suolo e radici. In particolare la sperimentazione è stata incentrata sullo studio della respirazione del suolo e delle radici in piante di *Quercus ilex* ed è iniziata dalla metà del secondo anno quando le piante sono state poste in pieno campo. Di seguito si riportano brevemente l’insieme delle attività che precedono il trapianto delle piante in pieno campo che, pur rientrando nel WP1, sono preliminari allo studio previsto nel WP2.

La sperimentazione è iniziata sulle piante di leccio di due anni ottenute da seme prelevato in un areale definito dell’ambiente boschivo siciliano. Le piante, travasate in vasi di sette litri di volume, su substrato caratterizzato da una miscela composta da 70% sabbia, 20% torba bionda e 10% terra rossa, sono state poste in ambiente protetto. Dopo una prima fase di acclimatamento alle condizioni microclimatiche, sono state avviate le prove sperimentali di stress idrico. Gli obiettivi della prova sono stati quelli di studiare la risposta delle piante in condizioni di *stress* idrico lieve e forte e, al contempo, di studiare la risposta delle piante a condizioni di *stress* idrico breve o prolungato. Per quanto concerne il primo obiettivo la prova è stata articolata secondo lo schema seguente:

- Controllo (CC): piante mantenute costantemente alla Capacità di campo (100% ADM);

- Lieve *Stress* (LS): ripristino della CC una volta raggiunta la soglia del 60% della ADM;
- Forte *Stress* (FS): ripristino della CC una volta raggiunta la soglia del 30% della ADM.

Ad inizio prova è stato effettuato un campionamento distruttivo per la determinazione dei principali parametri biometrici quali: altezza, diametro, numero di foglie e peso della biomassa vegetale.

Il contenuto idrico del substrato è stato monitorato con cadenza giornaliera mediante uso di FDR Wet Sensor della Delta T Devices. Mensilmente è stata effettuata una concimazione azotata con somministrazione di 50 ml di soluzione contenente N sotto forma di solfato di ammonio in ragione di 5 ppm. Sempre con cadenza mensile sono stati rilevati i seguenti parametri: allungamento del germoglio, SPAD, scambi gassosi, WUE_{ph}. Con cadenza trimestrale sono stati determinati invece i seguenti parametri: RWC, potenziale fogliare (*steam water potential*), WUE_{dw}, allungamento del germoglio (RGR), fluorescenza, Fv/F₀, curva di risposta alla luce.

Parallelamente è stato effettuato un campionamento distruttivo per la determinazione della sostanza secca delle diverse componenti della pianta, della superficie fogliare e dei fotosintetati (zuccheri e/o carbonio).

Per quanto riguarda il secondo obiettivo lo schema sperimentale è stato così articolato

- Controllo: piante mantenute costantemente alla Capacità di campo (100% ADM);
- *Stress* breve (SB): ripristino alla CC una volta raggiunta la soglia di intervento del 60% della ADM.
- *Stress* prolungato (SP): portare al 60% della CC una volta raggiunta la soglia di intervento del 30% della ADM.

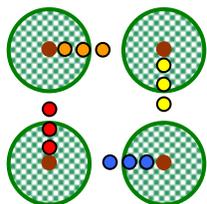
Il monitoraggio dei parametri è stato effettuato seguendo lo schema utilizzato per la prova di stress idrico lieve e forte.

Parallelamente ai trattamenti di *stress* idrico è stata studiata la risposta delle piante anche in funzione delle popolazioni endofitiche fungine e dello stato di micorrizzazione. In particolare per quanto concerne la valutazione dei microrganismi fungini endofiti in piante di *Q. ilex* apparentemente sane, sono stati effettuati saggi d'isolamento da piantine provenienti direttamente dal vivaio, prelevando foglie e rametti per ciascun semenzale. Si è proceduto quindi all'identificazione morfologica, avviando anche lo studio molecolare. A questa fase è seguito un campionamento durante e alla fine delle due prove di stress idrico per valutare le eventuali correlazioni tra micorrizzazione e risposta biometrica e fisiologica delle piante.

Esaurita la fase di studio in vaso, le piante sono state trapiantate in pieno campo in ambiente periurbano all'interno del parco della Fossa della Garofala (PA) per valutare la risposta

vegetativa in funzione dei livelli di stress subiti in vaso (WP1) e la relativa respirazione radicale (WP2).

Le misure di respirazione del suolo (radicale e microbica) sono state effettuate mettendo a dimora dei collari in PVC (diametro 110mm) secondo lo schema riportato in basso:



3 collari a pianta x plot composto da 4 piante = 12 collari per tesi

La respirazione del suolo è stata monitorata mediante l'utilizzo di un *Infra Red Gas Analyser* (EGM-4, PP Systems), accoppiato ad una camera per la respirazione del suolo di tipo SRC-1 (*Soil Respiration Chamber*) ed di una sonda STP (*Soil Temperature Probe*) per la rilevazione della temperatura del suolo che è stata applicata sui collari posti in campo durante le misure.

Per poter verificare l'andamento della respirazione del suolo è stato fatto un ciclo giornaliero di misure per individuare la respirazione minima e massima.

La respirazione del suolo (radicale e microbica) è stata determinata attraverso lo studio del flusso di CO₂ misurato a cadenza bisettimanale su collari in pvc disposti a distanza nota dalle piante, dal mese di gennaio 2015 al mese di aprile 2015. Durante questi mesi sono stati misurati i flussi minimi e i flussi massimi di respirazione radicale.

Al fine di correlare i dati ecofisiologici a quelli ambientali (umidità e temperatura del suolo), oltre alla sonda di temperatura del suolo di cui è dotata la strumentazione impiegata per la misura della respirazione, è stata installata presso il *plot* di piante di leccio prese in esame, una stazione meteo, dotata di sonde di temperatura dell'aria, RH, temperatura e umidità del suolo e di un pluviometro.

I risultati preliminari ottenuti durante i primi sei mesi di rilievi in campo, sembrerebbero non mostrare differenze significative tra le diverse tesi: i flussi di CO₂ hanno avuto picchi minimi di 4-5 g CO₂ m⁻² e massimi di 7-8 g CO₂ m⁻² giorno.

Con l'aumentare delle temperature verranno effettuati rilievi settimanali di respirazione del suolo (radicale e microbica) per verificare l'andamento dei flussi di CO₂ nelle varie tesi in corrispondenza della più spinta attività vegetativa delle piante. I rilievi continueranno nei prossimi mesi e per tutta l'annualità seguente.

Prodotti della ricerca

Congressi:

- G. Gianguzzi Giuseppe, M. Militello, G. Gugliuzza e V. Farina. Effetti dello stress salino su piante di *Quercus Ilex* L. allevate in vivaio. XII Convegno AISSA. Università degli Studi di Sassari Dipartimento di Agraria, 6-7 novembre 2014
- G. Piazza, M. Militello, L. Torta, G. Gugliuzza, V. Farina, S. Burruano. Osservazioni preliminari sullo stato di micorrizzazione in semenzali di *quercus ilex* l. sottoposti a stress idrico. Giornate tecniche SOI 2015: substrati di coltivazione per le produzioni ortoflorofrutticole e vivaistiche. 27-28 maggio 2015, Pescia.
- G. Piazza, L. Torta, S. Burruano, G. Liguori, G. Gugliuzza, M. Militello e V. Farina. Osservazioni preliminari sull'impiego di funghi arbuscolo micorrizici su piante di oleandro (*Nerium oleander* l.) e citrange (*Citrus sinensis* × *poncirus trifoliata* or *c. sinensis* × *c. trifoliata*) in ambito vivaistico. Giornate Tecniche SOI: biostimolanti, corroboranti, induttori di resistenza e micronutrienti nelle colture ortoflorofrutticole, 29-30 maggio 2014, Ancona.
- Piazza, G., Lo Piccolo, S., Torta, L., & Burruano, S. (2014). Preliminary observations on fungal endophytic community and mycorrhizal status in symptomless *Quercus ilex* seedlings. In XX Convegno Nazionale Società Italiana di Patologia Vegetale(S.I.Pa.V).

Tesi di laurea e laurea magistrale

- Tesi di laurea Magistrale 'Effetti dello stress salino su piante di *Quercus ilex* L. allevate in vivaio'. Giuseppe Gianguzzi, LM Scienze delle produzioni e delle tecnologie agrarie - Progettazione e gestione di parchi e giardini.

WP2 – UR: UNITS, UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

Responsabile: Prof. Mauro Tretiach

Le attività di UR-TS, svolte in parziale collaborazione con UR-PI, in questi primi due anni di studio si sono concentrate sui seguenti ambiti di indagine:

- valutazione dei fattori di rischio legati allo *stress* idrico in alberature urbane a *Quercus ilex* L. lungo un transetto nord ovest-sud est (NO-SE) nella città di Trieste;
- sperimentazioni preliminari di laboratorio che hanno come oggetto l'approfondimento di aspetti peculiari dell'ecofisiologia di *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, specie *target* per i trapianti;

- trapianti lichenici di *F. caperata* in due città, Trieste e Udine, con differenti fonti inquinanti e diverso mesoclima;
- caratterizzazione della risposta trascrittomica del fotobionte *Trebouxia* allo stress foto-ossidativo.

TASK 2A

EFFETTI SU MICROCLIMA URBANO

L'importanza dei fattori mesoclimatici nel determinare la distribuzione dei licheni in ambiente urbano è ancora largamente sottovalutata per la scarsità di dati sperimentali. Recenti esperimenti di trapianto suggeriscono che la disponibilità idrica può essere un fattore determinante per la sopravvivenza dei licheni nelle città. Questa attività di ricerca è finalizzata allo studio del ruolo del mesoclima e dell'inquinamento nella persistenza e ricolonizzazione dei licheni epifiti in ambiente urbano, con particolare interesse verso gli effetti della differente disponibilità idrica. A tale scopo erano stati inizialmente selezionati due centri urbani *target*, Udine e Trieste, ottenendo dagli uffici comunali di gestione del verde pubblico le mappe di distribuzione degli alberi, integrate da dati derivanti da numerose ispezioni in campo presso aree verdi di proprietà privata. Successivamente, nel corso della fase operativa, si è deciso di concentrare l'attenzione solamente sulla prima città nella quale, durante l'estate del 2014, era stata effettuata una campagna di rilevamenti delle comunità licheniche epifite. Al fine di operare un confronto a coppie tra la flora lichenica in siti con simili livelli di inquinamento atmosferico ma diversa umidità media dell'aria, dopo un'accurata analisi e selezione dei siti, sono state individuate due coppie di transetti paralleli, in corrispondenza di corsi d'acqua artificiali (rogge) e lontani da essi. Si è quindi proceduto con un attento studio della flora lichenica che è stato svolto principalmente su *Tilia* sp. (transetti 1 e 2, 42 forofiti totali), e su *Celtis australis*, (transetti 3 e 4, 21 forofiti totali), calcolando il Valore di Diversità Lichenica ("*Lichen Diversity Value*", LDV). Ai fini della caratterizzazione microclimatica sono stati inoltre collocati lungo i transetti 24 sensori di T e U.R. (*data logger*, EL-USB-2, Laskar Electronics Inc.). Per verificare i livelli di alterazione della qualità dell'aria in corrispondenza delle stazioni oggetto di studio, sono stati esposti, dal 12 al 19 febbraio 2015, campionatori passivi per NO₂, SO₂ (Radiello, Fondazione Salvatore Maugeri IRCCS) e per NO_x (Analyst, Aquaria S.r.l), di cui nelle prossime settimane saranno eseguite le analisi in cromatografia ionica e in spettrofotometria colorimetrica.

I risultati evidenziano l'esistenza di una marcata differenza in termini di diversità lichenica tra i transetti lontano dalle rogge rispetto a quelli a fianco di esse: i valori di LDV sono sempre superiori nelle stazioni dei transetti disposti lungo le rogge, con differenze medie prossime al 40%. Ad oggi non si è potuta ancora stabilire una diretta correlazione con la maggiore umidità atmosferica ipoteticamente presente in prossimità delle rogge in quanto i valori di umidità, registrati a partire dal luglio 2014, appaiono sostanzialmente omogenei in conseguenza dell'anomalo tasso di precipitazioni dell'estate in questione. Tuttavia, dall'analisi dei valori

registrati all'inizio di settembre, relativi a periodi di pochi giorni privi di pioggia, emerge comunque un tasso di umidità atmosferica superiore anche del 16% in alcune stazioni situate in prossimità delle rogge. Tali dati sembrerebbero attribuire, a parità di alterazione della qualità dell'aria, un ruolo significativo dell'umidità relativa nella diversa composizione delle comunità licheniche. Essendo necessario trovare ulteriori conferme a tale ipotesi, si è deciso di estendere l'indagine a una seconda città di pianura con condizioni macroclimatiche simili a quelle di Udine e caratterizzata dalla presenza di canali all'interno del tessuto urbano. Questa è stata identificata, dopo sopralluoghi effettuati a Padova e Treviso, nella prima di queste. Anche in questo caso è stata individuata una coppia di transetti, di cui uno orientato lungo il fiume Bacchiglione ed entrambi costeggiati da alberature pubbliche costituite da *Tilia* sp. La campagna di rilevamento dell'LDV verrà svolta nell'estate 2015, mentre è già stata effettuata la caratterizzazione degli inquinanti mediante campionatori passivi (vedi sopra) ed è attualmente in corso la caratterizzazione microclimatica.

Nel contempo, sono proseguite le ricerche bibliografiche sugli effetti del disseccamento sulla simbiosi lichenica e sui suoi *partner*, completando le elaborazioni di precedenti indagini, i cui risultati sono stati quindi oggetto di pubblicazione [Candotto Carniel *et al.*, submitted]

EFFETTI SU LICHENI

Al fine di approfondire alcuni aspetti dell'ecofisiologia di *F. caperata*, la specie lichenica che è stata selezionata per i trapianti, è stata avviata una serie di sperimentazioni di laboratorio che ha previsto l'esposizione di campioni lichenici in camere chiuse a diverse U.R. I risultati dimostrano che con U.R. superiori all'80% si ha l'attivazione del metabolismo anche in assenza di idratazione diretta con acqua liquida: i valori di fluorescenza (misurati con un fluorimetro Mini-PAM, *Walz*) indicano un rapporto diretto tra l'aumento dell' U.R. e l'attività degli apparati fotosintetici. Una seconda sperimentazione è poi servita ad approfondire le tempistiche di attivazione degli apparati fotosintetici nelle condizioni precedentemente testate.

Ad integrazione delle indagini ecofisiologiche, presso i laboratori dell'UR-PI sono stati condotti esperimenti volti a valutare l'effetto di differenti U.R. sull'integrità delle membrane della medesima specie campione, ma per ulteriori specifiche sulle ricerche effettuate, si rimanda alla relazione di quella UR. Tutti i dati ottenuti sono stati essenziali per la stesura dei protocolli da applicarsi ai trapianti lichenici, e sono stati quindi di notevole importanza per la successiva fase (ambito di indagine "3").

Dopo una attenta disamina della situazione ambientale, effettuata a Trieste, Udine e nelle relative province attraverso sopralluoghi in diverse stagioni e momenti della giornata, nonché mediante l'esposizione di sensori data logger, EL-USB-2 (*Laskar Electronics Inc.*), per misurare in continuo la T e l'U.R., sono stati selezionati 10 siti di esposizione. Otto di essi (quattro per ciascuna città) sono stati scelti in zone urbanizzate e due, più periferici, rappresentano il

controllo. In tali siti sono stati successivamente effettuati dei trapianti lichenici in due periodi dell'anno (febbraio-marzo e luglio-agosto 2014) per la verifica degli effetti delle condizioni climatiche e degli inquinanti sulla specie lichenica target *F. caperata*.

Porzioni di talli lichenici sono stati raccolti in un sito lontano da fonti note d'inquinamento del Carso Classico (Trieste) in una serie di campagne di campionamento effettuate nel novembre del 2013 che hanno permesso di accumulare sufficiente materiale per le esposizioni invernali ed estive. I campioni, dopo essere stati attentamente puliti e preparati, sono stati esposti su tronchi di tiglio (*Tilia sp.*).

Durante le settimane di esposizione, al fine di verificare le reali differenze microclimatiche nelle zone prese in esame, in ciascuno dei siti sono stati esposti due *data logger* precedentemente descritti e sono state inoltre effettuate ulteriori misure di luminosità, sia dirette - attraverso radiometri con sonda per luce PAR HD 2302.0 (*Delta Ohm*) - sia indirette attraverso foto *fish eye* della copertura della chioma che sono poi state elaborate attraverso appositi programmi. I dati relativi agli inquinanti sono stati invece ricavati (i) dalle centraline di monitoraggio della qualità dell'aria gestite da ARPA-FVG che sono prossime ai siti stessi e (ii) mediante l'esposizione di campionatori passivi (Radiello, *Fondazione Salvatore Maugeri IRCCS*) per l'O₃ effettuata nel periodo più caldo dell'estate.

Immediatamente prima e dopo l'esposizione dei campioni lichenici, sono state effettuate (i) le misure di efficienza degli apparati fotosintetici (misurazioni di fluorescenza della clorofilla *a* effettuate con un fluorimetro Mini-PAM, *Walz*); parallelamente è stato esposto anche il materiale selezionato per le analisi (ii) del rilascio di potassio per determinare l'integrità delle membrane (effettuate presso il Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche dell'Università di Trieste), e (iii) dei pigmenti fotosintetici e del contenuto di malondialdeide (attualmente in corso presso l'UR-PI).

I dati microclimatici raccolti confermano l'esistenza di un gradiente di U.R. dell'aria lungo i transetti individuati, che permette quindi di testare correttamente le ipotesi alla base della sperimentazione. Dai risultati delle analisi di fluorescenza e dell'integrità delle membrane si evidenzia che i fattori determinanti nella risposta di *F. caperata* alle condizioni di esposizione sembrano essere legati alle condizioni microclimatiche dei siti. Tuttavia, l'ipotesi secondo la quale l'aumento di temperatura e di episodi di siccità previsti da alcuni scenari per i prossimi decenni (Horizon 2050) nei periodi estivi alle nostre latitudini non si è potuta testare in quanto l'estate del 2014 si è rivelata, a differenza delle precedenti, particolarmente fredda e piovosa. Infatti, dopo le esposizioni, i campioni lichenici hanno mostrato una vitalità molto elevata e, contrariamente a quanto ci si aspettava, questa è risultata superiore a quella osservata dopo le esposizioni invernali.

Si prevede dunque di ripetere le esposizioni nel corso dell'estate del 2015. A questo fine nell'autunno 2014, sono state eseguite nuovamente sia la raccolta che la pulizia di ulteriori campioni di licheni.

Nel contempo, sono proseguite le ricerche bibliografiche sugli effetti delle sostanze inquinanti sulla simbiosi lichenica, e sono state completate le elaborazioni di precedenti indagini sugli effetti dell'ozono in dipendenza dell'idratazione, i cui risultati sono stati quindi oggetto di pubblicazione [Pellegrini *et al.* 2014, Bertuzzi *et al.*, submitted].

Prodotti della ricerca

Congressi:

- Panepinto F., Capozzi F., Craighero T., Tretiach M. (2014). Studio sui fattori limitanti la ricolonizzazione lichenica in ambiente urbano: il ruolo dell'umidità atmosferica. In: Munzi S. (a cura di), XXVII congresso della Società Lichenologica Italiana, Montecatini Terme, 15-17 ottobre 2014, Not. Soc. Lich. Ital. 27: 57. *Poster e abstract*.

