

Tesi Botaniche

Tesi Botaniche 7

Editoriale

In questo settimo numero della rubrica *Tesi Botaniche* vengono presentate tredici tesi di laurea magistrale. Anche tali studi delineano la capacità della Botanica di mettere in comunicazione discipline diverse, talvolta molto distanti tra loro. Questa caratteristica rende la Botanica una scienza aperta ed in continua evoluzione, in grado di adattarsi alle mutate esigenze della ricerca e della società. La sua evoluzione può essere paragonata, da un certo punto di vista, a quella delle piante che, nel corso della storia della vita sulla Terra, sono riuscite ad adeguarsi alle mutevoli condizioni ambientali. Le piante, seppur idealmente, possono essere quindi considerate come la memoria storica degli eventi naturali e non solo.

a cura di

Adriano Stinca

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Ambientali, Biologiche e Farmaceutiche
Università della Campania Luigi Vanvitelli, Caserta

T. Mazzarella, P. Appendino, A. Giletta, E. Moscato, L. Zara, A. Nardo, L. Maccaroni, L. Di Lisa, V. Osso, L. Boldrini, N. Pavanetto, E. Thouverai, M.D. Novellino

L'analisi del trascrittoma rivela la risposta di *Medicago truncatula* ai chito-oligosaccaridi esogeni che stimolano la micorrizza arbuscolare

T. Mazzarella

Introduzione

L'espressione genica nelle piante è fortemente regolata durante le varie fasi dello sviluppo della simbiosi micorrizica arbuscolare. Tale simbiosi inizia con uno scambio di segnali chimici, che mediano il reciproco riconoscimento, tra i funghi AM (micorrizici arbuscolari) ed i loro ospiti vegetali. Le radici rilasciano strigolattone i quali stimolano il metabolismo, la crescita e la ramificazione ifale, aumentando in tal modo le possibilità di un contatto fisico con le radici dell'ospite (Besserer et al. 2008, Waters et al. 2017). I funghi AM, invece, rilasciano molecole diffusibili (Myc-factors) che stimolano la risposta simbiotica della pianta. Tra i segnali fungini figurano oligomeri di chitina a corta catena (CO) e lipo-chito oligomeri (LCO) (Maillet et al. 2011, Genre et al. 2013). Un recente studio (Volpe et al. 2020) ha provato che l'applicazione dei CO esogeni promuove lo sviluppo delle simbiosi AM nella specie modello *Medicago truncatula* Gaertn. (Fabaceae).

Con l'obiettivo di approfondire l'effetto del CO sulla pianta ospite, nel corso di questo lavoro di tesi sono stati studiati i profili di espressione genica di *M. truncatula* cresciuta in vaso in presenza ed in assenza dell'inoculo del fungo AM [*Funneliformis mosseae* [T.H. Nicolson & Gerd.] C. Walker & A. Schüßler], e con o senza l'applicazione del CO.

Materiali e Metodi

Lo studio è stato condotto in serra, utilizzando come modello *M. truncatula* 'Jemalong' (line A17). I semi, dopo essere stati sterilizzati, sono stati posti in capsule Petri con Plant-Agar e mantenuti a 4 °C al buio per due giorni, successivamente sono stati mantenuti a 23 °C fino alla germinazione. Le plantule sono state quindi trasferite in vaso (9 × 9 × 12 cm) con sabbia grossolana sterile (0,4-0,8 mm) e fertilizzate una volta a settimana con soluzione nutritiva Long Ashton (Hewitt 1966). Sono state utilizzate 5 piante per ognuna delle quattro condizioni sperimentali: 1) controllo (CTR), privo sia del trattamento CO che dell'inoculo con fungo AM; 2) controllo trattato con CO (CTR+CO); 3) micorrizzato (MYC), inoculato ma in assenza del trattamento CO; 4) micorrizzato trattato con CO (MYC+CO). Il trattamento con chito-oligosaccaridi è stato applicato a 21 e 23 giorni dopo il trasferimento delle piante in vaso; sulla superficie del substrato contenuto in ciascun vaso è stata spruzzata una soluzione (1 g/L) di una miscela commerciale di CO (compresa tra CO2 e CO5). Le piante di *M. truncatula* sono state raccolte

10, 14, 21 e 28 giorni dopo l'inoculazione per estrarre l'RNA totale dall'apparato radicale. IGA Technology Services Srl (Udine) ha eseguito un'analisi di RNA-seq con un sistema di next-generation sequencing (NGS); TruSeq stranded mRNA kit (Illumina, San Diego, CA) è stato usato per la preparazione della libreria, e il sequenziamento è stato effettuato con piattaforma Illumina NextSeq 500. Al fine di studiare più in dettaglio la regolazione genica locale in risposta alla percezione di CO, la soluzione di CO è stata applicata alle colture di organi radicali (ROCs) trasformate con *Agrobacterium rhizogenes* (Riker) Conn utilizzando un'applicazione mirata e un protocollo di campionamento.

Risultati

È stata svolta un'analisi globale del dataset con diversi strumenti bioinformatici per comprendere e visualizzare i dati. L'analisi della varianza sui dati normalizzati del trascrittoma ha evidenziato come l'inoculazione con il fungo abbia avuto un'influenza maggiore sull'espressione genica del trattamento con i CO e come il tempo sia stato il fattore più influente sulla variazione dell'espressione genica. Osservando, però, individualmente ogni time points è emerso che la varianza dipendente dal CO è maggiore a 10 giorni, quando ancora la simbiosi con il fungo AM è ad uno stadio precoce. Un'analisi pairwise MapMan sui DEGs ha permesso di individuare le vie metaboliche maggiormente coinvolte, così come i geni maggiormente downregolati e upregolati. Questa ulteriore analisi ha consentito di notare come nelle piante MYC, non trattate, il trascrittoma radicale sia stato principalmente downregolato e le vie metaboliche poco attive ai time points più precoci. Al contrario, nelle piante trattate con CO a 14 giorni, alcuni geni marker della simbiosi AM sono risultati già upregolati (VAPYRIN, DMI2, ERN1, CERBERUS, NSP1, NSP2). Tali risultati confermano il ruolo dei CO come elicitori della risposta alla simbiosi.

Discussione

L'analisi dei dati dell'RNA-seq ha fornito una visione dettagliata dell'impatto del CO sul trascrittoma di *M. truncatula*, consentendo il confronto dei profili di espressione genica a ogni time point sperimentale. Il trattamento con CO ha condizionato fortemente l'espressione genica vegetale, in piante sia inoculate che non inoculate, in particolare al time point più breve (10 giorni). L'analisi delle piante CTR+CO ha indicato che l'effetto del CO diminuisce durante i successivi time points (14, 21, 28 giorni), mentre uno scenario più complesso è stato registrato nelle piante inoculate, dove l'espressione genica viene anche drasticamente modificata dallo sviluppo del fungo AM. Le piante MYC hanno raggiungono il massimo livello di regolazione a 28 giorni, mentre una condizione comparabile è stata raggiunta a 14-21 giorni nei campioni MYC+CO. In effetti, studi precedenti supportano l'ipotesi che il trattamento con CO abbia accelerato lo sviluppo della simbiosi (Volpe et al. 2020). Questa analisi ha rivelato la regolazione precoce di numerosi geni vegetali marker coinvolti nelle risposte di segnalazione e 'accommodation' del fungo nelle cellule radicali vegetali. Nel complesso le nostre analisi hanno ampiamente caratterizzato la risposta della pianta ospite al CO, confermando il ruolo di queste molecole come Myc-factors e la loro capacità di accelerare lo sviluppo del fungo AM. Tali risultati sono importanti per un uso di queste molecole come promotori della simbiosi AM nelle pratiche agricole sostenibili.

Letteratura citata

- Besserer A, Bécard G, Jauneau A, Roux C, Séjalon-Delmas N (2008) GR24, a synthetic analogue of strigolactones, stimulates the mitosis and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* by boosting its energy metabolism. *Plant Physiology* 148: 402-413.
- Genre A, Chabaud M, Balzergue C, Puech-Pagès V, Novero M, Rey T, Fournier J, Rochange S, Bécard G, Bonfante P, Barker DG (2013) Shortchain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺-spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytologist* 198(1): 190-202.
- Hewitt EJ (1966) Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition. Technical Communication No. 22. Commonwealth Bureau, London. 241 pp.
- Maillet F, Poinot V, André O, Puech-Pagès V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel A, Martinez EA, Driguez H, Bécard G, Dénariéj (2011) Fungal lipochitoooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469(7328): 58-63.
- Volpe V, Carotenuto G, Berzero C, Cagnina L, Puech-Pages V, Genre A (2020) Short chain chito-oligosaccharides promote arbuscular mycorrhizal colonization in *Medicago truncatula*. *Carbohydrate Polymers* 229: 115505.
- Waters MT, Gutjahr C, Bennett T, Nelson DC (2017) Strigolactone Signaling and Evolution. *Annual Reviews of Plant Biology* 68: 291-322.

Candidata: Teresa Mazzarella

Relatore: Andrea Genre

Correlatore o Relatore esterno: Veronica Volpe

Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università di Torino, Largo Paolo Braccini 2, 10095 Grugliasco (Torino)

Anno di discussione: 2020

Caratterizzazione del microbiota associato alle radici di erba medica coltivata secondo le linee guida dell'agricoltura simbiotica per la produzione lattiero-casearia

P. Appendino

Introduzione

Le comunità microbiche del suolo sono tra le più abbondanti, complesse ed eterogenee presenti sul nostro pianeta e sono responsabili di molte funzioni fondamentali per gli ecosistemi (Bardgett, van der Putten 2014). I due gruppi più importanti di organismi all'interno di queste comunità sono i batteri (es. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-PGPR e batteri azotofissatori endosimbionti affini al genere *Rhizobium*) ed i funghi (es. micorrizici arbuscolari-AM) (Bonfante, Genre 2010, du Jardin 2015, Santoyo et al. 2016). La diversità nelle popolazioni di microrganismi risulta fortemente influenzata dalle attività umane ed è ormai noto che l'intensificazione delle attività agricole convenzionali determina l'impoverimento delle comunità microbiche dei suoli (Nannipieri et al. 2003). Al fine di migliorare la sostenibilità ambientale dell'agricoltura, senza comprometterne le rese, sono stati proposti diversi metodi di coltivazione e allevamento innovativi. Uno di questi è la cosiddetta "agricoltura simbiotica" la quale prevede l'impiego di consorzi di microrganismi e di sostanze naturali che mantengono e sviluppano la sostenibilità microbiologica dei suoli e delle piante.

Il presente lavoro di tesi, svolto nell'ambito del progetto MicroBOOST, ha l'obiettivo di valutare l'impatto degli inoculi microbici benefici utilizzati dall'agricoltura simbiotica sulle colture di erba medica (*Medicago sativa* L. 'Padus', leguminosa emicriptofita che rappresenta la principale specie foraggera proteica italiana) nella filiera lattiero-casearia piemontese.

Materiali e Metodi

Lo studio di campo è stato condotto nei comuni di Monasterolo di Savigliano e Murello (Cuneo) tra l'autunno del 2017 e l'autunno del 2019. La cultivar studiata, 'Padus', è diffusa in Piemonte ed in particolare nella provincia di Cuneo dove sono state eseguite le sperimentazioni. L'inoculo microbico commerciale utilizzato in questo studio è MICOSAT F (CCS Aosta S.r.l.). Sono stati effettuati due trattamenti con MICOSAT F (1 kg/ha) formulato in polvere: il primo al momento della semina tramite concia dei semi; il secondo all'inizio del periodo vegetativo dell'anno 2018. Sono state indagate le differenze nelle comunità microbiche del suolo in relazione alla diversa gestione dei medicaï (conduzione convenzionale o simbiotica). Nel dettaglio, è stata valutata la resilienza delle comunità microbiche del suolo in medicaï trattati con inoculi per la prima volta ed in medicaï in cui la somministrazione degli inoculi avveniva da più di 5 anni. Le comunità microbiche del suolo e della rizosfera sono state analizzate seguendo una pipeline bioinformatica appositamente sviluppata per le analisi di metabarcoding tramite i software QIIME2 ed R.

Risultati

I risultati hanno evidenziato che le diverse nicchie (suolo, rizosfera ed endosfera radicale) ospitano comunità microbiche profondamente diverse e che gli inoculi microbici hanno effetti molto diversi su ognuna di esse. Sono state individuate complessivamente 11535 Operational Taxonomic Units (OTUs) procariotiche e 2059 OTUs fungine, distribuite in modo disomogeneo nelle tre nicchie (circa 3000 OTUs procariotiche e 500 fungine per ogni campione della nicchia suolo, meno di 1000 OTUs procariotiche e 100 fungine per ogni campione dell'endosfera radicale). È emerso come la conduzione dei medicaï (convenzionale o simbiotica) abbia avuto l'impatto maggiore sulla definizione della struttura del microbiota del suolo. Le comunità microbiche dei campi inoculati, infatti, sono risultate nel complesso più strutturate di quelle dei campi non inoculati (presenza di treatment-sensitive OTUs indicative ed esclusive dei campi simbiotici nei networks di co-occorrenza). È stata valutata anche la resilienza delle comunità microbiche sottoposte ai diversi trattamenti. Non sono emerse differenze significative (p -value > 0,05) nell'abbondanza o nella composizione tra le comunità microbiche dei campi simbiotici, a prescindere dalla disparità nella distribuzione dell'inoculo microbico. Analogamente non sono state osservate differenze significative tra le comunità microbiche dei campi convenzionali. Un altro aspetto emerso da questo studio è l'importanza delle proprietà chimico-fisiche dei suoli, le quali diventano delle "driving forces" in grado di modificare una determinata comunità microbica.

Discussione

I risultati ottenuti nel corso di questa ricerca suggeriscono che la diversa conduzione dei campi (convenzionale o simbiotica) comporti delle differenze in termini di ricchezza (biodiversità) e stabilità delle comunità microbiche del suolo. In un contesto di forte resilienza delle comunità microbiche native, i microbiota dei campi simbiotici sono risultati omogenei tra loro, indipendentemente dal rinnovo dell'inoculo microbico.

Analogamente, le comunità dei campi convenzionali sono state poco influenzate dalla singola somministrazione di inoculo microbico. Questo suggerisce che non sia sufficiente una singola somministrazione di inoculo microbico per modificare il microbiota in maniera stabile.

Letteratura citata

- Bardgett RD, van der Putten WH (2014) Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature* 515(7528): 505-511.
- Bonfante P, Genre A (2010) Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications* 1: 48.
- du Jardin P (2015) Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae* 196: 3-14.
- Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellaria G, Renella G (2003) Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 54: 655-670.
- Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, del Carmen Orozco-Mosqueda M, Glick BR (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research* 183: 92-99.

Candidato: Pietro Appendino

Relatore: Andrea Genre

Correlatore o Relatore esterno: Enrico Ercole

Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università di Torino, Largo Paolo Braccini 2, 10095 Grugliasco (Torino)

Anno di discussione: 2020

Studio dei processi di segnalazione in pianta e in fungo nelle micorrize arbuscolari

A. Giletta

Introduzione

Le micorrize arbuscolari (AM) sono endosimbiosi che si instaurano tra i funghi del subphylum Glomeromycotina ed il 70-90% delle piante terrestri (Bonfante, Genre 2010). La comunicazione tra i due simbionti è basata su un sofisticato scambio di molecole diffusibili. In particolare, il fungo produce i cosiddetti Myc-factor (Oldroyd 2013) che, una volta percepiti dalla pianta, attivano in essa una via di trasduzione del segnale caratterizzata da "Calcium spiking", cioè variazioni della concentrazione di calcio a livello nucleare (Russo et al. 2013). Il presente lavoro di tesi ha come obiettivo quello di studiare diversi aspetti della segnalazione AM in *Oryza sativa* L., *Medicago truncatula* Gaert. e *Gigaspora margarita* W.N. Becker & I.R. Hall, utilizzando la microscopia confocale e diverse sonde fluorescenti.

