

**Programma Short-term Mobility 2007**  
**University of Virginia (Charlottesville, VA, USA)**

**1-23/9/07**

**Il Proponente: Dr. Francesco Loreto**

**Il Fruitore: Federico Brilli**

**Relazione Scientifica:**

**“Fisiologia ed emissione di VOCs (*Volatile Organic Compounds*) da parte della  
specie invasiva *Pueraria montana* (kudzu) in Nord-America”**

**Introduzione**

Il kudzu, *Pueraria montana* (Lour.) è una pianta rampicante appartenente alla famiglia *Fabaceae* (o *Leguminosae*) ed è stata conosciuta per la prima volta negli USA nel 1876 durante la *Centennial Exposition* in Philadelphia, PA. Inizialmente, è stata abbondantemente utilizzata dal *Soil Erosion Service and Civilian Conservation Corp* per ridurre l'erosione dei terreni, ma è stata successivamente bandita nel 1953. Nel 1970 è stata ufficialmente classificata come una pianta infestante e nel 1997 è stata inserita nella “*Federal Obnoxious Weed List*” (Forst et al, 2004). Attualmente è stato stimato che il kudzu sia presente su circa 3 milioni di ettari nella parte orientale degli USA, e che si stia diffondendo ad una velocità di circa 50,000 ettari all'anno.

Il kudzu è caratterizzato da un veloce tasso di crescita, elevati livelli di area fogliare e di fotosintesi, e dalla capacità di emettere abbondanti quantità di isoprene (Sharkey & Loreto, 1993; Wiberley et al, 2005). Sia per la sua abilità a sovrastare ed ombreggiare alberi utilizzandoli come semplici supporti nella ricerca delle migliori condizioni di luce, che per la sua capacità azoto-fissatrice che rende più semplice l'approvvigionamento delle risorse utili alla produzione di proteine (come per es. la ribulosio bifosfato carbossilasi impiegata nella fotosintesi), il kudzu risulta essere un forte competitore per le specie indigene. Proprio per queste sue forti caratteristiche invasive, il kudzu possiede potenzialmente la capacità di alterare le proprietà biogeochimiche dell'ecosistema dove si diffonde, specialmente se povero di specie azoto-fissatrici che possano competere con esso, limitandone la crescita. Attualmente, questa situazione si sta verificando nella parte orientale degli USA dove il kudzu è largamente più diffuso di altre specie azoto-fissatrici (compresa la soia) (Mitich, 2000; USDA, 2002).

E' ipotizzabile che il futuro aumento delle temperature e del livello di CO<sub>2</sub> nell'atmosfera, previsto come conseguenza dei cambiamenti climatici, possa determinare un'espansione dell'areale di diffusione del kudzu, poiché la sua crescita è particolarmente stimolata dall'aumento della concentrazione di CO<sub>2</sub> (non essendoci alcuna limitazione alla traslocazione del carbonio assimilato con la fotosintesi nel tessuto legnoso). Uno studio più approfondito dell'impatto dell'espansione della pianta di kudzu sull'intero ecosistema risulta necessario, al fine di investigare possibili alterazioni a carico del ciclo dell'azoto, delle comunità microbiche del terreno e della quantità di VOCs (*Volatile Organic Compounds*) emessi nell'atmosfera.

## Materiali & Metodi

### *Ciclo dell'azoto*

Campioni di suolo sono stati prelevati da un sito sperimentale del Maryland (USA), sia da un appezzamento invaso dalla pianta di kudzu, che da uno non invaso adiacente al precedente. I due diversi appezzamenti sono stati selezionati in modo da avere simile: pendenza, aspetto ed uso agronomico. Nello stesso sito sono stati raccolti campioni di foglie appartenenti a piante di kudzu ed ad altre 7 specie diverse di alberi.

Il contenuto di azoto inorganico ( $\text{NO}_3^-$  ed  $\text{NH}_4^+$ ) del terreno è stato quantificato attraverso un'estrazione in cloruro di potassio (KCl) ed utilizzando un analizzatore Lachat (Wilsonville, OR, USA). La quantità totale di azoto e di carbonio è stata determinata utilizzando un sistema CE Flash EA 1112 Elemental Analyzer.

La quantità netta di azoto mineralizzato è stata determinata incubando 10 giorni in laboratorio i campioni di terreno raccolti, e calcolando la differenza tra il contenuto di azoto inorganico estratto all'inizio ed alla fine del periodo di incubazione. Parallelamente, la quantità netta di azoto nitrificato è stata determinata calcolando la differenza tra il contenuto di  $\text{NO}_3^-$  presente nei campioni all'inizio ed alla fine dello stesso periodo di incubazione.

Un indice relativo all'attività microbica di denitrificazione è stato ricavato attraverso il metodo dell'inibizione con acetilene (Smith et al., 1978), utilizzando un gas cromatografo per misurare lo sviluppo di  $\text{N}_2\text{O}$  dopo un ora e dopo tre ore.

### *Misurazioni di scambio gassoso e campionamento di VOCs*

Le foglie di kudzu utilizzate per le misurazioni sperimentali sono state prelevate giornalmente dalla vegetazione spontanea nei pressi dell'Università della Virginia (Charlottesville, VA, USA). Ogni singolo ramoscello di kudzu selezionato è stato prima reciso dalla pianta madre, poi immerso in un recipiente contenente acqua ed immediatamente tagliato sott'acqua per evitare la cavitazione dei vasi. I ramoscelli di kudzu così campionati sono stati successivamente trasportati in laboratorio.