Articoli scientifici:

- Candotto Carniel F., Zanelli D., Bertuzzi S., Tretiach M. Desiccation tolerance and lichenization: a case study with the aeroterrestrial microalga *Trebouxia sp.* (Chlorophyta). *Planta*, submitted (28/01/2015).

WP2 – UR: UNIROMA, UNIVERSITA' "LA SAPIENZA" DI ROMA

Responsabile: Prof. Fausto Manes

TASK 2A

MICROMETEOROLOGIA DEI FLUSSI DI MATERIA ED ENERGIA

Nell'ambito del WP2 UR-ROMA ha svolto una serie di attività propedeutiche per la strutturazione, messa in funzione e successivo avvio dell'attività della torre *Eddy Covariance* inizialmente prevista all'interno del sito urbano (Villa Ada) e programmata in collaborazione con UR-UNICATT per il secondo anno. Dopo aver effettuato diversi sopralluoghi, avvalendosi anche della collaborazione dell'UR-UNICATT, è stato individuato all'interno di Villa Ada un potenziale sito idoneo al posizionamento della torre. A tal fine le attività si sono concentrate sulla richiesta di preventivi presso ditte specializzate per la costruzione e la messa in opera della torre. Alla luce dei preventivi molto onerosi pervenuti (40-60 mila euro) e delle riduzioni apportate al finanziamento inizialmente richiesto. Tale problema discusso e approvato in via cautelativa durante il *kick-off meeting* tenutosi a Pisa il 07/02/2013, ha comportato una rimodulazione delle

attività in quanto la costruzione della struttura che doveva ospitare la tecnologia *Eddy Covariance*, appare economicamente insostenibile per l'UR-ROMA. Tuttavia un finanziamento ottenuto su fondi di Ateneo per l'acquisto di grandi attrezzature è stato finalizzato alle attività di tale progetto. L'UR-ROMA ha acquistato un analizzatore di particolato (Optical Particle Counter OPC, Multicanale, versione 4 Hz, TCR Tecora s.r.l per un costo pari a euro 36550,88). Tale strumento, all'avanguardia sia per la qualità del dato rilevato sia per la velocità di campionamento, è stato installato presso la torre periurbana di Castelporziano, gestita da UNITUS, per una breve campagna pilota, nell'ambito della quale verrà testato l'utilizzo di questo tipo di strumentazione per il calcolo dei flussi di particolato tra atmosfera e vegetazione mediante la tecnica *Eddy Covariance* in un ecosistema a *Quercus ilex*.

L'elaborazione dei dati risultanti dalla campagna pilota (Agosto – Ottobre 2014), è attualmente in atto. L'acquisizione di ulteriori dati di PM è in corso.

Attraverso l'elaborazione delle immagini telerilevate da satellite e la relativa restituzione cartografica delle principali tipologie vegetazionali presenti nell'area metropolitana romana, si è proceduto alla stima della rimozione di particolato atmosferico operata dagli ecosistemi a *Q. ilex* dominate che caratterizzano le foreste urbane e periurbane del territorio analizzato.

Sono stati inoltre raccolti e analizzati i dati di concentrazione di ozono troposferico (O₃) rilevati dalla stazione di monitoraggio ARPA LAZIO di Villa Ada, e dall'infrastruttura presente a Castelporziano e gestita da UNITUS.

Calcolando l'AOT40, una differenza tra siti e tra gli anni considerati (2013-2014) è subito evidente. In entrambi gli anni nel sito urbano di Villa Ada l'AOT40 CUM calcolato durante la stagione vegetativa (con radiazione > 50 W m²), supera il livello critico per la vegetazione forestale (LRTAP, 2004), e a Castelporziano è quasi il doppio di quello riscontrato nel il sito urbano. Questa differenza fa emergere il fatto che in ambito urbano numerose molecole *scavenger* dell'ozono entrano nel suo ciclo fotochimico, abbassandone la concentrazione. In particolare nel 2013 le concentrazioni di O₃ in entrambi i siti (VA = 8986.5 ppb h; CP = 20148.33 ppb h) è più bassa che nel 2014 (VA = 12418.5 ppb h; CP = 24396.08 ppb h).

Prodotti della ricerca

Articoli scientifici:

- Silli V., Salvatori E., Manes F., 2015. Removal of airborne particulate matter by vegetation in an urban park in the city of Rome (Italy): an Ecosystem Services perspective. *Annali di Botanica*, 5, 53-62.

- Manes F., Silli V., Salvatori E., Incerti G., Galante G., Fusaro L., Perrino C., 2014. Urban Ecosystem Services: tree diversity and stability of PM₁₀ removal in the Metropolitan Area of Rome. *Annali di Botanica*, 4, 19-26.

WP3: SIMULAZIONE DI UNO SCENARIO 2050 ATTRAVERSO L'APPLICAZIONE DI STRESS COMBINATI IN AMBIENTE CONTROLLATO

(Coordinatore: Dott. Filippo Bussotti)

L'obiettivo del WP3 è quello di studiare il comportamento di specie arboree selezionate nelle condizioni climatiche previste nelle città per il 2050 e, in particolare: aumento della temperatura diurna (circa 2 °C), aumento della temperatura notturna (circa 4 °C), aumento della CO₂, *stress* idrico e da ozono.

WP3 – UR: CNR FI, CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE DI FIRENZE

Responsabile: Dott. Massimiliano Tattini

Nel corso del progetto è stato condotto uno studio fisiologico, molecolare e biochimico sugli effetti di *stress* abiotici legati ai cambiamenti climatici in semenzali di *Quercus pubescens*, in particolare è stato valutato l'effetto dello *stress* idrico e/o da elevata temperatura. Riassumendo, a partire dall'anno 2013, al fine di studiare la risposta allo *stress* idrico nella specie *Q. pubescens*, sono stati utilizzati 13 semenzali di una stessa pianta madre (half-sib, ROV 1-13), di circa 2 anni; lo *stress* idrico è stato seguito nel tempo, partendo dal tempo 0 e sospendendo l'annaffiamento fino ad arrivare ad un picco di *stress* e alla successiva reidratazione. L'esperimento si è protratto per circa un mese (29/5-30/6/2013), con 2 cicli di *stress* idrico: nel primo (2-13/6/2013) sono stati monitorati 5 punti (tempo 0, *stress* lieve, *stress* severo, reidratazione parziale e completa), in modo da rilevare sia le variazioni precoci che quelle relative al picco dello *stress* della risposta genica e metabolica; il secondo (18-30/6/2013), di 3 punti (tempo 0, *stress* severo e reidratazione completa), è stato condotto con temperature ambientali più elevate (in media ca. +10°C), permettendo di considerare l'effetto della temperatura in aggiunta allo *stress* idrico imposto. Durante l'esperimento le piante sono state pesate quotidianamente al fine di stimare il contenuto idrico del terreno (AWC, *actual water content*). Inoltre, per ogni punto monitorato, sono stati misurati gli scambi gassosi di ciascuna pianta utilizzando un analizzatore all'infrarosso portatile (Li-Cor 6400) e l'RWC (*Relative Water Content*) fogliare. Per ogni punto, per almeno 4 piante, sono stati raccolti i composti organici volatili, VOCs (*Volatile Organic Compounds*), al fine di misurare la variazione nell'emissione di isoprene e di monoterpeni in relazione allo *stress* imposto. Per l'analisi dei metaboliti e l'analisi del trascrittoma i campioni fogliari raccolti sono stati immediatamente congelati in azoto liquido, prelevando rispettivamente 1 foglia da ciascuna delle 13 piante utilizzate e 1 da ciascuna delle 4 piante selezionate (ROV 3-6-8-9).

L'analisi del trascrittoma è stata condotta scegliendo 7 punti nella successione degli *stress*, relativi a entrambi gli esperimenti, ritenuti idonei al monitoraggio della variazione dell'espressione genica: i due punti iniziali (T01, T02), due punti di *stress* lieve (Tms1, Tms2), due di *stress* severo (Tss1, Tss2) e uno di reidratazione (Rw). L'RNA totale è stato estratto con il kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), il cui protocollo è stato messo a punto per ottenere concentrazioni di RNA da *Q. pubescens* sufficienti per le successive analisi. I campioni di RNA (2,4 µg ciascuno) sono stati inviati ad un servizio esterno (IGA, Udine) che ha verificato la buona qualità dell'RNA (mediante corsa su Bioanalyzer 2100 Agilent) ha proceduto alla costruzione delle librerie e al successivo sequenziamento. I dati del sequenziamento *paired-end* da 100 bp sono stati utilizzati per l'assemblaggio *de novo* che ha permesso la ricostruzione del trascrittoma della foglia, costituito di 96006 contig con una lunghezza media di 618 bp. I trascritti annotati mediante ricerca di omologia con le sequenze di 7 database pubblici (Uniprot, NR, RefSeq e KOGs presso NCBI, Pfam, InterPro e KEGG) sono stati 83065. Inoltre sono stati individuati 14202 marcatori microsatellite (SSR) e 18425 mutazioni puntiformi (SNP). Con le sequenze fiancheggianti i 14202 microsatelliti sono state disegnate 10864 coppie di primer; 20 di questi, scelti a caso, sono stati utilizzati per l'amplificazione via PCR con DNA estratto da due individui: 17 (85%) hanno prodotto frammenti di dimensione attesa ed è stata verificata e caratterizzata la loro variabilità mediante l'analisi di 8 individui di due popolazioni diverse. L'analisi delle dimensioni dei frammenti ha permesso di rilevare il polimorfismo di 11 marcatori. Analogamente sono stati validati 10 marcatori SNP mediante il clonaggio e il sequenziamento di frammenti derivati dai 4 genotipi utilizzati per la ricostruzione del trascrittoma. L'annotazione dei trascritti con la *Gene Ontology* (GO) ha permesso di effettuare l'analisi della variazione di espressione delle categorie funzionali nella successione degli *stress*; inoltre è stata condotta l'analisi dell'espressione differenziale dei geni in confronti tra coppie di condizioni relative a *stress* idrico e/o da elevate temperature. L'analisi dei metaboliti è stata condotta scegliendo i sette punti utilizzati per l'analisi del trascrittoma. I metaboliti analizzati sono stati: zuccheri, carotenoidi e polifenoli. Inoltre è stato analizzato l'ormone acido abscissico (ABA), la sua forma glicosilata (ABA-GE) ed i suoi cataboliti (acido faseico e di-idrofaseico, PA e DPA). L'estrazione è stata effettuata secondo protocolli standardizzati riportati in letteratura e gli estratti fogliari sono stati analizzati utilizzando le seguenti strumentazioni: HPLC-DAD, HPLC-RID e HPLC-MS-MS.

Nell'estate 2014 è stato condotto un altro esperimento su altri 12 semenzali di *Q. pubescens* di circa 3 anni per studiare l'effetto di uno *stress* severo da elevata temperatura e/o siccità analizzando piante ben irrigate (w), piante sottoposte a elevata temperatura ma ben irrigate (h), piante sottoposte solo a siccità (d) e piante sottoposte a caldo e siccità (hd). Su ciascuna pianta sono stati effettuate misure di scambi gassosi e sono stati raccolti i VOCs. Inoltre, da ciascuna pianta sono state prelevate foglie per le analisi genetiche e biochimiche. È in corso l'analisi dei trascrittomi [ottenuti dal sequenziamento dell'RNA totale estratto dalle foglie (RNASeq)] e dei metaboliti delle 4 condizioni suddette.

Prodotti della ricerca

Articoli scientifici:

- Brunetti C., Ferrini F., Fini A., Tattini M., 2014. New evidence for the functional roles of volatile and non volatile isoprenoids in stressed plants. *Agrochimica*, 58: 61-76
- Brunetti C., Guidi L., Sebastiani F., Tattini M., 2015. Isoprenoids and phenylpropanoids are key components of the antioxidant defense system of plants facing excess light stress. *Environmental and Experimental Botany*, 119: 54-62.
- Ferrini, F, Bussotti, F, Tattini, M, Fini, A. 2015. Trees in the urban environment: Response mechanisms and benefits for the ecosystem should guide plant selection for future plantings. *Agrochimica*, 58: 234: 246.
- Fini A., Guidi L., Giordano C., Baratto M.C., Ferrini F., Brunetti C., Calamai L., Tattini M., 2014. Salinity stress constrains photosynthesis in *Fraxinus ornus* more when growing in partial shading than in full sunlight: consequences for the antioxidant defence system. *Annals of Botany*, 114: 525-538.
- Fusaro L., Mereu S., Brunetti C., Di Ferdinando M., Ferrini F., Manes F., Salvatori E., Marzuoli R., Gerosa G., Tattini M., 2014. Photosynthetic performance and biochemical adjustments in two co-occurring Mediterranean evergreens, *Quercus ilex* and *Arbutus unedo*, differing in salt-exclusion ability. *Functional Plant Biology*, 41: 391-400.
- Tattini M., Loreto F., Fini A., Guidi L., Brunetti C., Velikova V., Gori A., Ferrini F., 2015. Isoprenoids and phenylpropanoids are part of the antioxidant defense orchestrated daily by drought-stressed *Platanus x acerifolia* plants during Mediterranean summers. *New Phytologist*, 307: 613-626
- Torre S., Tattini M., Brunetti C., Fineschi S., Fini A., Ferrini F., Sebastiani F., 2014. RNA-Seq Analysis of *Quercus pubescens* leaves: de novo transcriptome assembly, annotation and functional markers development.

WP3 – UR:UNIFI, UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE

Responsabile: Prof. Francesco Ferrini

Per quanto riguarda la simulazione delle condizioni climatiche è stato elaborato un progetto per la costruzione di celle bioclimatiche previste. Purtroppo l'Amministrazione Comunale non ci ha concesso il permesso alla loro costruzione in deroga al regolamento comunale. Di conseguenza, vista l'impossibilità di realizzare le serre bioclimatiche in tempi consoni alla durata del progetto

PRIN, è stata effettuata un'analisi della letteratura dalla quale è apparso chiaro che lo strumento più utilizzato per la valutazione degli effetti del cambiamento climatico sulle specie arboree sono le camere di crescita tradizionali. Le camere di crescita permettono di studiare gli effetti della variazione simultanea di più parametri climatici, nello specifico temperatura e concentrazione di CO₂. Seppur le camere climatiche tradizionali abbiano il principale difetto di utilizzare irraggiamenti e temperature giorno/notte costanti e pre-determinate (da qui la necessità originaria di costruire le serre climatizzate), si è ritenuto che esse possano essere idonee per il raggiungimento degli obiettivi progettuali stabiliti.

Le piante sono state perciò trasferite nelle camere climatiche per essere sottoposte alle misurazioni previste nel protocollo di ricerca.

Nei due anni sono state effettuate analisi approfondite riguardo agli effetti sulla ecofisiologia e sulla biochimica delle specie oggetto di ricerca, con interazioni anche con le altre UA del progetto, che hanno anche portato alla pubblicazione di alcuni lavori su riviste internazionali e la partecipazione ad alcuni convegni nazionali e internazionali.

Sono state reiterate alcune misurazioni relative agli effetti dello *stress* idrico controllato volto a identificare il grado di tolleranza alla siccità, e i meccanismi messi in atto per sopravvivere a periodi siccitosi, in tre specie autoctone di quercia, differenti per la persistenza delle foglie e per l'emissione di isoprenoidi volatili: *Quercus ilex*, *Quercus cerris* e *Quercus pubescens*. determinazione dei parametri fisiologici e biochimici, attualmente in corso di elaborazione, forniranno informazioni utili per identificare i meccanismi di risposta alla siccità messi in atto da ciascuna specie.

WP3 – UR: UNIPI, UNIVERSITA' DI PISA

Responsabile: Prof. Giacomo Lorenzini

Sulla base dell'andamento circadiano dei livelli di ozono (O₃) registrati in Toscana nell'estate 2012, di modelli previsionali inerenti l'incremento delle dosi al suolo di questo inquinante (20-25%) e dei consumi idrici di ogni specie arborea oggetto di studio, è stato simulato in ambiente controllato uno scenario climatico per le condizioni urbane e rurali prevedibili nel 2050. Piante del genere *Quercus* uniformi di circa 3 anni di età e 40 cm di altezza, acquistate presso un vivaio commerciale, sono state rinvasate a fine inverno 2013-2014 in contenitori (20 x 20 x 30 cm) con un miscuglio di sabbia e torba (1:2, in volume). Dopo due mesi, esse sono state disposte all'interno di *box* in *perspex* in presenza di aria filtrata, condizioni climatiche naturali (luce, umidità relativa e fotoperiodo) e di un adeguato approvvigionamento idrico. Dopo due settimane di adattamento, 80 individui per ciascuna specie (*Quercus ilex*, *Q. pubescens* e *Q. cerris*) sono stati selezionati (per taglia e grado di sviluppo) e sottoposti, per 77 giorni (da maggio ad agosto),

rispettivamente a (20 piante per specie per ogni trattamento): (i) *stress* da O₃ (80-100 ppb dalle 10.00 alle 15.00, ora solare), (ii) carenza idrica (approvvigionamento idrico quotidiano di circa 1/3 del totale evapotraspirato dalle piante di controllo ben irrigate), (iii) combinazione dei due agenti di *stress* (O₃ + carenza idrica) e (iv) aria filtrata e approvvigionamento idrico giornaliero pari al 100% dell'evapotraspirato (controllo).

La *performance* del processo fotosintetico (della seconda e terza foglia del secondo internodo) e lo stato idrico delle piante sono stati monitorati a cadenza settimanale mediante analisi degli scambi gassosi [Li-6400 (Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska, USA), CIRAS- 2 (PP- *systems*, USA)], di fluorescenza della clorofilla *a* (PAM 2000, Walz, Effeltrich, Germania) e del potenziale idrico fogliare stimato prima dell'alba [PDΨ_w Camera a pressione (PMS; *model 600 Pressure Chamber Instrument*, Indonesia)]. Dopo 28 e 77 giorni dall'inizio del trattamento, è stato determinato il profilo circadiano dei principali *marker* d'integrità dell'apparato fotosintetico nelle sue componenti fisiologiche (mediante le tecniche e le determinazioni sopra citate) e sono stati effettuati i campionamenti del materiale fogliare per le analisi biochimiche: valutazione del contenuto in pigmenti fotosintetici ed accessori, carboidrati solubili, prolina, acido abscissico (ABA), acido lipoico e malondialdeide (MDA) e misure di potenziale osmotico. A cadenza settimanale, è stata condotta un'indagine sulla presenza di sintomi fogliari. Al termine dell'esposizione, le piante sono state separate in foglie (in relazione all'età e alla presenza o meno di effetti macroscopici), fusti e radici ed è stato rilevato il peso fresco e secco delle singole parti. Ad oggi, i dati emersi dalle analisi condotte sulle piante di *Q. cerris* e *Q. ilex* sono stati completamente elaborati mediante un'analisi della varianza (ANOVA) ad una via, prendendo come unico fattore il trattamento. Diversamente, i risultati inerenti le piante di *Q. pubescens* fin qui analizzati, sono stati elaborati con un'ANOVA a due vie prendendo come fattori le due tipologie di *stress* (idrico e ozono).

Dopo 28, 33 e 47 giorni dall'inizio del trattamento, rispettivamente le piante di *Q. pubescens*, *Q. cerris* e *Q. ilex* sottoposte a carenza idrica (singolarmente e in combinazione con O₃) hanno manifestato dei sintomi fogliari in forma di necrosi marginali bifacciali di colore giallo-marrone localizzate sulle foglie più giovani completamente espanse. Alla fine della fumigazione, non sono stati osservati sintomi da O₃, ma tutte le piante (ad eccezione dei controlli) hanno mostrato una filloptosi marcata.

