

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Facoltà di Agraria

Dipartimento di Ingegneria Agraria e Agronomia del Territorio

Tesi sperimentale per il conseguimento del titolo di Dottore di ricerca in
Scienze e tecnologie delle produzioni agro-alimentari

EFFETTO DI STRESS SALINO E STRESS DA OZONO SU POMODORO DA INDUSTRIA

Docente tutore:

Ch.mo Prof. Stefania De Pascale

Docente co-tutore:

Ch.mo Prof. Massimo Fagnano

Candidato:

Dott. Armando Martino

Coordinatore:

Ch.mo Prof. Salvatore Spagna Musso

XIX ciclo (2003-2006)

Indice

1. Introduzione	3
1.1 Effetto dell'ozono sulle colture agrarie	5
1.2 Andamento giornaliero e stagionale dell'ozono troposferico	9
1.3 Definizione dei livelli critici di ozono	11
1.4 Interazioni dell'ozono con altri fattori ambientali	15
2. UN MODERATO STRESS OSMOTICO PUÒ RIDURRE I DANNI DA OZONO?	22
2.1 Introduzione	22
2.2 Materiali e Metodi	23
2.3 Risultati	26
2.4 Discussione	38
2.5 Conclusioni	41
3. EFFETTO DI PROLINA ESOGENA SU PIANTE SOTTOPOSTE A SALINITÀ E OZONO	43
3.1 Introduzione	43
3.2 Materiali e Metodi	46
3.3 Risultati	49
3.4 Discussione	72
3.5 Conclusioni	77
4. Appendice	79
5. Bibliografia	81

1. Introduzione

La formazione della maggior parte dell'ozono della stratosfera avviene a più di 30 Km di altezza, in corrispondenza della zona equatoriale dove l'irraggiamento solare è più intenso. Le radiazioni UV con lunghezza d'onda inferiore ai 242 nm dissociano l'ossigeno molecolare in ossigeno atomico che, per la sua reattività, si combina rapidamente con una molecola di ossigeno originando l'ozono ($O+O_2 \rightarrow O_3$). A loro volta le molecole di ozono che si formano nel corso di questa reazione assorbono le radiazioni solari con lunghezza d'onda compresa fra 240 e 340 nm, e questo ne provoca la fotolisi che libera un atomo ed una molecola di ossigeno ($O_3 \rightarrow O_2+O$). La presenza dello strato di ozono (6-8 ppm) nell'alta atmosfera è indispensabile per la vita sulla terra poiché funge da schermo per le radiazioni solari con lunghezze d'onda inferiori a 290 nm e impedisce che i raggi ultravioletti raggiungano la superficie della terra determinando la denaturazione delle proteine e la distruzione di ogni forma di vita. La riduzione della quantità di ozono nella stratosfera (fenomeno conosciuto come "buco dell'ozono") è stata messa in relazione con la quantità di cloro-fluoro-carburi dispersi nell'ambiente dall'uomo ed è considerato un fenomeno pericoloso per la vita dell'intero pianeta in quanto mancando questo schermo naturale l'esposizione degli esseri viventi alle radiazioni UV potrebbe incrementare l'incidenza di alcune malattie della pelle (Abarca e Casiccia, 2002).

A differenza dell'ozono presente nella stratosfera quello troposferico è considerato un pericoloso inquinante. Si forma principalmente dalla ossidazione e fotolisi del biossido di azoto (NO_2) immessi nell'atmosfera principalmente dai gas di scarico dei veicoli che circolano nelle aree urbane ($uv + NO_2 = NO + O^{\cdot-}$; $O^{\cdot-} +$

$O_2 = O_3$). Successivamente, nell'aria non inquinata, l'ozono così formatosi reagisce con l'NO prodotto dalla prima reazione ripristinando l'equilibrio iniziale ($NO + O_3 = NO_2 + O_2$). Invece, in aria inquinata, gli idrocarburi reattivi reagiscono con l'NO, limitando la possibilità di degradazione dell'ozono che si accumula nella troposfera raggiungendo concentrazioni pericolose per gli esseri viventi. Poiché l'immissione nell'atmosfera dei precursori dell'ozono (NO_2 e idrocarburi) aumenta costantemente a causa della diffusione esponenziale del trasporto privato, dell'industrializzazione e dell'aumento della popolazione mondiale è atteso un costante aumento dell'ozono troposferico. La concentrazione media mondiale di ozono nell'anno 2000 era di circa 50 nmol mol^{-1} , il valore stimato nell'era pre-industriale di circa 38 nmol mol^{-1} e le previsioni più pessimistiche prevedono il raggiungimento di 80 nmol mol^{-1} entro il 2010 (Fiscus *et al.*, 2005). I movimenti dell'aria spostano questo inquinante e i suoi precursori dai siti di produzione, principalmente aree urbane e periurbane, alle aree rurali dove si accumula a causa della minore presenza di NO che ne determinerebbe la degradazione. Pertanto la concentrazione di ozono è maggiore nelle aree rurali rispetto a quelle urbane, determinando gravi danni alle vegetazione naturale e coltivata (Welfare *et al.*, 1995).

I paesi dell'areale mediterraneo sono maggiormente esposti alla formazione di ozono soprattutto nei periodi tardo-primaverili ed estivi, quando le particolari condizioni di alta pressione, elevate temperature e scarsa ventilazione favoriscono il ristagno e l'accumulo degli inquinanti e il forte irraggiamento solare innesca le reazioni fotochimiche che determinano concentrazioni di ozono più elevate rispetto al livello naturale (stimato in poche decine di ppb).

Il corpo umano non è indifferente alla presenza di questo inquinante nell'atmosfera. Mentre al momento non sono ancora ben note le conseguenze

"croniche", derivanti cioè da una lunga esposizione a basse concentrazioni di ozono, tra gli effetti "acuti" vi sono irritazioni agli occhi, al naso, alla gola e all'apparato respiratorio, maggiore frequenza delle crisi asmatiche e maggiore predisposizione alle allergie delle vie respiratorie (Wills-Karp 2005; Halliwell e Cross, 1994; D'amato *et al.*, 2005).

1.1 Effetto dell'ozono sulle colture agrarie

Tra gli inquinanti atmosferici l'ozono è ormai considerato la principale causa di perdita di produzione non solo in Italia, ma anche in Europa: differenti stime riportano mediamente cali di resa del 15-20% (Fagnano e Quaglietta Chiarandà, 2004). La valutazione dell'impatto dell'ozono sulla produzione agricola è stimato nell'ordine di 2-4 miliardi di dollari per gli USA e di 4 miliardi di Euro per l'Europa (Ashmore 2005).

L'assimilazione del carbonio, la traslocazione dei fotosintetati, l'assorbimento di elementi nutritivi e altri processi fisiologici sono inibiti dalla esposizione all'ozono che, come risultato finale, riduce lo sviluppo della pianta e la produzione. I danni da ozono possono manifestarsi come: (1) danneggiamento delle membrane dei tessuti fogliari che provoca squilibrio ionico e altre disfunzioni; (2) perdita di capacità fotosintetica associata a basso contenuto e ridotta attività della rubisco; (3) problemi nell'allocare i carboidrati negli organi in sviluppo; (4) produzione di segnali molecolari simili a quelli indotti dalla presenza di patogeni; (5) senescenza prematura (Fuhrer e Booker, 2003).

L'ozono penetra nei tessuti fogliari principalmente tramite gli stomi e si diffonde negli spazi intercellulari del mesofillo e nella parete cellulare, e giunto a contatto con il plasmalemma ne attacca le molecole proteiche e i lipidi (Rao *et al.*,

2000). L'ozono all'interno del tessuto fogliare genera molecole con forte attività ossidante (*Reactive Oxygen Species*, ROS), come il perossido d'idrogeno (H_2O_2) il radicale superossido (O^{2-}) e il radicale idrossido ($OH\cdot$). Le cellule vegetali producono le ROS, in particolare superossido e H_2O_2 , come messaggeri secondari in processi associati alla crescita e allo sviluppo della pianta, tanto che la generica definizione di "stress ossidativo" associato alla produzione di ROS sembra debba essere sostituita da quella di "segnale ossidativo" per evidenziare il ruolo di messaggeri ricoperto dalle ROS (Foyer e Noctor, 2005). Quando queste molecole sono presenti in quantità superiore rispetto alla capacità di detossificazione del metabolismo cellulare reagiscono con le proteine, gli amminoacidi, gli acidi nucleici, causano la perossidazione delle membrane lipidiche e possono innescare reazioni radicaliche a catena (Baier *et al.*, 2005). L'acido ascorbico (ASA) gioca un ruolo importante nella difesa della cellula vegetale dalle ROS generate dall'ozono poiché reagisce con i radicali liberi, trasformandosi in radicale monodeidroascorbato, il suo prodotto primario che si forma a seguito dell'ossidazione. L'ASA è sintetizzato all'interno delle cellule ed è trasportato nello spazio cellulare da carrier specifici che si trovano sulla membrana plasmatica. L'apoplasto ha funzioni strutturali, di regolazione della crescita e di comunicazione cellula-cellula. Quale zona dei tessuti vegetali che direttamente si affaccia sull'ambiente esterno, esso svolge un ruolo fondamentale nell'adattamento agli stress imposti dall'ambiente, e rappresenta la prima linea di difesa e il principale sito di reazione dell' ASA con le ROS, anche se è stato stimato che solo il 10% dell'ASA totale è dislocato nello spazio apoplastico (Conklin e Barth, 2004).

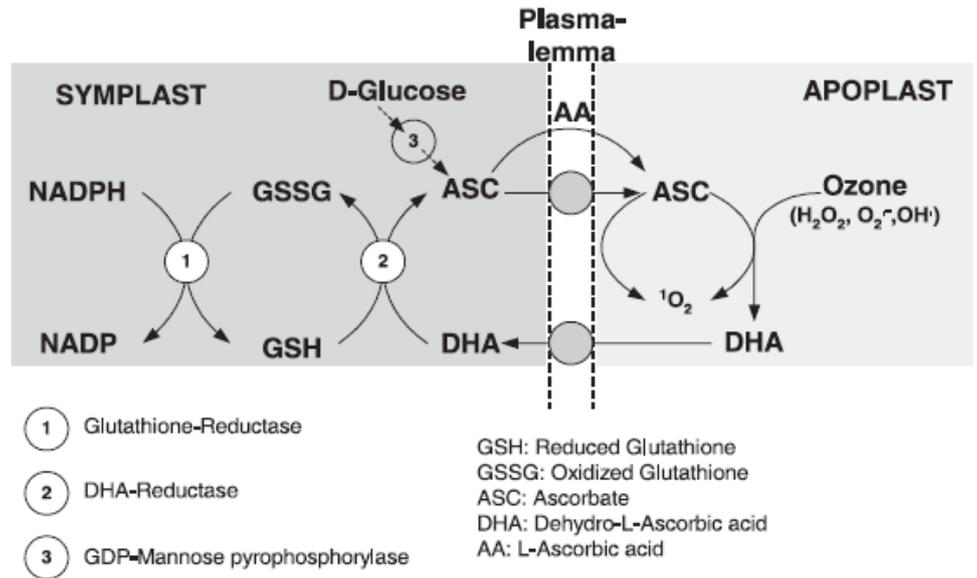


Figura 1 - Possibile meccanismo di detossificazione, l'ozono e le ROS reagiscono con l'Acido Ascorbico (ASC) nell'apoplasto (da Fuhrer e Booker, 2003).

L'apertura stomatica varia in funzione di numerosi fattori ambientali e interni alla pianta al fine di regolare gli scambi gassosi della foglia. Molti inquinanti atmosferici, anche se presenti in basse concentrazioni nell'atmosfera, possono interferire con il controllo dell'apertura stomatica. Per alcune specie è stato chiarito il meccanismo di azione dell'ozono nei confronti degli stomi. Nelle piante non alofite il meccanismo di apertura stomatica è guidato dall'accumulo di K^+ nelle cellule di guardia con conseguente aumento del turgore cellulare e apertura della rima stomatica. La penetrazione del K^+ nelle cellule di guardia dipende dalla permeabilità della membrana plasmatica a questo ione, ma questo meccanismo è sensibile anche alla presenza di radicali liberi e stress ossidativi che quindi riducono la capacità della pianta di controllare la conduttanza stomatica (Robinson *et al.*, 1998). In talune specie la sensibilità all'inquinamento da ozono

pare legata anche alla risposta stomatica. Infatti piante sensibili mostrano una repentina riduzione della conduttanza stomatica che regredisce in poche ore e quindi espone i tessuti all'effetto dell'inquinante, mentre in specie resistenti l'induzione della chiusura stomatica è di minore entità, ma l'effetto permane nel tempo (Robinson *et al.*, 1998). La concentrazione di ozono nell'aria è indubbiamente importante per la determinazione del danno da ozono ma poiché la penetrazione dell'inquinante nelle foglie è quasi esclusivamente stomatica qualsiasi fattore che altera la conduttanza stomatica modifica il flusso di ozono tra ambiente e pianta e quindi la risposta della pianta all'ozono. I principali fattori ambientali che influenzano la conduttanza stomatica sono la temperatura delle foglie, la differenza di pressione di vapore tra la foglia e l'aria (VPD), la radiazione fotosinteticamente attiva (PPFD), la concentrazione ambientale di CO₂, lo stato idrico del suolo e la concentrazione di sali nella zona radicale (Edwin *et al.*, 2005).

Sebbene non sia ancora chiaro se la riduzione della fotosintesi sia la conseguenza della ridotta permeabilità dei tessuti alla CO₂ o se vi siano dei meccanismi specifici dell'ozono nei confronti dell'apparato fotosintetico è stato osservato in alcune specie che l'esposizione all'ozono diminuisce l'assimilazione fotosintetica del carbonio (Morgan *et al.*, 2003). In molti casi questo effetto è stato attribuito ad una ridotta efficienza della carbossilazione associata ad una perdita di attività della Rubisco (Fiscus *et al.*, 2005).

In molte specie, in presenza di ozono sono stati documentati anche cambiamenti nella distribuzione della sostanza secca tra i vari organi (Fuhrer e Booker, 2003; Postiglione e Fagnano 2005). L'ozono sembra influenzare il rapporto parte aerea:parte radicale della pianta che diminuisce a seguito di una distribuzione della sostanza secca a favore della seconda ed un conseguente

effetto deleterio sulla produzione finale, qualora questa sia rappresentata dalla porzione aerea della pianta.

A livello macroscopico il danno da ozono si manifesta con necrosi o colorazioni fogliari caratteristiche che possono notevolmente differire nelle diverse specie vegetali e in relazione allo stadio fenologico nel quale si ha l'esposizione a questo inquinante. In fagiolo la sensibilità a questo inquinante è maggiore durante la fase di riempimento del baccello, in pomodoro tra la fioritura e lo sviluppo dei frutti, in grano tra l'antesi e il riempimento delle cariossidi (Ashmore, 2005).

Sono stati segnalati cloni/cultivar sensibili o tolleranti all'ozono per molte specie di importanza agraria tra le quali ricordiamo soia (*Glycine Max* L.), fagiolo (*Phaseolus vulgaris* L.), pomodoro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), trifoglio (*Trifolium repens* L.) e patata (*Solanum tuberosum* L.). La resistenza è un carattere ereditabile geneticamente che nella maggior parte dei casi deriva da metaboliti con attività antiossidante particolarmente efficienti nel neutralizzare le ROS prodotte (Conklin e Barth, 2004; Fiscus *et al.*, 2005).

1.2 Andamento giornaliero e stagionale dell'ozono troposferico

La concentrazione dell'ozono nella troposfera varia durante l'arco della giornata seguendo un andamento a campana con valori minimi durante la notte, valori crescenti fino alle prime ore del pomeriggio e poi decrescenti nella seconda parte della giornata (Fagnano, 1995).

Generalmente la concentrazione dell'ozono nella troposfera risulta essere minima durante le ore notturne. Questa riduzione della concentrazione è la conseguenza, da una parte, della mancanza delle condizioni ottimali (alta temperatura e

radiazione solare) per lo svolgimento delle reazioni fotolitiche, che portano alla sintesi ed all'accumulo di ozono, e dall'altra è dovuta al verificarsi di reazioni di degradazione dell'ozono da parte dell'NO.

Un importante parametro che influenza l'andamento giornaliero della concentrazione ambientale di ozono è l'altitudine (Bolhàr-Nordenkampf *et al.*, 1999; Lorenzini, 2002). Ad elevate altitudini la totale fluttuazione giornaliera della concentrazione di ozono è minore rispetto alle zone site in pianura, dove invece, come si è detto, l'andamento assume una pronunciata forma a campana (Bolhàr-Nordenkampf *et al.*, 1999; Lorenzini, 2002). Inoltre, le concentrazioni ambientali di ozono tendono ad essere più elevate e maggiormente stabili ad elevata altitudine. Questo accade sia a causa della mancanza di quei composti atmosferici (NO) che normalmente sottraggono l'ozono nelle zone urbane durante la notte sia per la minore intensità dei flussi verticali di aria (Musselman e Minnick, 2000; Lorenzini, 2002).

La concentrazione ambientale di ozono segue anche un andamento stagionale ben definito con valori massimi nel periodo primaverile-estivo e valori minimi nel periodo invernale (Wieser *et al.*, 1999; Kalabokas *et al.*, 2000). Ciò è dovuto al fatto che durante la stagione invernale nelle zone di emissione, la distruzione dell'ozono generalmente prevale sulla sua produzione (Parrish *et al.*, 1999), in quanto:

- anche se le basse temperature da una parte rallentano le velocità di reazione della NO₂ con l'O₃, dall'altra rendono l'equilibrio termico tra NO₃, NO₂ e N₂O₅ favorevole all'accumulo di N₂O₅;
- la minore miscelazione verticale porta generalmente a maggiori concentrazioni di NO₂;

- la minore lunghezza del fotoperiodo e i maggiori angoli zenitali solari riducono i raggi ultravioletti e la velocità di produzione fotochimica di ozono;
- condizioni di elevata umidità dell'aria sono più frequenti.

Per questi motivi anche la fluttuazione giornaliera della concentrazione ambientale di ozono tende ad essere minore durante il periodo invernale (Kalabokas *et al.*, 2000).

1.3 Definizione dei livelli critici di ozono

Uno dei primi casi di danno da ozono riportato in letteratura si riferisce ad una prematura senescenza delle foglie di vite, registrato in California nel 1954. La comparsa di questo fenomeno fu messo in relazione con l'elevata concentrazione di ozono che si era verificata in quell'anno. Successivamente sono state eseguite numerose ricerche che hanno permesso di individuare diverse specie più o meno sensibili all'azione dell'ozono. In questa fase i danni erano sempre associati alle concentrazioni dell'inquinante. I primi indici che furono messi a punto tenevano quindi conto esclusivamente delle concentrazioni medie di ozono nelle 24 ore (O_3 24h), nelle 7 ore (O_3 7h) e il valore massimo giornaliero (O_3 max). L' O_3 24h risulta dalla media aritmetica delle concentrazioni orarie registrate nell'arco della giornata. L' O_3 7h risulta dalla media delle concentrazioni orarie registrate nell'arco delle 7 ore in cui si verificano i livelli più elevati di inquinamento (generalmente dalle 9.00 alle 16.00 o dalle 10.00 alle 17.00). L' O_3 max rappresenta la concentrazione oraria massima di ozono che si è verificata nella giornata. Questo criterio di valutazione dei danni dovuti ad esposizione all'ozono presentava tuttavia dei limiti. Infatti, l'ozono può determinare danni alla vegetazione anche in seguito ad esposizione cronica, ossia a basse concentrazioni

per lunghi periodi di tempo, per cui è stato necessario individuare un nuovo indice che esprimesse i valori cumulati al di sopra della soglia di fitotossicità (40 ppb). Su questo punto si è sviluppato un dibattito tra i ricercatori delle diverse nazioni interessate al problema dell'inquinamento da ozono. Oggi è comunemente accettato, anche dall'Organizzazione Mondiale per la Sanità, il concetto di "livello critico". Infatti, nel 1988 la Commissione Economica per l'Europa delle Nazioni Unite (UN/ECE) nell'ambito della Convenzione sull'Inquinamento dell'Aria Trans-frontaliero (*Long-Range Transboundary Air Pollution*, LRTAP), ha adottato un approccio, basato sugli effetti dell'ozono, che considerava, per l'appunto, il concetto di livello critico (UN/ECE, 1996).

I livelli critici definiti come esposizioni cumulate di ozono, utilizzano l'indice AOT_{40} (*Accumulated exposure Over a Threshold of 40 ppb*) pari alla somma delle differenze tra le concentrazioni orarie di ozono e la soglia prefissata di 40 ppb, relativamente alle ore di luce (radiazione globale maggiore di 50 W m^{-2}) dell'intera stagione vegetativa (Kärenlampi e Skärby, 1996):

$$AOT_{40} = \sum_{i=1}^n ([O_3]_i - 40) \quad \text{con } [O_3]_i > 40 \text{ ppb}$$

dove n è il numero di ore nel periodo considerato e $[O_3]_i$ rappresenta la concentrazione di O_3 espressa in ppb misurata all'ora i .

I livelli critici così definiti corrispondono all'esposizione all'ozono associata a significativi effetti negativi sulla resa delle specie coltivate, sull'aumento della biomassa di un bosco, oppure sulla composizione in specie di comunità vegetali semi-naturali (Fuhrer *et al.*, 1997). L'indice AOT_{40} può essere *spazializzato* su base geografica (mediante calcolo diretto derivato dalle informazioni della rete di centraline di monitoraggio, oppure mediante modelli spaziali); in tal modo si

possono ottenere mappe di rischio che stimano le aree nelle quali vi siano eccedenze di ozono che causano effetti negativi. Questo tipo di approccio è definito come Valutazione del Rischio di Livello I (*Level I assessments*).

La necessità di valutare il rischio potenziale di danno sulla vegetazione naturale e coltivata ha così avviato un'imponente attività di monitoraggio, di bio-monitoraggio e di bio-indicazione, che si è sviluppata mediante l'utilizzo di specie vegetali sensibili e resistenti all'azione fitotossica dell'ozono, e che ha avuto come obiettivo:

- la determinazione e la valutazione dei sintomi fogliari visibili causati dall'ozono;
- la valutazione delle riduzioni di biomassa indotte dall'ozono;
- lo studio della risposta relativa all'ozono di specie allevate in camere climatiche con parametri ambientali controllati, in camere parzialmente aperte (*Open Top Chambers*, OTCs) o direttamente in campo (aree coltivate, aree forestali).

Sulla base di tali studi sono stati definiti dall'UN/ECE i livelli critici di 3.000 ppb/ora in tre mesi per le colture agricole e di 10.000 ppb/ora in sei mesi per la vegetazione forestale (Bull, 1996; Fuhrer, 1996; Skärby e Karlsson, 1996).

