



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-Forestali

Corso di laurea magistrale in Scienze Forestali e Ambientali

Relazioni funzionali di xilema, floema e biomassa
fogliare in rami di *Picea abies* (Karst.) in seguito a
sei anni di esclusione dalle precipitazioni

Relatore
Prof. Gai Petit

Correlatori
Dott. Natasa Kiorapostolou
Dott. Dario Zambonini

Laureando
Federico Fioroni
Matricola n. 1181648

ANNO ACCADEMICO 2019/2020

Riassunto	5
Abstract	7
1.Introduzione	9
2.Materiali e Metodi	25
2.1 AREA DI STUDIO	25
2.2 CAMPIONAMENTO E PREPARAZIONE CAMPIONI	27
2.3 RICOSTRUZIONE DELLA CRESCITA RADIALE E ASSIALE	28
2.4 ANALISI ANATOMICHE DI XILEMA E FLOEMA	29
2.4.1 Preparazione micro-sezioni	29
2.4.2 Digitalizzazione dei campioni	30
2.4.3 Quantificazione delle caratteristiche anatomiche nelle immagini anatomiche	32
2.5 MISURE BIOMASSA FOGLIARE	33
2.6 ANALISI STATISTICHE	34
2.7 CARATTERISTICHE ANATOMICHE FUNZIONALI	35
3. Risultati	39
3.1 VARIAZIONE DEL DIAMETRO DEI VASI	40
3.2 VARIAZIONE DELL'AREA DEGLI ANELLI	41
3.3 VARIAZIONE DELL'AREA FOGLIARE E BIOMASSA DEI RAMI	42
3.4 VARIAZIONE DELLA CONDUTTIVITÀ IDRAULICA	44
3.5 VARIAZIONE DELLA CONDUCIBILITÀ SPECIFICA FOGLIARE	45
3.6 VARIAZIONE DELLO SPESSORE DELLA PARETE CELLULARE	46
3.7 VARIAZIONE ALLA RESISTENZA ALL'IMPLOSIONE DELLA PARETE CELLULARE	47
3.8 VARIAZIONE DELLA MEDIA DELLE DIMENSIONI DELLE CELLE PER ANNO DEL FLOEMA	48
4. Discussione	49
5. Conclusioni	57
6. Bibliografia	58

Riassunto

Eventi di siccità possono avere delle forti ripercussioni sul trasporto idrico della pianta. Questo può causare una riduzione della differenza di potenziale idrico tra foglie e suolo, oltre che la possibilità di elevati eventi di cavitazione all'interno dello xilema con conseguente perdita di conduttanza. Nel floema può aumentare la viscosità della linfa, impedendo un fluido trasporto di zucchero all'interno della pianta. Questo insieme di fattori può portare al deperimento della pianta, fino alla sua morte. L'ipotesi di questo studio è che le piante, quando sono sotto stress idrico, tendono a modificare la propria struttura interna. Questo per permettere alla pianta un approvvigionamento idrico costante, a costo di risultare meno sicuri contro rischi di embolizzazione. Infatti, la pianta dovrebbe conservare il mantenimento di una conduttanza xilematica e floematica per la sopravvivenza.

Questo esperimento è all'interno del progetto KROOF, in Germania. Grazie a delle strutture apposite, è stato previsto l'esclusione dalle piogge di una parte della foresta di Kranzberg, questo per poter simulare un evento di siccità. Le piante sono state divise in due plot: in uno sono state escluse tutte le precipitazioni durante la stagione vegetativa, mentre nell'altro non sono state fatte modifiche. Successivamente sono state analizzate le caratteristiche anatomiche di xilema e floema su rami di abete rosso (*Picea abies* Karst.) Sono stati prelevati rami di lunghezza di circa 2 m a non meno di 3 m dall'apice di individui maturi di circa 29 m di altezza. Sui rami sono stati selezionati diverse posizioni di campionamento a distanze diverse dall'apice, questo per misurare le differenze dei modelli assiali tra i due gruppi di alberi. Sono stati misurati: diametro idraulico delle tracheidi (D_h), area annuale degli anelli (RA), area fogliare cumulata (La cum), biomassa dei rami cumulata (Bm cum), conduttività idraulica totale (K_h), conducibilità specifica fogliare (LSC), spessore della parete cellulare (CWT), resistenza all'implosione della parete cellulare ($(t/b)^2$) e media delle dimensioni dei condotti floematici (MCA Phloem).

I risultati finali dimostrano che non ci sono state significative modifiche dei tratti anatomici. Ci si aspettava anche un aumento dell'area fogliare, ma anche in questo caso non c'è stata.

Questi risultati dimostrano che la modifica delle strutture xilematiche e floematiche comportano un costo molto elevato e le piante sotto stress possono preferire di non modificarlo, se non ci sono condizioni estreme.

Abstract

Drought events can have a strong impact to the water transport of the plants. This can reduce leaf-to-soil water potential difference, other than the possible embolism-related losses of conductance in xylem. In the phloem, can increase the sap viscosity, preventing a fluid transport of sugar inside the plant. This set of factors can lead to the decay of the plant, until his death. The hypothesis of this study is that plant under water stress tend to change their internal structure. This to allow the plant to maintain a constant water supply, at a cost to be less safe against embolization risk. In fact, the plant should preserve the maintenance of a xylematic and phloematic conductance for survival. This experiment is part of the KROOF project in Germany. This experiment involves the exclusion from the rains, thanks to special structures, in order to simulate a drought event inside the forest of Kranzberg. The plants were divided in two plots: in one were excluded all precipitation during the growing season, while in the other were not made changes. Subsequently, have been analyzed the anatomical characteristics of xylem and phloem on branches of Norway spruce (*Picea abies* Karst.). Have been taken branches of length about 2 meters at not less than 3 meters from the apex of mature individuals of about 29 meters of height. Different sampling position were selected on the branches at different distance from the apex to measure differences in axial patterns between the two-tree group. Measurements were made are: the tracheid hydraulic diameter (Dh), the annual ring area (RA), leaf area cumulated ($LA\ cum$), branches biomass cumulated ($BM\ cum$), total hydraulic conductivity (Kh), leaf-specific conductivity (LSC), cell wall thickness (CWT), cell wall implosion resistance ($(t/b)^2$) and mean cell area per year of phloem ($MCA\ phloem$).

The final results show that there were no significant changes in anatomical traits. It was also expected an increase in leaf area, but there isn't.

These result show that modifying xylematic and phloematic structure result a very high cost of C, and stressed plant may prefer not to modify it, if there are no extreme conditions.

1.Introduzione

La limitazione di acqua è una delle sfide più critiche per la sopravvivenza e la produttività delle piante alla luce dei cambiamenti climatici in atto. L'Intergovernmental Panel on Climate Change ha redatto dei modelli dei cambiamenti climatici previsti associati all'aumento dei gas serra nell'atmosfera. La quantità di riscaldamento atteso nel prossimo secolo dipende da quale scenario di emissione di gas serra si utilizza. Lo scenario con le stime migliori prevede un riscaldamento da 1.8° a 4.0°C nei prossimi 100 anni. L'intervallo di risposta di differenti scenari con differenti modelli climatici si trovano da 1.1° a 6.4°C (Shugart and Woodward, 2011). Dato questo scenario, secondo il resoconto dell'IPCC del 2007, circa il 20-30% delle specie vegetali, valutate nel resoconto dell'IPCC finora, sono probabilmente a rischio di estinzione se gli aumenti della temperatura media globale superano 1,5-2,5 °C. Per aumenti della temperatura media globale superiore a 1,5-2,5 °C e in concomitanza con concentrazioni di CO₂ atmosferica, si prevedono grandi cambiamenti nella struttura e nella funzione dell'ecosistema, nelle interazioni ecologiche tra le specie e negli spostamenti negli areali geografici delle specie, con conseguenze prevalentemente negative per la biodiversità e i beni e servizi ecosistemici, ad es. approvvigionamento idrico e alimentare (IPCC, 2007). In questo scenario climatico aumenterà la frequenza di eventi climatici estremi, come ondate di calore, periodi di siccità estrema per durata e/o intensità e precipitazioni eccezionali (IPCC, 2007).

Questi eventi di siccità portano ad un inevitabile aumento di mortalità delle piante (Allen et al., 2010). Infatti, la mortalità legata al clima è stata osservata in tutti e sei i continenti vegetati (McDowell et al., 2008). Ci sono tre possibili cause di mortalità degli alberi: agenti biotici patogeni, disfunzionalità idraulica e esaurimento delle risorse di carbonio (McDowell et al., 2008). La rilevanza di questi meccanismi è legata all'intensità e alla durata dello stress idrico. Infatti, l'acqua gioca un ruolo molto importante all'interno della pianta. Esso è l'elemento principale nel processo di traspirazione e nell'assorbimento di anidride carbonica. Il trasporto dell'acqua è però un processo molto costoso. Principalmente, l'acqua dalle radici viene dispersa in atmosfera attraverso l'evapotraspirazione, mentre solo all'incirca l'1% dell'acqua assorbita viene utilizzata nella fotosintesi come donatore di elettroni. Limitazioni al processo di trasporto idrico sono molto dannose per le piante perché impediscono l'attività fotosintetica (con blocco di

produzione di SO) e la termoregolazione dei tessuti (con degenerazione dei tessuti). Il trasporto idrico deve quindi essere mantenuto efficiente dalla pianta.

L'attuale comprensione dei trasporti d'acqua a lunga distanza nelle piante si basa sulla teoria della coesione-tensione, proposta più di 100 anni fa da Dixon e Joly (1894). Secondo questa teoria, il trasporto dell'acqua nello xilema è guidato da gradienti di tensione, generati dall'evaporazione dell'acqua dalle foglie e trasmesso attraverso colonne d'acqua continue (Melcher, 1998). Le caratteristiche fondamentali dell'acqua perché ciò accada sono: la coesione, l'adesione e la tensione superficiale. La coesione è l'attrazione reciproca tra le molecole attraverso i legami a idrogeno, l'adesione è l'attrazione dell'acqua a una parete solida, come la parete cellulare, mentre la tensione superficiale genera le forze fisiche che attraggono l'acqua attraverso il sistema vascolare della pianta, impedendo all'aria di penetrare nei pori della parete cellulare (Taiz & Zeiger, 2002). La tensione superficiale è responsabile delle tensioni che si creano nello xilema, come i menischi aria-acqua nei piccoli pori della parete cellulare nel mesofillo delle foglie che non permettono all'aria di entrare nel sistema. La traspirazione a livello fogliare così causa una pressione negativa che viene trasmessa al sistema radicale, dove l'acqua viene assorbita (Losso, 2017). Per descrivere l'energia libera dell'acqua lungo ciascun punto del continuum suolo-pianta-atmosfera si utilizza un'unità di misura detta potenziale dell'acqua (Ψ). I valori del potenziale totale in ciascun punto del continuum (suolo, radice, foglia, atmosfera) sono solitamente negativi, e così il movimento dell'acqua andrà dalle aree di potenziale più elevato (zero o poco negativo) a quelle di potenziale più basso (molto negativo) (Smith, 2013). Pertanto, il movimento d'acqua dal suolo alla radice, dalla radice alla foglia e dalla foglia all'atmosfera dipende dal mantenimento di un gradiente di potenziale dell'acqua sempre più negativo man mano che si procede lungo il sistema:

$$\Psi_{atm} < \Psi_{foglia} < \Psi_{radice} < \Psi_{suolo} \quad (\text{eq. 1.1})$$

Questo processo consente il movimento dell'acqua attraverso il sistema continuum suolo-pianta-atmosfera (Smith, 2013).

Il flusso di acqua che transita all'interno dello xilema può essere determinato secondo la Legge di Darcy, che descrive il moto di un fluido in un mezzo poroso:

$$F = K * \Delta\Psi \quad (\text{eq. 1.2})$$

dove K è la conduttanza idraulica ($\text{m}^3 \text{ mPA}^{-1}\text{s}^{-1}$) e $\Delta\Psi$ la differenza di potenziale idrico tra foglie e suolo ($\Delta\Psi = \Psi_{foglie} - \Psi_{suolo}$) (Tyree & Ewers, 1991; Kiorapostolou, 2020). K può essere descritta dalla legge di Hagen e Poiseuille, un'equazione per descrivere i fluidi che scorrono attraverso un fascio di tubi perfettamente cilindrici (Tyree & Ewers, 1991):

$$K = (\pi\rho/128\eta L) \sum_{i=1}^n (d_i^4) \quad (\text{eq. 1.3})$$

dove ρ è la densità del fluido (kg/m^3), η è la viscosità dinamica del fluido (MPa/s), d è il diametro (m) del -iesimo tubo, n è il numero dei tubi nel fascio e L (m) è la lunghezza del tubo capillare. Per il tessuto xilematico, i diametri del condotto possono essere misurati e la somma dei loro diametri alla quarta potenza calcolata per determinare la conduttanza idraulica teorica (Tyree & Ewers, 1991). Il valore dell'equazione 1.3 dimostra l'effetto marcato di alcuni grandi vasi sulla conducibilità idraulica degli steli. Infatti, ci dice che il contributo idraulico di un recipiente grande 4 volte la dimensione media contribuirà alla conducibilità di $4^4 = 256$ recipienti di diametro medio (Tyree & Ewers, 1991).

La conduttanza può essere anche espressa con il suo reciproco, la resistenza idraulica R ($\text{m}^{-3}\text{MPa s}$):

$$R = \frac{1}{K} \quad (\text{eq. 1.4})$$

L'equazione 1.2 può quindi variare, diventando:

$$F = \frac{\Psi_{atm} - \Psi_{suolo}}{R_{radici} + R_{fusto} + R_{foglie}} \quad (\text{eq. 1.5})$$

K dipende dal contributo idraulico di ogni singolo condotto xilematico che costituisce il sistema di trasporto dell'acqua. Poiché K non può essere prontamente modificato, poiché i condotti di xilema sono cellule vuote morte, una riduzione di $\Delta\Psi$ dovuta alla siccità del suolo (vuol dire Ψ_{suolo} inferiore) può essere limitante per F , e quindi per lo scambio di gas. Se questa situazione persiste fino a quando l'albero esaurisce tutte le riserve di carbonio (C), si verificherebbe il declino e infine la morte per esaurimento delle riserve di C (Kiorapostolou et al., 2020).

Un ruolo fondamentale è dato dagli stomi e dall'apertura stomatica, questa infatti è strettamente dipendente dallo stato di idratazione delle cellule di guardia:

$$ET = g_s * VPD \quad (\text{eq. 1.6})$$

dove ET è l'evapotraspirazione, g_s è la conduttanza stomatica e VPD è la capacità di attrarre vapore. La dimensione e la densità degli stomi giocano un ruolo fondamentale per la traspirazione fogliare e la capacità di scambio gassoso (diffusione CO_2 nel mesofillo). Per mantenere gli stomi aperti, il flusso idrico radici-foglie attraverso lo xilema deve sostenere la respirazione fogliare ($ET=F$).

Condizioni di ridotta idratazione del suolo possono determinare limitazioni al trasporto idrico e al conseguente rifornimento idrico delle foglie, con effetti negativi sull'idratazione dei tessuti fogliari e l'apertura degli stomi, determinando quindi limitazioni agli scambi gassosi ($ET>F$). Lo stress idrico può essere causato da una diminuzione del potenziale idrico del suolo (dato dalla mancanza di acqua) o da un aumento della VPD . In quest'ultimo caso, la pianta avrà bisogno di assorbire molta più acqua dal suolo per compensare le perdite per evapotraspirazione. Nella formula abbiamo che $ET = g_s * VPD$ e $F = K * (\Psi_{atm} - \Psi_{suolo})$, per cui durante uno stress idrico noi avremo:

$$\frac{g_s * VPD}{\Psi_{foglia} - \Psi_{suolo}} > K \quad (\text{eq. 1.7})$$

Le piante possono adottare due meccanismi per sopperire a temporanei o prolungati periodi di stress, attraverso l'osmoregolazione, cioè la regolazione attiva della pressione osmotica. Le specie possono essere evitanti (non controllano l'osmoregolazione,

isoidriche), con un potenziale fogliare minimo Ψ_{min} caratteristico, con alto margine di sicurezza idraulico e basso rischio di cavitazione. In questo caso, con la diminuzione del Ψ_{suolo} , il Ψ_{foglia} rimane fisso, con conseguente riduzione di $\Delta\Psi$ e chiusura. Questo metodo è tipico della maggior parte delle gimnosperme.

Altrimenti possono essere tolleranti (controllano l'osmoregolazione, anisoidriche) con basso margine di sicurezza idraulico e alto rischio di cavitazione, in questo caso Ψ_{min} diminuisce compensando la riduzione di Ψ_{suolo} , permettendo una prolungata apertura stomatica. Questo metodo è, invece, tipico di molte angiosperme.

In caso di prolungata situazione di siccità, nel primo caso si arriverà a morte per esaurimento delle riserve di carbonio. Infatti, la chiusura stomatica per preservare il disseccamento, fa sì che l'assorbimento del carbonio fotosintetico diminuisca fino a quasi lo zero. La continua domanda di carboidrati per mantenere il metabolismo esaurirà le riserve di carbonio, portando alla fame di carbonio o all'incapacità di respingere attacchi da agenti biotici (McDowell et al., 2008).

Nel secondo caso si arriverà, invece, ad un fallimento idraulico del sistema di trasporto, causato da eventi di cavitazione all'interno dello xilema.

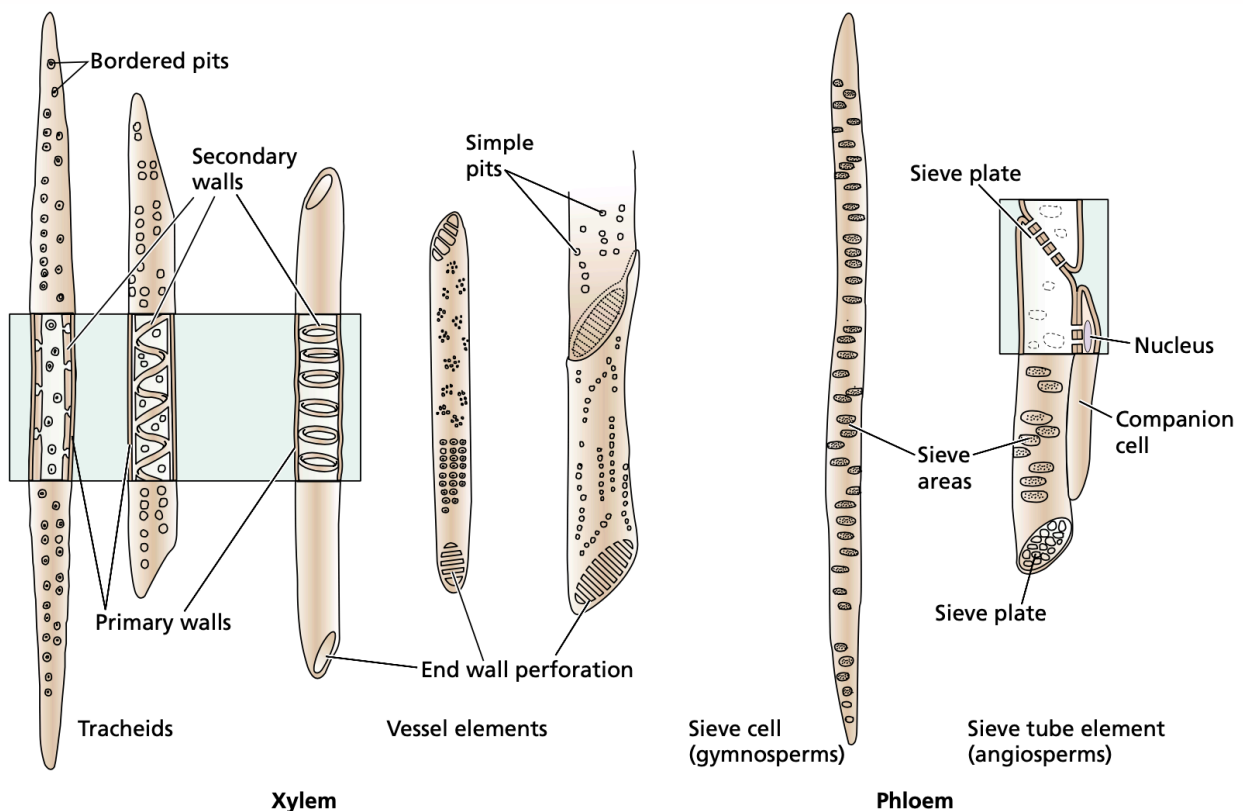


Fig. 1.1: Tessuti vascolari: xilema e floema (Taiz & Zeiger, 2002)

Nella pianta esistono due sistemi di trasporto a lunga distanza, uno per le sostanze nutritive (floema) e uno per l'acqua (xilema) (Fig. 1.1). Il sistema di trasporto dello xilema distribuisce acqua dal suolo alle foglie (Tyree & Sperry, 1989). Gli elementi di conduzione fondamentali dello xilema delle conifere sono le tracheidi (o fibrotracheidi). Infatti, il legno dell'abete rosso è definito omoxilo, cioè caratterizzato dalla sola presenza delle fibrotracheidi che svolgono sia la funzione di trasporto dell'acqua che di sostegno fisico (Hacke et al., 2015). Più del 90% di una sezione trasversale dello xilema delle conifere è composto da tracheidi. Esse hanno un diametro compreso tra 5 e 80 μm (Tyree et al. 1994; Linton et al. 1998; Pittermann and Sperry 2003; Schulte 2012b; McCulloh et al. 2014), con una lunghezza solitamente minore di 5 mm (Bannan 1965; Sperry et al. 2006; Dunham et al. 2007; Domec et al. 2008; Schulte 2012b). Il restante 10% dello xilema è formato dal parenchima (Evert, 2006). L'acqua nei condotti xilematici deve essere sotto pressione negativa, tipicamente a -1 o -2 MPa e qualche volta fino a -10 MPa. Questo significa che l'acqua deve rimanere liquida a pressione ben al di sotto della pressione del vapore. In questo stato "metastabile" la cavitazione deve essere evitata se la continuità della colonna di acqua nei condotti xilematici vuole essere mantenuta. Il risultato della cavitazione è che un condotto principalmente pieno di acqua liquida alla fine si riempie di aria (embolia). Il condotto riempito di aria è embolizzato e non è più utilizzabile per il trasporto di acqua. Quindi, le piante dipendono, per il loro approvvigionamento idrico, in un sistema di trasporto intrinsecamente vulnerabile (Tyree & Sperry, 1989). La cavitazione è biologicamente importante perché l'embolizzazione dei condotti riduce la conduttività idraulica dello xilema (Tyree & Sperry, 1989), portando al guasto idraulico e al conseguente esaurimento delle riserve di carbonio.