In *Q. cerris*, il profilo settimanale del processo fotosintetico risultava modificato. Già dopo due settimane di sperimentazione, lo scarso approvvigionamento in acqua determinava un calo della fotosintesi netta (A) rispetto ai controlli (-61 e -67%, rispettivamente nello *stress* idrico singolo e con O₃). Tale riduzione rimaneva costante per l'intera durata della prova ed era imputabile ad una concomitante chiusura degli stomi, come confermato dalla diminuzione della conduttanza stomatica [(g_s), -53% nello *stress* idrico singolo e con O₃]. Alle variazioni di tipo ecofisiologico potrebbero essere associate anche alterazioni a livello biochimico del processo fotosintetico: a partire dall'ottava settimana, la concentrazione intercellulare di anidride carbonica [CO₂ (C_i)]

non subiva variazioni statisticamente significative rispetto al controllo. Soltanto a partire dalla settima settimana di fumigazione, anche i soggetti esposti a O₃ mostravano un decremento costante e significativo dei livelli di A e g_s (-28 e -58% rispetto ai controlli), a dimostrazione di un'attivazione di un meccanismo di esclusione dell'inquinante (*avoidance*). Poiché nella settimana successiva i valori di C_i non differivano in maniera significativa da quelli del materiale mantenuto in aria filtrata, è evidente che il contaminante determinava anche un'alterazione a livello del mesofillo. In tutte le tesi, il rapporto tra fluorescenza variabile e fluorescenza massima (F_v/F_m) non mostrava variazioni significative per l'intera durata della prova: i valori rientravano nel *range* ottimale definito in letteratura per una pianta sana (0,80-0,86). Negli individui soggetti a carenza idrica, la resa quantica effettiva del PSII (Y) e il *quenching* fotochimico (qP) mostravano un decremento significativo rispetto ai controlli a partire dalla sesta settimana (Y: -20 e -25%, rispettivamente nello *stress* idrico singolo e con O₃; qP: -9 e -21%). I livelli di *quenching* non fotochimico (qNP) si presentavano più elevati rispetto ai controlli nelle piante che avevano subito solo *stress* idrico a partire dalla quarta settimana (+15%). Nei soggetti sottoposti a trattamento con l'inquinante, non sono riportate variazioni statisticamente significative dei valori di Y, qP e qNP rispetto al controllo.

Analoghe differenze tra i trattamenti emergevano anche dai risultati riferiti al 28° e 77° giorno. Lo *stress* idrico (singolo e combinato) comprometteva la *performance* della pianta già al primo tempo di analisi, alterando sia i livelli di PDΨ_w, MDA e prolina (più di 5 volte *vs* 3 volte più basse dei controlli; +11 *vs* +4%; +112 *vs* +45%, rispettivamente) che i profili circadiani dei parametri ecofisiologici. Già dopo 28 giorni, infatti, lo *stress* idrico (applicato singolarmente o in combinazione con O₃) induceva per tutto l'arco della giornata la riduzione di A (-65%) dovuta ad una limitazione sia stomatica (g_s: -67%) che biochimica (C_i mostrava valori analoghi ai controlli), così come diminuiva F_v/F_m e Y (-9 e -41%, rispettivamente) specialmente nelle ore pomeridiane. Nelle piante sottoposte ad O₃, risposte simili si osservavano solamente dopo 77 giorni di esposizione: -80% dei valori di PDΨ_w; +17% della concentrazione di MDA; i livelli della prolina (che risultavano più bassi dopo 28 giorni) incrementavano fino a quelli costitutivi; -68% di A e -70% di g_s (nelle ore più calde del giorno); C_i e F_v/F_m non cambiavano; -13% dei valori di Y (si osservava solamente una fotoinibizione). Alla fine del trattamento, l'effetto dello *stress* combinato risultava maggiore rispetto a quello idrico applicato singolarmente in termini di parametri biochimici, mentre il profilo circadiano della fotosintesi continuava ad essere alterato analogamente tra i due trattamenti a livello quali-quantitativo. Una risposta differenziale nei livelli di ABA è stata osservata tra le tesi durante l'estate ed è risultata strettamente collegata con l'andamento dei suoi precursori (neo- e violaxantina). Dopo 28 giorni di trattamento, il contenuto di questo fitormone incrementava solamente nelle piante sottoposte a carenza idrica (+143%), mentre un innalzamento dei livelli di neoxantina si osservava negli individui trattati con O₃ singolarmente e in combinazione (+15 e +31%, rispettivamente). Diversamente, alla fine dell'esposizione, la concentrazione di ABA aumentava nelle piante trattate con l'inquinante (singolo e combinato) (+250 e 24%, rispettivamente), mentre la violaxantina decrementava (-32

e -47%). In base alle analisi dei parametri biometrici, è stato osservato che lo *stress* idrico (singolo e combinato con O₃) influenzava negativamente il peso secco dell'intera pianta, con effetto marcato sulla parte epigea (fusti e foglie). L'O₃ determinava esclusivamente una riduzione a carico dell'apparato fogliare (in termini di numero e peso).

Anche le piante di *Q. ilex* hanno mostrato un minore accrescimento e una riduzione della produzione di biomassa secca se sottoposte a *stress* idrico (-60 e -46%, rispettivamente singolo e combinato con O₃), così come un'alterazione della *performance* fotosintetica riscontrata già dopo 14 giorni dall'inizio della prova. Lo scarso approvvigionamento idrico ha determinato un calo della A rispetto ai controlli (-60% nello *stress* idrico sia singolo che combinato con O₃), imputabile ad una concomitante chiusura degli stomi, come confermato dalla riduzione dei livelli di g_s (-62% nello *stress* idrico sia singolo che combinato). Anche i soggetti esposti a O₃ mostravano un decremento significativo di A (-27%) e g_s (-32%), ma solo dopo 21 e 28 giorni dall'inizio dell'esposizione, suggerendo l'attivazione di meccanismi di *avoidance*. La riduzione del tasso fotosintetico (più evidente negli individui sottoposti a carenza idrica) risultava imputabile ad un rallentamento dei processi carbossilativi piuttosto che ad una compromissione dell'apparato stesso. In tutte le tesi saggiate, F_v/F_m rientrava nel *range* ottimale definito per una pianta sana. Analogamente, dall'analisi del *quenching* emergeva (i) un decremento dello Y (con riduzioni significative per il materiale sottoposto a *stress* idrico e combinato pari a -27 e -21%) e (ii) un incremento del qNP già dopo 14 giorni di trattamento, a conferma di una spiccata capacità di attivare meccanismi fotoprotettivi. Le misure di PDΨ_w hanno confermato uno stato di sofferenza delle piante sottoposte ad uno scarso regime idrico in combinazione o meno con O₃, come avvalorato da: (i) forti accumuli di prolina in tutte le piante saggiate rispetto al controllo [nelle piante sottoposte a carenza irrigua singola e combinata (rispettivamente 1 e 6 volte superiori ai controlli)]; (ii) aumento del contenuto di ABA dovuto al trattamento con O₃ (singolo e combinato con *stress* idrico); (iii) incremento del contenuto in MDA esclusivamente nelle piante sottoposte a *stress* combinato (+23%).

Anche negli individui di roverella, come per leccio e cerro, i valori di PDΨ_w più negativi si manifestavano nelle piante sottoposte a *stress* idrico, indipendentemente dal trattamento con O₃ (-180%, al termine della prova). O₃ e carenza idrica, applicati singolarmente o in combinazione, risultavano in grado di ridurre significativamente l'assimilazione di CO₂ (-56, -32 e -69%, rispettivamente nello *stress* idrico, da O₃ e combinato); i due fattori agivano tuttavia indipendentemente in questa specie in quanto la loro interazione non induceva differenze significativamente apprezzabili per questo parametro. Sia l'O₃ che lo *stress* idrico riducevano significativamente la g_s, seppure la carenza idrica (indipendentemente dalla fumigazione con O₃) appariva il fattore maggiormente determinante per il suddetto decremento (-70, -52 e -74%, rispettivamente nello *stress* idrico, da O₃ e combinato). Il valore della concentrazione intercellulare di CO₂ si riduceva significativamente a seguito del trattamento con O₃ o in carenza idrica, ma la loro interazione non risultava significativa. Il water use efficiency (WUE, A/g_s)

differiva solo nelle piante sottoposte all'interazione dei due *stress* (-11%, rispetto al controllo). I restanti risultati degli scambi gassosi e le analisi di fluorescenza della clorofilla *a* sono oggetto di elaborazione statistica. Il peso secco totale, il rapporto parte epigea/ipogea ed il peso secco fogliare decrementavano nelle piante sottoposte a carenza idrica (-54, -44, e -71%, rispettivamente), ad O₃ (-24, -19 e -15%) e allo *stress* combinato (-64, -31 e -66%). Per quanto riguarda le analisi biochimiche, alla fine della prova il contenuto di MDA è risultato maggiore in tutte e tre le tesi rispetto ai controlli (+10, +11 e +31%, rispettivamente nello *stress* idrico singolo, *stress* da O₃ e *stress* idrico combinato con O₃), mentre la prolina è risultata incrementare soltanto negli individui sottoposti a *stress* idrico singolo e in combinazione con O₃ (+200% e +160%, rispettivamente). E' stato osservato un incremento di clorofilla (chl) *a*/chl *b* nelle piante stressate idricamente (+13%) e in quelle sottoposte a *stress* combinato (+7%), mentre non sono state rilevate differenze significative in termini di chl (*a+b*) e carotenoidi totali.

Al momento, le analisi del contenuto idrico relativo, della conducibilità elettrica, del potenziale osmotico e di crescita vegetazionale delle tre specie in esame sono oggetto di elaborazione statistica; per le analisi dei carboidrati non strutturali e dell'acido lipoico è in corso la messa a punto dei protocolli sperimentali.

ESPOSIZIONE ACUTA DI SPECIE QUERCINE A CARENZA IDRICA E OZONO

Nel mese di ottobre 2013, piante delle medesime specie dell'esperimento di esposizione cronica (*Q. ilex*, *Q. pubescens* e *Q. cerris*; 60 piante per specie), sono state sottoposte a: (i) *stress* da O₃ (200 ppb dalle 08.00 alle 13.00, ora solare), (ii) carenza idrica (approvvigionamento idrico quotidiano di circa 1/3 del totale evapotraspirato dalle piante di controllo ben irrigate), (iii) combinazione dei due agenti di *stress* (O₃ + carenza idrica) e (iv) aria filtrata e approvvigionamento idrico giornaliero pari al 100% dell'evapotraspirato (controllo).

E' stata utilizzata una cella climatica (dimensioni utili: 2,70 x 2,90 x 2,00 m), all'interno della quale i parametri ambientali sono stati mantenuti su valori impostati [20±1 °C, 85±5% di umidità relativa (U.R.), radiazione fotosinteticamente attiva 530 μmol m⁻² s⁻¹] attraverso sistemi automatici di controllo, e l'aria è immessa da un sistema forzato di filtraggio a carboni attivi. All'interno è collocata una camera di fumigazione in *perspex*, anch'essa ventilata (dimensioni 1,30 x 0,75 x 1,00 m), nella quale è possibile l'arricchimento controllato dell'aria, previamente filtrata, con O₃, mediante un idoneo meccanismo di insufflaggio e distribuzione.

La *performance* del processo fotosintetico delle piante è stata monitorata mediante analisi degli scambi gassosi e di fluorescenza della clorofilla *a* ai tempi: 0, 5 (fine fumigazione) e 24 h. All'inizio del trattamento, dopo 1, 2, 5, 8 e 24 h sono state effettuate delle analisi *in vivo* per determinare l'eventuale induzione della morte cellulare, così come la produzione di acqua ossigenata (H₂O₂) e anione superossido (O₂⁻). Agli stessi tempi, inoltre, è stato campionato del materiale fogliare per le analisi biochimiche programmate: determinazione della capacità

antiossidante e dei contenuti in specie reattive dell'ossigeno [ROS (H_2O_2 , O_2^-)], in ormoni [etilene (ET), ABA, acido salicilico (SA), acido jasmonico (JA)], in prolina, in MAP chinasi e in ossidi di azoto.

Al momento sono stati elaborati i primi dati riferiti alle risposte delle piante di *Q. ilex* sottoposte ad O_3 dove, alla fine del trattamento, non sono stati osservati danni visibili a livello macroscopico. Tuttavia, attraverso analisi microscopiche, si è registrata la presenza di danno e morte cellulare. L'induzione e la propagazione di questi fenomeni sembrano essere dovuti a: (i) l'attivazione del *burst* ossidativo con le produzioni bifasiche di H_2O_2 e O_2^- che mostravano un primo picco dopo 1 h dall'inizio del trattamento (+79 e +37%, rispettivamente rispetto ai controlli) ed un secondo dopo 8 h (+67 e +74%), con dei valori di H_2O_2 maggiori dei controlli osservati anche dopo 24 h (+64%); (ii) una regolazione ormonale della formazione delle lesioni indotte da O_3 con una significativa produzione di ET, JA e SA che mostravano un picco transiente nelle prime 2 h di prova (i livelli di ET erano più alti dei controlli del 50%, mentre quelli di JA e SA più di tre volte). Inoltre, ET mostrava un secondo picco dopo 8 h (+94%) e conservava valori più alti durante l'intera fase di recupero fino alle 24 h (+76%).

Ad oggi, i risultati delle analisi ecofisiologiche sono oggetto di elaborazione statistica; per la restante parte biochimica in laboratorio è in corso la messa a punto dei protocolli sperimentali.

Prodotti della ricerca

Congressi:

- Cotrozzi L., Remorini D., Pellegrini E., Lorenzini G., Massai R., Nali C., 2014. Response of *Quercus cerris* to combined ozone and drought stress. ICP Vegetation – 27th Task Force Meeting and ozone workshop. 28–30 gennaio, Parigi, Francia. *Presentazione orale e abstract*.
- Cotrozzi L., Campanella A., Pellegrini E., Nali C., Lorenzini G., 2014. Responses to ozone toxicity of two Italian *Fraxinus excelsior* provenances. 46th Air Pollution Workshop. 6-10 aprile, Guadalajara, Messico. *Presentazione orale*.
- Cotrozzi L., Remorini D., Pellegrini E., Lorenzini G., Massai R., Nali C., 2014. How sensitive is *Quercus cerris* to combined ozone and drought stress? 1st Workshop MEDiterranean STRESS: The impact of environmental stress on Mediterranean trees. 19-21 maggio, Birmensdorf, Zurigo, Svizzera. *Presentazione orale*.
- Landi M., Pellegrini E., Cotrozzi L., 2014. Plasticity of physiological and biochemical traits can assist oak species under drought and ozone in Mediterranean environment. FISV 2014 XIII Congress. 24-27 settembre, Pisa, Italia. *Poster*.

- Cotrozzi L., Pellegrini E., Lorenzini G., Massai R., Nali C., Remorini D., 2015. Evolution of ozone and drought stresses, singly or combined, in *Quercus cerris*. 28th Task Force Meeting ICP Vegetation. 3-5 febbraio, Roma, Italia. *Presentazione orale e abstract*.
- Pellegrini E., Campanella A., Tonelli M., Nali C., Lorenzini G., 2015. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in *Liriodendron tulipifera* plants exposed to ozone. 28th Task Force Meeting ICP Vegetation. 3-5 febbraio, Roma, Italia. *Presentazione orale e abstract*.
- Cotrozzi L., Tonelli M., Campanella A., Pellegrini E., Trivellini A., Remorini D., Vernieri P., Massai R., Lorenzini G., Nali C., 2015. The role of signaling molecules in ozone-induced cell death in *Quercus ilex*. POG 2015. 24-26 giugno 2015, Verona, Italia. *Poster*.

Articoli scientifici:

- Cotrozzi L., Pellegrini E., Campanella A., Nali C., Lorenzini G., 2015. Leaf functional traits of two provenances of *Fraxinus excelsior* exposed to ozone: secondary metabolites could play a key role in the response of urban forests to climate change? *In progress*.
- Cotrozzi L., Remorini D., Pellegrini E., Landi M., Massai R., Nali C., Guidi L., Lorenzini G., 2015. Plasticity of physiological and biochemical traits can assist oak species under drought and ozone in Mediterranean environment. *Submitted*.
- Fini A., Guidi L., Giordano C., Baratto M.C., Ferrini F., Brunetti C., Calamai L., Tattini M., 2014. Salinity stress constrains photosynthesis in *Fraxinus ornus* more when growing in partial shading than in full sunlight: consequences for the antioxidant defence system. *Annals of Botany*. DOI: 10.1093/aob/mcu130.
- Lorenzini G., Nali C., 2014. A challenging job: Plant pathology in the urban environment. *Agrochimica*, Vol. 58: 206-221.
- Lorenzini G., Nali C., Pellegrini E., 2014. Summer heat waves, agriculture, forestry and related issues: an introduction (*Editorial*). *Agrochimica*, Vol. LVIII – *Special Issue*: 3-19.
- Lorenzini G., Pellegrini E., Campanella A., Nali C., 2014. It's not just the heat and the drought: the role of ozone air pollution in the 2012 heat wave. *Agrochimica*, Vol. LVIII – *Special Issue*: 40-52.
- Luvisi A., Lorenzini G., 2014. RFID-plants in the smart city: Applications and outlook for urban green management. *Urban Forestry & Urban Greening*, 13: 630-637.
- Pellegrini E., 2014. PSII photochemistry is the primary target of oxidative stress imposed by ozone in *Tilia americana*. *Urban Forestry & Urban Greening*, 13: 94-102.
- Tattini M., Loreto F., Fini A., Guidi L., Brunetti C., Velikova V., Gori A., Ferrini F. 2015. Isoprenoids and phenylpropanoids are part of the antioxidant defense orchestrated daily by drought-stressed *Platanus × acerifolia* plants during Mediterranean summers. *New Phytologist*. DOI: 10.1111/nph.13380.

Tesi di laurea e laurea magistrale:

- “Piante e cambiamento climatico: risposte ecofisiologiche di *Quercus cerris* a ozono e carenza idrica” – Ludovica Ricottone, Progettazione e Gestione del Verde Urbano e del Paesaggio, Università di Pisa (LM).
- “*Quercus* spp.: un caso di studio per la valutazione degli effetti combinati della carenza idrica e di fumigazioni croniche con ozono” – Elisa Garramone, Scienze Agrarie, Università di Pisa (L).
- “Risposte ecofisiologiche e biochimiche di *Quercus ilex* a ozono e carenza idrica” – Ilaria Mancini, Progettazione e Gestione del Verde Urbano e del Paesaggio, Università di Pisa (LM).
- “Risposte biochimiche di specie quercine a ozono e carenza idrica” – Francesca Alderighi, Progettazione e Gestione del Verde Urbano e del Paesaggio, Università di Pisa (LM).

WP3 – UR: UNIROMA, UNIVERSITA’ “LA SAPIENZA” DI ROMA

Responsabile: Prof. Fausto Manes

Le attività antropiche hanno aumentato notevolmente l'input di azoto (N) reattivo nell'atmosfera, sottoforma di NOx e NHx, aumentando le deposizioni secche ed umide di azoto e la sua disponibilità per gli ecosistemi forestali naturali e nelle aree urbane, dove a causa del traffico veicolare e delle attività industriali, vi è un elevato livello di emissioni di NOx (NOx = NO + NO₂). L'effetto delle deposizioni azotate sulla biodiversità è stato documentato mediante esperimenti di lungo termine, mentre poche sono le informazioni riguardanti gli effetti sulla funzionalità della vegetazione. Analizzare gli effetti delle deposizioni azotate su tali aspetti può dare un notevole contributo alla comprensione di come la vegetazione in aree naturali o metropolitane, risponde alle condizioni crescenti di multi *stress* a causa dei cambiamenti climatici in atto.