In relazione alla semplicità di calcolo e versatilità d'uso dell'AOT₄₀, la valutazione di rischio di livello I è stato molto utilizzato per valutazioni del rischio potenziale sia su base locale che regionale (Gerosa e Ballarin Denti, 2002). Tale approccio, seppure utile per la definizione delle aree a maggiore concentrazione di ozono, risulta però insufficiente per la determinazione del reale potenziale di rischio per la vegetazione di una data area geografica. Infatti, l'AOT₄₀ si basa solo sulla determinazione delle esposizioni a cui la vegetazione è sottoposta, ma non considera quei fattori agro-meteorologici (contenuto idrico del suolo, deficit di saturazione idrica dell'atmosfera, intensità del vento,...) che possono, direttamente o indirettamente, influenzare la conducibilità stomatica e

quindi la dose di ozono realmente assorbita dalle piante. In conseguenza di ciò si è resa necessaria la revisione della valutazione di rischio di livello I e della AOT₄₀ e la valutazione del rischio di livello II (*Level II assessments*), che si ottiene quando è possibile calcolare la dose di O₃ effettivamente assorbita dalla vegetazione in funzione dell'apertura degli stomi, che determina gli scambi gassosi tra foglia ed atmosfera (Fuhrer, 2000). Fuhrer (1996) e Posch e Fuhrer (1999) hanno proposto una AOT₄₀ “modificata” mediante l'introduzione di una serie di funzioni moltiplicative di natura empirica con valori compresi tra 0 e 1. Tali funzioni pongono in relazione l'AOT₄₀ al contenuto idrico del suolo, al deficit di saturazione idrica dell'atmosfera (Emberson *et al.*, 1998) e all'intensità del vento (Grünhage *et al.*, 1997). L'AOT₄₀ così modificata è stata sviluppata solo per le colture agrarie, risultando di difficile applicazione per le foreste (Gerosa e Ballarin Denti, 2002).

La necessità di quantificare il flusso o la dose accumulata dell'ozono, prevalentemente per via stomatica, da parte delle piante, ha condotto alla messa a punto di modelli appropriati che si basano sia su informazioni di natura micro-meteorologica, sia sulla descrizione della risposta stomatica alle variazioni dei parametri ambientali e fisiologiche della specie vegetale (Ashmore e Emberson, 1999; Emberson *et al.*, 2000).

Il modello proposto da Emberson *et al.* (2000) è basato sia su fattori fenologici che su fattori ambientali come l'intensità luminosa, la temperatura, la differenza di pressione di vapore e il deficit di umidità del suolo, e successivamente parametrizzato per differenti specie vegetali sulla base dei dati derivati dalla letteratura (Emberson *et al.*, 1996). La stima della conduttanza stomatica è basata su un modello moltiplicativo descritto da Jarvis (1976) e modificato da Körner *et al.* (1995) e può essere associata alle stime delle

conduttanze atmosferiche e dello strato limite (*boundary layer*) (Emberson, *et al.*, 2000), in combinazione con i corrispondenti dati di concentrazione di ozono, al fine di calcolare il flusso di ozono assorbito.

Il modello proposto da Grünhage *et al.* (2001) è basato sull'assunzione, esemplificativa, che la vegetazione sia considerata come una *big leaf*. Inoltre, tiene conto dell'indice di area fogliare, dell'altezza della chioma, della radiazione globale, della temperatura dell'aria, della umidità relativa della pressione atmosferica, della velocità orizzontale del vento ed infine della concentrazione di ozono ad un'altezza di riferimento.

1.4 Interazioni dell'ozono con altri fattori ambientali

In condizioni di pieno campo lo stress da ozono raramente si verifica in assenza di altri fattori ambientali che influenzano la crescita e le produzioni delle colture agrarie. Questi fattori, possono influenzare l'uptake di ozono nei tessuti fogliari e il meccanismo di detossificazione e/o riparazione cellulare necessario a riparare i danni da ozono. Quindi per una visione d'insieme del fenomeno occorre considerare l'effetto che possono avere le radiazioni UV-B, la temperatura, la concentrazione di CO₂, altri inquinanti gassosi (Fuhrer e Booker, 2003). Conoscere l'effetto di questi fattori è importante anche per la calibrazione di modelli che possano predire l'effetto dell'ozono in ambiente Mediterraneo, dove salinità e stress idrico si manifestano nel periodo estivo in concomitanza con l'esposizione all'ozono (Fumagalli *et al.*, 2001).

Interazione dell'ozono con CO₂ atmosferica

Di attuale interesse è l'interazione tra l'ozono e la CO₂ poiché è stato stimato che la concentrazione di CO₂ atmosferica continuerà ad aumentare per un lungo periodo di tempo. Non ci sono dubbi che in futuro gli agro-ecosistemi e il loro management sarà sostanzialmente differente rispetto ad oggi, e il potenziale impatto dell'ozono in agricoltura dipenderà anche dai cambiamenti degli altri fattori (Fuhrer e Booker, 2003). La presenza di elevati livelli di ozono nell'atmosfera riduce l'incremento di resa dovuto ad elevati livelli di CO₂. Esperimenti con piante di soia, grano e cotone hanno dimostrato che l'effetto positivo di elevati livelli di CO₂ sulle produzioni è maggiore in atmosfere contenenti alti livelli di ozono (Heagle *et al.*, 1998, 1999, 2000). Questo effetto pare sia legato al ridotto *uptake* di ozono che si ha in presenza di alte concentrazioni di CO₂ (Donnelly *et al.*, 2001). In atmosfere ad elevata concentrazione di CO₂ la produzione di biomassa per pianta è protetta dall'effetto dell'ozono grazie a fenomeni di competizione (CO₂/O₃), piuttosto che da una maggiore capacità di detossificazione cellulare (Fiscus *et al.*, 1997; McKee *et al.*, 1997).

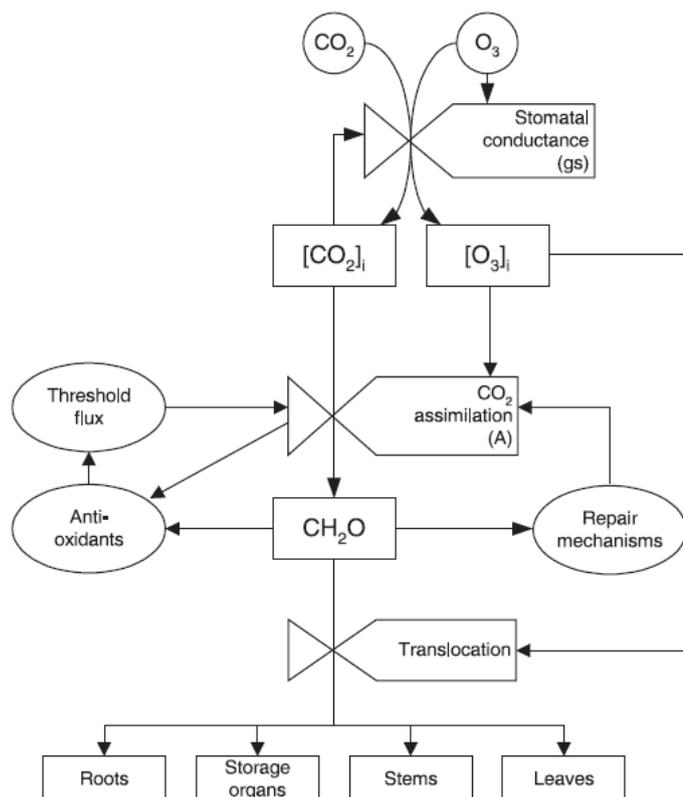


Figura 2 - Modello concettuale per l'interazione tra CO₂ e ozono nell'assimilazione di CO₂ e l'allocatione dei fotosintetati (da Fuhrer e Booker, 2003).

Interazione dell'ozono con lo stress idrico

Raramente gli stress abiotici si manifestano singolarmente per le colture agrarie (o specie vegetali in genere), ma spesso sono presenti simultaneamente. Studi recenti hanno dimostrato che la risposta delle piante a combinazioni di due (o più) stress abiotici è unica e non può essere estrapolata dalla risposta della pianta agli stress applicati singolarmente (Mittler 2006.). È logico ipotizzare che l'esposizione simultanea delle piante a differenti stress abiotici dia origine alla co-attivazione di differenti pathway di risposta, dei quali alcuni comuni ai singoli stress, ed altri specifici. Questi possono avere effetto sinergico o antagonista, e quindi amplificare o ridurre la risposta della pianta. Alla luce di queste

considerazioni è possibile spiegare la “matrice degli stress” (Figura 3) dove è riportato l’effetto combinato di vari stress ai quali sono sottoposte le colture agrarie (Mittler 2006).

Considerando che le massime concentrazioni di O₃ troposferico si registrano durante la stagione estiva, quando le piante sono più esposte allo stress idrico; l’interazione tra questi due stress è molto frequente. L’effetto dell’ozono sui processi fisiologici delle piante può essere influenzato dalla disponibilità idrica del substrato. La riduzione di conduttanza stomatica che si verifica in condizioni di stress idrico può limitare la penetrazione di ozono nei tessuti fogliari, e quindi proteggere le componenti cellulari dall’azione dei derivati di questo inquinante. L’effetto protettivo dello stress idrico nei confronti dell’ozono è stato evidenziato in frumento, soia, cotone, pomodoro, e in specie forestali quali frassino, leccio, betulla, abete e pino (Khan e Soja, 2003). Lo stress idrico ha determinato una riduzione dei danni da ozono in un biotipo sensibile di trifoglio, mentre non sono state registrate interazioni tra i due stress nel biotipo resistente (Merola *et al.*, in press). Tuttavia alcuni autori hanno osservato che il danno è maggiore per piante soggette a deficit idrico (Dobson *et al.*, 1990).

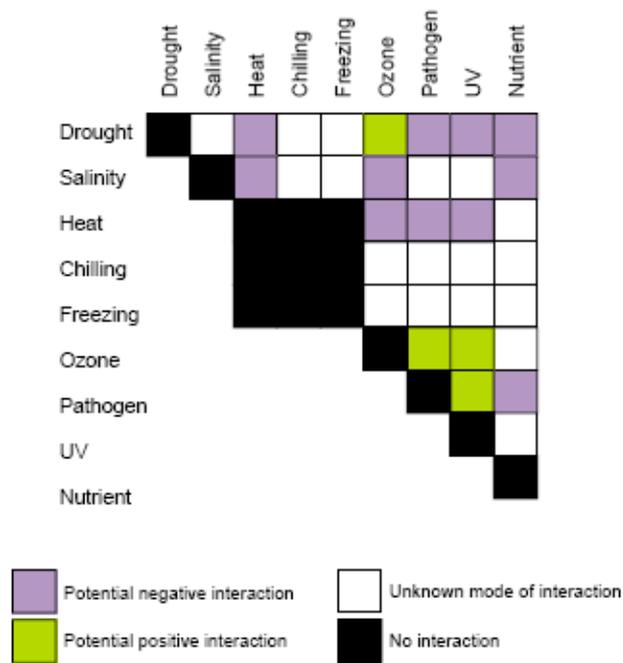


Figura 3: Combinazioni differenti di stress biotici e abiotici presentati in forma di “matrice degli stress” (da Mittler 2006).

Interazione dell’ozono con lo stress salino

L’esposizione delle colture ad elevate concentrazioni saline e di ozono si verificano generalmente durante la stagione estiva, quando le condizioni climatiche aumentano l’evapotraspirazione e la formazione di questo inquinante (Leonardi e Martorana, 2005; Fagnano e Quaglieta Chiarandà, 2004). La bibliografia in merito all’effetto combinato di ozono e salinità è piuttosto limitata e i risultati non sempre sono univoci. Questi due stress interagiscono tra di loro e il risultato è indubbiamente legato alla durata e all’intensità degli stress, nonché alla sensibilità della specie e/o varietà ai due stress. In piante di grano, l’irrigazione con acque saline ha avuto effetto protettivo nei confronti dell’ozono. Nello specifico, la riduzione dell’attività fotosintetica netta e della sostanza secca

della parte epigea ed ipogea registrata in presenza di entrambi gli stress era inferiore rispetto a quando gli stress erano presenti singolarmente (Hassan 2004). Per piante di riso sottoposte ad entrambi gli stress sono state registrate interazioni additive per alcuni parametri biometrici e antagonistiche per alcuni parametri fisiologici e per l'assorbimento di alcuni ioni (Welfare *et al.*, 1996), mentre per piante di cece l'interazione tra i due stress è stata di tipo additivo (Welfare *et al.*, 2002).

Il meccanismo protettivo di stress idrici e salini nei confronti dell'ozono è legato sicuramente alla riduzione del flusso di ozono nella pianta, ma anche alla produzione di molecole con capacità antiossidante, in grado di detossificare le ROS prodotte in seguito allo stress. In molti casi l'esposizione a diversi stress induce l'attivazione degli stessi geni i cui prodotti possono avere un ruolo critico nel processo di adattamento.

Nella risposta allo stress salino e da ozono, l'acido abscissico (ABA) e l'acido ascorbico (ASA) sono coinvolti sia come molecole con azione "segnale" sia come molecole ad azione detossificante (Conklin e Barth, 2004; Baier *et al.*, 2005). In condizione di stress salino aumenta la sintesi di ABA sia nella parte aerea che in quella radicale. In seguito all'aumento della concentrazione di questo ormone nel fluido xilematico si verifica una riduzione della crescita e della conduttanza stomatica (Mulholland *et al.*, 2003). La riduzione della conduttanza stomatica che si registra in presenza di stress salino può contrastare il danno da ozono sulla vegetazione attraverso una riduzione del flusso di ozono dall'ambiente al tessuto fogliare. Inoltre anche in presenza di ozono vengono attivati i geni implicati nella risposta all'ABA e viene aumentata la produzione dei precursori di questo fitormone, che è a sua volta implicato nella risposta allo stress ossidativo (Baier *et al.*, 2005).

In presenza di stress abiotici, viene stimolata la produzione di molecole antiossidanti per detossificare le ROS prodotte dal metabolismo secondario (Hasegawa *et al.*, 2000). Grande importanza, in questo contesto, riveste l'ASA grazie alle sue capacità riducenti. Molti autori riportano che la sensibilità all'ozono è correlata ai livelli totali di ASA. In particolare, in presenza di ozono l'ASA a livello apoplastico forma la prima barriera di detossificazione delle ROS, e gioca quindi un ruolo primario nella difesa dei tessuti vegetali dai danni da ozono. Piante di *Arabidopsis* deficienti nella detossificazione delle ROS, poiché non producenti acido ascorbico, mostrano una maggiore sensibilità all'ozono (Conklin *et al.*, 1996). L'ASA riveste un ruolo importante anche nella risposta stomatica di piante di pomodoro allo stress salino (Maggio *et al.*, 2004). Piante di *M. crystallinum* esposte a stress quali salinità e alta luminosità, sono meno sensibili all'ozono e non mostrano segni di stress ossidativo. In questo caso, l'attivazione di meccanismi antiossidativi in presenza di ROS sviluppatasi a seguito di stress fisiologici risulta in un effetto protettivo dai danni da ozono (Hurst *et al.*, 2004). Va inoltre considerato che ozono ed altri stress abiotici (stress da freddo, stress idrico e salino) attivano una serie di geni comuni che regolano la produzione di quattro fitormoni, etilene, acido salicilico, giasmonato e ABA che controllano e mediano la fisiologia dell'adattamento allo stress (Lee e Yun, 2006).

2. UN MODERATO STRESS OSMOTICO PUÒ RIDURRE I DANNI DA OZONO?

2.1 Introduzione

Lo stress salino è frequente nel bacino del Mediterraneo dove la scarsa qualità delle acque di irrigazione e l'accumulo di ioni nel suolo interferiscono con il normale sviluppo delle piante (Puigdefàbregas e Mendizabal, 1998). In seguito a stress salino il tasso di crescita fogliare è generalmente ridotto mentre aumenta il contenuto di sostanza secca. Il peso secco della pianta può diminuire a causa della riduzione della fotosintesi netta che si registra quando la chiusura stomatica abbassa la concentrazione di CO₂ nei tessuti fogliari. Questo stress generalmente si manifesta in primavera-estate e può interagire con lo stress da O₃ che generalmente si manifesta nello stesso periodo. Alcuni autori hanno riportato interazioni additive o antagonistiche tra l'O₃ e altri stress. L'aumento della chiusura stomatica e la resistenza del mesofillo agli scambi gassosi dovuta allo stress salino o idrico può ridurre le produzioni, ma può anche ridurre il flusso di O₃ all'interno delle foglie (Hassan 2004).

Sulla base delle complesse interazioni tra induzione della chiusura stomatica conseguente allo stress osmotico e controllo indiretto di questo sui potenziali danni da ozono, abbiamo voluto quantificare questo fenomeno studiando l'effetto dello stress salino su piante di pomodoro allevate in presenza o assenza di O₃.

2.2 Materiali e Metodi

L'esperimento è stato condotto nell'estate 2004 presso il Parco Gussone della Facoltà di Agraria di Portici (40°49'N, 14°15'E), sito a 30 m sul livello del mare (Foto 1). Le piantine di pomodoro (*Lycopersicon esculentum* Mill., cv. Paco) sono state trapiantate in aria aperta (AA) o nelle OTC (Open Top Chambers) il 20 maggio 2004 in vasi di 28 cm di diametro riempiti con substrato commerciale (miscela di torba) arricchito con un concime a lenta cessione Osmocote® (NPK =14:14:14). Per l'esperimento sono state utilizzate quattro OTC di forma cilindrica aventi altezza di 1.6 m e diametro di 2 m (Figura 2). Ogni OTC era equipaggiata con un sistema di ventilazione che assicurava un flusso d'aria di $1000 \text{ m}^3 \text{ hr}^{-1}$ che risultava in 3.3 cambi di aria al minuto. Due OTC erano equipaggiate di charcoal filters (AF), aventi superficie filtrante di 8.5 m^2 (SCF1/2-FPP/AFP Luwa Filters Shelter Technology) e con efficienza di filtrazione dell'ozono di oltre l'85%. Le restanti OTC ricevevano aria non filtrata (NF) (Fagnano *et al.*, 2004).

Ciascun vaso è stato posto su una riserva idrica ottenuta mediante l'uso di altri vasi del diametro inferiore ai precedenti realizzando un incastro di 3-4 cm. La continuità tra riserva idrica e suolo è stata garantita mediante l'uso di quattro *stoppini* (corde di lana di vetro) che, poste a circa metà altezza del vaso superiore attraverso i fori di drenaggio, raggiungevano l'acqua contenuta nel vaso inferiore (Figura 4). La riserva idrica è stata ripristinata due volte a settimana, prima del completo esaurimento.

In ogni OTC sono state coltivate 12 piante, 6 irrigate con acqua non salinizzata (T) e 6 irrigate con acqua salina ottenuta aggiungendo NaCl e CaCl₂ (rapporto molare 1:2) all'acqua di irrigazione per ottenere un potenziale osmotico finale della soluzione di 0.25 MPa (7.0 dS m^{-1}). Per valutare l'effetto delle camere

sulla crescita delle piante 24 vasi (12 per ogni trattamento salino) sono stati posti in aria ambiente (AA).

La temperatura e l'umidità relativa durante l'esperimento sono state monitorate in AF, NF e AA, l'intensità luminosa è stata misurata in AA usando un sensore Vaisala collegato ad un data-logger. La concentrazione di ozono è stata misurata con un misuratore spettrofotometrico collegato ad un data-logger. L'inquinamento da ozono è stato studiato tramite i seguenti indici: O_{3max} (massima concentrazione giornaliera) e $AOT_{40(8-8)}$ (somma delle differenze tra la concentrazione di ozono e la soglia di 40 ppb, calcolata tra le 8 AM e le 8 PM). L'esposizione delle piante all'ozono è stata calcolata tra il trapianto e la fioritura (DAT 1-24), tra la fioritura e la raccolta (DAT 25-78) e durante tutto l'esperimento (DAT 1-78).

Il consumo di acqua per pianta è stato misurato due volte a settimana (quando era ripristinata la riserva idrica) tramite doppia pesata del sistema vaso-riserva idrica (prima e dopo il ripristino della riserva idrica).

A 78 DAT sono stati effettuati i seguenti rilievi: sostanza fresca e sostanza secca prodotta (previo essiccamento in stufa a 60°C) e sua ripartizione nelle diverse frazioni della pianta (foglie, stelo, frutti). Il 3 Agosto, all'alba, a mezzogiorno e al tramonto è stata misurata la resistenza stomatica sulla prima foglia giovane completamente espansa utilizzando un porometro a diffusione (AP-4, Delta-T Devices, Cambridge).

Un campione di pomodori per ogni pianta raccolta è stato immediatamente congelato in azoto liquido, conservato a -80°C e successivamente liofilizzato in assenza di luce. Il licopene è stato estratto da 100 mg di polvere di pomodoro congelato ed essiccato miscelato con 3 ml di eptano. Questo campione è stato posto in agitazione per 10 minuti a 30°C e 30 minuti a 5-7 °C. L'estrazione è stata

ripetuta tre volte e gli estratti sono stati mischiati e portati a secco con un vacuum. L'estratto è stato diluito con 1 ml di etanolo e l'attività antiossidante è stata determinata tramite metodo ABTS, come riportato da Re *et al.*, (1999). I risultati sono stati espressi come mmol di Trolox equivalenti (TEAC).

I carotenoidi sono stati estratti come descritto da Leonardi *et al.* (2000). Un campione di 5 g di pomodoro liofilizzato è stato estratto con 25 ml di diclorometano e centrifugato a 3000 rpm per 5 minuti a 4°C. Il supernatante è stato raccolto e la procedura è stata ripetuta con altri 25 ml di solvente; i supernatanti sono stati uniti e poi portati a secco. I campioni sono stati ridisciolti in diclorometano e, dopo diluizione, una parte dell'estratto è stata utilizzata per la misura dell'attività antiossidante.

Per la frazione fenolica totale, 1 g di campione liofilizzato è stato estratto con 20 ml di una soluzione acquosa di metanolo al 60%, miscelando per 5 minuti e centrifugando a 4000 rpm per 5 minuti a 4°C. Il supernatante è stato raccolto ed utilizzato per l'analisi dell'attività antiossidante.

I tocoferoli sono stati estratti in accordo con la procedura AOAC (1990); 10 g di pomodoro omogeneizzato sono stati saponificati attraverso riflusso con 40 ml di etanolo al 95% e 10 ml di KOH al 50% per 30 minuti a 100°C. Dopo il raffreddamento della beuta, l'estratto è stato posto in un imbuto separatore e ad esso sono stati aggiunti 100 ml di CH_3CHCl_2 , 50 ml di $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ e 150 ml di KOH 1N. La fase CH_3CHCl_2 è stata raccolta e lavata prima con 40 ml di KOH 0.5 N, poi con 40 l di acqua distillata per tre volte e quindi essiccata sotto Na_2SO_4 anidra. Una volta evaporato il solvente, il residuo è stato ridisciolto in 1 ml di MeOH, filtrato con filtro a nylon (0.45 μm) e portato a secco con flusso di azoto. I campioni sono stati risospesi in MeOH per l'analisi dell'attività antiossidante.

L'acido ascorbico è stato estratto secondo la procedura AOAC (1990); 5 g di pomodoro sono stati centrifugati a 4000 rpm per 10 minuti a 4°C, il supernatante è stato raccolto e utilizzato per l'analisi dell'attività antiossidante.

I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza usando un disegno sperimentale a split-plot con due ripetizioni, con l'ambiente come fattore principale e lo stress salino come fattore secondario. I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) e le medie sono state confrontate con il test delle Differenze Minime Significative (DMS).

