



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE, ALIMENTARI E AGRO-AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN  
PRODUZIONI AGROALIMENTARI E GESTIONE DEGLI  
AGROECOSISTEMI

**Effetti di un singolo pulse di ozono in piante  
di leccio sottoposte a stress salino:  
metabolismo della prolina e sistemi  
antiossidanti**

RELATORE:

Prof.ssa. Lucia Guidi

CANDIDATO:

Mirko Sodini

CORRELATORE:

Dott. Damiano Remorini

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

## **INDICE**

<b>IL CLIMA MEDITERRANEO E LA MACCHIA MEDITERRANEA</b>	<b>3</b>
<b>GLI STRESS AMBIENTALI</b>	<b>5</b>
<b>LO STRESS SALINO</b>	<b>6</b>
Effetto della salinità sulla crescita	6
Stress idrico e relazioni idriche	7
Effetto della salinità su pigmenti fotosintetici e proteine	7
Anatomia fogliare	8
Effetto sulla composizione degli ioni	9
Effetto sulla fotosintesi	10
<b>RISPOSTE BIOCHIMICHE E MECCANISMI TOLLERANZA</b>	<b>10</b>
Regolazione interna degli ioni	10
Sintesi di soluti compatibili	11
Accumulo di prolina	13
Enzimi antiossidanti	16
Induzione attività ormonale	18
<b>L'OZONO</b>	<b>19</b>
I danni ossidativi e le risposte	19
Effetto dell'ozono sulle foreste e specie forestali	22
Fotosintesi e vie metaboliche	23
Metabolismo secondario	24
<b>SCOPI DELLA TESI</b>	<b>26</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>27</b>
Materiale vegetale e piano sperimentale	27
Potenziale idrico e contenuto di acqua relativo	28
Osmolalità, potenziale osmotico e contributo di ogni ione all'aggiustamento ionico	28
Perossidazione lipidica	28
Metabolismo e contenuto in prolina	29
Antiossidanti	31
Analisi statistica	33
<b>RISULTATI</b>	<b>34</b>
<b>CARATTERIZZAZIONE DELLO STRESS SALINO</b>	<b>34</b>

<b>Potenziali idrico ed osmotico</b>	<b>34</b>
<b>Contenuto degli elementi</b>	<b>34</b>
<b>Contributo osmotico</b>	<b>36</b>
<b>EFFETTO DELL'OZONO SULLE PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS SALINO</b>	<b>36</b>
<b>Perossidazione lipidica</b>	<b>36</b>
<b>Contenuto in prolina</b>	<b>37</b>
<b>Metabolismo della prolina</b>	<b>38</b>
<b>Enzimi antiossidanti</b>	<b>39</b>
<b>Molecole antiossidanti</b>	<b>39</b>
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>42</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>46</b>

## **IL CLIMA MEDITERRANEO E LA MACCHIA MEDITERRANEA**

Nella classificazione climatica di "Koppen-Geiger" il clima mediterraneo è definito dalla sigla CS. Il clima mediterraneo è considerato una transizione tra il clima tropicale e quello temperato, evolutosi tra 5 e 65 milioni di anni fa, durante l'era terziaria, sulla base di un clima caldo-umido (Di Castri e Mooney 1973). Questo clima è caratterizzato da temperature miti, con inverni ed estati secche. Le precipitazioni si concentrano nel semestre freddo dall'autunno alla primavera. Mediamente si registrano precipitazioni inferiori ai 30 mm nel mese più caldo. I periodi siccitosi in questo clima variano molto, si va dai 2 mesi fino ad arrivare a 5 o 6, specialmente in zone di confine con un clima arido (medi-oriente). La scarsità di precipitazioni nel periodo caldo e la opposta concentrazione nei mesi freddi rappresenta una delle maggiori caratterizzazioni di questo clima.

Nella quasi totalità dei climi si presenta la situazione opposta, ovvero la stagione calda concentra in se una maggiore abbondanza di precipitazioni, in virtù di una maggior facilità nel passaggio di stato dell'acqua. Il clima mediterraneo non è presente solamente nelle zone limitrofe all'omonimo mare, ma anche in altri areali bagnati dagli oceani, sia in paesi dell'emisfero australe che boreale: Portogallo, California, Costa meridionale australiana, Costa meridionale del sud Africa e costa centrale cilena. Il clima mediterraneo è quindi compreso tra 30° e 45° di latitudine, in zone limitrofe a mari ed oceani con escursioni termiche giornaliere ed annue modeste (inferiori ai 21 °C). Complessivamente rappresenta un areale equivalente al 1-2% delle terre emerse, concentrate per più del 50 % nel bacino del Mediterraneo.

La vegetazione presente in questi areali è caratterizzata da una larga varietà di piante con una massiccia presenza di strutture arbustive sempreverdi a foglie coriacee (sclerofille). La sclerofilla è un adattamento tipico del clima mediterraneo, caratterizzato dalla presenza di foglie piccole e coriacee con cuticola inspessita che protegge la pianta dai notevoli deficit idrici e nutrizionali caratteristici di questi areali. Questa struttura della foglia garantisce una protezione dagli stress ambientali a discapito di una ridotta crescita, poiché una quota rilevante del carbonio assimilato è destinata alla produzione di metaboliti secondari di protezione. In aggiunta a ciò, la ridotta traspirazione determina come conseguenza diretta una riduzione dell'attività fotosintetica.

La caratteristica struttura del bioma, ricca di sclerofille, ed adattamenti morfologici ad un clima che presenta molteplici stress ambientali, prende il nome di "Macchia" in italiano, di "maquis" in francese, di "mel-lee" in australiano, di "fynbos" in sud africano. La macchia è una formazione molto eterogenea per presenza e varietà di specie, e quindi difficilmente definibile e delimitabile (Bernetti 1997; 1998).

La macchia mediterranea ospita un ecosistema molto ricco di organismi vegetali ed animali. Gli organismi vegetali hanno adattato 2 diverse strategie per resistere all'aridità estiva definibili come: tolleranza e resistenza. La prima consiste in una serie di meccanismi che la pianta attiva per

evitare gli stress, come la caduta delle foglie, la chiusura stomatica e la riduzione dell'apparato vegetativo. La seconda permette invece alla pianta di continuare la propria attività vitale anche in condizioni di stress idrico. Questo è possibile grazie ad una serie di meccanismi contro la disidratazione a carico del protoplasma, che non sono tuttavia ancora stati chiariti.

Alle spalle della macchia mediterranea il bioma italiano autoctono prevede una fascia di vegetazione prevalentemente arborea in cui il leccio (*Quercu ilex* L.) è predominante. La foresta sempreverde costituita da leccio ed uno stato arbustivo di liane, manifesta una scarsa presenza di uno strato erbaceo, causato dalla forte copertura che il leccio impone sul suolo. La lecceta italiana è diffusa prevalentemente sulla costa; tuttavia nel meridione questa si sposta anche in zone più interne. *Q. ilex* è una pianta molto rustica che si adatta bene a molteplici ambienti, compresi quelli urbani, dove è utilizzata da molti anni come pianta ornamentale.

Dopo aver definito, se pur brevemente quelle che sono le caratteristiche del clima mediterraneo e del bioma che in esso prospera, è necessario porre attenzione su quelli che sono i cambiamenti climatici ed antropologici che attualmente ed in futuro sono e saranno presenti nel bacino del Mediterraneo. Sebbene alcuni autori non ritengono preoccupanti i fenomeni di cambiamento climatico su un ecosistema stabile e dalla notevole resistenza come quello del Mediterraneo (Moreno e Oechel 1995), fenomeni antropici sempre più impattanti e, comunque, prolungati negli anni, possono aprire la strada per la progressiva desertificazione se agissero in sinergia con il cambiamento climatico. I principali fattori di indebolimento dell'ecosistema sono principalmente: l'inquinamento marino e l'introduzione di organismi "alieni".

Lo sversamento nei mari ed oceani di sostanze tensioattive, prevenienti dalle zone urbane costiere, comporta ingenti danni soprattutto in un mare semi-chiuso e con circolazione ridotta come quello Mediterraneo. Queste sostanze unite al sale marino danno vita ad agenti corrosivi per la vegetazione costiera. L'introduzione di parassiti non autoctoni come il *Mastococcus feytaudi* (cocciniglia cuticolare del pino marittimo) è un altro fattore di indebolimento per l'ecosistema, che negli anni si è verificato sempre più frequentemente, spinto dal transito crescente di persone e merci a livello globale. A queste avversità si unisce il cambiamento climatico, anch'esso legato alla attività umana, che è già una realtà e che interessa a quasi tutto il globo, incluso il bacino del Mediterraneo.

A tal proposito uno studio del 2005 di Gualdos e Navarra definisce gli scenari futuri per il clima nel contesto Mediterraneo. Queste previsioni si basano su modelli matematici molto accurati, che rappresentano ad oggi il miglior modo di indagare i cambiamenti che governano il clima e per cercare di prevederne il comportamento. Il modello indica che, come conseguenza di un aumento della CO<sub>2</sub> atmosferica, il clima sul nostro pianeta e nel bacino del Mediterraneo, può cambiare in modo sostanziale. Variazioni maggiori si avranno nelle zone settentrionali del Mediterraneo, nelle

stagioni invernali, dove le precipitazioni diminuiranno e le temperature aumenteranno. Le precipitazioni nel bacino del Mediterraneo verranno ridistribuite a livello stagionale, e nel complesso si prevedono aumenti delle precipitazioni medie annue, con una maggior variabilità tra stagioni

Questi modelli indicano che il bioma vegetale nel bacino del Mediterraneo dovrà far fronte a condizioni ancora più proibitive, mettendo alla prova le capacità di resistere a condizioni climatiche avverse. È quindi importante, dal punto di vista scientifico, studiare quelli che sono gli adattamenti da parte di queste piante al clima mediterraneo, quali meccanismi mettono in atto per contrastare situazioni di stress, che erano verosimilmente ad accentuarsi nei prossimi anni.

## **GLI STRESS AMBIENTALI**

Il bioma vegetale dell'areale mediterraneo è quindi soggetto a forti stress ambientali, che ne influenzano i connotati. Verranno in questa sede analizzati due di questi stress, quello salino e quello da ozono. Come vedremo questi due agenti possono essere considerati come fattori di stress di base, provocando poi reazioni molto generiche che coinvolgono molti aspetti degli organismi vegetali. E rappresentano insieme, una larga parte degli stress a cui il bioma mediterraneo incorre. Inoltre negli ultimissimi anni, proprio questi due agenti sono stati fonte di discussione, a causa della frequenza di estati molto torride. L'ozono ad esempio è una minaccia non soltanto per le piante, ma pure per l'uomo, ed è per questo che le preoccupanti soglie registrate nella estate del 2015 hanno ricevuto la attenzione pubblica. La presenza di ozono è infatti molto legata alla radiazione solare ed all'inquinamento atmosferico, due fattori che negli ultimi anni non sono mancati. Per quanto riguarda la salinità, sempre più zone costiere riscontrano un problema di incursione salina nelle falde. Il fenomeno prende il nome di “cuneo salino”, e non è altro che l'interfaccia tra acqua dolce delle falde ed acqua salata del mare. Fenomeni di siccità, o eccessivo prelievo dell'acqua di falda, fa diminuire l'apporto di acqua dolce, con conseguente risalita del cuneo salino. Questo fenomeno può davvero rappresentare un problema e può correre per chilometri nell'entroterra. La risalita estiva del cuneo salino è in realtà una prassi di molte zone costiere, ma negli ultimi anni il fenomeno si è registrato in maniera sempre più accentuata, con ripercussioni anche gravi sulla agricoltura. È infatti in progetto un sistema di paratie nel delta del Po per limitare l'intrusione salina, dopo che negli ultimi anni agricoltura ed ambiente avevano risentito fortemente del problema. La salinità così come l'ozono sono problematiche attuali le quali riguardano sempre più territori italiani e del mondo intero.

## **LO STRESS SALINO**

Lo stress salino è sicuramente tra i maggiori ostacoli ambientali per le piante specialmente in regioni a clima arido e semi-arido, dove può creare seri limiti alla produzione agricola (Allakhverdiev 2000, Koca et al.. 2007). La salinità dell'acqua o del suolo, è dovuta ad una eccessiva quantità di sale, generalmente cloruro di sodio (NaCl). La presenza di sali è quindi fonte di una serie di risposte e di sintomi che la pianta manifesta, in maniera estremamente aspecifica e variabile tra specie e specie, e tra varietà, tale per cui non si può delineare una risposta o una sintomatologia comune a tutte le piante. L'unico aspetto che può essere fissato come comune a tutte le piante è legato alla origine dello stress. Un eccesso salino provoca infatti una larga gamma di reazioni in funzione di 4 effetti a cui possono essere ricondotte tutte le perturbazioni osservabili:

1. Riduzione del potenziale idrico
2. Scompenso nel bilancio degli ioni
3. Tossicità degli ioni
4. Interazioni dei tre precedenti

In base alla capacità di crescita o meno in ambiente con alte concentrazioni saline, le piante possono essere classificate come “alofite” e “glicofite”. Le prime sono piante dotate di adattamenti morfologici o fisiologici che ne permettono l'insediamento su terreni salini o alcalini. Le piante alofite, al contrario della maggior parte delle piante, possono crescere e compiere il loro ciclo vegetativo a concentrazioni di NaCl dell'ordine dell'1-2%. Le glicofite, al contrario, sono le specie vegetali che mostrano una resistenza bassa o nulla rispetto all'esposizione in terreni ricchi di sali, quali l'NaCl. La presenza di un terreno molto salato, quale ad esempio quello immediatamente vicino alla costa marina, determina nelle glicofite uno stress salino che può essere più o meno grave e, nei casi più estremi, portare alla morte dell'organismo. Molte piante sono glicofite e non possono tollerare elevate concentrazioni di sale (Sairam e Tyagi 2004). La selezione convenzionale ed il breeding, sono state usate per migliorare la tolleranza salina nelle colture agrarie (Ashraf 2002); tuttavia con queste tecniche non è possibile trasferire caratteristiche di tolleranza a piante che non lo sono, con effetti quindi molto limitati (Sairam e Tyagi 2004).

### **Effetto della salinità sulla crescita**

Una risposta immediata ad un eccesso di Sali nel suolo è la riduzione o l'arresto della crescita delle piante. La riduzione di crescita può essere quantificata come indice di superficie fogliare (o LAI, dall'inglese *Leaf Area Index*). È stato osservato che durante uno stress salino sufficientemente

prolungato la superficie fogliare media subisce una diminuzione, e questa diminuzione è direttamente proporzionale alla concentrazione salina somministrata (Wang e Nil 2000). E' stato largamente osservato che in un arco di tempo maggiore, lo stress salino si traduce in un decremento del peso fresco e del peso secco di foglie, radici e fusto (Herneez et al. 1995; Alidinar et al. 1999; Chartzoulakis e Klapaki 2000). All'interno del mondo vegetale, la variabilità tra specie e specie in fatto di condizioni di crescita ottimali in ambienti salini sono enormi. La bibliografia a riguardo, riporta che per *Rhizophora mucronata* Lam. (una mangrovia), le condizioni ottimali di crescita si ottengono con il 50% della salinità dell'acqua di mare (salinità che oscilla tra il 3 ed il 5%) (Aziz e Khan 2002). In un'altra specie, la *Salicornia rubra* Nels. (la salicornia) l'optimum di crescita si ottiene a 200 mM di NaCl (Khan 2001). Secondo uno studio condotto su *Raphanus sativus* L. (il ravanello), la riduzione di crescita è attribuibile per l'80% alla riduzione della superficie fogliare, con conseguente riduzione nell'intercettazione luminosa, e per il restante 20% alla riduzione nella conduttanza stomatica (Marcelis e Van Hooijdonk 1999). Come è già stato detto, la riduzione della superficie fogliare indotta dalla salinità, è accompagnata anche dalla riduzione del peso fresco e secco delle radici. La ridotta crescita radicale è da attribuirsi in parte a quello che accade alla parte aerea, con un LAI minore e stress salino che turba la normale attività, ed in parte alla azione tossica dello ione sodio in alte concentrazioni.

### **Stress idrico e relazioni idriche**

In condizioni di stress salino, il potenziale idrico ed osmotico della pianta decresce. Il potenziale idrico è l'energia per unità di volume necessaria per trasportare l'acqua a temperatura costante da un punto a quello di riferimento. Esso si misura in unità di pressione ed è rappresentato da  $\Psi$ . All'aumentare dei soluti all'interno di una soluzione acquosa, il potenziale si riduce, poiché l'attività dell'acqua diminuisce. Una diminuzione dell'attività si traduce in una minor disponibilità di acqua libera, ovvero di acqua che può essere parte di reazioni biochimiche, ma anche di essere utilizzata nell'equilibrio osmotico. Lo stress idrico che la salinità provoca è proprio legato alla diminuzione di attività per aumento di soluti. Il contenuto relativo di acqua all'interno della pianta, la traspirazione e l'efficienza di uso dell'acqua subiscono una limitazione in condizioni di stress salino. Lo stress idrico determina una serie di risposte a livello metabolico, che verranno in seguito analizzate.

### **Effetto della salinità su pigmenti fotosintetici e proteine**

Durante e a seguito di uno stress salino, il contenuto in clorofille e carotenoidi delle foglie diminuisce. La riduzione del totale dei pigmenti fotosintetizzanti è stato largamente dimostrato in molte specie. Su *Grevillea* è stato osservato, a fronte di una diminuzione di pigmenti fotosintetici,

un aumento significativo di antocianine che non svolgono tuttavia alcun ruolo nel processo di assorbimento della luce per il processo fotosintetico. (Kennedy e De Filippis 1999). Sostanzialmente la maggior parte dei lavori riportano una diminuzione dei pigmenti fotosintetici a seguito dello stress salino.

Diverso è il caso delle proteine, per le quali si evidenziano notevoli variazioni in funzione della specie considerata. Numerosi studi hanno osservato una diminuzione delle proteine totali (Alamgir e Ali 1999; Geallah 1999; Parida et al. 1999; Wang e Nil 2000), e altrettanto numerosi sono quelli che riportano invece un significativo aumento delle proteine solubili (Sigh et al. 1987; Ashraf e Harris 2004). Una possibile visione di questo contrasto tra dati, è data da uno studio di Ashraf e Harris (2004), che evidenziavano un aumento delle proteine in cultivar di orzo, girasole, riso e miglio, caratterizzate da una elevata tolleranza alla salinità. Questo potrebbe indicare una connessione tra tolleranza alla salinità ed accumulo di proteine.

### **Anatomia fogliare**

La struttura fogliare presenta delle alterazioni quando si incorre in uno stress salino prolungato. Oltre alla riduzione del LAI, le foglie possono presentarsi con epidermide e mesofillo inspessito e spazi intercellulari ridotti. Queste modifiche nell'anatomia fogliare sono state riscontrate su cotone, fagiolo e *Atriplex* (Longstreth e Nobel 1979), ma le difformità sono molto differenti tra specie, e non si può delineare un profilo comune. A supporto di ciò, due piante della stessa famiglia (*Solanaceae*), pomodoro e patata, sebbene mostrino entrambe delle modificazioni a livello fogliare, ci sono sostanziali differenze tra esse. Nel pomodoro si riscontra una diminuzione del LAI ed una ridotta densità stomatica (Romero-Area et al. 2001), mentre nella patata le condizioni di stress salino provocano un arrotondamento cellulare, con riduzione degli spazi intercellulari e riduzione del numero di cloroplasti (Bruns e Hecht-Bucholz 1990). Le alterazioni evidenziate a livello cellulare durante uno stress salino sono:

1. Sviluppo vacuolare e parziale rigonfiamento del reticolo endoplasmatico e dei mitocondri;
2. Maggiori frammentazioni vescicolari del vacuolo;
3. Degradazione del citoplasma.

Analisi condotte al microscopio elettronico, mostrano che anche la struttura del cloroplasto, interna ed esterna, presenta notevoli mutamenti. Le strutture tilacoidali si presentano disorganizzate, il numero e le dimensioni dei plastoglobuli incrementa, e il loro contenuto in amido diminuisce (Herneez et al. 1995 e 1999). Foglie di pomodoro trattate con NaCl, hanno mostrato cloroplasti aggregati, con membrane distorte e rugose, al loro interno, mentre i grana ed i tilacoidi erano assenti (Khavarinejad e Mostofi 1998).