Le performance della pianta di kudzu sono state analizzate in condizioni controllate di: intensità luminosa =  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , UR = 50-55 %, temperatura = 30 °C e concentrazione di  $\text{CO}_2$  = 380 ppm, attraverso il monitoraggio *in vivo* a livello fogliare dei flussi di  $\text{CO}_2$  e di  $\text{H}_2\text{O}$  utilizzando un sistema di scambio gassoso portatile Li-6400 (Li-Cor, Lincoln, USA). In particolare, foglie giovani (in fase di espansione) e di foglie adulte (già completamente espanse), sono state caratterizzate misurando i parametri di fotosintesi, conduttanza stomatica, concentrazione intercellulare di  $\text{CO}_2$  e traspirazione.

L'emissione di VOCs (Volatile Organic Compounds) è stata campionata *in vivo* e contemporaneamente ai flussi di  $\text{CO}_2$  e di  $\text{H}_2\text{O}$  utilizzando un sistema di analisi per ionizzazione chimica (Proton Transfer Reaction Mass Spectrometer) (PTR-MS, Ionicon, Innsbruck, Austria). Inoltre, il PTR-MS collegato all'uscita della cuvetta fogliare del Li-6400 è stato impiegato per riportare l'emissione di VOCs a fotosintesi, conduttanza stomatica e traspirazione durante l'applicazione di un rapido stress idrico conseguente al taglio del picciolo fogliare, sia in foglie giovani che adulte di kudzu.

## Risultati e discussione

Dalla comparazione dei campioni di foglie raccolti appartenenti a diverse specie è risultato evidente come il kudzu sia la specie che possiede la maggiore concentrazione di azoto (Fig 1). Le analisi dei campioni di terreno hanno evidenziato la capacità del kudzu di alterare il ciclo dell'azoto nel suolo. Infatti, nonostante l'indice relativo all'attività microbica di denitrificazione sia risultato più o meno simile nei due appezzamenti considerati (Fig 2a), entrambe le quantità totali di azoto mineralizzato (Fig 2b) e nitrificato (Fig 2c) sono risultate maggiori nell'appezzamento infestato dal kudzu rispetto a quello adiacente non infestato (rispettivamente 2 ed 1.6 volte maggiori).

La misurazione delle performance fisiologiche della pianta di kudzu non ha evidenziato differenze statisticamente rilevanti tra foglie giovani ed adulte nei parametri di fotosintesi, conduttanza stomatica, concentrazione intercellulare di CO<sub>2</sub> e traspirazione (Fig 3a, 3b, 3c, 3d). Ciò è interessante perché la maggiore quantità di azoto non corrisponde al previsto aumento di fotosintesi, almeno per unità di superficie. Un minor livello di fotosintesi è stato osservato nelle foglie giovani di kudzu rispetto a quelle adulte (Fig. 3a); questa leggera differenza può essere direttamente correlata ad una minore attività della ribulosio-bisfosfato carbossilasi, come risulta dal valore più elevato della concentrazione di CO<sub>2</sub> intercellulare nelle foglie giovani di kudzu rispetto a quelle adulte (Fig 3c).

Le foglie adulte di kudzu hanno mostrato un'emissione di isoprene molto maggiore di quelle giovani (Fig 3e). Questo risultato è in accordo con il fatto che la capacità di emettere isoprene si sviluppa dopo alcune settimane dall'acquisizione della piena capacità fotosintetica (Wiberley et al, 2005).

L'emissione di metanolo è risultata sostanzialmente maggiore (10 volte) nelle foglie giovani che in quelle adulte di kudzu (Fig 3f). Questa notevole quantità di metanolo rilasciata dalle foglie giovani potrebbe essere collegata all'attività enzimatica delle pectin-metil-esterasi presenti nelle pareti cellulari (sottoposte a continua espansione), che dovrebbe essere particolarmente accentuata durante la fase giovanile in specie ad accrescimento rapido come il kudzu.

Il monitoraggio continuo di un rapido stress idrico indotto dopo il taglio del picciolo fogliare ha evidenziato un aumento quasi immediato e transiente della conduttanza stomatica e della fotosintesi (effetto Ivanov), dovuto alla rimozione di alcune resistenze idrauliche ed al contemporaneo ingresso di aria che spinge più velocemente il flusso linfatico all'interno dei vasi sia in foglie giovani (Fig 4b) che adulte di kudzu (Fig 5b e Fig 6b). Successivamente, il processo di disidratazione ha causato una progressiva chiusura stomatica che, determinando una crescente limitazione all'ingresso della CO<sub>2</sub> nel mesofillo fogliare, ha gradualmente limitato la fotosintesi (Fig 4b, 5b, 6b) che ha raggiunto livelli minimi dopo circa 1 ora dal taglio del picciolo. È stato interessante osservare come l'emissione di isoprene delle foglie adulte di kudzu (Fig 5a, 6a) abbia subito una leggera stimolazione in corrispondenza del punto in cui la fotosintesi ha iniziato a diminuire e si sia mantenuta a livelli elevati finché la foglia non è stata fatta acclimatare per 10 minuti in condizioni di buio (Fig 6a). Questo disaccoppiamento dell'emissione di isoprene dal processo fotosintetico potrebbe essere messo in relazione dall'attivazione di vie metaboliche extra-cloroplastiche che potrebbero aver sostenuto la biosintesi di isoprene nel momento in cui si è verificata una limitazione del carbonio proveniente dalla fotosintesi (Brilli et al. 2007).