2.3 Risultati

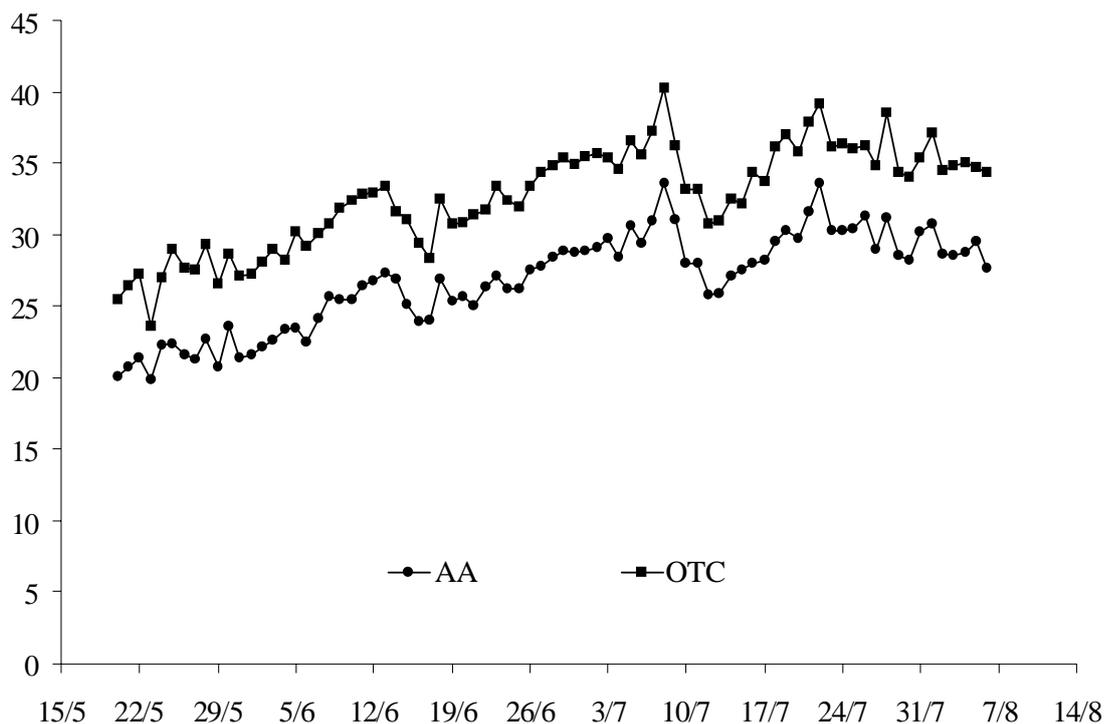
Parametri meteorologici e concentrazione dell'ozono

I valori di temperatura ed ozono registrati in AA e OTC sono riportati in figura 4. Durante l'esperimento la media delle temperature massime (Tmax) è stata di 27°C in AA e 33°C nelle OTC. Il più alto valore di Tmax registrato è stato di 34°C in AA e 40°C nelle OTC, dove Tmax è stato maggiore di 35°C per 21 giorni (Figura 4 A). In media la concentrazione massima di ozono (O₃) è stata di 38 ppb nelle OTC filtrate e di 62 negli ambienti non filtrati (AA e OTC). La massima concentrazione di O₃ è variata tra 16 e 65 ppb in AF e tra 37 e 102 ppb in AA e NF (Figura 4 B). Durante il ciclo colturale la media della concentrazione di ozono a mezzogiorno è stata inferiore a 40 ppb in AF, vicina alla concentrazione di 26±6 ppb riportata da Skov *et al.* (1997) per aree non inquinate dell'emisfero Nord. Invece in AA e NF sono stati registrati rispettivamente valori di 54 e 56 ppb (Figura 5). L'AOT40 durante il ciclo di coltivazione (78 giorni) è stata di 9.0 e 11.0 ppm h in NF e AA rispettivamente, mentre in AF sono stati registrati valori di 0.5 ppm h. Il VPD medio giornaliero (calcolato tra le 08:00 AM

e le 08:00 PM) è stato di 1.34 kPa in AA e di 2.0 kPa nelle OTC. Il più alto valore medio giornaliero di VPD è stato di 2.65 kPa in AA e di 3.51 kPa nelle OTC, i valori minimi sono variati tra 0.39 kPa e 0.49 kPa, rispettivamente per AA e OTC.

Temperatura massima giornaliera (°C)

A



Concentrazione massima giornaliera di O₃ (ppb)

B

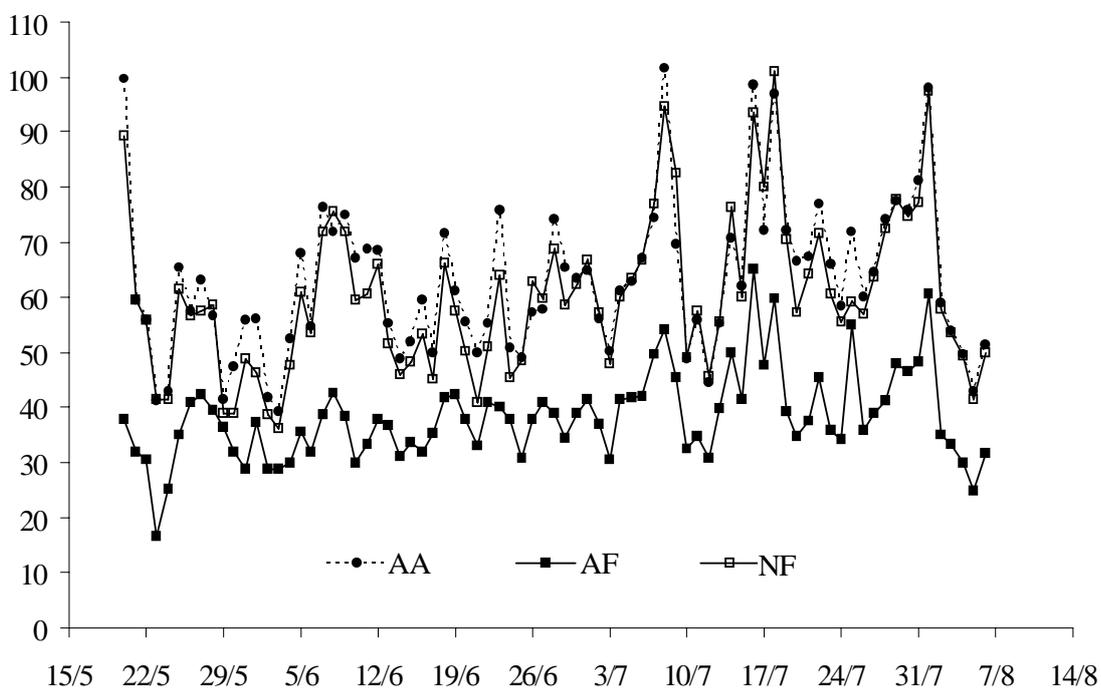


Figura 4: Temperatura massima giornaliera (A) e concentrazione di ozono (B) in aria ambiente (AA), OTC filtrate (AF) e non filtrate (NF), durante il ciclo di coltivazione.

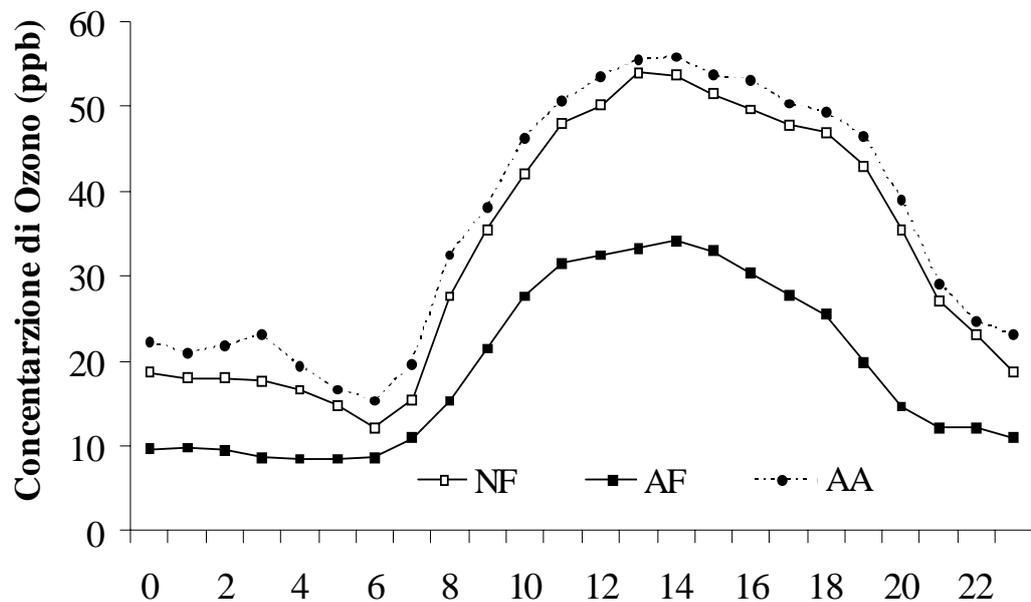


Figura 5: Concentrazione dell'ozono durante il giorno calcolata come media dei valori registrati durante il ciclo di coltivazione. AA = aria ambiente, AF = aria filtrata e NF aria non filtrata

Biomassa prodotta e risposta produttiva

Il numero di foglie per pianta non è stato influenzato dall'ambiente di coltivazione, mentre è stato debolmente ridotto dalla salinità (Tabella 1). Inoltre la salinità ha ridotto anche l'area fogliare totale e l'area fogliare media rispettivamente del 27% e del 23%. È stato anche registrato un effetto camera sull'area fogliare causato probabilmente da differenti fattori ambientali (VPD, temperatura e radiazione) ai quali erano esposte le piante coltivate nelle OTC. Le piante coltivate in AF presentavano una maggiore area fogliare (+29%) ed un maggior peso fresco delle foglie (+31%) rispetto alle piante cresciute in NF, a conferma che l'ozono può ridurre la crescita e l'espansione fogliare (NF vs. AF). Inoltre è stata registrata un'interazione tra salinità ed ozono per l'area fogliare e il

peso fresco delle foglie (Tabella 1 e Figura 6). Le piante cresciute in assenza di ozono (AF) mostravano area fogliare maggiore del 44% rispetto alle piante non salinizzate (-S) cresciute nelle OTC NF. Tuttavia la salinità, benché in misura relativa, ha annullato questa differenza poiché l'area fogliare è stata ridotta più in AF rispetto al trattamento NF (Figura 6). La stessa risposta è stata osservata per la dimensione media delle foglie.

Il contenuto di sostanza secca e il peso specifico della foglia (SLW) sono aumentati in piante coltivate in NF e sottoposte a irrigazioni con acque saline.

Poiché la temperatura massima ottimale per la crescita del pomodoro è tra 25 e 28°C, i nostri risultati sono in linea con una possibile esposizione delle piante coltivate nelle OTC (sia in NF che in AF) ad un moderato stress termico (Figura 4 A). Come precedentemente ricordato, l'effetto dello stress termico può essere stato parzialmente nascosto in AF poiché le piante erano coltivate in un ambiente più favorevole (assenza di ozono), rispetto alle piante coltivate in NF. Il Water Use cumulato (WU) in risposta ai differenti trattamenti concorda con lo sviluppo dell'area fogliare, con una riduzione della traspirazione del 13% in presenza di stress salino e incremento significativo in assenza di ozono (Tabella 1).

La massima produzione in termini di biomassa, frutti totali e frutti maturi è stata registrata in AF (Tabella 2). L'interazione tra la presenza/assenza di ozono e la salinità ha rispecchiato la dinamica di sviluppo delle foglie. Inoltre la differenza tra le produzioni osservata tra AF (765 g pianta⁻¹) e NF (661 g pianta⁻¹) in assenza di stress salino è stata annullata quando le piante erano irrigate con acque saline (373 per piante coltivate in AF vs. 347 g pianta⁻¹ per piante coltivate in NF). L'effetto più drastico è stato registrato in risposta alla salinità che ha ridotto la produzione di circa il 45% e 50% rispettivamente in termini di produzione totale e bacche mature. Il numero di bacche prodotte non è stato influenzato dalla salinità,

a conferma che lo stress salino ha influenzato lo sviluppo della pianta piuttosto che alcuni stadi fenologici, come la fioritura e l'allegagione (carica dei frutti) (Tabella 2).

	Foglie (n. pt ⁻¹)	Area fogliare (cm ² pt ⁻¹)	Dimensioni foglia (cm ² foglia ⁻¹)	Sostanza secca foglie (%)	SLW (mg dw/cm ²)	Peso fresco foglie (g pt ⁻¹)	WU (L pt ⁻¹)
<i>Ambiente</i>							
AA	31.3 a	1024.8 b	32.6 b	11.3 b	12.5 b	113.1 b	60.9 b
AF	31.3 a	1248.3 a	39.7 a	11.6 b	12.8 b	138.3 a	68.1 a
NF	30.0 a	969.5 b	32.3 b	13.8 a	15.1 a	105.3 b	60.4 b
	<i>n.s.</i>	**	**	**	**	*	*
<i>Stress salino</i>							
-S	32.0	1248.7	39.0	11.7	12.8	137.0	67.7
+S	29.7	913.0	30.8	12.8	14.1	100.8	58.6
	*	**	**	**	*	**	**
<i>Interazione A x S</i>							
	<i>n.s.</i>	*	**	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Tabella 1: Effetti dell'ozono e della salinità sullo sviluppo fogliare e sul plant water use. AA=aria ambiente; AF=aria filtrata e NF=aria non filtrata OTC; n.s., *, **, *** indicano rispettivamente medie non differenti o differenti per $P \leq 0.05$, 0.01, 0.001.

	Biomassa epigea (g pt ⁻¹)	Produzione (g pt ⁻¹)	Frutti pianta (n pt ⁻¹)	Peso fresco frutti maturi (g pt ⁻¹)	Peso medio frutti maturi (g)
<i>Ambiente</i>					
AA	841.5 a	599.2 a	22.5 a	545.0 b	41.6 a
AF	887.0 a	636.7 a	24.5 a	568.7 a	33.5 a
NF	768.5 a	561.2 a	20.8 a	503.9 c	32.4 a
<i>Significatività</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	**	<i>n.s.</i>
<i>Stress salino</i>					
-S	1051.7	774.0	21.2	720.9	46.7
+S	613.0	424.0	24.0	357.5	24.9
<i>Significatività</i>	**	**	<i>n.s.</i>	**	**
<i>Interazione A x S</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	**	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Tabella 2: Effetti dell'ozono e della salinità sulla produzione di biomassa epigea e sui parametri produttivi. AA=aria ambiente, AF=aria filtrata e NF=aria non filtrata OTC; n.s., *, **, *** indicano rispettivamente medie non differenti o differenti per $P \leq 0.05, 0.01, 0.001$.

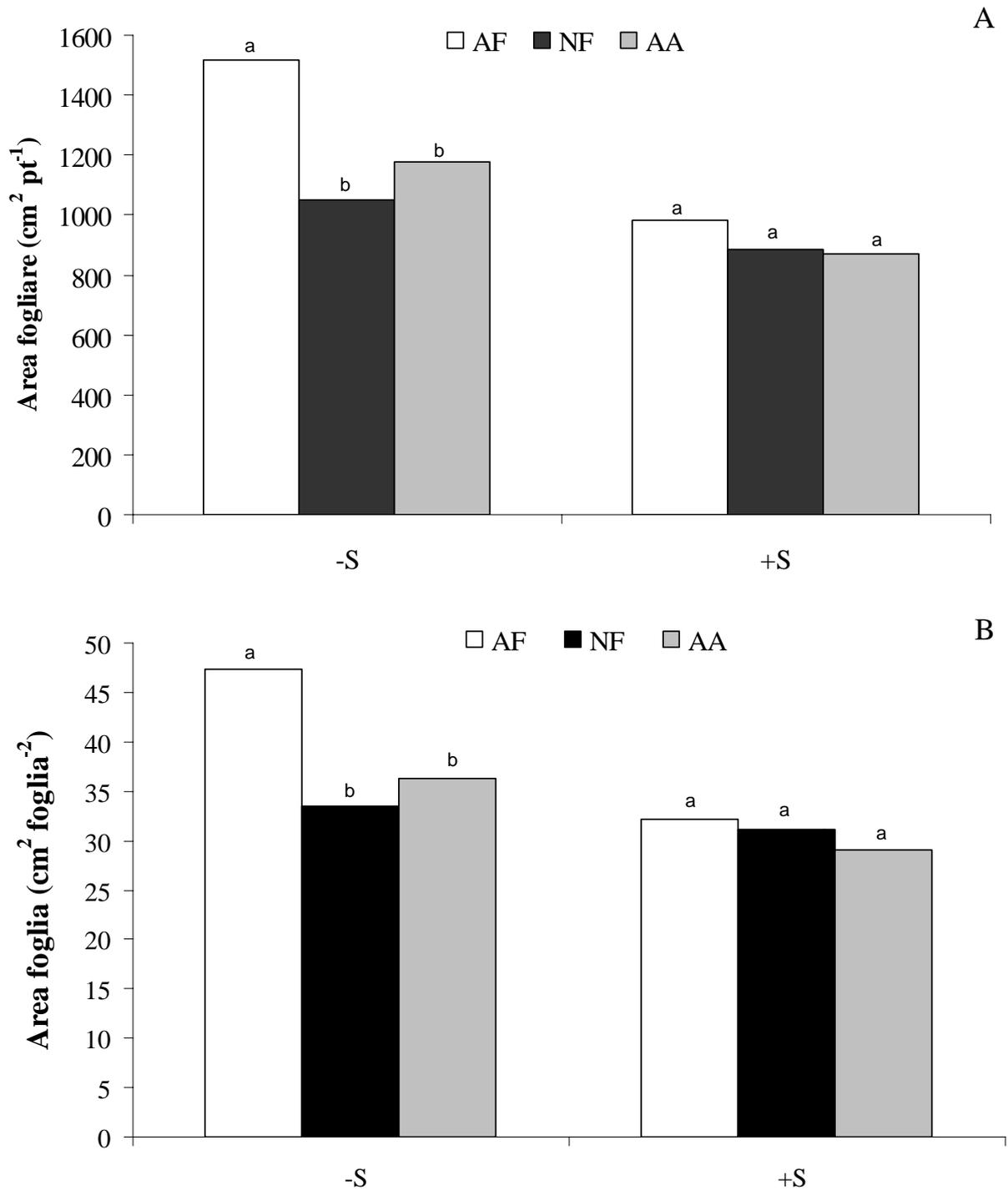


Figura 6: Sviluppo dell'area fogliare per pianta (A) e per singola foglia (B) in risposta all'ambiente di coltivazione e allo stress salino. All'interno di ogni trattamento salino lettere differenti indicano differenze significative con $P \leq 0.05$.

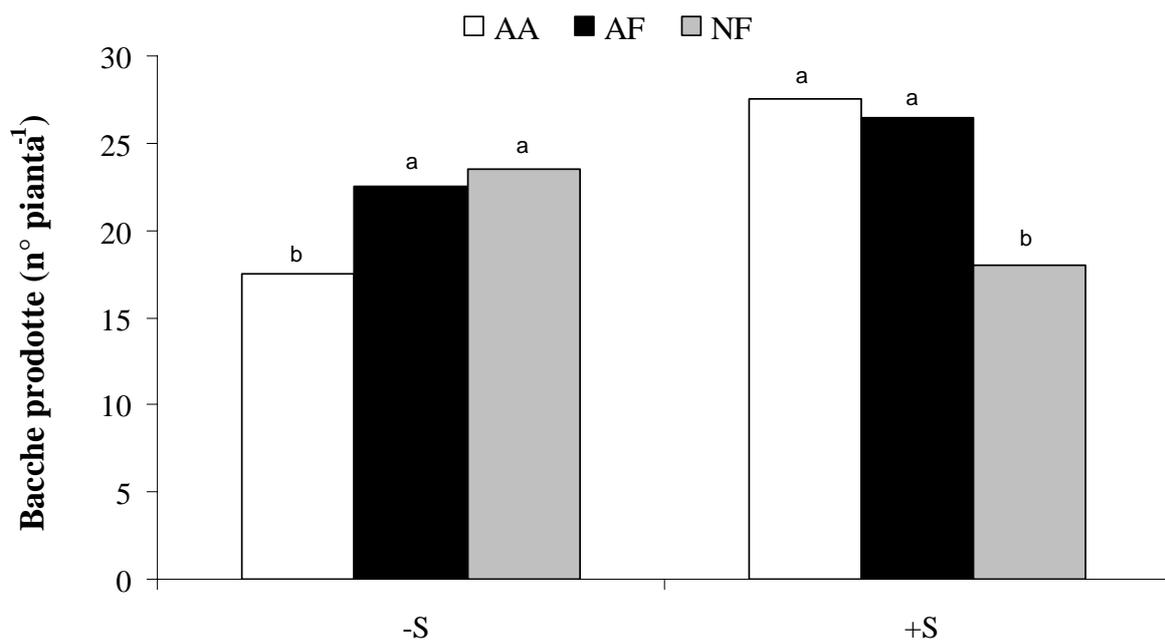


Figura 7: Produzione di bacche mature: interazione tra ozono e salinità. All'interno di ogni trattamento salino lettere differenti indicano differenze significative con $P \leq 0.05$.

Conduttanza stomatica e attività antiossidante

Variazioni di conduttanza stomatica (g_s) sono state registrate durante la giornata, con valori massimi (0.91 cm s^{-1}) al mattino e marcate riduzioni a mezzogiorno (0.66 cm s^{-1}) e nel pomeriggio (0.68 cm s^{-1}). La salinità ha ridotto queste differenze causando una generale riduzione della conduttanza stomatica a tutte le ore considerate (Figura 8). È importante considerare questo andamento, poiché i picchi di concentrazione diurna di ozono si sovrappongono con le variazioni diurna di conduttanza stomatica in ambiente salino riducendo l'assorbimento di ozono da parte della pianta (Figura 8). Durante le misure di conduttanza stomatica, la temperatura massima all'interno delle OTC era alcuni gradi maggiore rispetto all'aria ambiente ($29 \text{ vs. } 34^\circ\text{C}$) e i valori di VPD

rispettivamente 0.92, 1.43, e 1.30 in AA e 1.26, 2.44, e 2.33 nelle OTC, durante le ore di misura (08:00 AM, 12:00 PM e 8:00 PM). L'incremento di VPD ha ridotto significativamente la conduttanza stomatica solo nelle piante non salinizzate (Figura 8). Anche per questo parametro è stato registrato una interazione tra salinità ed ozono, con il più alto valore di conduttanza stomatica (1.42 cm s^{-1}) misurato nelle piante coltivate in AF (Figura 8 B). Anche la ridotta conduttanza stomatica delle piante salinizzate ha contribuito a ridurre il Water Use durante il ciclo di coltivazione (Tabella 1).

Le bacche di pomodoro sottoposte a stress osmotico hanno mostrato un incremento dell'attività antiossidante dei carotenoidi estratti di circa il 33% (Tabella 3). Inoltre le temperature maggiori e/o il livello di radiazione intercettata dalle piante ha ridotto significativamente il contenuto di carotenoidi nelle piante coltivate in OTC, che è stato minore del 46% rispetto ai valori registrati per quelle coltivate in AA (Tabella 3). Questo effetto è stato osservato quando la concentrazione dei carotenoidi era espressa sia in riferimento al peso fresco delle bacche che a quello secco (Tabella 3). I trattamenti non hanno influenzato la concentrazione di acido ascorbico e tocoferoli, mentre è stata registrata una moderata diminuzione dei composti fenolici totali (-18%) in risposta alla salinità.

