

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA BASILICATA
FACOLTA' DI SCIENZE MM. FF. NN. – FACOLTA' DI SCIENZE AGRARIE



CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN BIOTECNOLOGIE VEGETALI

TESI DI LAUREA

Analisi degli indici di fluorescenza e della fotoinibizione in
due varietà di olivo sottoposte a diversi livelli di deficit idrico
e luminoso

RELATORE

Prof. DICHIO Bartolomeo

CANDIDATO

SOFO Adriano
Matr. 26403

Anno Accademico 2006/2007

*“Homo liber nulla de re minus quam
de morte cogitat; et eius sapientia non
mortis sed vitae meditatio est.”*

*“Nulla v’è su cui l’uomo libero mediti meno che sulla
morte; e la sua saggezza sta appunto nel meditare
non sulla morte, ma sulla vita.”*

Spinoza, *Etica*, IV, 67

Ringraziamenti

Ringrazio in primo luogo il Prof. Cristos Xiloyannis per la continua fiducia e pazienza dimostrate nei miei confronti.

Ringrazio il Prof. Bartolomeo Dichio per l'aiuto nella preparazione della prova, l'analisi e l'interpretazione dei dati.

Un ringraziamento al Dott. Giuseppe Montanaro per la misura dei potenziali idrici e la preparazione della prova in campo.

INDICE	
1. INTRODUZIONE.....	6
1.1 Stress foto–ossidativo nelle piante sottoposte a stress idrico.....	6
1.2 Meccanismi di resistenza dell’olivo allo stress idrico.....	8
1.3 La fluorescenza della clorofilla.....	10
1.4 Relazione tra assorbimento della luce e fotosintesi netta.....	15
1.5 Interpretazione degli indici di fluorescenza della clorofilla.....	19
1.6 Relazione tra indici di fluorescenza e livelli di stress idrico.....	20
1.7 Obiettivi della ricerca.....	22
2. MATERIALI E METODI.....	23
2.1 Analisi degli indici di fluorescenza.....	23
2.1.1 <i>Materiale vegetale e disegno sperimentale</i>	23
2.1.2 <i>Parametri ambientali e potenziale idrico</i>	25
2.1.3 <i>Scambi gassosi e fluorescenza della clorofilla</i>	26
2.1.4 <i>Curve di risposta alla luce</i>	29
2.1.5 <i>Curve di rilassamento della fluorescenza</i>	30
2.1.6 <i>Analisi statistica</i>	31
3. RISULTATI.....	33
3.1 Parametri ambientali, potenziali idrici e scambi gassosi.....	33
3.2 Indici di fluorescenza.....	34
3.3 Curve di risposta alla luce e correlazioni tra NPQ e Φ_{PSII}	35
3.4 Curve di rilassamento della fluorescenza.....	36
4. DISCUSSIONE.....	48
4.1 Stato idrico, scambi gassosi ed indici di fluorescenza.....	48
4.2 Risposta fotosintetica e grado di fotoinibizione.....	53
5. CONCLUSIONI.....	56
6. BIBLIOGRAFIA.....	57

Abstract

Olive tree (*Olea europaea* L.) is commonly grown under environmental conditions characterized by water deficit, high temperatures and irradiance levels typical of Mediterranean semi-arid regions. Measurement of photosynthetic efficiency, photoinhibition and gas exchange were carried out on two-years-old olive trees (cv. 'Coratina' and cv. 'Biancolilla') subjected to a 21 day-period of water deficit under two different light regimes (exposed plants, EP; PAR = 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; and shaded plants, OP; PAR = 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) followed by 23 days of rewatering during which the soil water conditions were restored. During the experimental period, measurements by light response curves were carried out to study the photosynthetic performance of olive plants. The synergical effect of drought stress and high irradiance levels caused a reduction of gas exchange and an increase in photoinhibition more marked in EP than in OP. While EP had a higher capacity for thermal energy-dissipative processes, OP showed a better photochemical efficiency and an efficacious stomatal regulation. Gas exchange measurements indicate that mechanisms of stomatal regulation affected PSII efficiency in OP. Difference between the two cultivars were also observed, with a higher photosynthetic efficiency under drought stress in Biancolilla and a better physiological recovery during rewatering in Coratina. The information here obtained can be important to understand the mechanisms by which olive plants minimize photoinhibition when subjected to different abiotic stresses and suggest that photoinhibition due to high light intensity and water deficit can be an important factor that affects photosynthetic productivity of this species.

Abbreviazioni

α_c = efficienza quantica massima; A = tasso fotosintetico netto; C_i = concentrazione intercellulare di CO_2 ; EP = piante esposte; F_v/F_m = massima resa quantica del fotosistema II; g_s = conduttanza stomatica; I_c = punto di compensazione della luce; LWP = potenziale idrico fogliare; PAR = radiazione fotosinteticamente attiva; NPQ = estinzione non-fotochimica; NPQ_R = estinzione non-fotochimica a decadimento rapido; NPQ_S = estinzione non-fotochimica a decadimento lento; OP = piante ombreggiate; PSII = fotosistema II; qP = estinzione fotochimica; R_d = tasso di respirazione al buio; VPD = deficit di pressione di vapore; Φ_{PSII} = resa quantica del fotosistema II.

1. INTRODUZIONE

1.1 Stress foto–ossidativo nelle piante sottoposte a stress idrico

La maggior parte delle piante va incontro a diminuzioni transienti del contenuto idrico in alcuni stadi della loro vita ed è in grado produrre strutture tolleranti alla disidratazione quali semi, spore o polline (Ingram e Bartels, 1996). Questa carenza idrica sottopone le piante a quello che viene chiamato comunemente “stress idrico”, il quale è una delle principali cause della riduzione della crescita e della produttività delle piante in regioni semi aride e determina una serie di risposte a livello molecolare, cellulare, fisiologico e fenologico (Bray, 1993; Ingram e Bartels, 1996; Shinozaki e Yamaguchi–Shinozaki, 1997).

Le piante si acclimatano e si adattano alle limitazioni e all'eccesso di luce mediante variazioni della loro morfologia, anatomia e fisiologia. Queste variazioni influenzano anche la risposta della pianta allo stress idrico. Solitamente non ci sono differenze nel potenziale idrico di piante sottoposte a stress idrico sia ad alti che a bassi livelli di irraggiamento perché la conduttanza stomatica è determinata principalmente dal potenziale idrico. In condizioni di alti livelli di irraggiamento e di deficit idrico, quindi, la diminuzione della conduttanza stomatica ha un grande impatto sulla fotosintesi, perché la pianta deve “smaltire” l'energia fotonica in eccesso e non può farlo interamente mediante i processi di fissazione del carbonio, dal momento che questi ultimi sono ridotti a causa dei limitati scambi gassosi e dai danni all'apparato fotosintetico (Nilsen e Orcutt, 1994).

L'esposizione delle piante ad alti livelli di irraggiamento causa una riduzione della capacità fotosintetica dovuta al ridirezionamento dell'energia fotonica in processi che portano al danneggiamento dell'apparato enzimatico fotosintetico (fotoinibizione) e alla distruzione dei pigmenti fotosintetici (fotoossidazione) (Bowler *et al.*, 1992; Osmond *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 1998). Di conseguenza, sulla base dell'inibizione fotosintetica, le piante in ambienti con alti livelli di irraggiamento sono più suscettibili alla fotoinibizione e alla fotoossidazione quando sono soggette

contemporaneamente a stress idrico e alti livelli di irraggiamento; questo avviene perché il livello di energia fotonica diventa eccessivo in condizioni in cui l'assimilazione fotosintetica di CO₂ diminuisce più del tasso di trasporto elettronico (Foyer *et al.*, 1994). In presenza di alti livelli di irraggiamento, l'apparato fotosintetico va incontro ad un complicato ciclo di danneggiamento, degradazione e riparazione. Quando il livello di irraggiamento è alto, il danno supera la capacità di riparazione e prendono il sopravvento i processi coinvolti nella fotoinibizione e nella fotoossidazione (Melis, 1999). Il fotosistema II (PSII), ed in particolare la molecola di clorofilla del centro di reazione (P680) nella proteina D1, è l'obiettivo primario di un processo di fotoinibizione irreversibile, mentre il PS I è più "protetto", in quanto riceve un danno meno significativo e dipendente dal flusso elettronico dal PSII e dalla presenza di O₂ (Bowler *et al.*, 1992; Hideg e Murata, 1997; Anderson *et al.*, 1998). I centri Fe/S delle proteine che costituiscono il PS I sembrano essere i siti principali del danno ossidativo (Melis, 1999). La fotorespirazione aumenta in proporzione al tasso fotosintetico ed è in grado di riciclare una quantità considerevole di CO₂ e, quindi, di rendere la fotosintesi molto vantaggiosa, dal momento che protegge le membrane tilacoidali dal danno indotto dalla luce, nei momenti in cui l'assimilazione del carbonio è limitata (Douce e Neuburger, 1999). Il tasso fotorespiratorio, inoltre, aumenta durante lo stress idrico, riciclando CO₂ e proteggendo la pianta dalla fotoinibizione (Smirnoff, 1993). La fotorespirazione, infine, insieme al sink termico, è molto più efficace del ciclo perossidatico di Mehler–Asada nel proteggere le piante dalla fotoinibizione, soprattutto in condizioni di stress idrico durante alti livelli di irraggiamento.

Il 50–70% dei fotoni assorbiti da piante in condizioni di pieno irraggiamento è, infatti, dissipato mediante il ciclo delle xantofille nelle membrane tilacoidali. Questo processo non-fotochimico permette un certo grado di fotoprotezione creando un sink termico per i fotoni (retro-regolazione del PSII) che previene la sovra-riduzione della catena elettronica fotosintetica (in particolare del chinone Q_A, accettore primario di elettroni), evitando quindi la "pressione eccitatoria" a livello del PSII, che potrebbe altrimenti favorire la fotoinibizione (Thiele *et al.*, 1996; Verhoeven

et al., 2001). I restanti fotoni sono utilizzati nelle reazioni fotochimiche che guidano il trasporto elettronico, creando un “sink fotochimico” che sostiene la riduzione fotosintetica di CO₂ (Figura 1.1). Fotorispirazione, retro-regolazione del PSII e assimilazione fotosintetica di CO₂ sono processi in grado di prevenire l'eccessiva fotoriduzione di O₂, che potrebbe potenzialmente generare un eccesso di AOS attraverso il ciclo di Mehler–Asada, ma nessuno di essi può isolatamente prevenire la fotoinibizione in condizioni di alti livelli di irraggiamento (Osmond *et al.*, 1997). Il ciclo di Mehler–Asada, ad esempio accetta elettroni da H₂O a livello del PSII e li trasporta al PS I, consumando O₂ e producendo simultaneamente H₂O, ed impedendo così la diffusione di anione superossido ($\cdot\text{O}_2^-$) e perossido di idrogeno (H₂O₂) nello stroma. Gli elettroni trasportati a O₂, che funge da loro accettore, ammontano al 10– 50% della capacità di trasporto elettronico totale, variando in base alla specie ed all'intensità luminosa (Asada, 1999). E' comunque accertato che questa quantità è inadeguata per prevenire la fotoinattivazione della catena di trasporto elettronica e che la fotorispirazione rimane quindi essenziale (Osmond *et al.*, 1997).

1.2 Meccanismi di resistenza dell'olivo allo stress idrico

L'olivo (*Olea europaea* L.) è una delle specie arboree da frutto più rappresentative ed economicamente importanti delle aree mediterranee, caratterizzate da alte temperature, alti livelli di irraggiamento e carenza di precipitazioni. Questa specie sempreverde e sclerofilla mostra un alto grado di tolleranza alla siccità (Lo Gullo e Salleo, 1988; Connor and Fereres, 2005), un consumo parsimonioso di acqua dal suolo (Moreno *et al.*, 1996), una grande capacità di estrarre acqua dal suolo grazie ad un profondo sistema radicale (Fernández *et al.*, 1992) e un maggiore tasso di traspirazione specifica rispetto ad altre specie arboree da frutto, sia in condizioni di disponibilità idrica ottimale che in situazioni di deficit idrico (Tombesi *et al.*, 1986; Natali *et al.*, 1991). L'olivo ha la capacità di resistere allo stress idrico diminuendo il contenuto idrico e il potenziale idrico dei suoi tessuti e stabilendo in questo modo un alto gradiente di potenziale idrico tra

foglie e radici (Dichio *et al.*, 2002); in condizioni di stress idrico, inoltre, le piante di olivo arrestano la crescita della chioma e riducono i processi traspirativi e fotosintetici (Angelopoulos *et al.*, 1996; Xiloyannis *et al.*, 2003). Ciò permette una continua produzione di assimilati e il loro accumulo negli organi della pianta, in particolare nel sistema radicale, creando un maggiore rapporto radici/foglie rispetto alle piante irrigate (Dichio *et al.*, 2000).

Nell'olivo, periodi di stress idrico severo causano chiusura stomatica (Fernández *et al.*, 1997), inibizione della fotosintesi (Angelopoulos *et al.*, 1996), riduzione degli scambi gassosi (Xiloyannis *et al.*, 1988), aggiustamento osmotico (Dichio *et al.*, 2006), sovra-regolazione di alcuni enzimi antiossidanti (Sofa *et al.*, 2005), adattamenti morfo-anatomici delle foglie (Bosabalidis e Kofidis, 2003) e variazioni nell'accrescimento dell'apparato radicale (Fernández *et al.*, 1992). Lo stress idrico severo predispone il sistema fotosintetico dell'olivo alla fotoinibizione, dovuta ad una disattivazione luce-dipendente delle reazioni fotochimiche primarie associate al PSII (Angelopoulos *et al.*, 1996). I tassi assimilativi e traspirativi di questa specie diminuiscono con l'aumento dello stress idrico (Xiloyannis *et al.*, 2003), anche se le piante di olivo presentano una maggiore traspirazione specifica rispetto ad altre specie arboree da frutto, sia in condizioni idriche ottimali che in situazioni di deficit idrico (Tombesi *et al.*, 1986; Natali *et al.*, 1991). In condizioni di un alto deficit di pressione di vapore, inoltre, le piante di olivo prevengono la perdita di acqua eccessiva chiudendo i loro stomi (Fernández *et al.*, 1997). Nell'olivo, diminuzioni persistenti degli scambi gassosi a livello delle foglie potrebbero non essere dovute solo al mancato ripristino del turgore cellulare, ma anche ad altri fattori che probabilmente coinvolgono il bilancio biochimico (Bray, 1993; Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Sofa *et al.*, 2004) e ormonale della pianta (Busk e Pagès; Leung e Giraudat, 1998).

Durante i primi giorni di ripristino idrico in seguito a deficit idrico, le piante di olivo ripristinano solo parzialmente i processi traspirativi e fotosintetici, gli indici di fluorescenza della clorofilla e il potenziale osmotico (Angelopoulos *et al.*, 1996; Dichio *et al.*, 2006). Questo indica che il rapido recupero del contenuto idrico dei tessuti non è accompagnato da quello della funzionalità fogliare, che perdura per parecchi giorni ed è correlato al

livello di stress raggiunto in precedenza (Angelopoulos *et al.*, 1996). Infine, l'inibizione degli scambi gassosi e la regolazione di alcuni enzimi antiossidanti durante il ripristino idrico dipendono dai livelli di luce a cui le piante sono state sottoposte precedentemente e durano parecchi giorni dopo l'inizio del recupero (Sofo *et al.*, 2004).