Materiali e Metodi

In *O. sativa* è stata valutata l'importanza di due canali ionici presenti sull'involucro nucleare (CASTOR e POLLUX) nell'attivazione della via di trasduzione del segnale che porta all'instaurarsi della simbiosi. I due rispettivi mutanti sono stati dapprima trattati con specifici Myc-factor, chiamati chito-oligosaccaridi (CO) e successivamente, grazie ad una sonda fluorescente sensibile al calcio (YC3.6 Cameleon) espressa nel nucleo, si è valutata la presenza di Ca²⁺ spiking.

In *M. truncatula* è stato investigato il ruolo dell'endocitosi mediata da clatrina nella via di trasduzione del segnale, bloccando la formazione delle vescicole con l'inibitore Tirofostina A23 (Wang et al. 2016). In seguito i campioni, esprimenti il costrutto 35S:NupYC2.1, sono stati trattati con CO per valutare se il blocco della via endocitotica fosse in grado di influenzare la capacità di generare Ca²⁺ spiking. Infine, per studiare il ruolo del calcio come secondo messaggero in *G. margarita*, si è provato a sviluppare un protocollo per l'internalizzazione di un'innovativa sonda fluorescente per il calcio chiamata TAT-GCaMP. Siccome in fungo non è mai stata ottenuta una trasformazione stabile, l'approccio è stato quello di utilizzare la proteina virale chiamata TAT (transactivator of transcription del HIV-1) in grado di traslocare attraverso la membrana plasmatica proteine fuse con essa (Moscatiello et al. 2014). In particolare, per la messa a punto del protocollo si è utilizzata la sonda TAT-GFP in modo da poter monitorare il segnale di fluorescenza indipendentemente dalla presenza di calcio.

Risultati

Durante le acquisizioni al microscopio confocale, in entrambi i mutanti osCASTOR e osPOLLUX, precedentemente trattati con CO, non è mai stata osservata alcuna variazione della concentrazione di calcio a livello nucleare. Come controllo si è utilizzata una linea wild type in cui, a differenza dei mutanti, circa il 55% delle cellule trattate rispondevano generando Ca²⁺ spiking.

Nello studio su *M. truncatula*, si sono ottenuti risultati molto interessanti. Infatti, al contrario di quanto ci si

aspettasse, i campioni in cui è stata inibita l'endocitosi mediata da clatrina con la Tirfostina A23 sono comunque risultati essere sensibili al trattamento con CO, generando numerosi picchi di calcio durante le osservazioni al microscopio confocale.

Infine, cercando di sviluppare un nuovo protocollo per l'internalizzazione della sonda TAT-GFP, sono emerse numerose difficoltà che solo in parte sono state superate. Uno dei principali problemi è stata l'immobilizzazione delle ife appena germinate sul vetrino portaoggetti in modo da poter monitorare al microscopio confocale la sonda una volta introdotta al loro interno. Dopo numerosi tentativi il sistema più efficace è risultato essere quello di trasferire manualmente le singole spore sul vetrino, coperto da un sottile strato di agar-acqua.

Discussione

Dai dati raccolti è risultato evidente che in riso, così come nelle leguminose, entrambi i canali ionici CASTOR e POLLUX ricoprono un ruolo fondamentale nella via di trasduzione del segnale che porta all'instaurarsi della simbiosi AM. Infatti, quando anche solo uno di questi due componenti è assente, il calcio non viene rilasciato nel nucleoplasma dove non potrà quindi agire da secondo messaggero regolando la trascrizione di geni direttamente coinvolti nelle prime fasi della simbiosi.

Gli inattesi risultati ottenuti in *M. truncatula* hanno suggerito una nuova ipotesi su come la pianta sia in grado di rispondere in modo differenziale a funghi AM e batteri azoto-fissatori, nonostante questi attivino la stessa via di trasduzione del segnale. Secondo questa ipotesi, ancora da validare, l'endocitosi mediata da clatrina e la conseguente riallocazione all'interno della cellula vegetale del complesso recettoriale responsabile della percezione dei segnali diffusibili prodotti dal fungo o dal batterio, potrebbero rappresentare l'elemento discriminante che permette alla pianta di capire quale tipo di simbiosi andare ad instaurare.

Per quanto riguarda lo sviluppo del protocollo per l'internalizzazione della sonda TAT-GCaMP in *G. margarita*, i risultati ottenuti non sono ancora soddisfacenti. Nonostante il superamento dell'ostacolo legato all'immobilizzazione del campione, infatti, rimangono irrisolte alcune problematiche. Una tra queste consiste nel riuscire ad indebolire la parete cellulare per agevolare l'ingresso della sonda, senza però compromettere eccessivamente l'integrità della struttura ifale. Un ulteriore ostacolo è rappresentato dall'elevata densità del citoplasma fungino che si è visto limitare notevolmente la diffusione della sonda una volta all'interno dell'ifa. In conclusione, studi aggiuntivi risultano necessari per l'ottenimento di un protocollo efficace nell'imaging di sonde fluorescenti in *G. margarita*.

Letteratura citata

- Bonfante P, Genre A (2010) Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications* 1: 48.
- Moscatiello R, Sello S, Novero M, Negro A, Bonfante P, Navazio L (2014) The intracellular delivery of TAT-aequorin reveals calcium-mediated sensing of environmental and symbiotic signals by the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *New Phytologist* 203(3): 1012-1020.
- Oldroyd GED (2013) Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology* 11: 252-263.
- Russo G, Spinella S, Sciacca E, Bonfante P, Genre A (2013) Automated analysis of calcium spiking profiles with CaSA software: two case studies from root-microbe symbioses. *BMC Plant Biology* 13: 224.
- Wang C, Hu T, Yan X, Meng T, Wang Y, Wang Q, Zhang X, Gu Y, Sánchez-Rodríguez C, Gadeyne A, Lin J, Persson S, van Damme D, Li C, Bednarek SY, Pan J (2016) Differential regulation of clathrin and its adaptor proteins during membrane recruitment for endocytosis. *Plant Physiology* 171(1): 215-229.

Candidata: Alice Giletta

Relatore: Andrea Genre

Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università di Torino, Largo Paolo Braccini 2, 10095 Grugliasco (Torino)
Anno di discussione: 2020

Purificazione di chito-oligosaccaridi da miceli fungini e loro utilizzo come stimolatori della simbiosi micorrizica arbuscolare in *Medicago truncatula*

E. Moscato

Introduzione

Le micorrize arbuscolari (AM) rappresentano la simbiosi mutualistica più diffusa, dal punto di vista geografico e filogenetico, all'interno del regno delle piante (Smith, Read 2008). I funghi AM favoriscono la fitness delle piante ospiti aumentando l'assorbimento di nutrienti e incrementando la tolleranza a stress biotici e abiotici.

Le piante, invece, ricambiano i funghi simbiotici con composti organici prodotti mediante il processo fotosintetico. L'induzione della simbiosi è mediata dal riconoscimento di molecole come i chito-oligosaccaridi (Myc-COs), molecole a corta catena correlate al polimero della chitina (Oldroyd 2013, Gobbato 2015). Precedenti esperimenti svolti del nostro gruppo di ricerca hanno dimostrato che l'applicazione di Myc-COs esogeni può stimolare lo sviluppo della simbiosi in campo, un aspetto fondamentale per l'introduzione delle simbiosi AM nelle pratiche di agricoltura sostenibile. I Myc-COs commerciali, estratti da crostacei, risultano inoltre attualmente troppo costosi per l'applicazione su larga scala. I principali obiettivi del lavoro sperimentale svolto nell'ambito di questa tesi sono: 1) confrontare la bioattività di Myc-COs derivanti da miceli fungini e da crostacei; 2) sviluppare un protocollo economico basato sulla purificazione di Myc-COs da miceli di funghi non-AM, mediante l'estrazione della chitina e la sua successiva idrolisi.

Materiali e Metodi

Per raggiungere il primo obiettivo sono state prodotte in fermentazione liquida le biomasse di due ceppi fungini filogeneticamente molto distanti tra loro: *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. e *Trichoderma viride* Pers., rispettivamente un basidiomicete e un ascomicete. Le biomasse ottenute sono state liofilizzate ed utilizzate per mettere a punto un protocollo per l'estrazione e la purificazione dei Myc-COs. La qualità dei chito-oligomeri estratti è stata valutata attraverso analisi NMR e la loro bioattività mediante un biosaggio di signalling, basato sulla registrazione dei segnali nucleari del Ca^{2+} presenti nelle cellule epidermiche della radice. Successivamente, è stata analizzata l'efficienza dei Myc-COs e valutato il loro coinvolgimento nello sviluppo della simbiosi AM in *Medicago truncatula* Gaertn. inoculate con il fungo AM *Funneliformis mosseae* (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler. I protocolli di produzione della biomassa fungina e purificazione dei Myc-COs sono stati ottimizzati in vista dello scale up dell'intero processo, nell'ottica di ridurre l'uso di reagenti, tempi e costi di produzione. Con lo scopo di ottimizzare la produzione della biomassa fungina è stato dilatato il tempo di incubazione ed aumentato il volume della coltura. In aggiunta, per ridurre i costi di produzione ed agire in un'ottica di economia circolare, sono stati utilizzati diciannove sottoprodotti agroindustriali, come ad esempio scarti della produzione di quarta gamma, esuvie di insetto derivanti dalla produzione delle farine proteiche, come terreni culturali alternativi al terreno MEA (Agar Estratto di Malto) standard.

Risultati

La produzione della biomassa fungina, l'efficienza di purificazione della chitina e dei Myc-COs, la bioattività come segnale per lo sviluppo della simbiosi AM e le caratteristiche di biosicurezza hanno indicato *P. ostreatus* (un microorganismo GRAS, Generally recognised as safe) come il miglior candidato per lo scale up del protocollo di purificazione di Myc-COs da biomassa fungina. L'analisi NMR ha mostrato un grado di acetilazione significativamente più alto per i COs estratti da fungo con rispetto ad i COs di gambero e questo è stato correlato con una più alta bioattività dei Myc-COs fungini, riscontrata attraverso il saggio del Ca^{2+} spiking. I COs purificati dalla biomassa di *P. ostreatus* sono stati utilizzati anche per testare il loro effetto sulla crescita e lo sviluppo della simbiosi AM in *M. truncatula*. I Myc-COs hanno stimolato la colonizzazione da parte dei funghi AM in modo dose-dipendente, con il miglior risultato alla concentrazione di 1 g/L. Inoltre, durante la sperimentazione volta all'ottimizzazione dell'intero processo, la crescita di *P. ostreatus* non è stata influenzata negativamente dall'aumento del tempo di incubazione né del volume del sistema culturale. *P. ostreatus* si è dimostrato capace di crescere su tutti i diciannove differenti terreni culturali costituiti da sottoprodotti industriali con risultati molto promettenti. L'impiego di alcune matrici ha permesso di ottenere rese di produzione paragonabili a quelle ottenute con l'utilizzo di un terreno standard, come nel caso degli scarti vegetali provenienti dalla produzione di quarta gamma e delle esuvie di insetto.

Discussione

Il contenuto di chitina e chitosano dei funghi dipende da diversi fattori, quali il ceppo fungino, la fase di sviluppo del micelio, il terreno e le condizioni culturali (Nwe et al. 2010). Tuttavia, anche il metodo di estrazione può agire sulla recovery di COs estratti dalla biomassa fungina. I nostri risultati dimostrano che la parete fungina di funghi filogeneticamente distanti tra loro, presenta differenze nella composizione e nella struttura. Tali differenze inficiano sull'efficienza dell'estrazione dei COs, se effettuata mediante lo stesso un protocollo di estrazione chimica. Il grado di acetilazione dei chito-oligomeri è considerato uno dei principali caratteri che ne influenza la solubilità, la bioattività e la performance in molte applicazioni (Abdel-Salam 2013). Dal confronto con i COs commerciali (derivanti dai crostacei) tutti i COs fungini saggiati hanno rivelato un grado di acetilazione maggiore. Secondo le nostre osservazioni, i gruppi acetili sembrano avere un ruolo fondamentale per la loro bioattività in vitro. I risultati ottenuti, basati sulle analisi del Ca^{2+} spiking e sulle analisi NMR, mostrano una correlazione positiva tra l'intensità della bioattività dei COs ed il loro grado di acetilazione. Tuttavia, si tratta di un sistema biologico complesso, all'interno del quale molti fattori agiscono in sinergia. Infatti, un altro aspetto da considerare è il grado di polimerizzazione dei chito-oligomeri. In *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., i chito-oligomeri

chitina a catena lunga (CO8) vengono riconosciuti dai recettori associati alla membrana AtCERK1, come elicitori della risposta di difesa (Wan et al. 2008), mentre i chitoligomeri a catena corta (CO4/CO5) attivano la risposta simbiotica (Genre et al. 2013). I COs commerciali utilizzati per questo studio erano prevalentemente rappresentati da CO2 e CO5, mentre i COs fungini estratti durante il corso di questo studio erano costituiti da una miscela di molecole con diverso grado di polimerizzazione. La bioattività dei COs potrebbe essere quindi legata ad entrambi i parametri ed essere dovuta ad una combinazione del grado di acetilazione e di polimerizzazione. In ultimo, durante gli studi effettuati in vivo mediante l'utilizzo del sistema modello *Medicago truncatula*, è stata osservata una correlazione dose-risposta. Nel dettaglio, la progressiva stimolazione della colonizzazione AM in *M. truncatula*, trattata con concentrazione crescenti di COs derivanti dalla biomassa fungina di *P. ostreatus*, hanno confermato i risultati ottenuti in vitro, mediante l'osservazione del Ca²⁺ spiking. I funghi sono quindi un'ottima fonte di COs e *P. ostreatus* si è rivelato il ceppo fungino più promettente in termini di produzione di biomassa fungina, produzione e bioattività di Myc-COs. In aggiunta, si tratta di un organismo GRAS, ad oggi uno dei funghi più coltivato ed utilizzato in molti settori, come quello alimentare e farmaceutico.

Letteratura citata

- Abdel-Salam HA (2013) Evaluation of nutritional quality of commercial cultured indian white shrimps *Penaeus Indicus*. International Journal of Nutrition and Food Sciences 2(4): 160-166.
- Genre A, Chabaud M, Balzergue C, Puech-Pagès V, Novero M, Rey T, Fournier J, Rochange S, Becard G, Bonfante P, Barker DG (2013) Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. New Phytologist 198(1): 190-202.
- Gobbato (2015) Recent developments in arbuscular mycorrhizal signaling. Current Opinion in Plant Biology 26: 1-7.
- Nwe N, Tamura H, Furuike T (2010) Production of Fungal Chitosan by Enzymatic Method and Application in Plant Tissue Culture and Tissue Engineering: 11 Years of Our Progress, Present Situation and Future Prospects. In: Elnashar MM (Ed.) Biopolymers: 135-162. IntechOpen, Rijeka.
- Oldroyd GED (2013) Speak, friend, and enter: signaling system that promote beneficial symbiotic association in plants. Nature Review Microbiology 11: 252-263.
- Smith SE, Read DJ (2008) Mycorrhizal Symbiosis. 3rd ed. Academic Press, London. 800 pp.
- Wan J, Zhang XC, Neece D, Ramonell KM, Clough S, Kim SY, Stacey MG, Stacey G (2008) LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. The Plant Cell 20(2): 471-481.