Il grado di embolizzazione si misura come perdita di conducibilità rispetto alle condizioni di saturazione:

$$PLC = \left(1 - \frac{K_{\psi_x}}{K_{\psi_0}}\right) * 100 \quad (\text{eq. 1.8})$$

In terreni secchi, gli stomi regolano inizialmente la perdita d'acqua dalle foglie per mantenere la pressione xilematica (ψ_x ; misurata come potenziale idrico inferiore a 0) entro un intervallo che proteggerà lo xilema dall'embolia (Tyree & Sperry, 1989; Sperry et al., 1998). La resistenza all'embolia nelle piante è descritta dalla relazione tra pressione xilematica e perdita di conduttività idraulica (PLC). Quando ψ_x scende al di sotto di ψ_{50}

(50% di perdita di conduttività) la funzione di trasporto dell'acqua nello xilema è notevolmente compromessa e le piante sono esposte a un notevole rischio di embolia, che porta a lungo andare alla perdita di produttività, danno ai tessuti e, infine, alla morte (Brodribb & Cochard, 2009). Esiste una relazione lineare significativa tra ψ_x minima misurata nelle piante in condizioni naturali (min) e ψ_{50} , il che dimostra che la resistenza all'embolia è strettamente legata al livello di stress da siccità sperimentato dalle piante in un'ampia gamma di ambienti (Fig.1.1) (Choat et al., 2012). La differenza tra ψ_{min} e ψ_{50} rappresenta un "margine di sicurezza" altamente informativo all'interno di piante presenti in determinati ambienti (Alder et al., 1996; Meinzer et al., 2009). Questo margine di sicurezza quantifica il grado di cautela nella strategia idraulica di una pianta, indicando che piante con margine di sicurezza basso (o addirittura negativo) sperimentano grandi quantità di embolia e quindi rischio potenziale di guasto idraulico. (Fig. 1.2)

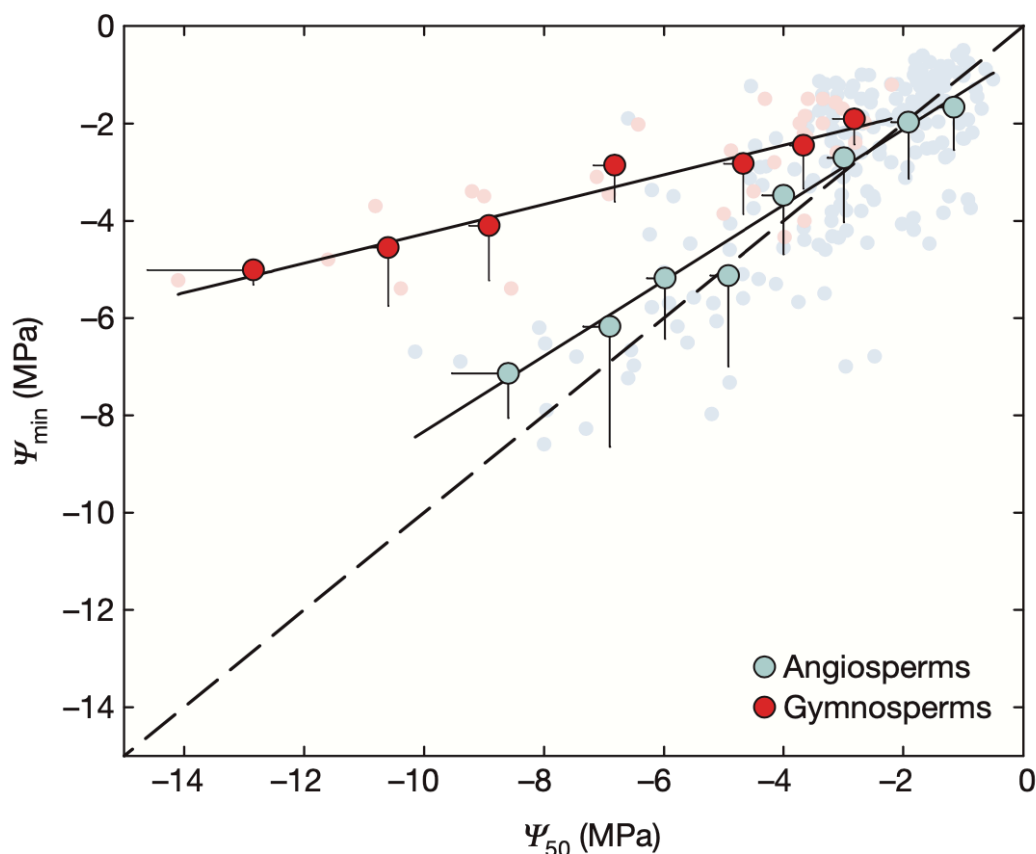


Fig. 1.2: Pressione xilemica minima in funzione della resistenza all'embolia (Choat et al., 2012)

Sia i biomi aridi che quelli medi sono vulnerabili al declino indotto dalla siccità se gli eventi di siccità estrema diventano più frequenti, come previsto dai cambiamenti climatici globali (Allison et al., 2009; Zhang et al., 2007). Nel complesso, le Gimnosperme hanno

mostrato maggiori margini di sicurezza idraulica rispetto alle Angiosperme, ma questo non significa che le Gimnosperme sono immuni alla minaccia del guasto idraulico (Fig. 1.2) (Choat et al., 2012). ψ_{50} è stato anche associato al MAP (precipitazione media annuale), mostrando una minore resistenza all'embolia con l'aumento delle precipitazioni. Questa è associata all'alta efficienza di trasporto e ai bassi costi strutturali, rendendo questa strategia vantaggiosa in ambienti tropicali altamente produttivi e umidi. ψ_{50} e MAP sono disaccoppiati in certi casi, il che implica che alcune specie che crescono in ambienti più asciutti sfuggono allo stress idrico, alleviando così la necessità di un'elevata resistenza all'embolia. (Choat et al., 2012)

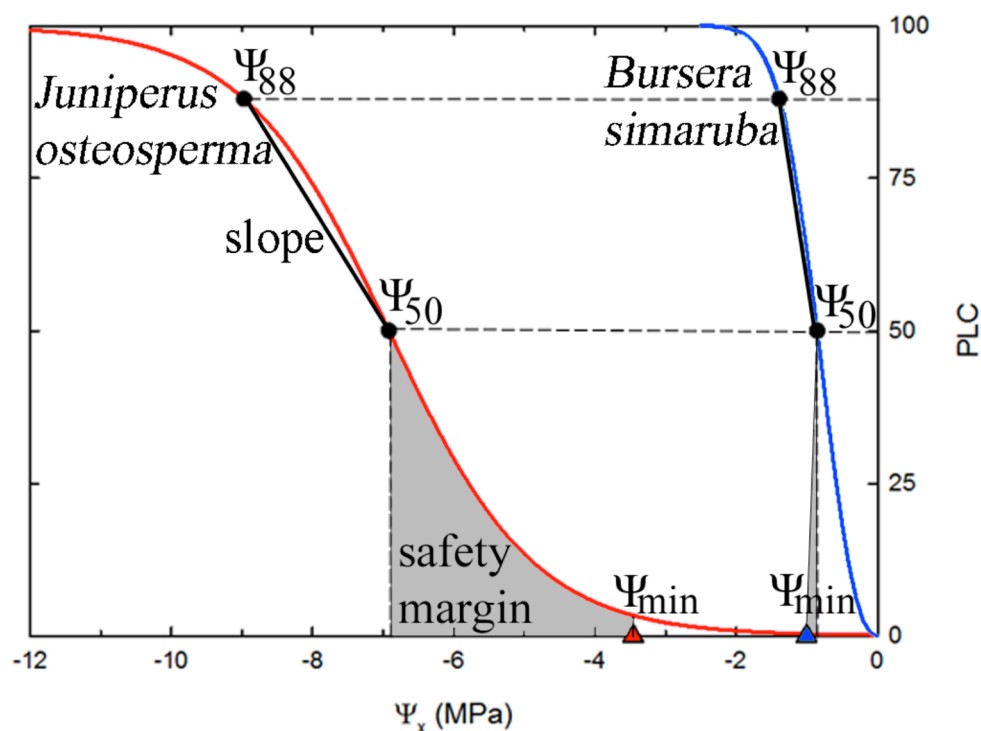


Fig. 1.3: Curve di vulnerabilità all'embolia che mostrano la perdita percentuale di conduttività idraulica (PLC) in funzione della pressione xilematica (ψ_x). Nell'esempio, la curva è indicata per le angiosperme la specie *Bursera simaruba*, una specie della foresta pluviale tropicale (curva blu), e per le gimnosperme *Juniperus osteosperma*, specie di foreste secche (curva rossa). La differenza tra ψ_{min} e ψ_{50} (area grigia) corrisponde al "margine di sicurezza", il che mostra per le angiosperme un margine di sicurezza leggermente negativo e quindi una strategia idraulica più rischiosa rispetto alle gimnosperme. (Choat et al., 2012)

Quando il potenziale idrico cala sotto ad una certa soglia, le bolle d'aria possono penetrare ed espandersi all'interno del condotto xilematico, che diventeranno piene di aria e non più utilizzabili. La vulnerabilità dei condotti xilematici all'embolizzazione dipende da diverse strutture anatomiche, quali dimensione e numero di vasi (Tixier et al., 2014). In generale, la resistenza all'embolia diminuisce con l'aumentare delle dimensioni

del condotto (Hacke et al., 2006; Sperry et al., 2006), specialmente a livello intraspecifico (Larter et al., 2017; Kiorapostolou et al., 2020). Le punteggiature (*pits*) sono importanti per evitare l'embolizzazione del sistema. Infatti, una causa di cavitazione per pressione negativa può essere data dal fallimento delle "valvole" *pits* tra i condotti (Crombie, Hipkins & Milburn 1985; Cochard, Cruiziat & Tyree 1992; Salleo et al. 1996; Sperry et al. 1996). Queste punteggiature impediscono all'aria presente nei condotti già danneggiati di entrare in quelli funzionali (Wheeler et al., 2005). La struttura e la funzione di questi *pits* rappresentano un compromesso unico tra i requisiti per un trasporto efficiente di acqua e la necessità di impedire la diffusione di aria tra tracheidi embolizzate (Pittermann et al., 2005; Domec et al., 2008). Poiché la lunghezza della tracheide è limitata, le caratteristiche del *pit* sono un fattore determinante della tracheide e della conducibilità idraulica dell'intero xilema. Al centro della membrana del *pit* c'è un toro ispessito, approssimativamente circolare, che è impermeabile all'acqua. Il toro è circondato da una membrana porosa chiamata margo, che provvede al passaggio dell'acqua. Quando due tracheidi adiacenti sono riempite d'acqua, il toro si trova centralmente nella *pit chamber*, permettendo al flusso di acqua tra le tracheidi attraverso i pori del margo, influenzato dal movimento passivo secondo i gradienti di pressione. Se una bolla d'aria entra in una delle tracheidi, la membrana si muoverà secondo il gradiente di pressione, in modo che il toro bloccherà l'apertura del bordo della fossa. (Fig. 1.3) Questo stato si chiama *pit aspiration* (Hacke et al., 2015).

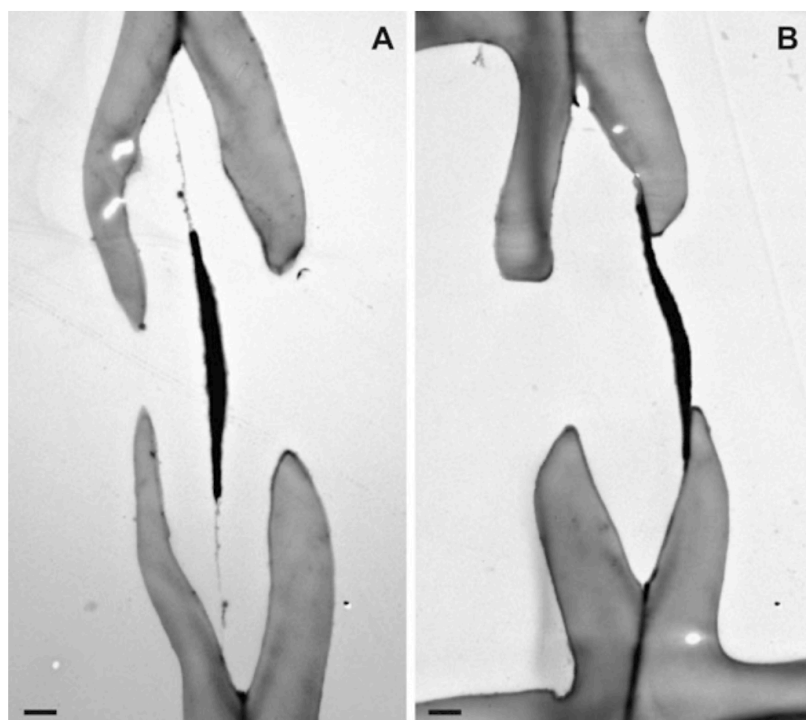


Fig. 1.4: Micrografia elettronica di trasmissione di membrane a fossa nelle radici di *Picea glauca*. Le membrane sono rilassate (A) o aspirate, bloccando l'apertura (B) (Hacke et al., 2015).

In molti casi, la membrana del *pit* può rimbalzare da una posizione aspirata. Questa capacità è un prerequisito per il recupero della conducibilità idraulica dopo che le tracheidi embolizzate sono state riempite. La tenuta fallirà quando la differenza di pressione attraverso la membrana del *pit* supererà la “*air-seed pressure*” in cui l’aria fuoriuscirà oltre e avverrà il processo di cavitazione nella tracheide adiacente (Hacke et al., 2004; Domec et al., 2008). Anche i pori della membrana hanno delle implicazioni sulla conducibilità idraulica. Infatti, si è notato che in piante con pori nel *pit* stretti, il margo contribuisce ha una resistenza maggiore (maggiore del 60%), mentre in piante con pori larghi, il margo ha una resistenza molto ridotta (meno del 40%) (Schulte, 2012a, Hacke et al., 2015). Di conseguenza, qualsiasi trade-off tra efficienza e sicurezza dovrebbe dipendere da queste valvole. Generalmente infatti, maggiore è la dimensione dei vasi, maggiore sarà quella dei *pits*, con conseguenti effetti sulla sicurezza idraulica (Wheeler et al., 2005).

Il floema è, invece, un sistema di pressione positiva che muove concentrati e linfa ricca di zucchero nel floema, dalle foglie ai meristemi di crescita. Il trasporto floematico utilizza un meccanismo di flusso osmotico a gradiente stazionario, in accordo con l’ipotesi di circolazione di Münch (Kiorapostolou & Petit, 2018), simile a quello di apparati secretori degli animali, ma è unico perché utilizza una pressione elevata (più di 3 MPa) e richiede due sistemi di gradiente stazionario che lavorano in tandem l’uno con l’altro, uno dei quali lavora al contrario (Tyree & Sperry, 1989). Il floema è formato da cellule cribrose (*sieve cell*) che si differenziano tra gimnosperme e angiosperme dalle dimensioni, le gimnosperme hanno tubi larghi la metà delle angiosperme, ma lunghezza maggiore (5 mm) (Liesche et al., 2017). Le cellule cribrose sono assialmente collegate da aree cribrose (*sieve area*) con la stessa struttura di quelle laterali. I pori dell’area cribrosa assomigliano ai plasmodesmi (strutture che mettono in comunicazione cellule vicine attraverso la parete cellulare), in quanto sono relativamente lineari e sono attraversati da membrane del reticolo endoplasmatico (Schulz, 1992). Inoltre, le *sieve cells* delle gimnosperme hanno spesso una sezione trasversale rettangolare, che ne riduce la conducibilità (Jensen et al., 2012; Liesche & Schulz, 2018) Gli zuccheri prodotti con la fotosintesi nelle foglie (fonte di C) scorrono in una soluzione acquosa attraverso il floema fino ai siti di assorbimento nelle differenti parti della pianta (Jensen et al., 2012). Questi zuccheri vengono utilizzati per mantenere la respirazione di tutti i tessuti vivi e per la biosintesi di nuova biomassa nei differenti organi (Maier, 2001), o viene immagazzinato come riserva di carbonio non strutturale nelle cellule parenchimatiche (Plavcová et al., 2016; Kiorapostolou & Petit, 2018).

Obiettivo della pianta è quello di cercare di mantenere un sistema sia efficiente che sicuro. Questo può dipendere dalle dimensioni delle tracheidi lungo il fusto, che però rimane un argomento molto dibattuto. Prendendo un diametro grande o molti diametri piccoli, in accordo con la legge di Hagen-Poiseuille (eq. 1.3), il flusso sarà sempre lo stesso, ma i costi di carbonio nella costruzione dei vasi saranno molto diversi. Infatti, fare molti vasi piccoli avrà un costo di carbonio molto maggiore. Grandi condotti (con grande diametro e grande lunghezza) sono considerati efficienti per la conduzione idraulica, ma altamente vulnerabili alla cavitazione rispetto ai condotti più piccoli (Carlquist, 1977; Baas, 1982; Zimmermann 1983; Cochard & Tyree, 1990).

Karl Sanio (1872) ha formulato cinque leggi generali che descrivono i cambiamenti nella lunghezza e nel diametro delle tracheidi che si verificano lungo il raggio in uno stelo dal midollo verso l'esterno (prima legge), lungo il fusto dall'apice verso il basso (seconda legge) e tra rami, fusti e radici (terza, quarta e quinta legge). La seconda legge di Sanio descrive un condotto verticale che si assottiglia lungo l'asse della pianta e afferma che i diametri dei condotti aumentano gradualmente dall'apice verso il basso fino a raggiungere un massimo, al di sotto del quale inizia un rapido declino verso la base del fusto (Mencuccini et al., 2007).

Il modello frattale di West et al. (1999, WBE) propone che il sistema di trasporto idraulico (xilema) di tutte le piante vascolari è strutturato di maniera da mantenere una velocità di flusso costante lungo tutta la lunghezza del percorso (cioè la distanza tra le radici e le foglie). Queste previsioni universali del modello WBE sono state testate e sostanzialmente supportate (Anfodillo et al., 2006; Weitz et al., 2006; Coomes et al., 2007; Petit et al., 2008). Nel sistema xilematico delle piante vascolari, i condotti sono indipendenti l'uno dall'altro, quindi per mantenere costante la portata a ogni livello, devono assottigliarsi verso l'apice (Petit & Anfodillo, 2009). Il modello WBE semplicemente propone che la pianta è formata da un fascio di tubi che corrono in parallelo tra di loro dalle radici fino alle foglie. In particolare, i tubi non sono cilindrici (come i precedenti modelli idraulici) ma hanno un certo grado di allargamento in direzione basale (*widening*), questo per permettere di mantenere l'efficienza fogliare il più costante possibile durante l'ontogenesi (crescita della pianta) (Anfodillo et al. 2013). La variazione longitudinale del diametro del condotto dello xilema (*widening*) è stata ampiamente studiata e il modello di allargamento del condotto verso la base era simile tra le piante di diverse dimensioni e specie (Anfodillo et al. 2006; Petit et al. 2008, 2010).