## **Effetto sulla composizione degli ioni**

Una acqua salina ha un contenuto di ioni molto superiori ad una soluzione ideale per una pianta; normalmente un acqua salina ha un elevato contenuto di ioni di cui la pianta non ha bisogno, o che necessita in quantità ridotte. Il primo problema che si viene a creare è quindi una competizione di questi ioni (solitamente  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) con altri di cui necessita, come  $\text{K}^+$ , determina nella pianta scompensi e deficit nutrizionali. Se la pianta accettasse tutti gli ioni in modo indistinto, andrebbe facilmente incontro a fenomeni di tossicità per l'eccesso di  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ . Esiste quindi un meccanismo attraverso il quale la pianta opera una selezione e non assorbe tutti gli ioni, ma riesce a livello radicale e poi a a livello cellulare ad assorbirli selettivamente. La selezione non è totale, e parte degli ioni, in misura variabile, vengono assorbiti nell'ambiente cellulare. Un eccesso di  $\text{NaCl}$  nell'acqua di irrigazione provoca un aumento di  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  ed un decremento di  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$  nelle foglie di molte specie vegetali (Khan et al. 1999 e 2000). L'accumulo di ioni risulta molto maggiore nelle foglie rispetto alle radici. La maggior vulnerabilità delle foglie è determinata dal trasporto idrico all'interno della pianta, che può rapidamente trasportare gli ioni verso l'alto con il flusso xilematico, ma molto più lentamente verso il basso attraverso quello floematico. La differente velocità di trasporto crea un accumulo unidirezionale di  $\text{Na}^+$  nelle foglie (Tester e Davenport 2003). Squilibri tra i livelli di  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  provocano disturbi a molti enzimi che utilizzano il potassio come cofattore. Il potassio è, infatti, necessario a molti enzimi (più di 50), molti dei quali coinvolti nella sintesi proteica. La presenza del  $\text{Na}^+$ , che si sostituisce al  $\text{K}^+$  potrebbe essere quindi una possibile causa della diminuzione di proteine durante lo stress salino (Tester e Davenport 2003). La concorrenza con il potassio nell'assorbimento è sicuramente associabile alla riduzione della sintesi delle proteine, mentre l'azione diretta del sodio sugli enzimi, benché probabile, non è ancora stata sufficientemente dimostrata. Un altro enzima che risulta perturbato dallo squilibrio ionico che un eccesso salino provoca, è la nitrato riduttasi (NR). Questo enzima chiave nel metabolismo dell'azoto, catalizza la reazione di trasporto di 2 elettroni dal NADH al nitrato, che quindi verrà organicato negli aminoacidi. L'attività della NR nelle foglie, diminuisce in molte piante sotto stress salino (Abd El Baki et al. 2000; Florestal 2000). La conseguenza è una riduzione dell'azoto in ingresso, che può portare alla carenza di questo macro-elemento fondamentale alla pianta. La diminuzione di attività può esser fatta risalire principalmente alla competizione tra  $\text{Cl}^-$  e  $\text{NO}_3^-$ , e quindi ad una diminuzione di attività per carenza di substrato. È tuttavia possibile che il  $\text{Cl}^-$  agisca anche direttamente sulla attività dell'enzima, ipotesi che è verificata negli ultimi anni da alcuni studi (Smith 1973; Flores et al. 2000).

## **Effetto sulla fotosintesi**

La riduzione del ritmo fotosintetico durante lo stress salino è stato osservato su una ampia varietà di specie. È da segnalare, tuttavia, che molti lavori riportano alcuna variazione sulla fotosintesi se non addirittura di incremento (Kkurban et al. 1998; Rajesh et al. 1998). Nel caso in cui la fotosintesi risulti diminuita dallo stress salino, ciò è ascrivibile a due effetti. Il primo è un effetto a “breve termine” che si manifesta dopo poche ore/giorni dalla somministrazione di NaCl e che comporta un rallentamento dell’assimilazione della CO<sub>2</sub>. Il secondo è un effetto a “lungo termine” che provoca una riduzione di peso fresco e la cessazione di crescita per eccesso di sale nelle foglie in sviluppo (Munns e Termatt 1998). E’ stata anche osservata sperimentalmente una diminuzione della attività del PSII all’aumentare della salinità (Parida et al. 2003).

Le cause della diminuzione del tasso fotosintetico sono molto varie e non riconducibili ad un unico aspetto dello stress salino. Secondo Iyengar e Reddy (1996) queste sono:

1. diminuzione dell’idratazione della membrana cellulare con diminuzione della permeabilità alla CO<sub>2</sub>;
2. tossicità salina;
3. ridotta presenza di CO<sub>2</sub> in conseguenza alla chiusura stomatica;
4. senescenza indotta dalla salinità;
5. cambiamento della attività enzimatica;
6. squilibri nella attività sink-source.

## **RISPOSTE BIOCHIMICHE E MECCANISMI TOLLERANZA**

### **Regolazione interna degli ioni**

Come già visto in precedenza durante uno stress salino lo squilibrio ionico crea grosse difficoltà agli organismi vegetali. Elevate quantità di sali all'interno del citosol, specialmente sali poco utili come NaCl non sono tollerati dalle piante, nemmeno dalle alofite. Questo significa che per riuscire a compiere i normali processi biochimici nelle cellule, anche le piante tolleranti hanno necessità di eliminare gli ioni eccedenti. Le piante hanno così sviluppato un meccanismo di compartimentazione dei sali in tessuti vecchi o nel vacuolo, grazie al quale riescono a proseguire le attività cellulari. Le glicofite stoccano generalmente il sodio in eccesso nei tessuti vecchi, i quali possono essere sacrificati per far proseguire le attività vitali nel resto della pianta (Cheesman 1988). Lo stoccaggio all'interno del vacuolo è possibile grazie ad un enzima trasportatore specifico, l'antiporto Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. Grazie a questo enzima si ha l'accumulo di sodio all'interno del vacuolo e la conseguente diminuzione della concentrazione nel citosol. In condizioni di salinità le piante e specialmente quelle più tolleranti, mantengono, all'interno del citosol, una concentrazione di K<sup>+</sup> elevata e di Na<sup>+</sup>

ridotta. Questo avviene sia con la regolazione delle reazioni che coinvolgono il potassio, sia con il trasporto all'interno del vacuolo del sodio (Zhu et al. 1993). La compartimentazione è utile in caso di stress, e sembra avere un ruolo centrale nella resistenza alla salinità. In realtà questo meccanismo è sempre indispensabile alla pianta, sia in caso di salinità che in condizioni normali (Adams et al. 1992). L'azione dell'antiporto è garantita da un gradiente protonico tra l'interno del vacuolo ed il citosol, che permette lo scambio 1:1 dell' $\text{Na}^+$  con l' $\text{H}^+$ , senza il consumo di energia (l'energia è usata per creare il gradiente, poi la reazione procede spontaneamente con aumento della entropia). Il mantenimento di un gradiente sufficiente allo scambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , è garantito grazie a 2 enzimi: la "H<sup>+</sup>-ATPasi" (ATPasi vacuolare) e la "pirofosfatasi vacuolare", che utilizzano energia sotto forma di ATP per trasferire un protone all'interno del vacuolo contro gradiente. L'azione combinata di questi enzimi è in grado di mantenere l'omeostasi all'interno del citosol. La v-ATPasi, è la pompa trans-membrana dominante, ed ha un ruolo fondamentale nella crescita delle piante anche quando non sono in presenza di stress. Il gradiente creato da questa pompa è usato da tutte le altre pompe trans-membrana per mantenere l'omeostasi dei soluti. Per questo suo ruolo chiave, la sintesi di v-ATPasi è stata studiata in relazione allo stress salino. In particolare, Otoch e Wang (2001) hanno mostrato come lo stress salino induca in *Vigna unguiculata* e *Suaeda salsa* alla espressione di v-ATPasi e, nelle le stesse condizioni, la sintesi di v-PPasi fosse addirittura inibita, chiarendo così il ruolo minore svolto dalla v-PPasi nel mantenimento del gradiente protonico trans-membrana.

Altro meccanismo di regolazione salina è rappresentato dalla secrezione salina. La secrezione salina premette ad una unica struttura cellulare specializzata, che prende il nome di ghiandola salina, di secernere sali in eccesso attraverso le foglie, e mantenere tollerabili concentrazioni cellulari (Hogarth 1999).

### **Sintesi di soluti compatibili**

Durante la condizione di stress la pianta ha necessità di: mantenere il potenziale idrico interno al di sotto di quello del terreno, il turgore cellulare ad un livello accettabile e di mantenere il bilancio ionico interno del vacuolo. Una necessità primaria per le piante è quindi quella di sintetizzare e poi accumulare nel citosol dei metaboliti a basso peso molecolare, che non interferiscano con le attività svolte in esso (Yancey et al. 1982; Ford 1984; Ashihara et al. 1997; Hasegawa et al. 2000; Zhifang e Loescher 2003).

L'accumulo di questi soluti ha come primaria funzione quella di continuare a permettere l'influsso di acqua all'interno della pianta o della cellula, o nei casi più estremi di impedire l'efflusso di acqua dalla cellula, ristabilendo un bilancio osmotico (Hasegawa et al. 2000). Questi soluti possono essere di varia natura. Prerogativa indispensabile è la bassa interferenza con le normali

attività svolte nel citosol, ma come vedremo molti di questi metaboliti possono svolgere anche altre funzioni, e concorrere alla protezione cellulare durante lo stress salino. I principali metaboliti riscontrabili in letteratura, e per i quali molti studi ne confermano l'accumulo sono:

1. carboidrati;
2. amminoacidi (in particolare la prolina) e composti azotati;
3. polialcol;
4. altri composti.

Tra i vari comportamenti osmoprotettivi, nelle glicofite i carboidrati rappresentano circa il 50% (Cram 1976). Carboidrati come il glucosio, il fruttosio, il saccarosio e l'amido, si accumulano in molte piante a seguito di un eccesso salino (Parida et al. 2002). La funzione principale sembra essere quella di bilanciare il potenziale osmotico della cellula, ma il loro accumulo può essere visto come uno stoccaggio di carbonio, o con un effetto di abbattimento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). In *Vicia faba* tuttavia, la salinità provoca invece una diminuzione della quantità totale di zuccheri solubili ed idrolizzabili a conferma della estrema variabilità nella risposta del mondo vegetale allo stress (Gadallah 1999). Anche a livello dei tessuti si possono avere differenze. Il contenuto di amido nell'apparato radicale di riso rimane pressoché invariato, mentre un aumento è registrabile nelle foglie. Un aumento di zuccheri riducenti e non riducenti, in contemporanea ad una diminuzione del contenuto di amido è stata osservata in *Bruguiera parviflora* da Parida et al. (2002) e, nello stesso studio, veniva osservato un aumento di polifenoli totali.

Composti contenenti azoto si accumulano molto frequentemente all'interno delle cellule delle piante sottoposte a stress salino. I più frequenti sono gli amminoacidi, gli imminoacidi, le proteine, le poliammine e i composti con azoto quaternario. Oltre alla funzione osmoprotettrice, questi composti fungono da riserva di azoto, bilanciamento del pH ed è stata proposta negli ultimi anni anche una funzione nell'abbattimento delle ROS (Parida e Das 2004). L'accumulo di questi composti è frequentemente connesso alla tolleranza salina (Mansour 2000).

L'aumento delle proteine come risposta alla salinità è molto controverso. In molte specie vegetali è stata osservata anche una correlazione positiva tra potenziale osmotico fogliare e glicinbetaina. L'aumento è stato documentato in molte specie quali spinacio, orzo, pomodoro, riso, sorgo, carota ed altre (Khan et al. 1998, 1999, 2000; Saneoka et al. 1999; Muthukumarasamy et al. 2000; Wang e Nil 2000). Questo composto possiede un ammonio quaternario, e si localizza principalmente nel cloroplasto, dove gioca un ruolo chiave nell'aggiustamento del potenziale osmotico tra la membrana tilacoidale, mantenendo la membrana integra e la efficienza fotosintetica elevata (Yokoi et al. 2002). In particolare, il mantenimento della efficienza fotosintetica è legata alla protezione del PSII in condizioni di salinità. La betanina sembra inoltre coinvolta nella tolleranza di

alcune piante. La applicazione fogliare di questo composto, è stata in grado di promuovere un miglioramento della tolleranza alla salinità in riso (Lutts 2000) e in pomodoro (Makela et al. 1998).

Una prova nel coinvolgimento degli amminoacidi nella risposta alla salinità, oltre all'accumulo di alcuni di essi rispetto al normale, sta nel mutamento dei rapporti di quantità tra essi. Circa il 50% degli amminoacidi liberi nella pianta di grano è rappresentato da cisteina, metionina e arginina. Dopo trattamento con NaCl gli amminoacidi prevalenti diventano valina, prolina, acido aspartico e isoleucina, inoltre la quantità totale aumenta rispetto al controllo (Elshintinawy e Elshourbagy 2001). La caratteristica peculiare degli amminoacidi che li fa risultare dei buoni osmoliti, giace nella loro natura zwitterionica. Sono, infatti, in grado molto più di altre molecole di preservare il pH del citosol e quindi di alterare il meno possibile il metabolismo enzimatico. Essendo in possesso di due cariche, gli amminoacidi vanno oltre alla semplice neutralità, sono in grado di svolgere un vero e proprio effetto tampone (Verbruggen e Hermans 2008).

I polialcol rappresentano una buona parte della CO<sub>2</sub> assimilata dalla pianta. I polialcol esistono in due forme, ciclici (pinitolo, ecc.) e aciclici (mannitolo, glicerolo, sorbitolo, ecc.), anche se i più comuni sono quelli ciclici. Il loro accumulo nella pianta è in grado di svolgere due funzioni: osmoprotezione e aggiustamento osmotico. La funzione di aggiustamento osmotico è in realtà analoga alle molecole già viste, mentre la funzione di osmoprotezione è invece specifica per questi composti. I polialcol sono in grado di interagire con la membrana e con le sue componenti, in particolare con le proteine, alle quali si legano proteggendole dalle sollecitazioni osmotiche.

### **Accumulo di prolina**

La prolina è un amminoacido particolare, caratterizzato da un basso peso molecolare. Il suo accumulo nei tessuti vegetali in seguito a stress di varia natura è stato largamente dimostrato in molte specie vegetali. È importante ricordare che l'accumulo di prolina non è legato solo allo stress salino o più in generale osmotico, ma ricorre anche a seguito di basse temperature, inquinamento atmosferico, eccesso di radiazione UV, deficienza nutrizionale, mancanza di ossigeno e attacchi patogeni. La variazione osservata durante questi studi è stata fino a 100 volte superiore rispetto al controllo. Il fatto che tra gli studi in letteratura, l'accumulo di prolina in seguito a stress osmotici sia il più frequente è legato semplicemente al fatto che questa situazione è molto ricorrente in agricoltura, ma non è l'unica fonte di accumulo di prolina. In funzione del suo accumulo, la prolina è stata proposta come soluto compatibile da molti anni. Tuttavia se consideriamo che l'accumulo è fortemente variabile tra le specie, e che nonostante la prolina sia a basso PM, non sia la molecola in assoluto più semplice da sintetizzare, si può facilmente dedurre che quello dell'aggiustamento osmotico non è che una parte del meccanismo di reazione legato alla prolina, e che ci debba essere

altro oltre al semplice accumulo come soluto. Innanzitutto, valgono per la prolina le attitudini già elencate in precedenza per gli amminoacidi, ovvero che l'accumulo funge anche da stoccaggio di azoto, e che favorisce il mantenimento del pH. Già da studi del 1989, si era osservata la capacità antiossidante della prolina *in vitro*, attività molto importante, visto la produzione di ROS connessa con la salinità (Cumbes 1989). Quasi 20 anni dopo, nel 2008, studi su un mutante antisenso per il gene *p5cs1*, registrò una minor tolleranza alla salinità, confermò l'attività antiossidante *in vivo* postulata da Cumbers e Smirnoff (Székely 2008).

Negli ultimi anni si è anche discusso sul ruolo della prolina come molecola segnale, o meglio come una parte del segnale per la promozione di un adattamento. Questa ipotesi tuttavia deve ancora essere approfondita (Maggio et al. 2002).

Per quanto riguarda la via biosintetica, esistono 2 differenti precursori per la prolina. La prima via biosintetica ha origine dal glutammato, il quale è convertito in prolina da due successive riduzioni, catalizzate dalla “pirrolina-5-carbossilato sintasi” (P5CS) e successivamente dalla “pirrolina-5-carbossilato riduttasi” (P5CR). La P5CS è in realtà un enzima che catalizza 2 reazioni differenti: una prima reazione di attivazione del glutammato per fosforilazione, e successivamente la riduzione dell'intermedio di reazione, il  $\gamma$ -glutammina fosfato, in glutammato semi-aldeide (GSA). L'altra via biosintetica, vede l'ornitina come precursore. Quest'ultima può essere transaminata a pirrolina-5-carbossilato (P5C) dalla “ornitina- $\delta$ - amminotransferasi (OAT), reazione che ha sede nel mitocondrio. Tra queste due vie, quella principale durante uno stress salino è la via del glutammato, anche se studi condotti su *Arabidopsis* hanno mostrato un contributo da parte della via dell'ornitina (Hu et al. 1992).

Per quanto riguarda la via degradativa, la prolina segue la via inversa della biosintesi, ma gli enzimi coinvolti sono la “prolina deidrogenasi” (PHD) e la “P5C deidrogenasi” (P5CDH). La degradazione della prolina avviene interamente nel mitocondrio, mentre la biosintesi ha collocazione nel citosol e nel cloroplasto (Elthon e Stewart 1981; Raypati et al. 1989; Szoke et al. 1992).

La maggior parte degli studi riguardanti la prolina e la sua via biosintetica nelle piante è stata condotta su *Arabidopsis thaliana*, che a causa del suo breve genoma è in assoluto la pianta più studiata, ed è presa come modello di riferimento per moltissimi studi. L'uso di piante antisenso per alcuni geni, è stato in grado di confermare il ruolo della prolina. Antisenso per P5CS di *Arabidopsis thaliana* erano infatti ipersensibili allo stress osmotico (Nanjo et al. 1999). L'enzima P5CS sembra esser l'enzima chiave della via biosintetica, perché ha un controllo a feed-back dalla trascrizione dei geni associati (Savourè et al. 1995; Yoshiba et al. 1995; Zhang et al. 1995). La P5CR, invece, pur essendo parte della via metabolica, sembra avere un ruolo minore. Il gene che codifica per la P5CR

è unico, tuttavia l'enzima può essere attivo sia nel citosol che nel cloroplasto (Raypati et al. 1989; Szoke et al. 1992; Verbuggen et al. 1993).

I geni che codificano per P5CR e P5CS, presentano una correlazione tra la loro trascrizione ed il livello di prolina in foglie ed altri organi, eccetto le radici. L'apparente discrepanza tra alti livelli di trascritti di P5CR/P5CR e basso livello di prolina, può essere una conferma della traslocazione della prolina via xilema dalle radici alle foglie. Durante lo stress salino tuttavia, soltanto la trascrizione del P5CS è ben correlata con il contenuto in prolina, e non quella della P5CR, confermando il ruolo marginale del secondo enzima (Yoshida 1995; Sauvé 1995).

Recentemente altri 2 geni correlati con la sintesi di prolina sono stati trovati su *Arabidopsis thaliana*. I geni *P5CS1* e *P5CS2* sono entrambi connessi con il metabolismo della prolina, anche se soltanto il gene *P5CS1* è attivato in condizioni di stress salino (Fabro et al. 2004; Szekely 2008).

Il gene *P5CS1* si è scoperto essere indotto anche dall'acido abscissico (ABA) (Strizhov et al. 1997; Savouce et al. 1997; Abhram et al. 2003). Il ruolo dell'ABA nella espressione di prolina e più in generale nello stress salino è stato discusso nel 2006 da Verslues e Bray. Questi autori utilizzavano l'ABA sintetico e piante mutanti, per mostrare la dipendenza dell'accumulo di prolina non solo l'accumulo di ABA, ma anche nella sensibilità rispetto a questo ormone. È stato trovato che il ruolo dell'accumulo della prolina come soluto compatibile è in realtà una visione molto semplicistica, e la stretta associazione con l'ABA e con la migrazione del segnale, pone questo amminoacido in un contesto più complesso, un meccanismo di risposta che coinvolge la pianta, e di cui la prolina fa parte.

Durante uno stress osmotico, la disponibilità di CO<sub>2</sub> atmosferica è limitata a causa della chiusura stomatica. Il conseguente accumulo di NADPH, non utilizzato nel ciclo di Calvin, può portare ad una sovraeccitazione del trasporto elettronico cloroplastico che, a sua volta, induce la produzione di ROS. In questo contesto la capacità dell'enzima P5CS di utilizzare NADPH ossidandolo a NADP<sup>+</sup>, può diminuire la possibilità di formazione delle ROS nel cloroplasto.