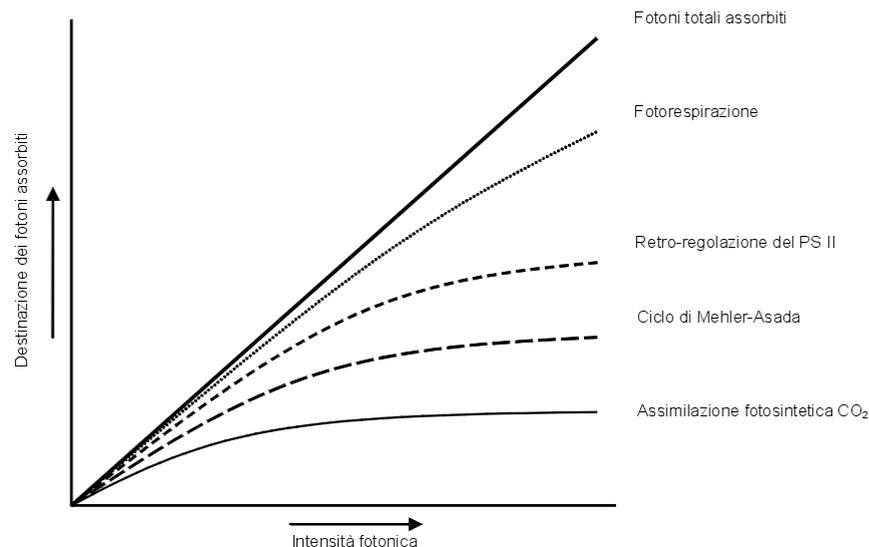


Figura 1.1 – Destinazione dell'energia fotonica assorbita dalla clorofilla nei cloroplasti in condizioni di diversa intensità luminosa. La capacità delle foglie di utilizzare energia luminosa per l'assimilazione di CO_2 è influenzata da diverse tipologie di stress ambientali quali siccità, basse temperature, stress da scambi gassosi, UV, luce intensa e anche da stress endogeni quali sink stress e senescenza. Quando l'intensità fotonica è in eccesso rispetto a quella necessaria per l'assimilazione di CO_2 , l'energia aggiuntiva è dissipata mediante la produzione di AOS a spese di O_2 , la retro-regolazione del PSII e la fotorispirazione. Quando l'accettore fisiologico di elettroni, CO_2 , non è disponibile nei cloroplasti, o il ciclo di fissazione non funziona correttamente, il flusso lineare di elettroni che attraversa il ciclo di Mehler-Asada è indispensabile per limitare il danno ossidativo (da Asada, 1999).

1.3 La fluorescenza della clorofilla

La fluorescenza è uno dei due processi radiativi con cui si può verificare il rilassamento di una molecola eccitata, l'altro è la fosforescenza (Figura 1.2). La distinzione tra i due processi fu originariamente fatta in base al tempo di vita della radiazione: nella fluorescenza la luminescenza cessa quasi subito dopo aver eliminato la radiazione eccitante, mentre nella

fosforescenza la radiazione continua ad essere emessa, almeno per un breve lasso di tempo, anche dopo aver eliminato la sorgente eccitante. Oggi, invece, si possono distinguere i due processi sulla base della natura degli stati elettronici coinvolti nelle transizioni responsabili dell'emissione di radiazione. Nella fluorescenza la radiazione è generata in virtù di transizioni tra stati con la stessa molteplicità di spin (per esempio $S_1 \rightarrow S_0$), mentre nella fosforescenza la transizione coinvolta comporta variazione della molteplicità di spin: il caso più frequente sono transizioni tripletto–singoletto. Questo è anche il caso della clorofilla che, in presenza di luce, va incontro alle seguenti transizioni:

Chl + hv → Chl * (clorofilla nello stato eccitato di singoletto – situazione normale)

Chl * → ³Chl (clorofilla nello stato di tripletto – prodotta quando non ci sono molecole accettrici per l'energia derivante dalle molecole di clorofilla energizzate)

³Chl + O₂ → ¹O₂ + Chl (Il radicale idrossile ¹O₂ è estremamente reattivo e danneggia la clorofilla (“chlorophyll bleaching”), le membrane lipidiche e le proteine dei fotosistemi).

Con l'avvento dei fluorimetri portatili, la fluorescenza della clorofilla è diventata una tecnica ubiquitaria negli studi di ecofisiologia vegetale. Nessuno studio sui processi fotosintetici può definirsi completo senza i più semplici indici di fluorescenza, ma la teoria alla base di questi indici e l'interpretazione dei dati richiede molte competenze di base in campo agronomico e fisiologico e un'approfondita conoscenza delle specie vegetali in esame.

L'energia luminosa assorbita dalle molecole di clorofilla presenti in una foglia può essere usata nella fotosintesi (reazioni fotochimiche), dissipata come calore o riemessa sotto forma di fluorescenza. Questi tre processi sono in competizione tra loro, così che qualsiasi aumento dell'efficienza di uno di essi causerà una diminuzione degli altri due. Di conseguenza, misurare la resa della fluorescenza della clorofilla fornisce informazioni sulle variazioni dell'efficienza delle reazioni fotochimiche e della dissipazione come calore. Sebbene la quantità totale di fluorescenza della clorofilla è molto piccola (solo 1 o il 2% della luce totale assorbita), le misurazioni sono abbastanza semplici.

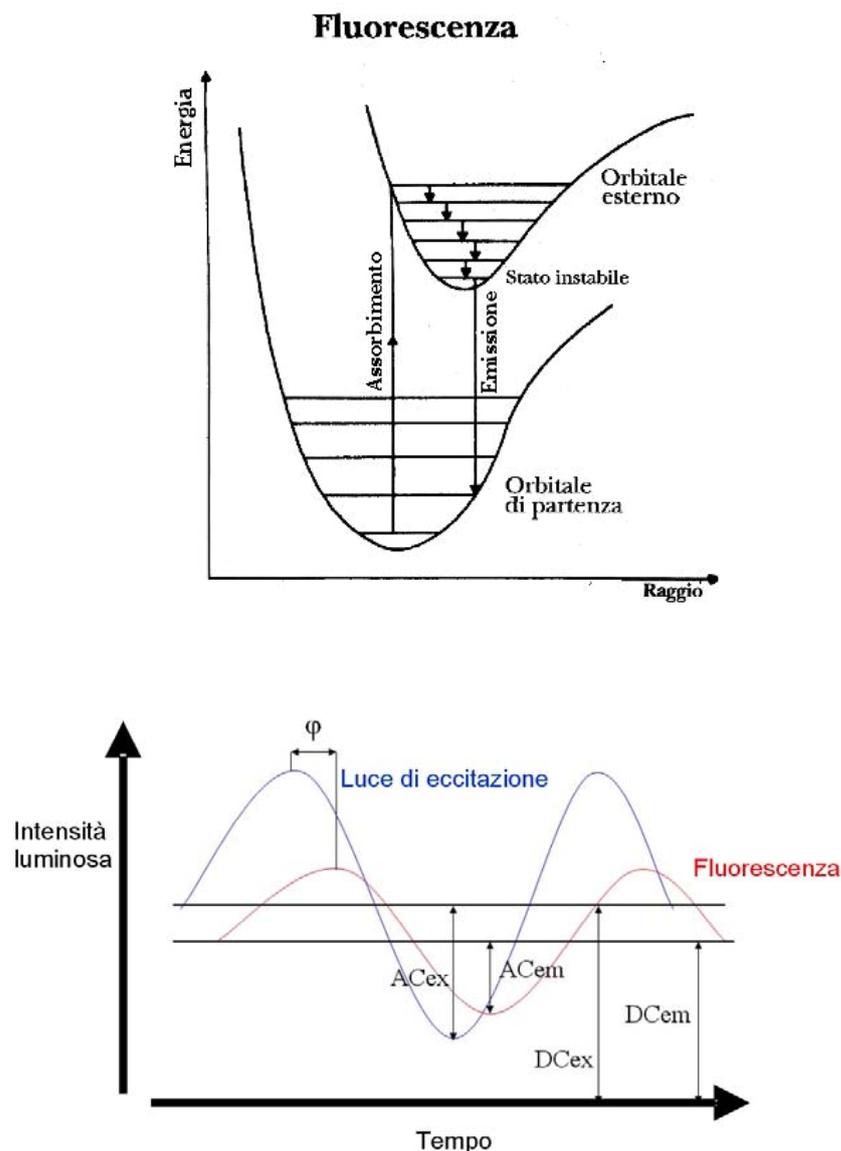


Figura 1.2 – Schema energetico dell'emissione di luce per fluorescenza. (In alto) Le due curve rappresentano l'energia dell'elettrone in funzione della distanza tra gli atomi della molecola, mentre le linee orizzontali all'interno delle curve sono i livelli di energia corrispondenti alle loro vibrazioni. Un elettrone, situato nel primo livello di vibrazione dell'orbitale di partenza, viene colpito dai raggi ultravioletti e ne assorbe l'energia grazie alla quale viene spinto su un orbitale più esterno, in un livello di vibrazione elevato; da qui, come indicato dalle frecce piccole, perde energia fino a raggiungere lo stato di vibrazione più bassa. Ma questo è uno stato instabile, per questo l'elettrone ricade nell'orbitale iniziale, provocando un'onda elettromagnetica che sarà visibile come luce blu, se il salto è elevato, o come luce verde o rossa, se il salto è piccolo. Infatti, la lunghezza d'onda della radiazione è tanto più corta quanto più il salto è energetico à alto; ciò spiega anche perchè per l'eccitazione sono necessari gli ultravioletti, con lunghezza d'onda più piccola della luce visibile. Infatti il salto di assorbimento deve ovviamente essere maggiore di quello di emissione, come si intuisce dallo schema. (In basso) Curva di emissione di intensità luminosa nel tempo della luce di eccitazione (in blu) e della luce emessa per fluorescenza (in rosso). ϕ = differenza di fase tra le due onde.

La fluorescenza di una foglia può essere misurata esponendo la foglia ad una luce di una lunghezza d'onda definita e misurando la quantità di luce riemessa a lunghezze d'onda maggiori. Ciò significa che tutte le analisi devono includere una forma di normalizzazione e una grande varietà di differenti parametri di fluorescenza devono essere calcolati. Il problema della normalizzazione è stato superato con l'applicazione di un sistema di misurazione "modulato" (Quick e Horton, 1984), in cui la sorgente luminosa usata per misurare la fluorescenza è modulata (accesa e spenta ad alta frequenza) e il rilevatore è regolato per registrare solo la fluorescenza eccitata dalla luce usata per misurare. La resa relativa di fluorescenza, quindi, può essere oggi misurata anche in presenza di illuminazione e soprattutto in presenza di luce piena in campo.

Le variazioni di fluorescenza della clorofilla sono state osservate per la prima volta nei primi anni '60, quando si scoprì che, in seguito al trasferimento di materiale fotosintetico da buio alla luce, avveniva un aumento della resa della fluorescenza della clorofilla in un periodo di circa 1 secondo. Questo aumento è stato successivamente spiegato come una conseguenza della riduzione degli accettori di elettroni nella catena di reazioni fotosintetiche, a valle del PSII, probabilmente a livello del plastoquinone Q_A . Una volta che il PSII assorbe la luce ed il Q_A ha accettato un elettrone, esso non è più in grado di accettarne un altro fino a quando non lo ha trasferito nel successivo trasportatore di elettroni (Q_B). Durante questo periodo, il centro di reazione è definito "chiuso". La presenza di una parte di centri di reazioni nello stato "chiuso" causa la riduzione totale dell'efficienza delle reazioni fotochimica e quindi l'aumento della fluorescenza (Figura 1.3).

Quando una foglia è trasferita dal buio alla luce, i centri di reazione del PSII si chiudono progressivamente. Questo causa l'aumento della fluorescenza della clorofilla. In seguito a questo evento, comunque, il livello di fluorescenza comincia solitamente a diminuire nuovamente, in un tempo di pochi minuti. Questo fenomeno, chiamato estinzione della fluorescenza (*fluorescence quenching*) si può spiegare in due modi. Innanzitutto avviene un aumento del tasso a cui gli elettroni sono trasportati fuori dal PSII; questo è dovuto principalmente all'attivazione indotta dalla luce degli enzimi

coinvolti nel metabolismo del carbonio e all'apertura degli stomi. Questa estinzione è chiamata estinzione fotochimica (*photochemical quenching, qP*). Allo stesso tempo, avviene un aumento dell'efficienza con cui l'energia è convertita in calore; quest'ultimo processo è definito estinzione non-fotochimica (*NPQ*). In una tipica pianta, le variazioni che avvengono a causa di questi due processi durano circa 15–20 min, prima che si raggiunga lo stato costante di fluorescenza (F_t).

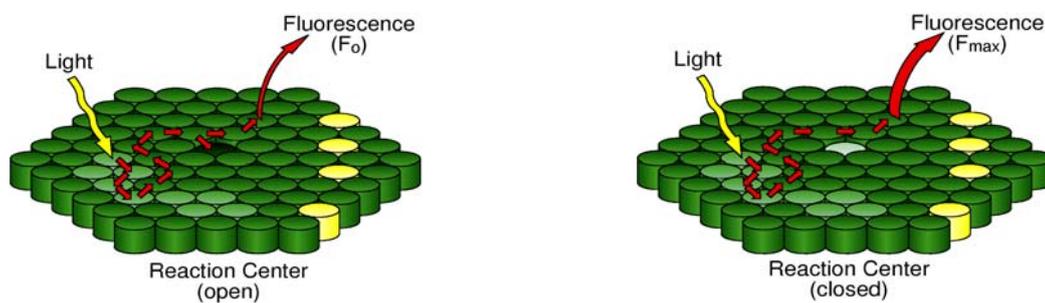


Figura 1.3 – Lo studio della fluorescenza consente di seguire i processi fotochimici nei centri di reazione. I centri che si trovano nello stato “aperto” sono fotosinteticamente inattivi, mentre quelli “chiusi” sono fotosinteticamente attivi.

Al fine di avere dati affidabili sull'efficienza fotosintetica di una pianta, è necessario essere in grado di distinguere i contributi dell'estinzione fotochimica e non-fotochimica. L'approccio più usato è quello di “spegnere” uno dei due processi, in particolar modo la fotosintesi, così che si possa stimare la fluorescenza in presenza solo dell'altro. In vitro, questo può essere ottenuto mediante l'aggiunta dell'erbicida DCMU, che inibisce il PSII e annulla completamente i processi fotochimici. Un altro metodo è quello di utilizzare la tecnica del “raddoppiamento della luce”, che permette l'annullamento dell'estinzione fotochimica (Quick e Horton, 1984). Con questo approccio, la pianta viene sottoposta a un flash di luce di breve durata e di alta intensità, il cui effetto è quello di chiudere temporaneamente tutti i centri di reazione del PSII. Il flash saturante è talmente breve da non influire significativamente sulla fotosintesi. Durante il flash, la fluorescenza raggiunge un valore equivalente a quello che potrebbe essere ottenuto in assenza di estinzione fotochimica, la fluorescenza massima (F_m) (Figura 1.4). Il confronto di questo valore con lo stato costante della fluorescenza

alla luce (F_t) e al valore di fluorescenza in assenza di luce attinica (fotosintetica) (F_o) fornisce informazioni sull'efficienza dell'estinzione fotochimica e sull'efficienza del PSII.

Così come avviene per le reazioni fotochimiche, l'efficienza di dissipazione del calore (estinzione non-fotochimica) può variare a seconda di vari fattori interni ed esterni, che si riflettono come variazioni di F_m . Al contrario delle reazioni fotochimiche, non è possibile inibire totalmente la dissipazione del calore e quindi non è possibile misurare la fluorescenza della clorofilla in assenza di estinzione non-fotosintetica. Di conseguenza, le stime di estinzione non-fotosintetica sono strettamente correlate ad un determinato punto adattato al buio (chiamato F_m). Per questa ragione, è necessario compiere esperimenti in modo tale da stimare tale punto di riferimento possa essere stimato. Questo requisito è la maggiore limitazione in condizioni di campo, dove si è soliti misurare il valore prima dell'alba (*pre-dawn*) di F_m .