Candidata: Elisa Moscato

Relatore: Andrea Genre

Correlatore o Relatore esterno: Cristina Varese

Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università di Torino, Via Accademia Albertina 13, 10123 Torino

Anno di discussione: 2019

Analisi delle relazioni cross-taxon in ecosistema urbano: un caso di studio nella città di Trieste

L. Zara

Introduzione

Sebbene l'urbanizzazione sia considerata una delle cause principali di omogeneizzazione ed estinzione biotica (McKinney 2006), le aree verdi urbane possono essere importanti rifugi per la biodiversità (Alvey 2006). Conoscere come le specie si distribuiscono in tali contesti è fondamentale per definire appropriate misure di conservazione e gestione (Margules, Pressey 2000, Kowarick 2011). Mediante lo studio di gruppi tassonomici "surrogati", ovvero specie ben studiate, tassonomicamente di facile determinazione, facilmente campionabili ed i cui pattern di diversità sono correlati a quelli di altri gruppi tassonomici, è possibile inferire la distribuzione di specie più difficili da monitorare (Margules, Pressey 2000). Questo approccio è stato indagato in diversi contesti, ma pochi studi sono stati condotti in ambiente urbano. In questo lavoro di tesi, svolto in collaborazione con il Civico Museo di Storia Naturale di Trieste, è stata analizzata la biodiversità di piante vascolari, formiche, coleotteri carabidi e curculionidi in sei aree verdi urbane della città di Trieste (Friuli-Venezia Giulia). Lo scopo della ricerca è stato quello di testare il ruolo delle piante vascolari come potenziale surrogato della diversità di formiche e coleotteri carabidi, investigando anche l'influenza delle variabili ambientali su tali relazioni.

Materiali e Metodi

Sono state campionate le seguenti aree verdi: Bosco Bovedo (BB), Orto Lapidario (OL), Giardino Pubblico (GP), Museo di Storia Naturale (MU) e Bosco Farneto (due aree: BF1 e BF2). Il campionamento degli artropodi è stato

effettuato interrando, in ciascun sito, dieci trappole a caduta per circa due settimane. All'interno di plot quadrati (10 × 10 m) centrati nei punti in cui sono state interrate le trappole, è stato effettuato il campionamento della vegetazione e delle variabili ambientali (legno morto, lettiera, disturbo antropico, rocciosità, pietrosità, suolo nudo). I pattern di diversità di ciascun gruppo tassonomico sono stati analizzati attraverso l'analisi partitiva della diversità, oltre che tramite il calcolo di ricchezza e composizione in specie. La congruenza tra i taxa è stata testata escludendo dall'analisi i curculionidi, dato lo scarso numero di ritrovamenti e la ridotta significatività nell'analisi dei dati. La congruenza tra i pattern di diversità (ricchezza e composizione in specie) è stata calcolata tra coppie di taxa mediante il test di Mantel semplice, mentre l'effetto delle variabili ambientali su tali correlazioni è stato valutato attraverso il test di Mantel parziale. L'analisi di co-corrispondenza, applicata sulla composizione in specie, ha permesso di valutare la capacità delle piante nel predire la composizione in specie di carabidi e formiche. Inserendo nell'analisi le variabili ambientali, infine, sono state investigate le condizioni abiotiche che influenzano la distribuzione delle specie.

Risultati

In totale sono stati rinvenuti 106 individui appartenenti a 13 specie di carabidi, 67 individui ascrivibili a 12 specie di curculionidi, 15387 individui ripartiti in 36 specie di formiche e 216 specie di piante vascolari. In OL e GP sono stati osservati, rispettivamente, il maggior ed il minor numero medio di specie di piante, carabidi e formiche. Per quanto riguarda i curculionidi, essi sono stati campionati in maggior ed in minor numero, rispettivamente, in BB e GP. Le analisi condotte con i test di Kruskal-Wallis e di Kruskal-Wallis multiple comparison hanno evidenziato una differenza significativa, tra alcuni siti, nella distribuzione della ricchezza in specie di piante e formiche. In particolare, sono emerse differenze significative nelle distribuzioni di piante tra OL-GP, e in quelle di formiche tra OL-GP, MU-GP e BB-GP. I siti GP, OL e MU si sono rivelati essere le aree con la maggior diversità floristica, e questo stesso pattern è stato osservato sulla composizione in specie di formiche. Al contrario, le composizioni di carabidi più eterogenee sono state trovate in MU e OL, ma non in GP, mentre la composizione di curculionidi più eterogenea è stata riscontrata in BF2. La ricchezza in specie tra le coppie di taxa (piante-carabidi, piante-formiche, formiche-carabidi) è risultata positivamente e significativamente correlata, e tale relazione è stata mantenuta anche testando l'eventuale effetto delle variabili ambientali. I pattern di congruenza calcolati invece sulla composizione in specie hanno dato risultati diversi: nonostante la correlazione nella composizione in specie tra piante-carabidi e piante-formiche sia rimasta positiva e significativa, quella tra carabidi-formiche è risultata negativa, ma non significativa. Questo risultato è stato confermato anche testando l'effetto delle variabili ambientali, le quali sembrerebbero svolgere un ruolo significativo anche nella relazione tra piante-carabidi. La composizione in specie dei carabidi, quindi, sembrerebbe essere maggiormente influenzata dalle variabili ambientali che dalla vegetazione. L'analisi delle co-corrispondenze ha permesso di visualizzare i pattern distribuzionali: piante, carabidi e formiche si sono distribuiti secondo un gradiente dettato dalla presenza di legno morto e disturbo antropico, seguendo quindi il grado di urbanizzazione dei siti. Tale gradiente è chiaramente visibile dall'analisi effettuata con i dati di presenza-assenza, mentre con i dati di abbondanza la correlazione tra piante-carabidi non è significativa. Al contrario, l'analisi con i dati di abbondanza tra piante-formiche non solo ha rimarcato il gradiente già individuato precedentemente, ma ne ha evidenziato un altro definito dalla presenza di suolo nudo/umidità.

Discussione

In OL e MU diversi fattori come l'eterogeneità dell'habitat, la presenza di specie non native e la connessione con altre aree verdi possono essere stati cruciali nel determinare la relativamente alta biodiversità di formiche, coleotteri e piante. L'elevata diversità di piante a disposizione in OL e MU, inoltre, genera la presenza di diversi microhabitat che possono essere colonizzati da diverse altre specie. Al contrario, nei siti meno urbanizzati (BB, BF1 e BF2), sono stati riscontrati livelli intermedi di biodiversità. Per quanto concerne la comunità vegetale, in questi siti sono state identificate meno specie aliene rispetto ai siti più urbanizzati e l'omogeneità strutturale potrebbe aver avuto un'influenza sulle comunità di carabidi e formiche. Tuttavia, il maggior substrato roccioso presente in BB sembrerebbe aver favorito una maggiore diversità di formiche rispetto a BF1 e BF2. In GP, invece, la ricchezza media di specie vegetali per plot è risultata essere la più bassa: sebbene le attività gestionali attuate nei giardini urbani possano aumentare la diversità vegetale (Blair 1996), le frequenti attività di manutenzione, la coltivazione di piante ornamentali e aliene, insieme alla frequentazione da parte delle persone, rappresentano un disturbo continuo che semplifica la struttura della vegetazione (McKinney 2002). Questo sembra avere un impatto anche sugli altri taxa considerati nel presente studio. Tuttavia, qui è stata registrata la maggior variazione in termini di composizione in specie di piante e di formiche. L'eterogeneità vegetazionale dei plot, attribuibile alle attività antropiche, consente la colonizzazione di diverse specie di formiche. Come evidenziato dalle analisi di congruenza tra i taxa, la comunità vegetale sembrerebbe influenzare direttamente la composizione in specie di formiche. Una grande diversità vegetale, infatti, fornisce diversi siti di annidamento e risorse alimentari (Alonso 2000). Le formiche agiscono inoltre come agenti di dispersione dei semi vegetali che contengono

elaiosoma e, attraverso la loro attività di scavo, influenzano positivamente le proprietà del suolo, garantendo aerazione e distribuzione degli elementi nutritivi (Folgarait 1998, Nkem et al. 2000). Al contrario, la variazione in composizione in specie dei coleotteri carabidi sembra essere determinata da fattori abiotici e solo indirettamente dalla vegetazione. Dall'analisi delle co-corrispondenze, le variabili abiotiche che in questo studio influenzano la comunità di coleotteri sono la presenza di legno morto, rocciosità e grado di disturbo antropico, tutti fattori che condizionano la prevalenza di una certa comunità vegetale. Le piante vascolari sono considerate buoni surrogati della diversità degli invertebrati (Panzer, Schwartz 1998) e il nostro studio ne conferma l'efficacia anche in contesto urbano.

Letteratura citata

- Alonso LE (2000) Ants as Indicators of Diversity. In: Agosti D, Majer JD, Alonso LE, Schultz TR (Eds.) *Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity*: 80-88. Smithsonian Institution Press, Washington and London.
- Alvey AA (2006) Promoting and preserving biodiversity in the urban forest. *Urban Forestry & Urban Greening* 5(4): 195-201.
- Blair RB (1996) Land use and avian species diversity along an urban gradient. *Ecological Applications* 6(2): 506-519.
- Folgarait PJ (1998) Ant biodiversity and its relationship to ecosystem functioning: a review. *Biodiversity & Conservation* 7(9): 1221-1244.
- Kowarik I (2011) Novel urban ecosystems, biodiversity, and conservation. *Environmental Pollution* 159(8-9): 1974-1983.
- Margules CR, Pressey RL (2000) Systematic conservation planning. *Nature* 405(6783): 243-253.
- McKinney ML (2002) Urbanization, biodiversity, and conservation. *BioScience* 52(10): 883-890.
- McKinney ML (2006) Urbanization as a major cause of biotic homogenization. *Biological Conservation* 127(3): 247-260.
- Nkem JN, de Bruyn LAL, Grant CD, Hulugalle NR (2000) The impact of ant bioturbation and foraging activities on surrounding soil properties. *Pedobiologia* 44(5): 609-621.
- Panzer R, Schwartz MW (1998) Effectiveness of a vegetation-based approach to insect conservation. *Conservation Biology* 12(3): 693-702.

Candidata: Laura Zara

Relatore: Giovanni Bacaro

Correlatori o Relatori esterni: Enrico Tordoni, Andrea Colla

Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste, Via Licio Giorgieri 10, 34127 Trieste

Anno di discussione: 2020

Il Ruolo della Botanica nelle Affinità Elettive (1809) di J.W. Goethe

A. Nardo

Introduzione

L'interesse per la botanica del giovane Johann Wolfgang von Goethe nacque con l'osservazione delle piante spontanee e coltivate che vivevano negli ambienti naturali, nei coltivi e nei giardini della corte di Weimar (Moiso 2002). Nel 1786 Goethe partì per l'Italia e fu proprio durante questo viaggio che i suoi interessi botanici cominciarono ad assumere una precisa formulazione (Goethe 1999). Lo scienziato sperava di trovare la cosiddetta "Urpflanze", la pianta originaria. Egli era convinto che la pianta archetipica rappresentasse la forma di tutte le altre piante. All'Orto Botanico di Padova Goethe ebbe la possibilità di osservare un esemplare di *Chamaerops humilis* L., nota anche come "palma di Goethe", in quanto proprio attraverso l'osservazione di questa pianta e di tutti gli stadi di crescita delle sue foglie, lo scienziato intuì di trovarsi di fronte ad una prima conferma concreta delle sue ipotesi sulla pianta originaria. Tali ipotesi si rafforzarono sempre più nelle successive tappe del suo viaggio, soprattutto a Palermo dove credette di aver finalmente trovato la pianta originaria. Fu dunque in questa città che Goethe scoprì la legge dell'organizzazione delle piante secondo la quale tutte le piante possono essere descritte attraverso un unico modello, la pianta originaria, formata da pochi elementi infinitamente mutabili e duplicabili (Moiso 2002).

Questa tesi vuole mettere in luce come ogni pianta e spazio del romanzo è simbolicamente collegato alle vicende dei quattro protagonisti: Eduard, Charlotte, Ottilie e il Capitano. Le trasformazioni sul paesaggio che conducono alla costruzione di un giardino paesaggistico, vanno di pari passo con le passioni dei personaggi attraverso la perdita del limite, della misura che caratterizza i loro percorsi interiori.

Materiali e Metodi

I materiali utilizzati per la stesura di questo lavoro sono stati innanzitutto testi riportati nel saggio "La Metamorfosi delle Piante" che hanno il ruolo di illustrare le teorie botaniche di Goethe e le sue scoperte. Il testo

“Viaggio in Italia” è stato invece fondamentale per delineare come tali teorie si sono formate. In secondo luogo, è stato analizzato il romanzo goethiano “Le Affinità Elettive”. In particolare, sono stati individuati e descritti gli elementi botanici presenti nel romanzo e la loro relazione con le vicende di ogni personaggio.

Risultati

Ciascun protagonista del romanzo ha un particolare rapporto con le piante e con lo spazio circostante. Eduard si occupa del giardino alla francese, come poi successivamente se ne occuperà Ottilie. Il giardino coltivato da Eduard è di tipo formale e le sue caratteristiche sono l'ordine e la misura. Vi si trovano infatti aiuole e serre ed è stato costruito in modo da scendere a terrazze verso la pianura (Cottone 1992). Egli ha una passione per le mode del tempo e le piante esotiche. Lo dimostrano il suo amore per i pioppi (*Populus L.*) ed i platani (*Platanus L.*) che egli ha salvato dalla volontà paterna di abatterli (Brosé 1976). Questi alberi venivano considerati esotici poiché erano stati importati in Germania dall'Italia. Nel romanzo hanno una evidente funzione simbolica in quanto i pioppi rappresentano la tristezza e il lutto, mentre i platani sono considerati gli alberi della sterilità, della morte e della caducità degli esseri umani (Goethe 1999). Tra gli alberi menzionati all'interno del romanzo figurano anche le querce (*Quercus L.*). I platani, al contrario delle querce, sono più estranei alla realtà tedesca e per questo si collegano alla figura di Ottilie, che è solita mantenere un rapporto di estraneità nei confronti della realtà. Il romanzo inoltre, si apre con Eduard che nel vecchio giardino del padre si occupa degli innesti; egli sta quindi cercando di imbrigliare e razionalizzare la natura. Gli innesti preannunciano la sua passione per le mode del tempo (Cottone 1992). Inizialmente, mentre Eduard era solito occuparsi del giardino, Charlotte si dedicava al parco, ovvero al giardino sentimentale che ha lo scopo di suscitare sensazioni ed emozioni. Solo successivamente, con l'arrivo del Capitano, il giardino di Charlotte si trasformerà in un giardino all'inglese classico. Già dalla metà dell'opera risulta chiaro che Charlotte amerà sempre più lavorare insieme al Capitano e rinuncerà con piacere al suo antico progetto nel parco. Eduard e Ottilie, invece, si dedicheranno alle cure del giardino. Il giardino è tradizionalmente il punto d'incontro degli amanti, è il cosiddetto “locus amoenus” dell'elegia classica e anche Goethe utilizza questo espediente per far incontrare da soli Eduard ed Ottilie. Il giardino è metafora dell'amore poiché è uno spazio fertile rispetto allo sterile ambiente cittadino e permette alla passione degli amanti di fiorire lontano dalle perverse e innaturali costrizioni della città (Bell 1991). I fiori hanno un ruolo molto importante nel romanzo. Essi si trovano sotto forma di fiori finti, di campo e ornamentali. Eduard fa addirittura preparare in un'occasione speciale la data e il nome di Ottilie sotto forma di lettere floreali. I fiori si trovano anche all'interno della cappella restaurata dall'architetto, il quale la affrescherà con festoni e ghirlande di fiori di cui si trovano modelli bellissimi in giardino. La natura fa ingresso nella cappella sotto forma di arte che è la stessa dei fiori artificiali la quale tenta di conferire alla natura una dimensione di eternità. Tra i fiori, gli astri (*Aster L.*) hanno un ruolo altamente simbolico. Insieme ai platani essi fanno parte della simbolica funeraria. Dopo l'allontanamento di Eduard dalla tenuta, Ottilie seminerà insieme al giardiniere tutte le cosiddette piante estive, ovvero quelle piante che sfidano il freddo e non smettono mai di fiorire. Gli astri soprattutto furono piantati numerosi a simboleggiare l'amore di Ottilie verso Eduard e il loro futuro ritrovarsi. Tuttavia, essi preannunciano la qualità funeraria che li contraddistinguere alla fine del romanzo quando saranno usati per adornare il capo della salma di Ottilie. Questi fiori avrebbero dovuto dare l'idea di un cielo stellato in terra (Cottone 1992). Quando Ottilie muore gli astri sono posti ad adornare il suo capo, mentre i fiori dipinti sulle pareti abbelliscono la cappella, la chiesa e la bara (Goethe 1999).

