

**Relazione scientifica dell'attività di ricerca svolta dal Dr. Mauro Centritto
presso il Département de Biologie-Faculté des Sciences Semlalia
Marrakech, Morocco**

L'attività svolta dal Dr. Centritto durante il suo soggiorno presso il Département de Biologie-Faculté des Sciences Semlalia, relativa al progetto "*Ecophysiological and molecular characterization of Argania spinosa, a native Moroccan species adapted to very arid conditions*", è stata effettuata con l'obiettivo di identificare la variabilità ecofisiologica e molecolare nell'efficienza dell'uso dell'acqua (WUE) in *Argania spinosa* al fine di identificarne ecotipi con elevata WUE da poter utilizzare per la lotta alla desertificazione.

Nell'ultimo decennio i processi di desertificazione hanno investito vaste aree del bacino mediterraneo ed ora questo pericolo interessa territori ancora più estesi. Il Marocco è uno dei paesi in via di sviluppo caratterizzati da un maggior livello di degradazione dei suoli. Sia la crescita della popolazione che la maggiore incidenza dei fenomeni siccitosi associata ai cambiamenti climatici renderanno ancora più intensi i processi di desertificazione già in atto. La lotta alla desertificazione si basa sulla ricostituzione della vegetazione che ha la funzione di bloccare i processi di erosione e di ripristinare i processi di riciclo biologico dei nutritivi. Per rendere ciò efficace e sostenibile è necessario però recuperare piante autoctone in grado di svilupparsi in aree degradate ed aride, in modo da costituire una vegetazione capace di mantenere un equilibrio tra la velocità di crescita, il grado di copertura del terreno e i consumi idrici. A tutt'oggi sono del tutto mancanti le conoscenze relative alla struttura ed al funzionamento degli ecosistemi, la loro caratterizzazione ecofisiologica e genetica relativa all'efficienza dell'uso dell'acqua lungo i gradienti di aridità e la loro risposta ai cambiamenti climatici. È di fondamentale importanza acquisire queste conoscenze e sviluppare un sistema pilota per 1) definire le caratteristiche ecologiche e la WUE dei diversi gruppi funzionali di piante degli ecosistemi presenti lungo i diversi gradienti di desertificazione, in modo da identificare specie di piante e tipi di vegetazione da impiegare nella riabilitazione dei suoli degradati e 2) utilizzare tra le specie/ecotipi caratterizzati (ecofisiologicamente e geneticamente) quelli dotati di maggiore fitness e quelle più adatte per essere impiegate come colture alternative. Di uguale importanza è inoltre la formazione di una nuova generazione di ricercatori che siano in grado di affrontare le tematiche ambientali con un approccio multidisciplinare e che siano in grado di trasferire le conoscenze acquisite ai futuri ricercatori e tecnici locali. Gli obiettivi generali del progetto sono 1) la valutazione e caratterizzazione della variabilità ecofisiologica e genetica della WUE nelle piante autoctone degli ambienti aridi; 2) la valutazione delle tipologie di risposta allo stress idrico ed ai diversi sistemi irrigui a basso consumo idrico, con particolare enfasi sul WUE per le specie autoctone particolarmente importanti come colture alternative. Queste maggiori conoscenze sul funzionamento degli ecosistemi negli ambienti aridi sono necessarie per capirne i cambiamenti indotti dall'uomo. Si utilizzano degli approcci sperimentali innovativi, che includono la manipolazione sperimentale delle precipitazioni e della radiazione incidente e lo studio della cinetica dello stress idrico che, combinati al monitoraggio delle risposte del complesso pianta-suolo, forniranno i dati per il raggiungimento degli obbiettivi sopracitati. Questi dati inoltre potranno essere anche utilizzati in modelli di simulazione per predire le risposte degli ecosistemi ai cambiamenti climatici in aree particolarmente a rischio come quella del bacino mediterraneo.

Un interesse particolare è stato dedicato allo studio delle caratteristiche ecofisiologiche e molecolari di ecotipi di *Argania spinosa*, pianta autoctona del Marocco che cresce lungo diversi gradienti di desertificazione. In queste aree l'*Argania spinosa* svolge un importantissimo ruolo nella lotta alla desertificazione e nel recupero dei suoli degradati. Questa specie può simultaneamente risolvere diversi problemi legati al controllo della desertificazione, poiché può aiutare a fissare le dune, ma anche ad aumentare la produttività biologica delle aree aride favorendo così il recupero dei pascoli e delle foreste degradate. Inoltre l'*Argania spinosa* è coltivata in quanto produce bacche da cui si estrae un olio di grande pregio, che ha molteplici impieghi culinari, farmacologici e cosmetici, e quantità sostanziali di biomassa utilizzabile per il pascolo.