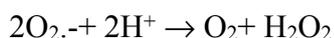
Anche la via dei pentosi fosfati (PPP) che utilizza NADP<sup>+</sup> è inibita dall'eccesso di NADPH e appare ovvio un legame con il metabolismo della prolina legato alla utilizzazione del NADPH. La via PPP è presente nel citosol e nei plastidi, ed entrambi i compartimenti ospitano anche la sintesi di prolina. Phang (1985) propose un interessante modello su come la prolina ed il P5C agissero da modulatori di NADP<sup>+</sup>/NADPH. L'applicazione di tale modello, potrebbe spiegare anche la modulazione tra l'accumulo di prolina ed il livello di NADP<sup>+</sup>/NADPH nei noduli radicali di soia, mantenendo un alto rapporto NADP<sup>+</sup>/NADPH (accumulo di NADP<sup>+</sup>), il quale può promuovere la via PPP (Khol et al. 1988, 1990).

Per dare una idea della controversia in materia, e di quanto ancora vi sia da studiare a

riguardo, basta ricordare che la prolina può essere tossica, e che una applicazione esogena di P5C è in grado di attivare molti geni di risposta a stress ed anche incrementare l'attività della PHD (Hellman et al. 2009).

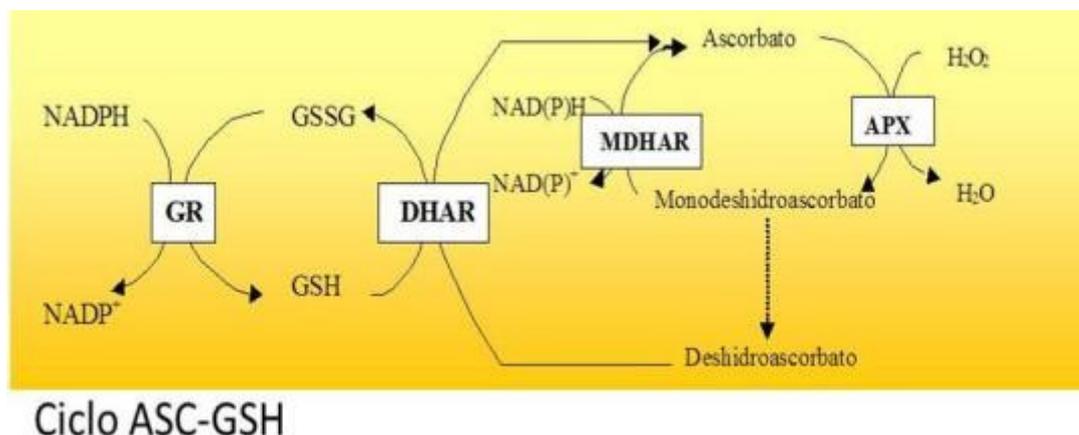
### **Enzimi antiossidanti**

Lo stress osmotico che si verifica con un eccesso di salinità, si lega indissolubilmente alla formazione di ROS. Le cosiddette ROS, sono una classe di composti estremamente reattivi che presentano un elettrone spaiato, e che sono in grado di strappare un elettrone ad altre molecole, ossidandole. Tra i radicali più deleteri e che comunemente si formano nella cellula vi sono l'anione "superossido" ( $O_2^-$ ), il "perossido di idrogeno" ( $H_2O_2$ ), l'ossigeno "singoletto" ( $^1O_2$ ) ed il "radicale idrossile" ( $OH^\cdot$ ). La presenza nella cellula di queste specie, è in grado di determinare danni, attraverso la ossidazione lipidica, proteica e degli acidi nucleici. Il legame tra ROS e stress osmotico è da ricercare nella loro formazione nel cloroplasto. Il potere riducente che proviene dall'acqua e che è utilizzato per sintetizzare le molecole organiche, è in grado di ridurre anche altre molecole se non utilizzato velocemente. Se il ciclo di Calvin rallenta, si possa accumulare potere riducente, sotto forma di NADPH, nel cloroplasto il quale può incorrere in danni ossidativi. Il rallentamento del ciclo può essere dovuto a molteplici fattori ambientali primo fra tutti l'induzione della chiusura degli stomi con conseguente minore assorbimento della  $CO_2$ . Nel caso dello stress osmotico la chiusura stomatica riduce la quantità di  $CO_2$  al livello del cloroplasto, determinando una riduzione della organicazione e quindi dell'utilizzazione di potere riducente. Il potere riducente sotto forma di NADPH si traduce in un aumento delle specie ROS nell'organello, in particolare di: superossido, perossido di idrogeno, ossigeno singoletto e radicale idrossile. È importante ricordare che con l'aumento di potere riducente si ha un "aumento di ROS" perché queste specie si generano comunque nel cloroplasto, anche quando non ci sono condizioni di stress. La formazione di specie radicali nel cloroplasto è, infatti, un processo normale, e la pianta per difendersi possiede antiossidanti sia nel citosol che nel cloroplasto ed in altri organelli. In particolare gli enzimi antiossidanti hanno un ruolo molto importante dell'abbattimento dei radicali. La SOD, superossido dismutasi, catalizza la seguente reazione di dismutazione:



ovvero la conversione di un ossidante estremamente reattivo come il superossido in uno meno aggressivo e disattivabile da altri antiossidanti. La catalasi, promuove la riduzione ad  $H_2O$ . La catalasi, tuttavia non è presente nel cloroplasto, e quindi il  $H_2O_2$  viene detossificato in una serie di

reazioni note come il ciclo di Halliwell-Asada, in cui sono coinvolti diversi enzimi e molecole antiossidanti (**Figura 1**) (Chen e Asada 1989).



**Figura 1.** Rappresentazione del ciclo di Halliwell-Asada coinvolto nel cloroplasto nell'abbattimento dell'anione superossido e del perossido di idrogeno. GR: glutatione riduttasi; DHAR: deidroascorbato riduttasi; MDHAR: monodeidroascorbato riduttasi; APX: ascorbato perossidasi; GSH: glutatione ridotto; GSSG: glutatione ossidato.

Grazie al ciclo Halliwell e Asada, tra l'altro viene anche utilizzato il NADPH per la rigenerazione del glutatione in forma ridotta, contribuendo così all'eliminazione del potere riducente in eccesso.

Quando una pianta è soggetta a stress ambientali come alta intensità di luce, temperature estreme, salinità, deficit idrici e minerali, il bilancio tra produzione di specie radicali e detossificazione da parte degli antiossidanti non è sufficiente ad eliminare le specie radicaliche che si generano. Questo sbilanciamento si traduce in un danno da stress ossidativo (Harper e Harvey 1978; Dhindsa e Matowe 1981; Wise e Naylor 1987; Spychalla e Desborough 1990). La correlazione tra stress salino ed aumento attività degli enzimi antiossidanti è stata ormai osservata in molti studi su una larga varietà di specie vegetali. Piante transgeniche sono state generate negli ultimi anni per provare la che le piante tolleranti erano in grado di abbattere i radicali liberi sotto stress salino. Antisense per i geni associati alla catalasi in tabacco mostravano una ipersensibilità alla salinità ed anche alla luce (Willkens et al. 1997). *A. thaliana* antisense per la ascorbato perossidasi mostra un incremento sensibile della vulnerabilità a stress salino (Conklin et al. 1996). Uno studio molto importante in questo settore è quello di Takemura et al. (2002). Isolando la sequenza codificante per Cu/Zn-SOD citosolitico e della catalasi, veniva analizzato il cambiamento di trascrizione sotto trattamento con NaCl. La trascrizione mostrava un significativo aumento dal primo al quinto giorno, ed una attivazione si registrava anche con la somministrazione di ABA esogeno. Il risultato di questo studio ha suggerito che la superossido dismutasi citosolitica aumenta durante lo stress salino. Dagli studi in merito alla attività degli enzimi antiossidanti presenti in bibliografia, emerge che laddove l'aumento di attività si registri, interessa molto spesso solo alcuni

degli enzimi antiossidanti, o comunque si registrano attività disuguali tra gli enzimi. Su cotone al quale era stato somministrato NaCl, ad esempio, l'attività della SOD e delle perossidasi aspecifiche (POD) mostravano un aumento, mentre l'ascorbato perossidasi (APX) e la catalasi (CAT) addirittura una diminuzione (Gosset et al. 1994).

### **Induzione attività ormonale**

Alte concentrazioni saline provocano anche un aumento nel livello ormonale di ABA e citochinine (Thomas et al. 1992; Aldesuquy et al. 1998). L'ABA, in particolare, è il responsabile per l'attivazione dei geni legati alla risposta allo stress salino (de Bruxelles et al. 1996). L'ABA sembra essere coinvolto in molti meccanismi di difesa dallo stress salino. L'ABA si è mostrato, infatti, in grado di alleviare gli effetti inibitori del NaCl sulla attività fotosintetica, crescita e traslocazione degli assimilati (Popova et al. 1995).

Come è ormai noto, l'ABA è in grado di promuovere la chiusura stomatica, alterando il flusso ionico nelle cellule di guardia. La sua azione, coinvolta nella modificazione della espressione di alcuni geni, risulta quindi in una azione molto complessa. È stato addirittura osservato su *Mesembryanthemum crystallinum* la capacità di promuovere il cambiamento dal metabolismo C<sub>3</sub> a quello CAM, sotto condizioni di stress salino (Thomas et al. 1992). Questo cambio di metabolismo permette alla pianta di ridurre la perdita di acqua, aprendo gli stomi soltanto di notte, quando la traspirazione è minore, ed accumulano la CO<sub>2</sub> per fissarla il giorno successivo. Questo meccanismo permette alla pianta di superare la condizione salina. È stato osservato anche una modificazione del metabolismo fotosintetico da C<sub>3</sub> a C<sub>4</sub> in *Atriplex lentiformis* (Zhu e Meinzer 1999) promosso sotto condizioni di stress salino.

In aggiunta, l'ABA è stato osservato ridurre la produzione di etilene in foglie sotto stress di *Citrus*, probabilmente grazie al decremento di ioni tossici nelle foglie (GomezCadenans et al. 2002). Questo ormone, è coinvolto nella tolleranza al sale delle piante alofite. Una conferma di questo è data dalla pianta alofita facoltativa *Lophopyrum elongatum*. Questa specie non è fortemente tollerante come altre; tuttavia se l'apporto di sale è graduale e la pianta ha modo di acclimatarsi, è in grado di tollerare alte concentrazioni di NaCl comparate a quelle che è in grado di sopportare a causa di un repentino innalzamento salino (Noamen et al. 2002). L'acclimatazione è regolata dall'ABA, e pretrattando la pianta con l'ormone esogeno, l'acclimatazione risulta più facile, ed anche lo shock di alte concentrazioni è tollerato con più facilità (Noamen et al. 2002). Il rapido acclimatamento mediato dall'ABA è connesso con la rapida attivazione di geni radicali detti *ESI*. Le capacità di risposta mediate dall'ABA sono quindi molto varie, ed il suo coinvolgimento è ormai accertato come riportato dalla letteratura in merito. Purtroppo la scarsa conoscenza della

trasmigrazione del segnale dell'ABA e molto spesso della risposta, non permette di delineare un quadro chiaro, basti pensare che pure la natura del recettore per l'ABA rimane ancora sconosciuta.

## **L'OZONO**

L'ossigeno è l'elemento più abbondante della crosta terrestre, e rappresenta il 23% dell'atmosfera. L'ossigeno è una molecola biatomica stabile, paramagnetica, visti i due elettroni spaiati con spin paralleli, e poco solubile in acqua. L'altra forma allotropica dell'ossigeno è l'ozono, O<sub>3</sub>. L'ozono è un composto termodinamicamente instabile ( $\Delta G_f^\circ=163\text{kJ}$ ) che a condizioni ambientali si presenta come un gas dall'odore pungente, con una solubilità in acqua 10 volte superiore a quella dell'ossigeno. L'ozono è un fortissimo ossidante ed è pertanto estremamente reattivo. L'energia necessaria per la trasformazione di 3 moli di O<sub>2</sub> in 2 moli di O<sub>3</sub> è pari a 285 kJ, e, nell'atmosfera, viene ottenuta alle scariche elettriche generate da fenomeni temporaleschi o dalla radiazione solare a  $\lambda < 300$  nm. Questo processo avviene normalmente nella zona alta dell'atmosfera, a circa 100 km di altitudine, dove le radiazioni solari opportunamente lunghe, dissociano l'ossigeno in due atomi, i quali si riassociano con l'ossigeno biatomico, generando ozono. A circa 20 km di altitudine si forma uno strato dove la concentrazione di ozono è massima (0,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ); questo strato è fondamentale per la vita sulla terra, poiché è in grado di assorbire le radiazioni di corta lunghezza d'onda (fino a 255.3 nm). Questo fenomeno impedisce che all'altezza della crosta terrestre non arrivi una quantità eccessiva di questa lunghezza d'onda, che è fortemente dannosa per tutti gli organismi.

Recenti studi hanno dimostrato come le piante terrestri non fecero la loro comparsa fino a quando nell'atmosfera non vi fu abbastanza ossigeno molecolare da produrre lo schermo protettivo di ozono, indicando che senza uno schermo alla radiazione solare UV, la vita non è possibile sul nostro pianeta. La diminuzione di ozono da questa zona dell'atmosfera, a causa della immissione di ossidi di azoto e cloro-fluoro-carburi nell'atmosfera, rappresenta un rischio reale e molto rilevante per il futuro del nostro pianeta. La radiazione non schermata che arriva nella zona bassa della atmosfera può danneggiare in 2 modi gli organismi viventi, direttamente sui processi vitali degli organismi, oppure generando ozono e stati eccitati dell'ossigeno, i quali sono fortemente ossidanti. L'assottigliamento della barriera di ozono atmosferico non è l'unico fattore in gioco per la formazione di ozono; infatti, negli ultimi anni ha sempre più importanza lo smog foto-chimico. Nelle giornate con forte insolazione ossigeno, radiazione solare, molecole organiche e ossidi di azoto, reagiscono in un complesso processo foto-chimico producendo O<sub>3</sub>.

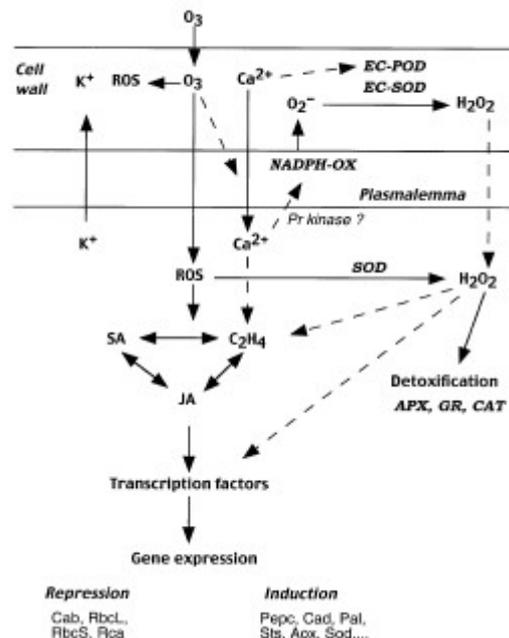
### **I danni ossidativi e le risposte**

Abbiamo detto che l'ozono è presente in grande quantità nell'atmosfera, e che così come i ROS è un

forte ossidante. Tuttavia al contrario della maggior parte dei ROS, l'ozono si trova al di fuori della pianta. Quali sono quindi i danni che l'ozono crea ai vegetali? E soprattutto quale è il suo meccanismo di azione?

L'azione negativa nei confronti delle piante è, come già detto, l'ossidazione. L'ozono entra prevalentemente dalle aperture stomatiche, ed esercita la sua azione negativa quasi esclusivamente al di fuori delle cellule. La parete cellulare e la membrana risultano quindi i primi compartimenti coinvolti nell'ossidazione. In particolare, l'ossidazione dei lipidi e delle proteine di membrana causa gravi danni alla cellula. Sebbene l'ozono non riesca a penetrare con facilità all'interno della cellula, il danno ossidativo vi penetra (Heath et al. 1997; Pell et al. 1997). Questo fatto è capibile attraverso il meccanismo di azione dell'ozono, che sebbene non sia ancora del tutto chiaro, è possibile farsi una idea dalla letteratura in materia.

L'ozono che entra attraverso gli stomi raggiunge l'apoplasto, dove si decompone, generando ROS, in particolare l'anione superossido, il perossido di idrogeno e il radicale idrossilico (Kangasjärvi et al. 1994; Heath et al. 1997) (Fig. 2). Una dismutasi extracellulare (Cu,Zn-SOD) associata con una NADPH ossidasi (NADPH-OX) provvedono all'abbattimento dello ione superossido, con formazione di idroperossido (Steller et al. 1994; Pellinen et al. 1999). I danni ossidativi causati nell'ambiente extracellulare, danneggiano il sistema di trasporto ionico della membrana, con la diretta conseguenza di un aumento dell'afflusso di  $\text{Ca}^+$  (Heath et al. 1997). Una parte delle ROS, in particolare il  $\text{H}_2\text{O}_2$ , riescono ad entrare all'interno. Il fatto che questa molecola sia considerata anche un trasduttore di segnale, fa ipotizzare che il passaggio del perossido possa attivare una serie di segnali a catena portando poi all'espressione genetica, attraverso fattori di trascrizione (Kangasjärvi et al. 1994; Sharma et al. 1997; Sandermann et al. 1998; Overmyer et al. 2000) (Fig. 2).



**Figura 2.** Meccanismo attraverso il quale l'O<sub>3</sub> penetra attraverso gli stomi nell'apoplasto dove genera le ROS ed interazione con le membrane cellulari sino alla trascrizione dei geni.

A livello extracellulare, ed in parte anche intracellulare, le MAPK o “mitogen-activated protein kinase“ giocano un ruolo primario nella regolazione del segnale a cascata coinvolto nella risposta a molti stress. Esse trasmettono il segnale grazie ad una serie di fosforilazioni (Neill et al. 2002). L'attivazione delle MAPK sotto esposizione ad ozono, è stata largamente dimostrata in varie specie tra cui tabacco (Samuel et al. 2000; Gomi et al. 2005), Arabidopsis (Ahlfors et al. 2004) e riso (Agrawal et al. 2002a; Kim et al. 2003). Sebbene l'attivazione di queste chinasi sia stato riscontrato, la trasduzione del segnale specifica rimane non codificato (Taj et al. 2010), e soprattutto il proseguimento del segnale intracellulare.

I meccanismi attraverso i quali il segnale viene trasmesso non sono ancora completamente chiari, ma è ormai appurato il coinvolgimento dell'acido salicilico (SA) e dell'etilene. Il SA è sintetizzato nella via dei fenil-propanoidi, in cui gli altri intermedi sono l'etilene e l'acido jasmonico. È stato trovato un aumento di acido jasmonico e salicilico in conseguenza a fumigazione con O<sub>3</sub>, confermando l'implicazione di questi acidi nella trasduzione del segnale a cascata (Rao et al. 2000). L'ozono si è mostrato un attivatore dei geni per la espressione di etilene ed anche per il recettore (Tosti et al. 2006). Recenti review sul segnale dell'etilene, hanno correlato ormoni vegetali, ROS e segnale a cascata delle MAPK, in un quadro molto complesso nel quale questi 3 agenti, inducono una risposta genica nelle piante (Lin et al. 2009; Santner e Estelle 2010; Merchante et al. 2013)

## **Effetto dell'ozono sulle foreste e specie forestali**

La quantità di ozono a livello del suolo è in costante aumento, attualmente è circa il doppio della concentrazione pre-industriale ed ogni anno aumenta dello 0,5–2% nell'emisfero nord (Vingarzan 2004). Ad oggi i livelli soglia di ozono per la salute umana sono fissati a  $120 \mu\text{g m}^{-3}$  di media per 8 ore al giorno, per non più di 25 giorni all'anno.