Discussione

Le “Affinità Elettive” sono un'opera ricca di elementi botanici. La loro funzione non è puramente estetica avente lo scopo di farci entrare nel vivo dei luoghi descritti dall'autore per mezzo di dettagliate e bellissime descrizioni, ma ogni elemento all'interno del romanzo ha un valore simbolico. In particolare, i cambiamenti che vediamo nel paesaggio vanno di pari passo con i cambiamenti e le vicende dei quattro protagonisti. Le “Wahlverwandschaften” si possono inoltre definire una perfetta sintesi del passaggio da un'epoca all'altra. All'interno della tenuta di Eduard è possibile distinguere i due modi di concepire il giardino che riflettono il passaggio dal classicismo al romanticismo (Baioni 1969). Da un lato, si ha il giardino formale di tradizione francese che rappresenta il dominio dell'uomo sulla natura e quindi l'assolutismo dell'ancien régime. Dall'altro, si vede il giardino all'inglese che esprime la libertà della natura che si identifica con gli elementi progressivi della nuova società liberale. Nel primo caso sono quindi fondamentali i concetti di artificiosità e regolarità, mentre nel secondo caso quelli di naturalezza e irregolarità (Cottone 1992). Il nuovo giardino di Charlotte si oppone al vecchio giardino del castello di Eduard che è un giardino razionale e geometrico alla francese e impone alla natura le forme dell'artificio. Il parco di Charlotte, invece, è un giardino all'inglese che si ispira all'immediatezza della natura (Goethe 1999). Il passaggio dal giardino francese al giardino all'inglese rappresenta la perdita del limite e della misura che caratterizza l'animo dei quattro protagonisti i quali si lasciano completamente andare alle loro passioni. Il fiore androgino, che nel saggio “Methamorphose der Pflanzen” era il

simbolo dell'umanesimo classico, diventa nel romanzo la cifra romantica dell'amore e della morte. In un passo del romanzo si deduce che Eduard e Ottilie raggiungono il piacere perfetto non con la congiunzione, ma attraverso la prossimità, il puro essere insieme dentro un'unica forma. La prossimità degli amanti ricorda dunque quella del maschile e del femminile all'interno della corolla del fiore androgino, ma non arriverà mai alla congiunzione celebrata nella "Matamorphose der Pflanzen" del 1798. Al contrario, qui i due principi sono sterili, non producono frutti, ma solo morte. Uno accanto all'altra, provando quel piacere perfetto, essi rappresentano il punto in cui il ciclo di natura non ha più futuro e la vita si ferma. Le Affinità Elettive si possono definire il romanzo della fine, una storia che conserva per i posteri un'epoca, il classicismo, ormai al tramonto (Goethe 1999).

Letteratura citata

- Baioni G (1969) *Classicismo e Rivoluzione: Goethe e la Rivoluzione francese*. Guida, Napoli. 349 pp.
- Bell M (1991) *Man and other plants: naturalistic anthropology in Goethe's writing from 'Werther' to 'Die Wahlverwandtschaften'*. Clarendon Press, Oxford. 326 pp.
- Brosé C (1976) *Park und Garten in Goethes Wahlverwandtschaften*. In: Winter C (Ed.) *Park und Garten im 18. Jahrhundert*. Heidelberg.
- Cottone M (1992) *Romanzo e Spazio Simbolico. «Le affinità elettive» di J. W. Goethe e «Effi Briest» di Th. Fontane*. Flaccovio, Palermo. 180 pp.
- Goethe JW (1999) *Le affinità elettive*, a cura di Giuliano Baioni, traduzione di Paola Capriolo. Marsilio, Venezia. 680 pp.
- Moiso F (2002) *Goethe: la natura e le sue forme*. Mimesis, Milano. 117 pp.

Candidata: Armida Nardo

Relatore: Roberta Malagoli

Correlatore o Relatore esterno: Marco Rispoli

Dipartimento di Studi Linguistici e Letterari, Università di Padova, Via E. Vendramini 13, 35137 Padova

Anno di discussione: 2019

Studio del popolamento di *Malus florentina* e dei principali driver ecologici responsabili del suo assetto all'interno della Riserva Naturale dell'Abbadia di Fiastra (MC)

L. Maccaroni

Introduzione

Nel 2017 è stato rinvenuto un esiguo popolamento di *Malus florentina* (Zuccagni) C.K.Schneid. nella Selva della Riserva Naturale dell'Abbadia di Fiastra, presso Urbisaglia (Marche, centro Italia). La Selva, una cerreta mesoxerofila posta ad una quota media di 200 m s.l.m., rappresenta uno degli ultimi boschi residui di significativa estensione (95 ha) nella fascia collinare marchigiana. Tale sito dal 1984 è parte della Riserva Naturale Abbadia di Fiastra e, contestualmente, sono cessate le utilizzazioni del soprassuolo. L'obiettivo del presente lavoro di tesi è l'analisi del popolamento di *M. florentina*, per poterne formulare delle proposte gestionali ai fini della conservazione.

Materiali e Metodi

Il lavoro di campo è stato svolto tra settembre ed ottobre del 2019. Lungo tre transetti (T1, T2 e T3) disposti ortogonalmente al sentiero che attraversa il bosco (cioè in punti dove era presente almeno un individuo di *M. florentina*) sono stati realizzati tre rilievi fitosociologici, dei quali uno centrato sul sentiero e due distanti di 20 m da quello centrale. Sono stati realizzati ulteriori due transetti (T4 e T5) in una zona depressa della Riserva, a ridosso del Fosso dell'Inferno, sempre in corrispondenza di individui di *M. florentina*. Contestualmente sono stati acquisiti i principali dati stazionali. Questo metodo di rilevamento consente di valutare la distribuzione della specie mettendola in relazione con diversi fattori ecologici. La superficie dei rilievi, compresa tra 30 e 150 m², è stata individuata applicando il metodo del minimo areale. La vegetazione è stata suddivisa in tre strati principali: arboreo (maggiore di 2 m), arbustivo (compreso tra 60 cm e 2 m), erbaceo (inferiore a 60 cm). Per la determinazione delle specie rinvenute e per la loro nomenclatura si è fatto riferimento alla Flora d'Italia (Pignatti 1982). Dopo aver informatizzato nel software Excel i dati raccolti, sono stati elaborati gli spettri biologico, corologico, delle classi fitosociologiche (AA. VV. 2015), ecologico di Ellenberg (Pignatti et al. 2006), oltre che calcolati il valore medio dell'indice di maturità (Taffetani, Rismondo 2009, Mei et al. 2019) ed il numero di specie.

Risultati

Lo studio ha evidenziato come la presenza di *M. florentina*, di cui sono stati censiti 27 individui, sia circoscritta alle immediate vicinanze del sentiero, in presenza di aperture della volta arborea ed in prossimità della morfologia d'incisione. Gli individui, ad eccezione di uno di essi, non presentavano fiori e frutti. L'elenco floristico totale consta di 37 specie, appartenenti a 22 famiglie, di cui la più rappresentata è quella delle Rosaceae. Lo spettro biologico mette in luce la netta prevalenza delle fanerofite (64,9%) sulle altre forme biologiche (nanofanerofite 13,5%, emicriptofite 8,1%, camefite 5,4% e geofite 5,4%, terofite 2,7%). Dal punto di vista corologico, prevalgono specie Eurasiatiche (51,4%) e Mediterranee (43,2%), con le restanti specie appartenenti alla categoria delle cosmopolite (5,4%). Dallo spettro delle classi fitosociologiche emerge come siano maggiormente rappresentate le specie appartenenti alle classi *Quercio-Fagetea* (35,1%), *Quercetea ilicis* (27,0%) e *Rhamno-Prunetea* (27,0%); seguono le classi *Trifolio-Geranietea* (5,4%), *Salici-Populetea* (2,7%) e *Artemisietea vulgaris* (2,7%). L'indice di maturità risulta pari a 8,46. Lo spettro ecologico di Ellenberg sottolinea e conferma gli aspetti emersi dalle elaborazioni precedenti, come la termofilia, legata alle condizioni climatiche e non all'irraggiamento solare diretto. In accordo con quanto emerso dagli studi geopedologici (Bisci et al. 1989), inoltre, la flora in esame risulta adattata a suoli neutro-basofili tendenzialmente asciutti, poveri in nutrienti a causa della lenta e/o parziale organicazione del materiale organico. Al fine di analizzare il popolamento di *M. florentina* dal punto di vista del dinamismo ecologico-vegetazionale, è stato elaborato un transetto tipo in cui sono stati riportati i dati medi calcolati sui rilievi dei transetti T1, T2 e T3 ed un transetto con i dati medi calcolati sui rilievi dei transetti T4 e T5, al fine di valutare e confrontare l'andamento dei principali driver ecologici nelle due situazioni ambientali (pieno bosco e interruzione della copertura arborea dovuta a morfologia d'incisione). Esaminando il transetto medio relativo alla situazione di "pieno bosco" emerge prima di tutto come il maggior numero di specie (18,7) si osservi in corrispondenza del sentiero, probabilmente da mettere in relazione al minor valore di copertura dello strato arboreo. Dal confronto degli spettri biologici, la percentuale di fanerofite nel contesto del sentiero risulta inferiore rispetto ai rilievi laterali, per la percentuale maggiore delle altre forme biologiche. In questa situazione, la presenza di un'apertura nella volta arborea in seguito a uno schianto in uno dei rilievi laterali ha permesso di osservare un aumento consistente del numero di specie. Il transetto medio relativo alla situazione in cui si riscontra l'interruzione delle chiome dovuta alla presenza di una morfologia d'incisione riguarda la porzione di bosco in prossimità del Fosso dell'Inferno. Le elaborazioni della variazione dei parametri ecologici rivelano come, avvicinandosi all'incisione, al diminuire della copertura dello strato arboreo aumenti il numero di specie presenti, da 13,5 a 25,5 specie. Analogamente, si osserva anche una diminuzione del valore dell'indice di maturità. Tali dati possono essere ricondotti al fatto che, in presenza di situazioni maggiormente luminose rispetto al "pieno bosco", si rinvergono anche specie ecotonali e di boschi aperti le quali, come evidenziato da diversi autori (Kopecky et al. 2013, Molder et al. 2014), risultano essere le più minacciate.

Discussione

Sulla base dei dati sopra esposti appare evidente che la flora esaminata sia tipica di una cenosi forestale mesoxerofila nella fase di maturità la cui composizione floristica risente della prolungata copertura delle chiome, come evidenziato dall'elevato valore dell'indice di maturità e dalla scarsa numerosità di classi d'ambiente ecotonale. Dai rilievi effettuati nell'area di studio è emerso che *M. florentina* è presente esclusivamente a ridosso dei sentieri, nei pressi di aperture nella volta arborea e in prossimità della profonda incisione del Fosso dell'Inferno, osservando quindi che la specie non si rinviene che entro pochi metri dal punto d'ingresso della luce. Si è però anche constatato che i 27 individui presenti si trovavano in una fase di deperimento (valutata visivamente), da imputare alla progressiva chiusura della volta arborea ormai anche in prossimità dei sentieri e dell'incisione. Infatti, se in passato le attività antropiche finalizzate alla gestione del bosco consentivano una maggiore incidenza luminosa al suolo e, quindi, condizioni più favorevoli per il popolamento, dopo ormai un trentennio di evoluzione naturale del bosco gli individui di *M. florentina* stanno risentendo dell'elevata copertura del piano dominante. Le precarie condizioni di conservazione in cui si trova il popolamento di *M. florentina* sono evidenziate dall'assenza pressoché totale di fiori e frutti negli individui, nonostante quasi tutte le piante siano nella fase di maturità. Solo nel 2018, infatti, è stato rinvenuto un esemplare fruttificante situato proprio in corrispondenza di un'apertura prodottasi in seguito a uno schianto. Sulla base delle nostre evidenze, appare indispensabile prevedere alcuni interventi selvicolturali mirati a salvaguardare il popolamento di *M. florentina* ed a favorirne la naturale espansione. Gli interventi suggeriti consistono in diradamenti selettivi dello strato arboreo e tagli a buche del soprassuolo forestale, finalizzati a creare condizioni di luce diretta in corrispondenza degli esemplari di *M. florentina* per consentirne la fruttificazione. Al contempo, al fine di favorire la rinnovazione gamica della specie oggetto di studio, è necessaria una riduzione generalizzata della copertura dello strato arboreo e arbustivo del bosco. In assenza di interventi, c'è il rischio concreto che questo popolamento segua la stessa sorte di quello rinvenuto da Fabio Taffetani nei primi anni '90 del secolo scorso in un'altra zona della Riserva, oggi non più ritrovato.

Letteratura citata

- AA. VV. (2015) Prodromo della vegetazione d'Italia. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare. Società Botanica Italiana. <http://www.prodromo-vegetazione-italia.org/> [accessed 01.01.2020].
- Bisci C, Dramis F, Gentili B (1989) Geomorfologia del comprensorio dell'Abbadia di Fiastra (Comune di Tolentino, Macerata). Studi geologici Camerti 11: 15-22.
- Kopecký M, R. Hédl, Szabó P (2013) Non-random extinctions dominated plant community changes in abandoned coppices. Journal of Applied Ecology 50(1): 79-87.
- Mei G, Pesaresi S, Corti G, Cocco S, Colpi C, Taffetani F (2019) Changes in vascular plant species composition, top-soil and seed-bank along coppice rotation in an *Ostrya carpinifolia* forest. Plant Biosystems 154(2): 259-268.
- Mölder A, Streit M, W. Schmidt (2014) When beech strikes back: How strict nature conservation reduces herb-layer diversity and productivity in Central European deciduous forests. Forest Ecology and Management 319: 51-61.
- Pignatti S (1982) Flora d'Italia 1-3. Edagricole, Bologna. 790 pp. vol 1, 732 pp. vol 2, 780 pp. vol 3.
- Pignatti S, Menegoni P, Pietrosanti S (2006) Bioindication through vascular plants. Indication values according to Ellenberg (Zeigerwerte) for the Flora of Italy. Braun-Blanquetia 39: 1-97.
- Taffetani F, Rismondo M (2009) Bioindicators system for the evaluation of the environment quality of agro-ecosystems. Fitosociologia 46(2): 3-22.