	% sostanza secca	TEAC (mmol trolox/100g dw)			
		Carotenoidi	Acido Ascorbico	Tocoferoli	Composti fenolici totali
<i>Ambiente</i>					
AA	7.9 a	2.66 a	10.2 a	0.60 a	0.46 a
AF	7.0 b	1.58 b	9.4 a	0.73 a	0.42 a
NF	7.6 a	1.43 b	9.1 a	0.66 a	0.48 a
<i>Significatività</i>	**	**	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
<i>Stress salino</i>					
-S	5.8	1.51	9.9	0.63	0.50
+S	9.3	2.27	9.2	0.69	0.41
<i>Significatività</i>	**	**	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	*
<i>Interazione A x S</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Tabella 3: Capacità antiossidante espressa come Trolox equivalente (TEAC) dei carotenoidi, acido ascorbico, tocoferoli e composti fenolici estratti, espressi come mmol di Trolox per 100 g di campione su base peso secco. AA=aria ambiente, AF=aria filtrata e NF=aria non filtrata OTC; *n.s.*, *, **, *** indicano rispettivamente medie non differenti o differenti per $P \leq 0.05$, 0.01, 0.001.

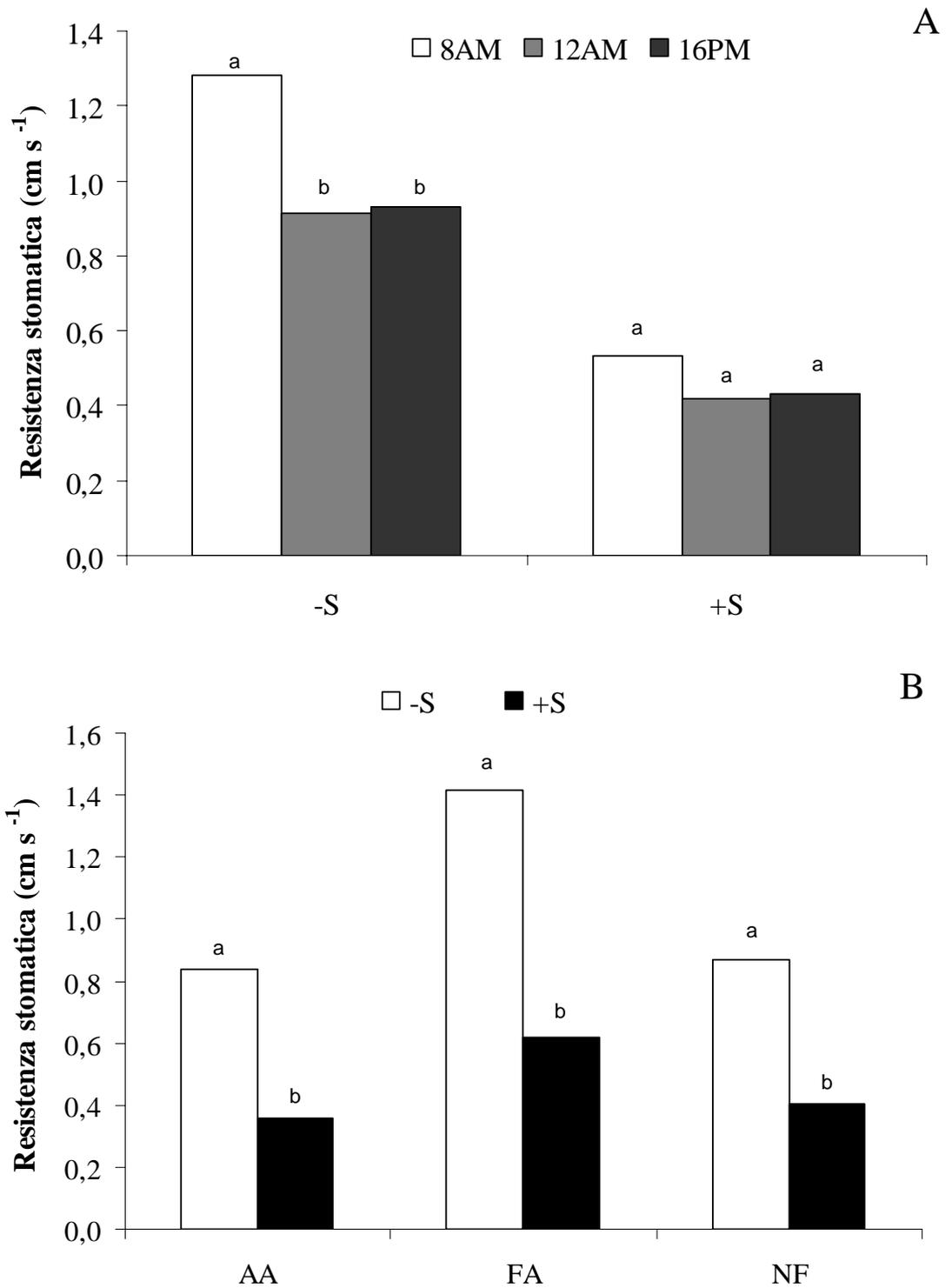


Figura 8: Conduttanza stomatica in funzione delle ore del giorno (A) e dell'ambiente di coltivazione (B). All'interno di ogni trattamento salino lettere differenti indicano differenze significative con $P \leq 0.05$.

2.4 Discussione

Produzione e conduttanza stomatica

La sensibilità all'ozono delle colture viene determinata tramite la AOT 40 associata ad una riduzione di produzione del 5%. (Mills *et al.*, 2003). Come riportato da alcuni autori (Oshima *et al.*, 1975, Reinert *et al.*, 1997, Temple *et al.*, 1990) una AOT di 5.4 ppm h⁻¹, cumulata in 90 giorni, equivale ad una riduzione della produzione del 5% per il pomodoro, classificato specie sensibile all'ozono. I nostri risultati sono in linea con questi valori avendo registrato una variazione di circa il 10% della produzione ad 11 ppm h⁻¹ cumulata in 78 giorni (Tabella 2 e Figura 5). Il meccanismo fisiologico che sta alla base della sensibilità all'ozono delle diverse specie è ancora sconosciuto. Tuttavia il controllo stomatico del flusso dell'ozono e la detossificazione delle ROS prodotte possono giocare un ruolo fondamentale in questo contesto. La chiusura stomatica può essere considerata la prima linea di difesa nei confronti dell'ozono poiché riduce il flusso dell'ozono verso la pianta. Come indicato da Massman (2004), è chiaro che l'ozono di per sé può indurre la chiusura stomatica, anche se in questo caso non è semplice stabilire se questa sia una risposta di difesa specifica nei confronti dell'ozono, attivata in seguito alla percezione di livelli critici a livello stomatico o sub-stomatico (Paoletti e Grulke, 2005), o sia un effetto indiretto associato alla inibizione di altre funzioni fisiologiche. I nostri risultati indicano che l'ozono ha ridotto la conduttanza stomatica del 40% (Figura 8B). Poiché altri stress abiotici possono avere un effetto simile, è stato proposto che questo fenomeno possa limitare il flusso di ozono verso la pianta, e quindi il danno da ozono. Per il grano è stato riportato che la chiusura stomatica indotta dalla salinità ha un effetto

protettivo (Hassan 2004). La chiusura stomatica indotta dallo stress idrico riduce i danni da ozono sulla soia (Vozzo *et al.*, 1995). In presenza di ozono, la minore riduzione di g_s osservata nelle piante salinizzate (33%) rispetto a quelle non salinizzate (42%) può essere coerente con un effetto protettivo della salinità rispetto all'esposizione all'ozono. Tuttavia questa risposta può essere considerata solo in termini relativi poiché lo stress salino riduce esso stesso la conduttanza stomatica, indipendentemente dallo stress da ozono (Figura 8A). Simili conclusioni sono riportate da Hassan (2004), che ricordava che l'effetto dannoso della salinità va comunque tenuto in considerazione.

Nonostante vi sia questa interazione tra ozono e stress salino, i modelli attuali che predicono i danni da ozono considerano solo VPD, temperatura dell'aria, PPFD e deficit idrico del suolo come fattori che influenzano la conduttanza stomatica, e quindi il flusso di O_3 (Fiscus *et al.*, 2005). In questi modelli non vengono generalmente considerati altri fattori ambientali, quali la salinità del suolo e/o dell'acqua di irrigazione, che iniziano a manifestare la loro criticità in molti contesti agricoli dell'Europa meridionale (Puigdefàbregas e Mendizabal, 1998; Pérez-Sirvent *et al.*, 2003). Interazioni tra meccanismi fisiologici che possono influenzare la soglia di danno da ozono esistono e l'interpretazione del loro contributo relativo è complicata da 1) sovrapposizione di più stress; 2) momento di insorgenza dello specifico stress; 3) lunghezza dell'esposizione allo specifico stress. Per esempio nell'agricoltura irrigua praticata in ambiente Mediterraneo, la chiusura stomatica indotta dalla salinità è un evento che si evolve durante il ciclo di coltivazione, come conseguenza all'accumulo stagionale di sale nel suolo associata all'irrigazione (Maggio *et al.*, 2004). Inoltre in ambiente arido e semi-arido le piante si adattano alle variazioni giornaliere di VPD e PPFD. Le maggiori concentrazioni di ozono durante il giorno e durante

l'anno generalmente coincidono con le condizioni ambientali che espongono maggiormente le piante alla chiusura stomatica indotta dalla salinità (Figura 1 e Figura 2). E' inoltre importante precisare che anche l'ozono può mitigare l'effetto dello stress salino, come suggerito dalle riduzioni di conduttanza stomatica del 57% e 47% osservate rispettivamente in piante salinizzate coltivate in AF e NF (Figura 8B). Come discuteremo di seguito, la salinizzazione non causa solo chiusura stomatica e modifiche morfologiche, ma attiva altri meccanismi di adattamento che possono a loro volta ridurre la tossicità dell'ozono. Dal momento che salinità ed ozono spesso coesistono in ambiente Mediterraneo, è lecito ipotizzare che esista una soglia di esposizione allo stress salino in corrispondenza della quale la produzione può addirittura aumentare perché l'attivazione/induzione della risposta allo stress potrebbe manifestarsi più come protezione rispetto all'ozono piuttosto che come riduzione della crescita (Ruggiero *et al.*, 2004). Sebbene al momento non sia possibile identificare tale livello di soglia, questa ipotesi è in linea con l'aumento relativo di produzione spesso osservato in alcune colture a bassi livelli di salinità (Maas e Hoffman, 1977).

Sintesi di molecole antiossidanti e loro ruolo nella detossificazione dell'ozono

L'adattamento a condizioni che causano stress ossidativo nelle piante è stato correlato con l'aumento del livello di molecole antiossidanti ed enzimi coinvolti nella detossificazione delle ROS (Sunkar *et al.*, 2003; D'Haese *et al.*, 2005). Grande interesse è rivolto all'attività di queste molecole nell'apoplasto perché quando l'ozono entra nella pianta e si formano i suoi derivati tossici è in questa zona che possono essere detossificati prima che si manifestino danni irreversibili all'interno delle cellule. L'associazione tra sintesi di antiossidanti all'interno della pianta e difesa nei confronti dei danni da ozono è stata proposta

negli anni '60 quando fu descritta la relazione tra contenuto di ascorbato apoplastico e tolleranza all'ozono (Freebairn, 1960; Conklin *et al.*, 1996). In questo esperimento non sono stati osservati cambiamenti nella concentrazione di acido ascorbico in risposta alla salinità e all'ozono (Tabella 3), probabilmente perché non sono state analizzate separatamente le frazioni intra- ed extra-cellulare. D'altro canto i nostri risultati confermano che la salinità influenza l'accumulo dei carotenoidi (De Pascale *et al.*, 2001).

L'esposizione a temperature più basse rispetto alle OTC e/o alti livelli di radiazione intercettata ha stimolato la maturazione dei frutti che nel nostro esperimento è stata più intensa in aria ambiente rispetto alle OTC. Questi risultati sono in accordo con la riduzione del contenuto di carotenoidi nelle bacche di pomodoro coltivati in coltura protetta rispetto al pieno campo riportata da Dumas *et al.* (2003). La produzione di carotenoidi indotta dallo stress salino potrebbe avere un effetto protettivo dai danni da ozono sulle bacche di pomodoro, sebbene l'accumulo degli antiossidanti andrebbe considerato in un contesto più generale di risposta allo stress (Mittler 2002) (Figura 4 e Tabella 3).

2.5 Conclusioni

Lo stress salino può avere un effetto protettivo nei confronti dell'ozono riducendone il flusso verso la pianta (tramite la chiusura stomatica) o aumentando la sintesi delle molecole che contribuiscono alla detossificazione dei derivati tossici dell'ozono. Queste risposte possono sostanzialmente influenzare i risultati di modelli di revisione che non considerano la componente osmotica della soluzione circolante del suolo. Nella stima dei danni potenziali dell'ozono in agricoltura non si può tralasciare l'effetto degli stress abiotici che generalmente

coesistono con livelli critici di ozono e che possono amplificare o ridurre l'effetto di questo inquinante.

Le metodologie standard per valutare i danni da ozono possono avere alcune limitazioni. L'uso di OTC, si basa su una stima dei danni da ozono tramite sottrazione dell'inquinante dall'atmosfera della camera, le quali tuttavia determinano variazioni critiche del microclima (incremento di Temperatura e VPD) (Figura 1) che andrebbero considerate con più attenzione. Altri sistemi si basano su sistemi di fumigazione dell'aria (FACE), ma in questo caso la risposta delle piante si valuta in funzione di un'aggiunta di ozono alla coltura piuttosto che una sottrazione dall'atmosfera (Volk *et al.*, 2003). In base ai nostri risultati possiamo concludere che i modelli che stimano i danni da ozono dovrebbero essere calibrati e testati in contesti agricoli omogenei. Uno di questi potrebbe essere rappresentato dalle regioni costiere del Mediterraneo, spesso caratterizzate da problemi legati alla salinità e alla scarsità delle acque di irrigazione.

3. EFFETTO DI PROLINA ESOGENA SU PIANTE SOTTOPOSTE A SALINITÀ E OZONO

3.1 Introduzione

I soluti responsabili dell'osmoregolazione sono sali minerali inorganici assorbiti dalla soluzione del terreno e composti organici prodotti dalla pianta. Si definiscono *soluti compatibili* gli osmoliti organici responsabili del bilancio osmotico ed allo stesso tempo compatibili con il metabolismo cellulare (Galinsky, 1993). In funzione della loro capacità di stabilizzare macromolecole in condizioni di stress da disidratazione e di conferire stabilità termica queste molecole vengono definite anche osmoprotettori (Yancey, 1994). Gli osmoliti prodotti in presenza di stress salino, analogamente a quanto avviene in condizioni di deficit idrico, appartengono ad una vasta classe di composti; quali zuccheri, polioli, composti ternari dello zolfo e composti quaternari dell'ammonio. Appartengono a questo ultimo gruppo la prolina e la glicina betaina che oltre all'effetto osmotico agiscono come agenti stabilizzanti delle proteine (Khedr *et al.*, 2003) e probabilmente come molecole segnale, capaci cioè di attivare in vari organismi (batteri, piante e animali) varie risposte di adattamento allo stress. In particolare la prolina, oltre ad avere un ruolo importante nell'osmoregolazione, riveste molteplici funzioni chiave in condizioni di stress quali: a) costituzione di una riserva di carbonio e di azoto; b) protezione degli enzimi dalla denaturazione; c) regolazione dell'acidità citoplasmatica; d) detossificazione della cellula dai radicali liberi (Alia e Saradhi, 1993; Delauney e Verma, 1993; Naqvi *et al.*, 1994). La glicina betaina, invece, oltre ad avere funzione osmoregolatrice stabilizza

l'attività di evoluzione di ossigeno del complesso proteico del fotosistema II (Yeo, 1998). Molti autori hanno dimostrato come sia possibile incrementare il contenuto di prolina negli organismi vegetali attraverso l'utilizzo delle tecniche di ingegneria genetica, ma i risultati indicano che queste piante mostrano un tasso di crescita ridotto (Maggio, 2002; Molinari *et al.*, 2004). E' stato tuttavia dimostrato che in alcune condizioni colturali, una concentrazione costitutiva elevata di prolina può determinare un effetto protettivo nei confronti dello stress. Rispetto alla tecnologia transgenica, una somministrazione esogena di soluti compatibili può essere modulata con maggiore flessibilità ed adattata a specifiche condizioni colturali (Leonardi e Martorana, 2005).

E' stato documentato che applicazioni fogliari di glicinbetaina possono aumentare la conduttanza stomatica e la fotosintesi netta, migliorare lo stato idrico e la produzione in situazione di stress idrico e salino senza tuttavia determinare variazioni nel contenuto in ABA in pomodoro e (Makela, 1998 e 1999) e fagiolo (Lopez, 2002). Inoltre l'applicazione di prolina esogena può mitigare gli effetti tossici del cloruro di sodio anche nelle colture arboree (Gleeson *et al.*, 2004), ed è più efficiente della glicinbetaina probabilmente a causa del diverso potere antiossidante (Okuma, 2004).

Quando un organismo vegetale è esposto a stress abiotici come temperature estreme, siccità, salinità, raggi UV, ozono e metalli pesanti, viene incrementata la produzione di ROS. Infatti la produzione di ROS è l'unico evento comune nella reazione a tutti gli stress. In questa situazione gli organismi producono molecole ad azione antiossidante per ridurre la concentrazione intracellulare delle ROS, e una delle principali molecole antiossidanti non-enzimatiche è la prolina (Rodriguez e Redman, 2005).

In letteratura è stato documentato che somministrazioni di prolina esogena possono ridurre i danni della salinità (Sudhir e Murthy, 2004) attraverso l'attivazione di una serie di meccanismi importanti durante l'adattamento allo stress (aggiustamento osmotico, controllo delle ROS). In alcuni casi, ed in particolari condizioni colturali, è stato inoltre evidenziato che l'accumulo di prolina a livello cellulare può indurre l'apertura stomatica in seguito ad una *percezione indotta* di un ambiente ipo-osmotico. Considerando le molteplici funzioni fisiologiche associate ai livelli cellulari di prolina, tra cui una modulazione dell'apertura stomatica in assenza di stress, abbiamo voluto verificare in maggiore dettaglio l'associazione tra conduttanza stomatica, stress osmotico e potenziali danni da ozono.

3.2 Materiali e Metodi

L'esperimento è stato condotto su pomodoro nell'estate 2006 presso il Parco Gussone della Facoltà di Agraria di Portici (40°49'N, 14°15'E) (Foto 1), sito a 30 m sul livello del mare.

Le piantine di pomodoro (*Lycopersicon esculentum* Mill., cv. 'Perfect peel' Petoseeds) sono state trapiantate in aria aperta (AA) o nelle OTC (Open Top Chambers) il 30 maggio 2006 in vasi dal diametro di 28 cm preparati come descritto per l'esperimento 1. Per l'esperimento sono state utilizzate quattro OTC di forma cilindrica aventi altezza di 2 m e diametro di 3 m (Foto 2). Ogni OTC era equipaggiata con un sistema di ventilazione che assicurava un flusso d'aria di $1000 \text{ m}^3 \text{ hr}^{-1}$ (Foto 2). Due OTC erano equipaggiate di charcoal filters (AF), aventi superficie filtrante di 8.5 m^2 (SCF1/2-FPP/AFP Luwa Filters Shelter Technology) e con efficienza di filtrazione dell'ozono di oltre l'85%. Le restanti OTC ricevevano aria non filtrata (NF) (Fagnano *et al.*, 2004).

Ciascun vaso è stato posto su una riserva idrica, ottenuta mediante l'uso di altri vasi del diametro inferiore ai precedenti realizzando un incastro di 3-4 cm. La continuità riserva idrica e suolo è stata garantita mediante l'uso di quattro *stoppini* (corde di lana di vetro) che, posti a circa metà altezza del vaso superiore attraverso i fori di drenaggio, raggiungono l'acqua contenuta nel vaso inferiore (Figura 4). La riserva idrica è stata ripristinata due volte a settimana, prima del completo esaurimento.

In ogni OTC sono state coltivate 24 piante, 12 irrigate con acqua non salinizzata (-S) e 12 irrigate con acqua salina (+S) ottenuta aggiungendo NaCl e CaCl₂ (rapporto molare 1:2) all'acqua di irrigazione per ottenere un potenziale osmotico finale della soluzione di -0.15 MPa (4.0 dS m^{-1}). Per valutare l'effetto

delle OTC sulla crescita delle piante, 48 vasi (24 per ogni trattamento salino) sono stati posti in aria ambiente (AA). Il 12 e il 19 giugno (13 e 20 DAT) sono stati distribuiti 200 cm³ di una soluzione 10 mM di L-Prolina (Sigma Aldrich, purezza 98%) a metà delle piante (+P) di ciascun trattamento salino (sia in AA e nelle quattro OTC), mentre alle restanti piante (-P) è stata distribuita la stessa quantità di sola acqua di irrigazione.

La temperatura e l'umidità relativa durante l'esperimento sono state monitorate in AF, NF e AA, l'intensità luminosa è stata misurata in AA usando un sensore Vaisala collegato ad un data-logger. La concentrazione di ozono è stata misurata con un misuratore spettrofotometrico collegato ad un data-logger. L'inquinamento da ozono è stato studiato tramite i seguenti indici: O_{3max} (massima concentrazione giornaliera) e $AOT_{40(8-8)}$ (somma delle differenze tra la concentrazione di ozono e la soglia di 40 ppb, calcolata tra le 8:00 AM e le 8:00 PM).

Il 4 agosto 2006 (66 DAT) sono stati effettuati i seguenti rilievi su sedici piante per ambiente di coltivazione (quattro piante per ogni trattamento): numero di foglie e superficie fogliare per pianta (areometro Li-Cor 3000), sostanza fresca e sostanza secca prodotta (previo essiccamento in stufa a 60°C) e sua ripartizione nelle diverse frazioni della pianta (foglie, bacche e steli). Il 27 giugno, il 12 e il 21 luglio (28, 43 e 52 DAT) all'alba, a mezzogiorno e al tramonto è stata misurata la resistenza stomatica sulla prima foglia giovane completamente espansa utilizzando un porometro a diffusione (AP-4, Delta-T Devices, Cambridge). Sulle stesse foglie è stato misurato il potenziale idrico totale (Ψ_t) utilizzando uno psicrometro a termocoppia tipo "dew-point" (WP4, Decagon Devices, Washington). Il potenziale osmotico (Ψ_π) è stato misurato sugli stessi campioni dopo congelamento (a -30 °C) e scongelamento. La pressione di turgore (Ψ_p) è

stata ricavata per differenza tra il potenziale totale e quello osmotico, ritenendo nulla la componente matriciale (De Pascale *et al.*, 2003).

L'attività antiossidante delle bacche di pomodoro è stata misurata su 72 campioni, sei per ogni parcella elementare. Sono state utilizzate due diverse tecniche indicate come metodo DMPD e metodo ABTS, che analizzano rispettivamente l'attività antiossidante idrofila (AA-I) e l'attività antiossidante lipofila (AA-L). Per la determinazione dell' AA-I, 1 g di ciascun campione, congelato e liofilizzato al buio, è stato centrifugato con 5 mL di acqua distillata a 4°C a 4000 rpm per 5 minuti, il surnatante è stato raccolto e il pellet è stato riestratto con altri 5 mL di acqua distillata. L'attività antiossidante idrofila è stata determinata per i due estratti acquosi ottenuti tramite il metodo DMPD (Fogliano *et al.*, 1999). Per la determinazione dell' AA-L, 1 g di ciascun campione, congelato e liofilizzato al buio, è stato centrifugato con 5 mL di alcol metilico a 4°C a 4000 rpm per 5 minuti, dopodiché è stato raccolto il surnatante e il pellet è stato sottoposto ad una seconda centrifugazione con altri 5 mL di metanolo. Sui due estratti metanolici ottenuti (tenuti separati) è stata determinata l'attività antiossidante lipofila con il metodo ABTS (Miller *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1997a e b; Re *et al.*, 1999).