L'area del Mediterraneo è particolarmente interessata al problema dell' $\text{O}_3$  in relazione alle condizioni climatiche tipiche di questa area che favoriscono la formazione di questo inquinante. I risultati di una osservazione della trasparenza coronale, mostravano un incremento proporzionale di questa con l' $\text{O}_3$ , con maggiori effetti in *Fagus sylvatica* rispetto a *Quercus ilex* (Klap et al. 2000). Su *F. sylvatica*, una trasparenza coronale elevata è stata riportata anche da Bussotti (2005). La maggior resistenza osservabile dalle piante del Mediterraneo, in particolare dalle sclerofite, rispetto all' $\text{O}_3$ , è legata alla caratteristica della sclerofillia alla base della tolleranza (Stolte 1982; Monk e Murray 1995; Manes et al. 1998; Bussotti e Gerosa 2002; Grulke e Paoletti 2005). Le caratteristiche morfologiche delle sclerofite, permettono uno scambio gassoso limitato, grazie alla chiusura stomatica, all'ispessimento cuticolare e alla riduzione degli spazi intercellulari. In aggiunta a questo, il periodo del giorno in cui gli stomi sono chiusi, ovvero le ore più calde della giornata sono anche le ore di maggior produzione di  $\text{O}_3$ ; quindi, a fronte di una limitazione alla traspirazione e all'ingresso di  $\text{CO}_2$ , abbiamo un limitato assorbimento di  $\text{O}_3$ . Tutto questo, sommato alla coriaccità delle foglie rende più difficile gli stress ossidativi (Paoletti 2005). Tutto ciò potrebbe spiegare la maggior resistenza delle piante del Mediterraneo. Tuttavia il fatto che le stesse specie presentino maggiore resistenza quando presenti nel Mediterraneo rispetto al nord-Europa, ed il riscontro di piante con una elevata conduttanza stomatica che presentano scarsi livelli di stress ossidativo indica che non è solo la conduttanza stomatica che si gioca un ruolo chiave nella sensibilità o tolleranza all'inquinante. Uno studio del 2004 di Nali et al. ha evidenziato una sovrapposizione tra tolleranza alla salinità e tolleranza all' $\text{O}_3$ . Tre specie arboree sono state sottoposte a fumigazione con  $\text{O}_3$  ed i risultati ottenuti hanno evidenziato come il *Laurus nobilis* fosse la specie più sensibile, seguita da *Arbutus unedo* e da *Phyllirea latifolia*. I parametri analizzati erano i livelli di antiossidanti, il tasso di assorbimento di  $\text{O}_3$ , la conducibilità elettrica e il contenuto idrico. La conduttanza stomatica della *P. latifolia* era la più alta, così come il ritmo di assorbimento (dopo 90 giorni); le piante, tuttavia, non mostravano alti valori di stress ossidativo. Le analisi condotte sugli antiossidanti hanno mostrato che la elevata presenza di antiossidanti costitutivi, soprattutto della SOD, e la capacità di attivare questi enzimi quando in presenza di uno stress, è in grado di contribuire fortemente alla tolleranza all' $\text{O}_3$ . Questo meccanismo può essere importante nel sud dell'Europa dove deficienze idriche e alte irradiazioni possono incrementare l'attività dei maggiori antiossidanti, e quindi

contribuire a combattere anche gli stress ossidativi provocati da O<sub>3</sub>.

Tornando alla analisi delle foreste, tutti questi studi sono molto importanti per la messa a punto di soglie limite, al di sopra del quale le piante riscontrano uno stress ossidativo. Tuttavia l'utilizzo di piantine di giovane età può risultare un fattore limitante nella comprensione del fenomeno (Kolb e Matyssek 2003).

Gli studi sulle foreste del Mediterraneo hanno comunque mostrato come le specie di questo areale presentino un elevato adattamento alle condizioni ambientali avverse, ed una elevata tolleranza a stress ossidativi provocati da ozono e ROS associato ad altri stress quali quello idrico, salino nonché elevata alla irradianza (Paoletti 2005).

### **Fotosintesi e vie metaboliche**

È largamente accettato che in presenza di uno stress da O<sub>3</sub> abbastanza prolungato, l'attività respiratoria della pianta aumenti, alterando in questo modo tutte le vie metaboliche connesse (Darral et al. 1989; Dizengremel et al. 1994). È altrettanto accettato che la fotosintesi rallenti significativamente in condizioni di stress da O<sub>3</sub> (Reich et al 1983; Le Thiec et al. 1994; Ryang et al. 2009; Villany et al. 2014; Rashied et al. 2015). La riduzione della fotoassimilazione della CO<sub>2</sub> può essere interpretato come la conseguenza diretta della chiusura stomatica indotta dall'inquinante. È logico pensare che con un elevato quantitativo di O<sub>3</sub> nell'aria, la pianta cerchi di limitarne l'assorbimento chiudendo gli stomi. Tuttavia vari autori hanno riscontrato dei valori di CO<sub>2</sub> intracellulari piuttosto elevati ad indicare che le cause connesse alla riduzione della fotoassimilazione siano da ricercarsi nelle attività metaboliche legate alla fotosintesi. La ribulosio-1,5-*bis*fosfato carbossilasi/ossigenasi (Rubisco) è l'enzima più abbondante sul pianeta e nelle piante, ed è uno degli enzimi chiave del metabolismo fotosintetico poiché responsabile della fissazione di CO<sub>2</sub> in una molecola organica. La quantità e l'attività della Rubisco decrescono in presenza di ozono (Pell et al. 1992 e 1994). La riduzione è più marcata nelle foglie mature rispetto alle foglie giovani (Pell et al. 1994). Un riscontro a riguardo proviene anche dalla analisi dei geni. Questo enzima è costituito da 2 sub-unità: SSU (*small subunits*) e LSU (*large subunits*) ed i geni associati alle 2 sub unità sono rispettivamente: *rbcS* e *rbcL*. Entrambi i geni mostravano un livello di trascrizione ridotto in piante sottoposte ad O<sub>3</sub> rispetto al controllo (Afif et al. 1995; Brendley et al. 1998).

In piante sottoposte ad O<sub>3</sub> era evidente anche un aumento dell'attività della fosfoenolpiruvato carbossilasi (PEPc) (Fontaine et al. 2003), che potrebbe portare alla sintesi di substrati necessari per riparazione dei processi ossidativi causati da O<sub>3</sub> (Dizengremel 2001). Questo rafforza l'idea che vi sia un processo trascrizionale di risposta alla esposizione da O<sub>3</sub>, il quale può

essere una parte dell'adattamento di alcune piante tolleranti agli stress (Fontaine et al. 2003). Non è infatti la sola PEPc ad essere attivata in queste condizioni, anche alcuni enzimi della respirazione, del ciclo di Krebs e della via dei pentosi fosfati, mostravano una attività maggiore. L'enzima chiave della via dei pentosi fosfati è la glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH), la quale mostrava un aumento in relazione alle fumigazioni con O<sub>3</sub> (Dizengremel 2001; Fontaine et al. 2003; Sharma et al. 1997). La attività di G6PDH era più elevata di quella di altri enzimi, in particolare della fosfofruttochinasi glicosolitica (Sehmer et al. 1998). Anche la piruvato chinasi era stimolata dalle fumigazioni con O<sub>3</sub>, sebbene ci siano riscontri contrapposti sul fatto se sia favorita la produzione di malato o di piruvato. Il destino del piruvato è quello principale di entrare nel ciclo di Krebs, mentre il malato deve essere prima decarbossilato a piruvato e quindi seguire lo stesso destino. In letteratura si è riscontrato che del ciclo di Krebs l'attività dell'enzima fumarasi e isocitrato deidrogenasi aumentavano l'attività in risposta a fumigazione con O<sub>3</sub> (Dizengremel 2001; Fontaine et al. 2003; Sharma et al. 1997). Il NADH prodotto da queste reazioni viene quindi riossidato a NAD<sup>+</sup> dalla catena respiratoria, la quale per altro mostra un incremento della proprio attività. Questo complicato equilibrio tra le diverse vie metaboliche, può in realtà essere semplificato considerando la riduzione del processo fotosintetico causato dall'O<sub>3</sub>, che può essere dovuto in parte alla chiusura stomatica ed in parte al rallentamento dell'attività enzimatica, in come è cui come già è stato detto la Rubisco svolge un ruolo fondamentale. Conseguentemente i tessuti vegetali mettono in atto una serie di modifiche nella attività delle vie metaboliche per fornire energia alla pianta, utilizzando vie cataboliche, che garantiscono un apporto di ATP.

### **Metabolismo secondario**

Fumigazioni con O<sub>3</sub> provocano anche l'accumulo di metaboliti secondari. Nella parete cellulare si accumula lignina in varie specie arboree (Langebartels et al. 1997). La lignina è prodotta dalla via dei fenil-propanoidi. Un enzima chiave della via biosintetica, la scichimato deidrogenasi, è risultato più attivo in foglie di alberi di pino scozzese dopo fumigazione con l'inquinante (Luethy-Krause et al. 1990; Lèger et al. 1997). Anche alcune poliammine si sono accumulate in seguito all'esposizione ad O<sub>3</sub>, in particolare la putrescina (Kangasjärvi et al. 1994; Langebartels et al. 1997). Questo composto potrebbe avere un ruolo indiretto nella prevenzione della perossidazione lipidica della membrana, agendo come disattivante dei radicali liberi (Kangasjärvi et al. 1994; Langebartels et al. 1997). Anche l'etilene mostra un aumento significativo dopo l'esposizione ad O<sub>3</sub> (Mehlhorn et al. 1987), la quale potrebbe essere coinvolta nella tras migrazione del segnale a cascata. Poliammine ed etilene possiedono un precursore in comune, la S-adenosilmetionina. Vi è quindi una competizione tra le due vie, che potrebbe essere collegato alla resistenza o meno della pianta all'O<sub>3</sub> (Heath et al.

1997; Langebartels et al. 1997). La competizione è difatti presente tra le due vie, e poliammine ed etilene reprimono reciprocamente la via biosintetica (Kangasjärvi et al. 1994; Schraudner et al. 1996).

## SCOPI DELLA TESI

La presente tesi sperimentale aveva come obiettivo lo studio dell'effetto di un singolo pulse di ozono su piante di *Q. ilex* precedentemente sottoposte a stress salino. Questo evento può verificarsi in ambiente naturale, soprattutto nell'areale Mediterraneo, nel quale, durante l'estate, fenomeni di elevata salinità del suolo possono essere seguiti da eventi in cui la concentrazione dell'O<sub>3</sub> supera i livelli soglia stabiliti per gli organismi vegetali. La scelta del leccio come specie modello deriva dal fatto che questa rappresenta una specie ampiamente diffusa nel Mediterraneo ed anche nelle aree urbane. In aggiunta, il leccio è noto presentare una elevata tolleranza agli stress ambientali, soprattutto stress idrico, ed ozono, e, ad oggi, non vi sono in letteratura molti lavori che riguardano lo studio degli effetti della salinità in piante di leccio.

A questo fine, piante di leccio dell'età di 3 anni venivano sottoposte durante l'estate 2015 ad una irrigazione con un eccesso di NaCl (150 mM) per 15 giorni. Su queste piante venivano valutati alcuni aspetti connessi allo stato idrico delle foglie, al contenuto in ioni Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e K<sup>+</sup>, al metabolismo della prolina ed alla valutazione dei meccanismi antiossidanti enzimatici e non. Un altro esperimento era condotto su piante sottoposte alle medesime condizioni di stress salino al termine del quale le piante venivano esposte per 5 ore ad una fumigazione in condizioni controllate con 80 nL L<sup>-1</sup> di O<sub>3</sub>.

## **MATERIALI E METODI**

### **Materiale vegetale e piano sperimentale**

Piante di *Quercus ilex* (leccio) di tre anni, sono state invasate in vasi da 6,5 L, e cresciute in una mistura standard di “*Einheitserde Topfsubstrat ED 63 grob*” (torba e argilla, 34% carbonio organico, 0.2% azoto organico, pH 3.8-6.8) e sabbia (3.5:1). I vasi sono stati posizionati in campo ed irrigati 2 volte al giorno con una soluzione nutritiva Hoagland. Dopo un mese di irrigazione con soluzione nutritiva, le piante sono state sottoposte a stress salino come di seguito descritto.

Nel primo esperimento il trattamento salino era stato indotto dal 5 al 20 luglio 2015, e le foglie giovani in accrescimento venivano marcate prima dell'inizio del trattamento. Metà delle piante venivano rifornite con concentrazioni crescenti di cloruro di sodio (0, 25, 50 e 100 mM) ad intervalli di 2 giorni. Il trattamento finale alla concentrazione di 150 mM era raggiunto alla fine di un intervallo di 6 giorni. Il trattamento salino è stato proseguito fino a quando l'attività fotosintetica delle foglie delle piante sottoposte a stress non si riduceva del 70% rispetto ai controlli rappresentati da piante mantenute in ottime condizioni. L'esperimento è stato compiuto presso il Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Agro-ambientali dell'Università di Pisa. La PAR (Photosynthetically active radiation) o radiazione fotosinteticamente attiva, determinata a mezzogiorno aveva una media nell'intero periodo sperimentale di 1644  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , la temperatura minima, massima e media era 22.5, 33.6 e 28.1 °C, mentre l'umidità relativa era in media del 67%. Alla fine del periodo di trattamento con NaCl venivano determinati sulle foglie precedentemente marcate i potenziali idrici e venivano prelevati i campioni per le determinazioni biochimiche.

Nel secondo esperimento, che è stato svolto dal 5 al 20 settembre 2015, le condizioni sperimentali erano le stesse seguite in quello precedente. La PAR a mezzogiorno era in media di 1585  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , la temperatura minima massima e media era 17.1, 27.0 e 22.1 °C, mentre l'umidità relativa era del 71%. Quando la fotosintesi diminuiva fino al 70% del controllo, le piante erano quindi sottoposte ad un singolo pulse di O<sub>3</sub>.

Le piante erano trasferite in quattro camere di crescita in condizioni controllate: due box (O<sub>3</sub> e sale+O<sub>3</sub>) venivano sottoposti ad una fumigazione con O<sub>3</sub> (80 nL L<sup>-1</sup> per 5 ore), mentre gli altri due box erano fumigati con aria filtrata (Controllo e sale). L'intera metodologia di esposizione all'ozono è stata messa a punto seguendo il protocollo riportato in Nali et al. (2004). L'O<sub>3</sub> era generato da scariche elettriche usando l'ozonizzatore Fisher 500. La concentrazione ad altezza pianta era costantemente monitorata (Monitor labs, mod.8810, San Diego, CA, USA) collegata ad un computer. Alla fine del processo di fumigazione sono stati raccolti i campioni per le successive analisi biochimiche.

### **Potenziale idrico e contenuto di acqua relativo**

Il potenziale idrico ( $\Psi_{pd}$ ) delle foglie veniva misurato attraverso una camera a pressione (PMS model 600, PMS Instrument Company, Albany, OR, USA). Tutte le misurazioni sono state completate prima dell'alba su sei foglie per la tesi del controllo e per quella del trattamento con il sale. La determinazione del contenuto idrico relativo (RWC) è stato determinato su dischetti fogliari (5 per ogni foglia e 6 foglie per ogni tesi) dei quali veniva determinato il peso fresco. Una volta determinato il peso fresco i dischetti venivano posti in acqua distillata a 4 °C al buio per 24 ore. Alla fine veniva determinato il peso turgido e quindi i dischetti venivano posti in stufa a 60°C per circa 24 ore. Al termine si procedeva alla determinazione del peso secco.

La formula per il calcolo dell'RWC era la seguente:

$$RWC = (\text{peso fresco} - \text{peso secco}) / (\text{peso turgido} - \text{peso secco}) \times 100.$$

Per il calcolo della massa fogliare per unità di volume (LMA, g m<sup>-2</sup>) veniva rapportata l'area dei dischetti al loro peso secco infine, la succulenza veniva calcolata usando la seguente equazione:

$$\text{Succulenza} = (\text{peso fresco} / \text{area dischetto}) \text{ (mg H}_2\text{O cm}^{-2}\text{)}.$$

### **Osmolalità, potenziale osmotico e contributo di ogni ione all'aggiustamento ionico**

Il tessuto vegetale delle foglie marcate all'inizio dell'esperimento veniva polverizzato in un mortaio con N<sub>2</sub> liquido per favorire l'omogeneità del preparato. Dopo aver estratto e filtrato, il campione è stato centrifugato a 2700 g per 10 minuti, ad una temperatura di centrifuga di 4 °C. 10µL di surnatante sono stati utilizzati per la determinazione dell'osmolalità usando un osmometro (Digital Osmometer Roebing, Berlin, Germany). Il potenziale osmotico è stato calcolato usando la formula:

$$\Psi_s(\text{MPa}) = - \text{osmolalità} \times 2,58 \times 10^{-3} \text{ in accordo con l'equazione di Van't Hoff.}$$

Il contenuto relativo di ogni ione al potenziale osmotico è stato stimato come percentuale dell'osmolalità calcolata attraverso il rapporto:

concentrazione dello ione (mmol kg<sup>-1</sup> acqua nel tessuto)/osmolalità (mmol kg<sup>-1</sup> solvente) in accordo con Silveira et al. (2009).

### **Perossidazione lipidica**

Per valutare l'entità dello stress ossidativo sono state condotte indagini finalizzate alla determinazione della perossidazione lipidica, un processo ben noto che danneggia le cellule e che induce l'ossidazione dei lipidi di membrana, producendo lipidi perossidati e aldeidi come la Malondialdeide (MDA) e i 4-idrossialchenali tra cui la più conosciuta 4-idrossi-2(E)-nonenale (4-HNE). La misura di questi due composti fornisce un indice della perossidazione lipidica (Esterbauer 1990).

Il materiale vegetale (500 mg di foglia) veniva omogenato con 5 mL di acido tricloroacetico (TCA) allo 0.6% (volume/volume) contenente acido tiobarbiturico (TBA) al 10% (peso/volume) (Zhang et al. 2008). L'omogenato veniva centrifugato a 10000 g per 10 minuti a 4 °C. Il surnatante era incubato in acqua bollente per 20 minuti. Terminato il tempo di incubazione il surnatante veniva posto in un bagno di ghiaccio fino a completo raffreddamento. Il surnatante era nuovamente sottoposto ad una centrifuga di 10000 g per 10 minuti e quindi allo spettrofotometro veniva letta l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 532 nm (picco massimo di assorbimento del complesso MDA-TBA) e a 600 nm in modo da annullare la presenza di torpidità non specifiche.

### **Metabolismo e contenuto in prolina**

Il contenuto in prolina è stato determinato in accordo con il metodo di Bates et al. (1973) con alcune piccole modificazioni. Il materiale vegetale (0.2 g) è stato omogenizzato in un mortaio con 10 mL di acido sulfosalicilico al 3% in acqua. Dopo centrifugazione con lo scopo di sedimentare il materiale per una filtrazione più veloce, il materiale è stato filtrato con filtri Whatman. A questo punto, a 2 mL di filtrato sono stati aggiunti 2 mL di acido acetico glaciale e 2 mL di acido ninidrinico precedentemente preparato (per 50mL: 1.25g di ninidrina, 20mL di acido fosforico 6M e 30mL di acido acetico glaciale). La soluzione così ottenuta con un volume finale di 6 mL è stata posta a bagnomaria per un'ora a 100 °C, al termine della quale si poneva in un bagno di ghiaccio. Dopo il raffreddamento, 4 mL di toluene sono stati aggiunti alla soluzione, ed il tutto è stato sottoposto ad un vigoroso mescolamento per 20 secondi circa. A questo punto la fase del toluene che si formava è stata estratta, e l'assorbanza letta in cuvette, alla lunghezza d'onda di 520 nm, usando toluene puro come bianco.

La determinazione del contenuto in prolina è stato dedotto da una curva di taratura. La determinazione del contenuto della prolina è possibile mediante la misurazione per via spettrofotometrica del cromoforo formatosi tra l'amminoacido e la ninidrina, e la successiva estrazione in toluene. La ninidrina in eccesso reagisce con gli amminoacidi formando un complesso cromoforo detto "Ruben's Purple", dal caratteristico colore viola, che può essere letto allo spettrofotometro a 570 nm. Il complesso che si forma tra 2 molecole di ninidrina ed una di prolina, è un complesso differente da quello formato dagli altri amminoacidi, a causa della presenza dell'azoto terziario (Mendel Friedman 2004). Il complesso ha quindi un assorbimento preciso a 520 nm.

Il metabolismo della prolina è stato studiato valutando l'attività di due enzimi chiave per la sintesi e la degradazione: la pirrolina-5-carbossilato sintasi (PC5S) e la prolina deidrogenasi (PHD). Per l'estrazione di entrambi gli enzimi è stato seguito il metodo di Wang et al. (2011) con alcune

modifiche. Sono stati omogenizzati 0,2 g di materiale vegetale fogliare con 8 mL di sodio buffer 100 mM (pH 7.4), contenente 1 mM di acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), 10 mM di  $\beta$ -mercaptoetanololo, 1% (peso/volume) di polivinilpirrolidone (PVPP), 5 mM di  $MgCl_2$  e 60 mM di KCl. Dopo centrifugazione a 12000 g per 20 minuti ad una temperatura di 4 °C, il surnatante veniva prelevato e conservato a -20 °C sino al momento delle analisi dell'attività degli enzimi.