Candidato: Luca Maccaroni

Relatore: Fabio Taffetani

Correlatore o Relatore esterno: Giacomo Mei

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università Politecnica delle Marche, Piazza Roma 22, 60121 Ancona

Anno di discussione: 2020

Effetti di *Acacia saligna* sulla composizione floristica della macchia mediterranea in Molise e Nord Puglia

L. Di Lisa

Introduzione

Gli ambienti costieri sono molto suscettibili alle invasioni biologiche e lo studio di tali fenomeni in questi contesti richiede un'analisi dei fattori ambientali coinvolti, sia biotici che abiotici, oltre che un'approfondita conoscenza dell'ecologia delle specie prese in considerazione (Malavasi et al. 2018). L'obiettivo del presente studio è quello di verificare se una copertura superiore al 70% di *Acacia saligna* (Labill.) H.L.Wendl. (Fabaceae), altera le comunità di macchia mediterranea dell'Adriatico centro-meridionale in termini di composizione floristica, complessità strutturale e caratteristiche ecologiche. *A. saligna* è una fanerofita di origine australiana introdotta intenzionalmente in passato per interventi di rimboscimento lungo il litorale Adriatico, in seguito divenuta invasiva negli habitat di duna e retroduna (Del Vecchio et al. 2013, Calabrese et al. 2017).

Materiali e Metodi

Il lavoro di campo è stato svolto nel mese di Giugno 2020 nelle aree della Rete Natura 2000 presenti lungo la costa molisana e pugliese: ZSC "Foce Trigno-Marina di Petacciato", ZSC "Foce Saccione-Bonifica Ramitelli", ZSC "Dune e Lago di Lesina e Foce del Fortore". In ciascuna area, oggetto di studio sono stati gli habitat (Direttiva 92/43/CEE) 2250* "Dune costiere con *Juniperus* spp." e 2260 "Dune con vegetazione di sclerofille dei *Cisto-Lavanduletalia*". In totale sono stati eseguiti 40 rilievi della vegetazione mediante plot di forma quadrata con lato di 4 m, equamente ripartiti tra i due habitat considerati. Per ciascun habitat, in particolare, sono stati rilevati 10 plot in aree invase, ovvero con copertura di *A saligna* superiore al 70%, e 10 plot in aree non invase, cioè con totale assenza della specie. L'identificazione delle entità rinvenute è stata eseguita in base alla Flora d'Italia di Pignatti et al. (2017-2019). I dati raccolti sono quindi stati analizzati statisticamente utilizzando i software R e Past, effettuando le seguenti analisi: Multidimensional Scaling Non-Metrico (NMDS), test Mann Whitney Pairwise e Simper.

Risultati

Dall'analisi NMDS è emersa una ben precisa separazione tra gli habitat 2250* e 2260. In linea generale i plot invasi si sono caratterizzati per la maggiore presenza di specie alloctone come *Erigeron canadensis* L. e *Xanthium orientale* L. subsp. *italicum* (Moretti) Greuter (oltre ad *A. saligna*), ma anche di specie ruderali come *Eragrostis pilosa* (L.) P.Beauv., *Oloptum miliaceum* (L.) Röser & H.R.Hamasha e *Reseda alba* L. Inoltre, hanno mostrato anche una quasi totale assenza di specie focali degli habitat 2250* (*Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sm.) Neillr.) e 2260 (es. *Phillyrea angustifolia* L., *Pistacia lentiscus* L. e *Cistus creticus* L.) che invece sono state rilevate nei plot non invasi. I maggiori impatti sono stati osservati nell'habitat 2260, mentre nell'habitat 2250* gli effetti

di *A. saligna* sulla vegetazione nativa sono molto meno evidenti, probabilmente a causa di caratteristiche microclimatiche, strutturali della vegetazione e pedologiche che tendono a sfavorire il suo insediamento. Relativamente ai cambiamenti nella struttura della vegetazione indotti dall'alloctona, nelle aree invase è stato rilevato un aumento della copertura di Fanerofite arboree, dovuto essenzialmente alla presenza di *A. saligna*, e di Emicriptofite cespitose, associato all'ingresso di specie erbacee ruderali. Contestualmente è stata osservata una riduzione delle Fanerofite cespugliose rappresentate dalle sclerofille arbustive tipiche degli habitat di macchia mediterranea.

Discussione

La notevole presenza di *A. saligna* provoca la contrazione della copertura delle specie focali tipiche della macchia mediterranea, soprattutto di quella bassa a cisti, oltre che la ruderalizzazione ed esotizzazione della flora di questi habitat costieri (Biondi et al. 2010, Del Vecchio et al. 2013, Calabrese et al. 2017). L'invasione di di questa esotica non è tuttavia, spazialmente omogenea, ma varia lungo la zonazione dunale (Marzialetti et al. 2019). I risultati ottenuti nel corso di questo lavoro hanno evidenziato che gli effetti ecologici provocati dall'invasione di questa specie sono meno evidenti nell'habitat 2250*, il quale si trova più vicino al mare e su terreni meno evoluti (sabbiosi e con basso contenuto di sostanza organica) e più instabili rispetto alla macchia a cisti. La minore distanza dalla linea di costa, inoltre, comporta una relativa maggiore esposizione ai venti salsi ed una minore disponibilità di acqua dolce (Santoro et al. 2011, Del Vecchio et al. 2013). Inoltre, poiché il riscaldamento del suolo favorisce la germinazione dei semi di *A. saligna* (Cohen et al. 2008), nell'habitat 2250* la fitta vegetazione a ginepro determina un ombreggiamento del suolo che dunque crea condizioni svantaggiose per l'ingresso di questa aliena. In conclusione, per preservare questi fragili ma importanti habitat costieri, si propongono interventi mirati di eradicazione delle specie esotiche e la messa a dimora di specie autoctone legnose native. Tali azioni, finalizzate al ristabilimento della flora e della vegetazione originaria degli habitat analizzati, sono già state positivamente attuate lungo il litorale molisano di Petacciato e Campomarino nell'ambito del LIFE MAESTRALE (www.lifemaestrale.eu).

Letteratura citata

- Biondi E, Blasi C, Burrascano S, Casavecchia S, Copiz R, Del Vico E, Galdenzi E, Gigante D, Lasen C, Spampinato G, Venanzoni R, Zivkovic L (2010) Manuale Italiano di Interpretazione degli habitat della Direttiva 92/43/CEE. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare. Società Botanica Italiana, Roma. 20 pp.
- Calabrese V, Frate L, Iannotta F, Prisco I, Stanisci A (2017) *Acacia saligna*: specie invasiva delle coste molisane. *Forest@* 14: 28-33.
- Cohen O, Riov J, Katan J, Gamliel A, Bar P (2008) Reducing persistent seed banks of invasive plants by soil solarization-the case of *Acacia saligna*. *Weed Science* 56(6): 860-865.
- Del Vecchio S, Acosta A, Stanisci A (2013) The impact of *Acacia saligna* invasion on Italian coastal dune EC habitats. *Comptes Rendus Biologies* 336(7): 364-369.
- Malavasi M, Acosta ATR, Carranza ML, Bartolozzi L, Basset A, Bassignana M, Campanaro A, Canullo R, Carruggio F, Cavallaro V, Cianferoni F, Cindolo C, Cocciuffa C, Corriero G, D'Amico FS, Forte F, Freppaz M, Mantino F, Matteucci G, Pierri C, Stanisci A, Colangelo P (2018) Plant invasions in Italy: An integrative approach using the European LifeWatch infrastructure database. *Ecological Indicators* 91: 182-188.
- Marzialetti F, Bazzichetto M, Giulio S, Acosta ATR, Stanisci A, Malavasi M, Carranza ML (2019) Modelling *Acacia saligna* invasion on the Adriatic coastal landscape: An integrative approach using LTER data. *Nature Conservation* 34: 127-144.
- Pignatti S, Guarino R, La Rosa M (2017-2019) *Flora d'Italia* 1-4. 2nd ed. Edagricole, Bologna. 1164 pp. vol 1 (2017), 1178 pp. vol 2 (2017), 1288 pp. vol 3 (2018), 1054 pp. vol. 4 (2019).
- Santoro R, Jucker T, Carranza ML, Acosta A (2011) Assessing the effects of *Carpobrotus* invasion on coastal dune soils. Does the nature of the invaded habitat? *Community Ecology* 12(2): 234-240.

Candidata: Letizia Di Lisa

Relatore: Angela Stanisci

Dipartimento di Agricoltura, Ambiente e Alimenti, Università del Molise, Via Francesco De Sanctis s.n.c., 86100 Campobasso

Anno di discussione: 2020

Risposte all'acidificazione di *Posidonia oceanica* e *Cymodocea nodosa*

V. Osso

Introduzione

La peculiarità dei fattori chimici e fisici che governano gli ambienti marini, fanno sì che essi siano in grado di mitigare le concentrazioni di CO₂ atmosferica assorbendola. Le emissioni di CO₂ antropogenica hanno nettamente alterato l'equilibrio dell'ambiente marino, determinando un abbassamento dei valori di pH e dunque

determinando una minaccia per le biocenosi coralline. La capacità degli organismi fotosintetici marini di utilizzare l'acido carbonico per la fotosintesi è stata vista come un possibile rimedio a lungo termine (Invers et al. 1999). I siti di emissioni di CO₂ vulcanica sottomarina, detti "CO₂ vents" (Hall-Spencer et al. 2008), sono dei laboratori naturali per lo studio del buffering mediato da fanerogame marine, quali sono le specie endemiche *Cymodocea nodosa* (Ucria) Asch. e *Posidonia oceanica* (L.) Delile (Koch et al. 2013). Popolazioni di queste specie adattate alle condizioni nei siti acidificati di Ischia (Campania) e Vulcano (Sicilia) sono state caratterizzate a scala di fitocenosi e di individuo mediante analisi citologiche e molecolari. L'obiettivo di questo lavoro è definire la risposta adattativa delle due specie alle condizioni di estrema acidificazione rispetto a popolazioni limitrofe viventi a normali condizioni di pH marino (pH 8,2).

Materiali e Metodi

Le aree di studio di Ischia e Vulcano sono entrambe caratterizzate da un gradiente di pH compreso fra 6,8 e 8,2, che diventa più alcalino man mano che ci si allontana dai "CO₂ vents". I campionamenti sono stati condotti in immersione subacquea: in tre siti ad Ischia per *P. oceanica* (un sito a pH 7,91, un sito a pH 8,02 ed uno di controllo a pH 8,17); in due siti a Vulcano per *C. nodosa* (uno a pH 7,9 ed uno di controllo a pH 8,18). Il lavoro sul campo ha compreso la valutazione ecologica basata su appositi descrittori di natura fisiografica, strutturale e numerica in accordo ai protocolli standard (ISPRA 2014). Per le analisi molecolari sono stati campionati fasci fogliari per ottenere la rappresentatività della popolazione (ISPRA 2014). Dieci individui per ogni condizione sperimentale (sia per *P. oceanica* che per *C. nodosa*) sono stati processati per l'estrazione, la purificazione ed il sequenziamento delle proteine e comparazione dei livelli di espressione attraverso un approccio proteomico semiquantitativo (Piro et al. 2015). Cinque individui per ogni sito sono stati processati per l'analisi citoistochimica.

Risultati

In *C. nodosa* l'acidificazione non influisce significativamente sulla copertura della prateria mista (89% vs. 87%), sulla densità relativa delle piante (275±30 fasci/m² vs. 225±90 fasci/m²) ed assoluta (310±40 fasci/m² vs. 285±80 fasci/m²) delle praterie, sulle associazioni interspecifiche con *Caulerpa racemosa* J. Agardh, ed intraspecifiche di *C. nodosa* rispetto al controllo, ma presentano disomogeneità rispetto al substrato. La densità assoluta di *P. oceanica* nei siti controllo, intermedio e acidificato rispettivamente di 490±25, 460±25 e 450±35 fasci/m², corrisponde alla classificazione di "praterie dense" (Giraud 1977); la prateria presenta però discontinuità di copertura che risulta minore nel sito intermedio rispetto a quello acidificato e controllo. Questo evidenzia un adattamento progressivo della popolazione di *P. oceanica* alle differenti condizioni di pH. Le analisi citologiche ristrette al tessuto fogliare epidermico e parenchimatico di entrambe le specie hanno evidenziato modificazioni citologiche di adattamento, con assottigliamento delle pareti delle cellule epidermiche (fino al 70% di riduzione rispetto al controllo), aumento del volume cellulare dei parenchimi (fino al 30% rispetto al controllo) e riduzione della deposizione di amido primario nelle cellule epidermiche in funzione del gradiente di pH. *P. oceanica* mostra una riduzione del 30% nel contenuto in proteine e un trend di adattamento metabolico lungo il gradiente di acidificazione che nel complesso, rispetto alle piante viventi a condizione di CO₂ di riferimento, induce una sovra-espressione: 1) dei metabolismi catabolici delle proteine fino a 6 volte superiore, 2) del metabolismo del citoscheletro e delle componenti cellulari (fino 4 volte), 3) del metabolismo del carbonio (3 volte superiore), 4) della maturazione dell'mRNA (2 volte superiore), 5) del metabolismo energetico. In *C. nodosa* acclimatata a condizioni acidificate si osserva la riduzione del contenuto in proteine nei tessuti fogliari fino al 35-38% rispetto al controllo, la sovra-espressione di proteine del metabolismo nucleare quali metilazione (5 volte superiore), duplicazione/trascrizione (4 volte), organizzazione della matrice nucleare (3 volte), dello splicing alternativo dell'mRNA (3 volte), delle modificazioni post-trasduzionali (3 volte); infine risulta sovra-espresso il trasporto polare dell'auxina (2 volte superiore). Risultano sotto-espressi i metabolismi correlati alla osmoregolazione che risultano ridotti di 3 volte rispetto al riferimento.