La prova è stata impostata secondo uno schema sperimentale a split-plot con l'ambiente come fattore principale, lo stress salino come sub-parcella e i trattamenti con prolina come sub-sub parcella, con due ripetizioni. I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) e le medie sono state confrontate con il test delle Differenze Minime Significative (DMS).

3.3 Risultati

Parametri meteorologici e concentrazione dell'ozono

I valori di temperatura ed ozono registrati in AA e OTC sono riportati in figura 9. Durante l'esperimento la media delle temperature massime (Tmax) è stata di 29°C in AA e 31°C nelle OTC. Il più alto valore di Tmax registrato è stato di 33°C in AA e 36°C nelle OTC, dove per 9 giorni il Tmax ha raggiunto valori pari o superiori a di 35°C (Figura 9 A). In media la concentrazione massima di ozono (O₃) è stata di 37 ppb nelle OTC filtrate e di 64 negli ambienti non filtrati (AA e OTC). La massima concentrazione di O₃ è variata tra 19 e 49 ppb in AF e tra 38 e 102 ppb in AA e NF (Figura 9 B). Durante il ciclo colturale la media della concentrazione di ozono a mezzogiorno è stata inferiore a 40 ppb in AF, quindi molto vicino alla concentrazione di 26±6 ppb riportata da Skov *et al.* (1997) per aree non inquinate dell'emisfero Nord. Invece in AA e NF sono stati registrati valori di 58 e 53 ppb rispettivamente (Figura 10). L'AOT 40 durante il ciclo di coltivazione (66 giorni) è stato di 9.8 e 13.0 ppm h in NF e AA rispettivamente, mentre in AF sono stati registrati valori di 0.1 ppm h. Il VPD medio giornaliero (calcolato tra le 08:00 AM e le 08:00 PM) è stato di 2.18 kPa in AA e di 2.81 kPa nelle OTC. Il più alto valore medio giornaliero di VPD è stato di 4.04 kPa in AA e di 5.05 kPa nelle OTC, i valori minimi sono variati tra 1.01 kPa e 1.23 kPa, rispettivamente per AA e OTC.

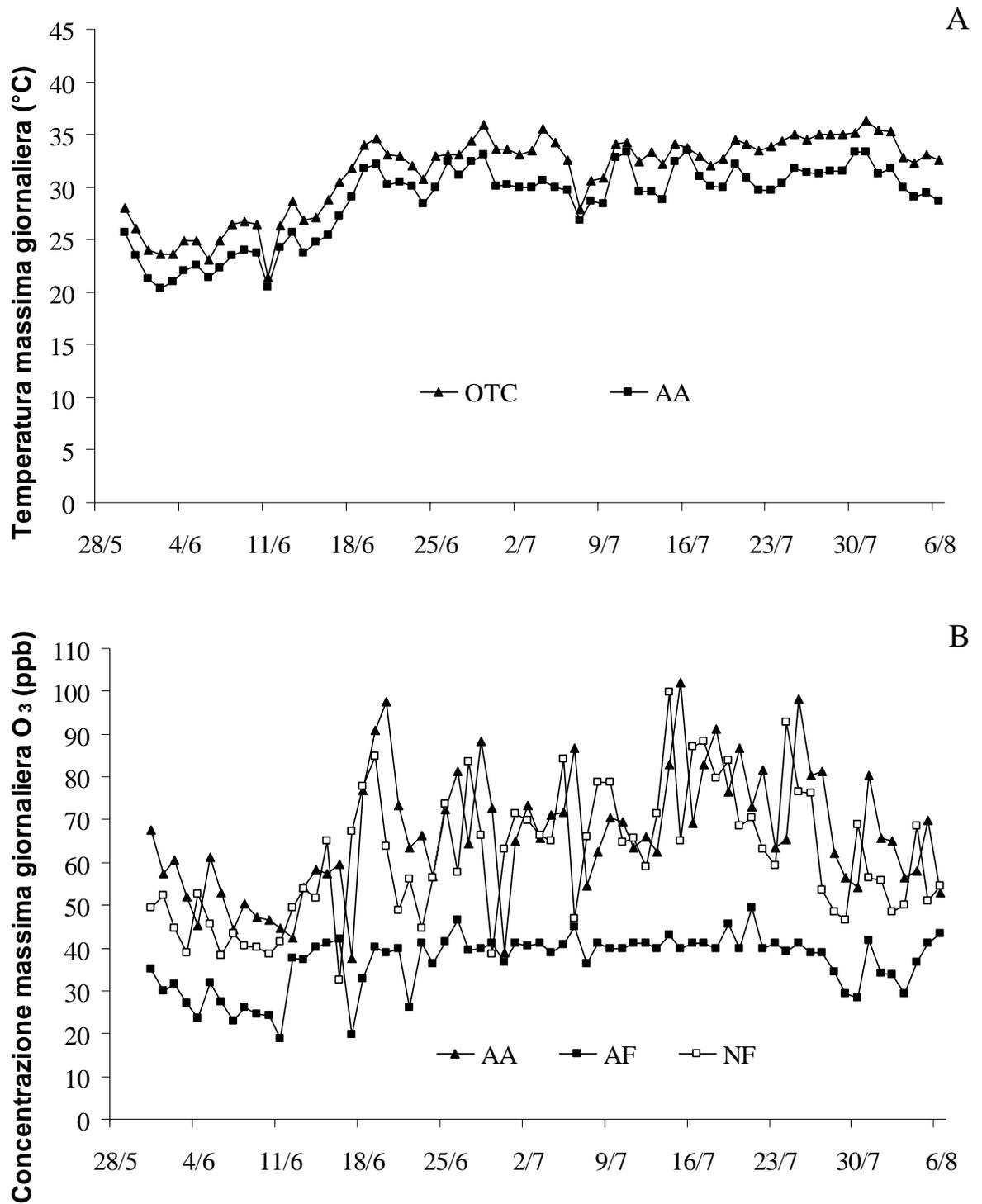


Figura 9: Temperatura massima giornaliera (A) e concentrazione di ozono (B) in aria ambiente (AA), OTC filtrate (AF) e non filtrate (NF), durante il ciclo di coltivazione.

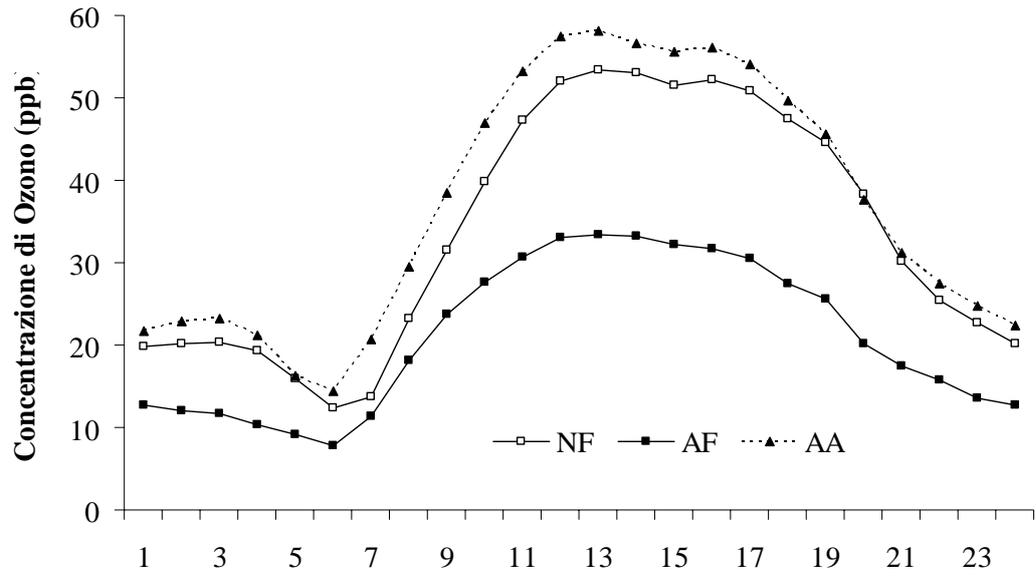


Figura 10: Concentrazione dell'ozono durante il giorno calcolata come media dei valori registrati durante il ciclo di coltivazione. AA = aria ambiente, AF = aria filtrata e NF aria non filtrata.

Biomassa prodotta e risposta produttiva

In tabella 4 è riportato l'effetto dei trattamenti sulle principali caratteristiche biometriche delle piante. Il numero di foglie per pianta è stato ridotto dall'ambiente di coltivazione e dallo stress salino. È stata inoltre registrata una interazione tra ambiente di coltivazione, salinità e prolina (Figura 11). In AA ed in assenza di sale nell'acqua di irrigazione il trattamento con prolina ha aumentato il numero di foglie per pianta, tuttavia in presenza di sale la prolina sembra aver sortito un effetto opposto in AA e AF. L'ozono ha ridotto l'area fogliare del 35 % (NF vs. AF) così come le principali caratteristiche biometriche delle piante, riducendo il peso fresco di tutti gli organi e incrementandone il contenuto di sostanza secca. È stato anche registrato un effetto camera (NF vs. AA) associato probabilmente all'azione di diverse condizioni ambientali (VPD, temperatura e radiazione) sulla crescita delle piante. La coltivazione in NF rispetto all'AA ha ridotto l'area fogliare del 45 % e il peso fresco dei vari organi, ed ha incrementato la percentuale di sostanza secca nello stelo. La salinità ha ridotto l'area fogliare del 30% e il peso fresco degli organi della pianta, mentre ne ha incrementato la percentuale di sostanza secca. Le piante trattate con prolina presentavano un minore peso fresco delle foglie e dello stelo ed una minore sostanza secca delle bacche (Tabella 4 e 5).

L'ozono, l'effetto camera e la salinità hanno ridotto la produzione di bacche, mentre i trattamenti con prolina hanno avuto l'effetto contrario, incrementando la produzione di circa 8% (780,6 vs. 722,8) (Tabella 5). È stata inoltre registrata una interazione tra ambiente di coltivazione, salinità e prolina (Figura 19). Quando le piante sono state irrigate con acqua normale la prolina ha aumentato la produzione di bacche in AA e in AF (anche se in questo ambiente non è stata raggiunta la significatività), con il valore massimo per la tesi AA -S.

L'effetto opposto è stato registrato quando le piante erano coltivate in OTC in presenza di ozono (Figura 19). Tutti i trattamenti hanno ridotto la sostanza secca prodotta. Sono state inoltre registrate delle interazioni tra ambiente di coltivazione e salinità (Figura 15) e tra salinità e prolina (Figura 16). In assenza di stress osmotico la massima produzione di sostanza secca è stata registrata in AF. L'ozono ha ridotto la sostanza secca prodotta di circa il 40% (AF vs. NF) mentre l'effetto camera (AA vs. NF) ha indotto una riduzione del 34%. In presenza di stress osmotico le piante cresciute in NF hanno mostrato una diminuzione della sostanza secca prodotta di circa il 30 % rispetto a AA e AF. La prolina ha ridotto la sostanza secca prodotta in -S del 28 %, mentre non sono state registrate differenze in +S. L'effetto positivo di questo osmolita sulle produzioni non è stato quindi dovuto all'aumento della sostanza secca totale prodotta, ma piuttosto ad un maggiore accumulo di sostanza secca nelle bacche a discapito di foglie e steli (Tabella 4).

	foglie n pt ⁻¹	pf. foglie g	ss foglie %	pf. stelo g	ss stelo %	area cm ² pt ⁻¹	sostanza secca totale g pt ⁻¹
Ambiente							
AA	48 a	266,5 a	12,1 a	173,5 b	17,8 b	3283 a	446,2 a
AF	39 b	266,5 a	11,4 b	201,3 a	15,7 c	2814 b	473,1 a
NF	34 c	156,1 c	12,2 a	131,9 c	20,3 a	1811 c	292,2 b
	**	**	**	**	**	**	**
Sale							
-S	46	284,0	11,0	195,5	17,3	3095	485,1
+S	36	175,4	12,8	142,3	18,6	2178	322,5
	**	**	**	**	*	**	**
Prolina							
-P	41	248,5	11,7	177,0	17,7	2747	430,6
+P	40	210,9	12,0	160,7	18,2	2526	377,1
	n.s.	**	n.s.	*	n.s.	n.s.	**
Interazioni							
AxS	*	n.s.	n.s.	**	*	n.s.	**
AxP	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
SxP	**	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*
AxSxP	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabella 4: Effetto dei trattamenti sulle caratteristiche biometriche delle piante.

AA=aria ambiente; AF=aria filtrata e NF=aria non filtrata OTC; n.s., *, **, *** indicano rispettivamente medie non differenti o differenti per $P \leq 0.05$, 0.01, 0.001.

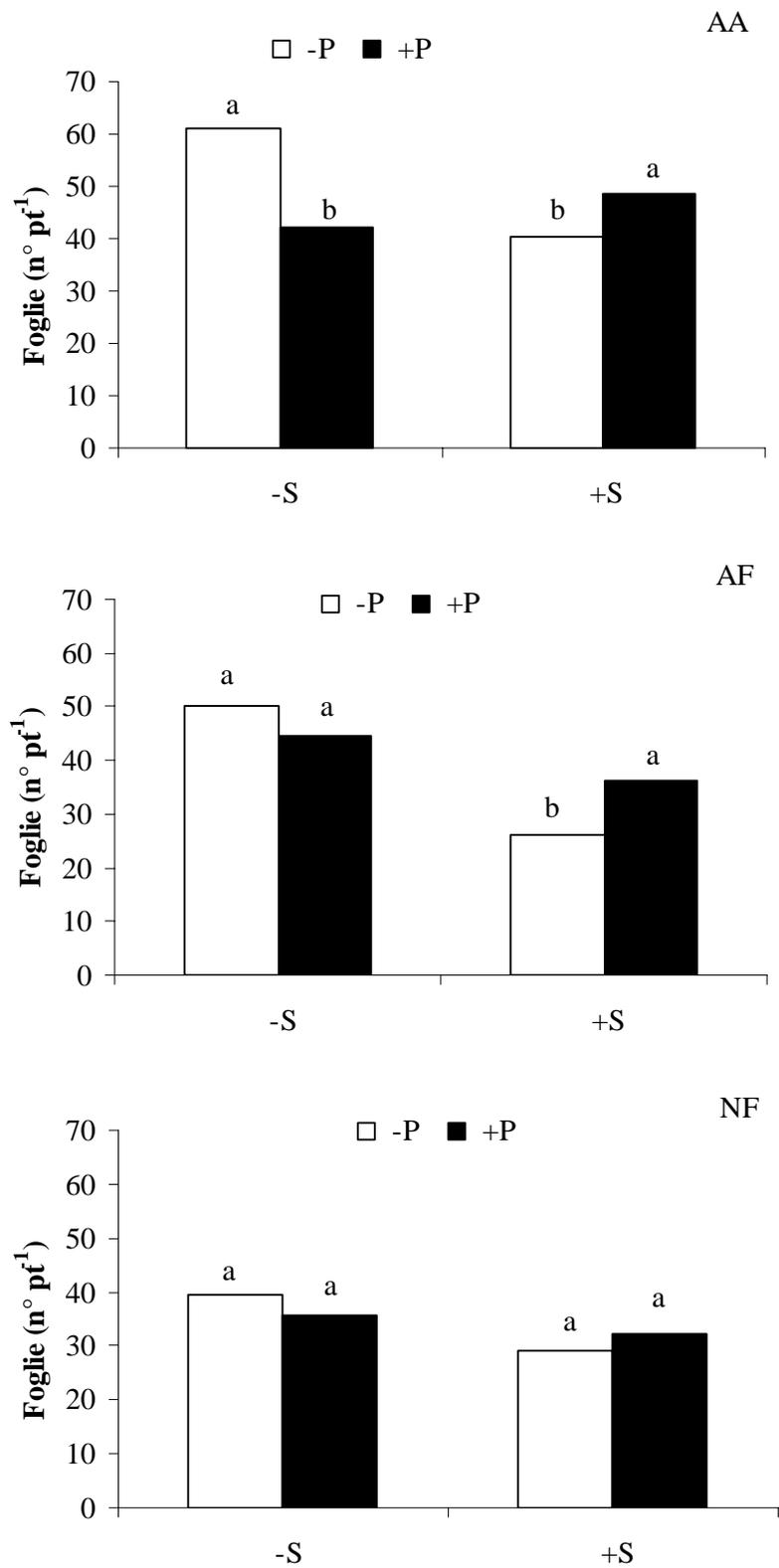


Figura 11: Interazione tra ambiente di coltivazione, salinità e prolina sul numero di foglie per pianta. All'interno di ogni trattamento salino lettere differenti indicano differenze significative con $P \leq 0.05$.

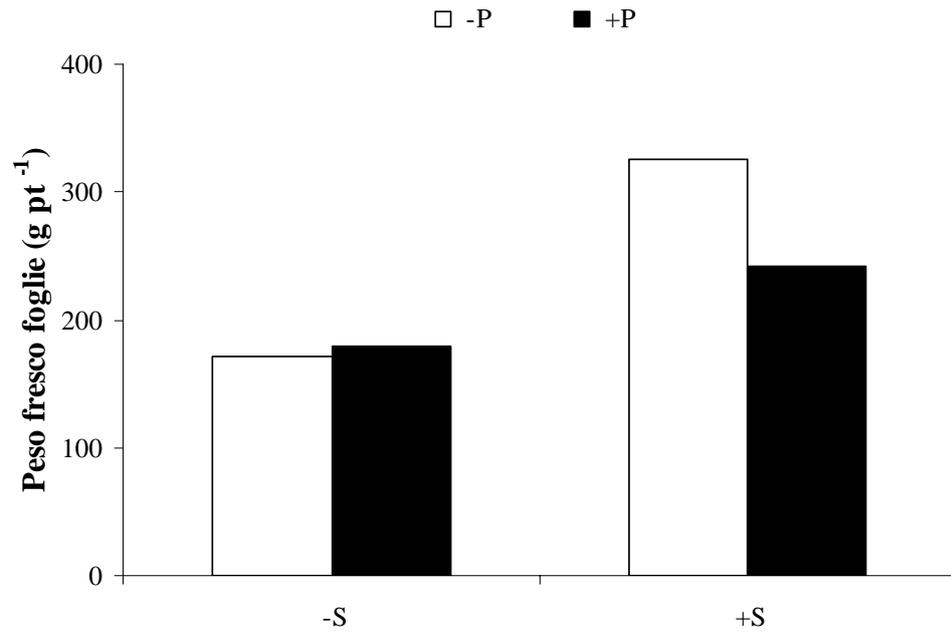


Figura 12: Interazione tra salinità e prolina sul peso fresco delle foglie. All'interno di ogni trattamento salino lettere differenti indicano differenze significative con $P \leq 0.05$.

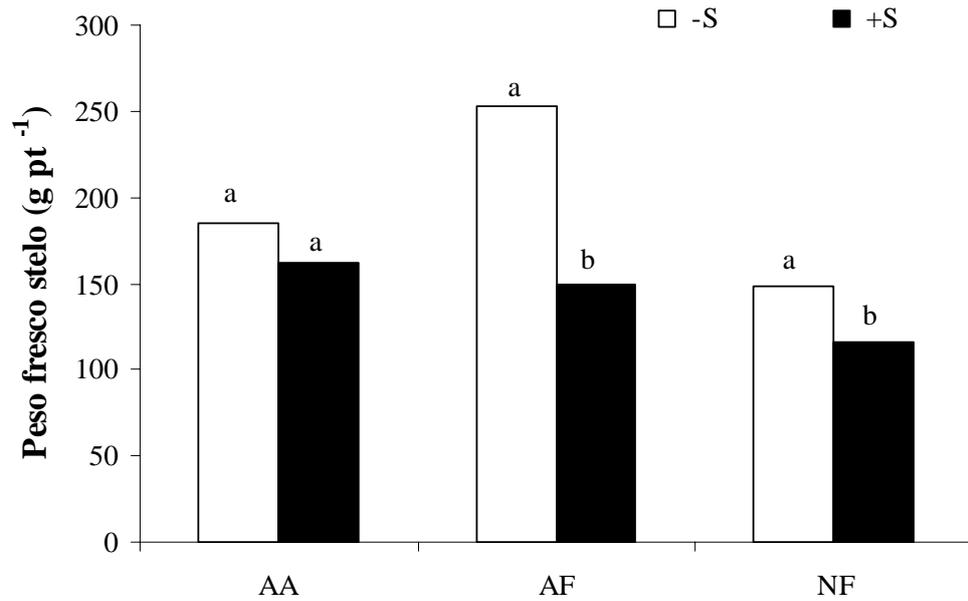


Figura 13: Interazione tra salinità e ambiente di coltivazione sul peso fresco dello stelo. All'interno di ogni ambiente di coltivazione lettere differenti indicano differenze significative con $P \leq 0.05$.

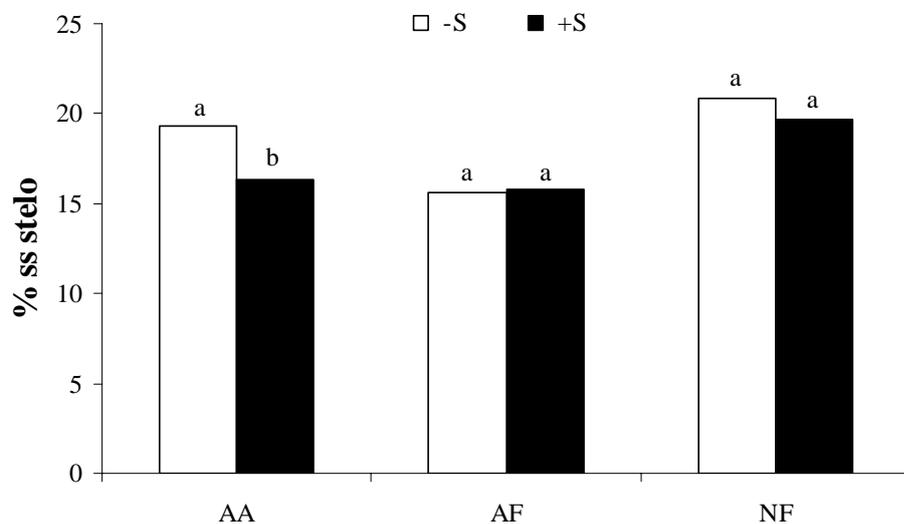


Figura 14: Interazione tra ambiente di coltivazione e salinità sulla percentuale di sostanza secca dello stelo. All'interno di ogni ambiente di coltivazione lettere differenti indicano differenze significative con $P \leq 0.05$.