L'attività dell'enzima prolina deidrogenasi (PHD) è stata determinata seguendo il metodo riportato da Lutts et al. (1999). Nello specifico, 50  $\mu$ L di estratto sono stati aggiunti a 950  $\mu$ L di  $Na_2CO_3$ -HCl buffer 0.15 M (pH 10.3), a cui sono stati aggiunti 15 mM di L-prolina e 1.5 mM di  $NAD^+$ . La soluzione così preparata direttamente nella cuvetta veniva letta allo spettrofotometro a 340 nm, per 1 o 2 minuti, seguendo la reazione nella quale il  $NAD^+$  veniva ridotto a NADH, secondo la seguente reazione:



L'attività dell'enzima P5CS è stata determinata mediante il metodo di Saibi et al. (2015). L'enzima P5CS catalizza la seguente reazione:

- Acido L-glutammico + ATP + NADPH +  $H^+$   $\rightarrow$  glutammico- $\gamma$ -semialdeide (GSA) +  $NADP^+$  + ADP +  $P_i$

Successivamente il GSA si convertirà ad acido  $\delta$ -pirrolin-5-carbossilico (P5C) in una reazione spontanea. Il metodo si basa sulla lettura dell'assorbanza del complesso cromoforo  $\gamma$ -glutammil-idrossamato, che si forma dopo la reazione. A 900  $\mu$ L di Tris(idrossimetil)amminometano cloridrato (TRIS-HCl) buffer 50mM (pH 7) veniva aggiunti  $MgCl_2$  20 mM, acido L-glutammico 50 mM, idrossilamina 100 mM e ATP 10 mM. Alla miscela si aggiungevano quindi 100  $\mu$ L di estratto, ed il tutto veniva incubato per 15 minuti a 37 °C. Al termine della incubazione la reazione era interrotta mediante la aggiunta di 1 mL di una soluzione contenente 2.5 M di HCl contenente  $FeCl_3$  e acido tricloroacetico (TCA). Le proteine precipitate erano rimosse mediante centrifugazione per 15 minuti a 10000 g a 4 °C. L'assorbanza era determinata quindi ad una lunghezza d'onda di 535 nm rispetto ad un bianco che non conteneva l'ATP. La quantità del complesso  $\gamma$ -glutammil-idrossamato che si produceva durante la reazione era determinato con un coefficiente di estinzione molare pari a 250  $M^{-1}$ , riportato per il complesso Fe-idrossamato.

Entrambe queste attività sono state riportate come attività specifica sul contenuto totale di proteine solubili, determinate per via colorimetrica utilizzando il Protein assay kit II (Bio Rad). Venivano preparati due "bianchi" (0.2 mL di reagente e 0.8 mL di acqua), due "standard" (0.2 mL di reagente, 0.79 mL di acqua e 0.010 mL di standard) e due "campioni" (0.2 mL di reagente, 0.79 mL di acqua e 0.010 mL di estratto). Dopo aver agitato energicamente le cuvette, si lasciava avvenire la reazione per 15 minuti a temperatura ambiente; si passava così alle letture allo spettrofotometro ad

una lunghezza d'onda di 595 nm, azzerando contro il bianco. La concentrazione dei campioni si otteneva grazie al confronto con lo standard, costituito da albumina siero bovino (BSA), a concentrazione nota. A questo scopo veniva costituita una curva di taratura. I dati erano espressi in mg di proteine per ml di estratto

### **Antiossidanti**

Gli enzimi antiossidanti sono stati estratti utilizzando 0.2 g di materiale vegetale, posti in un mortaio ed omogeneizzati con 1 mL di una soluzione contenente potassio-fosfato buffer 66 mM (pH7), EDTA 1 mM, e 0,1% di PVPP. L'estratto è stato centrifugato a 11000 g per 15 minuti a 4 °C. Il surnatante ottenuto è stato usato per il saggio degli enzimi antiossidanti, e per la determinazione delle proteine, attraverso il metodo precedentemente descritto.

L'attività della superossido dismutasi (SOD) è stata determinata seguendo il metodo di Beyer e Fridovich (1987). A 4 volumi diversi di estratto (0, 1, 2 e 5 µL), sono stati aggiunti direttamente in cuvetta da UV: 700 µL di buffer Na-P 66 mM con EDTA 0,1 mM (pH 7.0), 100µL di nitroblu tetrazolio (NBT) 75 µM, 100µL di L-metionina 13 mM e 100 µL di riboflavina 12 µM (aggiunto da ultimo e preparato al buio per evitare l'ossidazione). Per ciascuna delle diverse concentrazioni di estratto preparata sono state eseguite 2 repliche. Una replica è stata posta alla luce per 10 minuti, mentre l'altra era mantenuta al buio per lo stesso periodo di tempo. In presenza dell'ossigeno atmosferico e la radiazione luminosa la riboflavina si decompone generando lo ione superossido, usando come donatore di elettroni la metionina. A questo punto, lo ione superossido può ridurre l'NBT, il quale può essere determinato allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 560 nm. L'attività della SOD veniva determinata indirettamente in quanto la SOD dismutando il superossido impedisce la sua ossidazione da parte dell'NBT, e quindi la determinazione di questo ultimo. Attraverso le diverse concentrazione di estratto è possibile costruire una retta, sulla quale possiamo individuare il 50% della attività massima della SOD.

L'attività dell'ascorbato perossidasi (APX) è stata determinata seguendo il metodo di Lyons et al. (1999). 50 µL di estratto sono stati aggiunti a una soluzione contenente 880 µL di potassio-fosfato buffer 66 mM ed EDTA 0,1 mM (pH 7.0), 40 µL di acido ascorbico 300 µM e 50 µL di perossido di idrogeno 1 mM, per un volume finale di 1000 µL. Allo spettrofotometro veniva quindi determinata la riduzione di assorbanza del perossido di idrogeno a 290 nm. Utilizzando il coefficiente di estinzione molare  $2.8 \text{ mM}^{-1}$  caratteristico del perossido di idrogeno, veniva quindi determinata l'attività della APX. Anche in questo caso è stata determinata l'attività specifica dell'APX e quindi riferita al contenuto totale di proteine solubili.

L'attività della glutatione riduttasi è stata determinata seguendo il metodo di Schaedle e Bassham

(1977). In una cuvetta, 50  $\mu\text{L}$  di estratto vegetale sono stati aggiunti a 850  $\mu\text{L}$  di soluzione contenente potassio.-fosfato buffer 50 mM (pH 7.5), 3 mM di  $\text{MgCl}_2$ , e 0.15 mM di NADPH. Alla fine vengono aggiunti anche 100  $\mu\text{L}$  di GSSG (glutazione ossidato) 10 mM. La reazione su cui si basa il metodo, è quella della riduzione del GSSG a glutazione ridotto (GSH), catalizzata da parte della glutazione riduttasi:



Il bilancio stechiometrico è di una mole di GSSG e NADPH e due moli di GSH. Allo spettrofotometro viene seguita l'assorbanza del NADPH ad una lunghezza d'onda di 340 nm. Per il calcolo dell'attività viene utilizzato il coefficiente di estinzione molare del NADPH.

La determinazione del contenuto in acido ascorbico totale ( $\text{ASA}_t$ ) e della sua forma ridotta (ASA) è stata effettuata seguendo il metodo di Kampfenkel et al. (1995). Questo metodo si basa sulla riduzione del  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  da parte dall'ASA, la quale riduzione può essere seguita in presenza del 2,2, dipiridil con il quale lo ione ferroso forma un complesso colorato. Per il calcolo dell'ascorbato totale, la quota ossidata è stata opportunamente ridotta con ditiotreitolo (DDT), il cui eccesso è eliminato con (N-etil maleimide (NEM) dopo 15 minuti. L'estrazione è stata fatta con 0.1 g di materiale vegetale, omogeneizzato con 1 mL di soluzione contenente TCA, ed il tutto è stato centrifugato per 10 minuti a 15000 g. L'estratto è stato quindi sottoposto a 2 differenti percorsi per la determinazione dell'ASA e dell' $\text{ASA}_t$ . Per la determinazione dell' $\text{ASA}_t$ , 50 $\mu\text{L}$  di estratto sono stati fatti atti reagire con 100  $\mu\text{L}$  di buffer fosfato 0.2M (pH 7.4) e 50  $\mu\text{L}$  di DTT per 15 minuti a 42 °C. Dopodiché sono stati aggiunti 50  $\mu\text{L}$  di NEM 0,5%, 250  $\mu\text{L}$  di soluzione con TCA, 200  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 42%, 200  $\mu\text{L}$  di 2,2 dipiridil al 30% in etanolo e 100  $\mu\text{L}$  di  $\text{FeCl}_3$  3% (peso/volume). La miscela è stata incubata per 40 minuti a 42 °C. Per l'ASA ridotto invece, 50 $\mu\text{L}$  di estratto sono stati aggiunti ad una soluzione contenente 150  $\mu\text{L}$  di buffer fosfato, 50  $\mu\text{L}$  di acqua bi-distillata, 250  $\mu\text{L}$  di soluzione TCA, 200  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 200  $\mu\text{L}$  di soluzione 2,2 dipiridil e 100  $\mu\text{L}$  di soluzione  $\text{FeCl}_3$ , alle stesse concentrazioni utilizzate per il saggio dell' $\text{ASA}_t$ . Anche in questo caso si è proceduto all'incubazione per 40 minuti a 42 °C. al termine dell'incubazione si procedeva alla determinazione dell'assorbanza a 525 nm, picco massimo di assorbimento del complesso  $\text{Fe}^{2+}$ -2,2-dipiridil. Per il calcolo dei metaboliti si faceva riferimento ad una curva di taratura dell'acido ascorbico, precedentemente determinata, che correlava le concentrazioni note di ASA (nel range di 0.05-10  $\mu\text{M}$ ) alle relative assorbanze.

Il glutazione totale ( $\text{GLU}_t$ ), ossidato (GSSG) ed ridotto (GSH) sono stati determinati come descritto da Ryang et al. (2009) con alcune modifiche. L'omogeneizzazione del materiale (0.2 g) è stata eseguita in 5 mL di HCl 0.1 M contenente 0.1% PVPP. L'omogenato veniva quindi centrifugato a 15000 g per 20 minuti a 4 °C. Un'aliquota di surnatante (100  $\mu\text{L}$ ) veniva quindi

aggiunta al buffer di determinazione costituito da fosfato buffer 100 mM, EDTA 5 mM, NADPH 0.2 mM, Acido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico (DTNB) 0.6 mM e 3 unità di glutatione riduttasi. La determinazione era quindi effettuata per via spettrofotometrica ad una lunghezza d'onda di 412 nm, picco massimo di assorbimento del glutatione ossidato. Veniva costruita una curva di taratura con il glutatione ossidato nel range tra 4.5 e 90  $\mu$ M.

### **Analisi statistica**

Tutti i dati vengono espressi come media delle repliche e la deviazione standard. I dati derivanti dall'esperimento in cui le piante erano sottoposte a stress salino sono stati sottoposti al test del *t* di Student per il confronto fra le medie. I dati ottenuti dall'esperimento in cui le piante sottoposte a stress salino venivano quindi esposte ad un singolo pulse di O<sub>3</sub> sono stati sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA) a due vie con il trattamento salino e la fumigazione con O<sub>3</sub> come fonti di variabilità. Le medie sono state quindi confrontate utilizzando la differenza minima significativa.

## RISULTATI

### CARATTERIZZAZIONE DELLO STRESS SALINO

#### Potenziali idrico ed osmotico

Le misure del potenziale idrico delle foglie determinate all'alba ( $\Psi_{pd}$ ) e di quello osmotico ( $\Psi_s$ ) era significativamente diverso nelle piante sottoposte a stress salino rispetto ai controlli ( $P < 0.001$  per entrambi i potenziali) (Tab. 1).

**Tabella 1:** Potenziale idrico ( $\Psi_{pd}$ ) ed osmotico ( $\Psi_s$ ) (MPa) determinati nelle foglie di *Q. ilex* sottoposte a un trattamento con NaCl (Sale; 150 mM per 15 giorni). Le piante di Controllo erano rappresentate da piante non sottoposte al trattamento. I dati sono la media di 6 repliche. Nell'ultima riga viene riportata la significatività della differenza delle medie a seguito del test di Student (\*\*\*:  $P < 0.001$ ).

Trattamento	$\Psi_{pd}$	$\Psi_s$
Controllo	0.91 (0.0164)	1.8 (0.06)
Sale	1.71 (0.192)	3.2 (0.25)
Significatività	***	***

Nel controllo il  $\Psi_{pd}$ , aveva un valore di -0.91 MPa che raggiungeva valori di -1.71 MPa nelle foglie di *Q. ilex* sottoposte a stress salino. Anche il  $\Psi_s$  si riduceva nelle piante sottoposte a stress, passando da valori di -1.8 MPa nel controllo a valori di -3.2 MPa nelle piante in stress (Tab. 1).

Il contenuto idrico relativo (RWC) delle foglie si riduceva significativamente a seguito dello stress, mentre la succulenza aumentava in queste foglie rispetto ai controlli (Tab. 2). La misura della massa fogliare per unità di area (LMA) era statisticamente uguale nei controlli e nelle piante in stress (Tab. 2).

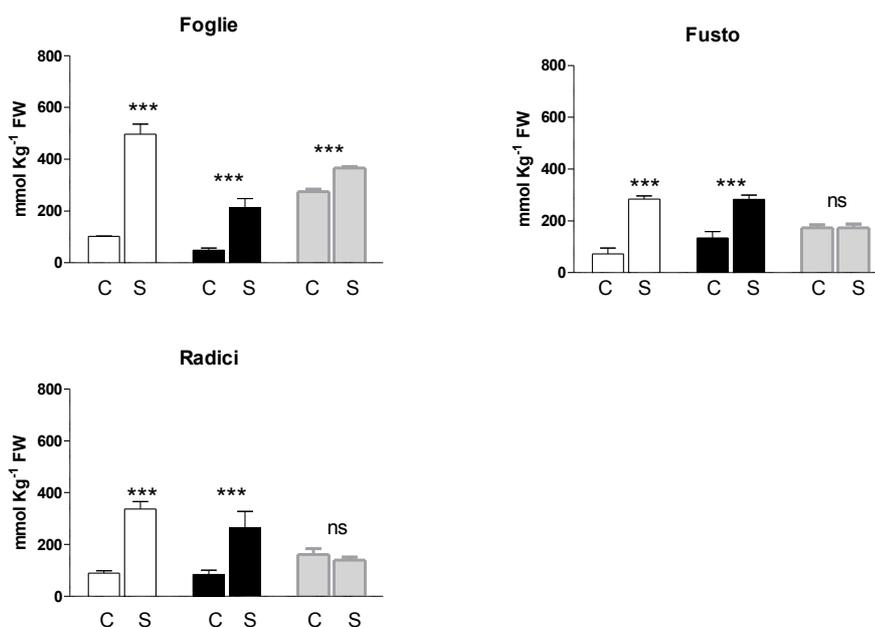
#### Contenuto degli elementi

Le analisi condotte sul contenuto in sodio ( $\text{Na}^+$ ), cloro ( $\text{Cl}^-$ ) e potassio ( $\text{K}^+$ ) dei tessuti vegetali (foglie, fusto e radici) sono riportati nella Figura 1. Nei tessuti fogliari si registrava un aumento statisticamente significativo ( $P < 0.001$ ) di tutti e tre gli ioni a seguito dello stress salino rispetto al controllo. Il livello di  $\text{Na}^+$  nelle foglie delle piante trattate con NaCl risultava inoltre più elevato rispetto ai contenuti ritrovati in radici e fusto. In modo analogo i contenuti di potassio con un aumento significativo nei tessuti fogliare delle piante sotto stress ma nessuna variazione nel fusto e nelle radici (Fig. 1).

**Tabella 2:** Contenuto idrico relativo (RWC; %), massa fogliare per unità di superficie (LMA; g m<sup>-2</sup>) e succulenza fogliare (mg H<sub>2</sub>O cm<sup>-2</sup>) determinati nelle foglie di *Q. ilex* sottoposte a un trattamento con NaCl (Sale; 150 mM per 15 giorni). Le piante di Controllo erano rappresentate da piante non sottoposte al trattamento. I dati sono la media di 6 repliche. Nell'ultima riga viene riportata la significatività della differenza delle medie a seguito del test di Student (ns: P>0.05; \*: P<0.05; \*\*: P<0.01).

Trattamento	RCW	LMA	Succulenza fogliare
Controllo	89 (3.3)	120 (17.6)	11.2 (1.79)
Sale	83 (1.4)	129 (23.9)	14.8 (0.54)
Significatività	**	ns	*

Anche nel fusto, le piante sottoposte a stress salino, mostravano un aumento significativo del contenuto in Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>. Tuttavia il contenuto di potassio presentava valori simili tra controllo e trattato, con una differenza non significativa (P>0.05) (Fig. 1).



**Figura 1:** Contenuto in Na<sup>+</sup> (barra bianca), Cl<sup>-</sup> (barra nera) and K<sup>+</sup> (barra grigia) nei diversi tessuti di *Q. ilex* del controllo (C) e delle piante sottoposte a stress salino (NaCl 150 mM per 15 giorni; S). Ogni valore rappresenta la media di 3 repliche ( ±deviazione standard). La significatività della differenza tra controlli e stressati veniva effettuata mediante il test del T di Student. Ns: P>0.05; \*\*\*: P<0.001.

Le radici mostravano risultati simili a quelli del fusto. Le piante trattate registravano un significativo aumento del contenuto in sodio e cloro, ma la differenza nel contenuto in potassio non risultava significativa, e pertanto statisticamente non valida (P>0.05) (Fig. 1). Dalla Figura 1 è visibile come il contenuto in Cl<sup>-</sup> era molto simile e piuttosto uniforme nei tessuti delle foglie, del fusto e delle radici, sia del controllo che del trattato. Per gli altri 2 ioni invece si

evidenziavano andamenti diversi in relazione al tipo di tessuto. In particolare, nelle foglie del trattato si registra un accumulo maggiore sia di Na<sup>+</sup> che di K<sup>+</sup> (Fig. 1).

### Contributo osmotico

Per comprendere come i singoli ioni contribuiscono al bilanciamento osmotico della cellula, abbiamo determinato il contributo percentuale dei singoli ioni analizzati al potenziale osmotico della foglia. Anche se durante lo stress salino, il contenuto di K<sup>+</sup> aumentava in modo significativo rispetto al controllo, il suo contributo al bilanciamento osmotico non variava significativamente rispetto al controllo (Tab. 3).

**Tabella 3:** Contributo relativo (%) dei soluti inorganici (Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e K<sup>+</sup>) alla osmolalità delle foglie di *Q. ilex* sottoposte a stress salino (Sale: NaCl 150 mM per 15 giorni), e di foglie di controllo (Controllo: senza nessun trattamento salino). I dati sono la media di 3 repliche ( $\pm$ deviazione standard). Nell'ultima riga viene riportata la significatività della differenza delle medie a seguito del test di Student (ns: P>0.05; \*\*: P<0.01; \*\*\*: P<0.001).

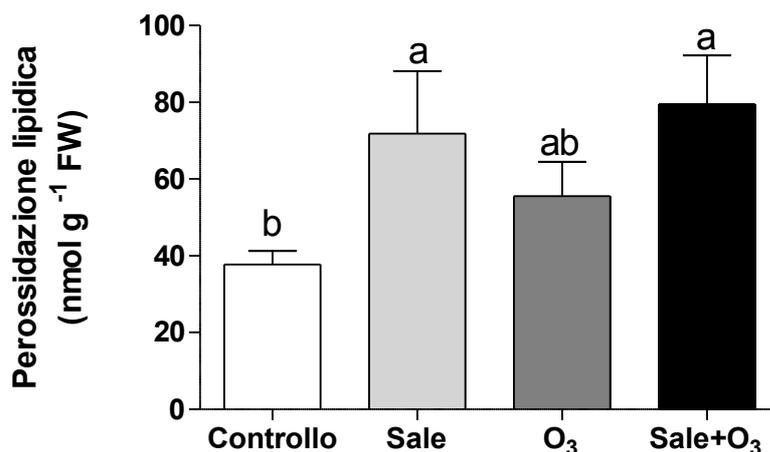
Tattamento	Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	K <sup>+</sup>
Controllo	1.3 (0.21)	4.1 (1.19)	22.1 (1.75)
Sale	32.9 (6.01)	14.2 (4.42)	23.1 (3.2)
P	***	**	ns

Il cloro che pure aumentava nelle piante sotto stress, aumentava anche il contributo osmotico in modo significativo, passando dal 4.1% del controllo al 14.2% del trattato. In modo simile per lo ione sodio: il suo contenuto aumentava molto nelle piante sotto stress, ed anche il contributo al bilanciamento osmotico passava dal 1.3% del controllo al 32.9% del trattato (Tab. 3). Dando uno sguardo complessivo, questi 3 ioni passano da avere un contributo percentuale del 27.5% a circa il 70%, aumento attribuibile quasi esclusivamente dagli ioni Cl<sup>-</sup> e Na<sup>+</sup>.