Tipicamente la variazione è meno che lineare, con la larghezza del condotto che aumenta dall'apice dello stelo alla base seguendo una traiettoria di potenza della forma:

$$d = aL^b \quad (\text{eq. 1.7})$$

dove d è il diametro dei condotti xilematici, L la distanza dall'apice del fusto (lunghezza del percorso), a la costante allometrica e b l'esponente di scala (grado di allargamento) (Anfodillo et al., 2006). La teoria assume che le piante dovrebbero avvicinarsi al grado minimo di allargamento necessario per compensare pienamente il progressivo aumento della resistenza idraulica con la crescita in altezza, negli alberi ad alto fusto. Questo valore si avvicina a 0,2 (West et al. 1999; Anfodillo et al. 2006, 2013; Petit et al. 2008, 2010; Bettiati et al., 2012).

Durante un periodo di siccità si pensa che ci sia un trade-off strutturale tra efficienza e sicurezza del trasporto idrico, cioè che un'efficienza xilematica ci sia a costo di una vulnerabilità al fallimento idraulico e viceversa. Il caso più comune che è stato riportato negli alberi in condizioni di stress significative che precedono la mortalità indotta dalla siccità, con un'alta perdita di conduttanza (>60%) a causa della formazione di embolia diffusa (Adams et al. 2017).

In molti scritti si è cercato di capire qual'è la relazione del diametro dei vasi con il clima e se questa è direttamente correlata alla situazione ambientale. Ci sono degli studi che hanno cercato di relazionare il diametro dei vasi con le differenze climatiche, trovando che la dimensione dei vasi diminuisce con l'aumentare dell'aridità (Pfausch et al., 2016; Martínez-Sancho et al. 2017) suggerendo che uno xilema più sicuro contro la cavitazione è necessario sotto tensioni xilematiche più elevate. La realtà però è differente, infatti il fatto che in ambienti aridi è stato frequentemente riportato che le dimensioni dei vasi sono minori dipende principalmente dal fatto che le piante sono mediamente più piccole e caratterizzate da accrescimenti minori. Di conseguenza, il diametro dei vasi alla base dei fusti sarà minore. Tuttavia, se normalizziamo la differenza di diametro con l'altezza della pianta, avremo che le differenze spariscono. Lechthaler et al. (2018) ha infatti individuato che quando il diametro idraulico viene standardizzato per la distanza dall'apice, la sua variazione assiale non era più significativa, quindi nessuno dei parametri climatici aveva effetti significativi sul diametro idraulico. Anche altri scritti hanno individuato che il pilota principale nella variazione del diametro dei vasi è il percorso conduttivo, come riflesso della lunghezza, e che altri fattori come clima, habitat o

differenza tra mono- e dicotiledoni hanno solo un ruolo limitato (Olson et al., 2014). Inoltre, secondo i protocolli di campionamento più diffusi, le misurazioni anatomiche vengono effettuate solo in un'unica posizione di campionamento, cioè alla base del fusto o su rami di età caratteristica (generalmente 2-3 anni). Tali approcci metodologici trascurano sostanzialmente che i tratti anatomici (ad esempio, il diametro del condotto dello xilema e il diametro delle *sieve cell* del floema) variano assialmente con la distanza dall'apice del fusto/ramo (Anfodillo et al. 2013). Pertanto, le piante con tassi di crescita ridotti e statura più corta (vale a dire, le caratteristiche tipiche delle piante che crescono in condizioni di secco) verrebbero campionate a breve distanza dall'apice, dove i condotti xilematici e gli *sieve element* del floema sono di per sé più piccoli (Kiorapostolou et al., 2020). Quindi il clima può interferire, ma sulla crescita degli alberi e non direttamente sulla dimensione dei vasi (Petit et al., 2011). Inoltre, la relazione tra efficienza e sicurezza idraulica può cambiare lungo l'asse dello stelo, per dare priorità alla sicurezza verso l'apice e all'efficienza verso la base. Questo può essere spiegato dall'importanza di un apice non danneggiato per sostenere la crescita in altezza e competere con gli alberi vicini (Prendin et al., 2018). Quindi la perdita di conduttività causata dall'embolia è associata a una riduzione della crescita sia primaria che secondaria (es. Weemstra et al. 2013, Camarero et al. 2015), che implica limitazioni per il bilancio di carbonio della pianta.

In questo contesto, ci si aspetterebbe comunemente che si verificano aggiustamenti fenotipici delle anatomie dello xilema e del floema, in base alla variabilità naturale lungo i gradienti ambientali, permettendo agli alberi di mantenere attiva la funzionalità.

Le prove emerse da vari studi dimostrano che le risposte delle piante alla siccità non implicano la produzione di condotti più piccoli e più sicuri. Cioè, i condotti aumentano con la distanza dall'apice a tassi che non sono influenzati dalle condizioni ambientali, e il diametro assoluto del condotto è risultato essere simile (Lechthaler et al. 2018, Kiorapostolou & Petit, 2018) o più largo lungo tutto l'asse longitudinale stelo/ramo in condizioni di secco (Petit et al. 2016, Kiorapostolou et al. 2018).

È stato anche ipotizzato che la siccità del suolo impone limitazioni al floema a due livelli. Da una parte, a meno che le foglie non osmoregolino per abbassare il loro potenziale idrico, un basso potenziale idrico del suolo riduce la pendenza del potenziale idrico lungo lo xilema (Venturas et al., 2017), influenzando a sua volta la pendenza del gradiente di pressione idrostatica accoppiata lungo il floema (Hölttä et al., 2006, 2009). Dall'altra parte, l'osmoregolazione del floema, per equilibrare il suo stato idrico con il più basso potenziale idrico dello xilema (Savage et al., 2016), aumenterebbe la viscosità della linfa

floematica (Mencuccini et al., 2015), con un impatto negativo sulla velocità di trasporto degli zuccheri (in accordo con la legge di Hagen-Poiseuille, cioè che la resistenza idraulica è proporzionale alla viscosità del fluido (Tyree & Ewers, 1991)). Al fine di sostenere il metabolismo della pianta, si suppone un aumento della conduttanza floematica in risposta alla siccità, per effetto di una maggiore viscosità della linfa floematica (Sevanto, 2014; Sevanto et al., 2018). Una possibile soluzione sarebbe ottimizzare l'investimento di C nelle architetture xilematiche e floematiche, riducendo l'allocazione a nuove biomasse (cioè, crescita primaria e secondaria più lenta) mantenendo o addirittura aumentando la conduttanza dello xilema e/o floema producendo cellule conduttive più grandi (Kiorapostolou et al., 2020).

Anche la biomassa fogliare si modifica in risposta allo stress idrico. Infatti, la pianta può dare priorità di assegnazione di biomassa agli aghi rispetto allo xilema in condizioni di siccità, cercando di migliorare l'assimilazione totale per unità di tempo di apertura stomatica, mantenendo condizioni di sicurezza contro il rischio di cavitazione xilematica. Tuttavia, una tale strategia può portare a lungo termine all'esaurimento delle riserve di carbonio e alla morte per esaurimento delle risorse di carbonio (Kiorapostolou et al., 2018). A seconda del controllo stomatico della traspirazione fogliare, le piante possono evitare un'eccessiva disidratazione fogliare e lo sviluppo di pericolose tensioni xilematiche o osmoregolare per mantenere aperti gli stomi e gli scambi di gas anche se si presenta ad un più elevato rischio di formazione di embolia. Nelle condizioni più secche, gli scambi di gas sono più limitati dalla chiusura stomatica prolungata, specialmente nelle specie che evitano la siccità (isodriche). Pertanto, gli alberi richiedono un rapporto biomassa fogliare/area maggiore, per sostenere un determinato costo di manutenzione della respirazione (Anfodillo et al. 2016, Kiorapostolou et al. 2018), che non sia influenzata dall'apertura degli stomi (Kiorapostolou & Petit, 2018).

Lo scopo di questo studio è stato quello di comparare l'anatomia di xilema e floema attraverso tutta la lunghezza di campioni di rami presi da 12 piante di abete rosso (*Picea abies* L.), in convivenza con faggio selvatico (*Fagus sylvatica* L.), che si differenziano per buona e ridotta disponibilità idrica. L'ipotesi è che gli alberi con ridotta disponibilità idrica si differenziano da quelli con buona disponibilità idrica dal fatto che dovrebbero produrre delle tracheidi più grandi, per mantenere la conduttanza idraulica totale con una riduzione dell'allocazione di carbonio alla biomassa xilematica. Inoltre, l'anatomia del floema degli alberi in declino dovrebbe essere caratterizzata da un'area conduttiva più elevata e da *sieve elements* più larghi per garantire un'adeguata efficienza del trasporto a lunga distanza di una linfa più viscosa dovuta a una più forte disidratazione dei tessuti indotta

dalla siccità. Si è anche cercato di capire se ci sono compromessi tra l'efficienza idraulica e la sicurezza idraulica, come approssimato dal *cell wall reinforcement* $(t/b)^2$ a livello di anello interno, perché pareti delle tracheidi spesse e larghe del legno primaticcio richiederebbero un alto costo di carbonio. (Prendin, 2018)

Si cerca quindi di verificare le varie ipotesi per le quali in caso di siccità avremo che le piante creano vasi più efficienti e meno sicuri, con un apparato fogliare più grande. In questo esperimento viene creata una siccità sperimentale, escludendo una data quantità di precipitazione, il che dovrebbero fornire risposte preziose sul meccanismo di risposta degli ecosistemi, anche se la superficie considerata di solito è molto ridotta (Bonal et al., 2016).

Per ogni campione sono stati analizzati variazioni nel diametro dei vasi (Dh), nell'area degli anelli legnosi (RA), l'area fogliare (LA), la biomassa dei rami (BM), la conduttività idraulica (Kh), la conducibilità specifica fogliare (LSC), lo spessore della parete cellulare (CWT), la resistenza all'implosione della parete cellulare $(t/b)^2$ e la dimensione delle celle per anno del floema ($MCA\ Phloem$).

2. Materiali e Metodi

2.1 AREA DI STUDIO

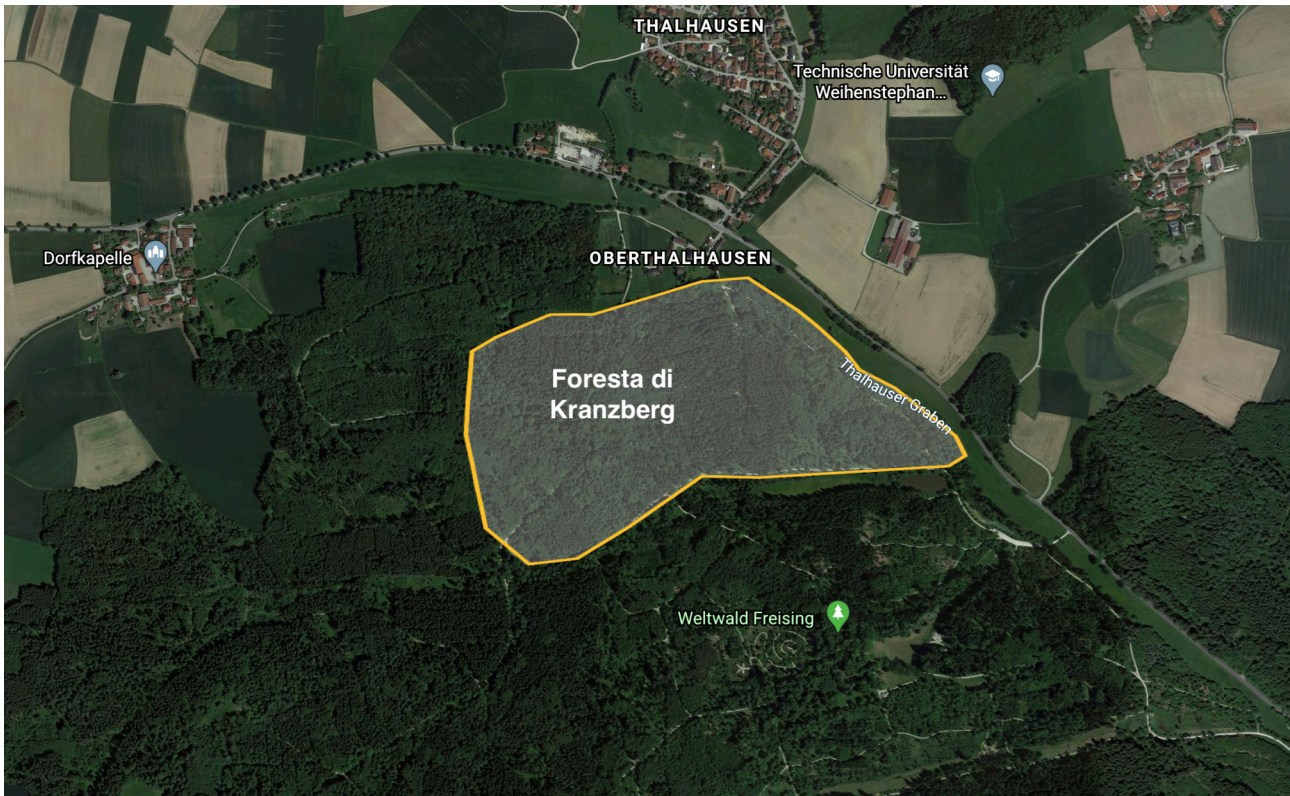


Fig. 2.1: foto satellitare della zona oggetto di studio (Google Earth)

Il sito di studio è situato nella foresta di Kranzberg, in Germania a sud della Bavaria (N 48°25'12", O11°39'42", 450 m s.l.m.) (Fig. 2.1). La temperatura media annuale è di circa 7,8°C e la media delle precipitazioni è 750 - 800 mm all'anno, mentre durante la stagione vegetativa (maggio - settembre) i valori cambiano rispettivamente a 13,8°C e 460-500 mm (in riferimento al periodo 1971-2000: Hera et al. 2012). Il sito è caratterizzato da un bosco monoplano misto di faggio (*Fagus sylvatica* (L.)) e abete rosso (*Picea abies* Karst.) con un'età compresa tra gli 83 e i 91 anni per il faggio e tra i 65 e i 69 anni per l'abete rosso (nel 2018). Nel 2010 sono stati creati 12 appezzamenti con una superficie totale di 1730 m² con 63 alberi di faggio (altezza media 26,1 m, diametro medio all'altezza di 1,30m (petto d'uomo) 28,9 cm) e 53 alberi di abete rosso (altezza media 29 m, diametro medio all'altezza di 1,30m (petto d'uomo) 34,3 cm) (Schäfer et al., 2019).

Gli alberi appartenenti alle aree di studio sono inclusi nel "Kranzberg ROOF experiment" (KROOF, Goisser et al. 2016, Pretzsch et al. 2016). Ogni plot (con dimensioni che variano tra i 110 e i 200 m²) comprende 4-6 esemplari di *F. sylvatica* e 4-6 esemplari

di *P. abies*. Attorno ai plot sono stati scavati, nella primavera del 2010, delle trincee profonde circa 1 m (raggiungendo un denso stato argilloso di sedimenti terziari), successivamente rivestite con un telone di plastica (impermeabile all'acqua e alla crescita delle radici), e riempite con terreno. Da maggio 2014, le precipitazioni sono state escluse in 6 dei 12 plot per mezzo di tetti automatizzati posizionati a circa 3 metri dal terreno, che da aprile-maggio a novembre vengono chiusi in caso di precipitazioni (Pretzsch et al. 2016). Durante l'inverno, il tetto viene lasciato aperto perennemente (Tomasella et al. 2017). (Fig. 2.2)



Fig. 2.2: Struttura con tetto di chiusura per l'esclusione della pioggia (Umwelt-Geräte-Technik GmbH, Germany)

2.2 CAMPIONAMENTO E PREPARAZIONE CAMPIONI

In questo studio la specie oggetto di studio è stata *Picea abies* Karst. Sono stati selezionati 10 individui campione, 5 posizionati all'interno dei plot trincerati e quindi sottoposti a stress idrico dovuto all'esclusione delle precipitazioni durante la stagione vegetativa (TE: *Throughfall Exclusion*) e 5 controllo (CO). Per ciascuna pianta, un ramo di circa 2 m di lunghezza è stato prelevato da uno dei palchi apicali con inserzione a meno di 3 m dall'apice grazie all'ausilio di una gru.

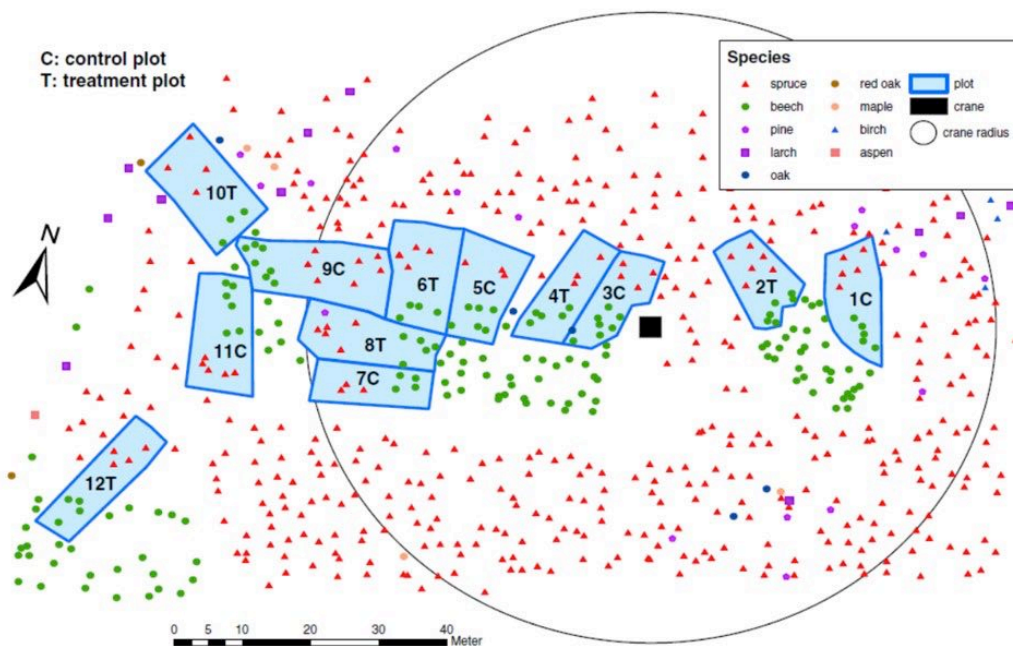


Fig. 2.3: Mappa della distribuzione dei plot divisi in control (CO) e treatment (TE) (Pretzsch, Rötzer et al. 2014)

Lungo l'asse principale di ciascun ramo sono stati selezionati 7-9 punti di campionamento, identificati attraverso un codice univoco (che corrisponde al codice dell'albero da cui è stato prelevato il campione e una lettera corrispondente alla posizione di campionamento lungo il ramo). Per ciascuno di essi è stato estratto un segmento di 2-3 cm, successivamente collocato in provette contenenti alcool (50% in volume) e acqua, questo per permetterne la conservazione. Inoltre, per ogni punto di campionamento è stata misurata la distanza tra un punto del taglio e quello successivo, mentre, per quanto riguarda il punto più distale, viene misurata la distanza dall'apice del ramo (DAP). Per ogni campione è stata poi misurata la distanza dall'apice, semplicemente sommando in direzione basale (cioè dall'apice verso la base) la distanza di ogni punto di campionamento dal precedente.

2.3 RICOSTRUZIONE DELLA CRESCITA RADIALE E ASSIALE

Per catturare la variabilità temporale dei tratti anatomici xilematici e floematici lungo l'asse del ramo, è stata ricostruita matematicamente la distanza dall'apice di ogni campione per ogni anello di accrescimento, tenendo conto degli accrescimenti e del numero di anelli presenti in ogni segmento analizzato. Attraverso l'analisi anatomica dei campioni (vedi paragrafi successivi), è stato contato automaticamente il numero di anelli di ogni segmento, ed è stato assegnato l'anno di formazione di ciascun anello. L'allungamento annuale del ramo è stato ottenuto interpolando linearmente la distanza tra i segmenti divisa per la differenza di età tra i segmenti di separazione:

$$\Delta H = \frac{DAP_{i-1} - DAP_i}{RN_{i-1} - RN_i} \quad (\text{eq. 2.1})$$

dove DAP_i e RN_i sono rispettivamente la distanza dall'apice e il numero di anelli dell' i -esimo segmento. Per ricostruire la posizione assiale al momento della formazione dell'anello, è stata calcolata la distanza dall'apice dell'anno come la differenza tra la distanza dall'apice attuale e l'allungamento annuale del ramo (Prendin et al. 2018).