Il calcolo dei parametri della fluorescenza è illustrato meglio mediante un tipico esperimento (Figura 1.4). La misurazione della fluorescenza inizia accendendo la luce per la misurazione (*measuring light*), che dà una misura del minimo livello di fluorescenza (F_o). E' poi applicato un flash di luce saturante, che permette la misura di F_m (fluorescenza massima) nello stato adattato al buio (F_m). In seguito, si applica la luce attinica e, ad intervalli appropriati, si applicano altri flash di luce saturante. Da ognuno di questi, può essere misurato un valore di F'_m (fluorescenza massima alla luce). Lo stato costante della fluorescenza immediatamente prima del flash è chiamato F_t . Dopo un flash, la rimozione della luce attinica, preferibilmente mentre si fornisce simultaneamente un luce nel rosso-lontano, permette la misurazione di F'_o .

1.4 Relazione tra assorbimento della luce e fotosintesi netta

Nelle piante, la quantità di luce assorbita e la fotosintesi sono correlate da un parametro chiamato resa quantica della fotosintesi, che indica il rapporto tra moli di CO₂ fissate e moli di PAR (radiazione

fotosinteticamente attiva) assorbita. Questo parametro è l'inverso dell'efficienza quantica. La resa quantica della fotosintesi può essere misurata mediante lo studio delle curve di risposte alla luce, che rappresentano uno strumento diagnostico molto valido per lo studio di molti parametri fotosintetici (Figura 1.5). Le curve di risposta alla luce raffigurano le variazioni dei valori fotosintesi di una foglia sottoposta ad intensità luminose crescenti o decrescenti. Partendo ad esempio da condizioni di buio totale, in cui non c'è fotosintesi, i primi fotoni assorbiti dalla foglia saranno usati con grande efficienza. Man mano che la luce aumenta, l'efficienza cala e i successivi aumenti di luce causeranno piccoli aumenti o nessun aumento di fotosintesi. Queste curve possono fornire una misurazione del tasso di respirazione al buio, del punto di compensazione della luce (flusso fotonico assorbito per il quale la fotosintesi e la respirazione si bilanciano), l'efficienza quantica (pendenza iniziale) e il tasso fotosintetico massimo (Figura 1.5).

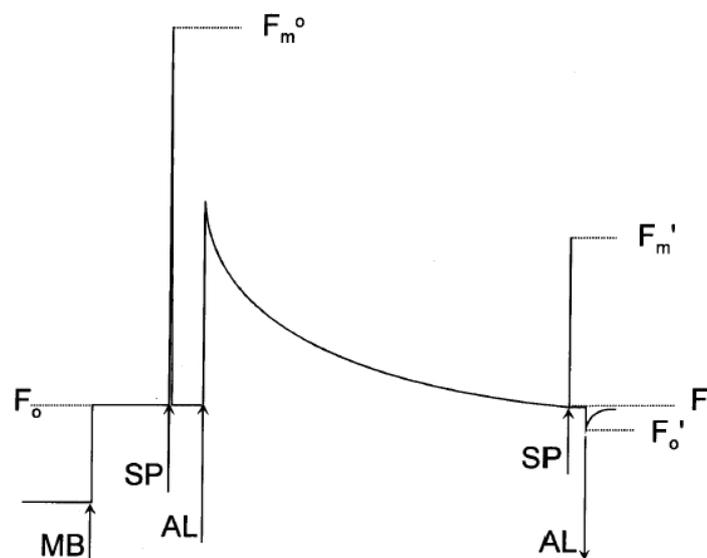


Figura 1.4 – Sequenza di un tipico esperimento di fluorescenza. Un raggio di luce misuratore si accende (MB) e si misura il livello di fluorescenza zero (F_0). L'applicazione di un flash di luce saturante (SP) permette la misurazione del massimo livello di fluorescenza F_m . E' poi applicata una luce per dare avvio alla fotosintesi (AL). Dopo un periodo di tempo, un altro flash di luce saturante (SP) permette la misurazione della massima fluorescenza alla luce (F_m'). Il livello di fluorescenza immediatamente prima del flash saturante è chiamato F_t . Lo spegnimento della luce attinica (AL), solitamente in presenza di luce nel rosso-lontano, permette la stima del livello zero di fluorescenza alla luce (F_0').

Solitamente, le specie, le varietà e gli organi adattati all'ombra, anche ad esempio foglie in parti diverse della chioma di una stessa pianta, presentano tassi di respirazione al buio, punti di compensazione e tassi fotosintetici massimi più bassi rispetto a quelli adattati alla luce, mentre l'efficienza quantica sembra non essere molto differente tra piante esposte ed ombreggiate ed è quindi più conservativa. Le foglie adattate all'ombra, inoltre, sviluppano adattamenti anatomici particolari rispetto a quelle più esposte: sono più sottili, con un mesenchima a palizzata poco organizzato, presentano sistemi tilacoidali e fotosistemi più disorganizzati e quindi una fotosintesi meno efficiente, soprattutto ad intensità luminose elevate.

Da quanto abbiamo detto finora, emerge il fatto che la fotosintesi si satura in condizioni di alti livelli di luce in quanto la clorofilla è in grado di assorbire molta energia fotonica che non è poi utilizzata nel processo di fissazione del carbonio. La bassa resa quantica in condizioni di luce in eccesso avviene perché il tasso di assorbimento dei fotoni da parte della clorofilla supera il tasso di consumo di ATP e di NADPH da parte del ciclo di Calvin–Benson e questo può provocare dei seri danni ai fotosistemi. Fotoinibizione e fotoossidazione possono allora avvenire quando: 1) le foglie ombreggiate sono improvvisamente esposte a luce intensa (ad esempio durante la potatura e il diradamento); 2) Le foglie adattate alla luce solare sono esposte simultaneamente a luce intensa e a stress ambientali quali il deficit idrico o temperature estreme (questo è un serio problema per le specie sempreverdi che crescono in ambienti con alto irraggiamento invernale o per piante sottoposte a carenze idriche estive).

In ogni caso, un eccesso di luce è una condizione normale a cui le piante sono sottoposte quotidianamente. Per questo motivo, le piante hanno sviluppato una varietà di meccanismi per minimizzare i danni causati dall'assorbimento della luce in eccesso per mezzo di: 1) processi foto–protettivi fotochimici che dissipano l'energia in eccesso mediante i processi fotosintetici (estinzione fotochimica, qP); 2) Processi foto–protettivi non–fotochimici che dissipano l'energia in eccesso mediante il ciclo delle xantofille (una classe di carotenoidi che assorbono l'energia dallo stato eccitato della clorofilla e lo dissipano come calore) (Fig.). Tra questi carotenoidi ricordiamo la violaxantina, la zeaxantina e l'anteraxantina;

zeaxantina ed anteraxantina sono in grado di assorbire l'energia in eccesso dal PSII e dissiparla come calore, senza arrecare danno alle strutture cellulari fotosintetiche della pianta (Figura 1.6).

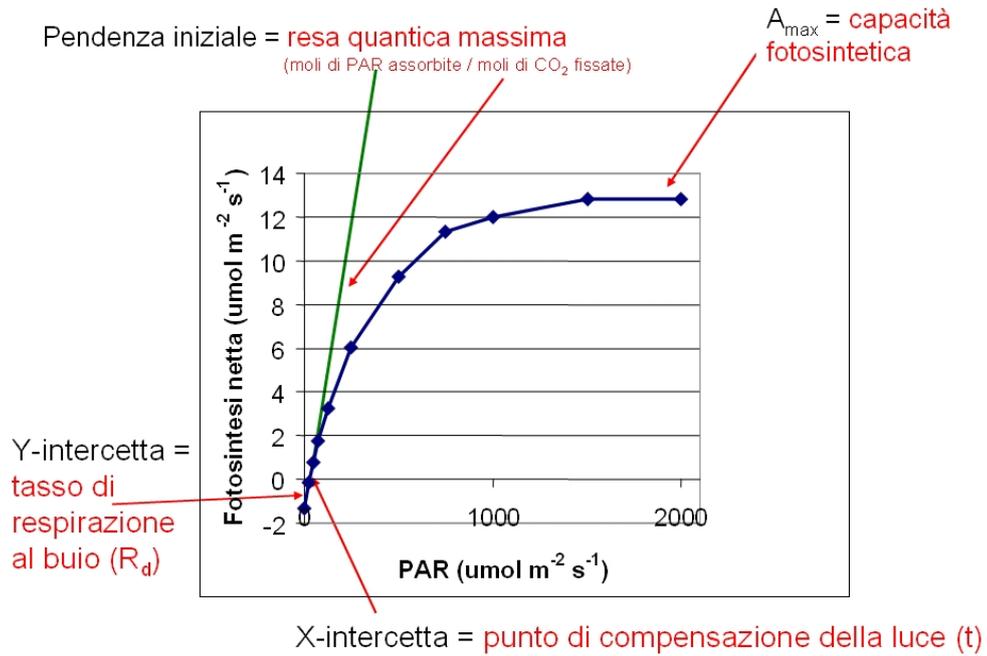


Figura 1.5 – Curva di risposta della fotosintesi alla luce con indicati gli indici fotosintetici che si possono calcolare dalla sua equazione.

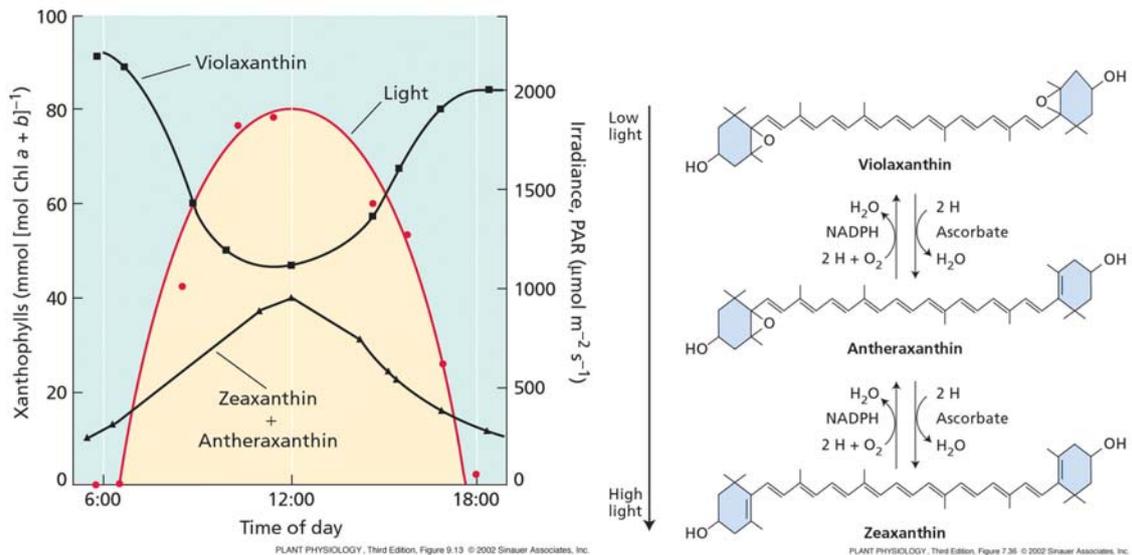


Figura 1.6 – (A sinistra) La concentrazione di violaxantina, zeaxantina e anteraxantina nel corso delle ore del giorno è influenzata dai livelli di irraggiamento a cui è sottoposta una pianta. (A destra) Ciclo delle xantofille, con trasformazione reversibile della violaxantina in zeaxantina e viceversa.

1.5 Interpretazione degli indici di fluorescenza della clorofilla

I principali indici di fluorescenza della clorofilla sono elencati in Tabella 1.1. Una diminuzione del rapporto fluorescenza variabile / fluorescenza massima in foglie ombreggiate (F_v/F_m) ed esposte alla luce (Φ_{PSII}) indica variazioni nell'efficienza fotonica del fotosistema II (PSII) (Demmig–Adams *et al.*, 1995). Un altro parametro, l'estinzione fotochimica (*photochemical quenching*; qP) fornisce un'indicazione sulla proporzione dei centri di reazione del PSII che si trovano in uno stato aperto (Maxwell e Johnson, 2000).

L'estinzione non–fotochimica (*non–photochemical quenching*; NPQ) della fluorescenza della clorofilla non è dovuta al fotochimismo del PSII ma ad altri, distinti, processi indotti dall'esposizione del cloroplasto alla luce (Walters e Horton, 1991; Maxwell & Johnson 2000) e quindi dalla quantità di energia non usata nella fotosintesi. Poiché negli ambienti naturali l'intensità luminosa cambia rapidamente, le cinetiche di formazione e di decadimento del NPQ possono essere estremamente importanti e forniscono una stima della fotoinibizione (Ruban e Horton, 1995). Il principale contributo ai valori di NPQ è dovuto all'estinzione ad alto stato energetico (high energy state quenching; qE) e avviene probabilmente nel core antenna del PSII (Ruban e Horton, 1996). qE è un processo essenziale per la protezione della foglia dal danno indotto dalla luce che dipende dalla presenza del gradiente protonico nei tilacoidi (Horton *et al.*, 1996) ed è correlato alla de-ossidazione enzimatica della violaxantina a zeaxantina attraverso il ciclo delle xantofille (Demmig–Adams, 1990). Un altro componente del NPQ , di minore importanza, che deriva dalla fosforilazione del complesso di raccolta della luce del PSII (LHCII), è chiamato estinzione da stato di transizione (*state transition quenching*; qT) ed è importante nel bilancio della distribuzione della luce tra PS I e PSII a bassi livelli di irraggiamento (Walters e Horton, 1991). Insieme, qE e qT , sono processi foto–protettivi che decadono entro pochi min dalla fine dell'illuminazione e sono i due componenti dell'estinzione non–fotochimica a decadimento rapido (NPQ_R).

Un secondo componente del NPQ , chiamato quenching da fotoinibizione (*photoinhibition quenching*; qI) indica sia un danno ai centri di

reazione sia un meccanismo protettivo di dissipazione nell'antenna di raccolta della luce del PSII. L'entità della fotoinibizione, maggiore in condizioni di alto irraggiamento e di stress, decade nel giro di ore e fa parte dell'estinzione non-fotochimica a decadimento lento (NPQ_S) (Ruban e Horton, 1995; Horton *et al.*, 1996). Generalmente, ad alti livelli di irraggiamento, le piante adattate alla luce mostrano un migliore utilizzo della luce e un alto valore di qE , mentre le piante ombreggiate mostrano un ridotto uso della luce, un ridotto valore di qE e un aumento di fotoinibizione (Demmig-Adams *et al.*, 1995).