Il veloce e progressivo processo di disidratazione ha provocato un'altrettanto progressiva diminuzione dell'emissione di metanolo, che è risultata più evidente nelle foglie giovani di kudzu (Fig 4a) dato il maggiore livello di emissione iniziale. La stretta dipendenza dell'emissione di metanolo dalla conduttanza stomatica è stata confermata sia in foglie giovani (Fig 7a; 7b), che adulte (Fig 8a; 8b) di kudzu. Però, la retta di regressione calcolata tra l'emissione di metanolo e la conduttanza stomatica, ha evidenziato una maggiore pendenza nel caso delle foglie giovani rispetto a quelle adulte di kudzu (Fig 9). Il significato di questa diversa pendenza potrebbe essere ancora direttamente collegato ad una maggiore attività enzimatica delle pectin-metil-esterasi nelle foglie giovani rispetto a quelle adulte di kudzu.

## Conclusioni

I risultati preliminari della sperimentazione condotta dall'Università della Virginia, hanno dimostrato come l'impatto invasivo del kudzu abbia realmente la capacità di alterare il ciclo biogeochimico dell'ecosistema, incrementando di un ordine di grandezza la quantità di azoto presente nel terreno (Holland et al., 2005).

In aggiunta, la valutazione delle performance fisiologiche della pianta di kudzu ha evidenziato una sua particolare resistenza allo stress idrico, poiché la fotosintesi ha raggiunto livelli minimi dopo più di un'ora dal taglio del picciolo fogliare.

Un dato interessante è emerso dall'osservazione dell'emissione di isoprene che sembra essere metabolicamente sostenuta da fonti extra-cloroplastiche alternative, nel momento in cui l'assimilazione del carbonio per via fotosintetica risulti essere limitata (Brilli et al, 2007). Questa caratteristica potrebbe conferire alla pianta di kudzu una maggiore resistenza agli stress ossidativi (Affek & Yakir, 2002) ed aumentarne ulteriormente la capacità invasiva.

Dall'analisi dell'emissione di metanolo, è stato possibile stimare un rapporto di 1:10 tra l'emissione proveniente dalle foglie adulte e quella proveniente dalle foglie giovani della pianta di kudzu. Questa emissione è stata confermata essere dipendente dall'apertura stomatica (Hüve et al, 2007), e potrebbe essere anche correlata ad una più elevata attività enzimatica delle pectin-metil-esterasi nelle foglie giovani di kudzu caratterizzate da un elevato indice di crescita, rispetto a quelle adulte.

Infine, la futura diffusione della pianta di kudzu, potrebbe essere facilitata da un incremento sia delle temperature medie stagionali che dei livelli di CO<sub>2</sub> nell'atmosfera e potrebbe portare ad un aumento della quantità di isoprene e di metanolo emessi nell'atmosfera.

## Bibliografia

Affek H. P., Yakir D. 2002. Protection by Isoprene against Singlet Oxygen in Leaves. *Plant Physiology* **129**: 269-277.

Brilli F., Barta C., Fortunati A., Lerdau M., Loreto F., Centritto M. 2007. Response of isoprene emission and carbon metabolism to drought in white poplar (*Populus alba*) saplings. *New Phytologist* **175**: 244-254.

Forseth, I. N., and A. F. Innis. 2004. Kudzu (*Pueraria montana*): History, physiology, and ecology combine to make a major ecosystem threat. *Critical Reviews in Plant Sciences* **23**:401-413.

Holland, E. A., B. H. Braswell, et al. 2005. Nitrogen deposition onto the United States and western Europe: Synthesis of observations and models. *Ecological Applications* **15**: 38-57.

Hüve K., Christ M. M., Kleist E., Uerlings R., Niinemets Ü., Walter A., Wildt J. 2007. Simultaneous growth and emission measurements demonstrate an interactive control of methanol release by leaf expansion and stomata. *Journal of Experimental Botany* **58**: 1783-1793.