In questo ambito è stato condotto l'esperimento dall'UR UNIROMA, volto a valutare come la specie *Quercus ilex* L., che riveste una notevole importanza nell'ambito della vegetazione urbana, risponde alle deposizioni azotate e come queste influenzano la risposta allo *stress* idrico. A partire dalle informazioni attualmente disponibili e gli *output* dei modelli previsionali riguardanti le deposizioni azotate nel Bacino del Mediterraneo, si è scelto di trattare piante di *Q. ilex* con una quantità pari a 30 kg di N ha yr⁻¹. 28 piante di età e dimensione uniforme, sono state poste in vasi da 14 L e dopo un periodo di adattamento di circa trenta giorni, sono state divise in

set diversi, seguendo un disegno sperimentale in cui i fattori testati, sono stati azoto (N) e acqua (W). Durante il periodo sperimentale (90 giorni) la dose di N stabilita è stata somministrata in trattamenti settimanali, aggiungendo azoto in forma di NH_4NO_3 all'acqua di irrigazione. L'esperimento è stato diviso in due fasi: I - erano presenti due set sperimentali: *set* di piante irrigate a capacità di campo, che non hanno ricevuto azoto (C), e piante che sono state irrigate e trattate con una soluzione azotata (N). II - dopo 60 giorni il regime di irrigazione è stato differenziato (con acqua, +W; *stress* idrico -W): i *set* C e N, sono stati divisi in due *subset* sperimentali e sottoposti ai seguenti trattamenti: *set* di controllo, piante non trattate con azoto e irrigate, (-N+W); *set* non trattato con azoto e non irrigato (-N-W); *set* con arricchimento in azoto e irrigato (+N+W); *set* con arricchimento in azoto e non irrigato (+N-W). Misure distruttive sono state effettuate ad inizio e fine dell'esperimento, permettendo di calcolare il tasso di accrescimento relativo per i vari trattamenti per l'intero periodo sperimentale, e la ripartizione della biomassa calcolando i rapporti tra biomassa fogliare, del fusto, e delle radici e la biomassa totale. Il rapporto tra area fogliare (L_a , m^2) e area conduttrice (S_w , m^2) è stato inoltre determinato per valutare l'effetto dei trattamenti sull'architettura idraulica di *Q. ilex*.

Alla fine dell'esperimento è stato misurato il contenuto di azoto fogliare. L'effetto dei trattamenti sui parametri funzionali è stato valutato tramite misure eco fisiologiche (scambi gassosi, fluorescenza della clorofilla *a*) eseguite a cadenza quindicinale (Fase I), e settimanale durante la fase di *stress* idrico (Fase II). Nella Fase II, al fine di valutare l'intensità dello *stress* idrico imposto, per ogni data di campionamento sono state eseguite misure di potenziale idrico fogliare di *pre-dawn*. Diversamente da quanto atteso la quantità di azoto totale al livello fogliare non è aumentata. La biomassa in foglie, fusti e radici cambia in seguito al trattamento azoto, aumentando, come anche il rapporto area fogliare superficie conduttrice (L_a/S_w , m^2m^{-2}). In *Q. ilex* l'azoto non ha nessun effetto sugli scambi gassosi, e le variazioni rispetto al controllo, che per P_n e g_s sono comprese tra il 5 e il 10 %, non sono significative. Lo *stress* idrico influisce sui parametri analizzati diminuendo la P_n e la g_s e, la *water use efficiency* aumenta nei *set* -W. Le piante trattate con azoto (+N-W) per *stress* idrico moderato ($\Psi_{PD} \sim -1$ MPa) mantengono valori di g_s e tassi di assimilazione maggiori rispetto al solo *stress* idrico (-N-W). In una seconda fase di *stress* idrico marcato ($\Psi_{PD} \sim -2$ MPa) la riduzione del tasso di assimilazione e della g_s è maggiore nel *set* +N -W rispetto a -N -W. Questo effetto può essere dovuto al fatto che l'arricchimento in azoto ha influito sulle relazioni idriche di questa specie, causando un aumento della superficie traspirante (*Leaf area*) e determinando così una maggiore suscettibilità in periodi prolungati di *stress* idrico. L'efficienza dei fotosistemi non cambia in risposta dell'arricchimento in azoto (Fase I), e cambia solo per *stress* idrici elevati (Fase II), diminuendo la funzionalità sia al livello degli accettori primari della catena di trasporto, che quelli finali.

Questo risultato è in linea con la marcata diminuzione del tasso di assimilazione. L'interazione tra i trattamenti invece emerge unicamente per *stress* idrici moderati, quando si verifica un aumento della performance complessiva dei fotosistemi (*Performance Index Totale*, PI_{TOT}) nel

+N-W rispetto al solo *stress* idrico. Dall'esperimento condotto si può concludere che gli effetti dell'aumentata disponibilità di azoto sui parametri funzionali e in risposta allo *stress* idrico, possono essere riconducibili ad un cambiamento nella ripartizione della biomassa determinata dalla maggiore disponibilità di azoto.

WP3 – UR: UNICATT, UNIVERSITA' CATTOLICA DEL SACRO CUORE DI BRESCIA

Responsabile: Prof. Giacomo Gerosa

Nell'ambito del WP3, l'Unità di Ricerca dell'Università Cattolica (UNICATT) ha ideato e condotto, presso la stazione sperimentale di *Open-Top Chambers* (OTC, serre a cielo aperto) di Curno (BG) che ha in gestione da diversi anni, un esperimento in condizioni di ambiente controllato su piante di *Quercus robur* e *Carpinus betulus*. Il sito sperimentale è dotato di tutta la strumentazione necessaria per la rilevazione e l'acquisizione in continuo delle principali variabili agro-meteorologiche (T, UR, PAR, SWC etc.) sia all'interno delle singole OTC che all'esterno di esse, e consente di esporre la vegetazione a diversi livelli di ozono, variando contemporaneamente altri fattori di *stress* abiotico che si ritengono particolarmente significativi in relazione agli scenari futuri di cambiamento climatico.

Metodologia

L'esperimento è stato condotto fra i mesi di marzo e ottobre 2013. Centoventi giovani piante (3 anni di età) di *Quercus robur* (farnia) e *Carpinus betulus* (carpino bianco), omogenee per dimensioni e provenienza, collocate in vaso (30 cm di diametro, 19 L) nel 2012, sono state suddivise in 12 OTC secondo un disegno sperimentale split-plot a 3 blocchi randomizzati e 2 fattori: la concentrazione di ozono troposferico è stata scelta come fattore principale, mentre la deposizione azotata come fattore annidato. Per simulare scenari futuri di cambiamento climatico sono stati applicati 4 livelli di ozono: -40% della concentrazione ambientale in OTC filtrate (CF-OTC), -5% in OTC non filtrate (NF-OTC), +30% e +74% della concentrazione ambientale in OTC arricchite con ozono (NF+30% e NF+74% rispettivamente). Questi trattamenti sono stati replicati 3 volte. All'interno di ciascun trattamento di ozono sono stati applicati 2 livelli di deposizione azotata mediante 6 irrigazioni mensili con una soluzione di nitrato di ammonio (NH_4NO_3) fino a raggiungere $70 \text{ kg di N} \cdot \text{ha} \cdot \text{y}^{-1}$ (+Ndep) su metà delle piante, e con acqua di irrigazione della rete idrica (controllo, -Ndep) sull'altra metà.

Durante la stagione vegetativa è stato effettuato il monitoraggio in continuo dei principali parametri agrometeorologici e della concentrazione di ozono all'interno delle OTC. Inoltre sono state effettuate misure fogliari di conduttanza stomatica (g_s) con un porometro a diffusione dinamica AP4 (Delta-T Devices LTD, UK) con cadenza bisettimanale (3 cicli giornalieri durante

ciascun giorno di misura), e sono state rilevate le curve di risposta dell'assimilazione di CO₂ da parte delle piante in funzione della concentrazione interna di CO₂ (curve A/Ci) per determinare alcuni parametri chiave della performance fotosintetica (V_{cm_{max}}, Respirazione, A_{max}). Queste ultime misure sono state effettuate una volta al mese a giugno, luglio e settembre 2013, con una gas-exchange analyzers CIRAS 2 (PPsystems, USA) sulle piante dei trattamenti CF-OTC e NF+74%.

Alla fine della stagione vegetativa (metà ottobre 2013) analisi distruttive compiute sulle singole piante hanno permesso di stimare l'effetto dei due *stress* (da soli e in combinazione) sulla produzione di biomassa totale.

Risultati

Come era lecito supporre, il solo aumento delle deposizioni azotate (nel trattamento con i livelli di ozono più bassi, CF) ha causato un generale effetto positivo sulla produzione di biomassa in entrambe le specie. Questo incremento è stato particolarmente intenso in *Carpinus betulus* (+76% come biomassa totale, +65% come biomassa radicale).

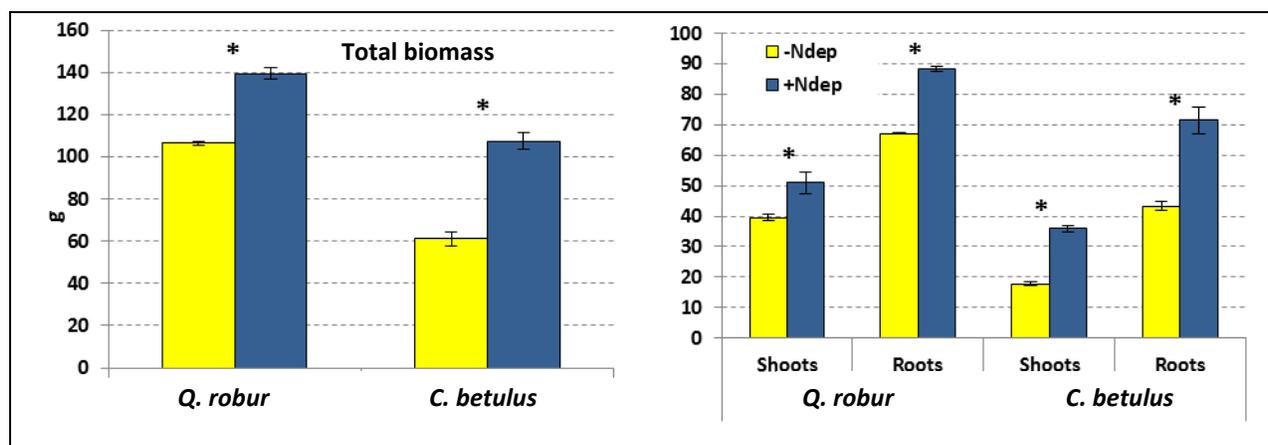


Figura 1 – Effetto dell'aumento di deposizione azotate sulla biomassa totale (e sulla biomassa di fusto e radici) di *Q. robur* e *C. betulus*. Sono state considerate solo le piante del trattamento CF (ozono filtrato). Le barre rappresentano l'errore *standard*. Gli asterischi indicano la significatività della differenza fra piante trattate con azoto (+Ndep) e piante di controllo (-Ndep) calcolata col test ANOVA.

Senza l'aumento della deposizione azotata (piante -Ndep), *Quercus robur* ha mostrato una risposta più forte all'ozono rispetto a *Carpinus betulus*, con una riduzione del 10 e del 18% rispettivamente della biomassa totale (Figura 2a) e della biomassa radicale (Figura 3) nel trattamento NF+74%, rispetto al trattamento di controllo (CF). Lo stesso effetto è stato trovato

nelle piante della stessa specie soggette al trattamento +Ndep (-15% per la biomassa totale, -16% per la biomassa radicale, Figura 3).

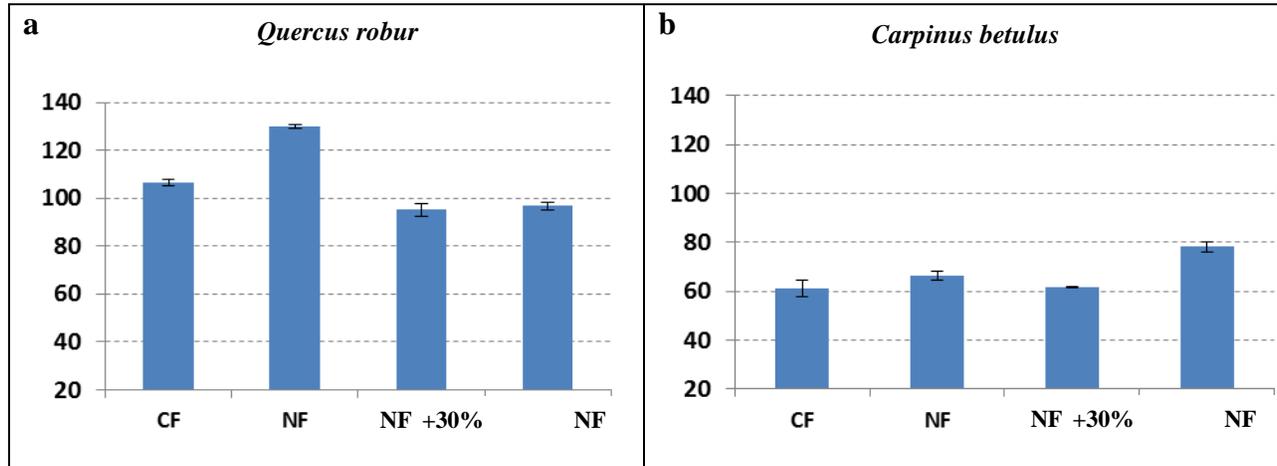


Figura 2 – Biomassa totale (espressa in grammi) rilevata al termine dell'esperimento in *Quercus robur* e *Carpinus betulus* nei diversi trattamenti di ozono applicati. Sono state considerate solo le piante controllo del trattamento azotato (-Ndep). Le barre rappresentano l'errore *standard*.

Al contrario il carpino in assenza di trattamento azotato è soggetto ad un incremento di biomassa per effetto dell'aumento di ozono (+5% della biomassa totale, Figura 4). Inoltre il trattamento +Ndep ha reso le piante di carpino più suscettibili all'effetto dell'ozono, con un effetto negativo sulla biomassa che nel trattamento NF+74% ha portato ad una riduzione del 25% circa sia sui fusti che sulle radici.

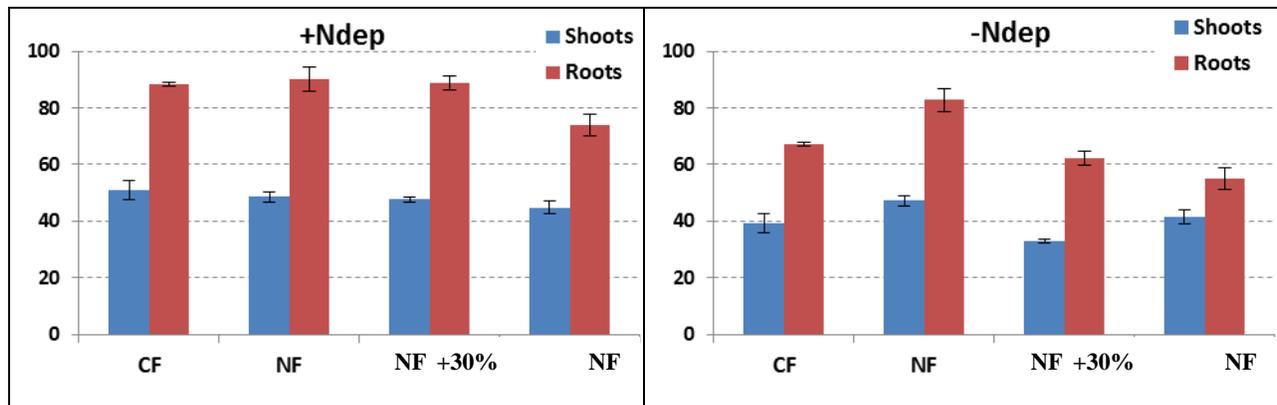


Figura 3 – Effetto dell'ozono sulla biomassa di fusto e radici (esprese in grammi) in piante di *Quercus robur* trattate con e senza azoto (+Ndep e -Ndep rispettivamente). Le barre rappresentano l'errore *standard*.

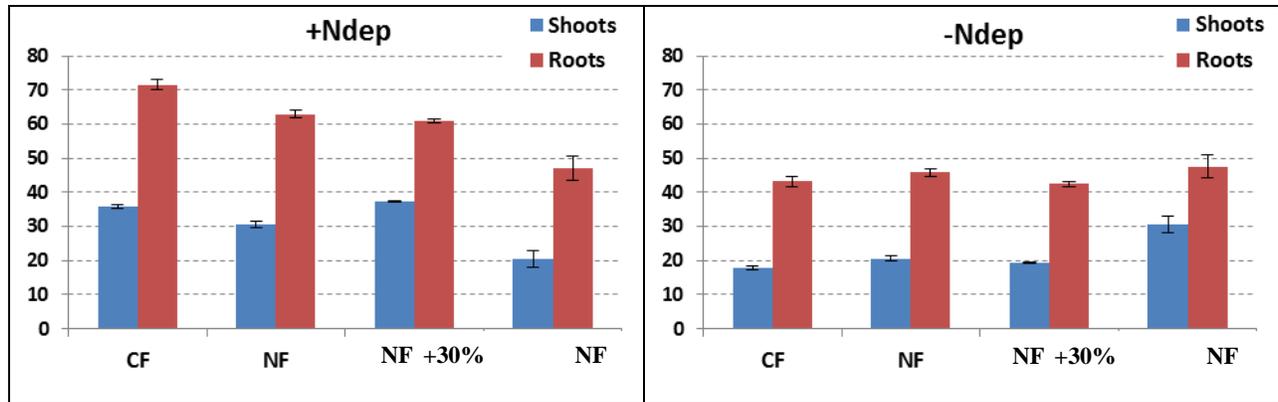


Figura 4 – Effetto dell’ozono sulla biomassa di fusto e radici (esprese in grammi) in piante di *Carpinus betulus* trattate con e senza azoto (+Ndep e –Ndep rispettivamente). Le barre rappresentano l’errore standard.

Poiché la conduttanza stomatica è considerata un fattore chiave per la comprensione della risposta all’ozono da parte della vegetazione, l’analisi dei valori medi di g_s riscontrati durante la stagione si è rivelata particolarmente importante. Le piante di *Quercus robur* cresciute in OTC-NF+74% infatti hanno fatto rilevare un decremento medio del 21% della g_s (Figura 5a) manifestando poi a fine stagione una perdita in biomassa totale del 10% rispetto alle piante cresciute in CF-OTC.