Tabella 1.1 – Indici di fluorescenza comunemente utilizzati.		
Parametri di estinzione fotochimica:		
Φ_{PSII}	Resa quantica del PSII	$(F'_m - F_t) / F'_m$
qP	Proporzione dei centri aperti del PSII	$(F'_m - F_t) / (F'_m - F'_o)$
F_v / F_m	Massima resa quantica del PSII	$(F_m - F_o) / F_m$
Indici di estinzione non-fotochimica:		
NPQ	Estinzione non-fotochimica	$(F_m - F'_m) / (F'_m - F'_o)$
NPQ_R	Decadimento rapido del NPQ	$(F_m / F'_m) - (F_m / F'_m)$
NPQ_S	Decadimento lento del NPQ	$(F_m - F'_m) / F'_m$

1.6 Relazione tra indici di fluorescenza e livelli di stress idrico

Sebbene le misurazioni di fluorescenza possano fornire delle buone misure di fotosintesi, il loro vero vantaggio è nella capacità di dare informazioni non facilmente ottenibili in altri modi. In particolare, la fluorescenza può fornire dettagli sulla capacità di una pianta di tollerare stress ambientali e sulla loro capacità di danneggiare l'apparato fotosintetico. Negli ultimi anni, la diffusione di fluorimetri portatili di piccole dimensioni ha consentito una più pratica raccolta di misurazioni di campo. Tali misurazioni, sebbene sembrano apparentemente semplici, richiedono una grande mole di lavoro, una accurata preparazione della prova sperimentale e molta competenza per l'interpretazione dei dati e per l'analisi statistica.

Misurazioni eseguite durante il giorno possono fornire informazioni sul *NPQ*, sui tassi di trasporto elettronico, sull'efficienza quantica, sull'entità di fotoinibizione in risposta alla luce e ad altri fattori ambientali (Bilger et al., 1985). I primi esperimenti sono stati ideati per misurare la diminuzione di F_v/F_m e l'aumento di F_o in foglie ombreggiate per indicare danni fotoinibitori in risposta alle alte temperature (Gamon e Pearcy, 1992), eccesso di luce (Ögren e Sjöström, 1990), stress idrico (Epron et al., 1992). Ancora oggi, nonostante le variazioni della terminologia e della tecnologia, queste osservazioni rimangono valide e le variazioni di F_v/F_m e F_o sono un affidabile indicatore biologico della fotoinibizione (He et al., 1996; Vallardes e Pearcy, 1997). Negli ultimi anni, le tecniche di misurazione di fluorescenza sono diventate sempre più raffinate e le misurazioni in foglie adattate al buio, in combinazione con quella alla luce, permettono una dettagliata analisi dei processi fotosintetici *in situ*.

Un esperimento molto elegante basato sull'uso in campo della fluorescenza è quello eseguito da Barker e Adams (1997) su alcune specie di cactus. In questo esperimento, sono stati misurati l'efficienza fotochimica, la fotosintesi e l'attività del ciclo delle xantofille in parti della pianta orientate diversamente e quindi sottoposte a diversi livelli di luce e temperature durante il giorno. Lo studio ha confermato che gli organi fotosintetici sottoposti a maggiori livelli di luce hanno un ciclo delle xantofille più efficiente, con la de-epossidazione della violaxantina ad anteraxantina e zeaxantina fortemente correlata al *NPQ* (Demmig-Adams, 1990). Un altro lavoro di Adams et al. (1999) ha dimostrato che in eucalipto l'andamento dei valori di *NPQ*, dipendente dal ciclo delle xantofille, è finemente regolato dalle variazioni dei parametri ambientali. Un approccio simile è stato adottato per quantificare il destino dell'energia luminosa in foglie esposte e ombreggiate di piante tropicali emi-epifite (Roberts et al., 1998; Griffith e Maxwell, 1999). Sebbene, come detto precedentemente, gli andamenti dettagliati dei valori di *NPQ* non siano facilmente misurabili in campo, semplici misure di rilassamento di F_m possono fornire dettagli sulle risposte delle piante agli stress. Per esempio, le bromeliadi epifittiche presentano una crescita molto lenta, la loro carbosilazione è limitata durante tutto il giorno e tutte le specie hanno una capacità per alti livelli di *NPQ* in risposta a livelli alti di

irraggiamento (Skillman e Winter, 1997). Nelle piante adattate all'ombra, inoltre, la fotoinibizione è solitamente più alta rispetto alle piante adattate alla luce intensa (Griffith e Maxwell, 1999).

1.7 Obiettivi della ricerca

Una completa conoscenza dei fattori molecolari e metabolici coinvolti nelle strategie della resistenza dell'olivo allo stress idrico e luminoso è fondamentale per il miglioramento colturale di questa specie, ma è attualmente carente. Sebbene la risposta dell'olivo allo stress idrico sia un processo ben documentato (tra i numerosi articoli ricordiamo i seguenti: Bonghi e Long, 1987; Xiloyannis *et al.*, 1988; Fernández *et al.*, 1997; Moriana *et al.*, 2002; Sofo *et al.*, 2005), solo pochi studi si sono concentrati sugli effetti dell'intensità luminosa su alcuni aspetti della fisiologia e sugli effetti sinergici della luce e della carenza idrica in questa specie (Angelopoulos *et al.*, 1996; Sofo *et al.*, 2004).

Gli obiettivi principali di questa ricerca sono: 1) determinare l'influenza dei diversi livelli di luce sui parametri fotosintetici e di fluorescenza di due cultivar di olivo sottoposte a differenti livelli di deficit idrico mediante la misurazione degli scambi gassosi e della fluorescenza della clorofilla; 2) verificare se la fluorescenza della clorofilla è uno strumento diagnostico per lo studio dell'attività fotosintetica delle piante di olivo e se è possibile correlare piante in condizioni irrigue ottimali con piante sottoposte a stress idrico mediante lo studio di questo parametro.

Tale lavoro potrà fornire un quadro più completo della risposta delle piante di olivo sottoposte a condizioni di stress ambientale significativo e all'azione sinergica di differenti stress abiotici, quali la carenza idrica e l'eccesso di luce. I dati ottenuti permetteranno in futuro la rapida individuazione mediante metodi non distruttivi di cultivar di olivo che presentano alti valori di associati ad un alto grado di resistenza allo stress idrico e la selezione di piante con un'alta efficienza traspirativa e fotosintetica in condizioni di disponibilità idrica non ottimale.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Analisi degli indici di fluorescenza

2.1.1 *Materiale vegetale e disegno sperimentale*

Le prove sperimentali sono state condotte su piante di olivo (*Olea europaea* L.) di due anni di età, appartenenti alle cultivar “Coratina” e “Biancolilla” e aventi un’altezza di 130–150 cm. La cultivar “Coratina” è caratterizzata da un’alta produttività e resistenza contro lo stress idrico, mentre la cultivar “Biancolilla” è presenta foglie di dimensioni più piccole ed anch’essa ha un buon grado di resistenza allo stress idrico (Lo Bianco, comunicazione personale). Il sito sperimentale è stato presso l’azienda agricola sperimentale “Pantanello” di Metaponto (Basilicata – N 40° 24’, E 16° 48’). Il periodo sperimentale è iniziato il 12 luglio ed è terminato il 26 agosto.

Le piante di olivo sono state allevate uniformemente in vasi di 0.016 m³ contenenti 73.2% sabbia, 13.3 % limo e 13.5% argilla. I vasi sono stati coperti con un telone di plastica e con un foglio di alluminio al fine di evitare l’evaporazione dalla superficie del suolo e di minimizzare l’aumento di temperatura all’interno dei contenitori. Tutte le piante sono state pesate ogni sera in per calcolare la quantità di acqua traspirata. Il contenuto idrico del suolo è stato mantenuto ad un valore costante dell’85% della capacità idrica di campo del vaso integrando la quantità di acqua persa mediante traspirazione durante il giorno. Le piante sono state fertilizzate lungo tutto il periodo di crescita vegetativa con 3.5 g di fertilizzante azotato a lento rilascio (Nitrophoska Gold 15N–9P–16K + 2Ca + 7Mg; Compo Agricoltura, Cesano Maderno, MI, Italia). All’inizio dell’esperimento, per ogni cultivar, le piante sono state divise in quattro gruppi: 26 piante sottoposte a stress idrico in condizioni di ombreggiamento (OP), 26 piante sottoposte a stress idrico in condizioni di non-ombreggiamento (EP), 4 piante di controllo ombreggiate e 4 piante di controllo non-ombreggiate. OP e EP sono state

allevate in condizioni di densità di radiazione fotosinteticamente attiva (photosynthetic active radiation, PAR) ambientale, mentre le piante di controllo sono state tenute in condizioni di semi-ombreggiamento di circa il 60% della PAR per mezzo di un telone di plastica ombreggiante (Immagine 2.1). La verifica della diminuzione di radiazione è stata ottenuta mediante misurazione con uno spettroradiometro. E' stato accertato che la diversa intensità luminosa ottenuta mediante il telone ombreggiante non ha influito sulla qualità della luce e che quindi la proporzione tra radiazioni di lunghezza d'onda differente sia sopra che sotto il telone era uguale.



Immagine 2.1 – Telone ombreggiante per la riduzione della luce e apparato sperimentale.

Durante l'intero periodo sperimentale, nelle piante di controllo la quantità di acqua aggiunta quotidianamente è stata uguale a quella traspirata. Le piante sottoposte a stress idrico sono state sottoposte ad una riduzione graduale di acqua per 21 giorni. Nei primi 10 giorni di stress idrico, la riduzione di acqua è stata condotta applicando una riduzione giornaliera del 20% minore dell'acqua traspirata totale, al fine di permettere l'induzione e l'espressione dei meccanismi adattativi nei confronti dello stress idrico, e successivamente l'irrigazione è stata interrotta. Il grado di stress idrico nelle piante è stato misurato per mezzo dei potenziali idrici fogliari (LWP) misurati prima dell'alba. Valori di LWP tra -1.5 e -2.0 MPa, raggiunti a partire da 7–10 giorni dall'inizio del periodo di stress idrico, sono stati definiti come stress idrico "lieve". Valori di LWP tra -3.5 e -4.0 MPa (14–17 giorni dall'inizio del

periodo di stress idrico) sono stati descritti come stress idrico “moderato”, e quelli tra -6.5 e -7.0 MPa (20–21 giorni dall’inizio del periodo di stress idrico) come stress idrico “severo”.

Dopo aver raggiunto il massimo livello di stress idrico (rispettivamente 2 e 3 agosto per Biancolilla e Coratina), misurato per mezzo dei valori di LWP, le piante sono state sottoposte ad un trattamento di recupero idrico (rewatering) ripristinando il contenuto idrico del suolo a valori ottimali. Il periodo di recupero è durato 23 giorni e, durante questo periodo, il contenuto di acqua aggiunta quotidianamente è stato uguale a quello traspirato. L’ottavo giorno dall’inizio del periodo di recupero è stato definito come “primo livello di recupero” e il ventitreesimo giorno come “secondo livello di recupero”.

2. 1. 2 Parametri ambientali e potenziale idrico

I parametri ambientali sono stati seguiti mediante una stazione meteorologica sperimentale situata a 20 m dal punto sperimentale. Le misurazioni di temperatura dell’aria, umidità relativa (*relative humidity*, RH) e radiazione fotosinteticamente attiva (PAR) sono state eseguite a cadenza oraria per ogni giorno del periodo sperimentale. I valori di PAR sono espressi come valori integrali giornalieri mentre i valori di deficit di pressione di vapore (*vapour pressure deficit*, VPD) sono stati calcolati secondo Goudrian e Van Laar (1994).

Tre CP e tre OP sono state scelte casualmente per misurare i valori di potenziale idrico e di scambi gassosi ad ogni livello di stress idrico e di recupero idrico, utilizzando foglie espanse selezionate da ogni pianta lungo il segmento mediano di germogli di nuova crescita e marcate all’inizio dell’esperimento. I valori di potenziale idrico fogliare (LWP) sono stati misurati prima dell’alba (04.00–05.00 h) utilizzando una camera a pressione Sholander (PMS Instrument Co. Corvallis, OR, USA), in base a Turner (1981) (Immagine 2.2).

2. 1. 3 Scambi gassosi e fluorescenza della clorofilla

Le misurazioni di tasso fotosintetico netto (A), conduttanza stomatica (g_s) e concentrazione sottostomatica di CO_2 (C_i) sono state condotte utilizzando un analizzatore programmabile portatile a flusso aperto (LI-6400; Li-Cor, Inc.) (Immagine 2.2) operando ad un flusso di $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, in condizioni ambientali (09.00–10.00 h e a 13.00–14.00 h) (Immagine 2.3). La temperatura all'interno della camera fogliare è uguale a quella ambientale ed è stata mantenuta costante durante le misurazione mediante il raffreddamento automatico dello strumento.

Le stesse piante utilizzate per le misurazioni di scambi gassosi sono state scelte per misurare la fluorescenza della clorofilla su foglie pienamente espanse selezionate da ogni pianta lungo il segmento mediano di germogli di nuova crescita e marcate all'inizio dell'esperimento. La fluorescenza della clorofilla è stata misurata *in vivo* alle 09.00–10.00 h e alle 13.00–14.00 h utilizzando un analizzatore programmabile portatile a flusso aperto (LI-6400; Li-Cor, Inc.) dotato nella camera fogliare di un fluorimetro (LI-6400-40; Li-Cor, Inc.) (Immagine 2.3). Su ciascuna pianta, sono state scelte foglie adattate alla luce e al buio per misurare i parametri di fluorescenza.

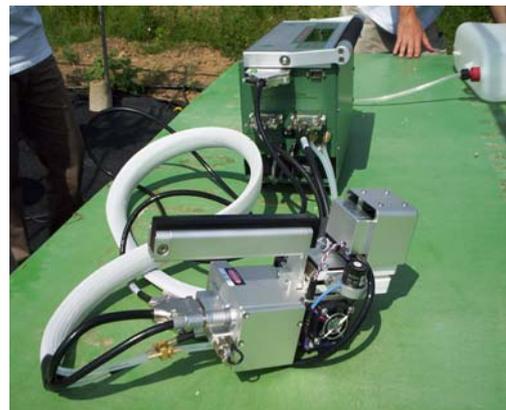


Immagine 2.2 – (A sinistra) Misurazione del potenziale idrico fogliare all'alba. (A destra) Analizzatore di scambi gassosi Li-Cor 6400.

Le foglie sono state adattate al buio con delle “mollette” fatte a mano con un cilindro nero centrale in grado di accettare la sonda a fibre ottiche del fluorimetro e posizionarla correttamente per la misurazione. La parte laterale della molletta ha consentito alla luce ambientale di non arrivare alla

foglia sia prima che dopo la misurazione. Le mollette sono state poste sulle foglie 30 min prima delle misurazioni. Questo intervallo di tempo di 30 min ha permesso delle misurazioni affidabili di fluorescenza, mentre la temperatura l'interno delle mollette non è stata diversa da quella dell'aria, a causa dell'intervallo di tempo non molto lungo. In foglie adattate al buio, sono stati calcolati la resa quantica del PSII come il rapporto di fluorescenza variabile su fluorescenza massima (F_v/F_m):

$$F_v/F_m = (F_m - F_o) / F_m \quad (1)$$

Tale valore rappresenta l'efficienza quantica massima, quando tutti i centri del PSII sono aperti. In condizioni ottimali e all'inizio dell'esperimento, le piante hanno raggiunto il massimo valore di F_v/F_m di circa 0.75. Per le foglie adattate al buio, i parametri usati per il raggio misuratore sono stati: intensità 1, modulazione 0.25 kHz, filtro 1 e gain 10; quelli per il flash sono stati durata 0.8 sec, intensità 5, modulazione 20 kHz e filtro 50 Hz.



Immagine 2.3 – Misurazione degli scambi gassosi e della fluorescenza della clorofilla effettuate con il Li-Cor 6400.

In foglie adattate alla luce, immediatamente dopo le misurazioni di scambi gassosi, sono state determinati i valori di efficienza del PSII (Φ_{PSII}),

tasso relativo di trasporto elettronico fotosintetico (rETR), estinzione fotochimica (qP) ed estinzione non-fotochimica (NPQ). Il flusso di luce all'interno della camera fogliare dello strumento (con il 90% della frazione rossa con una lunghezza d'onda di 630 nm e un 10% della frazione blu a 470 nm) è stata tracciata ogni tre sec da un sensore di luce esterno. Per le foglie adattate alla luce, i parametri usati per il raggio misuratore sono stati: intensità 4, modulazione 10 kHz, filtro 1 e gain 10; quelli per il flash sono stati durata 0.8 sec, intensità 6, modulazione 20 kHz e filtro 50 Hz.