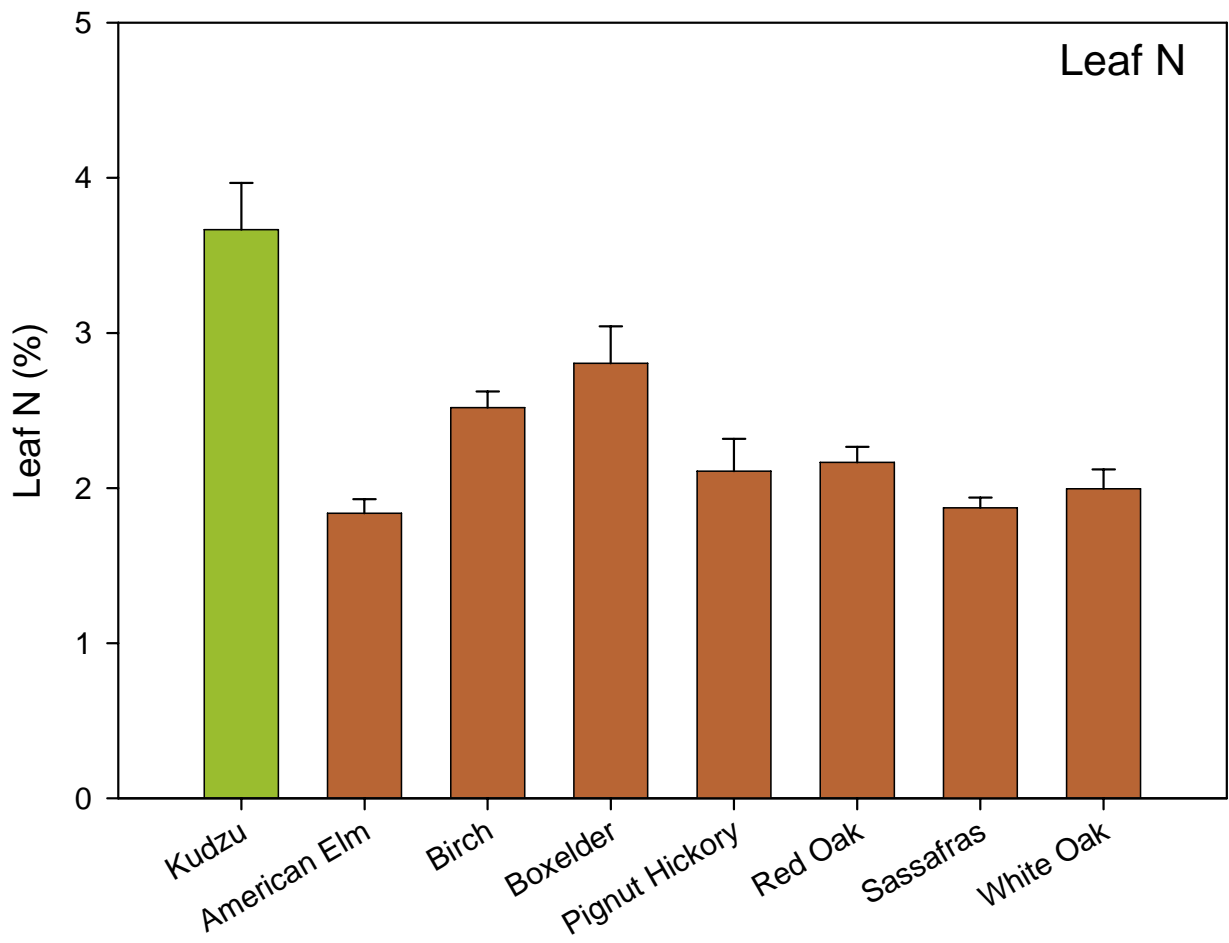
Mitich, L. W. 2000. Intriguing world of weeds series 67 - Kudzu *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. *Weed Technology* **14**:231-235.

Sharkey T. D., Loreto F. 1993. Water stress, temperature, and light effect on the capacity for isoprene emission and photosynthesis of kudzu leaves. *Oecologia* **95**: 328-333.

Smith, M. S., M. K. Firestone, et al. 1978. Acetylene Inhibition Method For Short-Term Measurement Of Soil Denitrification And Its Evaluation Using N-13. Soil Science Society of America Journal **42**: 611-615.

United States Department of Agriculture National Agricultural Statistics Service. 2002. 2002 Census of Agriculture. [http://www.nass.usda.gov/Census\\_of\\_Agriculture/index.asp](http://www.nass.usda.gov/Census_of_Agriculture/index.asp)

Wiberley A. E., Linskey A. L., Falbel T. G., Sharkey T. D. 2005. Development of the capacity for isoprene emission in kudzu. Plant, Cell and Environment **28**: 898-905.