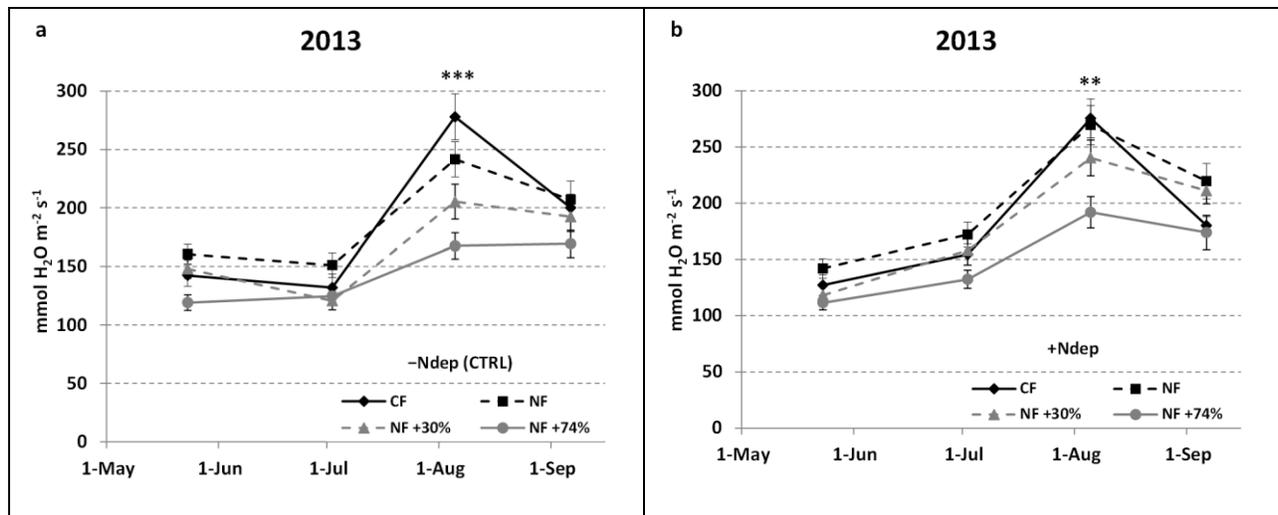


Figura 5 – Andamento della conduttanza stomatica in *Quercus robur* nei diversi trattamenti di ozono applicati. Le barre rappresentano l’errore standard. Gli asterischi indicano la significatività della differenza fra i due trattamenti di ozono più differenti (CF e NF+74%) calcolata con il test ANOVA.

Questo effetto si è confermato anche nelle piante della stessa specie trattate con aggiunta di deposizioni azotate (Figura 5b, +Ndep) nelle medesime OTC, sebbene i trattamenti di ozono intermedi (NF e NF+30%) mostrino un decremento della g_s di minore entità.

Nelle piante di carpino non soggette a deposizione azotata, l'ozono ha causato solo una lieve riduzione della g_s e di conseguenza della dose stomatica di ozono assorbita. Al contrario, le piante cresciute in OTC CF, trattate con aggiunta di azoto (piante +Ndep) hanno mostrato un significativo incremento della g_s (+23%, Figura 6) e della dose stomatica assorbita, suggerendo perciò l'ipotesi che le piante +Ndep esposte ai livelli più elevati di ozono (NF+74%), manifestino un danno ossidativo irreparabile in grado di sovrastare le difese biochimiche e fisiologiche (capacità di detossificazione), con un conseguente significativo decremento della biomassa totale (-30%).

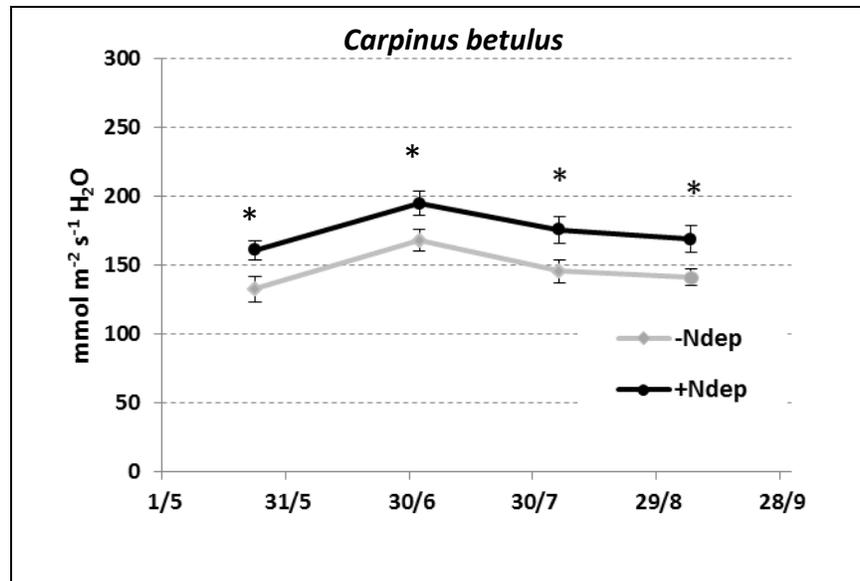


Figura 6 – Effetto del trattamento azotato su piante di *Carpinus betulus* cresciute in OTC filtrate (piante CF). Le barre indicano l'errore *standard*. Gli asterischi indicano la significatività della differenza calcolata col *test* ANOVA.

La risposta all'ozono da parte delle piante sembra perciò fortemente guidata dal comportamento stomatico, ma in ultima analisi la capacità di detossificazione legata ai sistemi di difesa cellulare è in grado di modulare la manifestazione del danno.

L'effetto generale di una diminuzione della g_s causata da elevate concentrazioni di ozono (riscontrata anche in altri esperimenti) ha evidenziato inoltre la necessità di includere una specifica funzione limitante ($f(O_3)$) nei modelli di g_s che sono stati definiti per queste due specie nell'ambito del WP4. E' tuttavia necessario sottolineare che esperimenti su lungo termine potrebbero aiutare a comprendere meglio l'effetto combinato dei due *stress* applicati.

WP3: COLLABORAZIONE FRA UNICATT, UNITUS E UNIROMA

Sempre nell'ambito del WP3, con particolare riferimento al *task* 3a, è stato allestito e condotto, in una collaborazione fra UNICATT, UNITUS e UNIROMA, un esperimento di esposizione di giovani piante di leccio agli stessi livelli di ozono impiegati per carpino e quercia, allo scopo di:

- i) studiare gli effetti dell'ozono sulla crescita in biomassa a diversi livelli (radici, fusto, foglie) di *Quercus ilex*;
- ii) determinare delle relazioni esposizione-danno basate sull'AOT40 e dose-danno basate sulla dose di ozono fitotossica (POD, Phytotoxic Ozone Dose) e il calo in biomassa;
- iii) caratterizzare e valutare l'effetto dell'ozono sugli apparati fotosintetici delle piante.

CONTRIBUTO UNIROMA

L'attività sperimentale che ha visto la collaborazione tra UR UNITUS E UNIROMA, aveva l'obiettivo di studiare la risposta l'effetto che l'esposizione acuta all'ozono troposferico (O₃) ha su tratti morfo-funzionali nella specie *Quercus ilex* L.

L'esperimento è stato effettuato utilizzando 20 piante, di età e dimensione uniforme, sono state poste in vasi da 14 L e posizionate all'interno di camere *walk-in* presenti all'interno del giardino sperimentale del Dipartimento di Biologia Ambientale. Dopo un periodo di adattamento di due settimane, le piante sono state divise in due *set* sperimentali e posizionate in due camere *walk-in*: una camera di controllo, in cui le piante non hanno subito nessun trattamento (C), e una di fumigazione (F), dove sono state trattate con O₃ per 12 giorni, per 5 ore al giorno ad una concentrazione di 150 ppb ora. Al termine dell'esperimento le piante di controllo sono state sottoposte ad un trattamento *shock* (300 ppb h di O₃). Entrambi i gruppi di piante sono state irrigate a piena capacità di campo.

Le fumigazioni con O₃ sono state effettuate in una camera *walk-in* appositamente predisposta facendo fluire ossigeno a contatto con una lampada UV (Helios Italquartz, Milan, Italy), e poi l'O₃ così generato è stato convogliato, attraverso un tubo di teflon, nella camera. La concentrazione di O₃ all'altezza della chioma delle piante è stata continuamente monitorata con un ozonometro (Model 205, 2B Technologies, Boulder, CO, USA). In ogni camera le piante sono state spostate giornalmente in modo random in modo da evitare qualunque effetto dovuto alla posizione all'interno della camera di crescita. Per quantificare l'esposizione all'O₃ è stato calcolato l'AOT40, ($AOT40 = \sum ([O_3]_i - 40)$; con $[O_3]_i > 40$ ppb). Sono state effettuate misure di scambio gassoso utilizzando l'analizzatore portatile CIRAS-2 (PPSystems, UK), e misure di fluorescenza della clorofilla *a* utilizzando un fluorimetro Handy PEA (Hansatech Ltd, UK), e un fluorimetro di ultima generazione in grado di misurare anche la fluorescenza del PSI (MPea, Hansatech Ltd, UK). Le misure funzionali sono state effettuate prima dell'inizio delle fumigazioni (punto zero) e a fine esperimento. Ai dati così raccolti, per verificare l'effetto dell'ozono è stato applicato un *test* ANOVA ad una via (one way-ANOVA). Per la valutazione

del danno morfologico e cellulare, al punto zero, a fine esperimento e dopo il trattamento *shock* si è proceduto ad un campionamento di tessuti fogliari (da ogni pianta è stata campionata una foglia). Da ogni foglia sono stati prelevati dalla porzione mediana e fissati (glutaraldeide al 2.5% in tampone cacodilato a pH 7.2) quadratini di tessuto di circa 2 mm di lato. Dopo 12 giorni di trattamento con O₃ l'osservazione al TEM ha mostrato come l'effetto più evidente consisteva in un aumento della dimensione dei granuli di amido all'interno dei cloroplasti. I risultati relativi al trattamento *shock* sono in via di elaborazione.

La temperatura dell'aria durante l'esperimento è stata mantenuta intorno a 26 ± 1.2 °C, durante il giorno e 22 ± 1.5 °C, durante la notte. L'umidità relativa era del 60 % e il VPD di circa 1.3 ± 0.3 kPa. Le fumigazioni durate 12 giorni (dalle h 9 alle h 13), hanno permesso di raggiungere un valore di AOT40 CUM pari a 7711 ppb h.

Dopo 12 giorni di fumigazione si registra una diminuzione significativa dell'assimilazione (Pn, -31% rispetto al controllo) e della conduttanza stomatica (gs, -41%). L'O₃ determina un significativo aumento della respirazione fogliare al buio, R_D.

La risposta della R_D a stress ossidativi come l'O₃ e lo *stress* idrico, può variare sia a seconda della specie che della durata e dell'intensità dello *stress* imposto. Analizzando i dati presenti in letteratura per la specie *Q. ilex* l'aumento della R_D è stato riscontrato per diversi livelli di esposizione all' O₃. L'aumento della R_D riscontrato anche in questo esperimento, conferma l'importanza che la R_D gioca nell'alimentare numerosi processi di risposta allo *stress* ossidativo che hanno un elevato costo metabolico. Il leccio risponde allo stress imposto aggiustando la funzionalità dell'apparato fotosintetico e dissipando in modo controllato l'eccesso di energia in entrata nei fotosistemi in condizioni di limitazioni stomatiche alla fotosintesi. Infatti il *Performance Index Totale* (PI_{TOT}), che esprime la capacità potenziale per la conservazione di energia dei fotoni assorbiti dal PSII, fino alla riduzione degli accettori finali oltre il PSI, aumenta nel trattamento +O₃ che, in presenza di una diminuzione della Pn, potrebbe indicare l'attivazione di cicli alternativi al trasporto elettronico con azione detossificante delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) che si formano in presenza di O₃. I parametri calcolati a partire dalle analisi della fluorescenza del PSI si riferiscono alla velocità di ossidazione del P700 e della plastocianina (v_{ox}) e la sua re-riduzione (v_{red}). Sia il v_{ox} che il v_{red} risentono dell'effetto dell'O₃ aumentando. Tale tendenza, inversa a quella che troviamo in altre specie in risposta all' O₃ (*Phaseolus vulgaris*), potrebbe suggerire la presenza di cicli alternativi che giocano un ruolo importante nei processi di detossificazione.

CONTRIBUTO UNICATT

Metodologia

Piante di *Quercus ilex* (48 individui) omogenee in dimensioni ed età (2 anni) prelevate dal vivaio di Castelporziano (Roma), sono state portate presso la *facility* di Curno il 3 aprile 2013 e

trasferite in vasi da 13.5 L (28 cm di diametro) mantenendo la zolla di terra originaria e riempiendo il resto del vaso con terriccio standard (Koro Excell). Le piante sono state lasciate circa 3 settimane all'aria aperta per l'adattamento alle nuove condizioni. Il 24 aprile i vasi sono stati trasferiti in 12 *Open-Top Chambers* (OTC) del diametro di 3m e altezza 2.4m. Per evitare un eccessivo riscaldamento dei vasi in estate essi sono stati posizionati in buchi scavati appositamente nel terreno in modo che il bordo superiore dei vasi coincidesse col livello del terreno circostante. Le piante sono state poi lasciate 2 settimane nelle nuove condizioni per acclimatarsi prima di iniziare i trattamenti con ozono il 6 maggio 2013. Le 12 OTC sono state organizzate in 3 blocchi randomizzati di 4 OTC ciascuno. All'interno di ciascun blocco sono stati applicati i seguenti trattamenti di ozono: -40% della concentrazione ambientale in OTC filtrata (CF-OTC), -5% in OTC non filtrata (NF-OTC), +30% e +74% della concentrazione ambientale in OTC arricchite con ozono (NF+30% e NF+74% rispettivamente).

La fumigazione con ozono è stata applicata per 8 ore al giorno (fra le ore 9.00 e le ore 17.00), mentre le OTC sono rimaste accese (e dunque la filtrazione è stata attiva) dalle ore 6.00 alle ore 22.00 di ogni giorno. Il 13 settembre 2013 la fumigazione è stata disattivata mentre le piante sono rimaste nelle OTC ancora in funzione fino alla fine dell'esperimento il 30 settembre 2013.

Da giugno a settembre le piante sono state irrigate automaticamente ogni notte (eccetto che per i giorni di pioggia) per mantenere il contenuto idrico del suolo vicino alla capacità di campo ed evitare limitazioni sulla conduttanza stomatica.

In data 25 giugno e 19 settembre sono state effettuate due campagne di misura della conduttanza stomatica all'acqua (g_w), delle curve di luce e assimilazione della CO_2 (con CIRAS 2 e LICOR6400), e di efficienza fotosintetica (con fluorimetro M-PEA) sulle piante appartenenti a 3 dei 4 trattamenti di ozono applicati (CF, NF+30% e NF+74%).

Al termine delle campagne di misura 576 misure di g_w (192 per ciascun trattamento di ozono) sono state elaborate per ricavare un valore di conduttanza stomatica massima (g_{wmax}) da usare nel modello di conduttanza usato per il calcolo della dose fitotossica di ozono (POD).

Alla fine dell'esperimento, le piante sono state raccolte e sono state separate le radici, il fusto e le foglie di ciascuna pianta per procedere alla determinazione della biomassa secca attraverso essiccazione a 80° C in forno.

L'esposizione delle piante all'ozono è stata calcolata attraverso l'indice AOT40 (*Accumulated Ozone over a Threshold of 40 ppb*) applicato lungo l'intera durata dell'esperimento.

Il flusso stomatico di ozono istantaneo assorbito dalle piante è stato invece calcolato applicando un modello di tipo Jarvis per simulare il comportamento della g_w durante la stagione e uno schema di deposizione di ozono di tipo "big-leaf", seguendo la metodologia suggerita dal

Mapping Manual della CLRTAP (Convention on Long-Range Trans-boundary Air Pollution, 2010).

I valori orari di g_w sono stati calcolati in base alla seguente equazione:

$$g_w = g_{w,max} \cdot f_{phen} \cdot f_{light} \cdot \max(f_{min}, f_{temp} \cdot f_{VPD} \cdot f_{SWP})$$

in cui $g_{w,max}$ rappresenta la conduttanza massima espressa dalle piante in condizioni ottimali e le varie funzioni (tutte con valore compreso fra 0 e 1) descrivono l'effetto della fenologia e delle diverse condizioni ambientali su questo parametro, per calcolare la conduttanza stomatica relativa (g_w). La funzione f_{min} rappresenta la conduttanza minima espressa in relazione alla $g_{w,max}$ durante il periodo diurno.

I dati orari delle variabili meteorologiche rilevate all'interno delle OTC sono stati usati come *input* per il modello. Una volta ottenuta la g_w , il flusso stomatico di ozono è stato calcolato a partire dalle concentrazioni medie orarie di ozono registrate in ciascuna OTC.

Infine la dose stomatica stagionale di ozono (POD) è stata calcolata come l'integrale dei flussi stomatici di ozono per l'intera durata dell'esperimento applicando poi la soglia di detossificazione Y di $1 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ di O₃ (POD₁) suggerita anch'essa dal *Mapping Manual* della CLRTAP.

Le relazioni dose-danno sono state ricavate attraverso la regressione lineare fra l'effetto relativo (*Relative Yield*, RY) medio sulla biomassa (totale, fusto, radici e foglie) riscontrato in ciascuna OTC e la dose di ozono (POD₁) calcolata per le piante della stessa OTC.

L'effetto relativo (RY) è stato calcolato come il rapporto fra il valore medio di biomassa per ciascuna parte della pianta (foglie, fusto, radici e totale) e il valore calcolato per ipotetiche condizioni di assenza di ozono (Gerosa, 2012; Fuhrer, 1994) stimato dall'intercetta della regressione lineare fra il valore di biomassa rilevato e la dose di ozono (POD₁) per ciascuna parte della pianta. Le relazioni basate sulla sola esposizione (AOT40) sono state ricavate in modo simile, ma poiché nelle CF-OTC il valore di AOT40 è stato estremamente basso non è stato necessario calcolare la biomassa in condizioni di AOT40 nullo e il valore di biomassa di questo trattamento è stato usato come base per il calcolo dell'effetto relativo (RY).

Le analisi statistiche sono state effettuate sui valori medi ottenuti dalle 4 piante di ciascuna OTC.

La significatività degli effetti dell'ozono sulla biomassa è stata ricavata attraverso un *test* ANOVA a una via applicato su un disegno a blocchi randomizzati con l'ozono come fattore fisso a quattro diversi livelli.

La significatività delle regressioni per le relazioni dose-danno ed esposizione-danno è stata controllata attraverso il *test* F e il calcolo del coefficiente di correlazione R^2 . Tutte le elaborazioni statistiche sono state effettuate con il software Statistica v. 8.0 (Stat Soft Inc.)

Risultati

La Figura 1 riporta le condizioni meteorologiche e climatiche rilevate durante l'esperimento. La primavera 2013 si è caratterizzata per piogge frequenti e abbondanti (545 mm di pioggia totali contro una media trentennale di 280 mm nello stesso periodo e luogo). Tuttavia i mesi estivi sono stati più caldi rispetto alla media (circa $+3^{\circ}\text{C}$) con un massimo di temperatura media giornaliera pari a 30.8°C registrato a fine luglio.