Il valore di Φ_{PSII} è stato determinato come una misura dell'efficienza dei centri chiusi del PSII (Genty *et al.*, 1989) come:

$$\Phi_{PSII} = \Delta F / F'_m = (F'_m - F_t) / F'_m \quad (2)$$

con misurazioni sotto luce attinica dello stato costante di fluorescenza F_t e della massima resa fotosintetica F'_m ottenuta usando un impulso saturante di 0.8 sec.

Il valore di qP è stato calcolato secondo Maxwell e Johnson (2000) come:

$$qP = (F'_m - F_t) / (F'_m - F'_o) \quad (3)$$

I valori della Stern-Volmer NPQ sono stati calcolati usando il valore iniziale F_m misurato dopo un lungo periodo di buio e usando il valore di F'_m misurato dopo esposizione alla luce (Bilger e Björkman, 1990) come:

$$NPQ = (F_m - F'_m) / (F_m - F'_o) \quad (4)$$

Sia qP che NPQ richiedono F'_o , il valore fluorescenza minima di una foglia adattata alla luce che viene successivamente esposta al buio. Questo valore è stato determinato utilizzando una luce nel rosso-lontano con i seguenti parametri: durata 6 sec, intensità 8, pre-time 1 sec, post-time 1 sec, modulazione 0.25 kHz, filtro 1 Hz.

2. 1. 4 Curve di risposta alla luce

Per ogni tesi, ad ogni livello di stress idrico e di recupero idrico, sono state scelte tre piante per effettuare le curve di risposta alla luce. Le misurazioni sono state condotte su foglie ben esposte alla luce, completamente espanse e non danneggiate. Le curve di risposta alla luce sono state registrate alle 09.00–11.00 h, quando la risposta fotosintetica delle piante è massima, con una luce attinica con proporzioni 90% rossa / 10% blu (Immagine 2.4). Le curve di risposta alla luce sono state effettuate partendo da intensità più alte (per le piante esposte: 2000, 1600, 1200, 800, 400, 200, 100 e 50 $\mu\text{mol PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$; per le piante ombreggiate: 1000, 800, 400, 200, 100 e 50 $\mu\text{mol PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ad intervalli regolari di 15 min, al fine di dare agli stomi il tempo di equilibrarsi ad ogni livello. Durante la registrazione della curva, sono stati misurati anche i valori di scambi gassosi, Φ_{PSII} , $r\text{ETR}$, qP e NPQ .

I parametri fotosintetici di ogni pianta sono stati ottenuti dall'equazione della curva di risposta alla luce della fotosintesi (Drake e Read, 1981):

$$A = [A_{\text{max}} (I - I_c) \alpha_c] / [A_{\text{max}} + (I - I_c) \alpha_c] \quad (5)$$

dove A e A_{max} sono rispettivamente il tasso fotosintetico netto e il tasso fotosintetico massimo (espressi come $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$), α_c l'efficienza quantica ($\mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol}^{-1} \text{PAR}$), I l'intensità luminosa e I_c il punto di compensazione della luce ($\mu\text{mol PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Per quanto riguarda

i valori di α_c , misurabili dalla pendenza iniziale, è stata calcolata la derivata utilizzando i primi tre punti della curva di risposta alla luce.

Il tasso di respirazione al buio R_d ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) è stato calcolato dalla relazione che descrive la parte limitante della curva di risposta alla luce, caratterizzata ad una risposta lineare ad intensità di PAR crescenti:

$$A = \alpha_c I - R_d \quad (6)$$

Per $I = I_c$, A è uguale a zero e, conseguentemente, R_d è uguale a $\alpha_c I_c$.



Immagine 2.4 – Curve di risposta alla luce e curve di rilassamento della fluorescenza effettuate con il Li-Cor 6400.

2. 1. 5 Curve di rilassamento della fluorescenza

Per ogni tesi, in corrispondenza del livello di stress idrico severo e del secondo livello di recupero, sono state scelte tre piante per condurre le curve di rilassamento di fluorescenza. Le misurazioni sono state effettuate alle 09.00–11.00 h su foglie adattate al buio, completamente espanse e non danneggiate (Immagine 2.4). Le foglie sono state adattate al buio per 30 min prima delle misurazioni, poi illuminate con luce attinica (per le piante

esposte: 2000 $\mu\text{mol PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; per le piante ombreggiate: 1000 $\mu\text{mol PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e successivamente riportate al buio (Figura 2.1). In questo tipo di analisi di rilassamento, l'estinzione è lasciata decadere al buio, dopo un periodo di illuminazione, e i valori di F_m sono registrati a intervalli regolari di 5 min (Walters e Horton, 1991). Il rilassamento è stato seguito per 45 min. L'estrapolazione dal grafico ($\log F_m$ contro il tempo) dei valori di F_m registrati a partire da quando la luce attinica è stata rimossa, ha permesso il calcolo di F'_m , che indica il valore di fluorescenza ottenuto se è presente alla luce soltanto l'estinzione di decadimento lento (Walters e Horton, 1991; Maxwell e Johnson, 2000) (Figura 2.1).

Il decadimento non-fotochimico lento e rapido (rispettivamente NPQ_S e NPQ_R) è stato calcolato secondo Maxwell e Johnson (2000) come:

$$NPQ_S = (F_m - F'_m) / F'_m \quad (7)$$

$$NPQ_R = (F_m / F'_m) / (F_m / F'_m) \quad (8)$$

2. 1. 6 *Analisi statistica*

I valori di potenziale idrico sono stati rappresentati come medie di nove misurazioni (\pm SD) da tre piante selezionate (tre misurazioni per pianta), mentre i valori di scambi gassosi, i valori fluorescenza della clorofilla e le curve di risposta alla luce e di rilassamento sono stati espressi come medie di tre misurazioni (\pm SD) da tre piante con potenziale idrico simile (una misurazione per pianta).

L'analisi statistica è stata effettuata mediante ANOVA. Le differenze significative sono state determinate a $P \leq 0.05$, in base al test t di Student.

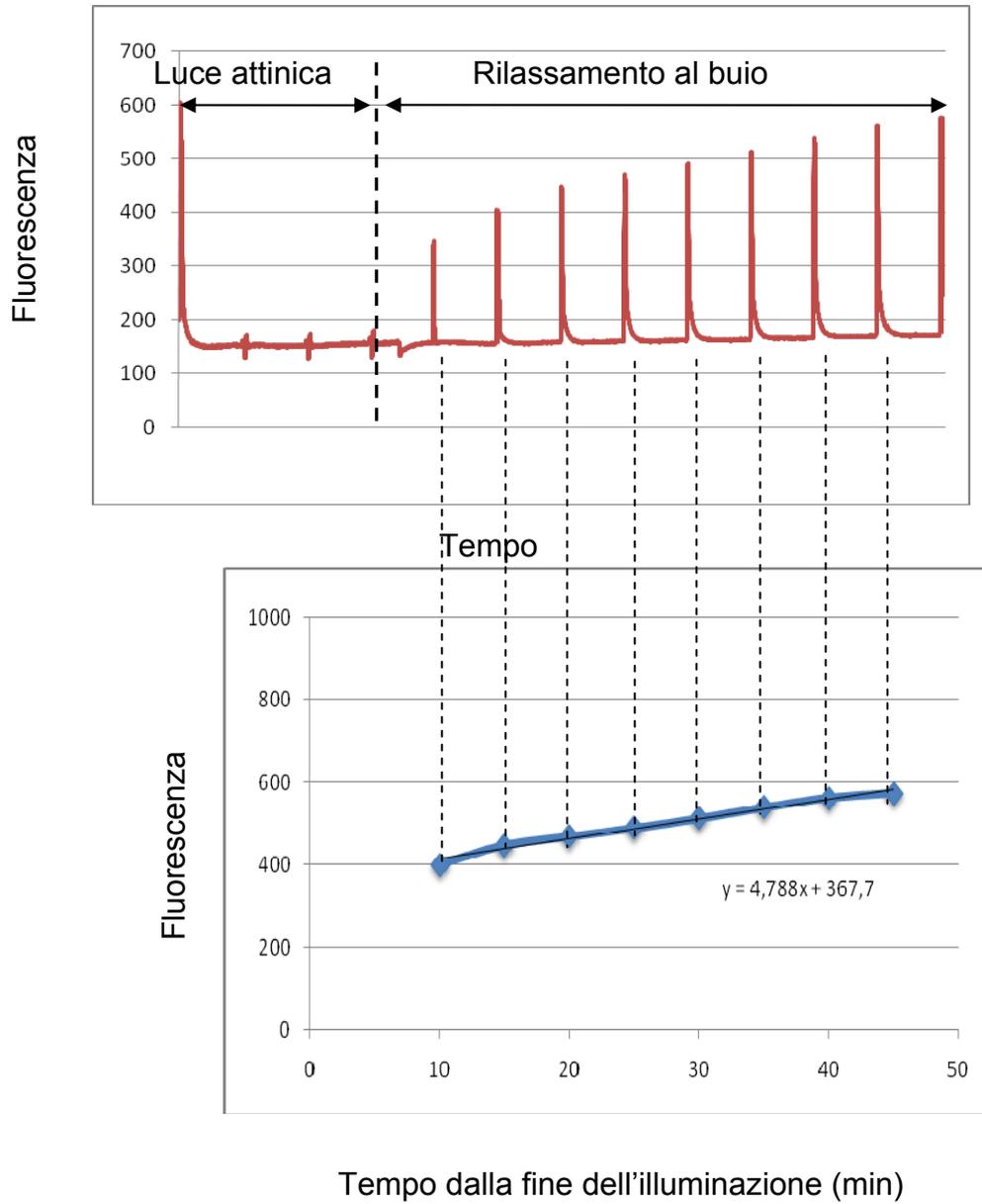


Figura 2.1 – (In alto) Tipica curva di rilassamento della clorofilla in piante di olivo ben irrigate. (In basso) Estrapolazione dei punti massimi di fluorescenza a partire dal secondo punto (dopo 10 min dalla fine dell'illuminazione) per il calcolo di F_m' (spiegazioni nel testo).

3. RISULTATI

3.1 Parametri ambientali, potenziali idrici e scambi gassosi

Il valore più alto tra le temperature massime è stato 39.2°C (29 luglio), mentre la media di tutti i valori di temperatura massima giornaliera è stata 31.6°C; il valore più alto della RH minima (53.1%) si è verificato l'11 agosto, con una media di 31.1%; il range dei valori di VPD è stato compreso tra 1.55 kPa (11 agosto) e 5.43 kPa (29 luglio), con un valore medio di 1.89 kPa; i livelli di irraggiamento giornaliero globale e di PAR hanno mostrato un andamento costante, ad eccezione di alcuni picchi minimi all'inizio della seconda decade di luglio e in alcuni giorni di agosto (3, 8 e 12 agosto) (Figura 3.1). I valori di temperatura massima dell'aria sono variati da 39.2 °C (29 luglio) a 24.5 °C (8 agosto), con una media di 31.6 °C durante l'intero periodo (Figura 3.1).

In tutte le tesi esaminate, il valore medio di LWP è diminuito durante il periodo del deficit idrico e, in seguito al ripristino idrico, i LWP sono ritornati ai valori delle piante di controllo (Figura 3.2).

Per quanto riguarda le misurazioni di scambi gassosi effettuate alle 09.00–10.00 h, le piante sottoposte a deficit idrico hanno mostrato una diminuzione dei valori di A e g_s . I valori di g_s sono stati più alti nelle EP che nelle OP mentre i valori di A sono stati più alti nelle OP che nelle EP (Figura 3.3). Alla fine del ripristino idrico, g_s nelle EP non ha raggiunto i valori delle piante ben irrigate, mentre le OP hanno mostrato un ripristino completo sia nella Coratina che nella Biancolilla (Figura 3.3). Il recupero idrico ha causato un ripristino completo di A nelle OP della Coratina ma non nella Biancolilla (Figura 3.3). Le EP di entrambe le cultivar non hanno mostrato un ripristino completo dei valori di A alla fine del periodo di ripristino (Figura 3.3). I valori di C_i sono aumentati in corrispondenza di livelli di stress idrico moderato e severo, mentre quelli delle EP sono diminuiti con l'aumentare del grado di stress (Figura 3.3).

Per quanto riguarda le misurazioni di scambi gassosi effettuate alle 13.00–14.00 h, le piante sottoposte a deficit idrico hanno mostrato una diminuzione dei valori sia di A che di g_s (Figura 3.4). Ad alti livelli di stress, i

valori di g_s sono stati più alti nelle EP che nelle OP di entrambe le cultivar mentre, a livelli di stress lieve e moderato, i valori di A sono stati differenti solo nella Coratina (Figura 3.3). Alla fine del ripristino idrico, A e g_s nelle EP non hanno raggiunto i valori delle piante ben irrigate, mentre le OP hanno mostrato un ripristino completo in entrambe le cultivar (Figura 3.4). I valori di C_i sono aumentati in corrispondenza di livelli dei livelli più alti di stress idrico, mentre quelli delle EP sono stati più stabili (Figura 3.4).

Nelle piante di controllo di entrambe le cultivar, i valori di LWP, A , g_s e C_i sono rimasti relativamente stabili.

3.2 Indici di fluorescenza

I valori di F_v/F_m misurati sono diminuiti durante tutto il periodo di stress idrico e successivamente sono ritornati ai valori di partenza durante il periodo di ripristino idrico (Figure 3.5 e 3.6). Nelle ore più calde, questo declino è stato più pronunciato nella Coratina (Figura 3.6). In generale, nelle EP la diminuzione di F_v/F_m è stata più marcata che nelle OP (Figure 3.5 e 3.6). In entrambe le cultivar, gli andamenti di Φ_{PSII} misurati nelle EP sono stati simili a quelli di F_v/F_m ma i valori sono stati più bassi poiché nelle foglie esposte alla luce una parte dell'energia luminosa assorbita è usata nei processi fotochimici (Figure 3.5 e 3.6). I valori di Φ_{PSII} trovati nelle OP durante tutto il periodo sperimentale sono stati più alti di quelli delle EP (Figure 3.5 e 3.6). Inoltre, al massimo livello di stress idrico, i valori di Φ_{PSII} nelle EP e nelle OP sono stati più alti nella Biancolilla che nella Coratina (Figure 3.5 e 3.6). Nella Biancolilla, e in minor misura nella Coratina, le EP non hanno recuperato i valori di Φ_{PSII} alla fine del periodo di ripristino idrico (Figura 3.5). Infine, in entrambe le cultivar, come per le F_v/F_m , i valori di Φ_{PSII} nelle OP sono stati più alti di quelli trovati nelle EP durante tutto il periodo sperimentale (Figure 3.5 e 3.6).

I valori di qP nelle OP nelle due cultivar sono stati più alti di quelli delle EP, mentre l'andamento di NPQ è stato opposto (Figura 3.5). In generale, gli andamenti di qP e NPQ misurati alle 13.00–14.00 h hanno mostrato una lieve depressione durante il periodo di stress idrico e

successivamente un recupero alla fine del ripristino idrico (Figura 3.5). Nelle EP, i valori di NPQ nella Biancolilla sono stati più alti di quelli riscontrati nella Coratina (Figura 3.5).