## EFFETTO DELL'OZONO SULLE PIANTE SOTTOPOSTE A STRESS SALINO

### Perossidazione lipidica

Dal saggio della malondialdeide, che indica il grado di perossidazione lipidica, è emerso in incremento significativo dei valori di MDA in tutti i campioni sottoposti a stress salino (Fig. 2). I trattati Sale e Sale+O<sub>3</sub> mostravano i valori più alti, con una differenza significativa rispetto agli altri valori, ma senza alcuna differenza tra di loro. La fumigazione con O<sub>3</sub> induceva un leggero aumento anche se il valore non era significativamente diverso dal controllo e dai trattati con sale.



**Figura 2.** Stima della perossidazione lipidica mediante il saggio dell'MDA determinate nelle foglie di *Q. ilex* delle piante di controllo, sottoposte a stress salino ((Sale: NaCl 150 mM per 15 giorni), fumigato con ozono (O<sub>3</sub>: piante di controllo sottoposte a 80 nL L<sup>-1</sup> per 5 ore) e stress salino e quindi fumigazione con ozono (Sale + O<sub>3</sub>: condizioni precedenti di sale sottoposte alle stesse condizioni di fumigazioni con O<sub>3</sub>). Le medie rappresentano la media di 5 repliche e la barra la deviazione standard. Lettere diverse rappresentano medie statisticamente diverse a seguito dell'ANOVA a due vie con il trattamento salino e la fumigazione con ozono come fonti di variabilità.

### Contenuto in prolina

Il contenuto in prolina nei tessuti fogliari delle piante di leccio diminuiva significativamente a seguito del trattamento con il sale, con l'O<sub>3</sub> ed anche nelle foglie delle piante sottoposte al trattamento salino e quindi ad O<sub>3</sub> (Tab. 4). Tuttavia non si evidenziavano differenze significative tra le tesi dei trattati.

Se analizziamo questi dati da un altro punto di vista, ovvero facendo le medie tra i trattati con sale e non, ed i trattati con ozono e non (Tab. 4) possiamo evidenziare come in realtà il fattore che maggiormente incideva sul contenuto in prolina era il trattamento salino; infatti, solo per questo fattore si otteneva un differenza significativa che non era invece presente a seguito della fumigazione con O<sub>3</sub> (Tab. 4).

**Tabella 4:** Contenuto in prolina (µg/g FW) nelle foglie di *Q. ilex* sottoposte a: stress salino (Sale: NaCl 150 mM per 15 giorni), fumigazione con ozono (O<sub>3</sub>: piante di controllo sottoposte a 80 nL L<sup>-1</sup> per 5 ore), stress salino sottoposto a fumigazione con ozono (Sale + O<sub>3</sub>: condizioni precedenti di sale sottoposte alle stesse condizioni di fumigazioni con O<sub>3</sub>), e controllo (Controllo: senza nessun trattamento salino e non fumigato con ozono). Ogni valore rappresenta la media di 3 repliche (±deviazione standard). La significatività delle differenze è espressa da lettere differenti a seguito dell'ANOVA a due vie con il trattamento salino e la fumigazione con O<sub>3</sub> come fonti di variabilità. Nell'ultima riga e nell'ultima colonna vengono riportati gli effetti dei singoli fattori con la significatività del singolo fattore.

	Controllo	O <sub>3</sub>	X
--	-----------	----------------	---

Controllo	75.0 (11.2)	48.1 (7.9)	61.55 A
Sale	36.3 (9.6)	50.4 (8.2)	43.35 B
X	55.65 A	49.25 A	

### Metabolismo della prolina

Le analisi del metabolismo della prolina hanno riguardato le attività di due enzimi: la pirrolina-5-carbossilato sintasi (P5CS) e la prolina deidrogenasi (PHD). L'attività della P5CS non variava a seguito dei trattamenti (Tab. 5).

**Tabella 5:** Attività dell'enzima P5CS espresso in  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$  in foglie di *Q. ilex* sottoposte a: stress salino (Sale: NaCl 150 mM per 15 giorni), fumigazione con ozono ( $\text{O}_3$ : piante di controllo sottoposte a 80 nL L<sup>-1</sup> per 5 ore), stress salino sottoposto a fumigazione con ozono (Sale +  $\text{O}_3$ : condizioni precedenti di sale sottoposte alle stesse condizioni di fumigazioni con  $\text{O}_3$ ), e nel controllo (Controllo: senza nessun trattamento salino). Ogni valore rappresenta la media di 3 repliche ( $\pm$ deviazione standard). La significatività delle differenze è espressa da lettere differenti a seguito dell'ANOVA a due vie con il trattamento salino e la fumigazione con  $\text{O}_3$  come fonti di variabilità. Nell'ultima riga e nell'ultima colonna vengono riportati gli effetti dei singoli fattori con la significatività del singolo fattore.

	Controllo	$\text{O}_3$	X
Controllo	2.4 (0.20) a	2.8 (0.59) a	2.6 A
Sale	2.3 (0.53) a	2.0 (0.67) a	2.1 A
X	2.3 A	2.4 A	

L'attività della PHD mostrava invece variazioni significative nelle foglie delle piante trattate rispetto ai controlli (Tab. 6). Il Controllo presentava i valori più bassi di attività, mentre un incremento significativo si evidenziava nelle foglie dei trattati con sale od  $\text{O}_3$  (Tab. 6). Infine le foglie delle piante sottoposte a stress salino e quindi  $\text{O}_3$  mostravano valori più alti dei controlli ma inferiori a quelli registrati per i singoli trattamenti.

**Tabella 6:** Attività dell'enzima PHD espresso in  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{prot min}^{-1}$  di foglie di *Q. ilex* sottoposte a: stress salino (Sale: NaCl 150 mM per 15 giorni), fumigazione con ozono ( $\text{O}_3$ : piante di controllo sottoposte a 80 nL L<sup>-1</sup> per 5 ore), stress salino sottoposto a fumigazione con ozono (Sale +  $\text{O}_3$ : condizioni precedenti di sale sottoposte alle stesse condizioni di fumigazioni con  $\text{O}_3$ ), e nel controllo (Controllo: senza nessun trattamento salino). Ogni valore rappresenta la media di 3 repliche ( $\pm$ deviazione standard). La significatività delle differenze è espressa da lettere differenti a seguito dell'ANOVA a due vie con il trattamento salino e la fumigazione con  $\text{O}_3$  come fonti di variabilità. Nell'ultima riga e nell'ultima colonna vengono riportati gli effetti dei singoli fattori con la significatività del singolo fattore.

	Controllo	$\text{O}_3$	X
Controllo	204.3 (20.15) c	611.3 (133.01) a	407.5 A

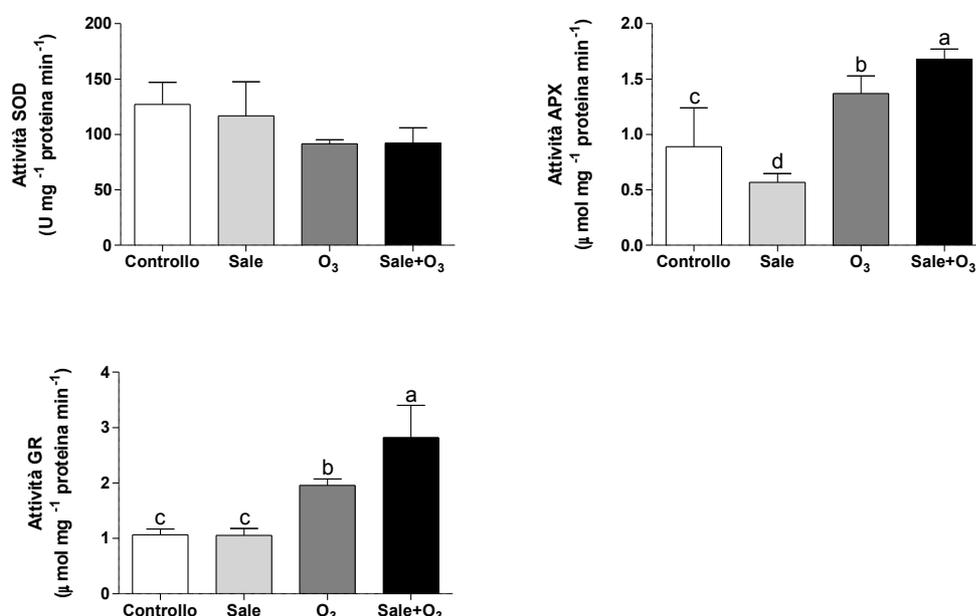
Sale	514.4 (74.99) a	389.6 (95.95) b	452.0 A
X	359.3 B	500.4 A	

### Enzimi antiossidanti

L'attività della SOD non presentava differenze di attività significative nelle diverse tesi (Fig. 3), mentre una riduzione significativa si registrava per l'attività dell'APX nelle foglie delle piante sottoposte a stress salino (Fig. 3). L'attività dell'APX, tuttavia, aumentava significativamente nelle piante fumigate con O<sub>3</sub> ed in quelle sottoposte a stress salino e quindi fumigate con l'inquinante (Fig. 3). Allo stesso modo in queste tesi l'attività della GR aumentava significativamente, senza alcuna variazione di attività nelle foglie delle piante sottoposte a stress salino (Fig. 3).

### Molecole antiossidanti

La quantità di acido ascorbico totale (ASA<sub>T</sub>) nei tessuti fogliari analizzati era sempre significativamente maggiore nei trattati sia con il sale che con l'O<sub>3</sub> rispetto al controllo (Tab. 7). Il trattato con sale aveva un contenuto in ascorbato totale significativamente maggiore rispetto agli altri trattati, seguito da Sale + O<sub>3</sub> e da O<sub>3</sub>.



**Figura 3:** Attività di superossido dismutasi (SOD), ascorbato perossidasi (APX) e glutatione riduttasi in foglie di *Q. ilex* sottoposte a: stress salino (Sale: NaCl 150 mM per 15 giorni), fumigazione con ozono (O<sub>3</sub>: piante di controllo sottoposte a 80 nL L<sup>-1</sup> per 5 ore), stress salino sottoposto a fumigazione con ozono (Sale + O<sub>3</sub>: condizioni precedenti di sale sottoposte alle stesse condizioni di fumigazioni con O<sub>3</sub>), e controllo (Controllo: senza nessun trattamento salino). Ogni valore rappresenta la media di 3 repliche (±deviazione standard). La significatività delle differenze è espressa da lettere differenti a seguito dell'ANOVA a due vie

con il trattamento salino e la fumigazione con O<sub>3</sub> come fonti di variabilità.

**Tabella 7:** Valori di acido ascorbico totale (ASA<sub>t</sub>; µg g<sup>-1</sup> FW) in foglie di *Q. ilex* sottoposte a: stress salino (Sale: NaCl 150 mM per 15 giorni), fumigazione con ozono (O<sub>3</sub>: piante di controllo sottoposte a 80 nL L<sup>-1</sup> per 5 ore), stress salino sottoposto a fumigazione con ozono (Sale + O<sub>3</sub>: condizioni precedenti di sale sottoposte alle stesse condizioni di fumigazioni con O<sub>3</sub>), e nel controllo (Controllo: senza nessun trattamento salino). Ogni valore rappresenta la media di 3 repliche (±deviazione standard). La significatività delle differenze è espressa da lettere differenti a seguito dell'ANOVA a due vie con il trattamento salino e la fumigazione con O<sub>3</sub> come fonti di variabilità. Nell'ultima riga e nell'ultima colonna vengono riportati gli effetti dei singoli fattori con la significatività del singolo fattore.

	Controllo	O <sub>3</sub>	X
Controllo	302.6 (5.71) c	350.7 (14.65) b	326.6 B
Sale	382.9 (44.77) a	366.90 (4.6) ab	374.9 A
X	342.7 A	358.8 A	

Il rapporto tra ascorbato ridotto e ascorbato totale (ASA/ASA<sub>T</sub>) non mostrava differenze significative tra le varie tesi in quanto l'interazione tra i due fattori di variabilità non risultava significativa (Tab. 8). Tuttavia quando considerati singolarmente, il fattore ozono si mostrava significativo ed il rapporto ASA/ASA<sub>t</sub> risultava significativamente più alto nelle piante fumigate con O<sub>3</sub> indipendentemente dal trattamento con NaCl (Tab. 8).

**Tabella 8:** Rapporto tra acido ascorbico ridotto ed acido ascorbico totale (ASA/ASA<sub>t</sub>; %) nelle foglie delle piante di *Q. ilex* sottoposte a: stress salino (Sale: NaCl 150 mM per 15 giorni), fumigazione con ozono (O<sub>3</sub>: piante di controllo sottoposte a 80 nL L<sup>-1</sup> per 5 ore), stress salino sottoposto a fumigazione con ozono (Sale + O<sub>3</sub>: condizioni precedenti di sale sottoposte alle stesse condizioni di fumigazioni con O<sub>3</sub>), e nel controllo (Controllo: senza nessun trattamento salino). Ogni valore rappresenta la media di 3 repliche (±deviazione standard). La significatività delle differenze è espressa da lettere differenti a seguito dell'ANOVA a due vie con il trattamento salino e la fumigazione con O<sub>3</sub> come fonti di variabilità. Nell'ultima riga e nell'ultima colonna vengono riportati gli effetti dei singoli fattori con la significatività del singolo fattore.

	Controllo	O <sub>3</sub>	X
Controllo	78.1 (3.6) A	84.1 (4.29) A	81.1 A
Sale	75.3 (6.21) A	84.2 (4.88) A	79.7 A
X	76.7 B	84.1 A	

Anche per il glutatione totale l'interazione tra i due fattori di variabilità non era risultata significativa (Tab. 9). Tuttavia risultava significativo l'effetto del trattamento salino la cui media (a prescindere dal fattore ozono) risultava significativamente più elevata rispetto alle piante non fumigate (Tab. 9).

**Tabella 9:** Valori di glutatione totale ( $GSH_t$ ;  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW) in foglie di piante di *Q. ilex* sottoposte a: stress salino (Sale: NaCl 150 mM per 15 giorni), fumigazione con ozono ( $O_3$ : piante di controllo sottoposte a  $80 \text{ nL L}^{-1}$  per 5 ore), stress salino sottoposto a fumigazione con ozono (Sale +  $O_3$ : condizioni precedenti di sale sottoposte alle stesse condizioni di fumigazioni con  $O_3$ ), e nel controllo (Controllo: senza nessun trattamento salino). Ogni valore rappresenta la media di 3 repliche ( $\pm$ deviazione standard). La significatività delle differenze è espressa da lettere differenti a seguito dell'ANOVA a due vie con il trattamento salino e la fumigazione con  $O_3$  come fonti di variabilità. Nell'ultima riga e nell'ultima colonna vengono riportati gli effetti dei singoli fattori con la significatività del singolo fattore.

	Controllo	$O_3$	X
Controllo	159.9 (22.38) a	147.6 (6.23) a	153.7 B
Sale	239.3 (37.22) a	221.7 (39.39) a	230.5 A
X	199.6 A	184.6 A	

Il rapporto glutatione ridotto/glutatione totale ( $GSH/GSH_T$ ) non variava a seguito dell'interazione tra trattamento salino ed  $O_3$  (Tab. 10). A differenza del contenuto in glutatione totale, il rapporto  $GSH/GSH_T$  diminuiva significativamente a seguito del trattamento con  $O_3$  mentre nessun effetto era attribuibile al trattamento salino (Tab. 10).

**Tabella 8:** Rapporto tra forma riducente e totale ( $GSH/GSH_t$ ) espressi in percentuale (%), in foglie di piante di *Q. ilex* sottoposte a: stress salino (Sale: NaCl 150 mM per 15 giorni), fumigazione con ozono ( $O_3$ : piante di controllo sottoposte a  $80 \text{ nL L}^{-1}$  per 5 ore), stress salino sottoposto a fumigazione con ozono (Sale +  $O_3$ : condizioni precedenti di sale sottoposte alle stesse condizioni di fumigazioni con  $O_3$ ), e nel controllo (Controllo: senza nessun trattamento salino). Ogni valore rappresenta la media di 3 repliche ( $\pm$ deviazione standard). La significatività delle differenze è espressa da lettere differenti a seguito dell'ANOVA a due vie con il trattamento salino e la fumigazione con  $O_3$  come fonti di variabilità. Nell'ultima riga e nell'ultima colonna vengono riportati gli effetti dei singoli fattori con la significatività del singolo fattore.

	Controllo	$O_3$	X
Controllo	84.2 (5.15) a	63.5 (4.07) a	73.8 A
Sale	90.2 (8.79) a	64.9 (7.73) a	77.5 A
X	87.2 A	64.2 B	

## DISCUSSIONE

Il leccio è una tipica piante dell'areale Mediterraneo caratterizzata da sclerofillia che in condizioni di alterato potenziale idrico del suolo, mostra una riduzione del potenziale idrico fogliare finalizzata ad aumentare la capacità di estrazione di acqua dal suolo (Tomás et al. 2013). Nel primo esperimento durante il quale alle piante di leccio veniva somministrata acqua contenente NaCl (150 mM per 15 giorni) il potenziale osmotico diminuiva significativamente rispetto al controllo ad indicare che le piante erano incorse in uno stress osmotico. La diminuzione del potenziale osmotico ( $\Psi_s$ ) sembra attribuibile ai soluti, considerando che le piante venivano giornalmente irrigate con acqua, se pur contenente 150mM di NaCl. In linea con questi dati, il contenuto idrico relativo delle foglie delle piante sottoposte a stress diminuiva passando dal controllo al trattato, anche se la succulenza aumentava significativamente nelle foglie delle piante sottoposte a stress.

I dati riguardo al contenuto degli ioni sono in linea con quanto riportato in letteratura (Munns 2005; Vera-Estrelle et al. 2005; Sleimi et al. 2015). Gli ioni  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$ , aumentavano significativamente in tutti i tessuti analizzati, e se associato al fatto che il contenuto idrico variava leggermente, l'abilità della pianta di mantenere un turgore potenziale idoneo è probabilmente dovuta all'assorbimento e compartimentalizzazione di questi due ioni (Breš et al. 2015). L'accumulo di ioni sodio e cloro nella pianta è, in molti casi, caratteristica comune alla tolleranza nei confronti di stress salino (Sleimi et al. 2015). È stato, infatti, riportato che le piante che non sono in grado di compartimentalizzare gli ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , sono genericamente più sensibili agli stress salini rispetto a piante con elevate quantità sodio nel citosol (Zid e Grignon 1986; Munns 2005).

L'elevato contenuto di ioni sodio e potassio nelle foglie ed il basso contenuto nelle radici è stato ritrovato da altri autori (Khan et al. 1999 e 2000). L'accumulo di  $\text{Na}^+$  nelle foglie è attribuibile alla facilità di diffusione del sodio nelle foglie. Il flusso floematico è, infatti, molto più lento di quello xilematico (Tester e Davenport 2003), e molto più selettivo. Per questo motivo lo ione sodio assorbito dalle radici si diffonde con facilità nell'apparato aereo. Similmente il concetto vale per lo ione potassio il cui accumulo nella parte aerea della pianta è sicuramente favorito dal trasporto xilematico.

Il contributo relativo degli ioni al potenziale osmotico ha evidenziato che gli ioni sodio e cloro contribuivano per quasi il 50% alla osmolalità della foglia, mentre il potassio soltanto per il 23%. Per questo ultimo ione non si evidenziavano differenze significative tra controllo a trattato. Questo dato assieme all'aumento significativo di potassio nelle foglie, suggerisce che il potassio che pure è stato mobilitato, non ha nel ruolo di osmolita il suo significato, è più probabile che sia un accumulo

volto a diminuire la concorrenza tra questi due cationi nelle attività metaboliche, poiché il sodio è facilmente interscambiabile con il potassio. Zepada e Jaso (2008) hanno dimostrato che la ritenzione di  $K^+$  nel citosol, legata alla traslocazione e all'assorbimento radicale, può essere considerato un altro elemento di tolleranza allo stress salino. L'assorbimento e la traslocazione di potassio verso le foglie durante lo stress salino, è stata confermata dall'aumento della attività genica che codifica per carriers specifici del potassio e rilascio di  $K^+$  nei canali di trasporto (Maathuis e Amtmann 1999). Questo fa pensare che la pianta nonostante l'eccesso di altri ioni, sia riuscita ad assorbire e accumulare  $K^+$ , grazie ad una implementazione del meccanismo di assorbimento radicale e di carriers specifici per il potassio.