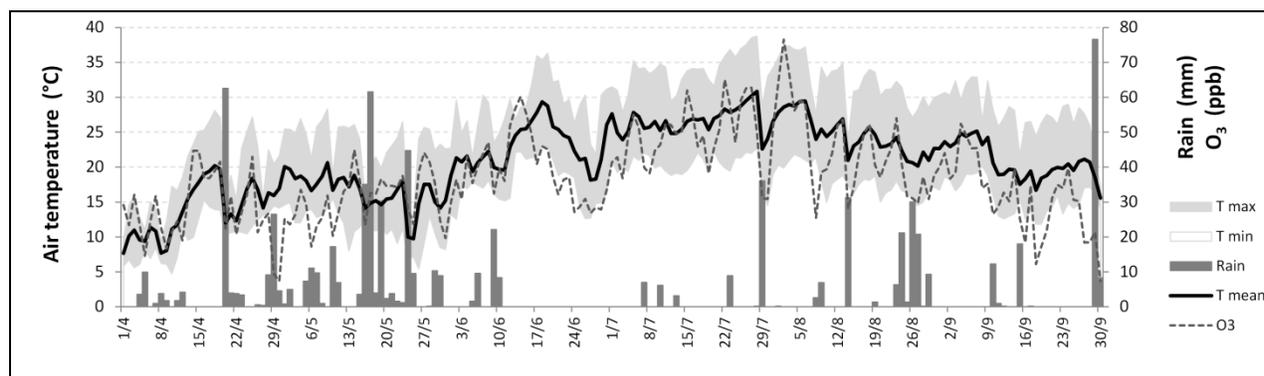


Figura 1 – Temperatura media, pioggia e concentrazione di ozono durante l'esperimento in aria ambiente. L'area grigia delimita il massimo e minimo di temperatura, mentre la linea tratteggiata riporta la concentrazione media di ozono rilevata durante le ore di luce (tra le 8.00 e le 20.00).

La dose di ozono calcolata come POD_1 è stata pari a 17.2, 34.2, 40.7 e 53.5 mmol m^{-2} di O_3 nei trattamenti CF, NF, NF+30% e NF+74% rispettivamente (Figura 2b). Questi valori sono stati tutti ben al di sopra dei livelli critici suggeriti dal *Mapping Manual* per la protezione delle specie forestali (4 mmol m^{-2} per faggio e betulla, 8 mmol m^{-2} per abete rosso).

L'andamento dell'AOT40 e del POD_1 mostrano interessanti differenze (Figura 2). La dose cresce più rapidamente dell'esposizione fino alla metà di giugno, per poi rallentare fino a metà agosto dove sembra riallinearsi con l'AOT40 fino a fine stagione.

a	b
---	---

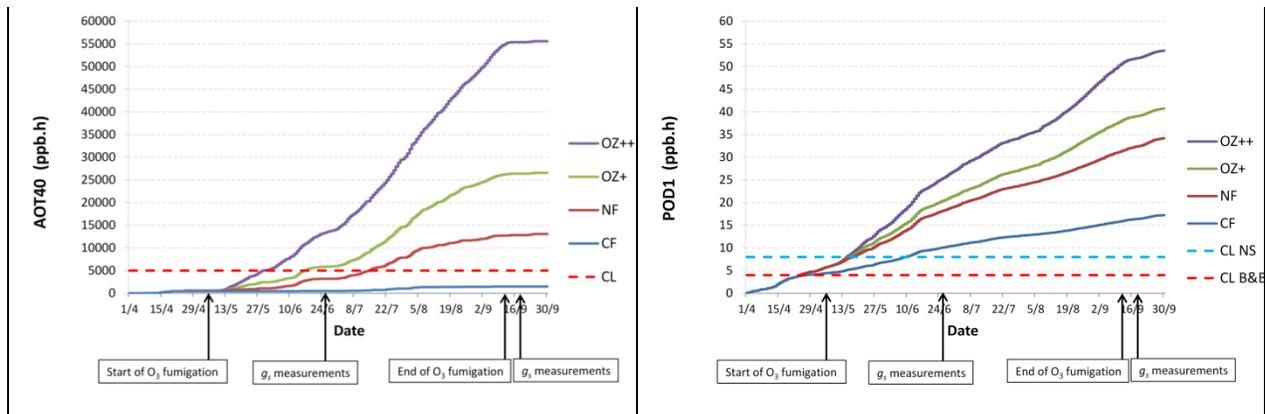


Figura 2 – Esposizione all’ozono media (a, AOT40) e dose fitotossica media (b, POD₁) nei 4 trattamenti di ozono (CF=OTC filtrate; NF= OTC non filtrate; OZ+ = OTC-NF+30%; OZ++= OTC-NF+74%). CL indica l’attuale livello critico di AOT40 per le foreste (5’000 ppb.h); CL NS e CL B&B indicano il livello critico di POD₁ per abete rosso (Norway spruce) e faggio e betulla (beech and birch), rispettivamente.

L’irrigazione automatica delle piante ha reso trascurabile qualsiasi limitazione al flusso stomatico istantaneo dovuto a questo fattore, mentre è risultato molto più limitante l’effetto della temperatura a partire dalla seconda metà del periodo sperimentale (Figura 3, f_T), e in maniera più lieve l’effetto del VPD, che ha contribuito ad abbassare la conduttanza stomatica, e dunque il POD₁, soprattutto a intorno alla parte centrale dell’estate (Figura 3, f_{VPD}).

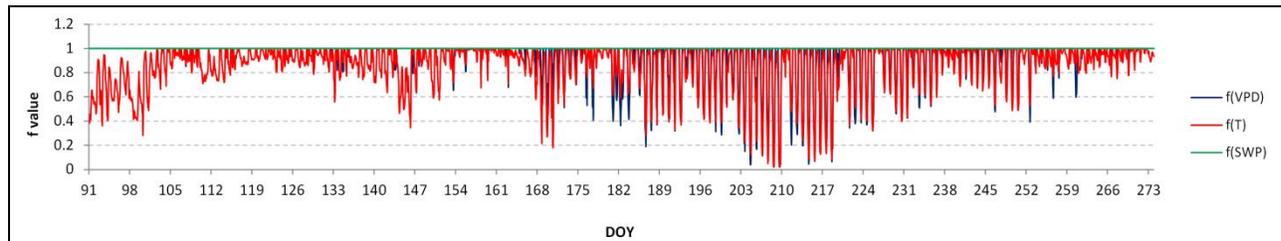


Figura 3 – Andamento delle principali funzioni limitanti la conduttanza stomatica durante il periodo sperimentale.

Gli effetti negativi dell’ozono sulle diverse componenti della biomassa secca delle piante sono riportati nella Figura 4. Il test dell’ANOVA indica che il calo di biomassa dovuto all’ozono è significativo per radici e fusto ($p=0.0407$ and $p=0.0008$, rispettivamente), mentre non è significativo per le foglie ($p=0.217$).

Il calo è stato in generale più intenso nelle radici che nel fusto, con un 27% di riduzione della biomassa radicale nel trattamento NF+74% in confronto al trattamento CF, mentre la biomassa del fusto ha mostrato una riduzione del 16%. La riduzione in biomassa totale nei trattamenti NF e NF+30% si è rivelata abbastanza simile (-16 e -14%, rispettivamente) e questo risultato riflette la similarità delle dosi di ozono assorbite (POD₁) dalle piante nei 2 trattamenti (Figure 2b).

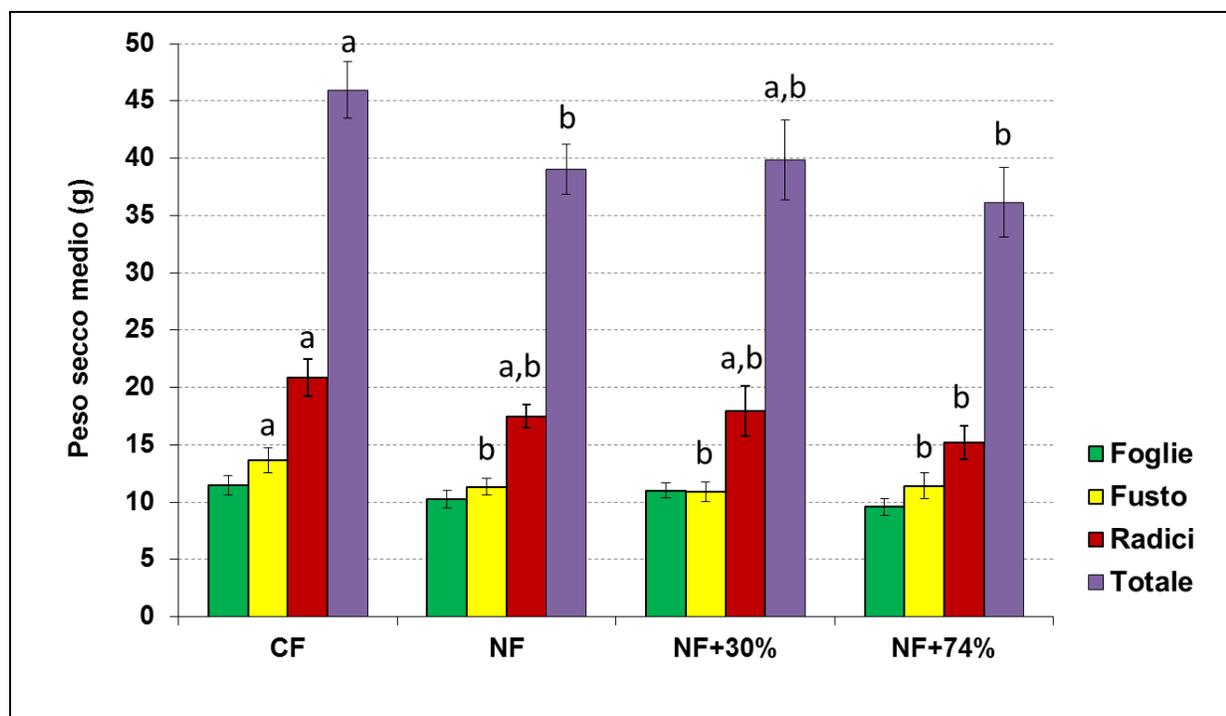


Figure 4 – Biomassa nei 4 trattamenti di ozono. E' riportato il peso secco medio per le diverse componenti della pianta e l'errore standard. Le lettere indicano il risultato del *test* LSD di Fisher's per la biomassa delle radici, del fusto e per quella totale.

L'analisi delle regressioni lineari fra la resa relativa in biomassa (fusto, radici e foglie) da una parte e AOT40 (Figura 5) e POD1 (Figura 6) dall'altra, mostra un chiaro effetto negativo dell'ozono che tende a intensificarsi con il crescere di esposizione e dose.

La relazione esposizione-danno evidenzia una significatività per il calo di biomassa nelle radici ma non per quello riscontrato in fusto e foglie (Figura 5).

Per quanto riguarda invece il POD1 (Figura 6), la regressione lineare col calo di biomassa si dimostra significativa per radici e fusto, ma non per le foglie. Il tasso di riduzione della biomassa è più intenso per le radici (-0.63% di biomassa ogni mmolm^{-2} di POD_1 assorbito) rispetto a fusto e foglie (-0.46% and -0.35%, rispettivamente).

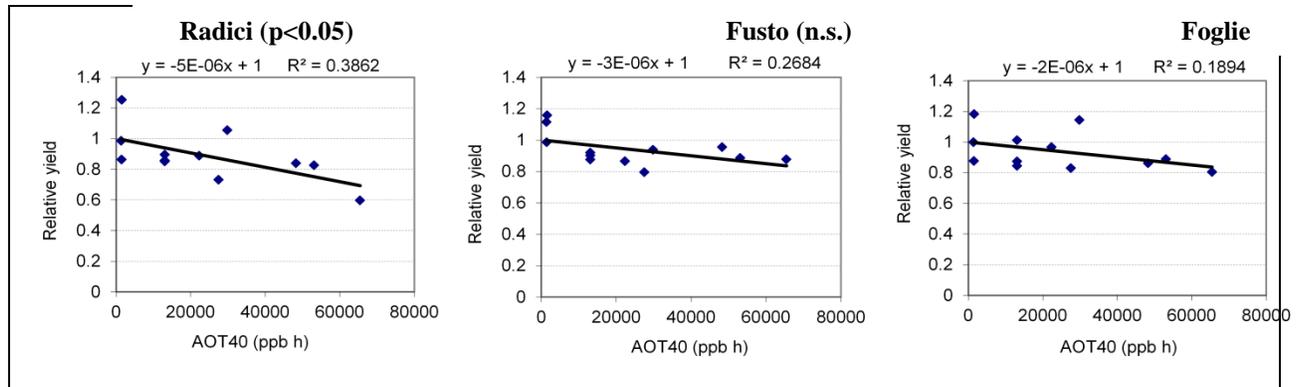


Figure 5 – Effetto dell’esposizione all’ozono (AOT40) sulla biomassa relativa di radici, fusto e foglie in *Q. ilex*. Ogni punto rappresenta la media delle 4 piante all’interno di una stessa OTC.

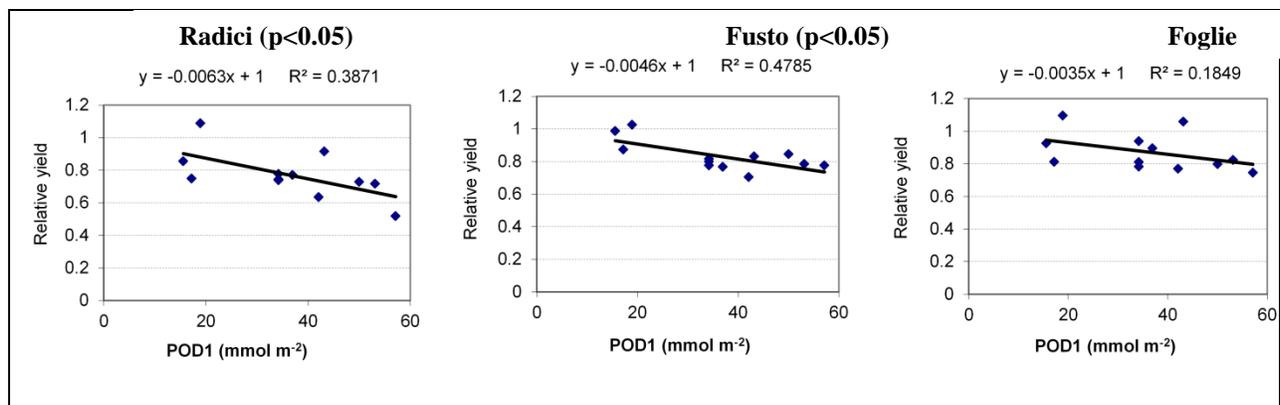


Figure 6 - Effetto della dose fitotossica di ozono (POD₁) sulla biomassa relativa di radici, fusto e foglie in *Q. ilex*. Ogni punto rappresenta la media delle 4 piante all’interno di una stessa OTC.

L’effetto dell’ozono sulla biomassa totale è riportato in Figura 7. La relazione esposizione-danno (Figura 7a) e quella dose-danno (Figura 7b) sono entrambe significative ($p<0.05$) e indicano una riduzione generale del 4% ogni 10.000 ppb.h di AOT40 e del 5.2% ogni 10 mmol m⁻² di POD₁, rispettivamente. Inoltre il coefficiente di correlazione R^2 per il POD₁ aumenta notevolmente se consideriamo la dose media e l’effetto medio calcolato sulle 3 repliche (OTC) di ciascun trattamento di ozono applicato. In questo caso (Figura 7c) la regressione lineare raggiunge un valore di R^2 pari a 0.933 per le radici, 0.6476 per il fusto, 0.6881 per le foglie e 0.9137 per la biomassa totale.

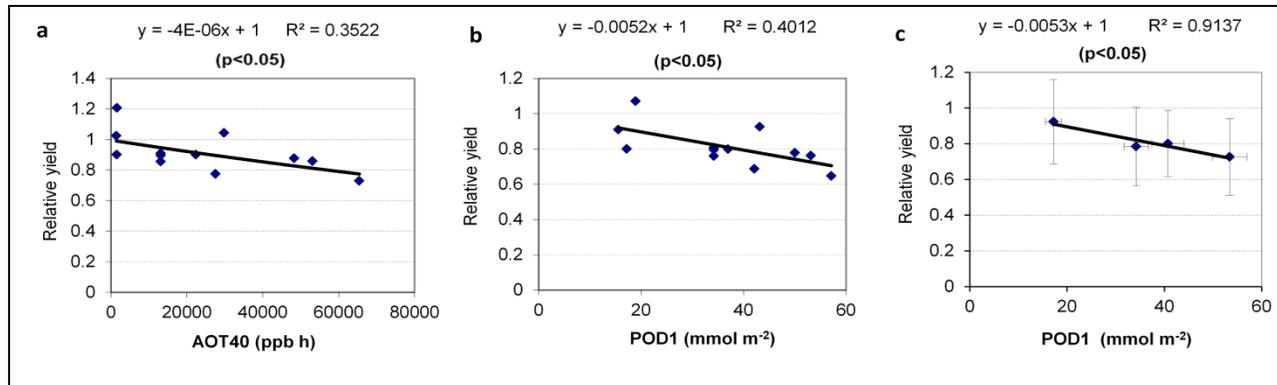


Figura 7 – Relazioni esposizione-danno (a) e dose-danno (b) per la biomassa totale di *Q. ilex*. Il grafico (c) mostra come sarebbe la relazione dose-danno per la biomassa totale se tutte le OTCs con lo stesso trattamento di ozono venissero mediate (le barre verticali e orizzontali rappresentano la deviazione standard della biomassa relativa media e della dose di ozono media, rispettivamente).

Considerando la relazione dose-danno sulla biomassa totale (Figura 7b) ricavata dall'esperimento è stato possibile identificare un livello critico di POD_1 applicabile per la protezione di *Quercus ilex*. Poiché nel *Mapping Manual* i livelli critici di POD_1 sono stati ricavati sulla base di una riduzione annua del 2% (per abete rosso) e 4% (per faggio e betulla) in biomassa totale, lo stesso principio è stato applicato per i dati ricavati da questo esperimento e scegliendo un danno pari al 4% di riduzione in biomassa totale per *Quercus ilex*, il livello critico identificato dalla relazione dose-danno è di 7 mmol m^{-2} di ozono (POD_1). Tale valore è circa il doppio di quello indicato nel *Mapping Manual* per le specie latifoglie decidue (4 mmol m^{-2}), ma ben al di sotto di quello indicato per le specie conifere sempreverdi se si considera la stessa intensità di danno (16 mmol m^{-2} per un calo in biomassa del 4%). Alla luce di questi risultati la sensibilità all'ozono di *Quercus ilex* (specie latifoglia sempreverde) sembra essere ad un livello intermedio fra quella delle latifoglie decidue e quella delle conifere sempreverdi, almeno negli stadi giovanili.

Prodotti della ricerca

Articoli scientifici:

- Fusaro L., Gerosa G., Salvatori E., Marzuoli R., Monga R., Kuzminsky E., Angelaccio C., Quarato D., Fares S. (2015). Early and late adjustments of the photosynthetic traits in *Quercus ilex* L. grown in an ozone-enriched environment. *Plant Biology*, submitted.
- Gerosa G., Fusaro L., Monga R., Finco A., Fares S., Manes F., Marzuoli R. (2015). A flux-based assessment of above and below ground biomass of Holm oak (*Quercus ilex* L.) seedlings after one season of exposure to high ozone concentrations. *Atmospheric Environment* 113, 41-49.

- Gerosa G., Finco A., Chiesa M., Marzuoli R. (2014). Plants in the city and their gaseous exchanges with the atmosphere. A possible way to estimate the air pollutant removal by plants and the related biological cost. *Agrochimica* 58, 269-289.
- Fusaro L., Mereu S., Brunetti C., Di Ferdinando M., Ferrini F., Manes F., Salvatori E., Marzuoli R., Gerosa G., Tattini M. (2014). Photosynthetic performance and biochemical adjustments in two co-occurring Mediterranean evergreens, *Quercus ilex* and *Arbutus unedo*, differing in salt exclusion ability. *Functional Plant Biology*, 41, 391–400.