I valori di qP misurati alle 13.00–14.00 h nelle due cultivar hanno mostrato andamenti molto più costanti durante il periodo sperimentale e le OP hanno mostrato valori leggermente più elevati di quelli delle EP (Figura 3.6). I valori di NPQ misurati alle 13.00–14.00 h hanno mostrato nelle OP una diminuzione al crescere dello stress idrico e, solo nella cultivar Coratina, un recupero completo alla fine del ripristino idrico; gli stessi valori misurati nelle EP di entrambe le cultivar denotano un forte incremento verso la fine del periodo sperimentale, durante il periodo di recupero idrico (Figure 3.6).

Nelle piante di controllo di entrambe le cultivar, i valori degli indici di fluorescenza sono rimasti relativamente stabili.

3.3 Curve di risposta alla luce e correlazioni tra NPQ e Φ_{PSII}

I valori di I_c , complessivamente più alti nelle EP che nelle OP, sono aumentati a causa del deficit idrico (Tabella 3.1). Nella Coratina, è avvenuto un recupero completo di I_c durante il periodo di ripristino idrico, mentre questo comportamento non è stato osservato nella Biancolilla (Tabella 3.1). I valori di R_d hanno mostrato una durante il periodo di stress idrico e sono stati significativamente più bassi nelle EP che nelle OP (Tabella 3.1). In entrambe le cultivar, i valori di α_c trovati nelle OP sono stati significativamente più alti di quelli riscontrati nelle EP durante tutto il periodo sperimentale (Tabella 3.1).

L'analisi delle curve di risposta alla luce a livelli di stress severo degli indici fotosintetici (Figura 3.7) mostra che le piante ben irrigate, stressate e alla fine del recupero di entrambe le cultivar hanno subito un rapido declino iniziale di (Φ_{PSII}) a bassi livelli di $(500\text{--}1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})$ (Figure 3.7 e 3.8). Ad alti livelli di luce $(1000\text{--}2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})$, le curve di Φ_{PSII} si sono stabilizzate e hanno mostrato minori differenze con l'aumento della PAR; questo comportamento è stato più marcato nelle OP rispetto alle EP (Figure 3.7 e 3.8). I valori di Φ_{PSII} ad alti livelli di luce sono stati più alti nelle OP che

nelle EP di entrambe le cultivar (Figure 3.7 e 3.8), indicando così la presenza di fotoinibizione nelle EP. Al massimo livello di stress idrico, i valori di Φ_{PSII} delle OP sono stati più alti in OP nella Biancolilla che nella Coratina (Figure 3.7 e 3.8). I valori di qP hanno mostrato una diminuzione con l'aumentare della PAR e sono stati differenti tra le piante ben irrigate e quelle sottoposte a stress (Figure 3.7 e 3.8). In condizioni di deficit idrico e alla fine del recupero idrico, le EP di entrambe le cultivar hanno mostrato una marcata riduzione di qP ad alti livelli di luce se comparati con le OP (Figure 3.7 e 3.8). Questo suggerisce che le SP, acclimatate a livelli di luce di 900–1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sono state in grado di usare per i processi fotochimici una maggiore proporzione di luce assorbita. I dati mostrano anche differenze marcate tra piante stressate e dall'altro lato piante ben irrigate e poste a recupero idrico di entrambe le cultivar per quanto concerne i valori di NPQ (Figure 3.7 e 3.8). Nella Biancolilla, i valori di NPQ delle piante stressate sono stati più alti di quelli della Coratina (Figure 3.7 e 3.8). In entrambe le cultivar, ed in particolare nella Biancolilla, l'incremento di NPQ a bassi valori di PAR è stato più rapido nelle EP che nelle OP (Figure 3.7 e 3.8). Questo indica che le EP hanno avuto una migliore dissipazione termica dell'energia assorbita.

Infine, i valori dei coefficienti di correlazione tra Φ_{PSII} and NPQ sono risultati più alti nella Biancolilla rispetto alla Coratina (Figure 3.9).

3.4 Curve di rilassamento della fluorescenza

Dall'esame delle curve di rilassamento della fluorescenza si evince che i valori di NPQ_R e NPQ_S nelle piante appartenenti alla cultivar Coratina aumentano in seguito a deficit idrico per poi recuperare completamente alla fine del periodo di ripristino (Tabella 3.2). Nelle piante della cultivar Biancolilla, gli stessi valori aumentano in seguito a deficit idrico ma non mostrano un pieno recupero nella fase successiva di ripristino idrico (Tabella 3.2). In entrambe le cultivar, inoltre, i valori di NPQ_R e NPQ_S nelle piante esposte sono più alti dei corrispettivi nelle piante ombreggiate (Tabella 3.1).

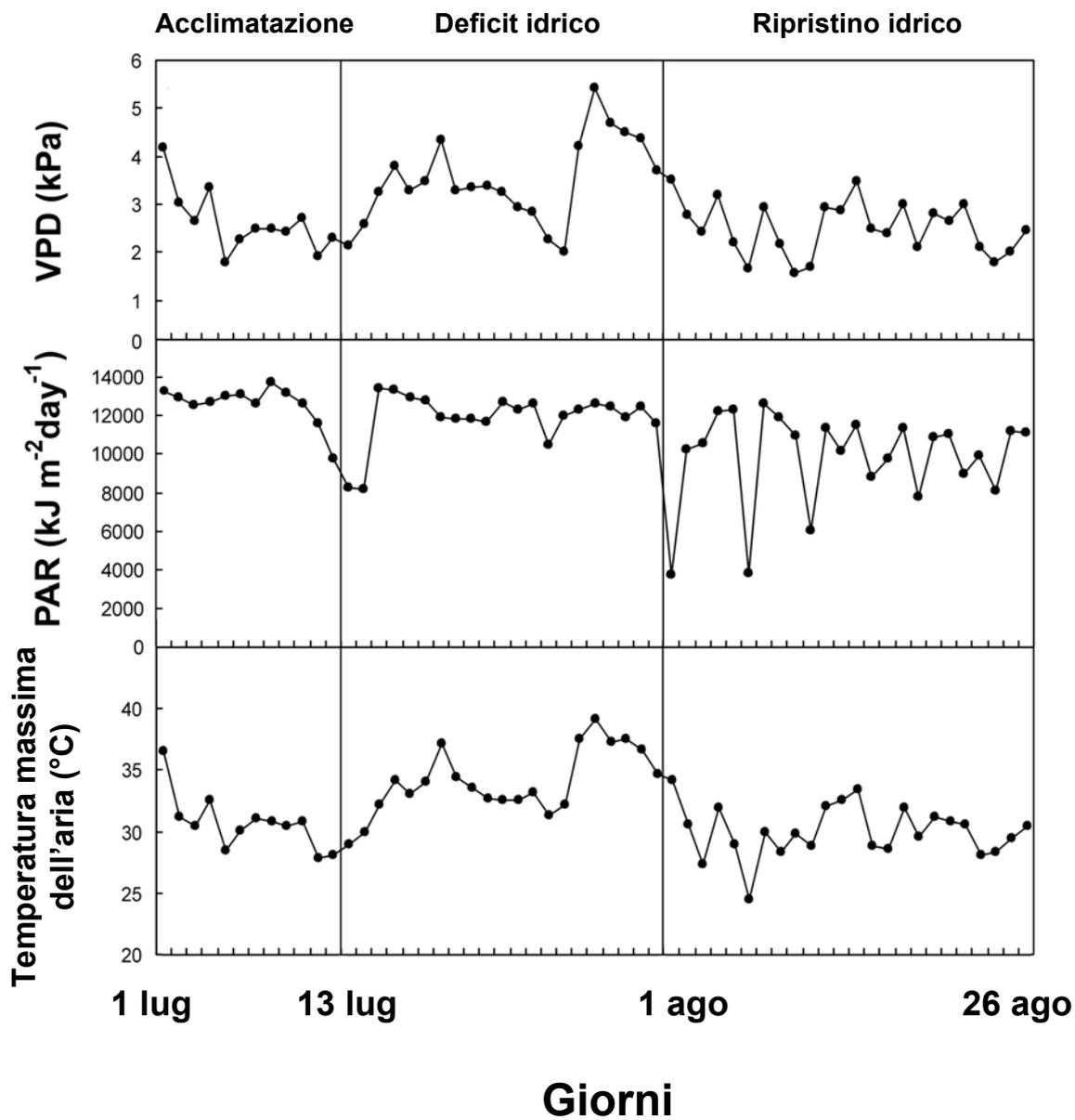


Figura 3.1 – Deficit di pressione di vapore (VPD), radiazione fotosinteticamente attiva (PAR) e temperatura massima dell'aria durante tutto il periodo sperimentale.

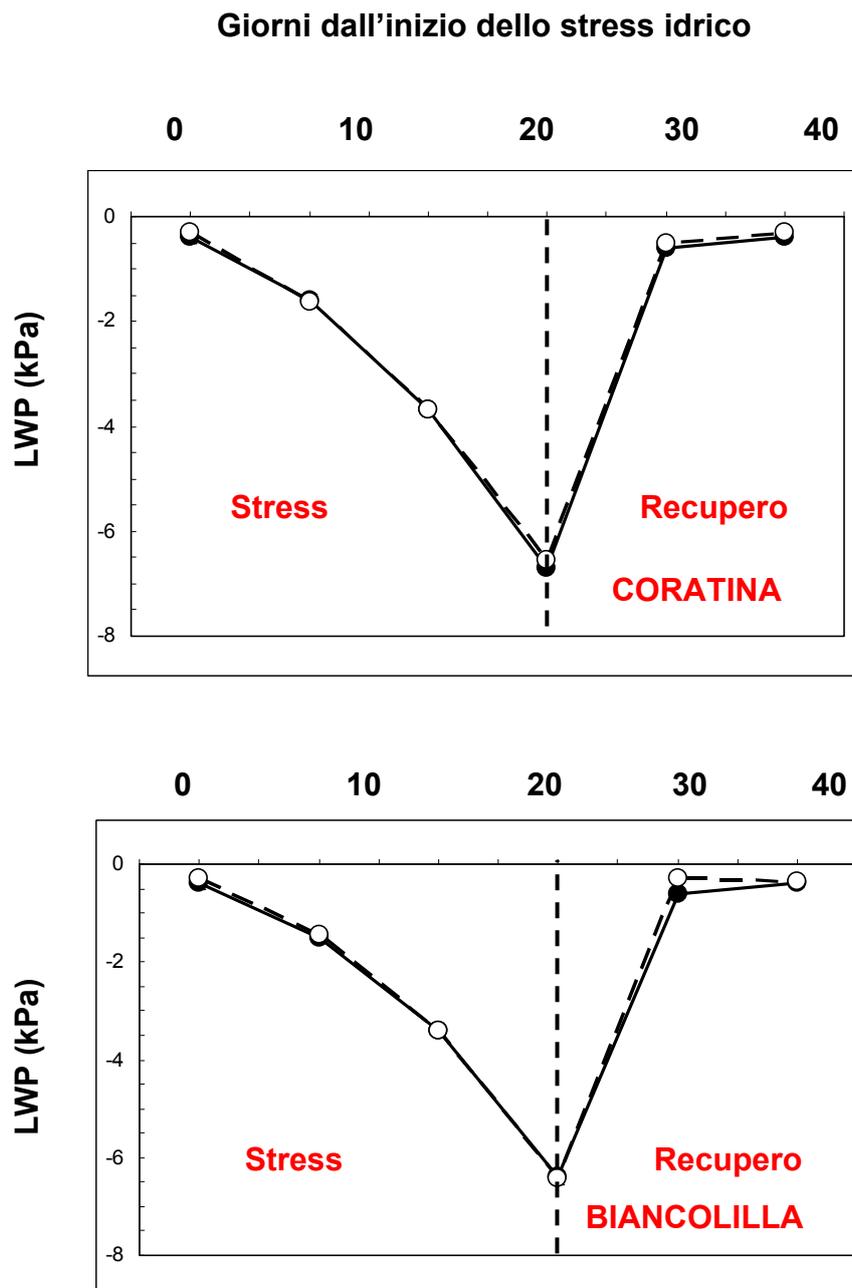


Figura 3.2 – Potenziale idrico fogliare (LWP) predawn misurato in piante in piante di olivo esposte (●) ed ombreggiate (○) appartenenti alla cultivar Coratina (*in alto*) e Biancolilla (*in basso*). I valori sono stati misurati alle 04:00–05:00 h durante tutto il periodo sperimentale. Ogni punto rappresenta la media di nove misurazioni (\pm SE).

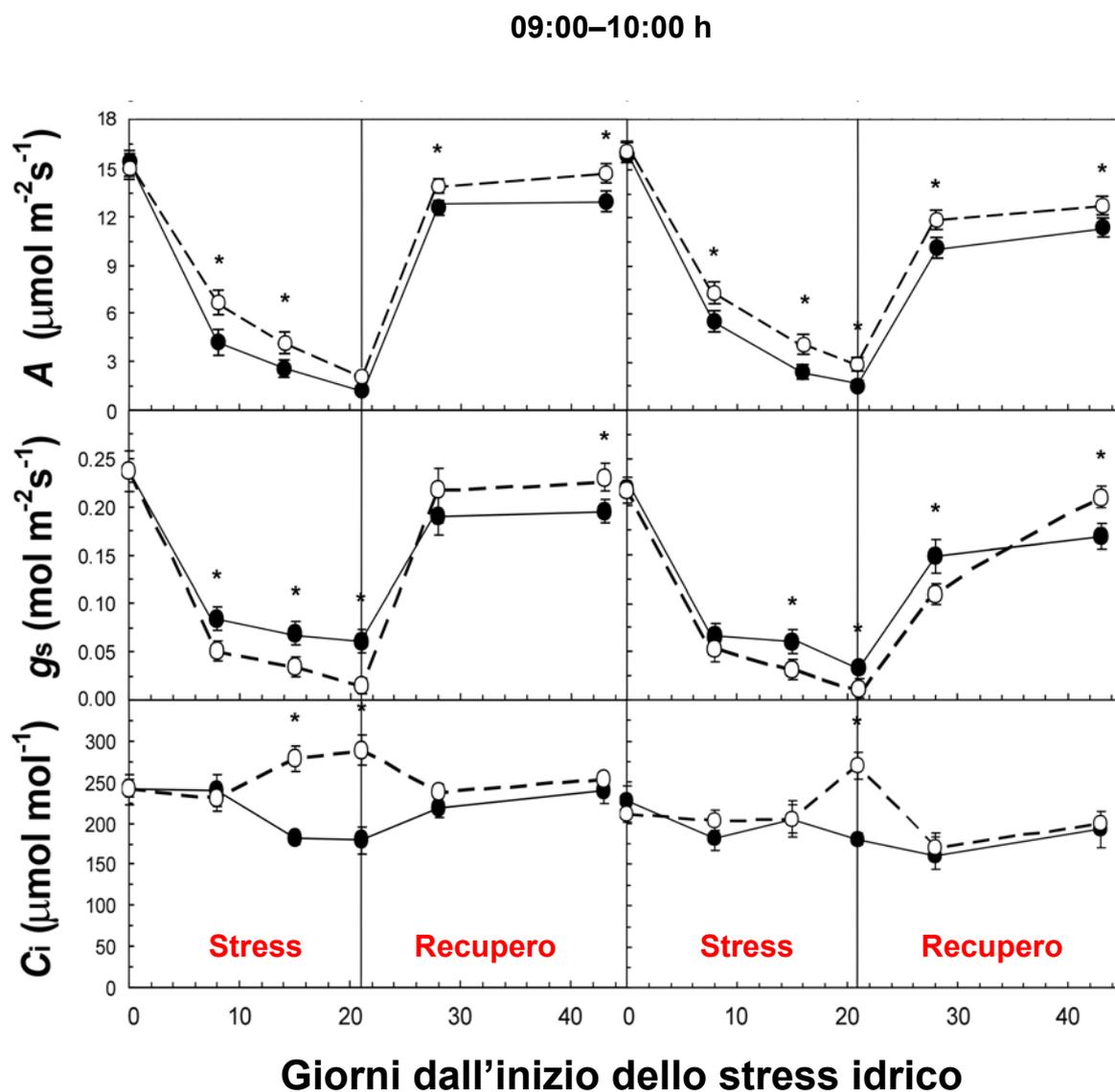


Figura 3.3 – Fotosintesi netta (A), conduttanza stomatica (g_s) e CO_2 substomatica (C_i) in piante di olivo esposte (●) ed ombreggiate (○) appartenenti alle cultivar Coratina e Biancolilla. I valori sono stati misurati alle 09:00–10:00 h durante tutto il periodo sperimentale. Ogni punto rappresenta la media di tre misurazioni (\pm SE) da tre piante con potenziale idrico simile. I valori con in alto l'asterisco sono significativamente differenti ($P \leq 0.05$, in base al test t di Student).