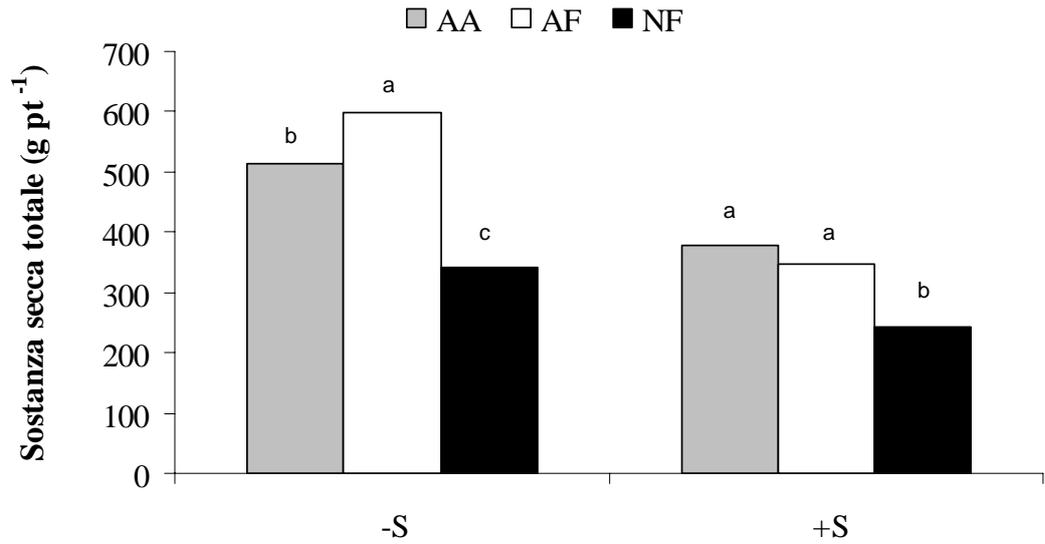


Figura 15: Interazione tra ambiente di coltivazione e salinità sulla sostanza secca totale prodotta. All'interno di ogni trattamento salino lettere differenti indicano differenze significative con $P \leq 0.05$.

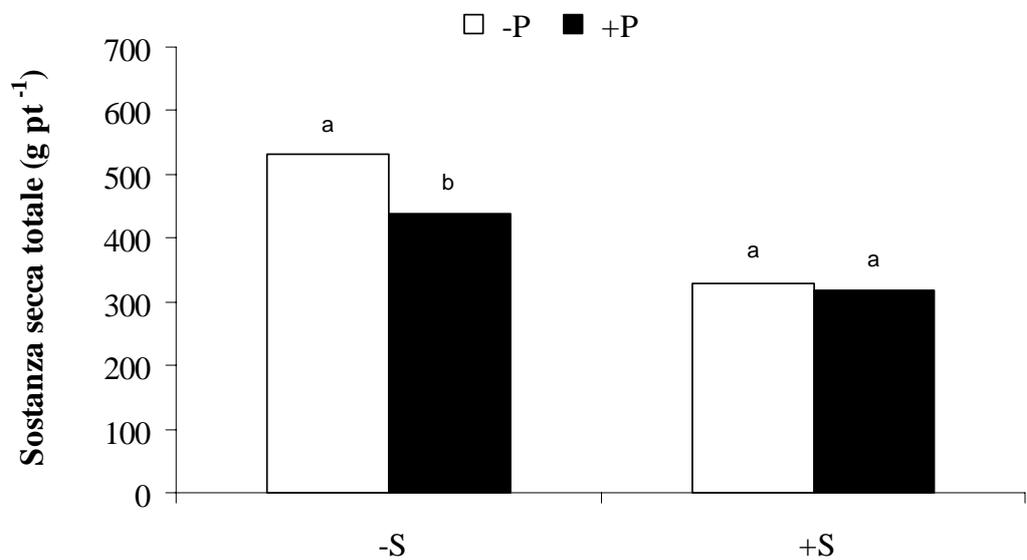


Figura 16: Interazione tra salinità e prolina sulla sostanza secca totale prodotta. All'interno di ogni trattamento salino lettere differenti indicano differenze significative con $P \leq 0.05$.

Bacche			
	numero n pt ⁻¹	produzione g pt ⁻¹	sostanza secca %
Ambiente			
AA	43 a	846,9 a	8,9 a
AF	38 b	887,6 a	8,7 a
NF	36 c	520,5 b	9,0 a
	*	**	n.s.
Sale			
-S	44	923,0	7,5
+S	36	580,4	10,3
	**	**	**
Prolina			
-P	40	722,8	9,1
+P	40	780,6	8,7
	n.s.	*	**
Interazioni			
AxS	**	**	n.s.
AxP	n.s.	**	n.s.
SxP	*	n.s.	n.s.
AxSxP	n.s.	**	n.s.

Tabella 5: Effetto dei trattamenti sulla produzione di bacche. AA=aria ambiente; AF=aria filtrata e NF=aria non filtrata OTC; n.s., *, **, *** indicano rispettivamente medie non differenti o differenti per $P \leq 0.05$, 0.01, 0.001.

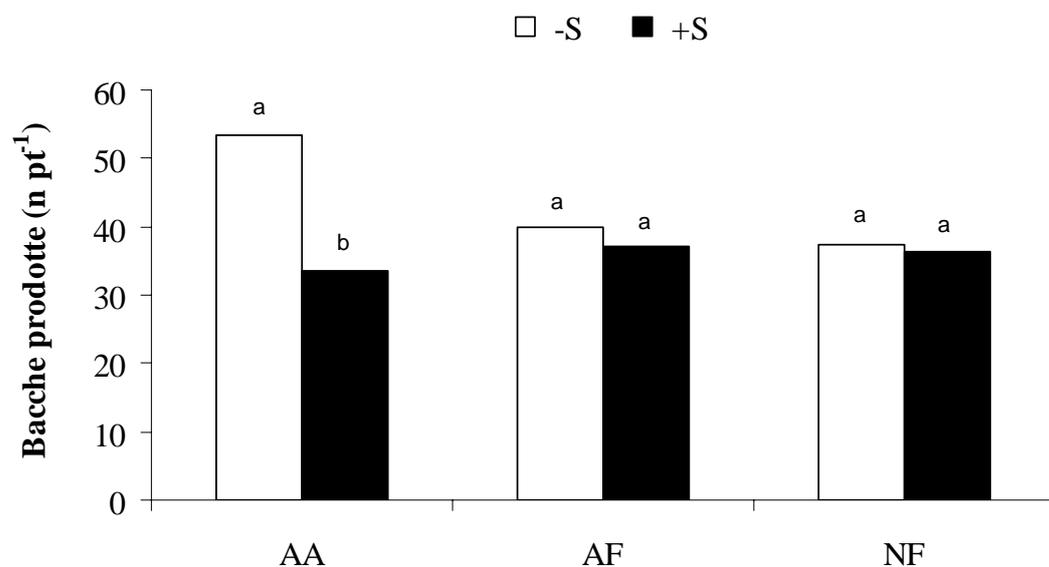


Figura 17: Interazione tra ambiente di coltivazione e salinità sul numero di bacche prodotte. All'interno di ogni ambiente di coltivazione lettere differenti indicano differenze significative con $P \leq 0.05$.

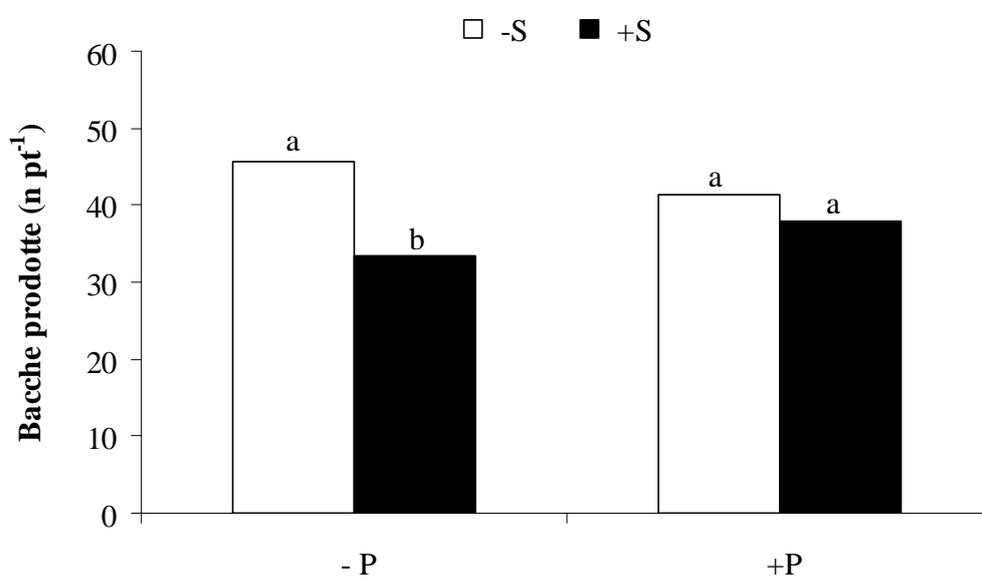


Figura 18: Interazione tra salinità e prolina sul numero di bacche prodotte. All'interno di ogni trattamento con prolina lettere differenti indicano differenze significative con $P \leq 0.05$.

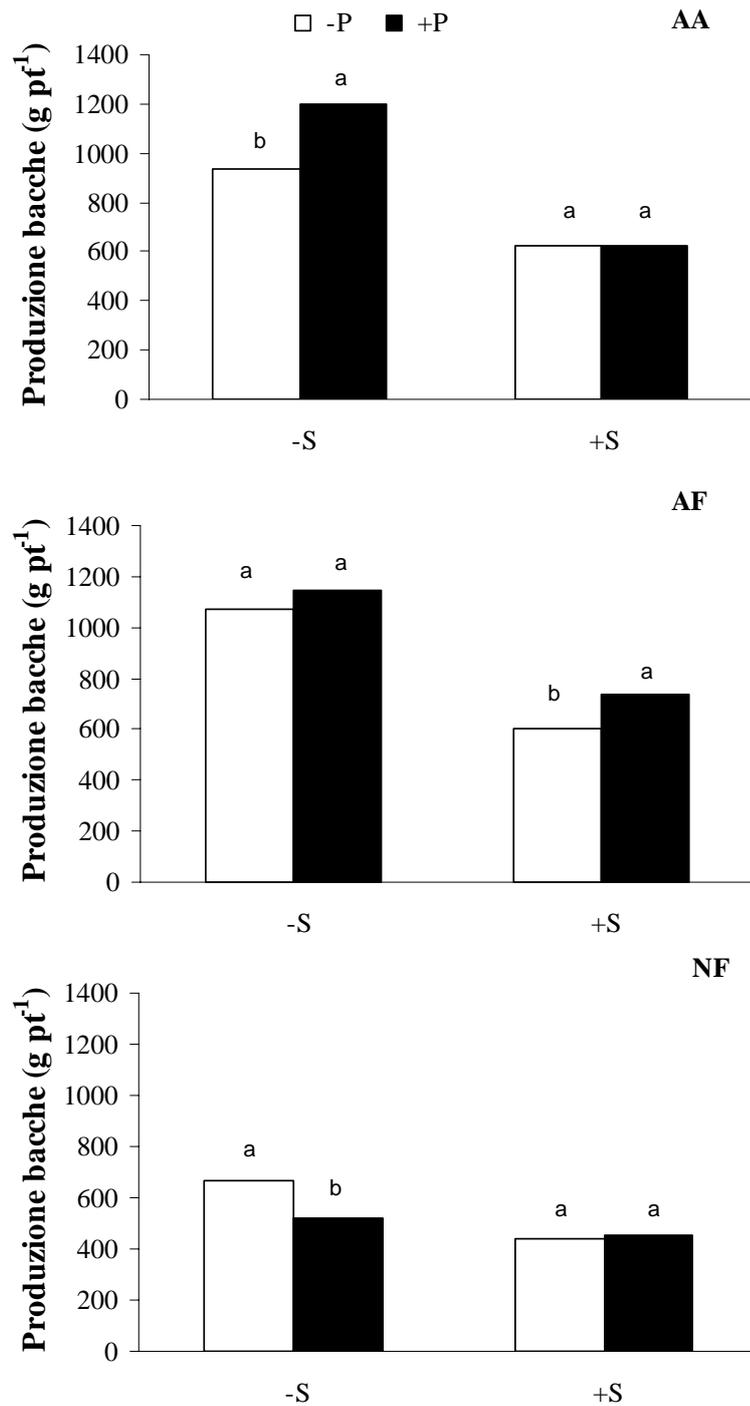


Figura 19: Interazione tra ambiente di coltivazione, salinità e prolina sul numero di bacche prodotte. All'interno di ogni trattamento salino lettere differenti indicano differenze significative con $P \leq 0.05$.

Risposta fisiologica e antiossidanti

La resistenza stomatica, misurata il 27 giugno, il 12 e il 21 luglio (28, 43 e 52 DAT), è variata durante il ciclo di coltivazione con i valori massimi raggiunti a 52 DAT (Tabella 6). Nelle piante sottoposte ad ozono la resistenza stomatica è aumentata a tutte le ore del giorno con valori medi di $1,58 \text{ s cm}^{-1}$ in NF vs. $0,86 \text{ s cm}^{-1}$ in AF. Anche le piante coltivate nelle camere hanno mostrato valori di resistenza stomatica più alti ($1,09 \text{ s cm}^{-1}$ in AA vs. $1,58 \text{ s cm}^{-1}$ in NF OTC). Il sale e la prolina hanno mostrato effetti opposti poiché il primo ha incrementato la resistenza stomatica ($1,42 +S$ vs. $0,94 -S$, nella media delle ore di misura) mentre il secondo ha ridotto la resistenza stomatica di circa il 15% ($1,08 +P$ vs. $1,27 -P$, nella media delle ore di misura) (Tabella 6). Per le misure effettuate alle ore 9:00 è stata registrata una interazione tra salinità e prolina (Figura 20). La prolina ha ridotto la conduttanza stomatica delle piante irrigate con acque saline mentre non sono state registrate differenze quando le piante erano irrigate con acqua di non salinizzata. Alle ore 13:00 è stata registrata una interazione tra ambiente di coltivazione, salinità e prolina. I trattamenti con prolina hanno ridotto la resistenza stomatica delle piante irrigate con acqua normale in AA, AF e NF, mentre in presenza di stress salino questo effetto è stato riscontrato solo in NF (Figura 21).

Il potenziale totale (Ψ_{tot}) e il potenziale osmotico (Ψ_{π}) misurati a 45 e 52 DAT sono variati durante il ciclo di coltivazione, con valori minori registrati nell'ultima data di misura (Tabella 7). L'ambiente di coltivazione (AA e OTC), diversamente da quanto registrato per la resistenza stomatica, non ha influenzato i valori di Ψ_{tot} e Ψ_{π} e turgore. È stata tuttavia registrata una interazione tra l'ambiente di coltivazione e la salinità per il Ψ_{tot} e il Ψ_{π} con una riduzione dei potenziali per le piante coltivate nelle OTC (AF e NF) rispetto a quelle coltivate in pien'aria (AA), solo nella tesi irrigata con acqua non salinizzata (Figura 22 A e B).

Invece, le piante irrigate con acqua salinizzata hanno mostrato valori di Ψ_{tot} e Ψ_{π} più bassi e non differenti tra i 3 ambienti di coltivazione.

In tabella 7 è riportato l'effetto dei trattamenti sull'attività antiossidante idrofila (AAI) e lipofila (AAL) espressa sul peso fresco misurata su bacche mature di pomodoro raccolte il 4 agosto 2006. L'ambiente di coltivazione non ha influenzato l'AAI, mentre ha modificato l'AAL facendo registrare significative riduzioni nelle OTC. La salinità ha incrementato sia l'AAI che l'AAL mentre la prolina ha ridotto la prima ed incrementato la seconda. È stata registrata una interazione significativa tra ambiente di coltivazione e trattamenti con prolina per l'AAI. Nello specifico l'AAI in AA e AF è risultata maggiore per le bacche di piante non trattate con prolina, mentre non sono state registrate differenze per le piante coltivate in NF (Figura 23). Sia per l'AAI che per l'AAL è stata rilevata un'interazione tra ambiente di coltivazione e acqua di irrigazione. La presenza di ozono (sia in AA che in NF) ha ridotto l'AAI in -S, mentre in +S l'effetto camera e l'ozono insieme (NF) hanno incrementato l'AAI (Figura 24). L'effetto camera ha ridotto l'AAL in +S (AA vs. AF e NF), mentre in -S è stata registrata una riduzione in NF rispetto a AF (Figura 25).

	ore 09:00 s cm ⁻¹	ore 13:00 s cm ⁻¹	ore 17:00 s cm ⁻¹	media s cm ⁻¹
DAT				
28	1,08 a	1,20 b	1,14 b	1,14 b
43	1,04 a	1,28 ab	1,13 b	1,15 b
52	1,11 a	1,38 a	1,22 a	1,24 a
	n.s.	**	**	**
Ambiente				
AA	0,99 b	1,17 b	1,10 b	1,09 b
AF	0,82 c	0,92 c	0,84 c	0,86 c
NF	1,42 a	1,78 a	1,54 a	1,58 a
	**	**	**	**
Sale				
-S	0,85	1,01	0,95	0,94
+S	1,30	1,57	1,38	1,42
	**	**	**	**
Prolina				
-P	1,12	1,44	1,24	1,27
+P	1,03	1,14	1,08	1,08
	**	**	**	**
Interazioni				
AxS	n.s.	**	*	**
AxP	n.s.	**	*	**
SxP	*	**	n.s.	**
AxSxP	n.s.	**	**	**

Tabella 6: Effetto dei trattamenti sulla resistenza stomatica misurata 28, 43 e 52 DAT. AA=aria ambiente; AF=aria filtrata e NF=aria non filtrata OTC; n.s., *, **, *** indicano rispettivamente medie non differenti o differenti per $P \leq 0.05$, 0.01, 0.001.

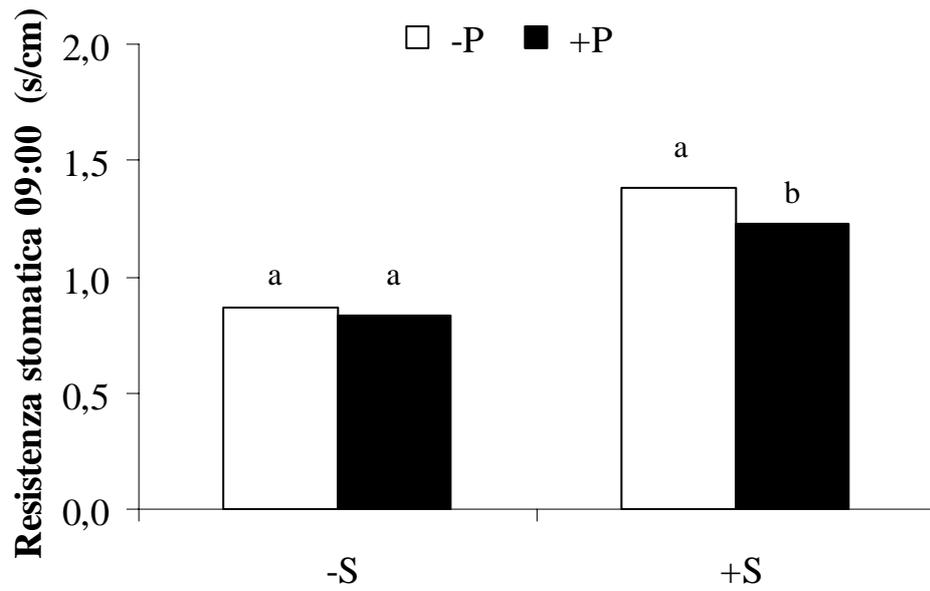


Figura 20: Interazione tra salinità e prolina sulla resistenza stomatica misurata alle ore 09.00. All'interno di ogni trattamento salino lettere differenti indicano differenze significative con $P \leq 0.05$.

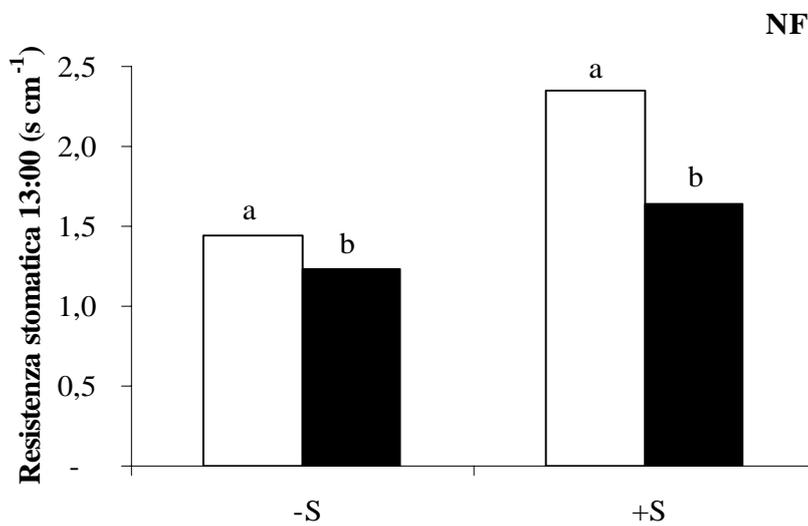
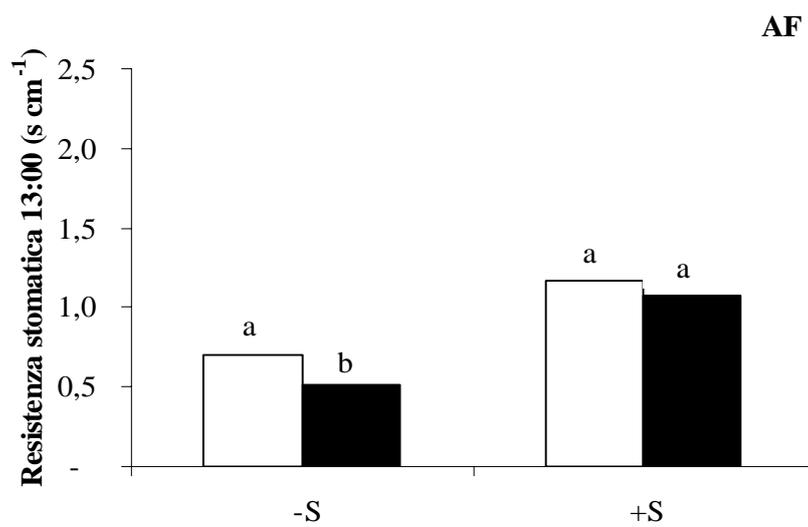
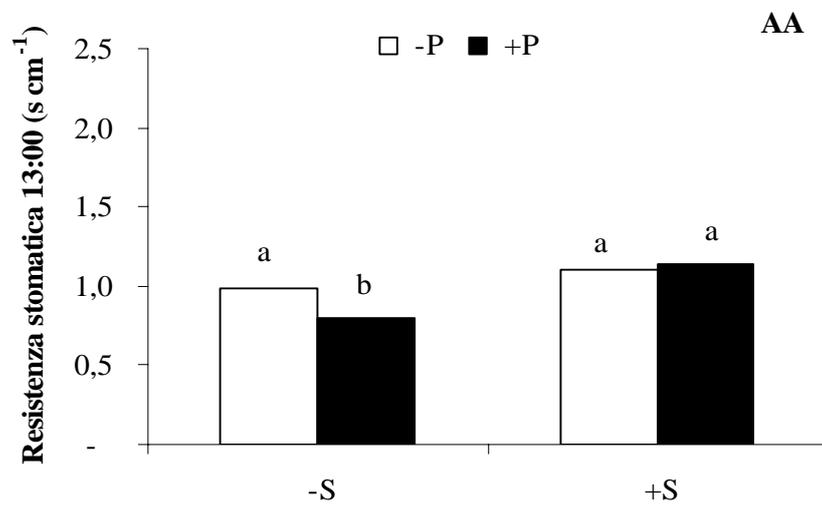


Figura 21: Interazione tra ambiente di coltivazione, prolina e salinità sulla resistenza stomatica misurata alle ore 13:00. All'interno di ogni trattamento salino lettere differenti indicano differenze significative con $P \leq 0.05$.