Congressi:

- Gerosa G., Marzuoli R., Monga R., Finco A. (2015). Ozone and nitrogen effects (and their interaction) in oak and hornbeam young trees after two years of treatments. 28th ICP Vegetation Meeting, Rome (I), 3-5 February 2015. *Oral presentation*.
- Gerosa G., Marzuoli R., Finco A., Monga R., Fusaro L., Salvatori E., Fares S., Kuzminsky E., Manes F. (2015) A dose-response relationship for young Holm oak trees exposed to different levels of ozone during one growing season. 28th ICP Vegetation Meeting, Rome (I), 3-5 February 2015. *Poster*.
- Fusaro L., Fares S., Gerosa G., Marzuoli R., Salvatori E., Finco A., Quarato D., Monga R., Manes F. (2014). Photosynthetic performance of *Quercus ilex* L. under long-term ozone exposure probed by carboxylation efficiency, maximum apparent quantum yield and modulated 820 nm reflection. 27th ICP Vegetation Meeting, Paris (F), 28-30 January 2014. *Poster*.
- Marzuoli R., Monga R., Finco A., Fusaro L., Salvatori E., Fares S., Kuzminsky E., Manes F., Gerosa G. (2014). Biomass response of young Holm oak trees after one season of ozone treatment in well watered condition. CAPERmed2014 Meeting, Committee on Air Pollution Effects Research on Mediterranean Ecosystems, Lisbon (P), 3-4 July 2014. *Poster*.
- Fusaro L., Salvatori E., Mereu S., Manes F. (2013) “Can nitrogen deposition influence the performance of tree species in Mediterranean forest? Results from a controlled experiment on *Quercus ilex* L. and *Fraxinus ornus* L.” ClimTree 2013, International Conference on Climate Change and Tree Responses in Central European Forests, 1 – 5 September - Zurich, Switzerland. *Poster*.

WP4: MODELLI INTEGRATI
(Coordinatore: Dott.ssa Elena Kuzminsky)

A. Sintesi delle attività svolte

La Tabella sottostante riporta una sintesi delle attività svolte e in corso, relativamente a quanto previsto per il WP4. La quasi totalità delle attività ha preso avvio nei primi due anni di svolgimento del progetto *TreeCity* e al momento non si registrano difficoltà al completamento del piano di ricerca ed al raggiungimento degli obiettivi proposti.

Stato di avanzamento del WP4 in relazione agli obiettivi prefissati nel kick-off meeting (7/2/2013)

<i>Task</i>		Cosa era previsto <i>(Attività prevista)</i>	Cosa si farà <i>(Attività rimodulata)</i>	Cosa si farà in più <i>(Aggiunte volontarie)</i>
T4a	Modelli di scambi gassosi	Elaborazione di modelli di scambi gassosi (UR-UNICATT) e delle 'performance' fotosintetiche di piante in ambiente urbano (UR-UNIRM). Simulazioni possibili scenari futuri -2050 (UNIRM); analisi emissione di VOC e metano mediante tecnica 'Eddy covariance' (UR-TUS)	Parametrizzazione di un modello JARVISIANO per gli scambi stomatici a livello fogliare di O₃ ed H₂O per le formazioni su cui sono state effettuate misure eddy nel WP2 (UNICATT). Le simulazioni per scenari futuri saranno effettuate solo previa fornitura di dati da scenari di cambiamento climatico con adeguata risoluzione temporale (UNIRM con il supporto UNICATT).	
T4b	Modelli di rimozione degli inquinanti aerei e simulazione di scenari futuri	caratterizzazione rimozione inquinanti (CO₂, NO_x, O₃, metano, VOCs, particolato (UR-TUS). UR-ROMA contribuirà fornendo dati derivanti da modelli di deposizione di inquinanti sulla vegetazione a Roma	Parametrizzazione di un modello SVAT per gli scambi di O₃ ed H₂O (e.g. DO3SE) a livello di popolamento (diversi pathways depositivi) se disponibili misure eddy (WP2-UNICATT) Unicatt può contribuire alla modellazione della rimozione di O₃ ; UR-ROMA contribuirà alla	

			<p>parte modellistica mettendo a disposizione le misure ecofisiologiche e strutturali (WP1) effettuate a livello fogliare; collaborerà con UNICATT per arrivare ad una stima della rimozione di O₃ da parte della vegetazione.</p>	
T4c	<p>Valutazione dei servizi ecosistemici offerta dalla vegetazione come base per la nuova pianificazione urbana</p>	<p>Misure di scambio gassoso fogliare e dati strutturali in due siti sperimentali situati all'interno della foresta periurbana a leccio (Castelporziano) e di quella urbana (Villa Ada) (UR-ROMA).</p>		<p>UNICATT può fornire un contributo a questo task sulla base dei risultati dei run modellistici di cui ai task T4a e T4b: valutazione delle quantità di O₃ rimosso dai diversi pathways deposizionali e valutazione del 'costo' biologico della rimozione di O₃</p>
T4d	<p>Validazione di modelli funzionali delle foreste urbane</p>	<p>In collaborazione con USDA-Forest Service-Northern Research Station (Prof. D.J. Nowak) sarà studiato un modello sugli effetti delle foreste urbane (UFORE), che sarà applicato alla città di Roma (UR-TUS)</p>		
T4e	<p>Migliorare la qualità dell'ambiente urbano</p>	<p>La pianificazione di città verdi assicura il miglioramento della qualità dell'aria attraverso la riduzione delle emissioni di CO₂ e aiuta ad aumentare la capacità adattativa degli ecosistemi urbani al cambiamento</p>		

		climatico (UR-TUS).		
--	--	---------------------	--	--

B. Stato di avanzamento delle attività sperimentali delle singole Unità di Ricerca

WP4 – UR: UNITUS, UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA

Responsabile: Dott.ssa Elena Kuzminsky

Task 4A e Task 4B – MODELLI DI SCAMBI GASSOSI E DELLE 'PERFORMANCE' FOTOSINTETICHE DELLE PIANTE IN AMBIENTE URBANO - MODELLI DI RIMOZIONE DI INQUINANTI AEREI E SIMULAZIONE DI SCENARI FUTURI

Come indicato nel WP2, l'unità di ricerca UNITUS ha dato inizio ad una attività di misura in continuo dei flussi di CO₂, H₂O, O₃, CH₄ presso il sito sperimentale "Grotta di Piastra" all'interno della Tenuta Presidenziale di Castelporziano. Per quanto riguarda l'attività modellistica, i dati raccolti con la tecnica *Eddy Covariance* sono serviti a validare modelli di deposizione di ozono all'interno degli stomi. Come per l'anno 2013, anche per l'anno 2014 sono stati finora testati due modelli: uno di tipo empirico (Jarvisiano) e uno più meccanicistico (Ball-Berry). Il primo è stato parametrizzato con una serie di misure di fattori ambientali misurati sul sito: temperatura dell'aria, umidità relativa, radiazione solare, temperatura e contenuto idrico del suolo. L'approccio meccanicistico è stato affrontato misurando i parametri ecofisiologici della vegetazione. Il secondo modello si è avvalso della parametrizzazione con dati fisiologici (V_{cmax} e conduttanza stomatica) raccolti sul sito con strumenti portatili mensilmente da febbraio 2014 a gennaio 2015. Sono stati elaborati fattori di riduzione della conduttanza stomatica utilizzando funzioni esistenti in letteratura, ed elaborate appositamente per la lecceta di Castelporziano. I due approcci sopra descritti sono stati utilizzati attraverso un approccio "*big leaf*", ovvero associando la chioma ad una unica superficie fogliare. L'attività modellistica si è poi spinta ad un livello più avanzato, applicando un modello *multi-layer* che calcola la conduttanza della *canopy* attraverso l'integrazione del contributo di diversi *layer* dal suolo fin sopra la *canopy*. Ci si è avvalsi di un modello di trasferimento radiativo per calcolare il bilancio energetico per ogni *layer*, così da modellizzare la risposta delle foglie a regimi diversi di radiazione e temperatura. Il modello permette inoltre la caratterizzazione delle emissioni di VOC da parte della lecceta utilizzando fattori di emissioni misurati in campo grazie all'uso di trappole e all'applicazione della tecnica '*eddy covariance*' (UR-TUS) come descritto nel WP2. Il modello è stato arricchito di una componente che calcola il contenuto idrico nel suolo grazie alla collaborazione con l'Università di Sydney. Il modello integrato permette ora di stimare limitazioni fisiologiche imposte dalla siccità. La valutazione del modello *multi-layer* è ancora in corso e verrà conclusa entro la fine del progetto con una pubblicazione internazionale. Si prevede di impostare attività modellistiche volte alla realizzazione di un modello a più ampio spettro, che permetta di calcolare i servizi ecosistemici offerti dalla vegetazione urbana.

Task 4C – VALUTAZIONE DEI SERVIZI ECOSISTEMICI OFFERTA DALLA VEGETAZIONE COME BASE PER LA NUOVA PIANIFICAZIONE URBANA

I risultati dell'attività modellistica serviranno ad indirizzare la pianificazione di città verdi assicurando il miglioramento della qualità dell'aria attraverso la riduzione delle emissioni di CO₂ e inquinanti (ozono e PM) aiutando ad aumentare la capacità adattativa degli ecosistemi urbani al cambiamento climatico. Per questo entro la fine del progetto si prevede di terminare la parametrizzazione e l'elaborazione della cartografia tematica e presentare i risultati presso eventi di divulgazione rivolti agli utilizzatori, considerato l'interesse nelle potenzialità della vegetazione di mitigare l'inquinamento urbano. Si prevede di elaborare un manoscritto da inviare a rivista internazionale ad alto *Impact Factor*.

Task 4D – VALIDAZIONE DI MODELLI FUNZIONALI DELLE FORESTE URBANE

Per quanto riguarda la validazione di modelli di deposizione di inquinanti su foreste urbane, è stato avviato un percorso che ha portato all'assunzione di un assegnista di ricerca (Dr Alivernini) per collaborare ad un progetto che si ispira al modello *i-tree* rilasciato per il nord America dall'USDA. Il modello è il risultato di una attenta parametrizzazione dei parametri strutturali ed ecofisiologici della vegetazione. La componente dinamica del modello che lega l'umidità del suolo allo stato fisiologico delle chiome è un valore aggiunto al modello, che attraverso un approccio *multi-layer* elaborato con *software* Matlab riesce a calcolare la deposizione di inquinanti, rimozione di carbonio ed emissione di VOC da parte della lecceta di Castelporziano. Il Dr. Alivernini sta collaborando con il Dr Fares per adattare il modello al linguaggio Python compatibile con i *softwares* di ambiente GIS, il che permetterà una maggiore elasticità del modello e capacità previsionale delle deposizioni di ozono ma anche di PM, SO₂, NO_x sulla vegetazione urbana. I lavori di parametrizzazione sono in corso, così come sono in corso una serie di rilievi a terra prendendo come area test il comune di Roma per identificare i parametri strutturali delle specie forestali maggiormente impiegate nelle alberature e parchi urbani di ambiente Mediterraneo. In particolare grazie alla collaborazione con il CRA SEL si sta implementando una tecnica che consente di calcolare il LAI (*Leaf Area Index*) di specie urbane elaborando immagini sferiche.

Task 4E - MIGLIORARE LA QUALITÀ DELL'AMBIENTE URBANO

I risultati dell'attività modellistica serviranno ad indirizzare la pianificazione di città verdi assicurando il miglioramento della qualità dell'aria e aiutando ad aumentare la capacità adattativa degli ecosistemi urbani al cambiamento climatico. Per questo entro la fine del progetto si prevede di terminare la parametrizzazione e presentare i risultati presso eventi di divulgazione rivolti agli utilizzatori, considerato l'interesse nelle potenzialità della vegetazione di mitigare l'inquinamento urbano. Si prevede di elaborare un manoscritto da inviare a rivista internazionale ad alto *Impact Factor*.

WP 4 – UR: UNICATT, UNIVERSITA' CATTOLICA DEL SACRO CUORE DI BRESCIA

Responsabile: Prof. Giacomo Gerosa

Task 4A– MODELLI DI SCAMBI GASSOSI E DELLE 'PERFORMANCE' FOTOSINTETICHE DELLE PIANTE IN AMBIENTE URBANO

Completato nel corso del I anno.

Task 4B - MODELLI DI RIMOZIONE DEGLI INQUINANTI AEREI E SIMULAZIONE DI SCENARI FUTURI

UNICATT ha iniziato ad elaborare i dati di flusso delle misure della torre *eddy-covariance* del Bosco della Fontana (MN) al fine di derivarne le conduttanze stomatiche orarie complessive della chioma e, di conseguenza i flussi stomatici di ozono. L'analisi comparata dei flussi stomatici con i flussi totali registrati ha permesso di stimare la frazione di ozono rimosso per via non-stomatica e, di conseguenza, il servizio ecosistemico a costo ecologico pressoché nullo. Le informazioni derivate con i modelli diagnostici DDIM (*Dry Deposition Inferential Models*) utilizzati per la partizione dei flussi di ozono nelle componenti stomatica e non-stomatica serviranno per la parametrizzazione del modello SVAT (*Soil-Vegetation-Atmosphere Transfer model*) di rimozione degli inquinanti da sviluppare per questo progetto.

Al momento sono stati implementati i moduli relativi al sottomodello di conduttanza stomatica e al sottomodello di simulazione della disponibilità idrica del suolo.

Lo schema deposizionale prescelto è un *multi-sink multilayer* a due strati: *upperstorey* e *understorey vegetation*, ancora da implementare insieme al modello atmosferico per la turbolenza. Il linguaggio scelto per l'implementazione del modello è *Visual Basic for Application* sotto Excel.

I primi risultati derivanti dalla partizione dei flussi di ozono hanno permesso di ricavare i valori riportati in Tabella 1 e gli andamenti medi giornalieri delle resistenze R_a , R_b , R_c , della resistenza stomatica (R_{stom}) e di quella non stomatica ($R_{nonStom}$) riportati in Figura 18.

Tabella 1- valori medi diurni delle resistenze (10/04/2013-31/08/2014).

	Da	il	A	il
Ra (s/m)	10,9	20/04/2013	2618	25/04/2013
Rb (s/m)	9,14	20/04/2013	69,9	25/05/2013
Rc (s/m)	2,53	16/08/2013	3804	13/05/2013
Rst (s/m)	5	21/08/2013	9458	08/05/2013
R non st (s/m)	76,5	06/05/2013	36236	15/04/2013

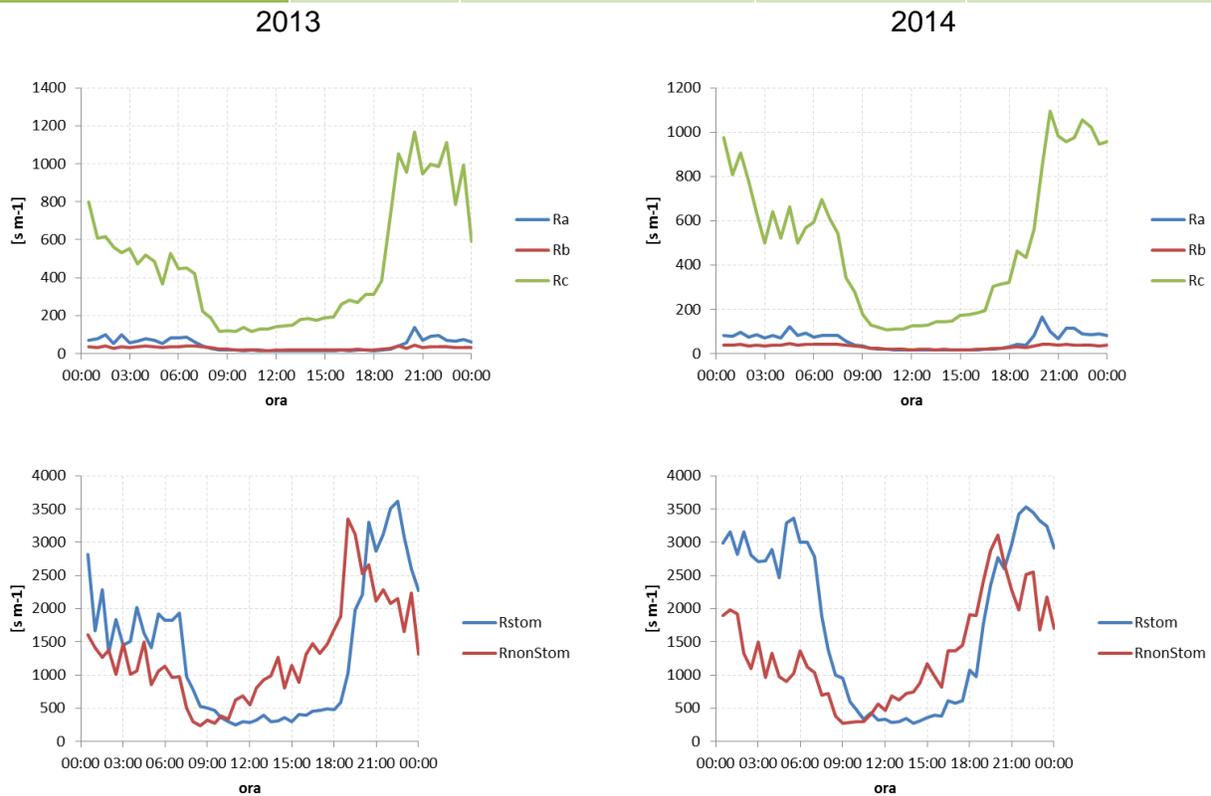


Figura 18 Evoluzione media giornaliera delle resistenze Ra, Rb e Rc (grafici superiori) e delle resistenze Rstom e RnonStom (grafici inferiori). I grafici a sinistra sono relativi all'anno 2013 mentre quelli di destra sono relativi all'anno 2014.

I valori di Ra e Rb sono stati molto bassi nelle ore centrali della giornata (inferiori ai 20 s m^{-1}), raggiungendo un massimo nelle ore serali intorno alle 20:00, pari per Ra a 137 s m^{-1} nel 2013 e a 164 s m^{-1} nel 2014, mentre Rb ha avuto un massimo pari a 44 s m^{-1} nel 2013 e 44 s m^{-1} nel 2013.

La resistenza della *canopy* Rc ha mostrato valori in generale molto più alti di Ra e Rb, circa 10 volte, confermandosi come il principale driver della deposizione all'ozono. L'andamento nei due

anni ha mostrato valori di R_c più alti nelle prime ore del giorno nel 2014 (circa il 20%); l'evoluzione di R_c nel corso della giornata è stato poi simile per entrambi gli anni: un minimo intorno alle ore 10:00 (117 s m^{-1} nel 2013 e 109 s m^{-1} nel 2014) e una crescita costante fino al tardo pomeriggio quando, raggiunti valori intorno ai 350 s m^{-1} , aumenta rapidamente per arrivare a valori intorno ai 1000 s m^{-1} per le prime ore della notte. I valori bassi nelle ore centrali della giornata sono chiaramente legati alla forte evapotraspirazione che a sua volta influenza la resistenza stomatica.

La resistenza stomatica R_{stom} in entrambi gli anni è stata caratterizzata da un andamento a campana rovesciata con un minimo diurno nelle ore centrali della giornata e valori anche 10 volte più alti nelle ore notturne. Nelle ore centrali della giornata la resistenza stomatica è stata mediamente di 360 s m^{-1} nel 2013 e leggermente più alta nel 2014 410 s m^{-1} . I valori notturni sono stati intorno ai 3000 s m^{-1} , con valori tra i 1500 e 2000 s m^{-1} nelle prime ore della giornata nel 2013. In entrambi gli anni gli andamenti della resistenza stomatica sono stati simili (seppur con valori molto diversi) a quelli della resistenza della chioma, confermando la forte influenza della resistenza stomatica su di essa.