13:00–14:00 h

CORATINA

BIANCOLILLA

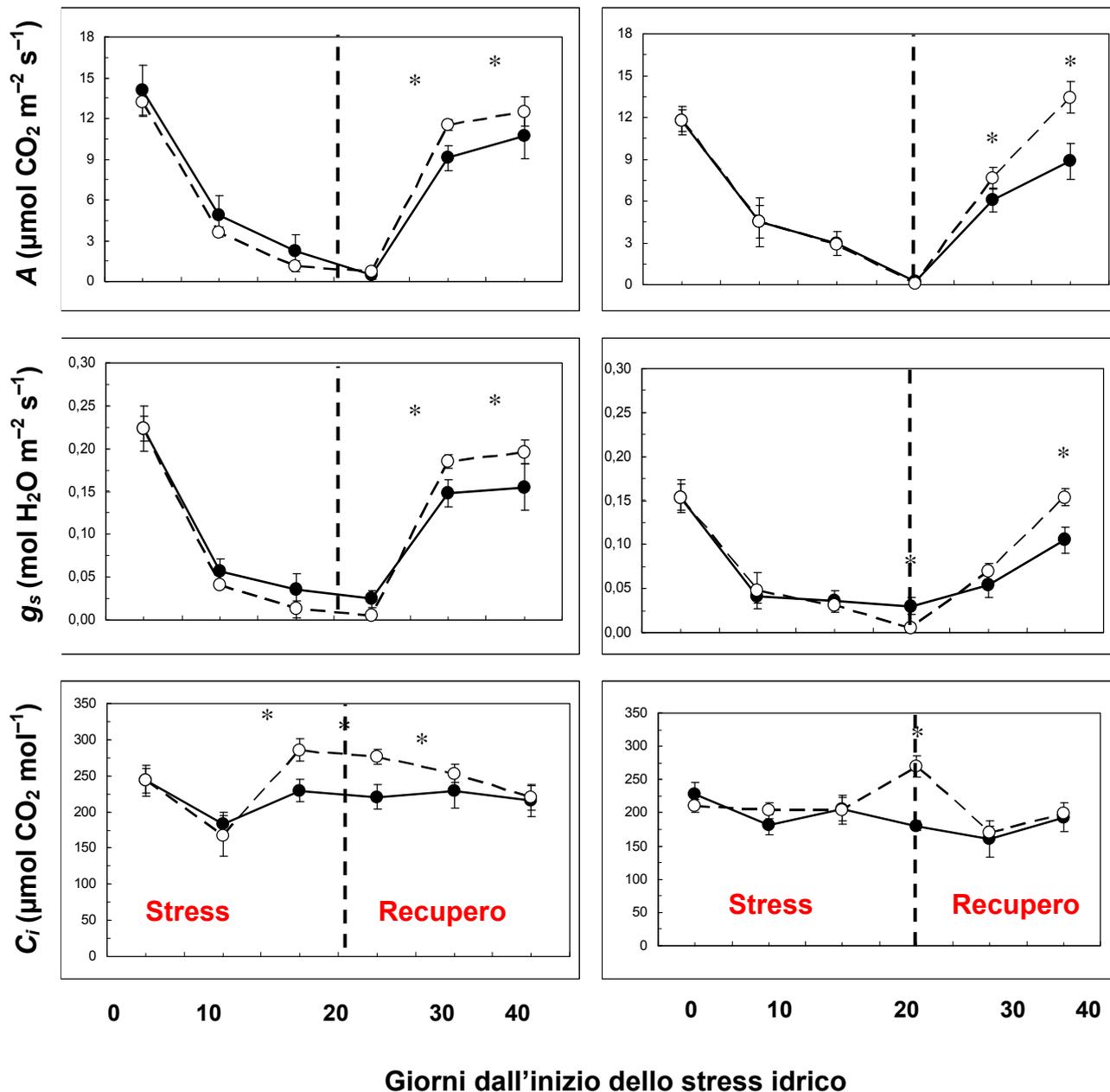


Figura 3.4 – Fotosintesi netta (A), conduttanza stomatica (g_s) e CO₂ substomatica (C_i) in piante di olivo esposte (●) ed ombreggiate (○) appartenenti alle cultivar Coratina e Biancolilla. I valori sono stati misurati alle 13:00–14:00 h durante tutto il periodo sperimentale. Ogni punto rappresenta la media di tre misurazioni (± SE) da tre piante con potenziale idrico simile. I valori con in alto l'asterisco sono significativamente differenti (P ≤ 0.05, in base al test t di Student).

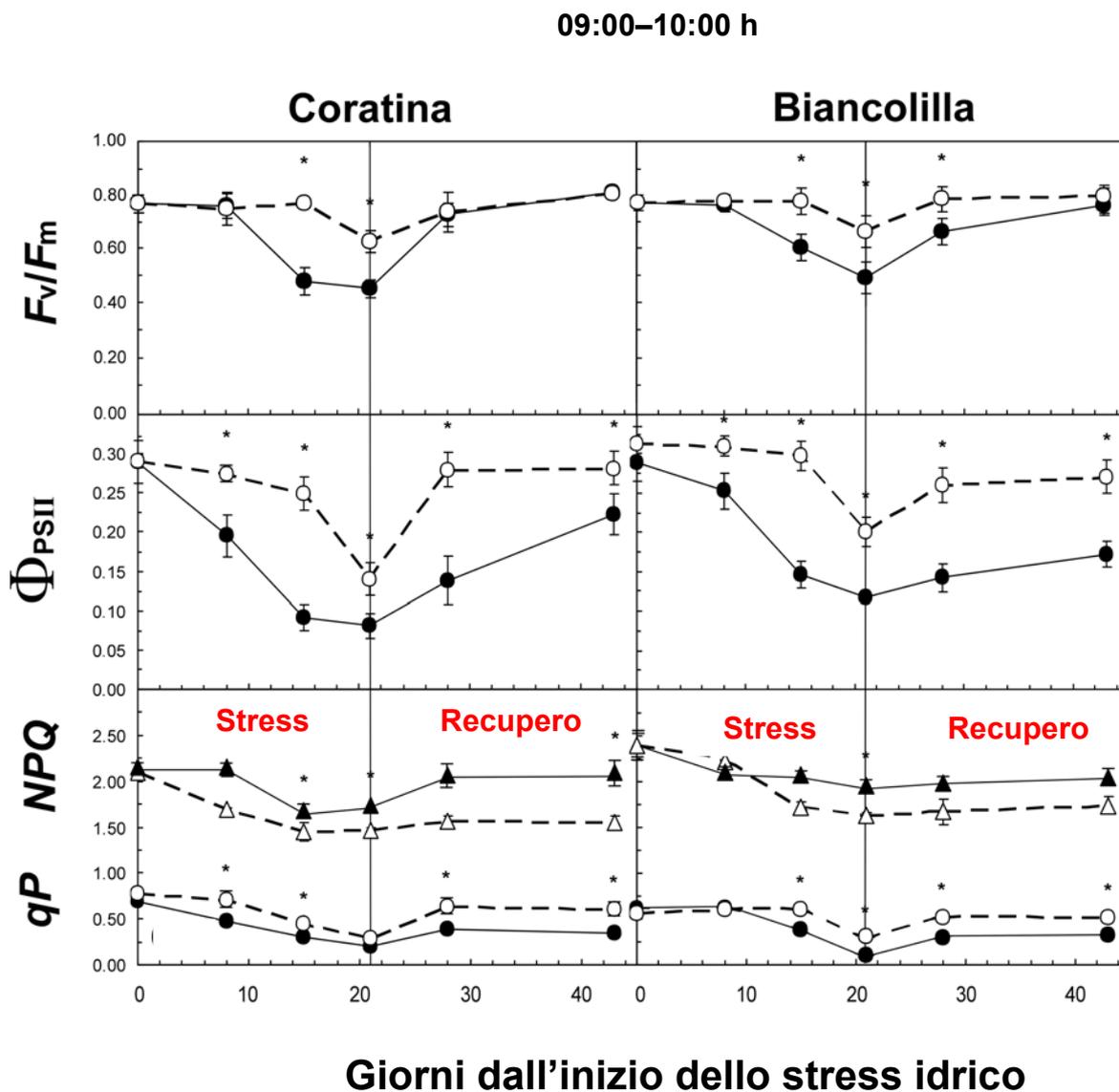


Figura 3.5 – Efficienza quantica massima (F_v/F_m), efficienza quantica (Φ_{PSII}) ed estinzione fotochimica (qP) e non-fotochimica (NPQ) misurata alle 09:00–10:00 h in piante di olivo esposte (●) ed ombreggiate (○) appartenenti alla cultivar Coratina e Biancolilla durante tutto il periodo sperimentale. Ogni punto rappresenta la media di tre misurazioni (\pm SE) da tre piante con potenziale idrico simile. I valori con in alto l'asterisco sono significativamente differenti ($P \leq 0.05$, in base al test t di Student).

13:00–14:00 h

CORATINA

BIANCOLILLA

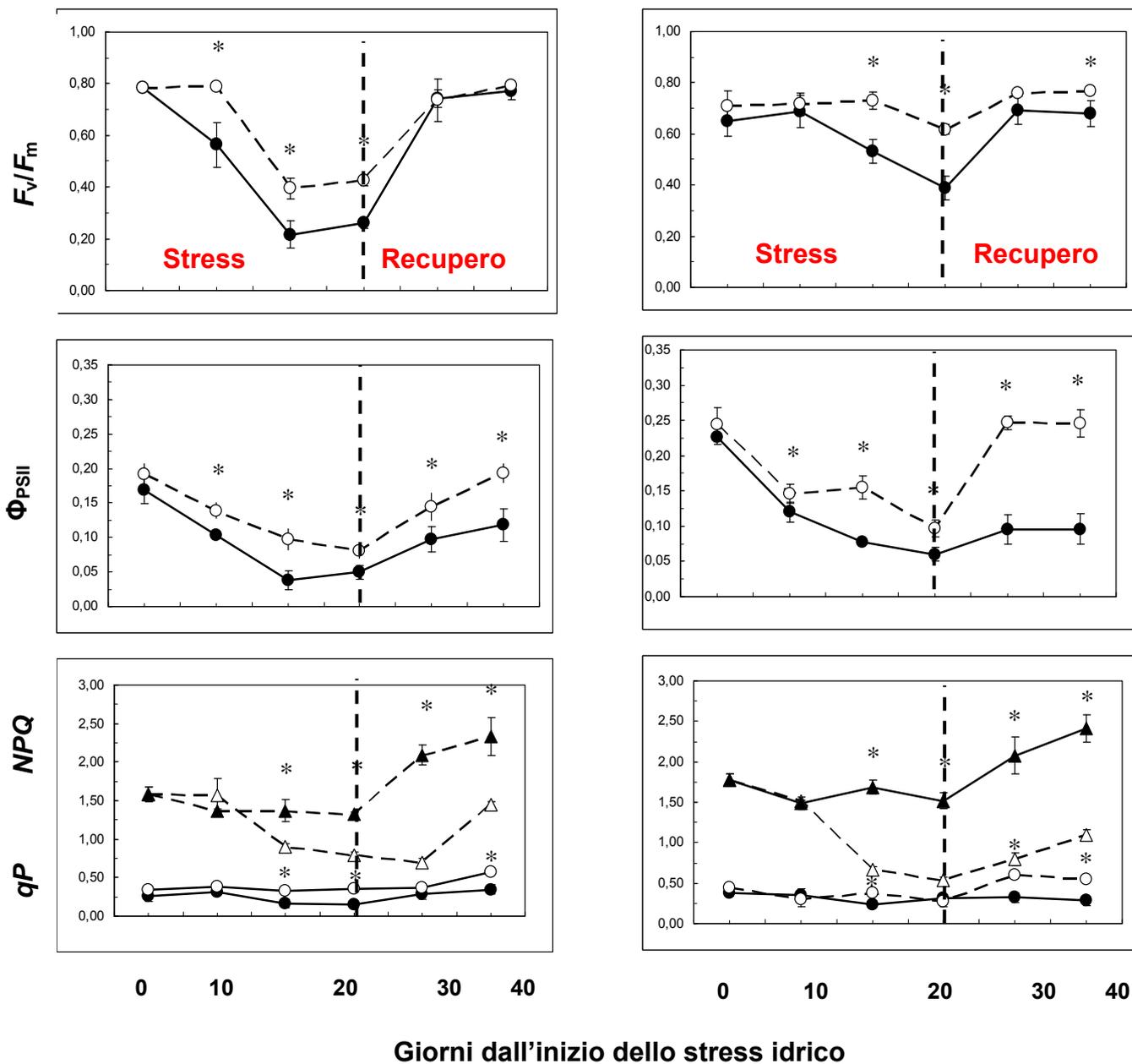


Figura 3.6 – Efficienza quantica massima (F_v/F_m), efficienza quantica (Φ_{PSII}) ed estinzione fotochimica (qP) e non-fotochimica (NPQ) misurata alle 13:00–14:00 h (*a destra*) in piante di olivo esposte (●) ed ombreggiate (○) appartenenti alla cultivar Coratina e Biancolilla durante tutto il periodo sperimentale. Ogni punto rappresenta la media di tre misurazioni (\pm SE) da tre piante con potenziale idrico simile. I valori con in alto l'asterisco sono significativamente differenti ($P \leq 0.05$, in base al test t di Student).