Sono state selezionati ecotipi provenienti da quattro aree del Marocco caratterizzate da differenti condizioni pedo-climatiche (allegato 1). Questi quattro ecotipi sono stati quindi cresciuti in vaso in una camera di crescita presso del Département de Biologie-Faculté des Sciences Semlalia. Le piantine sono state quindi sottoposte a tre livelli di stress idrico. La resistenza alla siccità e la WUE sono state valutate attraverso le misure di discriminazione degli isotopi stabili, del metabolismo del carbonio, della traspirazione e delle relazioni idriche. Le misure degli scambi gassosi sono stati effettuate con un apparato sperimentale di proprietà dell'IBAF costituito da un LICOR 6400 (strumento portatile che consente la misura dei parametri fotosintetici delle piante). L'abbondanza del ^{13}C nei tessuti delle foglie della maggior parte delle specie C3 è collegato alla WUE dell'intera pianta. La ragione di ciò è che le piante che hanno sufficiente acqua discriminano maggiormente il ^{13}C , durante la fotosintesi e la respirazione, in favore del ^{12}C rispetto alle piante soggette a stress idrico. Pertanto, l'aumento dei valori di ^{13}C nelle foglie suggerisce una maggiore WUE; quindi i valori di ^{13}C delle piante possono essere utilizzati come una misura integrata della WUE di lungo periodo. Le analisi del rapporto isotopico $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ (allegato 2) e della caratterizzazione molecolare delle quattro popolazione sono state effettuate presso i laboratori dell'IBAF.

I dati ottenuti sono in corso di elaborazione. Tuttavia, dai primi dati elaborati, si evincono evidenti differenze rapporto isotopico $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ tra le popolazioni. Lo scrivente ritiene che l'insieme dei dati ottenuti sia di ottima qualità e darà luogo ad un lavoro pubblicabile su una delle maggiori riviste scientifiche settoriali.

Monterotondo, 28 gennaio 2011



Dr. Mauro Centritto

Allegato 1

The area of the Moroccan argan forest is currently estimated at about 800.000 hectares. It is situated mainly in the west-southern part of Morocco, along the oceanic littoral from the mouth of the Oued (the river locally called “Oued”) Tensift in the north to the mouth of the Oued Draa in the south, between 29° and 32° North latitude. The argan tree is also developing in the plain of the Souss on the southern slopes of the High Atlas and on the northern and southern slopes of the Anti-Atlas to altitudes of 1300-1500 m. The area is characterized by a semi-arid to arid climate and by marked seasonal contrasting climate variables.

The CHA (Agadir), Aoulouz (Taroudant) and Lakhssas (Lakhssas) areas are part of the Souss–Massa bassin. In that bassin the rainfall average amounts to 250 mm/year in the plains and 500 mm/year in the mountains. The annual average temperature ranges between 14 °C and 20 °C in the high Atlas and in the anti-Atlas, respectively, with significantly higher temperature range of up to 48°C in the plain. The range of daily and seasonal temperatures in the plain is also high (19 °C in winter and 27 °C in summer). The precipitation period in a typical year is between October and March and will be referred to, hereafter, as extended winter. The dry period can extend from April to September. The potential evaporation is very high (>2000 mm/year) in the plain. The rainfall exceeds the evaporation during winter especially in the mountains areas, which constitute the main recharge origin for the Souss–Massa aquifer system (Bouchaou et al., 2008). However, Essaouira area on the coast can be noticed by their different values. This is a situation that can be explained by the strong ocean currents and the preponderant influence of the cold Canary current and upwelling along the coast of Essaouira, which lowers and overrides the temperature differences.

These sites were chosen for their different climatic conditions and the importance of these four provinces in Moroccan argan forest. They represent the natural geographical area of the remarkable endemic sapotaceous tree *Argania spinosa*, where it is the most dominant species.