**Fig 1**

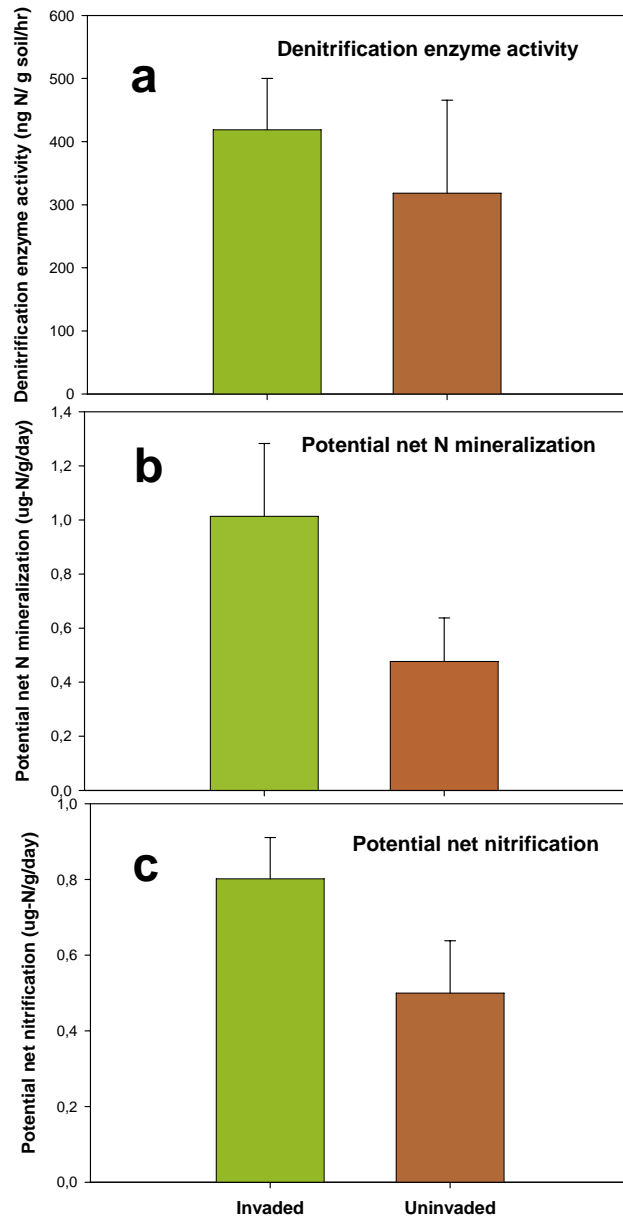
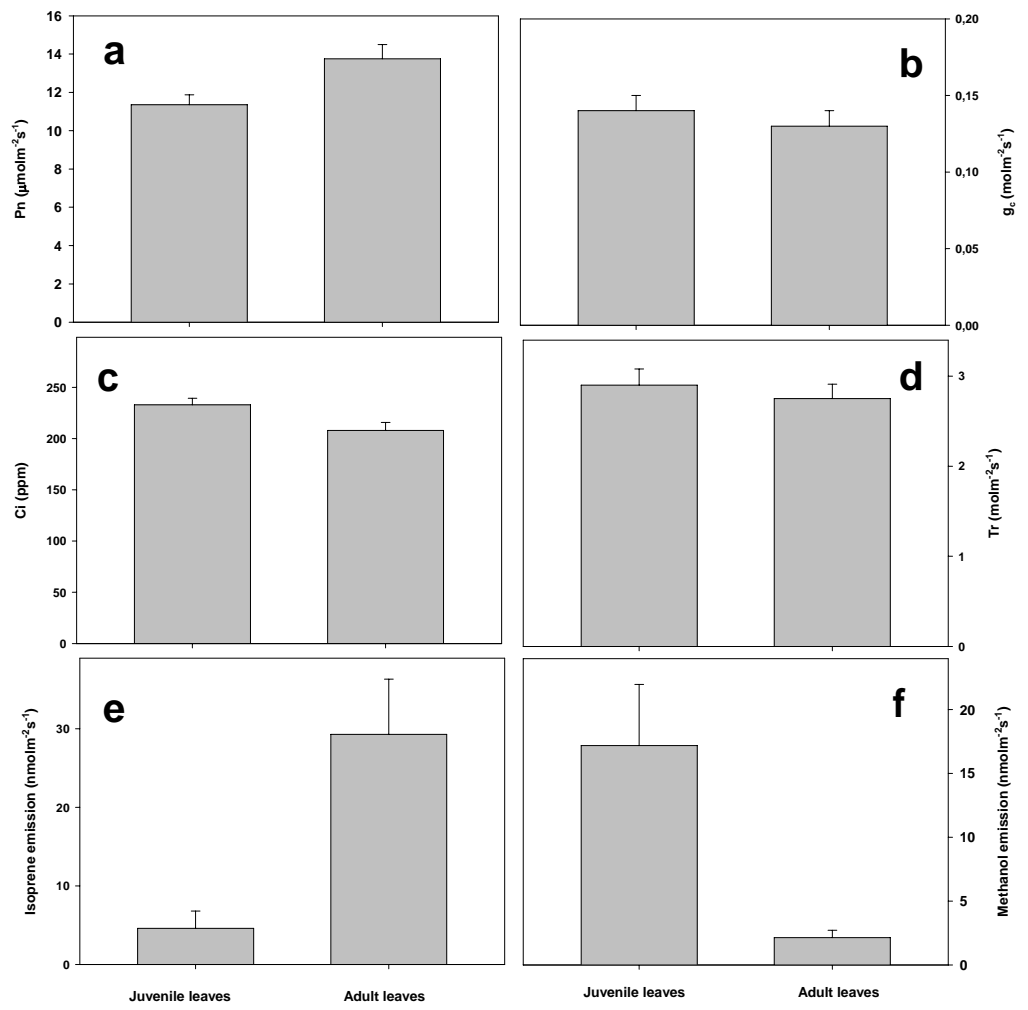