La resistenza non stomatica, in entrambi gli anni, ha mostrato un massimo di poco superiore ai 3000 s m^{-1} tra 19:00 e le 20:00 per poi decrescere fino al mattino successivo, raggiungendo intorno alle 9:00 un minimo di poco inferiore ai 300 s m^{-1} . Dalle 10:00 la resistenza non stomatica continua a crescere fino al punto di massimo nelle prime ore della sera.

Un primo modello prognostico è ancora in fase di sviluppo e completamento, esso sarà parametrizzato utilizzando i risultati mostrati.

Durante gli ultimi mesi è stata valutata la possibilità di utilizzare il *software open source* I-Tree, elaborato dal USDA Forest Service, per stimare la rimozione di ozono da parte di Bosco Fontana. I-Tree è un *tool* specificamente creato per analizzare la composizione di foreste urbane e valutare il potenziale di rimozione di inquinanti da parte di alberi e zone verdi presenti nelle città.

Il *tool*, realizzato nel 2006, si pone come obiettivo quello di fornire suggerimenti ai decisori pubblici per la gestione del verde urbano, finalizzata al miglioramento della qualità dell'aria delle città. Il *software* richiede di suddividere l'area oggetto di studio in un numero definito di plots (almeno 150 circa) di diametro di circa 10 m. In ciascun plot una *crew* di 2 persone deve stimare il numero di alberi e arbusti presenti, la loro specie, la loro dimensione, il loro stato di salute, la dimensione della chioma e altri parametri utili alla descrizione della vegetazione presente sul plot. I dati raccolti in campo vengono poi inseriti nel software. Il software elabora poi i dati e restituisce stime della rimozione di O_3 , PM_{10} , CO_2 e NO da parte della foresta urbana.

Il modello su cui si basa il funzionamento del software è quello proposto da Novak e Crane in “*The Urban Forest effects Model (UFORE): Quantifying urban forest structure and functions*”. È formato da alcuni moduli di base come I-Tree Eco, che descrive la composizione della foresta urbana per specie, I-Tree Canopy, che stima la tipologia di uso del suolo a partire dai dati inseriti nel modello, I-Tree Streets, che si concentra sui benefici apportati da viali alberati in città. Moduli aggiuntivi possono stimare anche il rischio di problemi di salute delle piante o il guadagno, in termini economici, derivante dalla presenza di piante in città dovuto al miglioramento del microclima cittadino.

L'elaborazione dati è veloce per USA, Canada e Australia e può avvenire nell'arco di qualche ora. Per questi Paesi infatti i dati meteo e di inquinamento da affiancare alle informazioni riguardanti la vegetazione cittadina sono già presenti all'interno del software. Purtroppo in I-Tree non sono presenti questi dati per l'Europa. Perché il software funzioni in un contesto europeo è necessario inviare i dati meteo e di inquinamento al USDA Forest Service insieme al progetto creato in I-Tree. L'USDA Forest Service provvede all'elaborazione, ma la tempistica è decisamente lunga: si può andare dai 2 ai 6 mesi di attesa prima di ottenere i risultati.

Il tempo di attesa per ottenere i risultati è decisamente troppo lungo per poter lavorare poi sui dati così ottenuti all'interno dei tempi previsti dal progetto.

Inoltre il *tool* I-Tree è specificamente disegnato per lavorare in un contesto cittadino e prevede un lungo lavoro in campo difficilmente realizzabile nel contesto di Bosco Fontana. La definizione dei plots appare da subito problematica e un esame di alberi e arbusti condotto al livello di dettaglio richiesto da I-Tree appare molto complesso. L'attività in campo richiederebbe anche una notevole disponibilità di tempo e risorse. Tutto questo ha portato UCSC a cercare strumenti modellistici alternativi rispetto ad I-Tree. In quest'ottica è stata avviata una collaborazione con l'unità che fa capo al prof. Manes (UniRoma), che ha dato la propria disponibilità per avviare una collaborazione su questi temi.

Task 4C - VALUTAZIONE DEI SERVIZI ECOSISTEMICI OFFERTI DALLA VEGETAZIONE COME BASE PER LA NUOVA PIANIFICAZIONE URBANA

La valutazione delle quantità di O₃ rimosso dai diversi *pathways* deposizionali e la valutazione del ‘costo’ biologico della rimozione di O₃ è stata effettuata da UNICATT sulla base delle proprie misure in corso al Bosco della Fontana (MN) dal 2013.

I risultati sono stati ampiamente illustrati nell'ambito del *Task 2A MICROMETEOROLOGIA DEI FLUSSI DI MATERIA ED ENERGIA*, al quale si rimanda per dettagli.

In estrema sintesi, nel 2013 il bosco ha rimosso 64.6 kg O₃ ha⁻¹ dei quali il 30% per via stomatica (19 kg O₃ ha⁻¹), mentre nel 2014 questa percentuale è scesa al 23% (13 kg O₃ ha⁻¹ per via stomatica e 57,5 19 kg O₃ ha⁻¹ complessivi) fornendo così un importante servizio ecosistemico il

cui costo biologico può essere stimato solo indirettamente attraverso la dose fitotossica perché, come è ovvio, non è possibile procedere ad *harvesting*.

La dose fitotossica stomatica (POD1) ricevuta dalle piante nella stagione vegetativa 2013 è stata di 39 mmol m⁻² nel 2013 e di 27 mmol m⁻² nel 2014, valori piuttosto alti se rapportati ai livelli critici di flusso indicati dall'UNECE per la protezione della vegetazione (4 mmol m⁻² riferiti a faggio e betulla, le specie prese a riferimento dall'UN/ECE per le latifoglie generiche, UN/ECE 2011). A questi livelli di flusso stomatico, sulla base dell'unica relazione dose-danno disponibile in letteratura (faggio e betulla, UN/ECE 2011), si possono prevedere per il nostro bosco periurbano cali di resa in biomassa compresi tra l'8.5% e il 9% ad un LAI di 5 m²/m². Si tratta di una riduzione piccola ma importante. Evidenze dell'effetto negativo dell'ozono sull'assimilazione di CO₂ sono state inoltre individuate nella progressiva riduzione del NEE (*Net Ecosystem Exchange*) osservata a partire da flussi stomatici istantanei di ozono superiori a 4 nmol m⁻² s⁻¹.

WP4 – UR: UNIROMA, UNIVERSITA' “LA SAPIENZA DI ROMA”

Responsabile: Prof. Fausto Manes

Task 4C – VALUTAZIONE DEI SERVIZI ECOSISTEMICI OFFERTI DALLA VEGETAZIONE COME BASE PER LA NUOVA PIANIFICAZIONE URBANA

Per quanto riguarda la valutazione dei servizi ecosistemici offerti dalla vegetazione, con particolare interesse alla rimozione di ozono, si intende procedere per via modellistica. Il modello scelto è stato GOTILWA+. Allo stato attuale, la fase di parametrizzazione del modello è stata quasi completata. I dati di scambio gassoso raccolti dalla UR-ROMA nell'ambito del WP1 vengono utilizzati per parametrizzare i moduli relativi alla regolazione stomatica e alla fotosintesi a livello fogliare. In particolare sono stati stimati i coefficienti della funzione Ball-Berry e i coefficienti per la funzione relativa alla respirazione fogliare. Il modello GOTILWA+ è già stato parametrizzato per la specie *Q. ilex* in ambito mediterraneo e questo permette di usare i parametri presenti in letteratura già adatti alla specie di nostro interesse, quando questi non sono disponibili per i siti di studio. Il modello GOTILWA+ è stato preferito ad altri modelli presenti in letteratura e già parametrizzati per il leccio, perché nasce come modello per stimare gli accrescimenti annui delle varie classi diametriche, permettendo di simulare gli effetti della gestione e/o del cambiamento climatico sui servizi ecosistemici offerti dalle due tipologie di vegetazione considerate in questo progetto. L'attenzione posta dal modello sulla dinamica di accrescimento della vegetazione (variazione nel tempo della distribuzione delle classi diametriche e d'evoluzione nel tempo del LAI e della chiusura dei “*gaps*” richiede un'insieme di rilevati strutturali necessari per poter inizializzare il modello e per parametrizzare le funzioni

relative alla capacità d'intercettazione della luce della comunità. A tal fine sono stati effettuati dei rilievi strutturali i cui dettagli sono riportati qui di seguito.

Rilievi Strutturali

I rilievi strutturali sono stati effettuati nei due siti di studio all'interno di aree appositamente selezionate (*plot*) rappresentative, per struttura e densità, degli individui presenti e della composizione specifica del popolamento forestale. I *plots* sono stati tutti georeferenziati, e delimitati misurando i lati con un metro a nastro in modo da poterne calcolare l'area. Nel sito di VA sono stati selezionati 5 *plot*, 4 nel sito di CP.

I dati biometrici rilevati sono stati:

- Circonferenza del tronco: misurata ad altezza petto (1,30 m circa) per gli individui di tutte le specie presenti all'interno del *plot* con una circonferenza maggiore ai 10 cm.
- Raggio della corona: solo per gli individui della specie *Q. ilex*, sono stati rilevati i raggi della corona, nelle diverse direzioni in cui la chioma era presente, considerando la distanza tra la proiezione del margine della chioma a terra e il tronco. In caso di individuo con polloni, i raggi delle corona venivano rilevati sempre da un punto equidistante da tutti i polloni presenti.

Analisi Dati

Per ogni area di saggio (*plot*) si è calcolata l'area (m²), e poi convertita in ettari (ha).

A partire dalla circonferenza al petto, approssimando il tronco ad una forma circolare, sono stati calcolati alcuni importanti parametri biometrici come il diametro (m), e l'area basimetrica (G, m²) che rappresenta la sezione di superficie trasversale. È stata inoltre calcolata l'area basimetrica per ettaro che esprime la densità del popolamento, consentendo di valutare la competizione tra le piante all'interno del popolamento, applicando la formula:

$$G_{ha} = G \frac{10000}{a} \quad \text{Eq.1}$$

dove *a* indica la superficie dell'area di saggio.

Il numero di fusti per ettaro è stato calcolato come:

$$N_{ha} = N \frac{10000}{a} \quad \text{Eq. 2}$$

dove *N* è il numero di fusti arborei rilevati nell'area di saggio di superficie *a* (in m²).

Per ogni singolo individuo è stato calcolato il raggio medio della chioma e a partire da questo, approssimando la corona ad una forma circolare, è stata ricavata la superficie della proiezione della chioma a terra, l'area della corona (m²). L'insidenza totale, è data dalla sommatoria delle aree di insidenza (aree delle corone) degli alberi presenti all'interno di un'area di saggio riportata

a ettaro. Nel calcolo di tale indice sono considerate solo le chiome o le porzioni di chioma ricadenti all'interno del *plot*. Il coefficiente di variazione, definito dal rapporto fra deviazione standard e media, è stato calcolato per raggio della corona, area della corona e diametro del tronco. I parametri biometrici rilevati e gli indici calcolati sono stati sottoposti ad un'analisi della varianza utilizzando il *software* Statistica 7.0 (Stat Soft Inc. Tulsa, OK, USA). Per analizzare le differenze tra i due siti, le medie delle variabili registrate nelle due foreste espresse per le singole aree di saggio, sono state confrontate effettuando l'analisi della varianza a una via (*one way-ANOVA*).

Nel sito periurbano il numero degli individui rilevati è stato maggiore che nel sito urbano (127 circonferenze rilevate a CP, 85 a VA), a causa della presenza di fustaie a CP. La densità media nel sito periurbano è molto elevata con circa 510 individui per ettaro rispetto al sito urbano con una densità media di 214 individui per ettaro. I due siti si differenziano anche per la composizione in specie. Se andiamo a guardare alla distribuzione delle aree basimetriche nel sito urbano di Villa Ada, si nota che il 71% delle aree rilevate appartiene alla specie *Q. ilex* e di queste solo il 2 % è rappresentato da individui pollonati mentre il restante 29% è occupato principalmente da individui di *Pinus Pinea* con un 18%, da altre specie decidue tra cui alcuni individui del genere *Tilia spp.*, *Aesculus hippocastanum*, *Cercis Siliquastrum* per il 7%, e da *Laurus nobilis* (presente solo sotto forma di ceduo) per il 4%.

Nel sito periurbano di CP il 99% delle aree basali rilevate nei plot è occupato da individui di *Q. ilex*, di cui un 11% sono polloni, il restante 1% è occupato principalmente da individui della specie *Phillyrea latifolia* L. Il diametro del tronco per gli individui nel sito periurbano di CP (mediana prossima ai 0,20 m), è mediamente inferiore rispetto a quello riscontrato nel sito urbano (mediana prossima a 0,5 m). Questa minore omogeneità del dato nel sito di VA emerge anche guardando alla distribuzione delle classi diametriche. Infatti quando guardiamo alla distribuzione complessiva del numero di piante per classi diametriche (incremento considerato è stato pari a 10 cm) relative al sito di Castelporziano è evidente che la quasi totalità degli individui (77%) è compreso nelle classi tra <0,1 a 0,3 metri. Gli individui con diametro maggiore e non oltre i 0,8 m rappresentano il 23% dei rilevati. La distribuzione delle classi diametriche è più ampia nel sito urbano di VA, con valori che si discostano molto dalla media, anche se con una scarsa frequenza. La maggior parte dei fusti misurati ha un diametro compreso tra i 0,2 e i 0,6 metri. Nel sito di VA a differenza di quanto riscontrato a CP, sono presenti individui con un diametro del tronco superiore a 1 metro e una quantità esigua di individui con diametro <0,2 m. In generale possiamo sottolineare che la dimensione degli individui nel sito urbano è maggiore sia in termini di diametro medio del tronco e quindi nell'area basimetrica, sia nei parametri relativi alla chioma. Infatti il diametro medio del tronco è di $0,5 \pm 0,16$ e $0,2 \pm 0,04$ metri, e l'area basimetrica media è pari a $0,26 \pm 0,13$ e $0,08 \pm 0,03$ m² a VA e CP rispettivamente.

I parametri relativi alla chioma confermano le maggiori dimensioni degli individui nel sito urbano di VA, con un raggio medio della corona di $5,3 \pm 0,66$ m e un'area di $100 \pm 18,99$ m² per

individuo, mentre nel sito periurbano il raggio e l'area media relativi alla corona sono rispettivamente di 3.2 ± 0.52 m e 42.2 ± 12.3 m².

Il dato area basimetrica per *ha*, che consente di valutare la competizione tra le piante all'interno del popolamento è significativamente diverso tra i due siti con un valore calcolato di $59 \pm 4,3$ m² a Villa Ada e 36.6 ± 9.2 m²a CP.

Prodotti della ricerca

Nota: tutti i prodotti di U.R.UNICATT e U.R.TUS sono stati indicati nei risultati del WP2.

Tesi di laurea e laurea magistrale

- “Le Infrastrutture Verdi e le funzioni di mitigazione del clima e dell'inquinamento atmosferico nelle aree urbane” – Francesco Lodato, Scienze Ambientali, Università La Sapienza (L).

WP5: DIVULGAZIONE

Interventi orali:

- Cotrozzi L., Bove F., Campanella A., Landi M., Pellegrini E., 2015. La città verde nell'era del cambiamento globale. Greentech Research Pisa. Pisa, 10 aprile, *presentazione orale*.
- Lorenzini G., 2013. *TreeCity*: un progetto per una migliore qualità della vita nelle nostre città. Evento Internazionale “Vestire il Paesaggio 2013” – le piante per la qualità ambientale e sostenibile delle aree urbanizzate. Pistoia, 26-28 giugno, *presentazione orale*.
- Lorenzini G., 2013. Pianificare il contrasto del cambiamento climatico e ridurre l'uso di energia tramite il verde urbano: il progetto *TreeCity*. Green City Energy Pisa. Pisa, 4-5 luglio, *presentazione orale*.
- Lorenzini G., 2015. La Scienza e la tecnologia al servizio dell'alimentazione sostenibile. Workshop di ItaliaCamp per EXPO2015. Pisa (Italia) 22 gennaio, *presentazione orale*.
- Lorenzini G., 2015. *TreeCity*: Un programma internazionale per una migliore qualità della vita nelle nostre città. Greentech Research Pisa. Pisa, 10 aprile, *presentazione orale*.
- Fusaro L., Salvatori E., Mereu S., Silli V., Scassellati E., Toniolo C., Nicoletti M., Abbate G., Manes F., 2013. Il Progetto PRIN “*TreeCity*”: Servizi Ecosistemici offerti dal verde urbano e cambiamento globale nell'area metropolitana romana. XXIII Congresso SIItE. Ancona, 16-18 settembre, *poster*.

Organizzazione congressi:

- Il Comitato Scientifico del Progetto PRIN “*TreeCity*” in collaborazione con la Società Italiana di Ecologia (S.It.E), la Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali della Sapienza ha organizzato il congresso dal titolo “Qualità dell'aria in aree urbane e rurali: contributi naturali e antropici, interazioni nei sistemi ambientali e qualità della vita”, Aula Giacomini. Roma, 27 Maggio 2013.
- Il comitato Scientifico del Progetto PRIN “*TreeCity*” in collaborazione con il corso di Dottorato di Ricerca in Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali ed il Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali (DiSAAA-a) dell'Università di Pisa ha organizzato il 1st *International Workshop “Plant physiology in the urban environment”*, Aula Magna DiSAAA-a. Pisa, 23 luglio 2014. In allegato, il programma della giornata.

Hanno partecipato oltre 80 studiosi. I contributi sono stati stampati su un fascicolo di *Agrochimica*, rivista indicizzata di proprietà dell'Università di Pisa

- “First Italian meeting on the MAES working group activities” Aula Giacomini. Roma, 27 febbraio 2014
- 28th ICP Vegetation Task Force Meeting. Dipartimento di Biologia Ambientale, Sapienza Università di Roma. Roma (Italia) 3-5 febbraio 2015.

Trasmisioni televisive:

- Gerosa G., Finco A., 2014. Mantova: il contributo del Bosco Fontana alla rimozione degli inquinanti. In Di Gennaro D., Gramazio L., Marcellini P, Sisto N., *LINEA VERDE*, RAI 1, 2/3/2014 ore 13:00

Conferenze didattiche:

- Gerosa G., Marzuoli R., Finco A., Monga R., 2014. Piante spazzine e servizi ecosistemici Come le piante contribuiscono a ripulire l'aria... facendosi del male. Notte dei ricercatori 2014. Brescia, 25 settembre 2014.
- Gerosa G., Marzuoli R., 2014. Il respiro delle Piante. LABORATORI DIDATTICI per SCUOLE, 11 e 13 novembre 2014, AIRweek 2014, Brescia
- Gerosa G., Finco A., Marzuoli R., Chiesa. La respirazione e la fotosintesi nelle piante. LABORATORI DIDATTICI per SCUOLE, 6 dicembre 2014, AIRweek 2014, Brescia.
- Gerosa, Finco, Marzuoli, Chiesa. Aria e inquinati dell'aria. LABORATORI DIDATTICI per SCUOLE, 6 dicembre 2014, AIRweek 2014, Brescia.

Altro:

- Realizzazione sito http://treecity.agr.unipi.it/?page_id=152