Discussione

I risultati ottenuti in questo studio hanno evidenziato variazioni significative dei metabolismi delle piante adattate alle condizioni in atto nei "CO₂ vents". Nelle piante viventi ad elevate concentrazioni di CO₂ nel sito acidificato, dove la disponibilità di carbonio inorganico (Ci) è sicuramente maggiore rispetto al sito di riferimento, l'organizzazione del carbonio mediante l'enzima RuBisco risulta sovra-espressa a dimostrazione di un aumento della capacità delle piante di sequestrare carbonio inorganico dall'ambiente. Questo risultato sembra confermare l'ipotesi che le piante marine siano Ci-limited e quindi siano avvantaggiate in un ambiente arricchito in Ci. La localizzazione dell'amido primario nelle cellule epidermiche delle foglie del sito acidificato suggerisce però un minore accumulo a livello dei cloroplasti. Una spiegazione a tale risultato potrebbe essere che, nelle piante acidificate, il glucosio fotosintetico venga trasformato in saccarosio e trasportato via floema al resto della pianta con maggiore efficienza rispetto a quanto accade nelle cellule delle foglie in condizioni di CO₂ di riferimento. La

riduzione però della quantità di proteine fogliari in entrambe le specie suggerisce una riduzione di produttività nelle piante che vivono nei vents. I nostri dati suggeriscono, inoltre, modificazioni citologiche; tali modificazioni hanno una matrice molecolare collegata al metabolismo cellulare del citoscheletro che regola la forma e il volume delle cellule e il traffico vescicolare all'interno del citoplasma. Recenti evidenze riportano, infatti, variazioni cellulari strutturali legate all'esposizione ad alta CO₂ in *Halodule wrightii* Asch. e alterazioni biomeccaniche in *C. nodosa* (de Los Santos et al. 2017, Schneider et al. 2018). Anche a livello della parete cellulare l'acidificazione sembra definire un quadro metabolico differente rispetto al sito intermedio e al sito di riferimento. L'inibizione delle pectinesterasi suggerisce una rimodellazione della parete cellulare, in particolare della lamella mediana che ne contiene maggiori quantità e gioca un ruolo nel loosening della parete. I risultati ottenuti suggeriscono che *C. nodosa* nei siti di emissione di CO₂ sottomarina naturale non presenta variazioni significative nel metabolismo dei carboidrati, almeno non riscontrabili con la tecnologia proteomica, ma manifesta una rimodulazione del metabolismo delle proteine, della risposta mediata dall'auxina e dalla protezione dallo stress osmotico. Le analisi citoistologiche presentano un quadro simile a quello riscontrato in *P. oceanica* con una presenza di una minor quantità di amido primario nei tessuti della foglia. Da questi risultati e da quanto emerge dalla relativa letteratura, le seagrasses sembrano avvantaggiarsi di un ambiente dove abbonda il carbonio inorganico attraverso adattamenti molecolari diversi. Accomunano le due specie nell'adattamento all'acidificazione le modificazioni citologiche e istologiche che meritano ulteriori approfondimenti.

Letteratura citata

- de Los Santos CB, Godbold JA, Solan M (2017) Short-term growth and biomechanical responses of the temperate seagrass *Cymodocea nodosa* to CO₂ enrichment. *Marine Ecology Progress Series* 572: 91-102.
- Giraud G (1977) Essai de classement des herbieres de *Posidonia oceanica* (Linné) Delile. *Botanica Marina* 20(8): 487-491.
- Hall-Spencer JM, Rodolfo-Metalpa R, Martin S, Ransome E, Fine M, Turner SM, Buia MC (2008) Volcanic carbon dioxide vents show ecosystem effects of ocean acidification. *Nature* 454(7200): 96-99.
- Invers O, Pérez M, Romero J (1999) Bicarbonate utilization in seagrass photosynthesis: role of carbonic anhydrase in *Posidonia oceanica* (L.) Delile and *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 235(1): 125-133.
- ISPRA (2014) Conservazione e gestione della naturalità negli ecosistemi marino-costieri. Il trapianto delle praterie di *Posidonia oceanica*. Manuali e Linee Guida 106/2014. Roma. 333 pp.
- Koch M, Bowes G, Ross C, Zhang XH (2013) Climate change and ocean acidification effects on seagrasses and marine macroalgae. *Global Change Biology* 19(1): 103-132.
- Piro A, Marin-Guirao L, Serra IA, Spadafora A, Sandoval-Gil JM, Bernardeau-Esteller J, Fernandez JMR, Mazzuca S (2015) The modulation of leaf metabolism plays a role in salt tolerance of *Cymodocea nodosa* exposed to hypersaline stress in mesocosms. *Frontiers in Plant Science* 6: 464.
- Schneider G, Horta PA, Calderon EN, Castro C, Bianchini A, da Silva CRA, Brandalise I, Bonomi Barufi J, Silva J, Rodrigues AC (2018) Structural and physiological responses of *Halodule wrightii* to ocean acidification. *Protoplasma* 255: 629-641.

Candidato: Vincenzo Osso

Relatore: Silvia Mazzuca

Correlatore o Relatore esterno: Amalia Piro

Dipartimento di Biologia, Ecologia e Scienze della Terra, Università della Calabria, Via Pietro Bucci 12/C, 87036 Rende (Cosenza)

Anno di discussione: 2020

Organizzazione subnucleare dei complessi di rimodellamento della cromatina e loro coinvolgimento nella risposta fotomorfenica

L. Boldrini

Introduzione

Domini intrinsecamente non strutturati e priono-simili sono due tipologie di sequenze proteiche che, attraverso il meccanismo di separazione di fase liquido-liquido ("liquid-liquid phase separation", LLPS), promuovono la formazione di compartimenti subcellulari amembranosi (Murthy et al. 2020). Diverse tipologie di regolatori epigenetici sono state individuate all'interno di questi compartimenti, come il complesso di rimodellamento della cromatina SWI/SNF. Tale complesso agisce modificando dinamicamente l'architettura istonica, permettendo così ai fattori di regolazione trascrizionale di accedere al DNA genomico condensato e quindi controllare l'espressione genica. Tale complesso è coinvolto nella risposta fotomorfenica in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ed è localizzato all'interno di uno di questi compartimenti subcellulari: le macule nucleari

("nuclear speckles"). Questi compartimenti si trovano in regioni intercromatiniche del nucleoplasma; essi costituiscono domini nucleari coinvolti nella regolazione dell'espressione genica e sono arricchiti in fattori di "splicing" e pre-mRNA. Questo lavoro di tesi ha avuto come scopo quello di caratterizzare funzionalmente il complesso SWI/SNF di *A. thaliana* in relazione al suo coinvolgimento nella fotomorfogenesi e nella formazione delle macule nucleari.

Materiali e Metodi

Semi di *A. thaliana* (ecotipo Col-0) mutanti per subunità del complesso SWI/SNF, per PW01, una proteina che interagisce fisicamente con esso, e per BRAHMA, subunità catalitica del complesso SWI/SNF, sono stati sterilizzati e posti a germinare su terreno sterile in piastre Petri. Le plantule sono state poi trasferite e coltivate in camera di crescita in condizioni di giorno lungo (16 ore di luce e 8 ore di buio). Dopo quattro settimane, è stata prelevata una foglia dalla rosetta di ciascuna pianta ed è stato estratto il DNA. Attraverso l'analisi PCR, con inneschi ("primer") specifici per le subunità d'interesse, è stata genotipizzata ciascuna pianta. Successivamente, i semi prodotti da piante omozigote sono stati messi a germinare; una parte di queste piante è stata utilizzata per un saggio di allungamento dell'ipocotile, mentre un'altra è stata cresciuta per 12 giorni in piastra e poi sottoposta al processo d'estrazione dell'RNA. Dall'RNA totale estratto è stato sintetizzato il cDNA; usando quest'ultimo come template per una RT-qPCR ("Reverse Transcription - quantitative PCR", tecnica che permette di stimare la concentrazione di uno specifico RNA presente in un campione), è stata analizzata l'espressione genica di geni coinvolti nel controllo della fotomorfogenesi. Parallelamente, attraverso il metodo di clonaggio "Gateway", sono stati prodotti plasmidi specifici per subunità del complesso SWI/SNF, al fine di operare saggi d'interazione proteica. I costrutti sono stati inizialmente clonati in *Escherichia coli* (Migula) Castellani & Chalmers. Successivamente, sono state trasformate cellule competenti di lievito con i plasmidi esprimenti domini d'interazione e attivazione trascrizionale, a seguito impiegati per saggi due-ibridi del lievito. Inoltre, plasmidi esprimenti subunità del complesso SWI/SNF legati a marcatori fluorescenti e sotto controllo di un promotore inducibile sono stati impiegati per trasformare *Agrobacterium tumefaciens* Smith & Townsend; le colonie batteriche così trasformate sono state poi inoculate sul lato abassiale della lamina fogliare di *Nicotiana benthamiana* Domin. Sono state successivamente eseguite osservazioni di microscopia a fluorescenza e confocale sull'epidermide di tali foglie.

Risultati

Le osservazioni fatte in microscopia a fluorescenza delle linee transgeniche di *Arabidopsis* esprimenti PW01 (legata a un marcatore fluorescente) hanno mostrato che, in condizioni di buio, la proteina risulta maggiormente espressa nel meristema apicale della radice. Il saggio di allungamento dell'ipocotile e l'analisi RT-qPCR su geni bersaglio della regolazione dello sviluppo luce-mediato del germoglio sono stati eseguiti su linee "knock-out" (KO), cioè nulle, per subunità del complesso SWI/SNF e per proteine che interagiscono con esso. Le linee KO per PW01 e BRAHMA avevano un ipocotile maggiormente allungato rispetto al tipo selvatico ("wild-type"). Tali linee hanno, inoltre, mostrato la sovraespressione di geni PIF (fattori fitocromo-interagenti) per la regolazione della risposta fotomorfogenica. Unendo i dati di microscopia con i risultati di qPCR, è stato creato un modello di regolazione genica che vede PW01 e BRAHMA come regolatori negativi della risposta scotomorfogenica. È riportato che CHC1, una subunità del complesso SWI/SNF che possiede un dominio priono-simile ("PRLD"), interagisce fisicamente con PW01 (Hohenstatt et al. 2018). A seguito del clonaggio, sono stati saggiati il dominio priono-simile e la restante sequenza della proteina ("NON PRLD") attraverso un saggio due-ibridi di lievito che bersagliava PW01. Apparentemente, il dominio priono-simile di CHC1 non è necessario né sufficiente per promuovere l'interazione fisica con PW01. Risultati del gruppo di ricerca del dottor Schubert (non ancora pubblicati) evidenziano come CHC1 localizzi all'interno delle macule nucleari. Dunque, è stata analizzata la localizzazione del costrutto CHC1-GFP, scomposto nei suoi domini priono-simile e non prionico ("PRLD" e "NON PRLD"), attraverso microscopia confocale su epidermide di tabacco. Anche in questo caso, le evidenze hanno confermato il mancato coinvolgimento del dominio priono-simile nella formazione delle macule nucleari.

Discussione

È noto che i componenti del complesso SWI/SNF si stabilizzano l'un l'altro, con le subunità principali che fungono da piattaforme di attracco per l'assemblaggio del complesso. Se lo stato stazionario delle subunità tende verso la forma non vincolata, i componenti diventano più inclini al legame dell'ubiquitina e alla degradazione proteasomiale (Tatarskiy et al. 2017). In considerazione di ciò, l'espressione di una subunità priva di un suo dominio funzionale (detta subunità tronca), potrebbe culminare con un'interazione fisica alterata (ipotesi confermata dal saggio due-ibridi di lievito), promuovendo la transizione dello stato stazionario a forma non vincolata ed esercitando quindi un impatto negativo sull'intensità del segnale fluorescente. In particolare, l'emivita delle proteine analizzate deve essere abbastanza lunga da permettere agli agenti nucleanti di

raggiungere la concentrazione di soglia critica e di innescare la LLPS (Alberti 2017). L'emivita ridotta potrebbe pertanto spiegare i risultati ottenuti in microscopia confocale. Il frammento priono-simile non presenta inoltre sequenza di indirizzamento nucleare, che potrebbe far luce sulla localizzazione citoplasmatica ma non fornirebbe la prova del posizionamento nucleare. Nello specifico, il frammento, slegato dalla componente non prionica, può formare più facilmente aggregati, che vengono riconosciuti come prodotti tossici per l'ospite, riconoscimento che è generalmente seguito dall'indirizzamento alla degradazione proteasomiale. Poiché è noto che i proteasomi vegetali (20S e 26S) sono equamente distribuiti tra nucleo e citoplasma (Vallon, Kull 1994), il loro indirizzamento potrebbe spiegare il segnale citoplasmatico e nucleare così diffuso. Alla luce di questi risultati è possibile escludere il coinvolgimento del dominio priono-simile in CHC1 nella formazione LLPS-mediata di macule nucleari. Resta tuttavia da indagare il coinvolgimento dei domini intrinsecamente non strutturati nella promozione di questo meccanismo.

Letteratura citata

- Alberti S (2017) Phase separation in biology. *Current Biology* 27(20): R1097-1102.
- Hohenstatt ML, Mikulski P, Komarynets O, Klose C, Kycia I, Jeltsch A, Farrona S, Schubert D (2018) PWWP-DOMAIN INTERACTOR OF POLYCOMBS1 Interacts with Polycomb-Group Proteins and Histones and Regulates *Arabidopsis* Flowering and Development. *The Plant Cell* 30(1): 117-133.
- Murthy AC, Fawzi NL (2020) The (un)structural biology of biomolecular liquid-liquid phase separation using NMR spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* 295(8): 2375-2384.
- Tatarskiy VV, Simonov YP, Shcherbinin DS, Brechalov AV, Georgieva SG, Soshnikova NV (2017) Stability of the PHF10 subunit of PBAF signature module is regulated by phosphorylation: role of β -TrCP. *Scientific Reports* 7(1): 5645.
- Vallon U, Kull U (1994) Localisation of proteasome in plant cells. *Protoplasma* 182: 15-18.

Candidato: Luca Boldrini

Relatore: Stefania Biondi

Correlatori o Relatori esterni: Daniel Schubert, Claire Jourdain

Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie, Università di Bologna, Via Irnerio 42, 40126 Bologna

Anno di discussione: 2020

Il pascolo e gli eventi climatici estremi influenzano le risposte funzionali di una comunità ripristinata di prateria

N. Pavanetto

Introduzione

La crescente frequenza di eventi climatici estremi causati dal riscaldamento globale, quali periodi di siccità prolungati, precipitazioni di forte intensità e ondate di caldo, determinano un impatto negativo sulla biodiversità, la quale regola il funzionamento degli ecosistemi tramite dinamiche compensatorie e risposte asincrone tra le diverse specie (Elst et al. 2017). La valutazione della diversità funzionale, definita come la variazione dei tratti funzionali tra gli organismi, è quindi di primaria importanza per quantificare l'impatto del clima sulla vegetazione, soprattutto in concomitanza con altri fattori di disturbo quali sono i cambiamenti nell'uso del suolo o il pascolo, fattori fondamentali da considerare nell'ambito della gestione, mantenimento e ripristino delle praterie naturali (Lepš et al. 2018, Bengtsson et al. 2019). In tale contesto si inserisce questa tesi i cui obiettivi sono: 1) valutare l'effetto della reintroduzione del pascolo sulla composizione funzionale di una comunità di prateria soggetta a ripristino nel 2001; 2) verificare in che modo le condizioni climatiche sono state responsabili delle fluttuazioni della diversità funzionale e compositiva nel tempo.

