

DIFESE ANTIOSSIDANTI IN OLIVO IN CONDIZIONI DI DEFICIT IDRICO ANTIOXIDANT DEFENCES IN OLIVE TREE DURING DROUGHT STRESS

Sofo A ⁽¹⁾, Dichio B ⁽¹⁾, Xiloyannis C ⁽¹⁾, Masia A ⁽²⁾

Università degli Studi della Basilicata – Dipartimento di Produzione Vegetale – Campus Macchia Romana, 85100, Potenza – email: adriano.sofa@tin.it

Università degli Studi di Bologna – Dipartimento di Colture Arboree – viale Fanin 46, 40127, Bologna

Parole chiave: *Olea europaea* L., catalasi, superossido dismutasi, ascorbato perossidasi

Additional key words: *Olea europaea* L., superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase

Abstract

*The olive tree (*Olea europaea* L.) is commonly grown in the Mediterranean basin and is able to resist severe and prolonged drought. The effects of drought stress and water recovery on the activities of superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, polyphenol oxidase and lipoxygenase, and on malondialdehyde levels were investigated in two-year-old olive (cv. 'Coratina') plants grown in environmental conditions characterized by high temperatures and different irradiance levels and gradually subjected to a controlled water deficit. The results show that the ability of olive trees to increase antioxidant system activity might be an important attribute linked to drought tolerance. The lower expression of the enzymatic antioxidant system in shaded plants with respect to non-shaded plants may be due to a reduced need of activated oxygen species removal. On the contrary, in non shaded plants, higher enzyme activities are required for a better protection against a more pronounced oxidative stress.*

Introduzione

Le piante soggette a deficit idrico vanno incontro ad un eccesso di potere riducente, dovuto alla limitazione dell'assimilazione di CO₂, che causa l'aumento dei livelli di specie attivate dell'ossigeno (AOS) e l'accumulo di radicali liberi. Se l'accumulo delle AOS supera la capacità del sistema antiossidante di rimuoverle, allora insorge il danno ossidativo all'apparato fotosintetico e alle membrane, il quale provoca infine la morte della cellula (Smirnoff, 1993). Il sistema di difesa enzimatico per eliminare le AOS adottato dalle piante include le superossido dismutasi (SOD), che catalizzano la conversione di superossido in H₂O₂, insieme alla catalasi (CAT), alle perossidasi guaiacolo-dipendenti (POD) ed agli enzimi del ciclo ascorbato-glutatione, quali l'ascorbato perossidasi (APX), che elimina il H₂O₂ prodotto. Gli isoenzimi della polifenolo ossidasi (PPO), presenti soprattutto nel lume tilacoidale, ossidano i substrati orto-difenolici a orto-chinoni e sono quindi coinvolti nel metabolismo dei fenoli, questi ultimi composti con un'azione antiossidante non enzimatica. Le lipossigenasi (LOX) catalizzano la diossigenazione di acidi grassi polinsaturi, producendo così i corrispondenti idroperossidi degli acidi grassi. Questi ultimi sono composti altamente reattivi, tossici per la cellula, e sono rapidamente degradati in metaboliti che portano alla produzione di jasmonato, acidi dienoici coniugati e aldeidi volatili, quali la malondialdeide (MDA) (Bird and Draper, 1984). Lo scopo di questo studio è stato quello di studiare l'influenza del deficit idrico e del successivo ripristino idrico e dell'irraggiamento sulle attività di alcuni enzimi antiossidanti e sui livelli di MDA.

Materiali e metodi

Le prove sono state condotte su piante di *Olea europea* L. di due anni autoradicate appartenenti alla cultivar "Coratina". Durante i primi 20 giorni del periodo sperimentale, le piante sono state sottoposte ad una graduale e controllata privazione di acqua. Dopo aver raggiunto il massimo livello di deficit idrico, le piante sono state sottoposte ad un trattamento di ripristino idrico della durata di 30 giorni, sia in condizioni di irraggiamento naturale che in condizioni di semi-

ombreggiamento. Campioni di foglie e radici sono stati raccolti durante tutto il periodo sperimentale, lavati, congelati in azoto liquido ed infine conservati a -80°C . L'attività SOD è stata determinata in base al metodo di Madamanchi et al. (1994) misurando la capacità dell'estratto enzimatico di inibire la riduzione fotochimica del nitro blue tetrazolio (NBT) a blu formazano. L'attività APZ è stata determinata seguendo spettrofotochimicamente la diminuzione di ascorbato a 290 nm (Ushimaru et al. 1997). L'attività CAT è stata determinata in base al metodo di Aebi (1984) seguendo spettrofotochimicamente la decomposizione di H_2O_2 a 240 nm. L'attività POD è stata misurata mediante la metodica di Chance and Maehly (1955) spettrofotochimicamente a 470 nm. L'attività IAAox, dovuta alla POD, è stata misurata spettrofotochimicamente a 247 e 254 nm (Ricard and Job 1974). L'attività PPO è stata determinata in base al metodo di Cañal et al. (1988) leggendo l'attività a 420 nm. Il contenuto in MDA è stato misurato in base al metodo di Du and Bramlage (1992) usando un coefficiente di assorbimento di $157 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e espresso come nmol per g DW. L'attività LOX è stata determinata spettrofotochimicamente a 25°C seguendo l'aumento di A_{234} (Williams et al., 2000), dovuta alla conversione del linoleato nel corrispondente idroperossido.