	Ψ_{tot} MPa	Ψ_{π} MPa	Turgore MPa
DAT			
45	-1,04	-1,22	0,18
52	-1,09 **	-1,28 **	0,19 n.s.
Ambiente			
AA	-1,04 a	-1,24 a	0,20 a
AF	-1,07 a	-1,26 a	0,19 a
NF	-1,08 a n.s.	-1,26 a n.s.	0,18 a n.s.
Sale			
-S	-0,92	-1,08	0,16
+S	-1,21 **	-1,42 **	0,21 **
Prolina			
-P	-0,99	-1,18	0,19
+P	-1,13 **	-1,33 **	0,20 n.s.
Interazioni			
AxS	*	*	n.s.
AxP	n.s.	n.s.	n.s.
SxP	*	**	n.s.
AxSxP	n.s.	n.s.	n.s.

Tabella 7: Effetto dei trattamenti su Ψ_{tot} , Ψ_{π} e Turgore misurati 45 e 52 DAT.

AA=aria ambiente; AF=aria filtrata e NF=aria non filtrata OTC; n.s., *, **, *** indicano rispettivamente medie non differenti o differenti per $P \leq 0.05$, 0.01, 0.001.

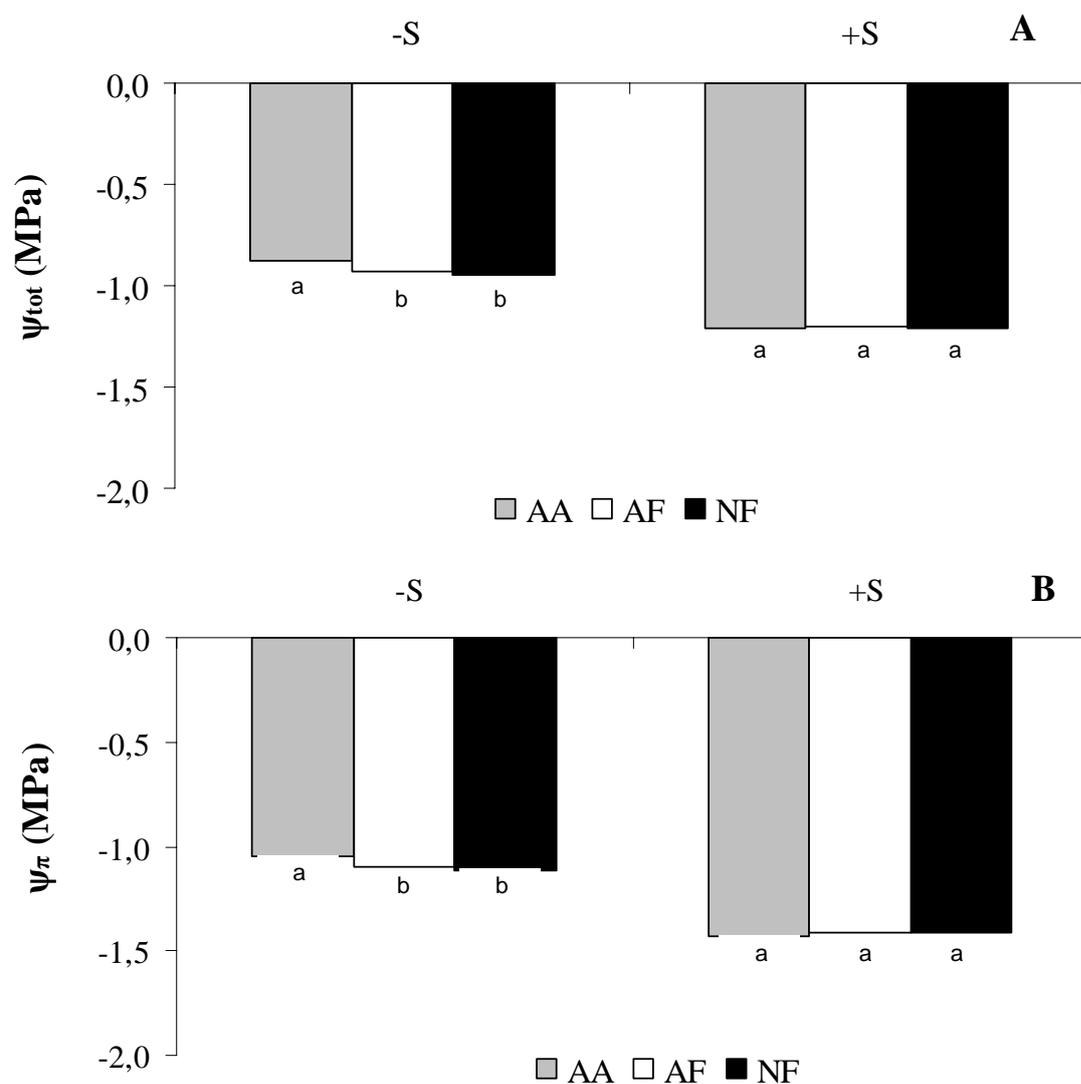


Figura 22: Interazione tra salinità e ambiente di coltivazione su Ψ_{tot} (A) e il Ψ_{π} (B). All'interno di ogni trattamento salino lettere differenti indicano differenze significative con $P \leq 0.05$.

	AAI mmol ac. Ascorbico/100g pf	AAL mmol trolox/100g pf
Ambiente		
AA	2,25 a	0,048 a
AF	2,28 a	0,044 ab
NF	2,33 a	0,043 b
	n.s.	*
Sale		
-S	1,75	0,031
+S	2,82	0,059
	**	**
Prolina		
-P	2,40	0,044
+P	2,17	0,046
	**	n.s.
Interazioni		
AxS	**	*
AxP	**	n.s.
SxP	n.s.	n.s.
AxSxP	n.s.	n.s.

Tabella 7: Effetto dei trattamenti sull'attività antiossidante idrofila (AAI) e lipofila (AAL) espressa sul peso fresco. AA=aria ambiente; AF=aria filtrata e NF=aria non filtrata OTC; n.s., *, **, *** indicano rispettivamente medie non differenti o differenti per $P \leq 0.05$, 0.01, 0.001.

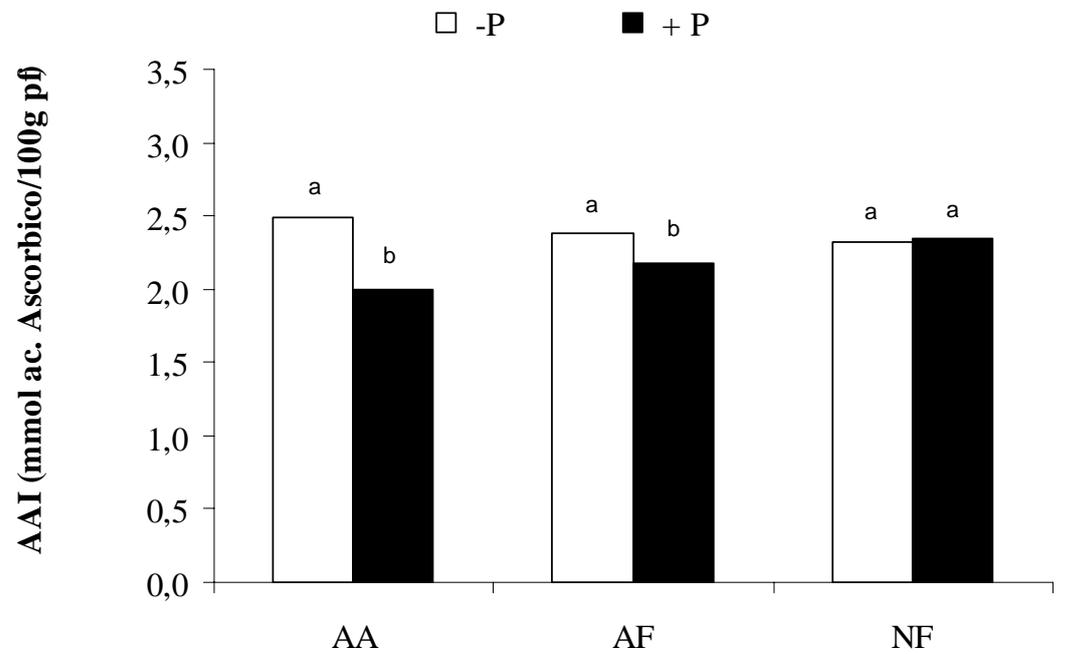


Figura 23: Interazione tra ambiente di coltivazione e prolina sull'AAI. All'interno di ogni trattamento salino lettere differenti indicano differenze significative con $P \leq 0.05$.

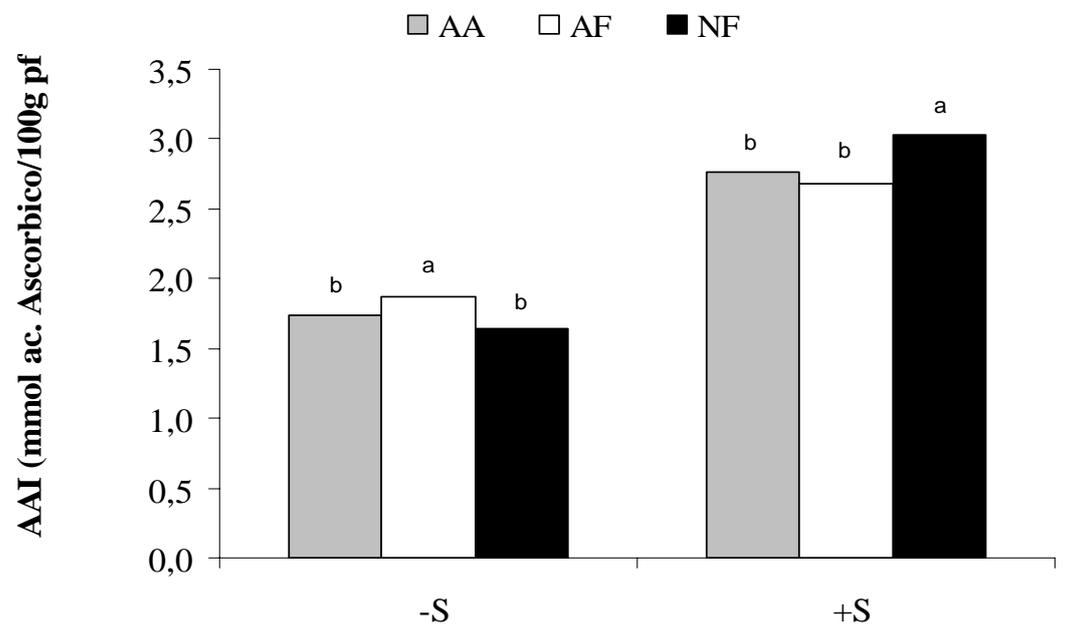


Figura 24: Interazione tra salinità e ambiente di coltivazione sull' AAI. All'interno di ogni trattamento salino lettere differenti indicano differenze significative con $P \leq 0.05$.

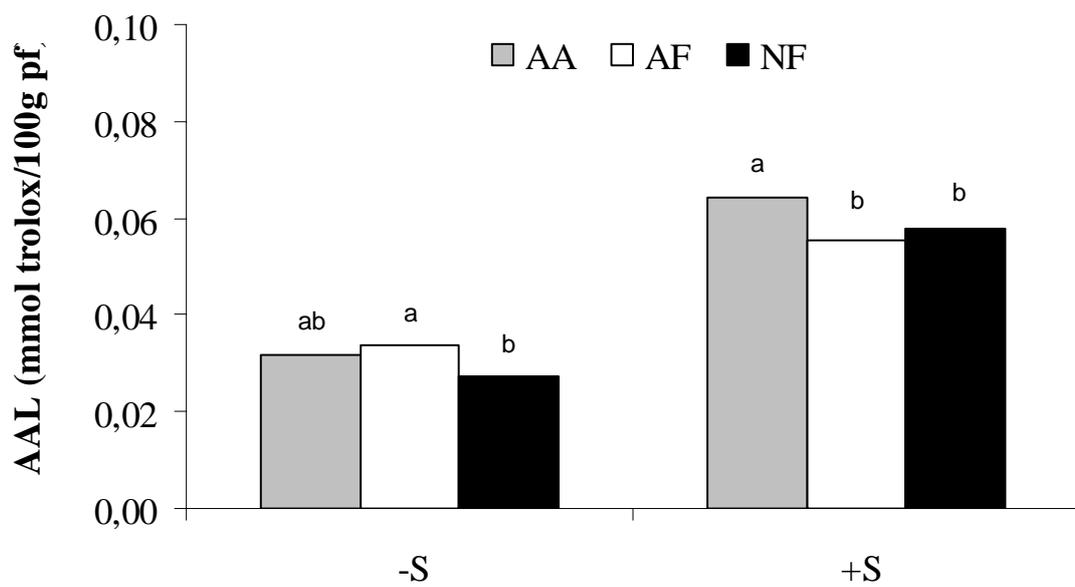


Figura 25: Interazione tra salinità e ambiente di coltivazione sull'AAL. All'interno di ogni trattamento salino lettere differenti indicano differenze significative con $P \leq 0.05$.

3.4 Discussione

Produzione e conduttanza stomatica

La possibilità di individuare tecniche colturali eco-compatibili innovative per migliorare la risposta agli stress ambientali ed allo stesso tempo il valore nutrizionale delle produzioni ortive, è strettamente dipendente da una conoscenza approfondita della fisiologia della coltura in generale e nello specifico ambiente di coltivazione. L'impiego di composti naturalmente prodotti dalla pianta quali sostanze "antistress" con funzione protettiva da poter somministrare durante le normali operazioni colturali, si basa sul principio del potenziamento di meccanismi fisiologici di difesa propri della pianta. In molti casi l'attivazione di meccanismi di difesa a stress ambientali o abiotici comporta anche l'accumulo di molecole ad elevato valore nutrizionale, quali ad esempio quelle a funzione antiossidante (De Pascale *et al.*, 2003). Benché la prolina abbia anche questa funzione (Alia e Saradhi, 1993; Delauney e Verma, 1993; Naqvi *et al.*, 1994), non è questo il suo ruolo principale nel processo di adattamento allo stress. Almeno per quanto sappiamo sino ad oggi la funzione fondamentale della prolina è quella di ridurre il potenziale osmotico cellulare e di ristabilire un gradiente di potenziale idrico favorevole all'ingresso di acqua nella pianta. I nostri risultati confermano le osservazioni di Makela *et al.* (1998 a, 1999) in merito all'effetto dei trattamenti con osmoliti sulla resistenza stomatica (Tabella 6). La prolina ha ridotto la resistenza stomatica in tutti gli ambienti di coltivazione (eccetto che in AA +S) (Figura 21). In accordo con Makela *et al.* (1998 b) in presenza di uno stress singolo (solo ozono in -S AA, e solo salinità in +S AF) è stato anche registrato un aumento della produzione di bacche per pianta (Figura 19). Tuttavia in NF OTC, quando le piante erano sottoposte alle più severe condizioni ambientali (stress da

ozono e temperatura elevata, VPD e radiazione limitanti) la prolina non ha esercitato alcun effetto sul controllo dalla chiusura stomatica ed ha invece acuito i danni da stress riducendo la produzione di bacche in -S. Questa risposta potrebbe spiegarsi con un effetto osmotico della prolina nella soluzione circolante. Se pur utilizzata a concentrazioni modeste (10 mM), la prolina potrebbe aver avuto effetti negativi su piante già stressate. Infatti in presenza di stress osmotico dovuto all'irrigazione con acque saline, la produzione è stata più bassa e la prolina non ha avuto effetti.

Contrariamente a quanto riportato da Makela *et al.* (1999) l'incremento della conduttanza stomatica registrato dalle piante trattate con prolina non ha indotto un incremento della sostanza secca totale prodotta, piuttosto una diminuzione di circa il 13% (Tabella 4). L'incremento delle produzioni registrato in AA e AF non è stato quindi dovuto ad una generalizzata maggiore produzione di sostanza secca delle piante (Figura 16), piuttosto si è verificato un maggiore accumulo di questa negli organi riproduttivi a discapito di foglie e stelo (Tabella 4). La maggiore produzione di bacche è stata registrata in -S AA, segno che in condizioni climatiche ottimali per la specie oggetto di studio la prolina è in grado di ridurre i danni degli stress abiotici attivando una serie di meccanismi di difesa. In accordo con Robinson *et al.* (1998) e Benton *et al.* (2000) le piante in presenza di ozono hanno ridotto gli scambi gassosi tra il mesofillo e l'ambiente esterno incrementando la resistenza stomatica durante la giornata (Tabella 6). In AF -S sono stati registrati i valori minimi di resistenza stomatica e le massime produzioni di sostanza secca, indicando che in assenza di ozono la fotosintesi è incrementata in seguito ai maggiori scambi gassosi con un conseguente incremento della sostanza secca prodotta (Figura 21 e Figura 15).

In accordo con Romero-Aranda *et al.* (2001), Ho (1989), Adams (1991) e Petersen *et al.* (1998) la salinità ha ridotto lo sviluppo della pianta ed ha aumentato la percentuale di sostanza secca delle bacche mature, foglie e steli.

Produzione di molecole ad attività antiossidante

La produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è una inevitabile conseguenza del metabolismo cellulare (Møller 2001). In presenza di stress biotici e/o abiotici (stress idrico, salino, termico e ozono) aumenta la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nella pianta (Apell e Hirt, 2004; Sharma e Davis, 1997; Zhu 2001). Quando queste molecole sono presenti in quantità superiore rispetto alla capacità di detossificazione del metabolismo cellulare reagiscono con le proteine, gli amminoacidi, gli acidi nucleici, causano la perossidazione delle membrane lipidiche e possono innescare reazioni radicaliche a catena (Baier *et al.*, 2005). La zona più esterna delle bacche di pomodoro è naturalmente ricca di molecole ad attività antiossidante che hanno il compito di limitare le reazioni foto-ossidative che in presenza di luce generano le ROS (Toor e Savage, 2005). Uno dei meccanismi di difesa che le piante possono attuare in queste condizioni è incrementare la sintesi di sostanze ad azione antiossidante, capaci di reagire con le ROS e ridurre i danni causati da queste molecole alle strutture cellulari (Zhu 2001). Inoltre, poiché lo stress stimola nelle piante la produzione di molecole con attività antiossidativa (Hasegawa *et al.*, 2000), l'applicazione di moderati stress potrebbe indurre incrementi del contenuto di carotenoidi con un conseguente miglioramento del valore nutrizionale delle bacche di pomodoro. Petersen *et al.* (1998) hanno infatti osservato un maggiore contenuto di carotenoidi in bacche di piante di pomodoro irrigate con acque

saline. Gli stessi autori hanno, tuttavia, attribuito l'incremento ad un effetto "concentrazione" dovuto al ridotto contenuto idrico. De Pascale *et al.* (2001; 2003) hanno dimostrato che la quantità di carotenoidi totali nei frutti di piante sottoposte a moderato stress salino (4.4 dS/m) è maggiore di quello attribuibile al solo effetto concentrazione. Il confronto tra i risultati ottenuti in questa prova ed altri riportati in letteratura (Petersen *et al.*, 1998; De Pascale *et al.* 2001; 2003; Navarro *et al.* 2006) conferma la possibilità di incrementare il contenuto di antiossidanti (sia nella loro frazione idrofila che in quella lipofila) con un moderato stress salino (Tabella 7, Figure 24 e 25). Occorre comunque notare che l'interazione tra salinità ed ambiente di coltivazione ha incrementato l'AAI in +S NF, mentre la presenza di ozono in assenza di stress salino ha avuto effetto contrario, probabilmente perché componenti dell'AAI hanno agito da substrato di reazione per le ROS prodotte dall'esposizione all' O₃, maggiore in -S a causa della minore resistenza stomatica (Figura 24). L'acido ascorbico (ASA), una delle maggiori componenti dell'AAI, è implicato nel processo di chiusura stomatica sia in condizioni ambientali ottimali che in presenza di stress (Maggio *et al.*, 2002). Le riduzioni di resistenza stomatica e AAI (Tabella 6 e Figura 23) indotte dai trattamenti con prolina in AA e AF potrebbero suggerire che i trattamenti con prolina esogena possono avere interferito con i processi di sintesi/degradazione dell'ASA a livello cellulare. Quando le piante erano esposte sia all'ozono che all'effetto camera non sono state registrate differenze per l'AAI, probabilmente a causa della maggiore degradazione di queste molecole dovuta alla somma degli stress salino e termico. In accordo con Dumas *et al.* 2003 i valori di temperatura superiori a 30°C (Figura 9 A) e la riduzione della radiazione luminosa registrati nelle OTC hanno ridotto l'AAL quando le piante erano irrigate con acque saline. In assenza di stress osmotico le migliori condizioni generali delle piante dovute

all'assenza di ozono hanno mascherato questo effetto, con una riduzione significativa solo per le piante in NF (Figura 25).

3.5 Conclusioni

Anche questo esperimento ha confermato che le concentrazioni di ozono in ambiente mediterraneo sono tali da ridurre le produzioni e influenzare la resistenza stomatica in piante di pomodoro. L'irrigazione con acque moderatamente saline ha ridotto in termini relativi l'effetto dell'ozono sulla produzione di bacche e sulla sostanza secca totale prodotta, tuttavia in termini assoluti le produzioni sono sempre risultate ridotte in seguito ad irrigazione con acqua salina. In accordo con diversi studi, il livello di stress osmotico testato in questo esperimento ha incrementato la sintesi/accumulo di sostanze ad attività antiossidante.

I trattamenti con prolina hanno influenzato la risposta fisiologica delle piante. La riduzione della resistenza stomatica ha incrementato i flussi di ozono tra l'ambiente e le foglie amplificando l'effetto dell'ozono e dell'ambiente di coltivazione nelle camere non filtrate. Tuttavia la maggior apertura stomatica non è sempre stata associata ad un maggior danno da ozono. In relazione a questo punto, ed allo sviluppo di modelli di previsione, siamo stati in grado di sviluppare un sistema colturale controllato in cui possiamo modulare la resistenza stomatica attraverso l'imposizione di uno stress salino (chiusura stomatica) o la somministrazione di prolina (apertura stomatica) in misura funzionale allo studio dei danni da ozono in relazione ai flussi in entrata e ad eventuali modifiche del profilo metabolico.

In condizioni che simulavano la coltivazione in piano campo, il trattamento con prolina ha migliorato l'adattamento delle piante alle condizioni ambientali incrementando la produzione di bacche, che è risultata maggiore anche rispetto all'ambiente filtrato. Dal punto di vista pratico/applicativo, i nostri

risultati indicano effetti positivi dei trattamenti con questo osmolita per il pomodoro coltivato in pieno campo, benché non siamo in grado di determinare con i dati a disposizione in che modo questa molecola determina un migliore adattamento della pianta all'ambiente. Ulteriori studi sono tuttavia necessari per studiare l'effetto dei trattamenti in funzioni delle diverse fasi fenologiche e per individuare le dosi ottimali di osmolita da utilizzare.

4. Appendice



Foto 1: Campo sperimentale presso il parco Gussone (Portici, Napoli).



Foto 2: Open Top Chamber (OTC) con sistema di filtraggio dell'aria.



Foto 3: piante coltivate in Aria Ambiente (luglio 2006).



Foto 4: Sistema vaso - riserva idrica.