Materiali e Metodi

Nel corso del 2019, all'interno della Riserva Naturale Monte Labbro (Toscana), è stata campionata la vegetazione considerando due trattamenti: pascolato, non pascolato. I rilievi sono stati eseguiti in 16 plot di 1 × 2 m, censendo tutte le specie vegetali e assegnando a queste il relativo valore di copertura tramite metodo "point quadrat" con densità di pin di 100 m⁻². I dati raccolti sono stati poi integrati con campionamenti ottenuti dal 2002 al 2016 sugli stessi plot. Sulle specie più abbondanti è stato misurato un set di tratti funzionali legati all'uso delle risorse (area fogliare specifica - SLA, contenuto secco di materia fogliare - LDMC, contenuto fogliare di azoto e carbonio - %N e %C), all'efficienza nel trasporto dell'acqua nelle foglie (lunghezza delle vene minori - VLA), all'efficienza di uso dell'acqua e scambi gassosi fogliari (composizione dell'isotopo stabile del carbonio - $\delta^{13}\text{C}$) e alla resistenza

all'aridità (potenziale dell'acqua al punto di perdita di turgore - Ψ_{tip}). Per ogni anno sono state calcolate delle variabili climatiche che riflettono la variabilità climatica naturale (temperatura media primaverile e precipitazioni totali durante il periodo vegetativo) e il verificarsi di eventi estremi (massimo numero di giorni consecutivi di siccità durante la primavera e nell'intero anno precedente il campionamento, massimo numero di giorni consecutivi di caldo intenso, numero di giorni di forti piogge, numero di giorni di gelo). L'intervallo dei valori dei singoli tratti tra i plot pascolati e non pascolati per ogni anno è stato valutato tramite Community Weighted Means (CWMs), mentre la diversità funzionale è stata valutata utilizzando tre indici di diversità funzionale: Functional Richness (FRic), Functional Evenness (FEve), Rao's quadratic entropy (Rao). I CWM e gli indici di diversità funzionale sono stati sottoposti ad un'analisi delle componenti principali (PCA). L'effetto del pascolo sulla comunità è stato valutato mediante dei Modelli Additivi Generalizzati (GAMs), utilizzando come variabili di risposta i CWM e gli indici di diversità, e come predittori gli anni di osservazione e il trattamento (due livelli, pascolato e non pascolato). L'effetto del clima è stato valutato tramite Modelli Lineari Misti (LMMs), partendo da un full model usando come variabile di risposta i CWM e gli indici di diversità e come predittori le variabili climatiche, specificando inoltre l'interazione tra durata dei periodi di siccità e durata delle ondate di calore, e procedendo successivamente a una "backward selection" al fine di ottenere dei "minimum adequate model".

Risultati

I risultati dell'ordinamento tramite PCA hanno mostrato come ci sia una chiara suddivisione tra i plot pascolati e non pascolati lungo il primo asse (51,5% della varianza totale). I plot pascolati sono risultati correlati a valori più alti di SLA, %N e Ψ_{tip} e più marginalmente a valori più alti di Rao, FRic e FEve, mentre i plot non pascolati sono risultati correlati a valori più alti di LDMC e $\delta^{13}\text{C}$. Nei modelli GAM il trattamento (pascolo pascolato, non pascolato) è risultato significativo ($p < 0,001$) per tutti i modelli, indicando una differenza significativa dei valori di composizione funzionale e degli indici di diversità funzionale tra le comunità pascolate e non pascolate lungo la serie temporale. Ad eccezione di Ψ_{tip} e %N, i quali hanno mostrato una elevata variabilità negli anni solamente nei plot pascolati, gli altri tratti funzionali hanno mostrato una simile tendenza oscillante sia nei plot pascolati che in quelli non pascolati. Dall'analisi dei LMM il massimo numero di giorni consecutivi di aridità durante la primavera è risultata la variabile più rappresentativa. Una significativa relazione negativa ($p < 0,001$) per SLA, VLA, Ψ_{tip} e FRic è stata trovata nei plot pascolati e non pascolati, mentre la stessa relazione è stata trovata nei plot non pascolati per quanto riguarda %N e Rao. Una significativa relazione positiva ($p < 0,001$) è stata trovata per LDMC e $\delta^{13}\text{C}$ sia per i plot pascolati che per i non pascolati, mentre per %C una significativa relazione positiva ($p = 0,03$) era presente solo per i plot non pascolati. I grafici di interazione tra i giorni consecutivi di aridità e i giorni consecutivi di caldo intenso hanno mostrato che per SLA (sia plot pascolati che non pascolati), LDMC (pascolato) e $\delta^{13}\text{C}$ (pascolato) i valori dei tratti sono relativamente stabili all'aumentare della durata dell'ondata di calore ma solo se accoppiato a brevi periodi di siccità. Al contrario, i CWM diminuiscono per SLA e aumentano per LDMC e $\delta^{13}\text{C}$ all'aumentare della durata dell'ondata di caldo se accoppiate con lunghi periodi di siccità. I valori dei CWM per VLA e %N nei plot pascolati hanno mostrato un generale aumento con la durata delle ondate di calore, ma le pendenze delle linee di interazione suggeriscono che l'effetto sia maggiormente significativo quando la durata delle ondate di calore è associata a brevi periodi di siccità rispetto a periodi più lunghi. I grafici di interazione per Ψ_{tip} e Rao hanno mostrato una "cross interaction": i valori di Ψ_{tip} diminuiscono con l'aumento della durata delle ondate di calore se accoppiate con lunghi periodi di siccità, ma aumentano con la durata delle ondate di calore quando accoppiate con brevi periodi di siccità. Al contrario, la relazione opposta può essere vista per Rao. Il numero di giorni di pioggia intensa è risultato correlato negativamente con VLA ($p < 0,001$), Ψ_{tip} ($p = 0,04$) e FRic ($p = 0,02$) solo nei plot pascolati. Il numero di giorni di gelo è risultato correlato negativamente con SLA ($p < 0,001$), Ψ_{tip} ($p = 0,04$) e Rao ($p = 0,01$) solo nei plot pascolati e positivamente correlato in plot sia pascolati che non pascolati per %C ($p < 0,001$) e $\delta^{13}\text{C}$ ($p < 0,001$). La quantità totale di precipitazioni è risultata positivamente correlata con SLA (plot pascolati, $p < 0,001$), Ψ_{tip} (pascolati e non pascolati, $p < 0,001$), %N (pascolati, $p < 0,001$) e Rao (non pascolati, $p < 0,01$), mentre è risultata negativamente correlata con Rao (pascolati, $p = 0,03$) e LDMC, %C e $\delta^{13}\text{C}$ (pascolati e non pascolati, $p < 0,001$).

Discussione

I risultati hanno dimostrato come il pascolo, agendo come fattore di disturbo, abbia selezionato specie più ruderali con una tendenza a strategie di crescita più acquisitive (es. crescita rapida, alto tasso fotosintetico e alta concentrazione di nutrienti, basso investimento in massa fogliare) e tolleranti il pascolo (Rota et al. 2017), come la fabacea *Trifolium incarnatum* L. Al contempo il pascolo ha promosso un aumento complessivo della diversità funzionale. Al contrario, i plot non pascolati presentavano delle specie con una strategia di crescita più conservativa, a scapito di una ridotta diversità funzionale e di una tendenza all'omogeneizzazione dovuta alla dominanza esercitata in questo caso dalla maggior abbondanza di piante graminoidi perenni (es. *Bromus erectus* Huds.), più resistenti allo stress. Tuttavia, i plot pascolati e funzionalmente più ricchi si sono dimostrati più

suscettibili agli eventi climatici anomali rispetto a quelli non pascolati, poiché la strategia più acquisitiva delle specie selezionate dal regime di pascolo le rende più vulnerabili ad eventi climatici estremi, specialmente in concomitanza di prolungati periodi di siccità e prolungate ondate di calore. Alcune specie generaliste e sinantropiche quali *T. incarnatum* hanno tuttavia mostrato un'elevata resilienza. Questi risultati evidenziano come la valutazione delle risposte funzionali delle comunità al cambiamento climatico sia uno strumento essenziale che dovrebbe essere sempre integrato con le classiche misure tassonomiche (es. ricchezza di specie), soprattutto durante la definizione degli obiettivi di progetti di ripristino.

Letteratura citata

- Bengtsson J, Bullock JM, Egoh B, Everson C, Everson T, O'Connor T, O'Farrell PJ, Smith HG, Lindborg R (2019) Grasslands—more important for ecosystem services than you might think. *Ecosphere* 10(2): e02582.
- Elst EM, De Boeck HJ, Vanmaele L, Verlinden M, Dhliwayo P, Nijs I (2017) Impact of climate extremes modulated by species characteristics and richness. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 24: 80-92.
- Lepš J, Májeková M, Vítová A, Doležal J, de Bello F (2018) Stabilizing effects in temporal fluctuations: management, traits, and species richness in high-diversity communities. *Ecology* 99(2): 360-371.
- Rota C, Manzano P, Carmona CP, Malo JE, Peco B (2017) Plant community assembly in Mediterranean grasslands: understanding the interplay between grazing and spatiotemporal water availability. *Journal of Vegetation Sciences* 28(1): 149-159.

Candidato: Nicola Pavanetto

Relatore: Giovanni Bacaro

Correlatori o Relatori esterni: Enrico Tordoni, Francesco Petruzzellis, Simona Maccherini

Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste, Via Licio Giorgieri 10, 34127 Trieste

Anno di discussione: 2020

Sviluppo di un nuovo pacchetto R (Rarefy) per il calcolo di curve di rarefazione tassonomiche, funzionali e filogenetiche spazialmente esplicite

E. Thouverai

Introduzione

I metodi di rarefazione sono largamente usati in ecologia vegetale per comparare misure di diversità tassonomiche, funzionali o filogenetiche basate su uno sforzo campionario comparabile (Bacaro et al. 2012). Tuttavia, si è reso necessario lo sviluppo di curve di rarefazione spazialmente esplicite poiché è evidente come l'inclusione dell'autocorrelazione spaziale in queste curve è in grado di modificare i pattern osservati di diversità e può cambiare in modo sostanziale la prioritizzazione degli hotspot di diversità e delle riserve naturali (Bacaro et al. 2016). Considerando quindi la necessità di avere metodi di rarefazione spazialmente espliciti che tengano conto dell'autocorrelazione spaziale fra le unità campionarie ed il crescente bisogno di promuovere una scienza aperta tramite l'uso di software open source, si è realizzato, attraverso questo lavoro di tesi, un nuovo pacchetto R denominato "Rarefy". Inoltre, come esempio di una possibile applicazione di tale pacchetto, la funzione "ser_functional", è stata utilizzata per la prima volta per la costruzione di una curva di rarefazione funzionale in cui le unità campionarie sono state ordinate tenendo conto della distanza filogenetica delle comunità vegetali campionate.

Materiali e Metodi

Un pacchetto R è una collezione di funzioni e datasets sviluppati dalla comunità di utenti di R. In termini pratici, può essere visto come una cartella contenente i file "description" (breve descrizione delle caratteristiche del pacchetto) e "namespace" (lista di imports ed exports del pacchetto), oltre che le cartelle denominate "R" (contenente le funzioni) e "man" (contenente i file di help per le funzioni). Nelle funzioni incluse nel pacchetto viene calcolata la rarefazione spazialmente e non spazialmente esplicita utilizzando diversi indici di diversità tassonomica, funzionale e filogenetica col metodo delle curve di accumulazione. Il calcolo di una curva di accumulazione avviene stimando la misura di biodiversità selezionata per un numero crescente e cumulato di unità di campionamento. Nel caso della rarefazione spazialmente esplicita, il numero di curve di accumulazione costruite corrisponde al numero di unità di campionamento che per ogni iterazione saranno riordinate in base alla distanza spaziale tra di esse. Per quanto riguarda le curve non spazialmente esplicite, il processo avviene

per un numero casuale di iterazioni deciso dall'utente e le unità di campionamento saranno ordinate in maniera casuale ogni volta. Le curve di accumulazione ottenute vengono poi mediate per ottenere la curva di rarefazione corrispondente. Per quanto riguarda il caso in studio, i dati utilizzati sono stati tratti da Caccianiga et al. (2006). L'area di studio è situata presso il ghiacciaio Rutor in Valle d'Aosta, tra i 2400 ed i 3000 m di altitudine, dove 45 specie sono state campionate in 59 unità di campionamento. Per ogni specie, sono stati calcolati alcuni tratti funzionali quali canopy height (mm), leaf dry matter content (LDMC; %), leaf dry weight (LDW; mg), specific leaf area (SLA; $\text{mm}^2 \text{mg}^{-1}$), leaf nitrogen content (LNC; %), leaf carbon content (LCC; %). Le specie sono state inoltre classificate secondo le strategie CSR con valori fuzzy da 1 a 100 in modo che la somma di C (competitors), S (stress tollerators) ed R (ruderals) sia 100. Da Daphne phylogeny (Durka, Michalski 2012) è stato successivamente estratto un albero filogenetico dal quale è stata poi calcolata una matrice di distanza filogenetica tra specie. Per le analisi è stata utilizzata la funzione "ser_functional" inclusa nel pacchetto "Rarefy", grazie alla quale sono state calcolate 2 curve di rarefazione filogeneticamente esplicite partendo da 2 matrici di distanze funzionali, una calcolata sui tratti funzionali ed una sulle strategie CSR. Le 2 curve sono state confrontate con la controparte non filogeneticamente esplicita.

Risultati

Il pacchetto "Rarefy" è stato inviato al CRAN ("Comprehensive R Archive Network", <https://CRAN.R-project.org>) e, dopo una lunga revisione, è stato pubblicato ufficialmente e reso accessibile dal 27 maggio 2020 a tutta la comunità scientifica (<https://cran.r-project.org/web/packages/Rarefy/index.html>). Le funzioni incluse nel pacchetto rappresentano un nuovo approccio metodologico per svolgere analisi sulla biodiversità, implementando l'approccio classico del calcolo della diversità tassonomica, funzionale e filogenetica nel contesto della rarefazione includendo la componente spaziale ed estendendone di conseguenza la validità e la correttezza. Per quanto riguarda il caso in studio, è stato osservato, per entrambe le curve funzionali basate su un ordinamento dettato dalla distanza filogenetica delle varie unità di campionamento (filogeneticamente esplicite), un andamento di crescita nettamente inferiore rispetto alle corrispondenti curve non filogeneticamente esplicite. Le curve non filogeneticamente esplicite costruite coi tratti funzionali e CSR raggiungono entrambe la gamma diversità per l'indice di Rao (rispettivamente 0,25 e 0,32) già con 10 unità di campionamento, mentre le curve filogeneticamente esplicite hanno valori più bassi (rispettivamente 0,22 e 0,29) e raggiungono la gamma diversità accumulando tutte le 59 unità di campionamento.

Discussione

In ecologia, l'influenza dell'organizzazione spaziale sulle misure e sui patterns di diversità è ben nota (Bacaro et al. 2016), così come è nota la necessità di misurare diverse caratteristiche della biodiversità (diversità tassonomica, funzionale e filogenetica) per comprendere a pieno la composizione, le dinamiche e la struttura di una comunità naturale (Arnan et al. 2017). In questo contesto, il pacchetto "Rarefy" consente di calcolare la rarefazione spazialmente esplicita utilizzando varie metriche di diversità funzionale (funzione ser_functional), filogenetica (funzione ser_phylo) e tassonomica (funzioni rare_alpha e rare_beta), consentendo l'esplorazione di diverse caratteristiche della biodiversità ed includendo l'effetto dell'autocorrelazione spaziale tra le unità di campionamento nel calcolo di queste metriche. È anche possibile costruire curve di rarefazione spazialmente esplicite utilizzando gradienti diversi da quello spaziale, caricando una generica matrice di distanza tra le unità di campionamento. Ad esempio, nel caso in studio è stata presentata una curva di rarefazione funzionale filogeneticamente esplicita basata sulle distanze filogenetiche tra le unità di campionamento, dimostrando che la rarefazione può essere utilizzata per misurare la diversità funzionale tenendo in considerazione i processi eco-evolutivi avvenuti nell'area di studio. In particolare, ci si aspetta che la curva funzionale filogeneticamente esplicita cresca più lentamente della sua controparte classica, in quanto specie filogeneticamente correlate condividono tratti funzionali più simili, i quali portano le specie a manifestarsi più spesso nelle stesse comunità riflettendo le loro tolleranze ambientali condivise, o a non manifestarsi se i tratti simili inducono competizione (Ricotta et al. 2015). In entrambe le curve, questo pattern è evidente e necessita di ulteriori approfondimenti. In queste analisi viene messa in evidenza la versatilità del pacchetto "Rarefy" nello sfruttare diverse metriche di biodiversità per il calcolo della rarefazione spazialmente esplicita lungo un gradiente. Il pacchetto include un considerevole elenco di indici di diversità per la costruzione delle curve, selezionati in base alla loro notorietà e idoneità con la generalizzazione di rarefazione proposta. Il pacchetto "Rarefy" offre inoltre la possibilità all'utente di stimare la rarefazione con una metrica non compresa tra quelle disponibili grazie all'inserimento dell'argomento fun_div, opzione delle varie funzioni che permette di definire un proprio indice di diversità. In conclusione, è possibile affermare che il pacchetto "Rarefy", disponibile sul CRAN per tutta la comunità scientifica, rappresenta la soluzione definitiva per calcolare la rarefazione con qualsiasi metrica di diversità tenendo conto del contributo dell'ordinamento basato su ogni tipo di distanza delle unità di campionamento, offrendo stime ecologiche significative delle diversità attese al crescere della dimensione del campione.