Risultati e discussione

Dopo 20 giorni di deficit idrico, il valore medio di potenziale idrico fogliare è sceso da -0.37 a -5.37 MPa e si sono verificate diminuzioni dei valori di fotosintesi netta e di traspirazione. Le attività di SOD, APX, CAT, POD e LOX sono aumentate parallelamente alla severità del deficit idrico sia nelle foglie che nelle radici. In particolare, nelle foglie delle piante sottoposte al massimo livello di stress è stato trovato un aumento significativo di cinque volte dell'attività APX rispetto al valore delle piante di controllo. Le attività POD e IAA ossidasi hanno mostrato un andamento simile, mentre l'attività CAT è aumentata durante livelli di deficit idrico severo nelle foglie e nelle radici fini. L'attività POD, al contrario, è diminuita durante il periodo sperimentale di deficit idrico. Durante il ripristino idrico, le attività di SOD, CAT, APX, POD e LOX e i livelli di MDA sono diminuiti durante il periodo di ripristino sia nelle foglie che nelle radici e la diminuzione è stata più veloce nelle piante re-irrigate in condizioni di semi-ombreggiamento che in quelle re-irrigate sotto la luce ambientale. Durante il ripristino idrico, l'attività di PPO, al contrario, è aumentata durante il ripristino idrico in tutti i tessuti esaminati. Poiché SOD e APX sono i principali enzimi antiossidanti dei cloroplasti, le variazioni osservate durante tutto il periodo sperimentale indicano che il deficit idrico provoca un aumento della loro attività. Ciò rende le piante in grado di rimuovere più efficacemente le AOS. Inoltre, bassi livelli di PPFD inducono una differente risposta dell'olivo allo stress ossidativi in quanto, in condizioni di semi-ombreggiamento, la necessità di difese antiossidanti è ridotta. L'attività CAT è stata influenzata dai livelli idrici e di irraggiamento, probabilmente perché questo enzima è molto suscettibile alla fotoinattivazione e degradazione in condizioni di alti livelli di luce. La regolazione dell'attività degli isoenzimi POD è importante durante il deficit idrico perché POD interviene nella biosintesi della parete cellulare durante la crescita della pianta e catalizza l'ossidazione di IAA. La variazione di attività POD contribuisce alla diminuzione dell'espansione cellulare e alla limitazione della crescita delle radici. Le isoforme della PPO hanno proprietà proteolitiche che permettono alle piante di rimuovere le proteine danneggiate dalle AOS prodotte durante il deficit idrico. L'attività PPO, inoltre, può regolare lo stato redox dei composti fenolici, particolarmente abbondanti nelle foglie di olivo. Le variazioni di attività LOX e dei livelli di MDA evidenziano che il danno alle membrane cellulari è una diretta conseguenza del deficit idrico. In condizioni di deficit idrico, i cloroplasti di olivo diventano più sensibili al danno ossidativo e questa potrebbe essere la causa della diminuzione di funzionalità fotosintetica osservata. L'aumento di MDA nei tessuti di olivo, inoltre, suggerisce che i meccanismi di riparazione non tengono il passo con il danno e che il deficit idrico può influenzare la composizione ed il turnover dei lipidi di membrana. Le dinamiche di attività enzimatiche e di accumulo di MDA nelle radici mostrano una diversa risposta di radici fini e radici medie nei confronti del deficit idrico: le radici fini, coinvolte nell'assorbimento di acqua, sono state più sensibili e reattive ai cambiamenti di contenuto idrico del suolo, mentre le radici medie, in cui sono accumulati i carboidrati prodotti nelle foglie e che presentano un maggiore grado di lignificazione,

hanno mostrato variazioni meno marcate. I risultati mostrano che la capacità dell'olivo di aumentare l'attività del sistema antiossidante enzimatico, limitando quindi il danno cellulare causato dalle AOS, potrebbe essere un importante attributo correlato alla tolleranza di questa specie alla siccità. Inoltre, durante il ripristino idrico, la minore espressione del sistema antiossidante enzimatico osservata in piante semi-ombreggiate rispetto a piante non ombreggiate potrebbe essere dovuto a una ridotta necessità di rimozione delle AOS. Nelle piante non ombreggiate, al contrario, sono richieste alte attività enzimatiche per una migliore protezione nei confronti di uno stress ossidativo più pronunciato. I risultati ottenuti in questa ricerca potrebbero essere importanti per una migliore comprensione della crescita vegetativa e della produttività di piante di olivo in regioni a clima semi-arido.

Bibliografia

- Smirnoff N (1993) *New Phytol* 125: 27-58
 Bird RP, Draper HH (1984) *Methods Enzymol* 105: 299-305
 Madamanchi NR *et al.* (1994) *Plant Mol. Biol.* 26: 95-103.
 Ushimaru T *et al.* (1997) *Plant Cell Physiol* 38 (5): 541-549
 Aebi H (1984) *Methods Enzymol.* 105: 121-126
 Chance B, Maehly AC (1955) *Methods Enzymol* 2: 764-775
 Ricard J, Job D (1974) *Eur. J. Biochem.* 44: 359-374
 Cañal MJ *et al.* (1988) *Physiol. Plant.* 74: 125-130
 Du D, Bramlage WJ (1992) *J. Agric. Food Chem.* 40: 1566-1570
 Williams M *et al.* (2000) *Phytochemistry* 53 (2000) 13-19