2.4 ANALISI ANATOMICHE DI XILEMA E FLOEMA

2.4.1 Preparazione micro-sezioni

I campioni contenuti nelle provette sono stati tagliati con un microtomo rotativo (Leica RM2145, Wetzlar, Germany) (Fig. 2.4) a circa 12 μm per la produzione di micro-sezioni trasversali.



Fig. 2.4: Microtomo rotativo semi-automatico Leica RM 2145, Wetzlar, Germany

Queste sezioni sono state poi predisposte su dei vetrini, grazie all'ausilio di un pennello, e poi controllate al microscopio per verificare la qualità del campione. Infatti, i campioni devono essere di buona qualità, senza danni allo xilema o al floema che potrebbero compromettere la validità dei dati. Per evitare danni alle strutture cellulari durante il taglio si possono utilizzare delle strategie, come far bollire o immergere i campioni in acqua o incorporarli nella paraffina (von Arx et al., 2016). Anche le lame del microtomo devono essere affilate e senza difetti, per evitare di danneggiare le delicate strutture anatomiche. I danni dovuti alle lame eccessivamente utilizzate sono di solito più pronunciati, soprattutto nelle sezioni più sottili. Una volta verificata la buona qualità del campione, si procede alla colorazione dello stesso, per permettere una migliore visibilità al microscopio. Il campione, sotto cappa di ventilazione, viene coperto con qualche goccia di un composto misto di Safranina e Astra Blu (1% e 0,5% in acqua distillata). Le sezioni vengono poi lasciate riposare sotto cappa per circa 5 minuti, dopodiché vengono lavati della colorazione in eccesso, prima con acqua, poi con alcool al 50%, infine con alcool al 99%.

Il lavaggio con alcool permette la disidratazione dei campioni. Il risultato finale prevede che la parte lignificata (xilema) si colora di rosso (grazie all'azione della Safranina), mentre la parte non lignificata (floema) si colora di blu (grazie all'azione dell'Astrablu), questo per aumentarne il contrasto in una diapositiva anatomica. I campioni vengono poi tamponati con carta assorbente, per eliminare alcool e acqua in eccesso. Successivamente, sopra ogni campione, vengono messe alcune gocce di Eukitt (Bioptica, Milano, Italy), come funzione di collante, e posizionato poi il vetrino copri oggetto. Il vetrino viene poi lasciato a riposo per qualche minuto, successivamente si verifica che non siano rimaste bolle o che i campioni non si siano rovinati durante le operazioni di lavaggio. Per evitare la deformazione della sezione, che comprometterebbe una messa a fuoco uniforme durante la cattura di un'immagine, il vetrino viene posto su di una piastra di metallo con un piccolo magnete posto sulla parte superiore, questo per mantenere le sezioni piatte e le bolle d'aria fuori durante l'asciugatura. (von Arx et al., 2016). Ogni vetrino viene poi contrassegnato attraverso lo stesso codice della provetta, di modo da identificare il campione durante la scannerizzazione.

2.4.2 Digitalizzazione dei campioni

Terminata la realizzazione dei vetrini, sono stati selezionati i campioni migliori per la loro successiva scannerizzazione. I vetrini selezionati sono stati puliti da incrostazioni in eccesso di Eukitt, rimossi attraverso raschiamento con lama da microtomo usate, e da polvere e impronte per mezzo di un panno in microfibra (von Arx et al., 2016).

Immagini delle sezioni sono state ottenute, acquisite a 20x ingrandimenti, attraverso un microscopio ottico scansione semi-automatica (Zenit G-Sight System (A. Menarini diagnostics)). (Fig. 2.5)

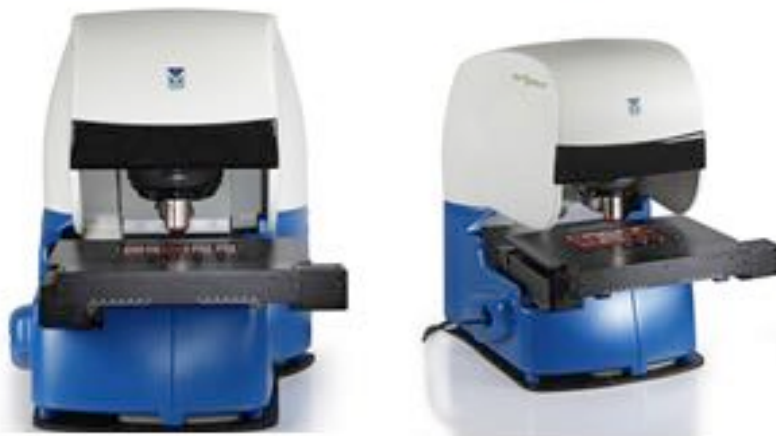


Fig. 2.5: Microscopio ottico semi-automatico Zenit G-Sight System

Durante la scannerizzazione una messa a fuoco attenta evita di ottenere strutture sfuocate che possono portare ad errori di misura. Questo microscopio offre una messa a fuoco semi-automatica che contribuisce ad una nitidezza dell'immagine costantemente elevata.

In molti casi, risulta difficile la messa a fuoco dei vetrini. La soluzione migliore sarebbe quella di preparare campioni migliori, ma a volte, anche con un'attenta preparazione del vetrino, la messa a fuoco non migliora. In questo caso è consigliabile cercare di escludere le regioni più sfuocate, per evitare eventuali errori di misurazione (von Arx et al., 2016). (Fig. 2.6)

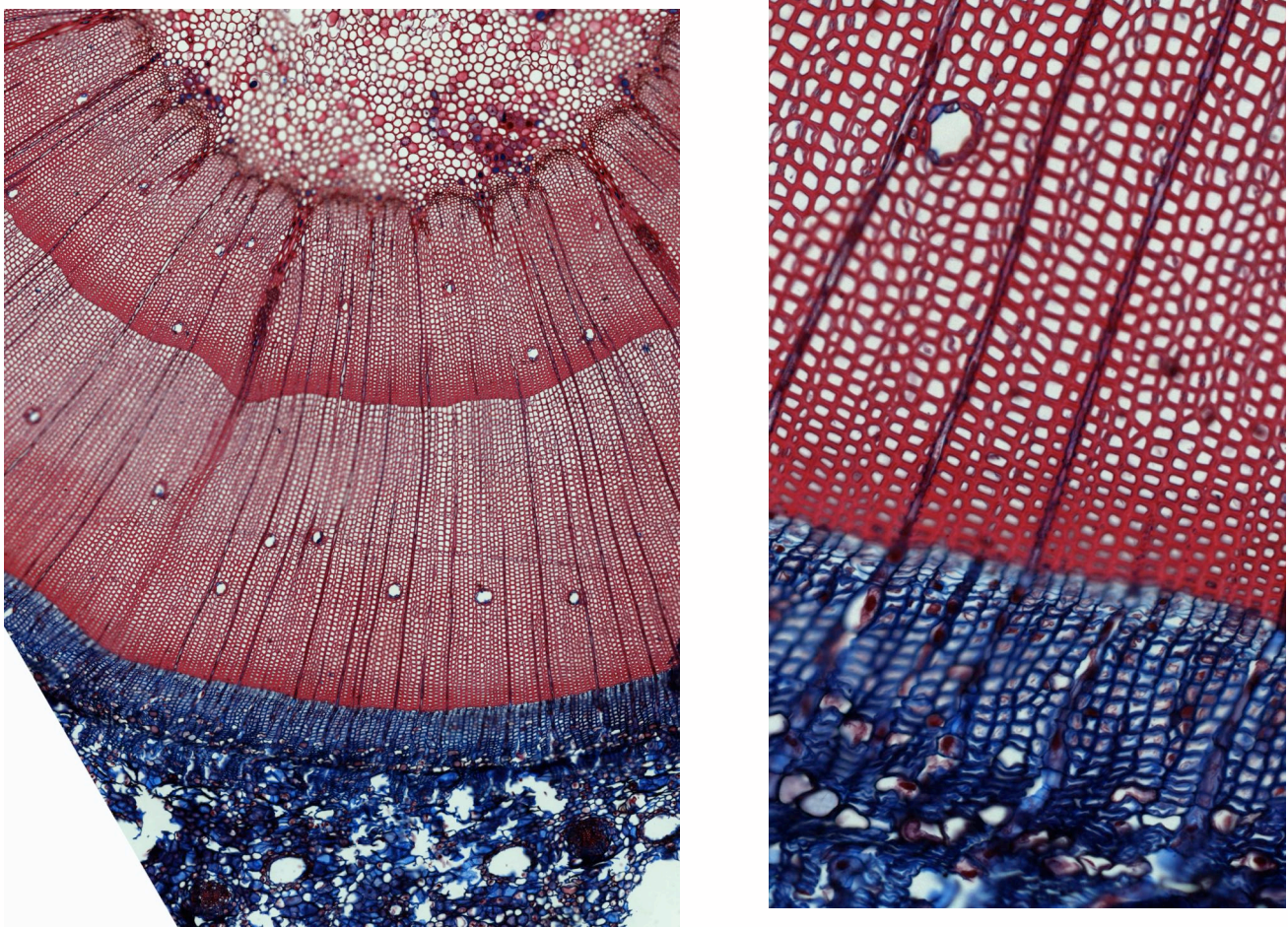


Fig. 2.6: Panorama di una sezione ottenuta a X20 con particolare a destra di xilema e floema

2.4.3 Quantificazione delle caratteristiche anatomiche nelle immagini anatomiche

In questo studio è stato utilizzato ROXAS (von Arx & Carrer, 2014) per le analisi sia dello xilema che del floema. ROXAS è uno strumento di analisi delle immagini per quantificare l'anatomia dello xilema e floema nelle angiosperme e nelle conifere. La caratteristica chiave di ROXAS è quella di elaborare immagini di interi campioni in un passaggio, fino a 1.000.000 di celle e più di 100 anelli annuali. Durante l'analisi automatica delle immagini, ROXAS corregge le carenze dell'immagine e dei campioni, tra cui un cattivo contrasto e pareti cellulari lacerate. ROXAS produce e salva più di 120 parametri a livello dell'intera immagine, di ciascun anello annuale e di ogni singola cella, compresa larghezza annuale dell'anello, area e diametro del lume delle cellule, spessore della parete cellulare (tangenziale e radiale), posizione delle celle nell'anello, raggruppamento dei vasi, conduttanza idraulica, indice di Mork e resistenza alla flessione $(t/b)^2$. L'output dei dati viene salvato in Excel e file di testo delimitati da schede. La qualità dei dati prodotti da ROXAS dipende molto dalla qualità delle immagini analizzate (oltre a corrette configurazioni e sufficienti modifiche manuali). Una volta convertite le immagini acquisite dallo scanner (JP2) in JPEG, si procede con l'analisi. Prima di tutto, per ottenere le misurazioni in unità metriche, occorre determinare prima la risoluzione da pixel a micrometri, che nel caso delle immagini acquisite corrisponde a 1.993615 pixel/ μm . Successivamente, è stato selezionato il centro del campione a livello del parenchima midollare, al fine di geo-referenziare tutti gli oggetti analizzati e le relative misurazioni (von Arx et al., 2016). Infine, sono stati selezionati degli spicchi centrati sul midollo, con angolo α , delimitanti l'area oggetto di analisi. Finita l'analisi, per ottenere risultati di qualità e affrontare le carenze di immagine, la modifica manuale finale è spesso necessaria dopo la rivelazione automatica e il filtraggio delle caratteristiche anatomiche. Per prima cosa sono state disegnate delle linee tra il legno tardivo e quello primaticcio, in modo che vengano identificati gli anelli annuali. L'accrescimento annuale viene datato partendo dalla base dell'immagine (corrispondente all'ultimo anello prima del floema) con anno 2018, fino all'anello prima del parenchima midollare. Successivamente è stata eseguita un'eliminazione manuale di quegli spazi che il programma considera cellule ma in realtà non lo sono (es. vasi resiniferi o interstizi cellulari).

Dall'analisi delle immagini con ROXAS sono state estratte automaticamente le seguenti metriche:

- Larghezza e anno degli anelli;

- Spessore della parete cellulare (cell wall thickness);
- Diametro idraulico medio (Dh) (diametro corrispondente alla conduttività idraulica media di tutte le condotte)
- Densità della cella (no./mm²) (CD)
- Area degli anelli (mm²) (RA)
- Indice di resistenza alla flessione (t/b)² (sicurezza dell'implosione cellulare).

Va specificato che le tracheidi sono state considerate come circolari e il diametro idraulico medio del vaso (Dh) è stato stimato come:

$$Dh = \frac{\sum d^5}{\sum d^4} \quad (\text{eq. 2.2})$$

Attraverso il comando "Summary_output" è stato possibile ottenere un unico file Excel contenente la sintesi di questi dati anatomici suddivisi anno per anno e relativi a tutte le sezioni analizzate.

2.5 MISURE BIOMASSA FOGLIARE

I rami che sono stati campionati sono stati selezionati lungo l'asse del ramo per i punti di campionamento (quelli da cui si sono ricavate le sezioni). Partendo dal punto di campionamento più apicale, è stato tagliato il ramo e si è misurata la biomassa fogliare di quella porzione di campione. Il dato cumulato per ogni campione è stato calcolato sommando in direzione basale (cioè dall'apice verso la base) la biomassa di ogni punto del campionamento. Il dato della biomassa del campione basale sarà uguale alla biomassa fogliare di tutto il ramo. Gli aghi e i rametti sono stati essiccati in stufa a 60°C per 48 h, dopodiché è stato calcolato il peso secco in g grazie ad una bilancia di precisione calibrata (0,1g) (Acculab ALC-1100.2). Su questi campioni si sono misurati l'area fogliare cumulata (LA Cum) in cm² e la biomassa fogliare cumulata (BM Cum) in g.

2.6 ANALISI STATISTICHE

I dati sono stati trasformati in forma logaritmica (Log_{10}), per garantire le condizioni di normalità e omoschedasticità come usualmente viene fatto per l'analisi delle relazioni allometriche. Le funzioni potenza tipo:

$$y = a * x^b \quad (\text{eq. 2.3})$$

Vengono linearizzate come:

$$Log_{10}y = Log_{10}a + b * Log_{10}x \quad (\text{eq. 2.4})$$

I parametri delle rette di regressione (di tipo I: OLS - Ordinary Least Squares) rappresentano la trasformata logaritmica della costante allometrica ($Log_{10}a$) e l'esponente di ogni equazione (b), identificati rispettivamente come l'intercetta sull'asse delle ordinate e la pendenza della curva. I coefficienti di regressione e i loro intervalli di confidenza al 95% sono stati calcolati con il software Matlab. Per definire il grado di significatività con cui le rette di regressione sono significativamente simili o dissimili è stato usato il test statistico ANCOVA attraverso il software R (Cran project).

2.7 CARATTERISTICHE ANATOMICHE FUNZIONALI

Per ogni anello annuale di ogni disco, sono stati calcolati le caratteristiche anatomiche di xilema e floema utilizzando le misure anatomiche sopra menzionate (Tab. 2.1). Come proxy per l'efficienza idraulica, è stato utilizzato il diametro idraulico medio (Dh), vale a dire il diametro del lume corrispondente alla conducibilità idraulica media tra tutte le tracheidi (Kolb & Sperry, 1999). Come indicatore per la sicurezza idraulica dall'implosione cellulare, è stata utilizzata la resistenza all'implosione della parete cellulare $(t/b)^2$.

Hacke et al. (2001) ha calcolato che le condutture riempite di acqua hanno delle grandi sollecitazioni intorno alle circonferenze del condotto che potrebbe portare il collasso cellulare in condizioni di siccità se le cellule vicine non fornissero un supporto meccanico sufficiente. Inoltre, si è dimostrato che le pressioni di implosione xilemica calcolate dalle dimensioni anatomiche delle cellule sono correlate alla densità del legno. La base di questo rapporto è che la parete a doppia cella condivisa da celle adiacenti si comporta in modo simile ad una lunga piastra di larghezza b (diametro della cella) e spessore t (spessore della parete a doppia cella), e questa piastra si sfibrerà con una forza proporzionale a $(t/b)^2$. Di conseguenza, il legno denso è caratterizzato unicamente da un'alta t per un dato b (a causa di una maggiore proporzione il volume della parete cellulare rispetto al volume del lume), è più resistente al collasso della parete cellulare rispetto al legno meno denso. (Domec et al., 2009). La funzione di supporto meccanico dello xilema è stimata dalla media dello spessore della parete cellulare (CWT). La dimensione delle tracheidi, lo spessore della parete cellulare e il loro numero dipendono dalla posizione all'interno dell'anello dell'albero, all'età dell'albero, alla loro posizione all'interno del fusto e alle condizioni climatiche del momento della loro differenziazione. I parametri morfologici dipendono dalla velocità della differenziazione delle tracheidi (Hacura et al., 2015). Per l'efficienza idraulica, oltre al Dh , è stata stimata anche la conduttività idraulica totale dello xilema. La misura della conduttività idraulica dello xilema ha costituito la base degli studi sulla meccanica dei fluidi nei condotti xilematici, sulla distribuzione e sull'origine delle resistenze e dei gradienti di pressione nel sistema di trasporto dell'acqua. La conduttività idraulica viene misurata sui campioni di xilema asportati. Questi sono collegati ad un sistema idraulico per misurare la differenza di pressione di un fluido (acqua) attraverso il campione e la portata di massa attraverso il campione. Il rapporto pressione-flusso è stato espresso in vari modi, il più semplice è la conduttività idraulica. (Sperry et al., 1988)

Nel nostro caso la conduttività idraulica è calcolata in maniera teorica da ROXAS approssimata dalla legge di Hagen-Poiseuille e adattata a tubi ellittici. La conduttività idraulica è, in poche parole, una misura della permeabilità della membrana all'acqua, ed è uno dei fattori che determinano la velocità di movimento dell'acqua all'interno della pianta. (Taiz et al., 2002). Secondo l'equazione Hagen-Poiseuille, un'elevata conducibilità idraulica può essere ottenuta aumentando le dimensioni e/o il numero dei recipienti. Poiché la conducibilità del condotto aumenta alla quarta potenza di diametro, i vasi larghi sono molto più conduttivi di quelli stretti e possono essere associati ad alta produttività, ma allo stesso tempo, i condotti larghi sono più inclini alla cavitazione indotta dalla siccità rispetto a quelli stretti (Schuldt et al. 2011). Per caratterizzare i modelli di conduzione dell'acqua, si possono confrontare le conducibilità specifiche delle foglie (*LSC*) tra le specie sottoposte a stress idrico e quelle controllate. La conduttività specifica delle foglie è definita come la portata d'acqua (Kg s^{-1}) attraverso un fusto o un ramo causato da un'unità di gradiente potenziale di pressione (MPa m^{-1}) per unità di superficie fogliare fornita dal fusto (m^2). La conduttività specifica della foglia, che varia ampiamente tra le specie e le forme di crescita, così come all'interno delle piante, è fortemente influenzata dall'anatomia xilemica. (Pallardy, 2008)

Per calcolare la *LSC* il calcolo che abbiamo fatto è stato:

$$LSC = \frac{K_h \times 360}{LA_{Cum}} \quad (\text{eq. 2.5})$$

Con $K_h \times 360$ uguale alla conduttività idraulica e LA_{Cum} l'area fogliare. Questo valore di conducibilità specifico delle foglie è una misura della capacità del ramo di rifornire le foglie di acqua. (Mokany et al., 2003). Come indicatore di efficienza idraulica del floema è stata utilizzata la media delle dimensioni delle celle per anno del floema (*MCA Phloem*). Infine, come indicatori per la crescita, sono stati presi l'area fogliare cumulata (*LA Cum*), la biomassa dei rami cumulata (*BM Cum*) e l'area degli anelli (*RA*), quest'ultima stimata sulla base delle misure della larghezza dell'anello di ROXAS, assumendo una sezione trasversale dello stelo circolare. (Prendin et al., 2018)

Tabella 2.1: Acronimi e descrizioni delle variabili utilizzate in questo studio

Variabile	Descrizione	Funzione	Riferimento
Descrittiva			
DAP (cm)	Distanza dall'apice (distance from Apex)	-	
H (cm)	Altezza albero	-	
TE	Piante sottoposte a stress	-	
CO	Piante controllo	-	
Tratti funzionali			
Dh (µm)	Diametro idraulico tracheidi	Efficienza idraulica	Kolb & Sperry (1999)
(t/b)²	Resistenza all'implosione della parete cellulare	Sicurezza idraulica	Hacke et al. (2001)
CWT (µm)	Spessore parete cellulare (Cell Wall Thickness)	Supporto meccanico	Myburg et al. (2013)
Kh (Kg m⁻¹ MPa⁻¹ s⁻¹)	Conduktività idraulica totale	Efficienza idraulica	Tyree & Zimmermann (2002)
LSC (Kg m⁻¹ MPa⁻¹ s⁻¹ g⁻¹)	Conducibilità specifica fogliare	Efficienza idraulica	
MCA Phloem (µm²)	Media delle dimensioni delle celle per anno del floema	-	
Crescita			
LA Cum (cm²)	Area fogliare cumulata	-	
BM Cum (g)	Biomassa rami cumulata	-	
RA (mm²)	Area anelli	-	

3. Risultati

Abbiamo effettuato un'analisi comparativa dei rapporti di scala tra i diversi tratti (variabili dipendenti: RA , CWT , Dh , Kh), rispetto alla DAP degli alberi CO e TE. Abbiamo utilizzato modelli standardizzati ad asse maggiore e testato per possibili differenze sull'elevazione (y-intercetta) e la pendenza (esponente b) delle diverse relazioni di scala. (Kiorapostolou, 2020). I dati sono stati riportati in logaritmo, interpolati in funzioni lineari e le differenze tra intercetta e pendenza sono state interpolate attraverso il Linear Mixed Effects Model.