5. Bibliografia

- Abarca, J.F., Casiccia, C.C., 2002. *Skin cancer and ultraviolet-B radiation under the Antarctic ozone hole: southern Chile, 1987-2000*. *Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine* 18 (6): 294-302.
- Alia P.P., Saradhi P.P., 1993. *Suppression in mitochondrial electron-transport is the prime cause behind stress-induced proline accumulation*. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 193, 54-58.
- AOAC, 1990. *Official method of analysis - vitamins and other nutrients*, p. 1058-1060.
- Apell, K., e Hirt, H., 2004. *Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction*. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373-399.
- Ashmore M.R., Emberson L.D., 1999. *Development of flux models for Level II mapping of ozone*. In: Fuhrer J., Achermann B. (eds), *Critical levels for ozone – Level II*. Environmental Documentation 115. Swiss Agency for the Environment, Forest and Landscape, Bern, Switzerland 37-40.
- Ashmore, M.R., 2005. *Assessing the future global impacts of ozone on vegetation*. *Plant, Cell and Environment* 28, 949-964.
- Baier, M., Kandlbinder, A., Gollack, D., Dietz, K.J., 2005. *Oxidative stress and ozone: perception, signalling and response*. *Plant, Cell and Environment*, 28, 1012-1020.
- Benton, J., Fuhrer, J., Gimeno, B.S., Skarby, L. Palmer-Brown, D., Ball, G., Roadknight, C., Mills, G., 2000. *An international cooperative programme indicates the widespread occurrence of ozone injury on crops*. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 78, 19-30.

- Bolhàr-Nordenkamp H.R., Loibl W., Gatscher B., Smidt St., 1999. *Adaptation to “pre-industrial” ozone concentrations – the cause for a fundamental change in the Austrian ozone risk map*. In: J. Fuhrer and B. Achermann (eds.). *Critical Levels for Ozone – Level II*. Environmental Documentation No.115. Swiss Agency for Environment, Forest and Landscape, Bern, 55-61.
- Bull K.,1996. Workshop Summary. In: Karenlampi, L., Skarby, L. (eds.) *Critical levels for ozone in Europe: Testing and finalizing the concepts*. UN-ECE Workshop Report, University of Kuopio, Department of Ecology and Environmental Science, Finland 7-8.
- 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 of the USA 93, 9970–9974.
- Conklin P.L. e Barth C., 2004. *Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plant to ozone, pathogens, and the onset of senescence*. Plant, Cell and Environment 27, 959-970.
- D’Haese, D., Vandermeiren, K., Asard, H., Horemans, N., 2005. *Other factors than apoplastic ascorbate contribute to the differential ozone tolerance of two clones of Trifolium Repens L*. Plant, Cell and Environment 28, 623-632.
- D’Amato, G., Liccardi, G., D’Amato, M., Holgate, S., 2005 *Environmental risk factors and allergic bronchial asthma*. Clinical and Experimental Allergy 35 (9): 1113-1124.
- Delauney, A.J., Verma, D.P.S., 1993. *Proline biosynthesis and osmoregulation in plants*. Plant Journal 4, 215-223.

- De Pascale S., Maggio A., Fagnano, V., Ambrosino, P., Ritieni, A., 2001. *Irrigation with saline water improves carotenoids content and antioxidants activity of tomato*. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 76, 447-453.
- De Pascale, S., Maggio, A., Barbieri, G., Ruggiero, C., 2003. *Growth, Water Relations, and Ion Content of Field Grown Celery Under Saline Irrigation (Apium graveolens L. var. dulce [Mill.] pers.)*. Journal of American Society for Horticultural Science. 128(1): 136-143.
- Dobson, M.C., Taylor G., Freer-Smith P.H., 1990. *The control ozone uptake by Picea abies (l.) Karst. An Picea sitchensis (Bong.) Carr. During drought and interacting effects on shoot water relations*. New Phytologist 116, 465-474.
- Donnelly, A., Craigon J., Black C.R., Colls J.J., Landon G., 2001. *Elevated CO₂ increases biomass and tuber yield in potato even at high ozone concentrations*. New Phytologist 149, 265-74.
- Dumas, Y., Dadomo, M., Di Lucca, G., Pascal, G., 2003. *Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes*. Journal of the Science of Food and Agriculture 83, 369-382.
- Emberson, L.D., Kuylenstierna J.C.I., Cambridge H.M., Cinderby S., Ashmore M.R., 1996. *Mapping relative potential sensitivity of vegetation to ozone in Europe: a preliminary analysis*. In: Kärenlampi L., Skärby L. (eds.) Critical levels for ozone in Europe: Testing and finalizing the concepts. UN-ECE Workshop Report, University of Kuopio, Department of Ecology and Environmental Science, Kuopio - Finland, 223-227.

- Emberson L.D., Ashmore M.R., Cambridge H.M., 1998. DETR Report n.EPG. 1/3/82, Imperial College Centre for Environmental Technology, London, 113 pp.
- Emberson, L.D., Ashmore M.R., Cambridge H.M., Simpson D., Tuovinen J.P., 2000. *Modelling stomatal ozone flux across Europe*. Environmental Pollution 109, 403-413.
- Emberson, L.D., Wieser, G., Ashmore, M.R., 2000. *Modelling of stomatal conductance and ozone flux of Norway spruce, comparison with field data*. Environmental Pollution 109, 393-402.
- Fagnano, M., 1995. *Tropospheric ozone concentration in Portici (Naples) in relation to meteorological parameters*. Agric Medit. S.V., 390-394.
- Fagnano, M., e Quaglietta Chiarandà, F., 2004. *Relazioni tra qualità dell'ambiente e produzione agricola*. Rivista di Agronomia 38, 33-84.
- Fagnano, M., Merola, G., Forlani, A., Postiglione, L., Fuhrer, J., 2004. *Monitoring yield loss from ozone pollution in a mediterranean environment: a comparison of methods*. Water Air Soil Pollution 155, 383-398.
- Fiscus, E.L., Reid C.D., Miller J.E., Heagle A.S., 1997. *Elevated CO₂ reduces O₃ flux and O₃-induced yield losses in soybeans: possible implications for elevated CO₂ studies*. Journal of Experimental Botany 48, 307-13.
- Fiscus, E.L., Booker, F.L., Burkey, K.O., 2005. *Crop responses to ozone: uptake, modes of action, carbon assimilation and partitioning*. Plant, Cell and Environment 28, 997-1011.
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., Ritieni, A., 1999. *Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wine*. Journal of Agriculture and Food Chemistry 47, 1035-40.

- Foyer, C.H., Noctor, G., 2005. *Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context*. *Plant, Cell and Environment* 28, 1056-1071.
- Freebairn, H.T., 1960. *The prevention of air pollution damage by use of vitamin C sprays*. *Journal of Air Pollution Control Association*, 10, 314–317.
- Fuhrer, J., 1996. *The critical level for effects of ozone on crops, and the transfer to mapping*. In: Kärenlampi L., Skärby L. (eds.). *Critical levels for ozone in Europe: Testing and finalizing the concepts*. UN-ECE Workshop Report, University of Kuopio, Department of Ecology and Environmental Science, Kuopio - Finland, 27-43.
- Fuhrer, J., 1997. *Ozone sensitivity of managed pastures*. In: Cheremisinoff P.N. (ed.). *Ecological Advances and Environmental Impact Assessment*. Huston, TX, USA: 681-706.
- Fuhrer, J., Skärby, L., Ashmore, M.R., 1997. *Critical levels for ozone effects on vegetation in Europe*. *Environmental Pollution* 97, 91-106.
- Fuhrer, J., 2000. *Special issue: Risk assessment for ozone effects on vegetation in Europe*. *Environmental Pollution* 109, 359-542.
- Fuhrer, J., e Booker, F., 2003. *Ecological issues related to ozone: agricultural issues*. *Environment International* 29, 141-154.
- Fumagalli, I., Gimeno B.S., Velissariou D., De Temmerman L., Mills G., 2001. *Evidence of ozone-induced adverse effect on crops in the Mediterranean region*. *Atmospheric Environment* 35, 2583-2587.
- Galinsky, E.A., Truper, H.G., 1994. *Microbial behavior in salt-stressed ecosystems*. *FEMS Microbiol Rev.* 15, 95–108.

- Gerosa, G., Ballarin Denti A., 2002. *Ozono e foreste in Lombardia: verso una valutazione di II livello*. *Informatore Fitopatologico* 3 41-45.
- Gleeson, D., Lelu-Walter M., Parkinson, M., 2004. *Influence of exogenous L-proline on embryogenic cultures of larch (Larix leptoeuropaea Dengler), sitka spruce (Picea sitchensis (Bong.) Carr.) and oak (Quercus robur L.) subjected to cold and salt stress*. *Annals of Forest Sciences* 61, 125–128.
- Grünhage, L., Jäger H.J., Haenel H.D., Hanewald K., Krupa S., 1997. *PLATIN (Plant-Atmosphere Interaction) I: a model of plant-atmosphere interaction for estimating absorbed doses of gaseous air pollutants*. *Environmental Pollution* 98, 51-60.
- Grünhage, L., Krause G.H.M., Köllner B., Bender J., Weigel H.-J., Jäger H.-J., Guderian R., 2001. *A new flux-oriented concept to derive critical levels for ozone to protect vegetation*. *Environmental Pollution* 111, 355-362.
- Halliwell, B., Cross C.E., 1994. *Oxygen derived species. Their relation to human disease and environmental stress*. *Environmental Health Perspectives* 102, 5-12 Suppl. 10.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R., Zhu, J.-K., and Bohnert, H.-J. 2000. *Plant cellular and molecular responses to high salinity*. *Annual Reviews of Plant Biology and Plant molecular Biology* 51, 463-499.
- Hassan, I.H., 2004. *Interactive effects of salinity and ozone pollution on photosynthesis, stomatal conductance, growth, and assimilate partitioning of wheat (Triticum aestivum L.)*. *Photosynthetica* 42, 111-116.
- Heagle, A.S., Miller J.E., Pursley W.A., 1998. *Influence of ozone stress on soybean response to carbon dioxide enrichment: III. Yield and seed quality*. *Crop Science* 38, 128–34.

- Heagle, A.S., Miller J.E., Booker F.L., Pursley W.A., 1999. *Ozone stress, carbon dioxide enrichment, and nitrogen fertility interactions in cotton*. Crop Science 39, 731–41.
- Heagle, A.S., Miller J.E., Pursley W.A., 2000. *Effects of ozone and carbon dioxide interactions on growth and yield of winter wheat*. Crop Science 40, 1656–64.
- Hu, Y.C., Schmidhalter, U., 2005. *Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants*. Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung und Bodenkunde 168 (4), 541-549.
- Hurst, A.C., Grams, T.E.E., Ratajczak, R., 2004. *Effects of salinity, high irradiance, ozone, and ethylene on mode of photosynthesis, oxidative stress and oxidative damage in the C-3/CAM intermediate plant Mesembryanthemum crystallinum L*. Plant Cell and Environment 27, 187-197.
- Jarvis, P.G., 1976. *The interpretation of the variations in leaf water potential and stomatal conductance found in canopies in the field*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B. Biological Sciences 273, 593-610.
- Kalabokas, P.D., Viras L.G., John G. Bartzis J.G., Repapis C.C., 2000. *Mediterranean rural ozone characteristics around the urban area of Athens*. Atmospheric Environment 34, 5199-5208.
- Kärenlampi, L., Skärby L., 1996. *Critical Levels for Ozone in Europe: Testing and Finalizing the Concepts*. UN/ECE Workshop Report. University of Kuopio, Department of Ecology and Environmental Science, Kuopio - Finland., 363.

- Khan, S. e Soja G., 2003. *Yield responses of wheat to ozone exposure as modified by drought-induced differences in ozone uptake*. Water, Air and Soil Pollution 147, 299-315.
- Khedr, A.H.A., Abbas, M.A., Wahid, A.A.A., Quick, W.P., Abogadallah, G.M., 2003. *Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress*. Journal of Experimental Botany 54, 2553-2562.
- Körner, C., Peterer J., Altrichtr C.H., Meusburger A., Slovik S., Zoschg M., 1995. *A simple empirical model to estimate annual dry deposition of atmospheric pollutants in needles of spruce and pine*. Allgemeine Forst. und Jagdzeitung 166, 1-9.
- Lee, S. e Yun S.C., 2006. *The ozone stress transcriptome of pepper (*Capsicum annuum* L.)*. Molecules and Cells 21(2), 197-205.
- Leonardi, C. e Martorana, M. 2005. *Stress osmotico e pomodoro in coltura protetta: risposta funzionale e strategie di intervento*. Italus Hortus 12, 43-56.
- Leonardi, C., Ambrosino, P., Esposito, F., Fogliano, V., 2000. *Antioxidative activity and carotenoid and tomatine contents in different typologies of fresh consumption tomatoes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48, 4723-4727.
- Lopez, C.M.L., Takahashi, H., Yamazaki, S., 2002. *Plant-Water Relations of Kidney Bean Plants Treated with NaCl and Foliarly Applied Glycinebetaine*. Journal of Agronomy and Crop Science 188, 73-80.
- Lorenzini, G., 2002. *Ozono e foreste: una introduzione al problema*. Informatore Fitopatologico 3, 9-12.

- Maas, E.V., Hoffman, G.J., 1977. *Crop salt tolerance, current assessment*. J. Irrig. Drain. Div. ASCE 103, 115-134.
- 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?* Plant Journal 31, 699-712.
- Maggio, A., De Pascale, S., Angelino, G., Ruggiero, C., Barbieri, G., 2004. *Physiological response of tomato to saline irrigation in long-term salinized soils*. European Journal of Agronomy 21, 149-159.
- Mäkelä, P., Munns, R., Colmer, T.D., Condon, A.G., Peltonen-Sainio P., 1998 a. *Effect of foliar applications of glycinebetaine on stomatal conductance, abscisic acid and solute concentrations in leaves of salt- or drought-stressed tomato*. Australian Journal of Plant Physiology 25, 655–663.
- Mäkelä, P., Jokinen, K., Kontturi, M., 1998 b. *Foliar application of glycinebetaine - a novel product from sugar beet - as an approach to increase tomato yield*. Industrial Crops and Products 7, 139-148.
- Mäkelä, P., Kontturi, M., Pehua E., Somersalo, S., 1999. *Photosynthetic response of drought- and salt-stressed tomato and turnip rape plants to foliar-applied glycinebetaine*. Physiologia Plantarum 105, 45–50.
- Massman, W.J., 2004. *Toward an ozone standard to protect vegetation based on effective dose: a review of deposition resistances and a possible metric*. Atmospheric Environment 38, 2323-2337.
- McKee, I.F., Eiblmeier M., Polle A., 1997. *Enhanced ozone-tolerance in wheat grown at an elevated CO₂ concentration: ozone exclusion and detoxification*. New Phytologist 137, 275 – 84.

- Merola, G., Forlani A., Piccolo R., Fagnano M., 2006. *Ozono e stress idrico: un biennio di prove in Open Top Chamber con due biotipi di trifoglio bianco (Trifolium repens L.)*. Italian Journal of Agronomy, In press.
- Miller, N.J., Paganga, G., Wiseman, S., Vannielen, W., Tijburg, L., Chowienczyk, P., Rice Evans, C.A., 1995. *Total antioxidant activity of low-density lipoproteins and the relationship with alpha-tocopherol status*. Febs Letters 365, 164-166.
- Miller, N.J., Rice Evans, C., 1997 a. *Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS(center dot+) radical cation assay*. Free Radical Research 26, 195-199.
- Miller, N.J., Rice Evans, C., 1997 b. *Factor influencing the antioxidant activity determined by the ABTS (.dagger) radical cation assay*. Free Radical Research 26, 594-594.
- Mills, G., Holland, M., Buse, A., Cinderby, S., Hayes, F., Emberson, L., Cambridge, H., Ashmore, M., Terry, A., 2003. *Introducing response modifying factors into a risk assessment for ozone effects on crops in Europe*. Establishing Ozone Critical Levels II. UN-ECE Workshop Report. IVL Report B 1523. IVL Swedish Environmental Research Institute, Gothenburg, Sweden.
- Mittler, R., 2002. *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance*. Trends in Plant Science 7, 405-410
- Mitler, R., 2006. *Abiotic stress, the field environment and stress combination*. Trends in Plant Science 11 (1), 15-19.
- Molinari, H.B.C., Marur, C.J., Filho, J.C.B., Kobayashi, A.K., Pileggi, M., Leite, R.P., Pereira, L.F.P., Vieira, L.G.E., 2004. *Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (Citrus sinensis Osb. x*

- Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. *Plant Science* 167, 1375–1381.
- Møller I.M., 2001. *Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, nadph turnover, and metabolism of reactive oxygen species*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52, 561-591.
- Morgan, P. B., Ainsworth, E.A., Long S. P., 2003. *How does elevated ozone impact soybean? A meta-analysis of photosynthesis, growth and yield*. *Plant, Cell & Environment* 26, 1317-1328.
- Mulholland, B.J., Taylor, I.B., Jackson, A.C., Thompson, A.J., 2003. *Can ABA mediate responses of salinity stressed tomato*. *Environmental and Experimental Botany* 50, 17-28.
- Musselman, R.C., Minnick T.J., 2000. *Nocturnal and stomatal conductance and ambient air quality standards for ozone*. *Atmospheric Environment* 34, 719-733.
- Okuma, E., Murakami, Y., Shimoishi, Y., Tada, M., Murata, Y., 2004. *Effects of exogenous application of proline e betaine on the growth of tobacco cultured cells under saline conditions*. *Soil Science Plant Nutrition* 50, 1301-1305.
- Oshima, R.J., Taylor, O.C., Braegelmann, P.K., Baldwin, D.W., 1975. *Effect of ozone on the yield and plant biomass of a commercial variety of tomato*. *Journal of Environmental Quality* 4, 463-464.
- Paoletti, E., Grulle, N.E., 2005. *Does living in elevated CO₂ ameliorate tree response to ozone? A review on stomatal responses*. *Environmental Pollution* 137, 483-493.

- Parrish, D.D., Ryerson T.B., Holloway J.S., Trainer M., Fehsenfeld F.C., 1999. *New Directions: Does pollution increase or decrease tropospheric ozone in Winter-Spring?*. Atmospheric Environment 33, 5147-5149.
- Pérez-Sirvent, C., Martínez-Sánchez, M.J., Vidal, J., Sánchez, A., 2003. *The role of low-quality irrigation water in the desertification of semi-arid zones in Murcia, Spain*. Geoderma 113, 109-125.
- Posch, M., Fuhrer J., 1999. In: Fuhrer & Achermann (Eds). *Critical levels for ozone – Level II*. Environmental Documentation N.115. Swiss Agency for Environment, Forest and Landscape, Bern, Switzerland, 49-53.
- Postiglione L, Fagnano M., 1995. *Ozone injury and ethylene diurea: first results on different species in the Campania region*. Agric Medit. S.V., 109-118.
- Puigdefàbregas, J., Mendizabal, T., 1998. *Perspectives on desertification: western Mediterranean*. Journal of Arid Environment 39, 209-224.
- Rao, M.V., Koch J.R., Davis K.R., 2000. *Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants*. Plant Molecular Biology 44 (3), 345-358.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radical Biology and Medicine 26, 1231-1237.
- Reinert, R.A., Eason, G., Barton, J., 1997. *Growth and fruiting of tomato as influenced by elevated carbon dioxide and ozone*. New Phytologist 137, 411-420.
- Robinson, M.F., Heat J., Mansfield T.A., 1998. *Disturbance in stomatal behaviour caused by air pollutants*. Journal of Experimental Botany 49, 461-469.

- Rodriguez, R. e Redman, R., 2005. *Balancing the generation and elimination of reactive oxygen species*. Proceedings of National Academy of Science of the U S A 102, 3175–3176.
- Ruggiero, B., Koiwa, H., Manabe, Y., Quist, Tm., Inan, G., Saccardo, F., Joly, R.J., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Maggio, A., 2004. *Uncoupling the Effects of ABA on Plant Growth and Water Relations: Analysis of *sto1/nced3*, ABA Deficient Salt Stress Tolerant Mutant in Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology, 136: 3134-3147.
- Sharma, Y.K., Davis, K.R. 1997. *The effects of ozone on antioxidant responses in plants*. Free Radic. Biol. Med. 23, 480-488.
- Skärby, L., Karlsson, P. E., 1996. *Critical levels for ozone to protect forest trees – best available knowledge from the Nordic countries and the rest of Europe*. In: L. Karenlampi and L. Skärby (eds.) Critical Levels for Ozone in Europe: Testing and Finalizing the Concepts. UN-ECE Workshop Report, University of Kuopio, Department of Ecology and Environmental Science, Kuopio - Finland, 72-85.
- Skov, H., Egelov, A.H., Granby, K., Nielsen, T., 1997. *Relations between ozone and other photochemical products at Li Valby, Denmark*. Atmospheric Environment 31, 685-691.
- Sudhir, P., Murthy, S.D.S., 2004. *Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis*. Photosynthetica 42, 481-486.
- Sunkar, R., Bartels, D., Kirch, H.H., 2003. *Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from Arabidopsis thaliana in transgenic plants improves stress tolerance*. Plant Journal 35, 452-464.

- Temple, P.J., 1990. *Growth and yield responses of processing tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) cultivars to ozone*. Environmental and Experimental Botany 30, 283-291.
- Toor, K. e Savage, P., 2005. *Antioxidant activity in different fractions of tomatoes*. Food research international 38, 487-494.
- UNECE, 2004. *Manual on the methodologies and criteria for modelling and mapping critical loads and levels and air pollution effects, risks and trends*. www.icpmapping.org.
- UNECE, 1998. ICP-Crops Experimental Protocol, Report, ICP – Crops Coordination Centre, Institute of Terrestrial Ecology, Bangor, U.K., <http://icpvegetation.ceh.ac.uk/>.
- Volin, J.C., Tjoelker, M.G., Oleksyn, J., Reich, P.B., 1993. *Lighe environment alters response to ozone stress in seedling of Acer saccharum Marsc, hybrid Populus L. II Diagnostic gas exchange and leaf chemistry*. New Phytologist 124, 237-246.
- Volk M., Geissmann, M., Blatter, A., Contat, F., Fuhrer, J., 2003. *Design and performance of a free-air exposure system to study long-term effects of ozone on grasslands*. Atmospheric Environment 37, 1341-1350.
- Welfare, K., Flowers, T.J., Taylor, G., Yeo, Y.R., 1996. *Additive and antagonistic effects of ozone and salinity on the growth, ion contents and gas exchange of five varieties of rice (Oriza sativa L.)*. Environmental Pollution 92, 257-266.
- Welfare, K., Yeo, Y.R., Flowers, T.J., 2002. *Effects of salinity and ozone, individually and in combination, on the growth and ion contents of two chickpea (Cicer arietinum L.) varieties*. Environmental Pollution 120, 397-403.

- Wellburn, F.A.M., Wellburn, A.R., 1996. *Variable patterns of antioxidant protection but similar ethene emission differences in several ozone-sensitive and ozone-tolerant plant selections*. *Plant, Cell and Environment* 19, 754–760.
- Wieser, G., Häsler R., Götz B., Kock W., and Havranek W.M., 1999. *Seasonal patterns of ozone uptake in mature evergreen conifers in contrasting environments*. In: J. Fuhrer and B. Achermann (Eds.). *Critical Levels for Ozone – Level II*. Environmental Documentation No.115. Swiss Agency for Environment, Forest and Landscape, Bern, 193-196.
- Wills-Karp, M., Koehl, J., 2005. *New insights into the role of the complement pathway in allergy and asthma*. *Current Allergy and Asthma Reports* 5 (5), 362-369.
- Yancey, P.H., (1994). *Compatible and counteracting solutes*. In K Strange, eds, *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 81-109.
- Yeo, A., 1998. *Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology*. *Journal of Experimental Botany* 49, 915-929.
- Zhu, J.K., 2001. *Plant salt tolerance*. *Trends in plant science* 6, 66-72.