A questo punto è necessario ricordare la collocazione degli ioni sodio e cloro nella cellula. Se i due ioni in eccesso fossero nel citosol, darebbero problemi alle varie attività metaboliche che avvengono in questo compartimento. La gran parte di  $Na^+$  e  $Cl^-$  presenti nella cellula è probabilmente accumulata nel vacuolo, grazie a pompe trans-membrana specifiche (Zhu et al. 1993). Lo scompensamento tra i potenziali interni alla cellula, è quindi molto forte, a causa della forte diminuzione del potenziale osmotico vacuolare, e la cellula necessita di ri-bilanciare l'omeostasi cellulare. Si è già visto come l'accumulo di potassio non partecipi a questa attività, ma che con molta probabilità serva a preservare le attività metaboliche dove questo ione è implicato, come ad esempio la sintesi di proteine (Tester e Davenport 2003).

Il ruolo di osmolita in grado di compensare il potenziale osmotico negativo del vacuolo è spesso attribuito alla prolina, ed in letteratura il suo aumento in condizioni di stress salino è molto frequente (Hare e Cress 1997; Smirnov e Cumbes 1989; Maggio et al. 2002; Fabro et al. 2004; Szekely et al. 2008). Tuttavia dai risultati ottenuti, è evidente come la prolina diminuisse significativamente nelle piante sottoposte a stress salino rispetto ai controlli. D'altra parte l'analisi degli enzimi coinvolti nel suo metabolismo confermano questo dato. Infatti, l'attività della P5CS, enzima responsabile della sintesi della prolina, non presentava differenze significative nelle piante sottoposte a stress salino rispetto ai controlli. Al contrario, l'attività dell'enzima PHD, responsabile della degradazione della prolina, subiva un incremento significativo passando dai controlli ai trattati. Nel nostro caso non si può quindi attribuire alla prolina il ruolo di osmolita, vista la sua diminuzione. Dati analoghi sono riportati da altri studi, dove la prolina diminuiva nei tessuti fogliari analizzati (Breš et al. 2015).

Generalmente gran parte degli studi riportano gli effetti dell' $O_3$  in concomitanza con altri stress (Mereu et al. 2011; Hoshika et al. 2012; Richet et al. 2012; Bohler et al. 2014; Gerosa et al. 2014; Hayes et al. 2015; Cotrozzi et al. 2016). In realtà non ci sono lavori finalizzati al comportamento delle piante sottoposte a stress salino e quindi esposte ad un singolo evento di  $O_3$ , come riportato in

questa tesi sperimentale

Il leccio è una specie caratterizzata da una buona tolleranza verso esposizioni ad ozono di breve durata (Calatayud et al. 2011; Cotrozzi et al. 2016; Fusaro et al. 2016). Il comportamento degli enzimi e delle molecole antiossidanti nei confronti di O<sub>3</sub> è molto variabile, ma il loro coinvolgimento nella detossificazione de O<sub>3</sub> è quasi sempre presente (Chameides 1989; Luwe et al. 1993; Burkey et al. 2003; Conklin e Barth 2004; Cheng et al. 2007). L'ascorbato è ritenuto essere il principale antiossidante dell'apoplasto, che è anche il luogo dove O<sub>3</sub> riversa il maggiore danno ossidativo (Foyer e Noctor 2009). In letteratura il rapporto tra ascorbato totale e ridotto è generalmente correlato con la sensibilità ad ozono in molte specie (Conklin et al. 1996; Cheng et al. 2007; Feng et al. 2010). L'ascorbato e il glutatione fanno parte del ciclo di Halliwell-Asada, il quale ha un ruolo importante nella detossificazione delle ROS, consentendo la continua rigenerazione delle molecole antiossidanti. La letteratura propone spesso che una maggiore quantità di ASA ridotto sia importante per la detossificazione delle ROS originate da O<sub>3</sub> (Castillo e Greppin 1988; Chamees 1989; Luwe et al. 1993; Luwe e Heber 1995; Ranieri et al. 1996, 2000; Conklin et al. 1997; Moldau 1998; Conklin e Barth 2004). Tuttavia molti sono gli esempi in cui si manifesta l'opposto, una diminuzione di ASA ridotto (Veljovic-Jovanovic et al. 2001; Booker et al. 2012). Un contributo importante al contrasto di dati è stato dato da Booker et al. (2012) i quali hanno proposto che l'ASA cellulare fosse in gran parte ridotto, ma quello apoplastico fosse quasi completamente ossidato. I risultati qui riportati evidenziano come l'ascorbato totale ed il glutatione totale mostravano un aumento significativo in funzione dello stress salino. La quantità totale delle molecole aumentava per effetto del sale, ma i risultati sulla frazione ridotta ed ossidata non mostrava differenze significative tra controllo e trattato. A seguito della fumigazione con O<sub>3</sub>, si registrava un aumento di ASA ridotto ed una diminuzione di GSH ridotto sia nei controlli che nelle piante sottoposte a stress salino. Il GSH ridotto rappresenta il donatore finale di elettroni che partecipa alla rigenerazione dell'ascorbato ridotto quando questo riduce il perossido di idrogeno. La sua diminuzione insieme con l'aumento di ASA ridotto è interpretabile come una maggiore attività del ciclo. La situazione che si viene a creare può essere così riassunta: il sale provocava un aumento significativo della concentrazione delle due molecole antiossidanti senza tuttavia variare il rapporto tra quantità totale e quantità della forma ridotta. Il trattamento con O<sub>3</sub> incrementava il turn-over del ciclo di Halliwell-Asada che si rendeva necessario per eliminare le ROS probabilmente generate dall'inquinante. Sebbene gli studi riguardanti stress salino e ozono non siano presenti in letteratura, i dati fin qui descritti sono in linea con alcuni studi in cui è presente soltanto la fumigazione con O<sub>3</sub> (Yendrek et al. 2015). I risultati degli enzimi confermano quanto appena descritto. Sia l'attività dell'APX che della GR, entrambi facenti parte del ciclo di Halliwell-

Asada, mostravano un aumento significativo in relazione alla fumigazione con l'O<sub>3</sub>, ma nessun aumento si osservava nel trattato con sale rispetto al controllo.

In conclusione, l'O<sub>3</sub> non determinava un incremento dello stress ossidativo indotto già dallo stress salino (vedi i risultati relativi all'analisi della perossidazione lipidica) anche se una ulteriore stimolazione delle varie componenti del ciclo di Halliwell-Asada era necessario per contrastare gli effetti dell'inquinante in una pianta già sottoposta a stress indotto dalla presenza del sale. Questa armonica risposta delle piante rappresenta tuttavia un costo energetico per la pianta che, nel lungo periodo, può determinare danni ingenti. Questo aspetto appare particolarmente importante nell'era del Global Change nella quale eventi come quelli riportati in questa sperimentazione possono verificarsi soprattutto nell'areale Mediterraneo.

## BIBLIOGRAFIA

- AbdelBaki, G.K., Siefritz, F., Man, H.M., Welner, H., Kaldenhoff, R., Kaiser, W.M., 2000. Nitrate reductase in *Zea mays* L. under salinity. *Plant, Cell & Environment*, 23: 15–521.
- Abraham, E., Rigo G., Szekely, G., Nagy, R., Koncz, C., Szabados, L. (2003). Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 51: 363–372.
- Afif, D., Cabané, M., George, V., Favre, J.M., Dizengremel, P. (1995). Rubisco activity and gene expression in tree species submitted to abiotic stresses. 10th International Photosynthesis Congress, Montpellier, Photosynthesis Research, Supp. 1, Abs P-22-51: 194.
- Agrawal, G.K., Rakwal, R., Yonekura, M., Kubo, A., Saji, H. (2002). Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for investigating ozone stress in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Proteomics*, 2: 947–959.
- Ahlfors, R., Macioszek, V., Rudd, J., Brosché, M., Schlichting, R., Scheel, D., Kangasjärvi, J.(2004). Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *The Plant Journal*, 40: 512–522.
- Alamgir, A.N.M., Ali, M.Y. (1999). Effect of salinity on leaf pigments, sugar and protein concentrations and chloroplast ATPase activity of rice (*Oryza sativa* L.). *Bangladesh Journal of Botany*, 28: 145–149.
- Aldesuquy, H.S. (1998). Effect of seawater salinity and gibberlic acid on abscisic acid, amino acids and water-use efficiency of wheat plants. *Agrochimica*, 42: 147–157.
- AliDinar, H.M., Ebert, G., Ludders, P. (1999). Growth, chlorophyll content, photosynthesis and water relations in guava (*Psidium guajava* L.) under salinity and different nitrogen supply. *Gartenbauwissenschaft*, 64: 54–59.
- Allakhverdiev, S.I., Sakamoto, A., Nishiyama, Y., Inaba, M., Murata, N., (2000). Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiology*. 123: 1047–1056.
- Ashihara, H., Adachi, K., Otawa, M., Yasumoto, E., Fukushima, Y., Kato, M., Sano, H., Sasamoto, H., Baba, S., (1997). Compatible solutes and inorganic ions in the mangrove plant *Avicennia marina* and their effects on the activities of enzymes. *Zeitschrift Naturforshung*, 52C: 433–440.
- Ashraf, M. (2002): Salt tolerance of cotton: Some new advances. *Critical Review of Plant Science*, 21: 1–30.
- Ashraf, M., Harris, P.J.C. (2004): Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*, 166: 3–16.
- Aziz, I., Khan, M.A., (2001). Effect of seawater on the growth, ion content and water potential of *Rhizophora mucronata* Lam. *Journal of Plant Research*, 114, 369–373.
- Bernetti, G. (1997). 4. La vegetazione forestale del bacino del Mediterraneo e le altre vegetazioni di tipo Mediterraneo. *Italia Forestale e Montana* LII (6): 469-471.
- Bernetti, G. (1998a). 5. Lessico Mediterraneo. 1a parte. *Italia Forestale e Montana* LIII (1): 31-33.
- Bernetti, G. (1998b). 5. Lessico Mediterraneo. 2a parte. *Italia Forestale e Montana* LIII (2): 109-112.
- Booker, F., Burkey K., Morgan P., Fiscus E., Jones A. (2012) Minimal influence of G-protein null mutations on ozone induced changes in gene expression, foliar injury, gas exchange and peroxidase activity in *Arabidopsis thaliana* L. *Plant, Cell & Environment* 35: 668–681.

- Brendley, B., Pell, E.J. (1998). Ozone-induced changes in biosynthesis of RubisCO and associated compensation to stress in foliage of hybrid poplar. *Tree Physiology*, 18: 81–90.
- Breś, W., Bandurska, H., Kupska, A. (2015). Responses of pelargonium (*Pelargonium × hortorum* L.H. Bailey) to long-term salinity stress induced by treatment with different NaCl doses. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38 (disponibile online).
- Bruns, S., Hecht-Buchholz, C., (1990). Light and electron-microscope studies on the leaves of several potato cultivars after application of salt at various developmental stages. *Potato Research*, 33: 33–41.
- Bussotti, F., Cozzi, A., Ferretti, M. (2006). Field surveys of ozone symptoms on spontaneous vegetation. Limitations and potentialities of the European programme. *Environmental Monitoring and Assessment* 115: 335-348.
- Bussotti, F., Gerosa, G., (2002). Are the Mediterranean forests in Southern Europe threatened from ozone? *Journal of Mediterranean Ecology*, 3: 23-34.
- Bussotti, F., Pancrazi, M., Matteucci, G., Gerosa, G., (2005). Leaf morphology and chemistry in *Fagus sylvatica* L. (beech) trees as affected by site factors and ozone: results from Level II permanent monitoring plots in Italy. *Tree Physiology* 25: 211-219.
- Calatayud, B., Vicent, G., Garcia-Breijo, Francisco J., Cervero J., Julia, A., (2011). Physiological, anatomical and biomass partitioning responses to ozone in the Mediterranean endemic plant *Lamottea diana*. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 74:1131-138
- Castillo, F.J., Greppin, H. (1988). Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum album* L. leaves after ozone exposure. *Environmental and Experimental Botany*, 28: 231–2387.
- Chameides, W.L. (1989). The chemistry of ozone deposition to plant leaves: role of ascorbic acid. *Environmental Science and Technology*, 23: 595–600.
- Chartzoulakis, K., Klapaki, G., (2000). Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Horticulture Science*, 86: 247–260.
- Cheeseman, J.M., (1988). Mechanism of salinity tolerance in plants. *Plant Physiology*, 87: 547–550.
- Chen, G., Asada, K., (1989). Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant and Cell Physiology*, 30: 987–998.
- Cheng, F.-Y., Burkey, K.O., Robinson, J.M., Booker, F.L. (2007). Leaf extracellular ascorbate in relation to O<sub>3</sub> tolerance of two soybean cultivars. *Environmental Pollution*, 150: 355–362.
- Conklin, P.L., Barth, C. (2004). Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant, Cell & Environment*, 27: 959–970.
- Conklin, P.L., Pallanca, J.E., Last, R.L., Smirnoff, N. (1996). L-Ascorbic acid metabolism in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant *vtc1*. *Plant Physiology*, 115: 1277–1285.
- Conklin, P.L., Williams, E.H., Last, R.L. (1996). Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 93: 9970–9974.
- Cotrozzi, L., Remorini, D., Pellegrini, E., Landi, M., Massai, R., Nali, C., Guidi, L., Lorenzini, G. (2016). Variations in physiological and biochemical traits of oak seedlings under drought and ozone stress. *Physiologia Plantarum*, 157: 69-84.
- Cram, W.J. (1976). Negative feedback regulation of transport in cells. The maintenance of turgor, volume and nutrient supply. In: Luttge U., Pitman M.G. (eds.): *Encyclopaedia of Plant Physiology*, New Series, Vol. 2. Springer-Verlag, Berlin.
- Darrall N.M. (1989). The effect of air pollutants on physiological processes in plants. *Plant, Cell & Environment*, 12: 1–30.

- de Bruxelles, G.L., Peacock, W.J., Dennies, E.S., Dolferus, R. (1996). Abscisic acid induces the alcohol dehydrogenase gene in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 111: 381–391.
- Dhindsa, R.S., Matowe, W., (1981). Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defense against lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany*, 32: 79–91.
- Dizengremel, P., Petrini, M. (1994). Effects of air pollutants on the pathways of carbohydrate breakdown, in: Alscher R.G., Wellburn A.R. (Eds.), *Plant Response to the Gaseous Environment. Molecular, Metabolic and Physiological Aspects*, Chapman and Hall, London, pp. 255–278.
- Dizengremel, P., Sasek, T.W., Brown, K.J., Richardson, C.J. (1994). Ozone-induced changes in primary carbon metabolism enzymes of loblolly pine needles, *Journal of Plant Physiology*. 144 300–306.
- Elshintinawy, F., Elshourbagy, M.N. (2001). Alleviation of changes in protein metabolism in NaCl-stressed wheat seedlings by thiamine. *Plant Biology*, 44: 541–545.
- Elthon, T.E., Stewart, C.R. (1981). Submitochondrial location and electron transport characteristics of enzymes involved in proline oxidation. *Plant Physiology*, 67: 780–784.
- Fabro, G., Kovacs, I., Pavet, V., Szabados, L., Alvarez, M.E (2004). Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced plant pathogen incompatible interactions in Arabidopsis. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 17: 343–350.
- Feng, Z.Z., Pang, J., Nouchi, I., Kobayashi, K., Yamakawa, T., Zhu, J.G. (2010). Apoplastic ascorbate contributes to the differential ozone sensitivity in two varieties of winter wheat under fully open-air field conditions. *Environmental Pollution*, 158:3539-3545.
- Flores, P., Botella, M.A., Martinez, V., Cedra, A., (2000). Ionic and osmotic effects on nitrate reductase activity in tomato seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 156: 552–557.
- Ford, C.W. (1984). Accumulation of low molecular solutes in water stress tropical legumes. *Phytochemistry*, 23:, 1007–1015.
- Foyer, C.H., Noctor, G. (2009). Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11:861-905
- Friedman, M. (2004). Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 385-406.
- Fusaro, L., Gerosa, G., Salvatori, E., Marzuoli, R., Monga, R., Kuzminsky, E., Angelaccio, C., Quarato, D., Fares, S. (2016). Early and late adjustments of the photosynthetic traits and stomatal density in *Quercus ilex* L. grown in an ozone-enriched environment. *Plant Biology*, 18:13-21.
- Gadallah, M.A.A. (1999). Effects of proline and glycinebetaine on *Vicia faba* response to salt stress. *Plant Biology*, 42: 249–257.
- Gerosa, G., Marzuoli, R., Finco, A., Monga, R., Fusaro, I., Faoro, F. (2014). Contrasting effects of water salinity and ozone concentration on two cultivars of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) in Mediterranean conditions. *Environmental Pollution*, 193:13-21
- GomezCadenas, A., Arbona, V., Jacas, J., PrimoMillo, E., Talon, M. (2002). Abscisic acid reduces leaf abscission and increases salt tolerance in citrus plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21: 234–240.
- Gomi, K., Ogawa, D., Katou, S., Kamada, H., Nakajima, N., Saji, H., Soyano, T., Sasabe, M., Machida, Y., Mitsuhashi, I., Ohashi, Y., Seo, S. (2005). A mitogen-activated protein kinase NtMPK4 activated by SIPKK is required for jasmonic acid signaling and involved in ozone tolerance via stomatal movement in tobacco. *Plant and Cellular Physiology*, 46: 1902–1914.
- Gossett, D.R., Millhollon, E.P., Lucas, M.C. (1994). Antioxidant response to NaCl stress in salt tolerant and salt sensitive cultivars of cotton. *Crop Science*, 34: 706–714.
- Grulke, N.E., Paoletti, E. (2005). A field system to deliver desired O<sub>3</sub> concentrations in leaf-

- level gas exchange measurements: results for Holm Oak near a CO<sub>2</sub> spring. *Phyton*, 45: 21-31.
- Hamel, L.P., Miles, G.P., Samuel, M.A., Ellis, B.E., Séguin, A., Beaudoin, N. (2005). Activation of stress-responsive mitogen-activated protein kinase pathways in hybrid poplar (*Populus trichocarpa x Populus deltoides*). *Tree Physiology*, 25: 277–288.
  - Hare, P.D., Cress, W.A. (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth and Regulation*, 21: 79–102.
  - Harper, D.B., Harvey, B.M.R. (1978). Mechanisms of paraquat tolerance in perennial ryegrass II. Role of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase. *Plant, Cell & Environment*, 1: 211–215.
  - Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H.J., (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 463–499.
  - Hayes, F., Williamson, J., Mills, G. (2015). Species-Specific Responses to Ozone and Drought in Six Deciduous Trees. *Water Air And Soil Pollution*, 226:156.
  - Heath R.L., Taylor G.E. (1997). Physiological processes and plant responses to ozone exposure, in: Sandermann H., Wellburn A.L., Heath R.L. (Eds.), *Forest Decline and Ozone*, Ecological Studies, vol. 127, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 317–368.
  - Hellmann, H., Funck, D., Rentsch, D., Frommer, W.B. (2000). Hypersensitivity of an Arabidopsis sugar signaling mutant toward exogenous proline application. *Plant Physiology*, 122: 357–367.
  - Hernandez, J.A., Campillo, A., Jimenez, A., Alacon, J.J., Sevilla, F. (1999). Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New Phytologist*, 141: 241–251.
  - Hernandez, J.A., Olmos, E., Corpas, F.J., Sevilla, F., del Rio, L.A. (1995). Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science*, 105: 151–167.
  - Hogarth, P.J. (1999). *The Biology of Mangroves*. Oxford University Press, New York.
  - Hoshika, Y., Watanabe, M., Inada, N., Koike, T. (2012). Growth and Leaf Gas Exchange in Three Birch Species Exposed to Elevated Ozone and CO<sub>2</sub> in Summer. *Water Air And Soil Pollution*, 223:5017-5025.
  - Hu, C.A., Delauney, A.J., Verma, D.P.S. (1992). A bifunctional D1-enzyme pyrroline-5-carboxylate synthetase catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 89: 9354–9358.
  - Iyengar, E.R.R., Reddy, M.P. (1996). Photosynthesis in highly salt tolerant plants. In: Pesserkali, M. (Ed.), *Handbook of photosynthesis*. Marshal Dekar, Baten Rose, USA, pp. 897–909.
  - Kennedy, B.F., De Fillippis, L.F. (1999). Physiological and oxidative response to NaCl of the salt tolerant *Grevillea ilicifolia* and the salt sensitive *Grevillea arenaria*. *Journal of Plant Physiology*, 155: 746–754.
  - Khan, M.A. (2001). Experimental assessment of salinity tolerance of *Ceriops tagal* seedlings and saplings from the Indus delta, Pakistan. *Aquatic Botany*, 70: 259–268.
  - Khan, M.A., Ungar, I.A., Showalter, A.M. (1999). Effects of salinity on growth, ion content, and osmotic relations in *Halopyrum mocoronatum* (L.) Stapf. *Journal of Plant Nutrition*, 22: 191–204.
  - Khan, M.A., Ungar, I.A., Showalter, A.M. (2000). Effects of sodium chloride treatments on growth and ion accumulation of the halophyte *Haloxylon recurvum*. *Communication of Soil Science and Plant Analysis*; 31: 2763–2774.
  - Khan, M.A., Ungar, I.A., Showalter, A.M., Dewald, H.D. (1998). NaCl-induced accumulation of glycinebetaine in four subtropical halophytes from Pakistan. *Plant Physiology*, 102: 487–492.