3.1 VARIAZIONE DEL DIAMETRO DEI VASI

È stata analizzata il rapporto tra Dh e DAP. Una prima visione al grafico evidenzia un chiaro schema assiale, infatti il Dh aumenta all'aumentare della DAP. Il test statistico individua che c'è una relazione lineare estremamente significativa. Si individua però che non c'è una differenza significativa tra alberi sotto stress (TE) e alberi non trattati (CO) (Tab. 3.1).

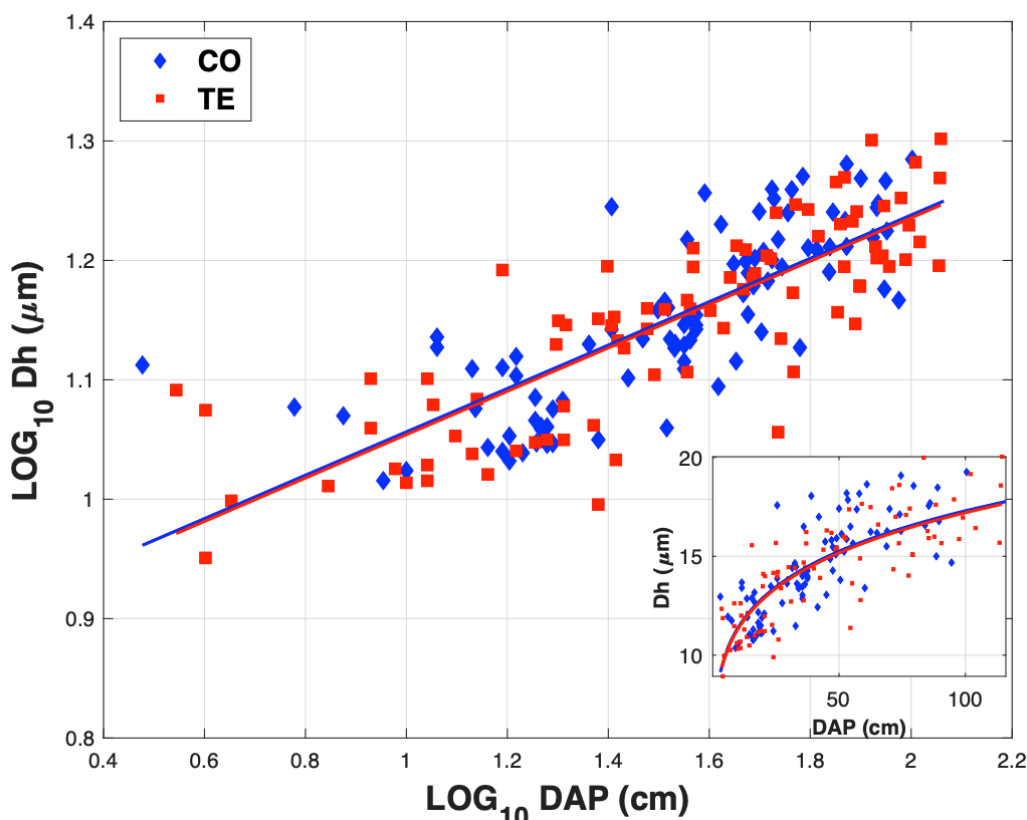


Grafico 3.1: Relazione tra il diametro idraulico (Dh) e la distanza dall'apice (DAP) per le piante CO e TE in scala Log_{10} - Log_{10} con curve di interpolazione (linee dritte). Nel riquadro piccolo la stessa relazione con i valori dei dati normali e curve di interpolazione in scala logaritmica.

Tabella 3.1: Parametri della regressione, essi sono uguali a: $\text{variable} \sim \text{DAP} + \text{treat}$ per verificare la differenza di elevazione (y -intercept), dove DAP è la distanza dall'apice. La slope (β) è uguale per le due condizioni. I dati sono trasformati in Log_{10} . La variabile presa è il diametro idraulico (Dh) e la condizione è piante stressate o meno. Sono riportati il valore, l'errore standard, gradi di libertà (DF), t -value e i valori di significatività (p -value).

Model	Covariates and fixed effects	Value	Std. Error	DF	t-value	p-value
$\text{Log}_{10}Dh \sim \text{Log}_{10}DAP + \text{treat}$	Intercept (y_0)	0,87	0,02	168	50,18	<0,0001
	Slope (β)	0,18	0,01	168	17,67	<0,0001
	Treat (TE)	0,87	0,01	8	-0,20	0,84

3.2 VARIAZIONE DELL'AREA DEGLI ANELLI

Sia negli alberi TE che negli alberi CO la ripartizione annuale nella biomassa xilemica segue una relazione assiale di scala tra RA e DAP. L'esponente di scala (cioè la pendenza della relazione log-log) è maggiore negli alberi CO rispetto a quella delle piante TE. (Grafico 3.2) Si individua però che non c'è una differenza significativa tra alberi TE e CO. (Tab. 3.2) La conducibilità si riferiva a un solo spicchio, per questo è stata rapportata all'intero disco.

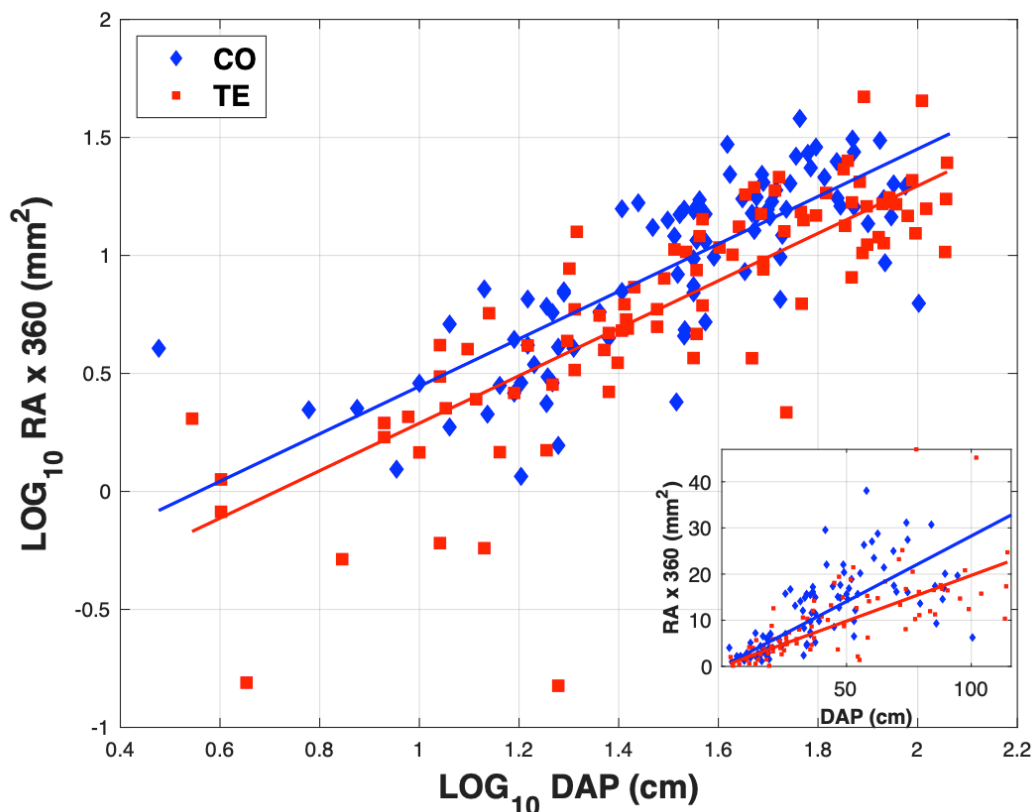


Grafico 3.2: Relazione tra l'area dell'anello (RA) e la distanza dall'apice (DAP) per le piante CO e TE in scala $\text{Log}_{10}\text{-Log}_{10}$ con curve di interpolazione (linee dritte). Nel riquadro piccolo la stessa relazione con i valori dei dati normali e curve di interpolazione in scala logaritmica.

Tabella 3.2: Parametri della regressione, essi sono uguali a: $\text{variable} \sim \text{DAP} + \text{treat}$ per verificare la differenza di elevazione (y -intercept), dove DAP è la distanza dall'apice. La slope (β) è uguale per le due condizioni. I dati sono trasformati in Log_{10} . La variabile presa è l'area dell'anello (RA) e la condizione è piante stressate o meno. Sono riportati il valore, l'errore standard, gradi di libertà (DF), t -value e i valori di significatività (p -value).

Model	Covariates and fixed effects	Value	Std. Error	DF	t-value	p-value
$\text{Log}_{10}\text{RAx360} \sim \text{Log}_{10}\text{DAP} + \text{treat}$	Intercept (y_0)	-0,56	0,10	173	-5,41	<0,0001
	Slope (β)	1,00	0,06	173	17,81	<0,0001
	Treat (TE)	-0,71	0,08	8	-1,90	0,09

3.3 VARIAZIONE DELL'AREA FOGLIARE E BIOMASSA DEI RAMI

Sono stati calcolati *LA* cumulata e *BM* cumulata degli alberi TE e CO. Una prima visione al grafico evidenzia un chiaro schema assiale, infatti sia *LA Cum* che *BM Cum* aumentano all'aumentare della *DAP*. Il test statistico individua che c'è una relazione lineare estremamente significativa. In tutti e due i casi non abbiamo una differenza significativa tra piante CO e TE. (Tab.3.3-3.4)

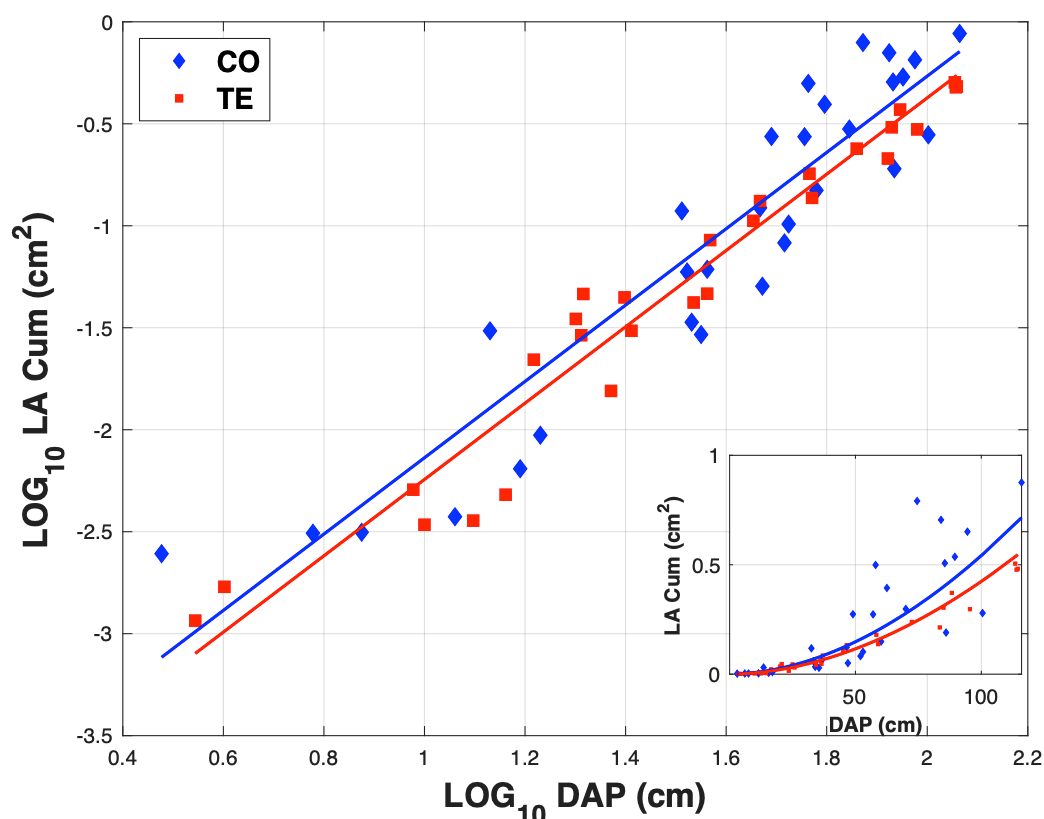


Grafico 3.3: Relazione tra l'area fogliare cumulata (*LA Cum*) e la distanza dall'apice (*DAP*) per le piante CO e TE in scala $\text{Log}_{10}\text{-Log}_{10}$ con curve di interpolazione (linee dritte). Nel riquadro piccolo la stessa relazione con i valori dei dati normali e curve di interpolazione in scala logaritmica.

Tabella 3.3: Parametri della regressione, essi sono uguali a: $\text{variable} \sim \text{DAP} + \text{treat}$ per verificare la differenza di elevazione (*y*-intercept), dove *DAP* è la distanza dall'apice. La slope (β) è uguale per le due condizioni. I dati sono trasformati in Log_{10} . La variabile presa è l'area fogliare cumulata e la condizione è piante stressate o meno. Sono riportati il valore, l'errore standard, gradi di libertà (*DF*), *t*-value e i valori di significatività (*p*-value).

Model	Covariates and fixed effects	Value	Std. Error	DF	t-value	p-value
$\text{Log}_{10}\text{LACum} \sim \text{Log}_{10}\text{DAP} + \text{treat}$	Intercept (<i>y</i> 0)	-4,01	0,13	47	-31,42	<0,0001
	Slope (β)	1,87	0,06	47	32,23	<0,0001
	Treat (TE)	-4,11	0,13	8	-0,85	0,42

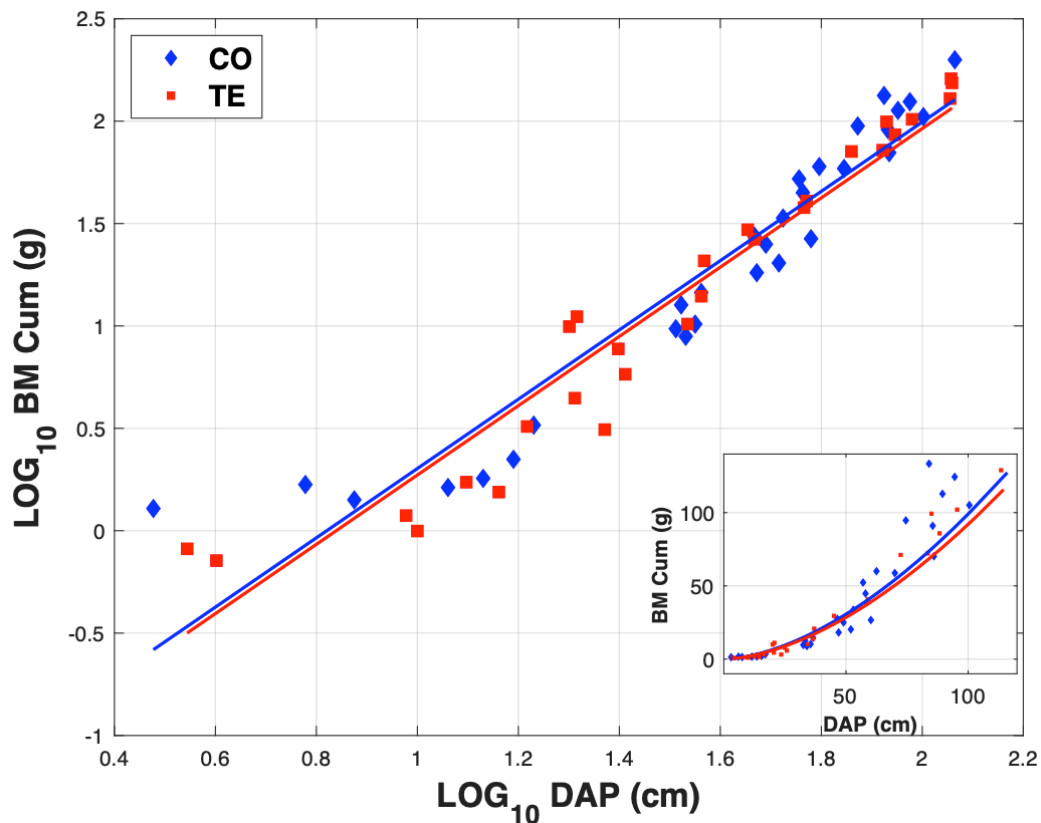


Grafico 3.4: Relazione tra la biomassa dei rami cumulata (BM Cum) e la distanza dall'apice (DAP) per le piante CO e TE in scala Log₁₀-Log₁₀ con curve di interpolazione (linee dritte). Nel riquadro piccolo la stessa relazione con i valori dei dati normali e curve di interpolazione in scala logaritmica.

Tabella 3.4: Parametri della regressione, essi sono uguali a: $variable \sim DAP + treat$ per verificare la differenza di elevazione (y -intercept), dove DAP è la distanza dall'apice. La slope (β) è uguale per le due condizioni. I dati sono trasformati in Log₁₀. La variabile presa è l'area fogliare cumulata e la condizione è piante stressate o meno. Sono riportati il valore, l'errore standard, gradi di libertà (DF), t -value e i valori di significatività (p -value).

Model	Covariates and fixed effects	Value	Std. Error	DF	t-value	p-value
$Log_{10}BMCum \sim Log_{10}DAP + treat$	Intercept (y_0)	-1,39	0,11	47	-12,37	<0,0001
	Slope (β)	1,69	0,06	47	25,83	<0,0001
	Treat (TE)	-1,42	0,06	8	-0,51	0,62

3.4 VARIAZIONE DELLA CONDUTTIVITÀ IDRAULICA

Anche in questo caso abbiamo una crescita assiale, con Kh che aumenta all'aumentare della DAP. Il test statistico individua una relazione estremamente significativa. Abbiamo che le piante CO hanno una maggiore conducibilità rispetto a quelle TE. Ma anche in questo caso non c'è una relazione significativa tra piante CO e TE. La conducibilità si riferiva a un solo spicchio, per questo è stata rapportata all'intero disco.