Fig 2



**Fig 3**



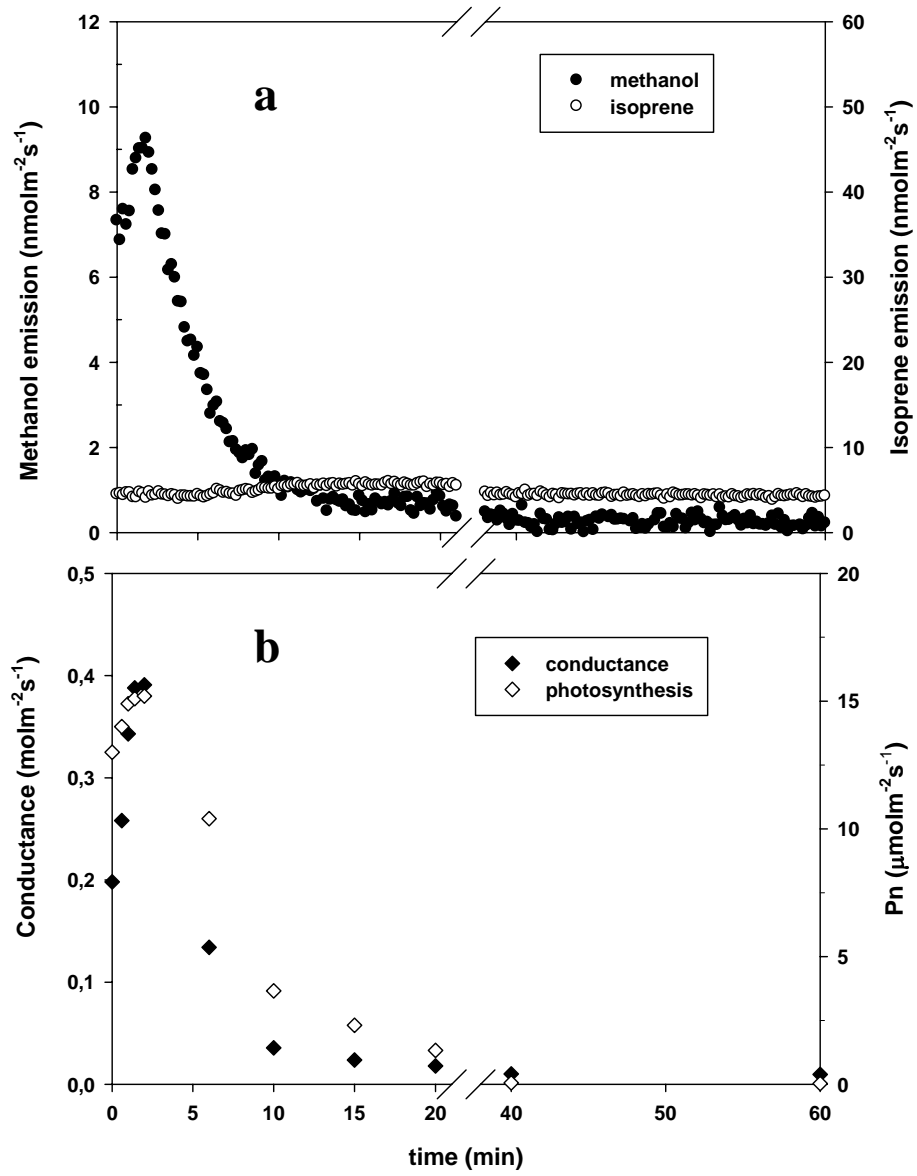


Fig 4

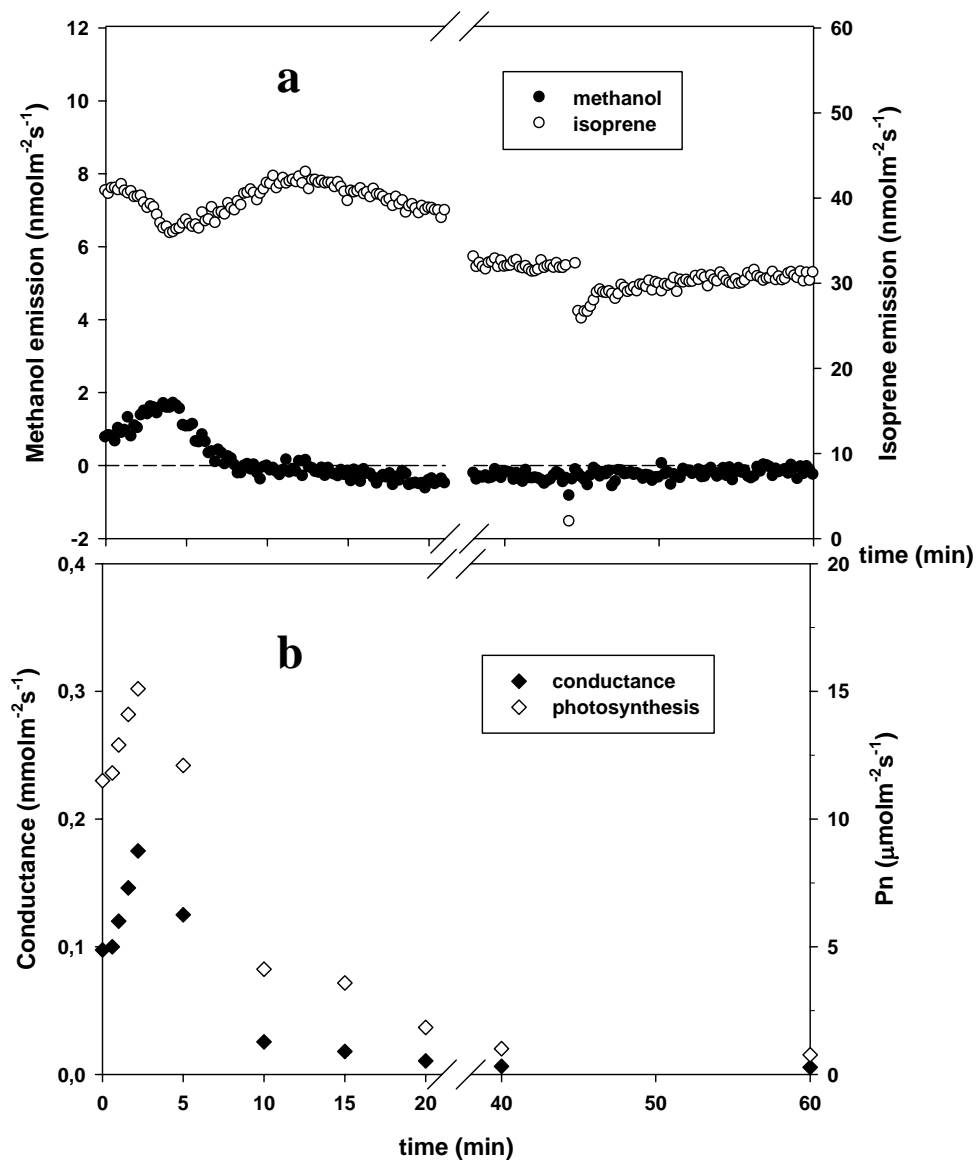


Fig 5