Letteratura citata

- Arnan X, Cerdá X, Retana J (2017) Relationships among taxonomic, functional, and phylogenetic ant diversity across the biogeographic regions of Europe. *Ecography* 40(3): 448-457.
- Bacaro G, Altobelli A, Cameletti M, Ciccarelli D, Martellos S, Palmer MW, Ricotta C, Rocchini D, Scheiner SM, Tordoni E, Chiarucci A (2016) Incorporating spatial autocorrelation in rarefaction methods: Implications for ecologists and conservation biologists. *Ecological Indicators* 69: 233-238.
- Bacaro G, Rocchini D, Ghisla A, Marcantonio M, Neteler M, Chiarucci A (2012) The spatial domain matters: Spatially constrained species rarefaction in a Free and Open Source environment. *Ecological Complexity* 12: 63-69.
- Caccianiga M, Luzzaro A, Pierce S, Ceriani RM, Cerabolini B (2006) The functional basis of a primary succession resolved by CSR classification. *Oikos* 112(1): 10-20.
- Durka W, Michalski SG (2012) Daphne: a dated phylogeny of a large European flora for phylogenetically informed ecological analyses. *Ecology* 93(10): 2297.
- Ricotta C, Bacaro G, Caccianiga M, Cerbolini BEL, Moretti M (2015) A classical measure of phylogenetic dissimilarity and its relationship with beta diversity. *Basic and Applied Ecology* 16(1): 10-18.

Candidato: Elisa Thouverai

Relatore: Giovanni Bacaro

Correlatori o Relatori esterni: Sandrine Pavoine, Enrico Tordoni

Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste, Via Licio Giorgieri 10, 34127 Trieste

Anno di discussione: 2020

Dalle mughete ai pascoli alpini. Storia degli ecosistemi nell'Olocene alla testata delle Alpi Orobie

M.D. Novellino

Introduzione

Quali sono gli eventi nella storia umana e del clima che hanno innescato la transizione da foreste boreali e brughiere a comunità erbacee all'interno del comprensorio alpino (Pini et al. 2017)? Il sito oggetto di studio, denominato Moia Armentarga, è localizzato nel settore orobico orientale della Val Brembana a 2345 m s.l.m. (comune di Carona). Esso rappresenta un archivio naturale di informazioni paleoambientali di straordinaria qualità, che fornisce una registrazione della storia della vegetazione e del clima degli ultimi 11500 anni, fin dall'inizio dell'Olocene. Si tratta di una successione sedimentaria di tipo lacustre situata al di sopra del limite degli alberi, che attualmente presenta le caratteristiche ecologiche tipiche della torbiera a Cyperaceae. Le torbiere sono ecosistemi ricchi di biodiversità, ma hanno anche un importante valore paleoecologico, paleoclimatico ed archeologico dei depositi che si sono accumulati al di sotto della superficie visibile (Badino et al. 2012). L'obiettivo di questo lavoro di tesi è ricostruire la storia degli ecosistemi durante gli ultimi 3000 anni, basata sul confronto di dati paleoecologici, fornendone un'interpretazione mediante la datazione degli eventi riconosciuti e il confronto con la documentazione storico-archeologica, che attesta la frequentazione umana a partire dal V sec a.C.

Materiali e Metodi

Il materiale analizzato è rappresentato da carote di sedimento estratte attraverso le manovre del carotaggio denominato ARMA5. L'intervallo considerato va da 50 a 105 cm di profondità. Per ottenere datazioni ^{14}C , sono stati isolati frammenti di resti vegetali a differenti profondità per un totale di 9 datazioni. Da ciascuna carota di sedimento, ogni 2 cm sono stati estratti dei campioni per l'analisi palinologica: essi hanno seguito la preparazione standard presso il Laboratorio di Palinologia e Paleoecologia del CNR-IGAG Milano Bicocca e sono stati osservati al microscopio ottico a trasmissione di luce a ingrandimento $\times 400$. La somma pollinica minima, stabilita convenzionalmente come buona indicatrice della vegetazione circostante il bacino di sedimentazione, è stata fissata a 600 granuli pollinici per ogni campione, esclusi quelli prodotti dalle piante torbigene, annoverati nel gruppo delle erbacee di ambiente umido. Oltre all'identificazione dei granuli pollinici, sono stati studiati spore di Pteridofite, resti algali e di palinomorfi non pollinici ("non-pollen palynomorphs"), rappresentati da resti vegetali, invertebrati e spore fungine. È stato inoltre eseguito il conteggio di micro-particelle di carbone. I dati ottenuti sono stati raccolti e rappresentati mediante il diagramma pollinico percentuale. Parallelamente è stato eseguito lo studio dei frammenti di carbone da setacciatura, al fine di ricostruire la storia degli incendi nell'area circostante il bacino di sedimentazione: questi campioni sono stati conteggiati utilizzando uno stereomicroscopio

a ingrandimento $\times 16$ e $\times 40$. Sono state inoltre eseguite analisi con tecnica LOI (“Loss on Ignition”), per la stima di acqua, sostanza organica totale, carbonati, residuo silicoclastico e ossidi nel sedimento; misure della suscettività magnetica, diagnostica di eventi meteorologici eccezionali; analisi delle diverse forme di fosforo, interpretate come disponibilità di nutrienti apportata dalla stabulazione del bestiame. L’analisi delle componenti principali (PCA) è stata impostata sui dati ottenuti con le tecniche sopra elencate della successione ARMA5.

Risultati

L’approccio paleoecologico multiproxy ha consentito di ricavare una visione dettagliata degli eventi che si sono verificati nel tempo: lo studio del contenuto pollinico effettuato su 27 campioni, ha portato ad un conteggio di oltre 16200 granuli pollinici riconducibili a specie presenti nella flora nord-italiana attuale, oltre al riconoscimento di altri palinomorfi non pollinici, tra cui spore di Pteridofite, alghe, spore di fungo coprofilo, stomi. Le analisi al microscopio sono state accompagnate da tavole fotografiche rappresentanti i diversi palinomorfi identificati. La registrazione pollinica è rappresentata in forma di diagramma pollinico, affiancato dalle colonnine stratigrafiche di riferimento e dal modello età-profondità, elaborato a partire dai risultati delle datazioni ^{14}C . Basandosi sulle maggiori variazioni percentuali dei taxa più rappresentativi, è stato possibile suddividere la registrazione pollinica in diverse zone e sub-zone polliniche. A questi risultati si sono affiancate le analisi svolte su 33 campioni per la determinazione delle forme del fosforo, termogravimetriche con tecnica LOI, di suscettività magnetica e di conteggio di frammenti di carbone da setacciatura e dei clasti. La PCA ha rivelato che le variabili forestali (*Alnus viridis* [Chaix] DC., *Corylus* sp. e *Picea* sp.) si associano ai campioni più profondi, mentre la posizione di campioni più recenti si associa a taxa connessi alle colture umane e favoriti dalla loro presenza (es. *Castanea* sp. e *Juglans* sp.), oltre che una maggior presenza di spore di fungo coprofilo (spore tipo *Sporormiella*, *Sordaria* e *Podospora*). Procedendo ancora verso campioni meno profondi, ne troviamo prima alcuni appaiati a proxy ambientali, come la concentrazione di fosforo totale e i carboni da setacciatura, fino ad arrivare all’accostamento con taxa riconducibili al pascolo, come Poaceae e Cichorioideae, e con specie strettamente legate all’uomo, come i cereali e *Cannabis/Humulus*, che rivelano la presenza di colture a pochi chilometri dal sito di studio. Infine, gli ultimi campioni della successione, all’interno del plot della PCA, tendono nuovamente ad associarsi a variabili forestali, meno riconducibili alla presenza dell’uomo. L’analisi della disposizione dei campioni rispetto alle variabili mostrata dall’analisi multivariata ha permesso la suddivisione degli ultimi 3000 anni di storia paleoambientale in 6 distinte fasi.

Discussione

Nella prima fase, collocabile tra l’Età del Ferro e l’Età Romana (XI-I sec. a.C.), l’abbondanza di polline appartenente a taxa forestali, come *A. viridis*, *Corylus* sp. e *Abies* sp., accompagnata da bassi valori per gli indicatori antropogenici, è interpretabile con un periodo con impatto antropico moderato (alpeggio). Nella seconda fase, a cavallo tra l’Età Romana e l’Età Longobarda (II-VII sec. d.C.), si riscontra pressione antropica, segnalata dall’aumento di spore di funghi coprofili e di concentrazione dei carboni da setacciatura. Il confronto con dati storici porta ad evidenziare un coevo sviluppo di attività metallurgiche in ambiente subalpino, con prelievo di legna (carbonaie) e apertura di pascoli (alpeggi). Nella terza fase, che si posiziona tra il IX ed il XIII sec., in piena Età Medievale, si verificano importanti cambiamenti nella registrazione pollinica, come l’aumento di *Castanea* sp. e *Juglans* sp., nonché la comparsa di polline di cereali. Le fonti storiche (Zonca 1998, Ceriani 2018) testimoniano una fase di maggiore fermento sociale, confermando peraltro la presenza di colture in relazione alla fondazione dei primi villaggi montani di Carona e Pagliari, posti rispettivamente a 3 e 6 km a valle dell’area di studio. La quarta fase, che si colloca nel Tardo Medioevo (XIV-XV sec.), rispecchia una fase di marcato impatto antropico, testimoniato da un aumento dei valori di fosforo, insieme a quelli di *Plantago* tipo *lanceolata* e dei carboni da setacciatura. La quinta fase segna il passaggio tra Medio Evo ed Età Moderna (XV-XVI sec.), dove il polline di cereali raggiunge i massimi valori espressi nella successione ed è concomitante a una diminuzione di *Castanea* e *Juglans*; questi dati indicano il declino dalla coltura del noce e del castagno a favore di quella dei cereali. Nell’ultima fase, a cavallo tra XVI e XVII sec., si ha una diminuzione della pressione antropica, come testimonia la minore presenza di indicatori antropogenici, probabilmente da attribuirsi anche ai cambiamenti climatici in atto in quel periodo (inizio della Piccola Età Glaciale). Circa quest’ultima fase, la ricostruzione della temperatura di luglio (Furlanetto et al. 2018), il confronto con le oscillazioni dei ghiacciai alpini (Le Roy et al. 2015) e le serie dendrocronologiche (Büntgen et al. 2005), suggeriscono che temperature più rigide e un aumento dell’innervamento, durante la Piccola Età Glaciale, si sia tradotto in una marcata riduzione dello sfruttamento dell’area da parte dell’uomo.

Letteratura citata

- Badino F, Pini R, Ravazzi C (2012) Le torbiere: un archivio per la biodiversità e la preistoria. Environnement. Ambiente e territorio in Valle d’Aosta 17(56): 36-39.
Büntgen U, Esper J, Frank DC, Nicolussi K, Schmidhalter M (2005) A 1052-year tree-ring proxy for Alpine summer

- temperatures. *Climate Dynamics* 25: 141-153.
- Ceriani D (2018) Patrimoni monastici in Valle Brembana (secc. XI-XII). *Quaderni Brembani* 17: 48-63.
- Furlanetto G., Ravazzi C, Pini R, Vallè F, Brunetti M, Comolli R, Novellino MD, Garozzo L, Maggi V (2018) Holocene vegetation history and quantitative climate reconstructions in a high-elevation oceanic district of the Italian Alps. Evidence for a middle to late Holocene precipitation increase. *Quaternary Science Reviews* 200: 212-236.
- Le Roy M, Nicolussi K, Deline P, Astrade L, Edouard JL, Miramont C, Arnaud F (2015) Calendar-dated glacier variations in the western European Alps during the Neoglacial: the Mer de Glace record, Mont Blanc massif. *Quaternary Science Review* 108: 1-22.
- Pini R, Ravazzi C, Raiteri L, Guerreschi A, Castellano L, Comolli R (2017) From pristine forests to high-altitude pastures: an ecological approach to prehistoric human impact on vegetation and landscapes in the western Italian Alps. *Journal of Ecology* 105(6): 1580-1597.
- Zonca A (1998) *Gli uomini e le terre dell'Abbazia San Benedetto di Vallalta (secoli XII-XIV)*. Comune di Bergamo, Comune di Albino. 300 pp.

Candidato: Massimo Domenico Novellino

Relatore: Roberta Pini

Correlatori o Relatori esterni: Cesare Ravazzi, Giulia Furlanetto

Dipartimento di Bioscienze, Università di Milano, Via Giovanni Celoria 26, 20133 Milano

Anno di discussione: 2019

AUTORI

Teresa Mazzarella, Pietro Appendino, Alice Giletta, Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università di Torino, Largo Paolo Braccini 2, 10095 Grugliasco (Torino)

Elisa Moscato, Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università di Torino, Via Accademia Albertina 13, 10123 Torino

Laura Zara, Nicola Pavanetto, Elisa Thouverai, Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste, Via Licio Giorgieri 10, 34127 Trieste

Armida Nardo, Dipartimento di Studi Linguistici e Letterari, Università di Padova, Via E. Vendramini 13, 35137 Padova

Luca Maccaroni, Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università Politecnica delle Marche, Piazza Roma 22, 60121 Ancona

Letizia Di Lisa, Dipartimento di Agricoltura, Ambiente e Alimenti, Università del Molise, Via Francesco De Sanctis s.n.c., 86100 Campobasso

Vincenzo Osso, Dipartimento di Biologia, Ecologia e Scienze della Terra, Università della Calabria, Via Pietro Bucci 12/C, 87036 Rende (Cosenza)

Luca Boldrini, Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie, Università di Bologna, Via Irnerio 42, 40126 Bologna

Massimo Domenico Novellino, Dipartimento di Bioscienze, Università di Milano, Via Giovanni Celoria 26, 20133 Milano

Responsabile della Rubrica: Adriano Stinca (adriano.stinca@unicampania.it; adriano.stinca@unina.it), Dipartimento di Scienze e Tecnologie Ambientali, Biologiche e Farmaceutiche, Università della Campania Luigi Vanvitelli, Via Vivaldi 43, 81100 Caserta