1. CHA site (30°35'16.81"N, 9°47'69.78"W) corresponding to Complex Horticultural Agadir is located on an area of 80 hectares in the south of Agadir city and about 8 km from the Atlantic coast. This site is located in the Souss valley, a depression separating the Anti-Atlas Mountains with Precambrian and Paleozoic rocks in the south and the High Atlas Mountains with Paleozoic, Mesozoic and Cenozoic rocks in the north. The Quaternary deposits are the most important hydrogeological sequence in the Souss Plain. These superficial alluvial sediments and underlying strata constitute the principal shallow aquifer, which provides

domestic, agricultural and industrial water. This shallow aquifer overlies one or several confined aquifers (Dindane et al., 2003).

Climate in Agadir city is temperate because of marine influence, with an average annual temperature of about 18,7 °C, whose the average annual relative humidity of air is 75%. The average maximum temperature of warmest month clearly shows that the coastal stations are characterized by moderate values (27 °C) and the thermal threshold corresponding to the average temperature minimum values of the coldest month of the year (January) never below 7°C (~ 7,2). The annual rainfall is scarce, 232 mm, and concentrated from October to April (96%), with a long summer drought (Díaz-Barradas et al. 2010).

2. Aoulouz site ($30^{\circ}68'82.38''N$, $8^{\circ}15'86.00''W$) is a small city located in the Souss Upstream Bassin (SUB) that covers about 9000 Km² representing 56 % of the Souss Basin area. The SUB is situated in southwestern Morocco, and bounded by longitudes 30° and 31° and latitudes 8° and 9°. It is bounded by the High Atlas Mountains (north), the Anti-Atlas Mountains (south), the Siroua crystalline complex (east) and the transition to the medium plain near Taroudant city (west) (Dindane et al., 2003). Altitude is about 771 m.

The long-term mean annual precipitation decreased in 20 years from 343 mm in Aoulouz to 232 mm in Taroudant (Dindane et al., 2003). The average annual temperature is about 19,8 °C. Concerning hydrographic location, The Souss valley has its origin in the Toubkal massif at 3500 m altitude. The first 70 km exhibit an impetuous mountain river having many rapids and being squeezed by gorges, its water flow rate is constant. At Aoullouz, at 750 m altitude, the river becomes free and enters a plain; its waters are entirely absorbed by a thick layer of the subaerial delta (seat of a quaternary sedimentation), and the river turns into an Oued (Chichagov, 2008).

3. Lakhssas site ($29^{\circ}57'66.22''N$, $9^{\circ}71'27.15''W$) is a small town located in south of Morocco, on the national main road No. 30 which links Tiznit city whit Guelmim city. It is a mountainous region whose altitude is about 980 m. Geographically, it is limited by Tiznit city in the north, the region of Bou Izakarn in south, the region of Aït Erkha in east and the region of Aït Baamrane in west. Lakhssas is a part of the territory of the province of Tiznit which is located on the west side of the field of Anti-Atlas in southern Morocco.

The average annual preceipitation in Tiznit is about (~189 mm), while the maximal average of the warmest month of the year is (~31.2 °C) (Donnadieu, 1977, Peltier, 1982 and Le Houérou

1989 in Médail and Quézel, 1998). The Tiznit valley is to the south of the Souss valley. The separating boundary is provided by the large Oued Massa (Chichagov, 2008).

Lakhssas region has an aride climate climate with very cold winter and hot summer.

4. Rabia site is 25 km from Essaouira. The Essaouira basin is located in a Moroccan semi-arid region with a maximum annual rainfall of 300 mm/year and with a potential evapotranspiration around 920 mm/ year (Bahir et al. 2001). The water resources of the Essaouira coastal basin (west of Marrakesh) are characteristic of a semi-arid climate and are severely impacted by the climate in terms of quantity and quality. This sedimentary basin has an area of about 1,200 km² and is filled with Mesozoic and Cenozoic materials, which are overlaid with superficial Plio-Quaternary terrains (Fernandes et al., 2010).

The Essaouira region is strongly influenced by the Canary Current which there is a considerable crushing temperatures and lower maximum temperature (~ 20.5 ° C). The annual average relative humidity of air in Essaouira in the south-west coast of Morocco is approximately (85%).

Bouchaou, A., Michelot, J.L., Vengosh, A., Hsissou, Y., Qurtobi, M., Gaye, C.B., Bullen, T.D. and Zuppi, G.M. (2008). Application of multiple isotopic and geochemical tracers for investigation of recharge, salinization, and residence time of water in the Souss–Massa aquifer, southwest of Morocco. *Journal of Hydrology* , Vol. 352, pp. 267– 287

Dindane K, Bouchaou L, Hsissou Y, Krimissa M (2003) Hydrochemical and isotopic characteristics of groundwater in the Souss Upstream Basin, southwestern Morocco. *J Afr Earth Sci*, Vol. 36, pp. 315–327

Chichagov, V. P. (2008). The plains at the periphery of the Atlas Mountains: the genesis, relief, current desertification. *Geography and Natural Ressources*, Vol. 29, pp. 292-296.