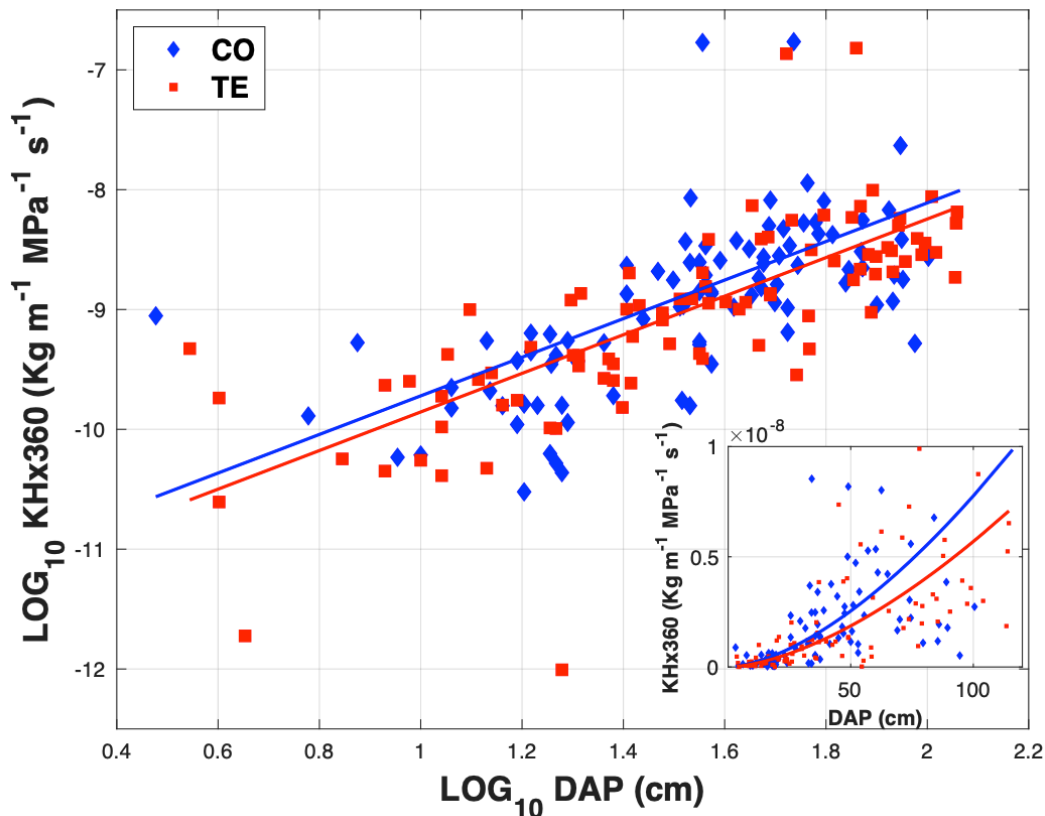


Grafico 3.5: Relazione tra la conducibilità idraulica (Kh) e la distanza dall'apice (DAP) per le piante CO e TE in scala Log_{10} - Log_{10} con curve di interpolazione (linee dritte). Nel riquadro piccolo la stessa relazione con i valori dei dati normali e curve di interpolazione in scala logaritmica.

Tabella 3.5: Parametri della regressione, essi sono uguali a: $variable \sim DAP + treat$ per verificare la differenza di elevazione (y -intercept), dove DAP è la distanza dall'apice. La slope (β) è uguale per le due condizioni. I dati sono trasformati in Log_{10} . La variabile presa è la conducibilità idraulica e la condizione è piante stressate o meno. Sono riportati il valore, l'errore standard, gradi di libertà (DF), t -value e i valori di significatività (p -value).

Model	Covariates and fixed effects	Value	Std. Error	DF	t-value	p-value
$Log_{10}Khx360 \sim Log_{10}DAP + treat$	Intercept (y_0)	-11,33	0,25	173	-45,12	<0,0001
	Slope (β)	1,61	0,13	173	12,10	<0,0001
	Treat (TE)	-11,46	0,21	8	-0,63	0,54

3.5 VARIAZIONE DELLA CONDUCIBILITÀ SPECIFICA FOGLIARE

In questo caso abbiamo una decrescita assiale, infatti LSC diminuisce all'aumentare della DAP (Graf. 6). Ma anche in questo caso non abbiamo una relazione significativa tra le piante CO e TE . (Tab.6)

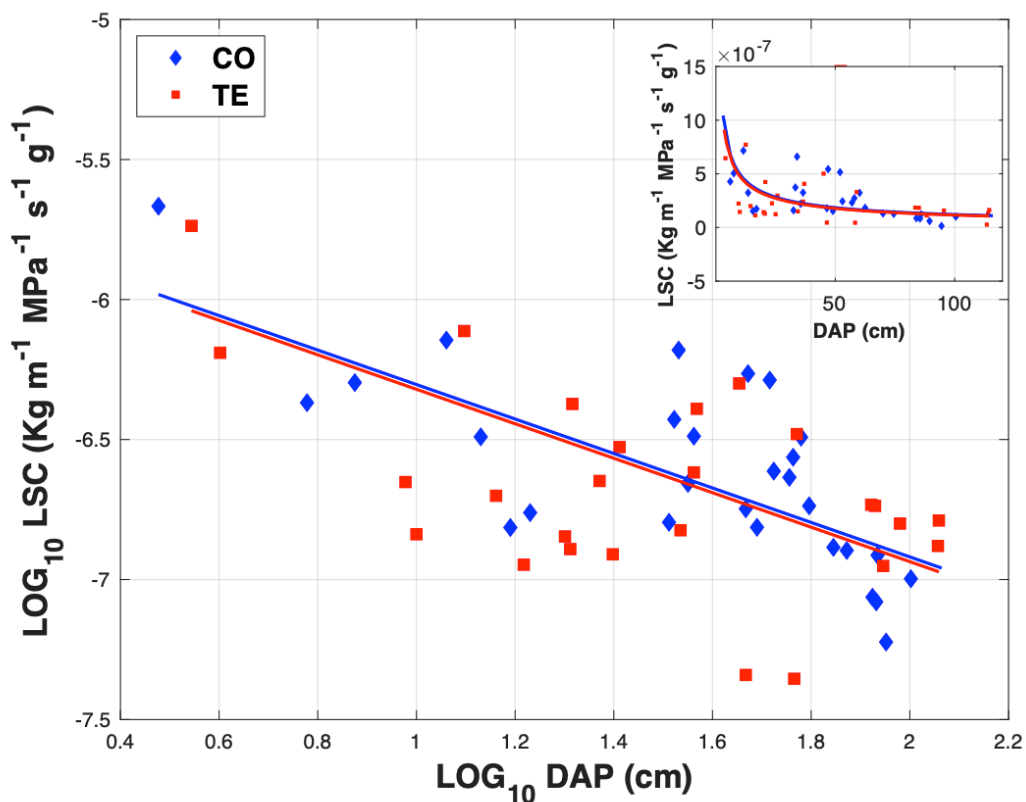


Grafico 3.6: Relazione tra la conducibilità specifica fogliare (LSC) e la distanza dall'apice (DAP) per le piante CO e TE in scala Log_{10} - Log_{10} con curve di interpolazione (linee drette). Nel riquadro piccolo la stessa relazione con i valori dei dati normali e curve di interpolazione in scala logaritmica.

Tabella 3.6: Parametri della regressione, essi sono uguali a: $variable \sim DAP + treat$ per verificare la differenza di elevazione (y -intercept), dove DAP è la distanza dall'apice. La slope (β) è uguale per le due condizioni. I dati sono trasformati in Log_{10} . La variabile presa è la conducibilità specifica fogliare e la condizione è piante stressate o meno. Sono riportati il valore, l'errore standard, gradi di libertà (DF), t -value e i valori di significatività (p -value).

Model	Covariates and fixed effects	Value	Std. Error	DF	t-value	p-value
$Log_{10}LSC \sim Log_{10}DAP + treat$	Intercept (y_0)	-5,69	0,21	46	-26,87	<0,0001
	Slope (β)	-0,61	0,11	46	-5,65	<0,0001
	Treat (TE)	-5,70	0,18	8	-0,09	0,93

3.6 VARIAZIONE DELLO SPESSORE DELLA PARETE CELLULARE

Sono stati comparati le *CWT* per quanto riguarda alberi CO e TE. Questo parametro viene calcolato automaticamente da ROXAS. Anche in questo caso abbiamo una crescita assiale, infatti *CWT* aumenta all'aumentare della *DAP*. Il testo statistico individua una relazione estremamente significativa per l'intercetta ma non per la pendenza. Anche in questo caso non c'è invece una relazione significativa tra le piante CO e quelle TE. (Tab. 3.7)

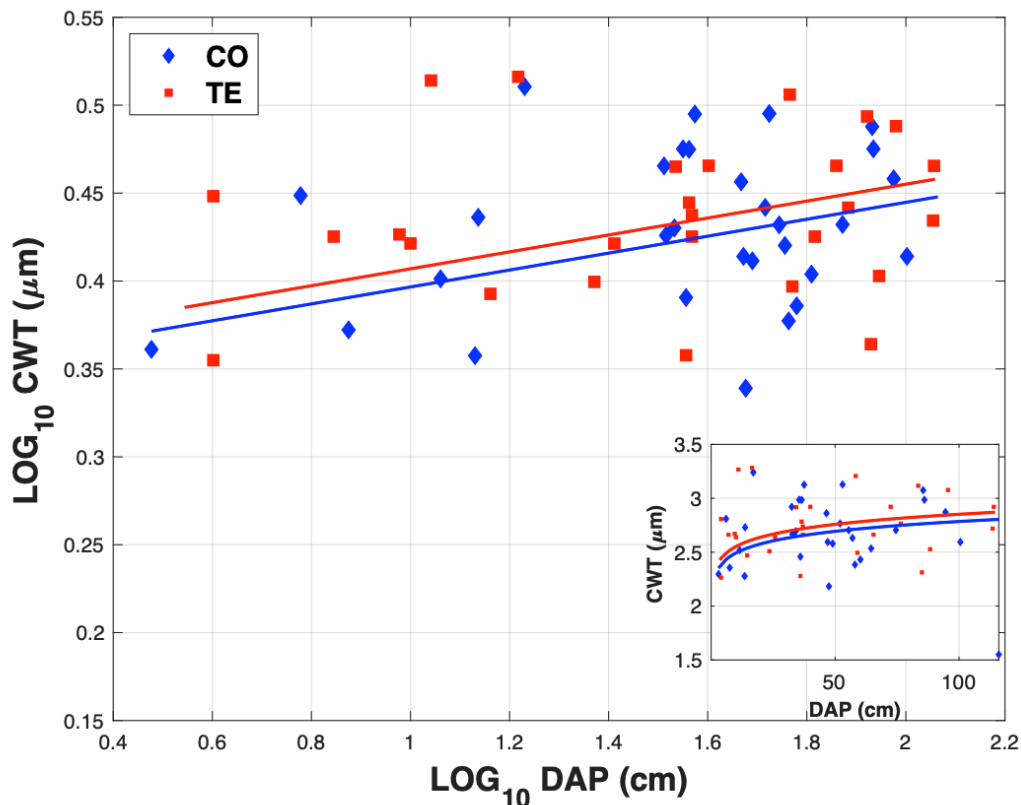


Grafico 3.7: Relazione tra lo spessore della parete cellulare (*CWT*) e la distanza dall'apice (*DAP*) per le piante CO e TE in scala Log_{10} - Log_{10} con curve di interpolazione (linee dritte). Nel riquadro piccolo la stessa relazione con i valori dei dati normali e curve di interpolazione in scala logaritmica.

Tabella 3.7: Parametri della regressione, essi sono uguali a: $\text{variable} \sim \text{DAP} + \text{treat}$ per verificare la differenza di elevazione (*y*-intercept), dove *DAP* è la distanza dall'apice. La slope (β) è uguale per le due condizioni. I dati sono trasformati in Log_{10} . La variabile presa è lo spessore della parete cellulare e la condizione è piante stressate o meno. Sono riportati il valore, l'errore standard, gradi di libertà (*DF*), *t*-value e i valori di significatività (*p*-value).

Model	Covariates and fixed effects	Value	Std. Error	DF	t-value	p-value
$\text{Log}_{10}\text{CWT} \sim \text{Log}_{10}\text{DAP} + \text{treat}$	Intercept (y_0)	0,35	0,03	47	11,78	<0,0001
	Slope (β)	0,05	0,02	47	2,70	0,009
	Treat (TE)	0,36	0,02	8	0,62	0,55

3.7 VARIAZIONE ALLA RESISTENZA ALL'IMPLOSIONE DELLA PARETE CELLULARE

In questo caso abbiamo una decrescita assiale con una relazione estremamente significativa, all'aumentare della DAP la $(t/b)^2$ diminuisce. (Graf. 3.8) Ma anche in questo caso non c'è una differenza significativa tra piante CO e TE. (Tab. 3.8)

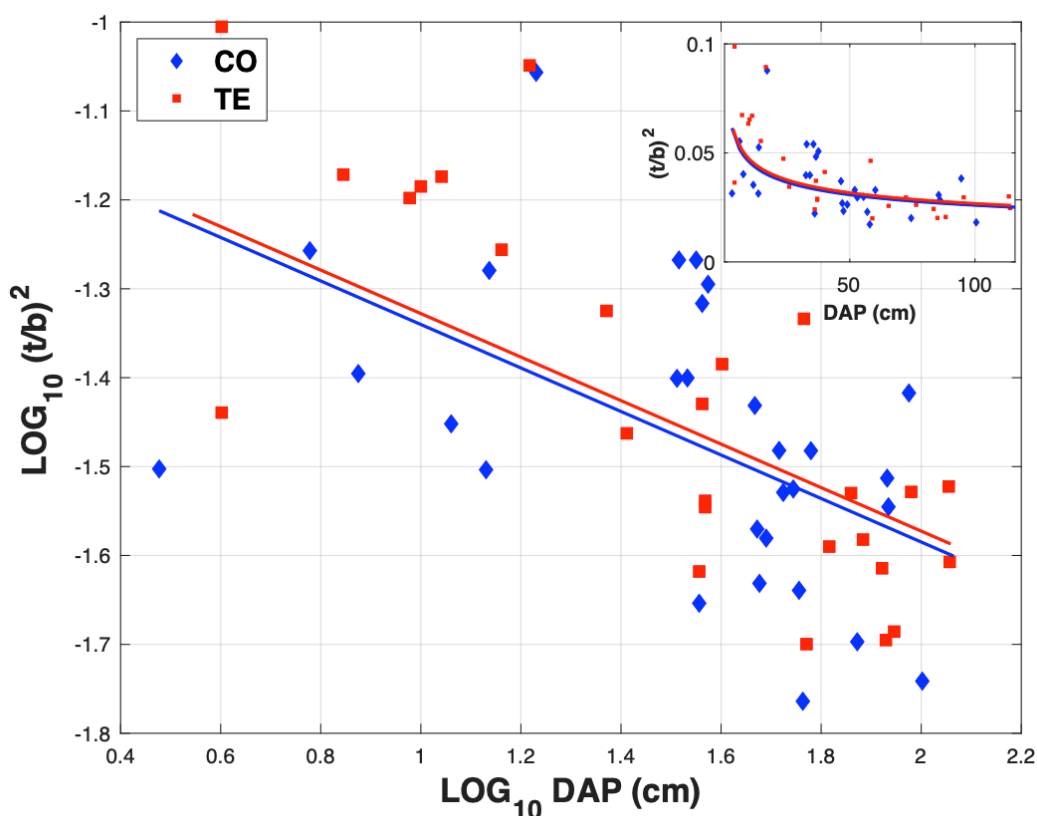


Grafico 3.8: Relazione tra la resistenza all'implosione della parete cellulare $(t/b)^2$ e la distanza dall'apice (DAP) per le piante CO e TE in scala Log_{10} - Log_{10} con curve di interpolazione (linee dritte). Nel riquadro piccolo la stessa relazione con i valori dei dati normali e curve di interpolazione in scala logaritmica.

Tabella 3.8: Parametri della regressione, essi sono uguali a: $\text{variable} \sim \text{DAP} + \text{treat}$ per verificare la differenza di elevazione (y-intercept), dove DAP è la distanza dall'apice. La slope (β) è uguale per le due condizioni. I dati sono trasformati in Log_{10} . La variabile presa è la resistenza all'implosione della parete cellulare e la condizione è piante stressate o meno. Sono riportati il valore, l'errore standard, gradi di libertà (DF), t-value e i valori di significatività (p-value).

Model	Covariates and fixed effects	Value	Std. Error	DF	t-value	p-value
$\text{Log}_{10}(t/b)^2 \sim \text{Log}_{10}\text{DAP} + \text{treat}$	Intercept (y0)	-1,09	0,08	45	-13,21	<0,0001
	Slope (β)	-0,24	0,05	45	-4,94	<0,0001
	Treat (TE)	-1,08	0,05	8	0,25	0,80

3.8 VARIAZIONE DELLA MEDIA DELLE DIMENSIONI DELLE CELLE PER ANNO DEL FLOEMA

In questo caso è stato analizzato il diametro medio delle cellule del floema. Abbiamo una crescita assiale estremamente significativa, aumentano all'aumentare della DAP). Anche in questo caso, però, non abbiamo una differenza significativa tra piante CO e TE. (Tab. 3.9)

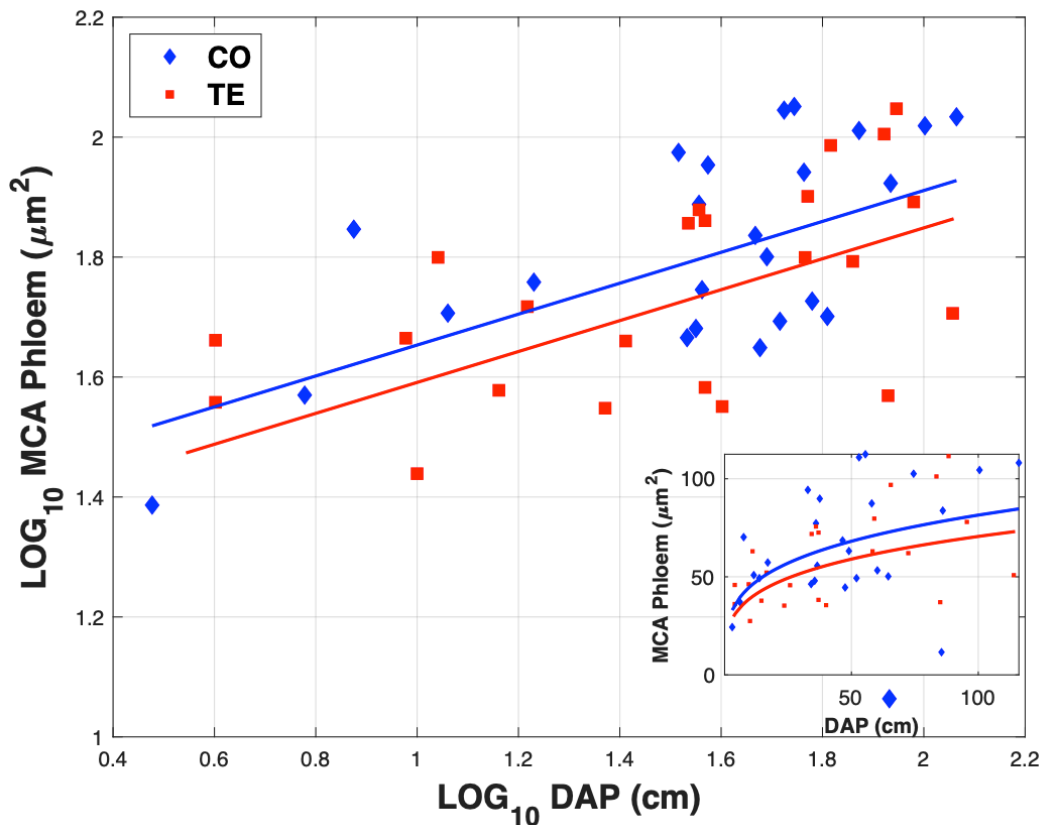


Grafico 3.9: Relazione tra la media delle dimensioni delle cellule del floema (MCA Phloem) e la distanza dall'apice (DAP) per le piante CO e TE in scala Log_{10} - Log_{10} con curve di interpolazione (linee dritte). Nel riquadro piccolo la stessa relazione con i valori dei dati normali e curve di interpolazione in scala logaritmica.

Tabella 3.9: Parametri della regressione, essi sono uguali a: $\text{variable} \sim \text{DAP} + \text{treat}$ per verificare la differenza di elevazione (y-intercept), dove DAP è la distanza dall'apice. La slope (β) è uguale per le due condizioni. I dati sono trasformati in Log_{10} . La variabile presa è le dimensioni delle cellule del floema e la condizione è piante stressate o meno. Sono riportati il valore, l'errore standard, gradi di libertà (DF), t-value e i valori di significatività (p-value).

Model	Covariates and fixed effects	Value	Std. Error	DF	t-value	p-value
$\text{Log}_{10}\text{MCA Phloem} \sim \text{Log}_{10}\text{DAP} + \text{treat}$	Intercept (y0)	1,39	0,11	38	13,02	<0,0001
	Slope (β)	0,26	0,06	38	3,99	0,0003
	Treat (TE)	1,33	0,06	8	-1,01	0,34

4. Discussione

Questo esperimento nasce con l'idea di spiegare che meccanismi le piante possono utilizzare per sopravvivere in condizioni di siccità. Questo studio è incentivato dagli ultimi resoconti dell'IPCC, che spiega come le temperature sono in costante aumento, con la conseguenza di maggiori eventi climatici estremi, come ondate di calore, periodi di siccità estrema per durata e/o intensità e precipitazioni eccezionali (IPCC, 2007). Questi eventi portano ad un inevitabile aumento della mortalità delle piante (Allen et al., 2010), con conseguenze importanti per il nostro pianeta.