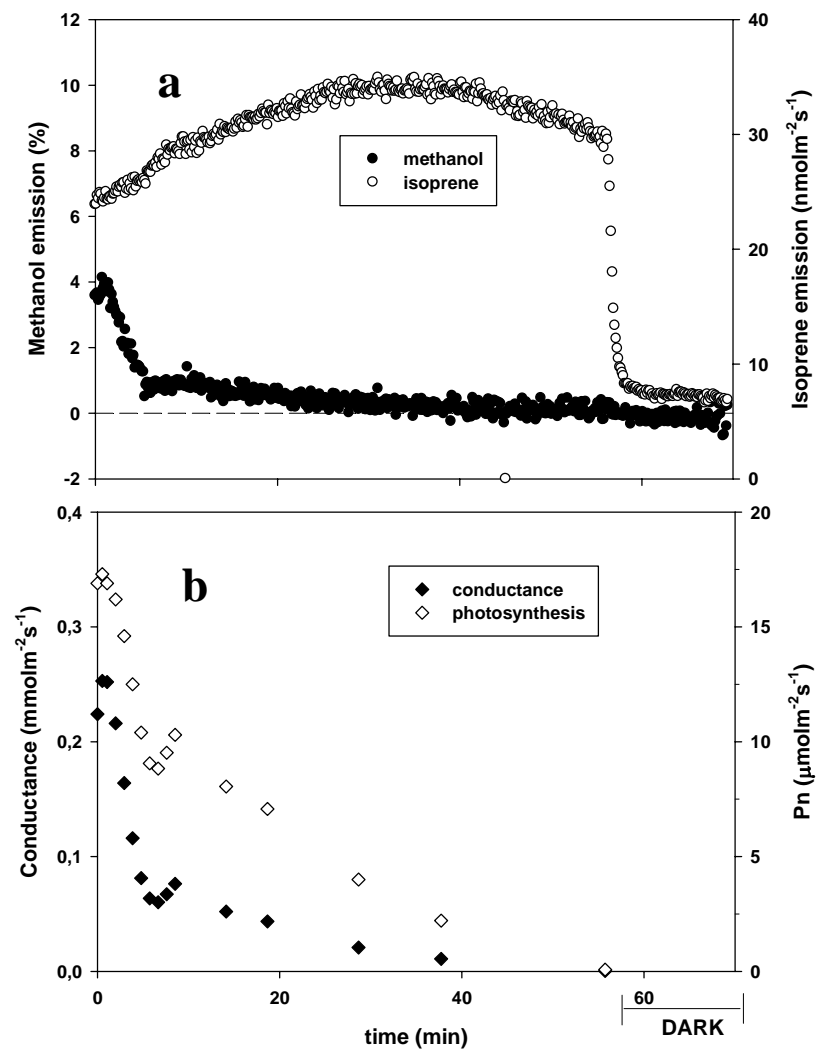


Fig 6

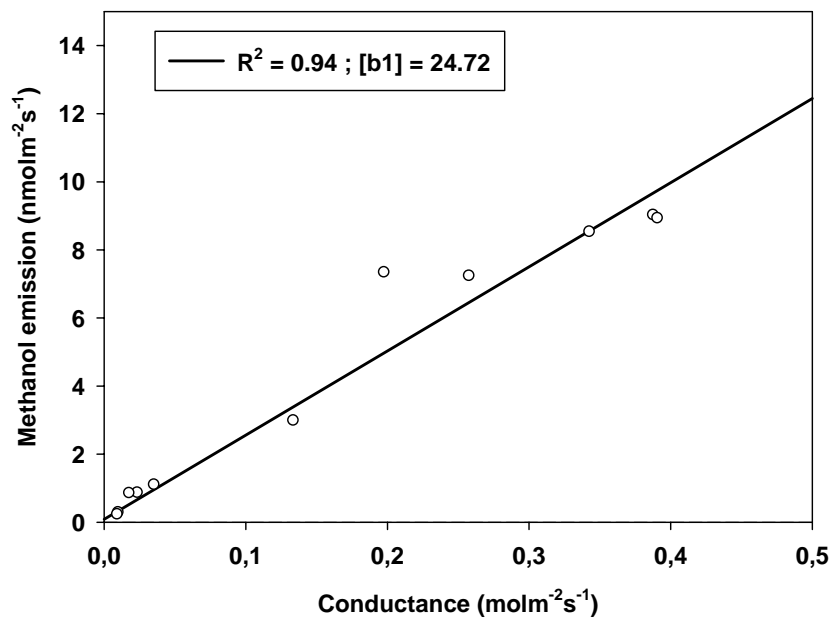


Fig 7a

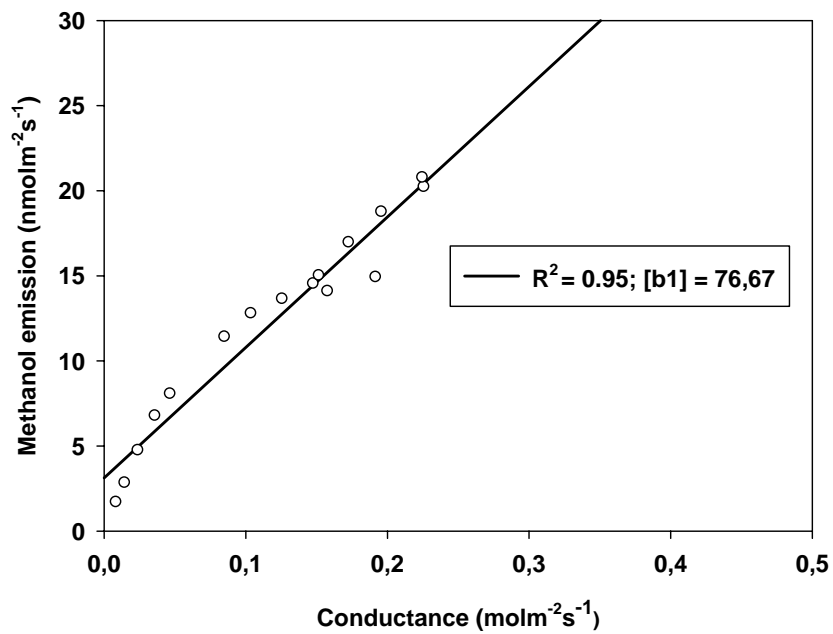


Fig 7b