Fernandes, P. G., Carreira, P. M. and Bahir, M. (2010). Mass balance simulation and principal components analysis applied to groundwater resources: Essaouira basin (Morocco). *Environ Earth Sci*, Vol. 59. pp. 1475-1484.

Bahir M, Jalal M, Mennani A (2001) Pollution nitrate'e des eaux souterraines du bassin synclinal d'Essaouira (Groundwater pollution by nitrates of the Essaouira synclinal basin). *J Environ Hydrol*, Vol. 9, pp. 1–9.

Díaz-Barradas, M. C., Zunzunegui, M., Ain-Lhout, F, Jáuregui, J., Boutaleb, S., Álvarez-Cansino, L. and Esquivias, M. P. (2010). Seasonal physiological responses of *Argania spinosa* tree from Mediterranean to semi-arid climate. *Plant Soil*, Vol. 337, pp. 217-231.

Allegato 2

Table: Variations of carbon isotope composition in leaves of *Argania spinosa* grown under different environmental conditions: nursery and different watering treatments in growth room.

TREATMENTS	PROVENANCES			
	<i>Black</i>	<i>Blue</i>	<i>Red</i>	<i>Unmarked</i>
<i>Nursery conditions</i>	-29.3‰ ± 0.2‰	-29.9‰ ± 0.2‰	-28.8‰ ± 0.2‰	-29.5‰ ± 0.3‰
<i>Growth room Control</i>	-35.1‰ ± 0.6‰	-34.9‰ ± 0.5‰	-35.9‰ ± 0.5‰	-36.8‰ ± 0.4‰
<i>Growth room Medium Stress</i>	-34.0‰ ± 0.6‰	-34.9‰ ± 0.7‰	-35.0‰ ± 0.4‰	-36.0‰ ± 0.5‰
<i>Growth room Severe Stress</i>	-34.5‰ ± 0.3‰	-33.1‰ ± 0.6‰	-35.0‰ ± 0.6‰	-34.6‰ ± 1.1‰

Rough estimation of $\delta^{13}\text{C}$ of air CO_2 in the growth room yield a value of -13.7‰. This estimation is based on the main assumption of similar conditions and Δ within the nursery and the growth room control. Furthermore, $\delta^{13}\text{C}$ of air CO_2 in the nursery is taken as -8.0‰. The estimation explains the remarkably negative values observed in the growth room. Such unusual values are due to limited air supply from the free atmosphere to the controlled environment, leading to a significant recycling of respired CO_2 (more negative $\delta^{13}\text{C}$ than that of atmospheric CO_2) during the photosynthetic assimilation.

It is noteworthy that the provenances show relevant variability of carbon isotope composition under both the comparison conditions: namely, the nursery and the growth room. Comparing the four provenances, values of leaf $\delta^{13}\text{C}$ show a span up to 1.1‰, in the nursery condition, and up 1.9‰, in the control condition of the growth room. Spans of 2.0‰ and 1.9‰ are respectively yielded in the medium and severe drought treatments. Such an evidence implies relevant differences in the photosynthetic operational points (C_i) among the provenances, allowing to claim relevant differences in water-use efficiency, based on genetic diversity of *Argania spinosa*.

It is interesting to note, furthermore, that the provenances show a diversity in the phenotypic plasticity of the physiological trait " $\delta^{13}\text{C}$ ". Just considering the various watering treatments in the growth room, the unmarked and the blue populations show variations in $\delta^{13}\text{C}$ as high as 2.2 and 1.8‰, respectively. The black and red populations show respectively variations of 1.1 and 0.9‰.

Finally, it has to be remarked that the provenances range in different manner in the nursery and in the growth chamber. Particularly, the blue provenance show the most negative value in the nursery but the least negative in the growth room. Whilst such a finding is unclear, the wide variability of intrinsic water-use efficiency, as displayed by this experiment, would imply a diversity in adaptedness to different environmental conditions among the studied populations. Such a result, whose implications require further studies, would indicate in *Argania spinosa* a wide genetic potential of evolvability, in front of climate change.