In questo studio, sono state analizzate le caratteristiche anatomiche di xilema e floema di 12 piante di abete rosso (*Picea abies* L.), in convivenza con faggio (*Fagus sylvatica* L.), che si differenziano per buona e ridotta disponibilità idrica. Analizzare l'anatomia di xilema e floema è importante per farci capire i metodi di adattamento della pianta alla siccità, oltre che ai tempi di adeguamento e se la pianta risulta sotto stress o meno, in base alle dimensioni dei vasi xilematici e floematici. Questi elementi possono essere utilizzati a nostro vantaggio per capire le modifiche che possono occorrere nelle nostre foreste nei prossimi anni. L'ipotesi è che piante con minore disponibilità idrica modificano xilema e floema per avere vasi più grandi (Kiorapostolou et al., 2018; Sevanto, 2014; Sevanto et al., 2018) e una maggiore quantità di massa fogliare (Anfodillo et al., 2006; Kiorapostolou et al., 2018), tutto questo per sopperire alla mancanza di acqua.

Abbiamo visto che le piante possono adottare due meccanismi per sopperire a temporanei o prolungati periodi di stress, attraverso l'osmoregolazione, cioè la regolazione attiva della pressione osmotica. Le specie possono essere evitanti (non controllano l'osmoregolazione, isoidriche), con un potenziale fogliare minimo Ψ_{min} caratteristico, con alto margine di sicurezza idraulico e basso rischio di cavitazione. In questo caso, con la diminuzione del Ψ_{suolo} , il Ψ_{foglia} rimane fisso, con conseguente riduzione di $\Delta\Psi$ e chiusura degli stomi. Questo metodo è tipico della maggior parte delle gimnosperme.

Altrimenti possono essere tolleranti (controllano l'osmoregolazione, anisoidriche) con basso margine di sicurezza idraulico e alto rischio di cavitazione, in questo caso Ψ_{min} diminuisce compensando la riduzione di Ψ_{suolo} , permettendo una prolungata apertura stomatica. Questo metodo è, invece, tipico di molte angiosperme.

In caso di prolungata situazione di siccità, nel caso di specie isoidriche si arriverà a morte per fame di carbonio. Infatti, la chiusura stomatica per preservare il disseccamento, fa sì che l'assorbimento del carbonio fotosintetico diminuisca fino a quasi lo zero. La continua domanda di carboidrati per mantenere il metabolismo esaurirà le riserve di carbonio, portando alla fame di carbonio o all'incapacità di respingere attacchi da agenti patogeni (McDowell et al., 2008). La carenza di carbonio causata dalla siccità, e la conseguente predisposizione all'attacco da parte di agenti patogeni, è una probabile causa di mortalità nelle specie isoidriche. La mortalità delle specie isoidriche è particolarmente probabile durante siccità prolungate di intensità intermedia (McDowell et al., 2008).

Nel caso di specie anisoidriche, invece, si arriverà ad un fallimento idraulico del sistema di trasporto, causato da eventi di cavitazione all'interno dello xilema. Il risultato della cavitazione è che un condotto principalmente pieno di acqua liquida alla fine si riempie di aria (embolia). Il condotto riempito di aria è embolizzato e non è più utilizzabile per il trasporto di acqua. La cavitazione è biologicamente importante perché l'embolizzazione dei condotti riduce la conduttività idraulica dello xilema (Tyree & Sperry, 1989), portando al guasto idraulico e al conseguente esaurimento delle riserve di carbonio. Le specie anisoidriche, relativamente tolleranti alla siccità, hanno maggiori probabilità di morire per fallimento idraulico perché mantengono un sottile margine di sicurezza idraulica. La mortalità delle specie anisoidriche è particolarmente probabile durante siccità intense.

In caso di specie isoidriche, per resistere a prolungati periodi di siccità, le piante dovrebbero produrre una maggiore biomassa fogliare, questo per sostenere un determinato costo di mantenimento della respirazione (Anfodillo et al. 2016, Kiorapostolou et al. 2018), che non sia influenzata dall'apertura degli stomi (Kiorapostolou & Petit, 2018). L'allocazione delle risorse di carbonio dovrebbe arrivare da un risparmio sulle strutture dello xilema, con una produzione di un numero minore di vasi più larghi e conduttivi, con un minore costo di carbonio. Infatti, prendendo un diametro grande o molti diametri piccoli, in accordo con la legge di Hagen-Poiseuille (eq. 1.3), il flusso sarà sempre lo stesso, ma i costi di carbonio nella costruzione dei vasi saranno molto diversi. Prendendo diametri 1/4 più piccoli di un vaso più grande, dovremo avere 256 vasi piccoli per avere lo stesso flusso, ma con costi di carbonio 64 volte maggiore. Grandi condotti (con grande diametro e grande lunghezza) sono considerati efficienti per la conduzione idraulica, ma altamente vulnerabili alla cavitazione rispetto ai condotti più piccoli (Carlquist, 1977; Baas, 1982; Zimmermann 1983; Cochard & Tyree, 1990).

Per questi motivi durante un periodo di siccità si pensa che ci sia un trade-off strutturale tra efficienza e sicurezza del trasporto idrico, cioè che un'efficienza xilematica abbia un determinato costo di vulnerabilità all'embolizzazione. La dimensione dei vasi diventa quindi un aspetto cruciale nel determinare l'efficienza del trasporto idrico. In condizioni di bassa disponibilità d'acqua il suolo è disidratato e il potenziale idrico del suolo (Ψ_{suolo}) si abbassa, riducendo il gradiente di potenziale che si genera tra il mesofillo fogliare e il terreno. Questo comporta un inevitabile riduzione della forza motrice del flusso (Tyree, 1997; Smith, 2013). In questi casi quindi il rifornimento idrico delle foglie dipende strettamente dalla dimensione dei condotti.

Come noto in studi precedenti (Sanio, 1872; West et al. 1999; Anfodillo et al. 2006, 2013; Mencuccini et al., 2007; Petit et al. 2008, 2010; Bettiati et al., 2012), la pianta è formata da un fascio di tubi che corrono in parallelo tra di loro dalle radici fino alle foglie. In particolare, i tubi non sono cilindrici (come i precedenti modelli idraulici) ma hanno un certo grado di allargamento in direzione basale (*widening*), questo per permettere di mantenere l'efficienza fogliare il più costante possibile durante l'ontogenesi (crescita della pianta) (Anfodillo et al. 2013). Questo trend di accrescimento è stato riscontrato anche in questo studio, sia nelle piante CO che in quelle TE. Infatti è stato ricavato un esponente di scala ($b=0,18$) molto simile a quanto ricavato da altri studi ($b=0,2$) (West et al. 1999; Anfodillo et al. 2006, 2013; Petit et al. 2008, 2010; Bettiati et al., 2012). Questo rafforza l'ipotesi che la selezione favorisce questo design assiale, senza fare differenza tra specie, altezza delle piante e ambiente (Anfodillo et al., 2006; Olson et al., 2014), probabilmente perché rappresenta il miglior compromesso tra efficienza e sicurezza idraulica nello xilema con bassi costi di carbonio (Mencuccini et al., 2007; Kiorapostolou et al., 2020). Infatti l'obiettivo della pianta è quello di cercare di mantenere un sistema sia efficiente che sicuro, e questo tipo di struttura permette entrambe le cose al minor costo di carbonio possibile.

Questa rigida architettura assiale rappresenta un'ottimizzazione biofisica per compensare il continuo aumento della resistenza idraulica a causa di un aumento della lunghezza del percorso, data dalla crescita in altezza delle piante (Prendin et al., 2018). I condotti più stretti e, quindi, più resistenti alla cavitazione (Larter et al., 2017) si trovano all'apice del fusto, dove le tensioni dello xilema sono più alte (cioè dove ci sono i più bassi potenziali di acqua) (Venturas et al., 2017). Proseguendo verso la base, i condotti progressivamente più grandi aggiungerebbero un contributo quasi trascurabile alla resistenza idraulica del

percorso totale, garantendo così una buona efficienza (ovvero conduttanza totale) del sistema di trasporto (Petit & Anfodillo, 2009).

Si è anche cercato di capire se ci sono compromessi tra l'efficienza idraulica e la sicurezza idraulica, come approssimato dal *cell wall reinforcement* $(t/b)^2$, perché pareti delle tracheidi spesse e larghe del legno primaticcio richiederebbero un alto costo di carbonio (Prendin et al., 2018). Come previsto, il $(t/b)^2$ diminuisce all'aumentare delle dimensioni del diametro sia per le piante TE che per quelle CO, il che suggerisce una diminuzione della sicurezza idraulica all'aumentare della distanza dall'apice (Prendin et al., 2018). Per quanto riguarda lo spessore della parete (CWT), che conferisce supporto meccanico, abbiamo un aumento all'aumentare della della distanza dall'apice sia per le piante TE che per quelle CO. Questo può essere spiegato dal fatto che gli alberi investono sempre più in strutture laterali man mano che diventano più grandi, il che richiede legno più forte per sostenerli (King, 2011). L'ipotesi è che le piante TE non abbiano abbastanza risorse per produrre pareti più spesse, avendo poche risorse di carbonio, ma non è stato riscontrato alcun cambiamento tra piante CO e TE.

Anche il floema si dovrebbe modificare sviluppando vasi più grandi. Questo viene spiegato dal fatto che la siccità del suolo impone limitazioni al floema a due livelli. Da una parte, a meno che le foglie non osmoregolino per abbassare il loro potenziale idrico, un basso potenziale idrico del suolo riduce la pendenza del potenziale idrico lungo lo xilema (Venturas et al., 2017), influenzando a sua volta la pendenza del gradiente di pressione idrostatica accoppiata lungo il floema (Hölttä et al., 2006, 2009). Dall'altra parte, l'osmoregolazione del floema, per equilibrare il suo stato idrico con il più basso potenziale idrico dello xilema (Savage et al., 2016), aumenterebbe la viscosità della linfa floematica (Mencuccini et al., 2015), con un impatto negativo sulla velocità di trasporto degli zuccheri (in accordo con la legge di Hagen-Poiseuille, cioè che la resistenza idraulica è proporzionale alla viscosità del fluido (Tyree & Ewers, 1991)). Al fine di sostenere il metabolismo della pianta, si suppone un aumento della conduttanza floematica in risposta alla siccità, per contrastare l'effetto di una maggiore viscosità della linfa floematica (Sevanto, 2014; Sevanto et al., 2018). In questo studio abbiamo trovato che il diametro medio delle celle del floema sono aumentati assialmente dall'apice del fusto verso il basso, con un aumento delle celle del diametro significativo ($b=0,25$), sia per le piante TE che per quelle CO. L'architettura del floema è caratterizzata da condotti cibrosi che aumentano progressivamente di diametro dall'apice del fusto verso la base (Petit &

Crivellaro, 2014; Jyske & Hölttä, 2015; Savage et al., 2017; Kiorapostolou & Petit, 2018), in modo che la cima dell'albero risulti essere un "collo di bottiglia" idraulico anche per il sistema di trasporto dello zucchero a distanza (Ryan & Robert, 2017; Savage et al., 2017).

I risultati del capitolo precedente dimostrano che in realtà non troviamo delle grosse differenze tra alberi CO e TE. Infatti, sia per quanto riguarda lo xilema, il floema e l'area fogliare, non troviamo differenze in piante stressate o normali. Nello xilema ci saremmo aspettati un aumento dei diametri, in accordo con l'ipotesi che la risposta delle piante in condizioni di siccità non implica la produzione di condotti più piccoli e sicuri, ma in realtà implica un diametro assoluto del condotto più largo lungo tutto l'asse longitudinale fusto/ramo in condizioni di secco (Petit et al. 2016; Kiorapostolou et al. 2018), questo per permettere una maggiore efficienza nel trasporto idrico, cosa che in condizioni di siccità diventa necessaria, a discapito della sicurezza idraulica. Anche per quanto riguarda il floema ci saremmo aspettati un aumento dei diametri, in accordo con Sevanto et al. (2014,2018), per il quale, al fine di sostenere il metabolismo della pianta, si suppone un aumento della conduttanza floematica in risposta alla siccità, per effetto di una maggiore viscosità della linfa floematica. Infatti, un aumento della viscosità della linfa floematica (Mencuccini et al., 2015), avrebbe un impatto negativo sulla velocità di trasporto degli zuccheri (in accordo con la legge di Hagen-Poiseuille, cioè che la resistenza idraulica è proporzionale alla viscosità del fluido (Tyree & Ewers, 1991).

Ci saremmo aspettati anche una modifica all'area fogliare, in risposta allo stress idrico. Infatti la pianta può dare priorità di assegnazione di biomassa agli aghi rispetto allo xilema in condizioni di siccità, cercando di migliorare l'assimilazione totale per unità di tempo di apertura stomatica, mantenendo condizioni di sicurezza contro il rischio di cavitazione xilematica. Gli alberi dovrebbero richiedere un rapporto biomassa fogliare/area maggiore, per sostenere un determinato costo di manutenzione della respirazione (Anfodillo et al. 2016, Kiorapostolou et al. 2018), che non sia influenzata dall'apertura degli stomi (Kiorapostolou & Petit, 2018) in condizioni di siccità, ma, dai nostri risultati, la biomassa fogliare non si è modificata tra piante CO e TE.

Questi risultati ci potrebbero portare a pensare che la pianta non modifica la propria struttura in caso di siccità. In realtà, però, alla luce di nuove analisi attualmente in corso, sembrerebbe che le strutture anatomiche alla base dell'albero negli stessi individui abbiano ampiezze anulari e diametri dei condotti xilematici minori rispetto a quelle non sotto stress. Da questi risultati possiamo ricavare che, probabilmente, le piante TE sono

all'inizio del loro processo di declino. Si può ipotizzare che forse l'intensità dello stress è stata troppo bassa per avere risultati significativi nel breve periodo, oppure che in soli 6 anni la pianta non ha avuto il tempo di modificare le strutture xilematiche e floematiche, oltre che l'apparato fogliare. Bisogna anche tenere conto che lo xilema è una struttura che la pianta modifica in maniera difficoltosa, infatti il potenziale di acclimatazione della pianta è un'importante caratteristica evolutiva. Questa consente agli alberi di tollerare i cambiamenti dell'ambiente, ma la plasticità ha un costo e potrebbe essere limitata nonostante i benefici (Magnani et al., 2002), infatti, se i cambiamenti dell'ambiente sono vari, ad esempio alternanza di situazioni di siccità con bombe di acqua improvvise, potremmo avere che la pianta si modifica per adattarsi ad un certo tipo di ambiente, ma quando questo cambia, il suo sforzo diventa inutile, con un spreco di carbonio per modificare la propria struttura (DeWitt, Sia & Wilson, 1998). Secondo il quadro idraulico, le siccità non letali dovrebbero promuovere la resilienza alla siccità o la capacità di sopravvivere alla siccità. Questo perché le piante in genere rispondono alla siccità non letale mediante l'acclimatazione dei parametri idraulici chiave, come l'area fogliare (riduzioni), l'area delle radici e dell'alburno (aumenti) e la resistenza alla cavitazione (aumenti), che dovrebbe sostenere gli alberi contro le future siccità (Cinnirella et al., 2002; Holste et al., 2006).

Inoltre è difficile che i diametri dello xilema non seguano il *widening*, struttura che permette alla pianta di avere alta conducibilità a bassi costi, soprattutto in una zona che può essere difficilmente modificabile, date le alte tensioni dello xilema (cioè dove ci sono i più bassi potenziali di acqua) (Venturas et al., 2017). Infatti all'apice vengono favoriti condotti più sicuri, per permettere alla pianta di competere in altezza con gli altri alberi senza rami danneggiati (Prendin et al., 2018), quindi può essere che, in basse condizioni di stress, la pianta non riesca a modificare in modo significativo le proprie caratteristiche anatomiche. Cosa invece che alla base, dove la pianta produce normalmente condotti più larghi per migliorare l'efficienza a discapito della sicurezza, può accadere. Per questo la pianta potrebbe modificare l'anatomia alla base ma di non modificare i diametri all'apice, nella parte iniziale dello stress. Questo sembrerebbe in accordo con la teoria di Maseda & Fernandez (2006), secondo i quali in condizioni di deficit idrico i meccanismi che le piante tendono a manifestare come risposta sono a breve e a lungo termine. Inizialmente infatti, le piante rispondono prevalentemente attraverso la riduzione della capacità di trasporto dell'acqua (Franks et al., 1995; Drew et al., 2009; Gortan et al., 2009), combinata con più o meno forti riduzioni di area e massa fogliare. A lungo termine, come risultato di tali

adeguamenti la K_h per unità di area fogliare può ridursi, rimanere costante o incrementare, con conseguente variazione della risposta a livello fogliare che si differenzia in questi tre casi, rispettivamente comportando una diminuzione, nessuna variazione o aumento della traspirazione. In questo studio vediamo che le nostre piante non hanno una variazione.

Un'ipotesi plausibile quindi è che le nostre piante sono in una fase iniziale di siccità, dove si sta modificando la parte basale rispetto a quella apicale, ma se verranno mantenute le condizioni di siccità, si potranno vedere delle modificazioni anche nella parte apicale, con una modifica di xilema, floema e un aumento dell'apparato fogliare, in risposta alle condizioni di siccità create.

5. Conclusioni

In questo studio sono stati quantificati i tratti anatomici di xilema e floema e le corrispondenti funzioni lungo il fusto di rami presi all'apice della pianta, per identificarne le priorità e *trade-off*. Si è anche misurata la biomassa fogliare, per capire se ci sarà un eventuale aumento dell'area fogliare per sopperire alla chiusura stomatica durante eventi di siccità.

Si evince che i forti vincoli biofisici portano ad un modello assiale di Dh rigido e quindi poco modificabile come risposta a stress ambientali. Inoltre, i risultati indicano che l'architettura idraulica complessiva dell'albero richiede una certa priorità di sicurezza verso l'apice del fusto, mentre l'efficienza idraulica ed il sostegno meccanico acquistano priorità verso la base del fusto.

Da questi risultati possiamo ipotizzare che la modifica xilematica della pianta risulta molto difficile e costosa in termini di C, infatti piante a differenti livelli di siccità non hanno modificato la propria struttura. Grazie ad un'ulteriore analisi sugli stessi individui abbiamo constatato che alla base della pianta lo xilema si modifica, mentre all'apice no. Questo può portare alla conclusione che la pianta, nel periodo iniziale dello stress, preferisce non modificare la parte apicale, che principalmente deve essere più sicura per competere in altezza con altre piante, ma piuttosto inizia il suo processo di modifica nella parte basale, dove il contributo delle cellule xilematiche all'efficienza idraulica complessiva è trascurabile.

La conclusione è che le piante, in risposta a condizioni di siccità, non modificano la propria struttura. Questo può essere spiegato dal fatto che la pianta può non aver consumato tutte le riserve di carbonio, con conseguente ritardo della fase di declino.

Questi risultati saranno un fattore da tenere in considerazione quando i cambiamenti climatici porteranno a condizioni climatiche differenti a quelle abituali, dove le piante potrebbe non rispondere con modifiche plastiche alla propria struttura.

6. Bibliografia

- Adams HD, Zeppel MJ, Anderegg WR, Hartmann H, Landhäusser SM, Tissue DT, ... Anderegg LD (2017) A multi-species synthesis of physiological mechanisms in drought-induced tree mortality. *Nature, Ecology & Evolution* 1: 1285.
- Alder NN, Sperry JS, Pockman WT (1996) Root and stem xylem embolism, stomatal conductance, and leaf turgor in *Acer grandidentatum* populations along a soil moisture gradient. *Oecologia* 105: 293-301.
- Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H, Bachelet D, McDowell N, Vennetier M, Kitzberger T,... Cobb N (2010) A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forest. *Forest, Ecology and Management* 259: 660-684.
- Allison I et al. (2009) *The Copenhagen Diagnosis: Updating the World on the Latest Climate Science*. Elsevier.
- Anfodillo T, Carraro V, Carrer M, Fior C, Rossi S (2006) Convergent tapering of xylem conduits in different woody species. *New Phytologist* 169: 279-290.
- Anfodillo T, Crivellaro A, Petit G (2013) Axial conduit widening in woody species: A still neglected anatomical pattern. *IAWA journal* 352-364.
- Baas P (1982) Systematic, phylogenetic and ecological wood anatomy - history and perspectives. In *New Perspectives in Wood Anatomy*. Ed. P. Bass. Martinus Nijhoff, The Hague 23-58.
- Baas P, Werker E, Fahn A (1983) Some ecological trends in vessel characters. *IAWA Journal* 141-159.
- Bannan MW (1965) The length, tangential diameter and length/width ratio of conifer tracheids. *Canadian Journal of Botany* 43: 967-984.
- Bettiati D, Petit G, Anfodillo T (2012) Testing the equi-resistance principle of the xylem transport system in a small ash tree: empirical support from anatomical analyses. *Tree Physiology* 32: 171-177.
- Bonal D, Burban B, Stahl C, Wagner F, Hérault B (2016) The response of tropical rainforest to drought-lessons from recent research and future prospects. *Annals of Forest Science* 73: 27-44.
- Brodribb TJ, Cochard H (2009) Hydraulic failure defines the recovery and point of death in water-stressed conifers. *Plant Physiology* 149: 575-584.