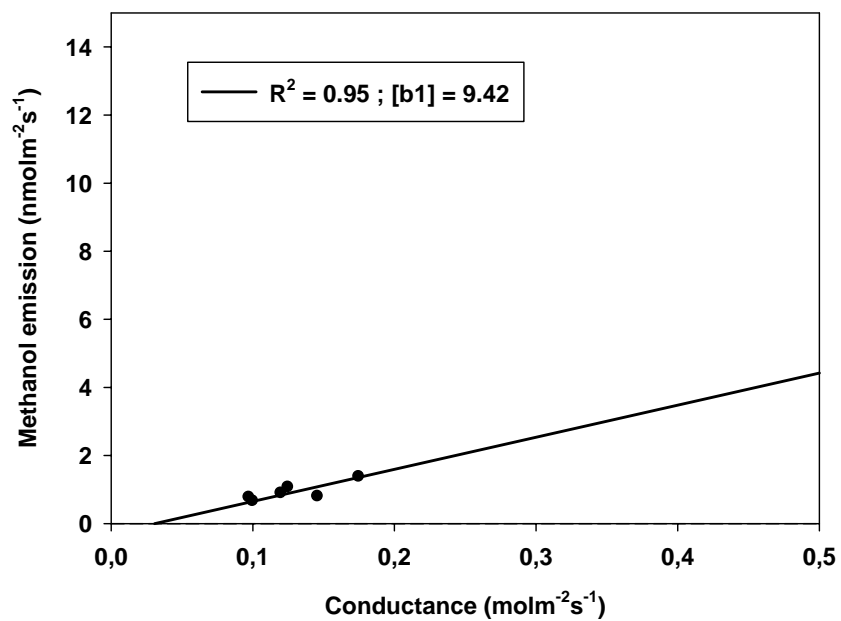


Fig 8a

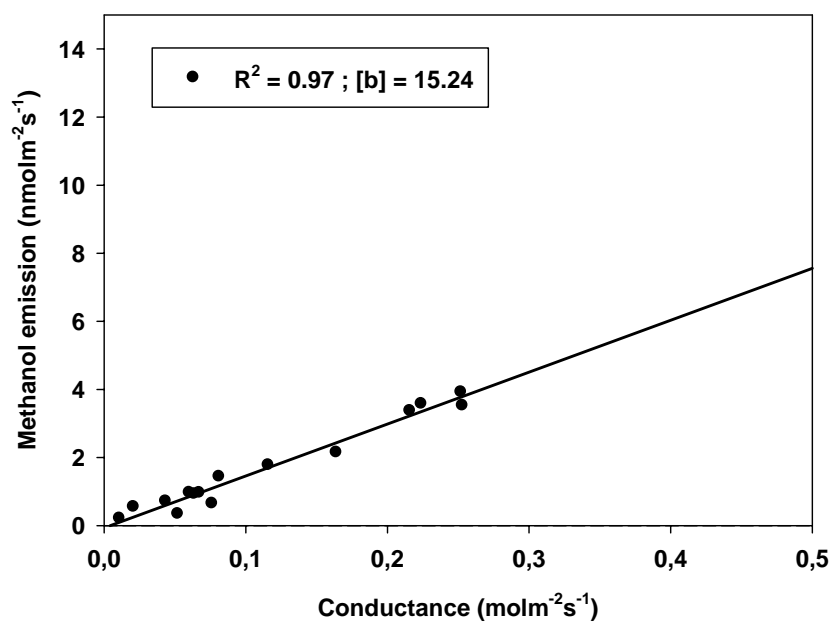


Fig 8b

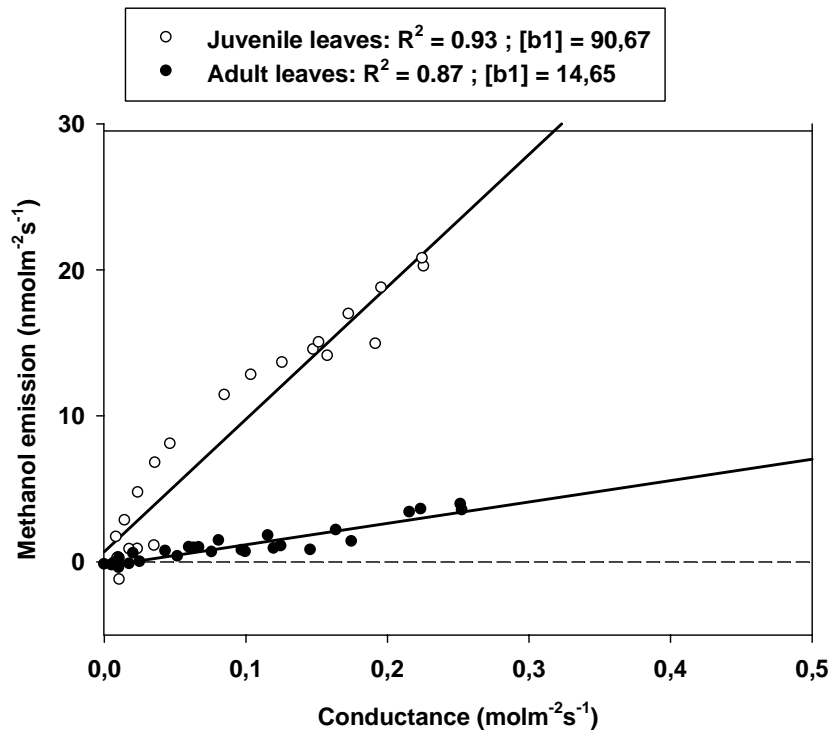


Fig 9