- Khavarinejad, R.A., Mostofi, Y. (1998). Effects of NaCl on photosynthetic pigments, saccharides, and chloroplast ultrastructure in leaves of tomato cultivars. *Photosynthetica*, 35: 151–154.
- Kim, J.A., Agrawal, G.K., Rakwal, R., Han, K.S., Kim, K.N., Yun, C.H., Heu, S., Park, S.Y., Lee, Y.H., Jwa, N.S. (2003). Molecular cloning and mRNA expression analysis of a novel rice (*Oryza sativa* L.) MAP kinase kinase OsEDR1, an ortholog of Arabidopsis AtEDR1, reveal its role in defense/stress signaling pathways and development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300: 868–876.
- Klap, J.M., Voshaar, J.H.O., de Vries, W., Erisman, J.W. (2000). Effects of environmental stress on forest crown condition in Europe. Part IV: statistical analysis of relationships. *Water, Air, and Soil Pollution*, 119: 387–420.
- Koch, J.R., Creelman, R.A., Eshita, S.M., Seskar, M., Mullet, J.E., Davis, K.R. (2000). Ozone sensitivity in hybrid poplar correlates with insensitivity to both salicylic acid and jasmonic acid. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiology*, 123: 487–496.
- Kohl, D.H., Lin, J.J., Shearer, G., Schubert, K.R. (1990). Activities of the pentose phosphate pathway and enzymes of proline metabolism in legume root nodules. *Plant Physiology*, 94: 1258–1264.
- Kohl, D.H., Schubert, K.R., Carter, M.B., Hagedorn, C.H., Shearer, G. (1988). Proline metabolism in N<sub>2</sub>-fixing root nodules: energy transfer and regulation of purine synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 85: 2036–2040.
- Kolb, T.E., Matyssek, R. (2001). Limitations and perspectives about scaling ozone impacts in trees. *Environmental Pollution*, 115: 373–393.
- Langebartels, C., Ernst, D., Heller, W., Lütz, C., Payer, H.D., Sandermann, H. (2001). Ozone responses of trees: results from controlled chamber exposures at the GSF 740 phytotron. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39: 729–742.
- Le Thiec, D., Dixon, M., Garrec, J.P. (1994). The effects of slightly elevated ozone concentrations and mild drought stress on the physiology and growth of Norway spruce, *Picea abies* (L.) Karst. and beech, *Fagus sylvatica* L., in open-top chambers. *New Phytologist*, 128: 671–678.
- Léger, E., Deschaseaux, A., Pireaux, J.C., Cabané, M., Weber, E., Afif, D., Dizengremel, P. (1997). Relationship between primary and secondary metabolism in ozone treated poplar trees. Changes in enzyme activities and gene expression, IUFRO Meeting ‘Somatic Cell Genetics and Molecular Genetics of Trees’, Quebec, Canada.
- Lin, Z., Zhong, S., Grierson, D. (2009). Recent advances in ethylene research. *Journal of Experimental Botany*, 60: 3311–3336.
- Longstreth, D.J., Nobel, P.S. (1979). Salinity effects on leaf anatomy. *Plant Physiology*, 63: 700–703.
- Luethy-Krause, B., Pfenninger, I., Landolt, W. (1990). Effects of ozone on organic acids in needles of Norway spruce and Scots pine. *Trees*, 4: 198–204.
- Lutts, S. (2000). Exogenous glycine betaine reduces sodium accumulation in salt-stressed rice plants. *International Rice Research*, 25: 39–40.
- Luwe, M., Heber, U. (1995). Ozone detoxification in the apoplast and symplast of spinach, broad bean and beech leaves at ambient and elevated concentrations of ozone in air. *Planta*, 197: 448–455.
- Luwe, M.W.F., Takahama, U., Heber, U. (1993). Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Physiology*, 101: 969–976.
- Maggio, A., Miyazaki, S., Veronese, P., Fujita, T., Ibeas, J.I., Damsz, B., Narasimhan, M.L., Hasegawa, P.M., Joly, R.J., Bressan, R.A. (2002). Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *The Plant Journal*, 31: 699–712.

- Makela, P., Jokinen, K., Kontturi, M., Peltonen-Sainio, P., Pehu, E., Somersalo, S. (1998). Foliar application of glycine betaine – a novel product from sugar beet, as an approach to increase tomato yield. *Industrial Crops Productions*, 7, 139–148.
- Manes, F., Vitale, M., Donato, E., Paoletti, E. (1998). O<sub>3</sub> and O<sub>3</sub>βCO<sub>2</sub> effects on a Mediterranean evergreen broadleaf tree, holm oak (*Quercus ilex* L.). *Chemosphere*, 36: 801-806.
- Mansour, M.M.F., (2000). Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Plant Biology*, 43: 491–500.
- Marcelis, L.F.M., Van Hooijdonk, J. (1999). Effect of salinity on growth, water use and nutrient use in radish (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil*, 215: 57–64.
- Mehlhorn, H., Wellburn, A.R., (1987). Stress ethylene formation determines plant sensitivity to ozone. *Nature*, 327: 417–418.
- Merchante, C., Alonso, J.M. E Stepanova, A.N. (2013). Ethylene signalling: Simple ligand, complex regulation. *Current Opinion in Plant Biology*, 16: 554-560.
- Moldau, H. (1998). Hierarchy of ozone scavenging reactions in the plant cell wall. *Physiologia Plantarum*, 104: 617–622.
- Monk, R.J., Murray, F. (1995). The relative tolerances of some *Eucalyptus* species to ozone exposure. *Water, Air and Soil Pollution*, 85: 1405-1411.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist*, 167: 645-663.
- Munns, R., Termatt, A. (1986). Whole plant responses to salinity. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13: 143–160.
- Muthukumarasamy, M., Gupta, S.D., Pannerselvam, R. (2000). Enhancement of peroxidase, polyphenol oxidase and superoxide dismutase activities by triadimefon in NaCl stressed *Raphanus sativus* L. *Plant Biology*, 43: 317–320.
- Nali, C., Paoletti, E., Marabottini, R., Della Rocca, G., Lorenzini, G., Paolacci, A.R., Ciaffi, M., Badiani, M. (2004). Ecophysiological and biochemical strategies of response to ozone in Mediterranean broadleaf evergreen species. *Atmospheric Environment*, 38: 2247-2257.
- Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi–Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1999). Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 461: 205–210.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D., Hancock, J.T. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1237–1247.
- Noaman, M.M., Dvorak, J., Dong, J.M. (2002). Genes inducing salt tolerance in wheat, *Lophopyrum elongatum* and amphiploid and their responses to ABA under salt stress. *Prospects for Saline Agriculture (Series: Tasks for Vegetation Science)*, 37: 139–144.
- Otoch, M.D.L., Sobreira, A.C.M., de Aragao, M.E.F., Orellano, E.G., Lima, M.D.S., de Melo, D.F. (2001). Salt modulation of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-pyrophosphatase activities in *Vigna unguiculata*. *Journal of Plant Physiology*, 158: 545–551.
- Overmyer, K., Tuominen, H., Kettunen, R., Betz, C., Langebartels, C., Sandermann, H., Kangasjärvi, J. (2000). Ozone sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell*, 12: 1849–1862.
- Paoletti, E., Petriccione, B., Racalbutto, S. (2005). Elevate concentrazioni di ozono nell'Italia mediterranea: una sfida alle foreste? *Forest@*, 2: 30-139.
- Parida, A.K., Das, A.B., Das, P., (2002). NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. *Journal of Plant Biology*, 45: 28–36.
- Parida, A.K., Das, A.B., Mitra, B. (2003). Effects of NaCl stress on the structure, pigment

- complex composition and photosynthetic activity of mangrove *Bruguiera parviflora* chloroplasts. *Photosynthetica*, 41: 191–200.
- Pell, E.J., Eckardt, N.A., Enyedi, A.J. (1992). Timing of ozone stress and resulting status of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase and associated net photosynthesis. *New Phytologist*, 120: 397–405.
  - Pell, E.J., Landry, L.G., Eckardt, N.A., Glick, R.E. (1994). Air pollution and RubisCO: effects and implications. In: Alscher R.G., Wellburn A.R. (Eds.), *Plant Responses to the Gaseous Environment*, Chapman and Hall, London, pp. 239–253.
  - Pell, E.J., Schlaghauer, C.D., Arteca, R.N. (1997) Ozone induced oxidative stress: mechanisms of action and reaction. *Plant Physiology*, 100: 264–273.
  - Pellinen, R., Palva, T., Kangasjärvi, J. (1999). Subcellular, localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *The Plant Journal*, 20: 349–356.
  - Phang, JM. (1985). The regulatory functions of proline and pyrroline-5- carboxylic acid. *Current Top Cellular Regulation*, 25: 91–132.
  - Popova, O.V., Ismailov, S.F., Popova, T.N., Dietz, K.J., Gollmack, D. (2002). Salt-induced expression of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase and ferredoxin-dependent glutamate synthase in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Planta*, 215: 906–913.
  - Rajesh, A., Arumugam, R., Venkatesalu, V. (1998). Growth and photosynthetic characteristics of *Ceriops roxburghiana* under NaCl stress. *Photosynthetica*, 35: 285–287.
  - Rao, M.V., Lee, H.I., Creelman, R.A., Mullet, J.E., Davis, K.R. (2000). Jasmonic acid signaling modulates ozone induced hypersensitive cell death. *The Plant Cell*, 12: 1633–1646.
  - Rashied, V. (2015). Effects of ozone on growth, net photosynthesis and yield of two African varieties of *Vigna unguiculata*. *Environmental Pollution*, 196: 230–238.
  - Rayapati, P.J., Stewart, CR., Hack, E. (1989). Pyrroline-5-carboxylate reductase is in pea (*Pisum sativum* L.) leaf chloroplasts. *Plant Physiology*, 91: 581–586.
  - Reich, P.B. (1983). Effects of low concentration of O<sub>3</sub> on net photosynthesis, dark respiration, and chlorophyll contents in aging hybrid poplar leaves. *Plant Physiology*, 73: 291–296.
  - Richet, N., Tozo, K., Afif, D., Banvoy, J., Legay, S., Dizengremel, P. (2012). The response to daylight or continuous ozone of phenylpropanoid and lignin biosynthesis pathways in poplar differs between leaves and wood. *Planta*, 236:727-737
  - Romeroaranda, R., Soria, T., Cuartero, J. (2001). Tomato plant—water uptake and plant–water relationships under saline growth conditions. *Plant Science*, 160: 265–272.
  - Ryang, S.Z., Woo, S.Y., Kwon, S.Y., Kim, S.H., Lee, S.H., Kim, K.N., Lee, D.K. (2009). Changes of net photosynthesis, antioxidant enzyme activities, and antioxidant contents of *Liriodendron tulipifera* under elevated ozone. *Photosynthetica*, 47 (1): 19–25.
  - Sairam, R.K., Tyagi, A. (2004). Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science*, 86: 407–421.
  - Samuel, M.A., Miles, G.P., Ellis, B.E. (2000). Ozone treatment rapidly activates MAP kinase signalling in plants. *The Plant Journal*, 22: 367–376.
  - Sandermann, H., Ernst, D., Heller, W., Langebartels, C. (1998). Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends in Plant Science*, 3: 47–50.
  - Sandermann, H., Wellburn, A.L., Heath, R.L. (1997). *Forest Decline and Ozone*, Ecological Studies, vol. 127, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 163–200.
  - Saneoka, H., Shiota, K., Kurban, H., Chaudhary, M.I., Premachandra, G.S., Fujita, K. (1999). Effect of salinity on growth and solute accumulation in two wheat lines differing in salt tolerance. *Soil Science and Plant Nutrition*, 45: 873–880.
  - Santner, A., Estelle, M. (2010). The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone

- signalling. *The Plant Journal*, 61: 1029-1040.
- Savoure', A., Hua, XJ., Bertauche, N., Van Montagu, M., Verbruggen, N. (1997). Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of the proline biosynthesis upon cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics*, 254: 104-109.
  - Savoure', A., Jaoua, S., Hua, XJ., Ardiles, W., Van Montagu, M., Verbruggen, N. (1995). Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 372: 13-19.
  - Schraudner, M., Langebartels, C., Sandermann, H. (1996). Plant defence systems and ozone. *Biochemical Society Transactions*, 24: 456-462.
  - Sehmer, L., Dizengremel, P. (1998). Contribution to subcellular localization of superoxide dismutase isoforms of spruce needles and oak leaves, *Journal of Plant Physiology*, 153: 545-551.
  - Sharma, Y.K., Davis, K.R. (1997). The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radical in Biology and Medicine*, 23: 480-488.
  - Singh, N.K., Bracker, C.A., Hasegawa, P.M., Handa, A.K., Buckel, S., Hermodson, M.A., Pfankock, E., Regnier, F.E., Bressan, R.A. (1987). Characterization of osmotin. A thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells. *Plant Physiology*, 85: 529-536.
  - Sleimi, N., Guerfali, S., Bankaji, I. (2015). Biochemical indicators of salt stress in *Plantago maritima*: implications for environmental stress assessment. *Ecological Indicators*, 48: 570-577.
  - Smirnoff, N., Cumbes, QJ. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28: 1057-1060.
  - Smith, F.A., (1973). The internal control of nitrate uptake into excised barley roots with differing salt contents. *New Phytologist*, 72: 769-782.
  - Spsychalla, J.P., Desborough, S.L. (1990). Superoxide dismutase, catalase, and alpha-tocopherol content of stored potato tubers. *Plant Physiology*, 94: 1214-1218.
  - Stolte, K.W. (1982). The effects of ozone on chaparral plants in the California South Coast Air Basin. M.S. thesis, Dept Botany and Plant Science, Univ. California, Riverside.
  - Streller, S., Wingsle, G. (1994). *Pinus sylvestris* L. needles contain extracellular CuZn superoxide dismutase. *Planta*, 192: 195-201.
  - Sze'kely, G., Abraham, E., Cseplo, A., Rigo, G., Zsigmond, L., Csiszar, J., Ayaydin, F., Strizhov, N., Jasik, J., Schmelzer, E., Koncz, C., Szabados, L. (2008). Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *The Plant Journal*, 53: 11-28.
  - Szoke, A., Miao, GH., Hong, Z., Verma, DPS. (1992). Subcellular location of D1-pyrroline-5-carboxylate reductase in root/nodule and leaf of soybean. *Plant Physiology*, 99: 1642-1649.
  - Taj, G., Agarwal, P., Grant, M., Kumar, A. (2010). MAPK machinery in plant. Recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant Signaling & Behavior*, 5: 1370-1378.
  - Takemura, T., Hanagata, N., Dubinsky, Z., Karube, I. (2002). Molecular characterization and response to salt stress of mRNAs encoding cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase and catalase from *Bruguiera gymnorrhiza*. *Trees*, 16: 94-99.
  - Tester, M., Davenport, R. (2003). Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annals of Botany*, 91: 503-527.
  - Thomas, J.C., McElwain, E.F., Bohnert, H.J., (1992). Convergent induction of osmotic stress—responses. *Plant Physiology*, 100: 416-423.
  - Titushin, K., Maxim, S. Feng, T., Yingang, I., Stepanyuk, L., Galina A. (2010). MR-derived

Topology of a GFP-photoprotein Energy Transfer Complex *Journal Of Biological Chemistry* 285:40891-40900

- Tomás, M., Flexas, J., Copolovici, L., Galmés, J., Hallik, L., Medrano, H., Ribas-Carbó, M., Tosens, T., Vislap, V., Niinemets, U. (2013). Importance of leaf anatomy in determining mesophyll diffusion conductance to CO<sub>2</sub> across species: quantitative limitations and scaling up by models *Journal of Experimental Botany*, 64 (8): 2269-2281.
- Tosti, N., Pasqualini, S., Borgogni, A., Ederli, L. (2006), Gene expression profile of ozone treatment *Arabidopsis*. *Plant Cell & Environment*, 29: 1686-1702.
- Veljovic-Jovanovic, S.D., Pignocchi, C., Noctor, G., Foyer, C.H. (2001). Low ascorbic acid in the *vtc-1* mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiology*, 127: 426– 435.
- Vera-Estrella, R., Barkla, Garcia-Ramiry, L., Pantoja. (2005). Salt stress in *Thellungiella halophila* activities Na<sup>+</sup> transport mechanism required for salinity tolerance. *Plant Physiology*, 139: 1507-1517.
- Verbruggen, N., Villaruel, R., Van Montagu, M. (1993). Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 103: 771–781.
- Verslues, PE., Bray, EA. (2006). Role of abscisic acid (ABA) and *Arabidopsis thaliana* ABA-insensitive loci in low water potential- induced ABA and proline accumulation. *Journal of Experimental Botany*, 57: 201–212.
- Verslues, PE., Strizhov, N., Abraham, E., Okresz, L., Blickling, S., Zilberstein, A., Schell, J., Koncz, C., Szabados, L. (1997). Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 12: 557–569.
- Vingarzan, R. (2004). A review of surface O<sub>3</sub> background levels and trends. *Atmospheric Environment*, 38: 3431-3442.
- Wang, B.S., Luttge, U., Ratajczak, R. (2001). Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*. *Journal of Experimental Botany*, 52: 2355–2365.
- Wang, Y., Nil, N., (2000). Changes in chlorophyll, ribulose biphosphatecarboxylase-oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75: 623–627.
- Willkens, H., Chamnopol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C. (1997). Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defense in C3 plants. *EMBO Journal*, 16: 4806–4816.
- Wise, R.R., Naylor, A.W. (1987). Chilling-enhanced photooxidation: evidence for the role of singlet oxygen and endogenous antioxidants. *Plant Physiology*, 83: 278–282.
- Yancey, P., Clark, M.E., Had, S.C., Bowlus, R.D., Somero, G.N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte system. *Science*, 21: 1214–1222.
- Yendrek, V., Craig R. Koester, Robert P.; Ainsworth, Elizabeth A. (2015). A comparative analysis of transcriptomic, biochemical, and physiological responses to elevated ozone identifies species-specific mechanisms of resilience in legume crops. *Journal of Experimental Botany*, 66: 7061-7069
- Yokoi, S., Quintero, F.J., Cubero, B., Ruiz, M.T., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Pardo, J.M. (2002). Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in the salt stress response. *The Plant Journal*, 30: 529–539.
- Yoshihara, Y, Kiyosue, T, Katagiri, T, Ueda, H, Mizoguchi, T, Yamaguchi-Shinozaki, K, Wada, K, Harada, Y, Shinozaki, K. (1995). Correlation between the induction of a gene for D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *The Plant Journal*, 7: 751–760.

- Yoshiba, Y., Kiyosue, T., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1997). Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant and Cell Physiology*, 38: 1095–1102.
- Zhang, C.S., Lu, Q., Verma, D.P.S. (1995). Removal of feedback inhibition of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 20491–20496.
- Zhifang, G., Loescher, W.H. (2003). Expression of a celery mannose 6- phosphate reductase in *Arabidopsis thaliana* enhances salt tolerance and induces biosynthesis of both mannitol and a glucosyl-mannitol dimmer. *Plant, Cell & Environment*, 26: 275–283.
- Zhu, J., Meinzer, F.C. (1999). Efficiency of C-4 photosynthesis in *Atriplex lentiformis* under salinity stress. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26: 79–86.
- Zhu, J.K., Shi, J., Singh, U., Wyatt, S.E., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Capita, N.C. (1993). Enrichment of vitronectin and fibronectin like proteins in NaCl-adapted plant cells and evidence for their involvement in plasma membrane-cell wall adhesion. *The Plant Journal*, 3: 637–646.