- Camarero JJ, Gazol A, Sangüesa-Barreda G, Oliva J, Vicente-Serrano SM (2015) To die or not to die: early warnings of tree dieback in response to a severe drought. *Journal of Ecology* 103: 44-57.
- Carlquist S (1977) Ecological factors in wood evolution: a floristic approach. *American Journal of Botany* 64: 887-896.
- Choat B, Brodribb T, Jansen S, Cochard H (2012) Global convergence in the vulnerability of forest to drought. *Nature* 491: 752-755.
- Cinnirella S, Magnani F, Saracino A, Borghetti M (2002) Response of mature *Pinus laricio* plantation to a three-year restriction of water supply: structural and functional acclimation to drought. *Tree Physiology* 22: 21-30.
- Cochard H, Cruiziat P, Tyree MT (1992) Use of positive pressures to establish vulnerability curves: Further support for the air-seeding hypothesis and implications for pressure-volume analysis. *Plant Physiology* 100: 205–209.
- Coomes DA, Jenkins KL, Cole LES (2007) Scaling of tree vascular transport system along gradients of nutrient supply and altitude. *Biology Letters* 3: 86-89.
- Crombie DS, Hipkins MF, Milburn JA (1985) Gas penetration of pit membranes in the xylem of *Rhododendron* as the cause of acoustically detectable sap cavitation. *Australian Journal of Plant Physiology* 12: 445–454.
- DeWitt TJ, Sih A, Wilson DS (1998) Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution* 13:77-81.
- Domec JC, Lachenbruch B, Meinzer FC, Woodruff DR, Warren JM, McCulloh KA (2008) Maximum height in a conifer is associated with conflicting requirements for xylem design. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105: 12069–12074.
- Domec JC, Warren JM, Meinzer FC, Lachenbruch B (2009) Safety factors for xylem failure by implosion and air-seeding within roots, trunks and branches of young and old conifer trees. *IAWA Journal* 30: 100-200.
- Drew DM, Downes GM, O’Grady AP, Read J, Worledge D (2009) High resolution temporal variation in wood properties in irrigated and non-irrigated *Eucalyptus globulus*. *Annals of Forest Science* 66: 406.
- Dunham S, Lachenbruch B, Ganio L (2007) Bayesian analysis of Douglas-fir hydraulic architecture at multiple scales. *Trees* 21: 65–78.
- Evert RF (2006) *Esau’s plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development*, 3rd edn. Wiley-Interscience, Hoboken.

- Franks PJ, Gibson A, Bachelard EP (1995) Xylem permeability and embolism susceptibility in seedlings of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. from two different climatic zones. *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 15-21.
- Gleason SM, Westoby M, Jansen S, Choat B, Hacke U, Pratt RB,... Zanne AE (2016) Weak tradeoff between xylem safety and xylem-specific hydraulic efficiency across the world's woody plant species. *New Phytologist* 209: 123-136.
- Gortan E, Nardini A, Gascò A, Salleo S (2009) The hydraulic conductance of *Fraxinus ornus* leaves is constrained by soil water availability and coordinated with gas exchange rates. *Tree Physiology* 29: 529-539.
- Goisser M, Uwe N, Rötzer T, Paya A, Huber A, Kerner R, Taryn B, Pretzsch H, Pritsch K, Häberle KH, Matyssek R, Grams T (2016) Does belowground interaction with *Fagus sylvatica* increase drought susceptibility of photosynthesis and stem growth in *Picea abies*? *Forest Ecology and Management* 375: 268-278.
- Hacke UG, Sperry JS, Pockman WT, Davis SD, Mcculloh KA (2001). Trends in wood density and structure are linked to prevention of xylem implosion by negative pressure. *Oecologia* 126: 457-461.
- Hacke UG, Sperry JS, Pittermann J (2004) Analysis of circular bordered pit function—II. Gymnosperm tracheids with torus-margo pit membranes. *American Journal of Botany* 91: 386-400.
- Hacke UG, Sperry JS, Wheeler JK, Castro L (2006) Scaling of angiosperm xylem structure with safety and efficiency. *Tree physiology* 26: 689-701.
- Hacke UG, Lachenbruch B, Pittermann J, Mayr S, Domec JC, Schulte PJ (2015) Functional and ecological xylem anatomy. Springer International Publishing Switzerland. Chapter 2 (the hydraulic architecture of conifers) 39-75.
- Hacura J, Gryc V, Vavrčik H, Hozová J, Urban J (2015) The effect of drought on cell wall thickness and radial dimension of tracheids of *Picea abies* (L.) Karst. *Wood Research* 60: 175-188.
- Hera U, Roetzer T, Zimmermann L, Schulz C, Maier H, Weber H, Koelling C (2012) Klima en détail-Neue hochaufgelöste Klimakarten zur klimatischen Regionalisierung Bayerns. *LWF aktuell* 86: 34-37.
- Holste EK, Jerke MJ, Matzner SL (2006) Long-term acclimation of hydraulic properties, xylem conduit size, wall strength and cavitation resistance in *Phaseolus vulgaris* in response to different environmental effects. *Plant, Cell & Environment* 29: 836-843.

- Hölttä T, Vesala T, Sevanto S, Perämäki M, Nikinmaa E (2006) Modeling xylem and phloem water flows in trees according to cohesion theory and Münch hypothesis. *Trees*. 20: 67-78.
- Hölttä T, Mencuccini M, Nikinmaa E (2009) Linking phloem function to structure: analysis with a coupled xylem-phloem transport model. *Journal of Theoretical Biology* 259: 325–337.
- Hoffmann WA, Marchin RM, Abit P, Lau OL (2011) Hydraulic failure and tree dieback are associated with high wood density in a temperate forest under extreme drought. *Global Change Biology* 17: 2731-2742.
- IPCC, 2007: Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, Pachauri, R.K and Reisinger, A. (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 104 pp.
- Jensen KH, Liesche J, Bohr T, Schulz A (2012) Universality of phloem transport in seed plants. *Plant, Cell and Environment* 35: 1065-1076.
- Jyske T, Hölttä T (2015) Comparison of phloem and xylem hydraulic architecture in *Picea abies* stems. *New Phytologist* 205: 102-115.
- King DA (2011) Size-related changes in tree proportions and their potential influence on the course of height growth. In F. C. Meinzer, B. Lachenbruch, & T. E. Dawson (Eds.), *Tree physiology* 165-191. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Kiorapostolou N, Galiano L, von Arx G, Gessler A, Gai P (2018) Structural and anatomical responses of *Pinus sylvestris* and *Tilia platyphyllos* seedlings exposed to water shortage. *Trees* 32: 1211-1218.
- Kiorapostolou N, Petit G (2018) Similarities and differences in the balances between leaf, xylem and phloem structures in *Fraxinus ornus* along an environmental gradient. *Tree Physiology* 39.
- Kiorapostolou N, Camarero J, Carrer M, Sterck F, Brigita B, Sangüesa-Barreda G, Petit G (2020) Scots pine trees react to drought by increasing xylem and phloem conductivities. *Tree Physiology* 40: 774-781.
- Kolb KJ, Sperry JS (1999). Transport constraints on water use by the Great Basin shrub, *Artemisia tridentata*. *Plant, Cell & Environment* 22: 925-935.
- Larter M, Pfautsch S, Domec JC, Trueba S, Nagalingum N, Delzon S (2017) Aridity drove the evolution of extreme embolism resistance and the radiation of conifer genus *Callitris*. *New Phytologist* 215: 97-112.

- Lechthaler S, Turnbull T, Gemini Y, Pirotti F, Anfodillo T, Adams M, Petit G (2018) A standardization method to disentangle environmental information from axial trends of xylem anatomical traits. *Tree Physiology* 39: 495-502.
- Liesche J, Pace MR, Xu Q, Li Y, Chen S (2017) Height-related scaling of phloem anatomy and the evolution of sieve element end wall types in woody plants. *New Phytologist* 6.
- Liesche J, Schulz A (2018) Phloem transport in gymnosperms: a question of pressure and resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 43: 36-42.
- Linton MJ, Sperry JS, Williams DG (1998) Limits to water transport in *Juniperus osteosperma* and *Pinus edulis*: implications for drought tolerance and regulation of transpiration. *Functional Ecology* 12: 906–911.
- Losso A, Beikircher B, Dämon B, Kikuta S, Schimid P, Mayr S (2017) Xylem sap surface tension may be crucial for hydraulic safety. *American Society of Plant Biologist* 175: 1135-1143.
- Magnani F, Grace J, Borghetti M (2002) Adjustment of tree structure in response to the environment under hydraulic constraints. *Functional Ecology* 16: 385-393.
- Maier CA (2001) Stem growth and respiration in loblolly pine plantations differing in soil resource availability. *Tree Physiologist* 21: 1183-1193.
- Mayr S, Schmid P, Laur J, Rosner S, Charra-Vaskou K, Daemon B, Hacke UG (2014) Uptake of water via branches helps timberline conifers refill embolized xylem in late winter. *Plant Physiology* 164: 1731-1740.
- Martínez-Sancho E, Dorado-Liñán I, Hacke UG, Seidel H, Menzel A (2017) Contrasting hydraulic architectures of Scots pine and sessile oak at their southernmost distribution limits. *Frontiers in Plant Science* 8: 598.
- Maseda PH, Fernandez RJ (2006) Stay wet or else: three ways in which plants adjust hydraulically to their environment. *Journal of Experimental Botany* 57: 3963-3977.
- McCulloh KA, Johnson DM, Meinzer FC, Woodruff DR (2014) The dynamic pipeline: hydraulic capacitance and xylem hydraulic safety in four tall conifer species. *Plant, Cell and Environment* 37: 1171–1183.
- McDowell N, Pockman WT, Allen CD, Breshears DD, Cobb N, Kolb T, Plaut J, Sperry J, West A, Williams DG, Yezpe EA (2008) Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytologist* 178: 719-739.

- Meinzer FC, Johnson DM, Lachenbruch B, McCulloh KA, Woodruff DR (2009) Xylem hydraulic safety margins in woody plants: coordination of stomatal control of xylem tension with hydraulic capacitance. *Functional Ecology* 23: 922-930.
- Melcher P, Meinzer F, Yount D, Goldstein G and Zimmermann U (1998) Comparative measurements of xylem pressure in transpiring and non-transpiring leaves by means of the pressure chamber and the xylem pressure probe. *Journal of Experimental Botany*. 49: 1757-1760.
- Mencuccini M, Petit G, Hölttä T, Magnani F (2007) Sanio's law revisited. Size-dependent changes in the xylem architecture of trees. *Ecology letters* 1084-1093.
- Mencuccini M, Minunno F, Salmon Y, Martínez-Vilalta J, Hölttä T (2015) Coordination of physiological traits involved in drought-induced mortality of woody plants. *New Phytologist* 208: 396–409.
- Mokany K, Mcmurtrie R, Atwell B, Keith H (2003) The interaction between the sapwood and foliage of Alpine ash (*Eucalyptus delegatensis*) trees as they grow taller. *Tree physiology* 23: 949-958.
- Myburg AA, Lev-Yadun S, Sederoff RR (2013). Xylem structure and function. eLS 1–9. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Mueller RC, Scudder CM, Porter ME, Trotter RT III, Gehring CA, Whitham TG (2005) Differential tree mortality in response to severe drought: evidence for long-term vegetation shifts. *Journal of Ecology* 93: 1085-1093.
- Olson M, Anfodillo T, Rosell J, Petit G, Crivellaro A, Isnard S, León C, Alvarado-Cardenas L, Castorena M (2014) Universal hydraulics of the flowering plants: Vessel diameter scales with stem length across angiosperm lineages, habits and climates. *Ecology Letters* 17.
- Petit G, Anfodillo T, Carraro V, Grani F, Carrer M (2011) Hydraulic constraints limit height growth in trees at high altitude, *New Phytologist* 189: 241-252.
- Petit G, Anfodillo T (2009) Plant physiology in theory and practice: An analysis of the WBE model for vascular plants. *Journal of Theoretical Biology* 259: 1-4.
- Petit G, Anfodillo T, Pfautsch S (2010) The challenge of tree height in *Eucalyptus regnans*: When xylem tapering overcomes hydraulic resistance. *New Phytologist* 187: 1146-1153.
- Petit G, Mencuccini M, Anfodillo T (2008) Tapering of xylem conduits and hydraulic limitations in sycamore (*Acer pseudoplatanus*) trees. *New Phytologist* 177: 653-664.

- Petit G, Crivellaro A (2014) Comparative axial widening of phloem and xylem conduits in small woody plants. *Trees* 28: 915-921.
- Petit G, Savi T, Consolini M, Anfodillo T, Nardini A (2016) Interplay of growth rate and xylem plasticity for optimal coordination of carbon and hydraulic economies in *Fraxinus ornus* trees. *Tree Physiology* 36: 1310-1319.
- Pfautsch S, Harbusch M, Wesolowski A, Smith R, Macfarlane C, Tjoelker MG, Reich PB, Adams MA (2016) Climate determines vascular traits in the ecologically diverse genus *Eucalyptus*. *Ecology letters* 19.
- Pittermann J, Sperry J (2003) Tracheid diameter is the key trait determining the extent of freezing-induced embolism in conifers. *Tree Physiology* 23: 907–914.
- Pittermann J, Sperry JS, Hacke UG, Wheeler JK, Sikkema EH (2005) Torus-margo pits help conifers compete with angiosperms. *Science* 310: 1924.
- Plavcová L, Hoch G, Morris H, Ghiasi S, Jansen S (2016) The amount of parenchyma and living fibers affects storage of nonstructural carbohydrates in young stems and roots of temperate trees. *American Journal of Botany* 103: 603–612.
- Prendin A, Petit G, Fonti P, Rixen C, Dawes MA, von Arx G (2018) Axial xylem architecture of *Larix decidua* exposed to CO₂ enrichment and soil warming at the tree line. *Functional Ecology* 32:273-287.
- Pretzsch H, Bauerle T, Häberle KH, Matyssek R, Schütze G, Rötzer T (2016) Tree diameter growth after root trenching in a mature mixed stand of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) and European beech (*Fagus sylvatica* (L.)). *Trees* 30.
- Ryan MG, Robert EM (2017) Zero-calorie sugar delivery to roots. *Nature plants* 3: 922.
- Salleo S, Lo Gullo MA, De Paoli D, Zippo M (1996) Xylem recovery from cavitation-induced embolism in young plants of *Laurus nobilis*: a possible mechanism. *New Phytologist* 132: 47- 56.
- Sanio K (1872) Über die Grösse der Holzzellen bei der gemeinen Kiefer (*Pinus silvestris*). *Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik* 8: 401-420.
- Savage JA, Clearwater MJ, Haines DF, Klein T, Mencuccini M, Sevanto S, Turgeon R, Zhang C (2016) Allocation, stress tolerance and carbon transport in plants: how does phloem physiology affect plant ecology? *Plant, Cell and Environment* 39: 709-725.
- Savage JA, Beecher SD, Clerx L, Gersony JT, Knoblauch J, Losada JM, ... Holbrook NM (2017) Maintenance of carbohydrate transport in tall trees. *Nature plants* 3: 965.

- Schäfer C, Rötzer T, Turm EA, Biber P, Kallenbach C, Pretzsch H (2019) Growth and tree water deficit of mixed Norway spruce and European beech at different heights in a tree and under heavy drought. *Forests* 10: 1-20.
- Schuldt B, Leuschner C, Horna V, Moser G, Köhler M, Barus H (2011) Change in hydraulic properties and leaf traits in a tall rainforest tree species subjected to long-term throughfall exclusion in the perhumid tropics. *Biogeosciences* 8: 2179-2194.
- Schulte PJ (2012a) Computational fluid dynamics models of conifer bordered pits show how pit structure affects flow. *New Phytologist* 193: 721-729.
- Schulte PJ (2012b) Vertical and radial profiles in tracheid characteristics along the trunk of Douglas-fir trees with implications for water transport. *Trees* 26: 421-433.
- Schulz A (1992) Living sieve cells of conifers as visualized by confocal, laser-scanning fluorescence microscopy. *Protoplasma* 166: 153-164.
- Shugart HH, Woodward FI (2011) *Global Change and the Terrestrial Biosphere - Achievements and Challenges*. Wiley - Blackwell 1-2, 86-87.
- Smith TM and Smith RL (2013) *Elementi di Ecologia*. Pearson Italia, Milano-Torino 113-115.
- Sevanto S (2014) Phloem transport and drought. *Journal of Experimental Botany* 65: 1751-1759.
- Sevanto S, Ryan M, Turin DL, Derome D, Patera A, Defraeye T, Pangle RE, Hudson PJ, Pockman WT (2018) Is desiccation tolerance and avoidance reflected in xylem and phloem anatomy of two co-existing arid-zone coniferous trees? *Plant, Cell and Environment* 41: 1551-1564.
- Sperry J, Donnelly JR, Tyree M (1988) A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant, Cell and Environment* 11: 35-40.
- Sperry JS, Saliendra NZ, Pockman WT, Cochard H, Cruiziat P, Davis SD, Ewers FW & Tyree MT (1996) New evidence for large negative xylem pressures and their measurement by the pressure chamber method. *Plant, Cell and Environment* 19: 427-436.
- Sperry JS, Adler FR, Campbell GS, Comstock JP (1998) Limitation of plant water use by rhizosphere and xylem conductance: results from a model. *Plant, Cell and Environment* 21: 347-359.
- Sperry JS, Hacke UG, Pittermann J (2006) Size and function in conifer tracheids and angiosperm vessels. *American Journal of Botany* 93: 1490-1500.
- Stephen G Pallardy (2008) *Physiology of Woody Plants*. School of Natural Resource. University of Missouri. Columbia, Missouri 315.

- Taiz L, Zeiger E (2002) Plant Physiology. Sinauer Associates. 44
- Tixier A, Herbette S, Jansen S, Capron M, Tordjeman P, Cochard H, Badel E (2014) Modelling the mechanical behaviour of pit membranes in bordered pits with respect to cavitation resistance in angiosperms. *Annals of Botany* 114: 325-334.
- Tyree MT, Sperry J (1989) Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. *Annual Review of Plant Physiology* 40: 19-36.
- Tyree MT, Ewers FW (1991) The hydraulic architecture of trees and other woody plants. *New Phytologist* 119: 345-360.
- Tyree MT, Davis SD, Cochard H (1994) Biophysical perspectives of xylem evolution—is there a tradeoff of hydraulic efficiency for vulnerability to dysfunction. *IAWA Journal* 15: 335-360.
- Tyree MT (1997) The Cohesion-Tension theory of sap ascent: current controversies. *Journal of Experimental Botany* 48: 1753-1765.
- Tyree MT, Zimmermann MH (2002) Xylem structure and the ascent of sap. Berlin, Germany: Springer.
- Tomasella M, Beikirker B, Häberle KH, Hesse B, Kallenbach C, Matyssek R, Mayr S (2017) Acclimation of branch and leaf hydraulics in adult *Fagus sylvatica* and *Picea abies* in a forest through-fall exclusion experiment. *Tree Physiology* 38: 1-14.
- Venturas M, Sperry J, Hacke U (2017) Plant xylem hydraulics: what we understand, current research and future challenges. *Journal of Integrative Plant Biology* 59.
- Von Arx G, Crivellaro A, Prendin A, Čufar K, Carrer M (2016) Quantitative Wood Anatomy—Practical Guidelines. *Frontiers in Plant Science* 7: 781.
- Von Arx G, Carrer M (2014) ROXAS - A new tool to build centuries-long tracheid-lumen chronologies in conifers. *Dendrochronologia* 32: 290-293.
- Weemstra M, Eilmann B, Sass-Klaassen UG, Sterck FJ (2013) Summer droughts limit tree growth across 10 temperate species on a productive forest site. *Forest Ecology and Management* 306: 142-149.
- Weitz JS, Ogle K, Horn HS (2006) Ontogenetically stable hydraulic design in woody plants. *Functional ecology* 20: 191-199.
- West GB, Brown JH, Enquist BJ (1999) A general model for the origin of allometric scaling laws in biology. *Nature* 400: 664-667.
- Wheeler JK, Sperry JS, Hacke UG, Hoang N (2005) Inter-vessel pitting and cavitation in woody Rosaceae and other vesselless plants: a basis for a safety versus efficiency trade-off in xylem transport. *Plant, Cell and Environment* 28: 800-812.

- Zhang X et al. (2007) Detection of human influence on twentieth-century precipitation trends. *Nature* 448: 461-465.
- Zimmermann MH (1983) *Xylem structure and the ascent of sap*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo 143.