CORATINA

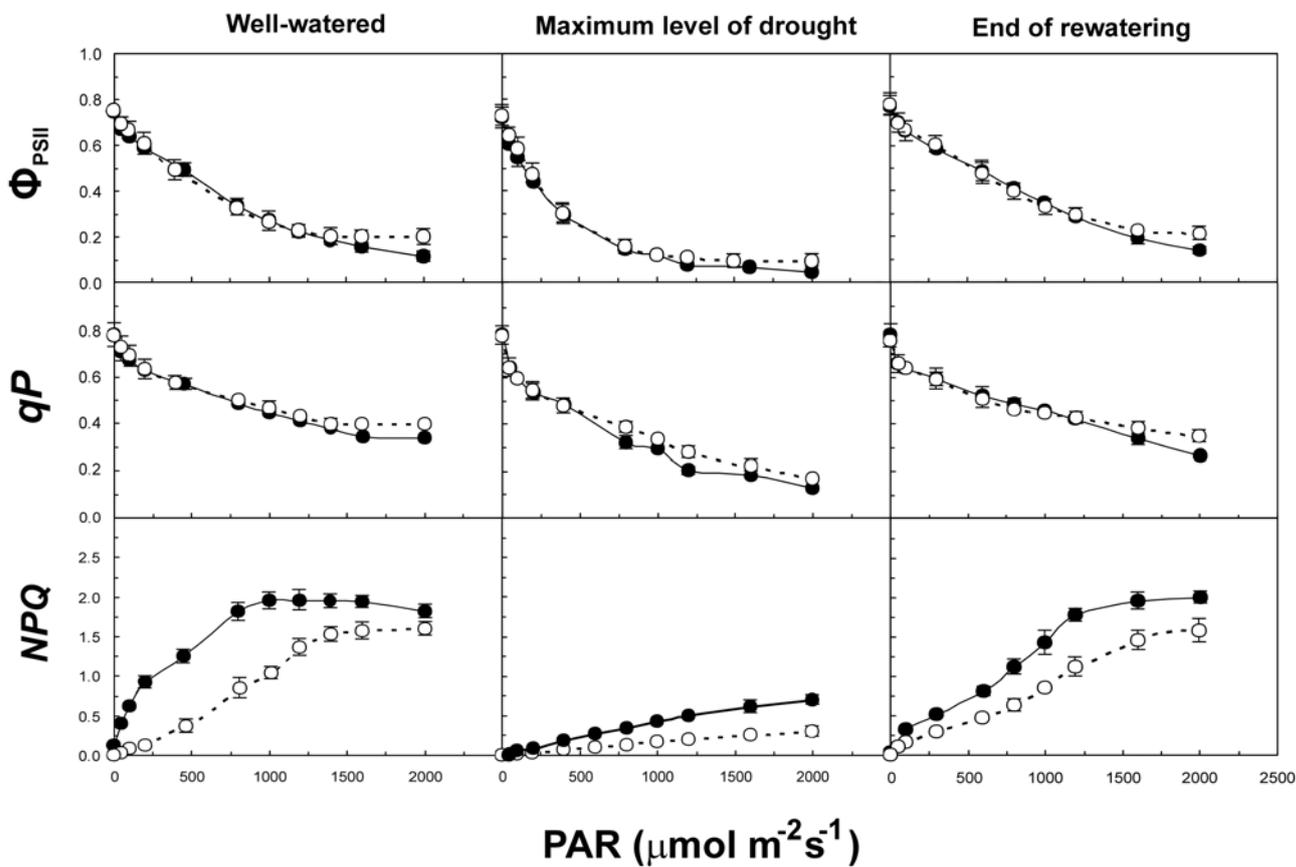


Figura 3.7 – Curve di risposta alla luce di efficienza quantica (Φ_{PSII}), estinzione fotochimica (qP) ed estinzione non-fotochimica (NPQ) in piante di olivo della cultivar Coratina esposte (\bullet) ed ombreggiate (\circ) in condizioni idriche ottimali, al massimo livello di stress idrico e alla fine del periodo di recupero idrico. Ogni punto rappresenta la media di tre misurazioni (\pm SE) da tre piante con potenziale idrico simile.

BIANCOLILLA

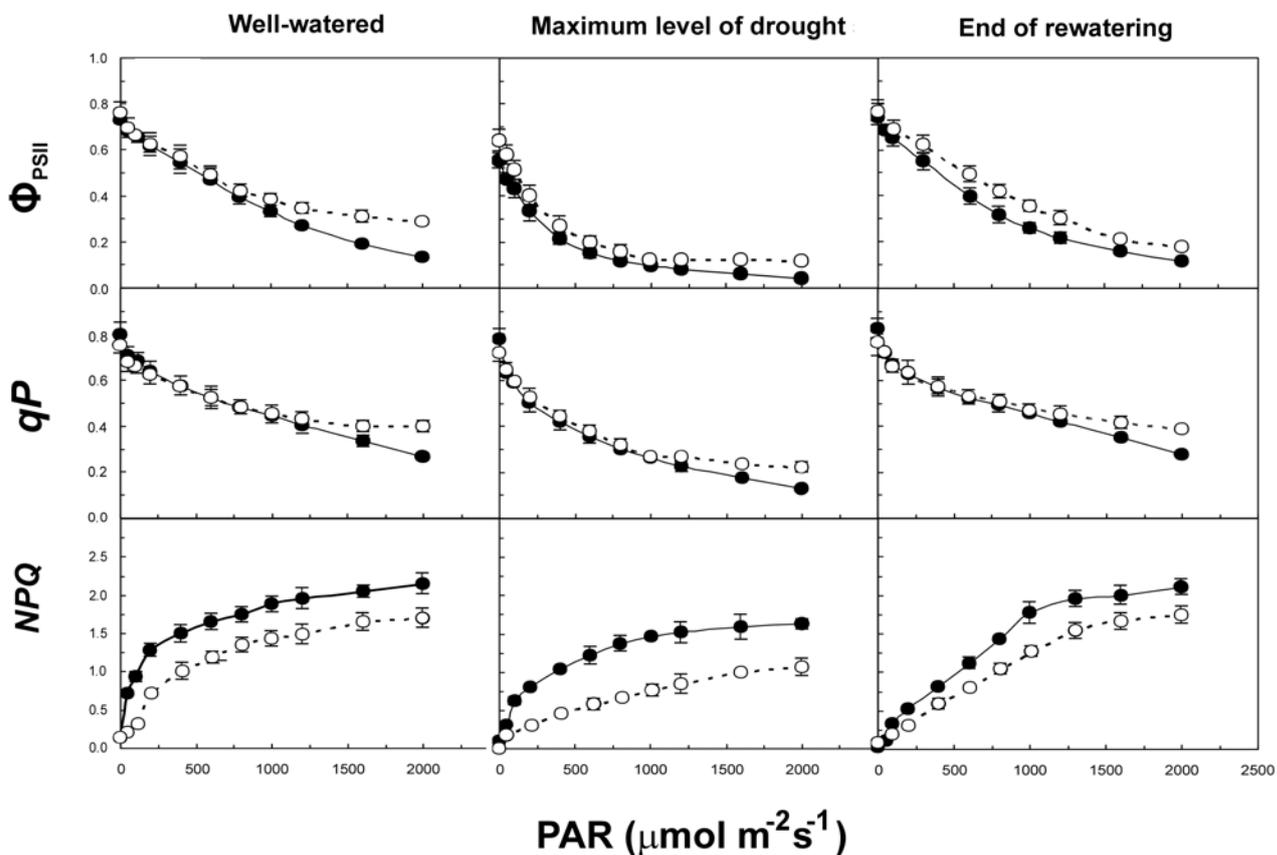


Figura 3.8 – Curve di risposta alla luce di efficienza quantica (Φ_{PSII}), estinzione fotochimica (qP) ed estinzione non-fotochimica (NPQ) in piante di olivo della cultivar Biancolilla esposte (●) ed ombreggiate (○) in condizioni idriche ottimali, al massimo livello di stress idrico e alla fine del periodo di recupero idrico. Ogni punto rappresenta la media di tre misurazioni (\pm SE) da tre piante con potenziale idrico simile.

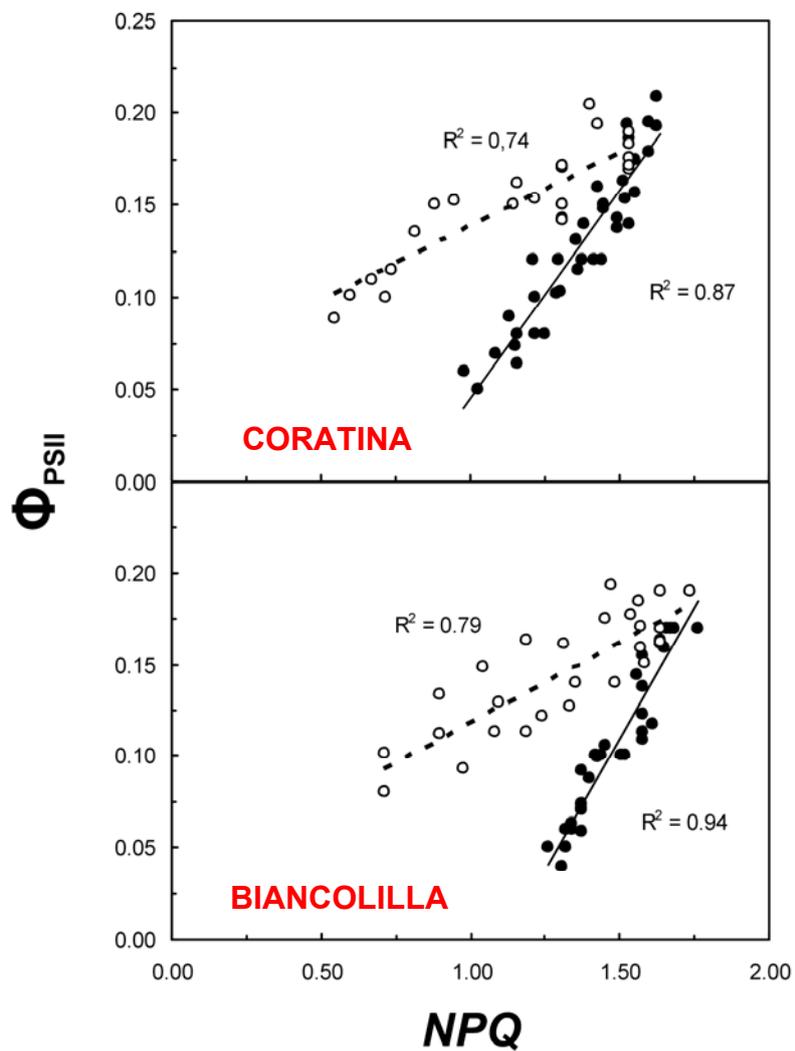


Figura 3.9 – Correlazione tra efficienza quantica del PSII (Φ_{PSII}) ed estinzione non-fotochimica (NPQ) misurati in piante esposte (linea continua) ed ombreggiate (linea tratteggiata) appartenenti alla cultivar Coratina e Biancolilla durante il periodo di stress idrico. I valori rappresentano singole misurazioni.

Tabella 3.1 – Tasso di respirazione al buio (R_d), punto di compensazione della luce (I_c) ed efficienza quantica (α_c) in piante di olivo esposte ed ombreggiate appartenenti alla cultivar Coratina e Biancolilla. Le misurazioni sono state effettuate durante tutto il periodo sperimentale ed ogni valore rappresenta la media di tre misurazioni (\pm SE) da tre piante con potenziale idrico simile. I valori seguiti da lettere differenti (maiuscole per tra le colonne e minuscole tra le righe) sono significativamente differenti ($P \leq 0.05$, in base al test t di Student).

	Giorni dall'inizio dello stress idrico				Giorni dall'inizio del ripristino idrico		
	0	8	15	21	7	22	
R_d ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Coratina esposte	-2.62 ± 0.12 Ab	-3.78 ± 0.33 Bb	-4.22 ± 0.51 Bd	-3.97 ± 0.09 Bd	-2.53 ± 0.31 Ab	-2.53 ± 0.20 Ab
	Coratina ombreg.	-2.45 ± 0.10 Ab	-3.56 ± 0.10 Bb	-3.81 ± 0.93 Bc	-3.50 ± 0.05 Bc	-2.41 ± 0.34 Ab	-2.71 ± 0.24 Ab
	Biancolilla esposte	-1.97 ± 0.23 Aa	-2.27 ± 0.19 Aa	-2.62 ± 0.09 Bb	-3.01 ± 0.22 Bb	-2.68 ± 0.39 Bb	-2.16 ± 0.19 Ab
	Biancolilla ombreg.	-2.05 ± 0.11 Aa	-2.16 ± 0.07 Aa	-2.35 ± 0.10 Aa	-2.77 ± 0.17 Ba	-2.89 ± 0.34 Ba	-2.45 ± 0.06 Ba
I_c ($\mu\text{mol PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Coratina esposte	14.06 ± 2.73 Ba	38.58 ± 6.22 Aa	39.78 ± 7.98 Aa	48.40 ± 5.09 Ab	16.58 ± 3.13 Bb	12.91 ± 1.66 Bb
	Coratina ombreg.	13.66 ± 2.80 Ca	21.02 ± 5.09 Bb	24.79 ± 5.78 Ba	42.42 ± 4.40 Aa	13.71 ± 2.15 Cb	10.08 ± 1.82 Cc
	Biancolilla esposte	13.81 ± 1.81 Da	26.65 ± 4.00 Bb	33.71 ± 2.58 Ba	48.06 ± 5.24 Aa	19.45 ± 2.25 Ca	18.24 ± 1.02 Ca
	Biancolilla ombreg.	13.60 ± 2.55 Da	23.02 ± 3.94 Bc	25.87 ± 4.12 Ab	28.58 ± 3.76 Ab	19.07 ± 1.07 Ca	17.03 ± 0.82 Cb
α_c ($\mu\text{mol } \mu\text{mol}^{-1}$)	Coratina esposte	0.06 ± 0.01 Aa	0.03 ± 0.00 Bb	0.01 ± 0.00 Cb	0.02 ± 0.00 Cb	0.05 ± 0.01 Aa	0.06 ± 0.02 Aa
	Coratina ombreg.	0.05 ± 0.01 Aa	0.05 ± 0.01 Ab	0.03 ± 0.00 Ba	0.03 ± 0.00 Ba	0.06 ± 0.00 Aa	0.05 ± 0.01 Aa
	Biancolilla esposte	0.06 ± 0.01 Aa	0.03 ± 0.00 Bb	0.01 ± 0.00 Cb	0.01 ± 0.00 Cb	0.03 ± 0.00 Bb	0.04 ± 0.00 Bb
	Biancolilla ombreg.	0.07 ± 0.01 Aa	0.05 ± 0.01 Ba	0.03 ± 0.00 Ca	0.03 ± 0.00 Ca	0.05 ± 0.01 Ba	0.06 ± 0.00 Aa

Tabella 3.2 – Estinzione non-fotochimica a decadimento rapido (NPQ_R) e a decadimento lento (NPQ_S) in piante di olivo esposte ed ombreggiate appartenenti alla cultivar Coratina e Biancolilla. Le misurazioni sono state effettuate in piante di controllo, al massimo livello di stress (-6.5 MPa) e alla fine del periodo di recupero idrico ed ogni valore rappresenta la media di tre misurazioni (\pm SE) da tre piante con potenziale idrico simile. I valori seguiti da lettere differenti (maiuscole per tra le colonne e minuscole tra le righe) sono significativamente differenti ($P \leq 0.05$, in base al test t di Student).

		Piante ben irrigate		Massimo livello di stress		Fine del recupero idrico	
		NPQ_R	NPQ_S	NPQ_R	NPQ_S	NPQ_R	NPQ_S
Coratina	Esposte	2.36 ± 0.28 Ba	0.42 ± 0.02 Ba	2.91 ± 0.12 Aa	0.58 ± 0.08 Aa	2.45 ± 0.41 Ba	0.46 ± 0.08 Ba
	Ombreg.	2.29 ± 0.19 Aa	0.24 ± 0.04 Bb	2.28 ± 0.18 Ac	0.49 ± 0.02 Ab	2.13 ± 0.12 Ab	0.22 ± 0.03 Bb
Biancolilla	Esposte	1.66 ± 0.10 Cb	0.32 ± 0.06 Cb	2.68 ± 0.18 Ab	0.64 ± 0.06 Aa	1.90 ± 0.20 Bb	0.50 ± 0.04 Ba
	Ombreg.	1.56 ± 0.12 Bb	0.12 ± 0.03 Bc	1.90 ± 0.11 Ad	0.33 ± 0.04 Ac	1.67 ± 0.11 Bc	0.28 ± 0.03 Ab

4. DISCUSSIONE

4.1 Stato idrico, scambi gassosi ed indici di fluorescenza

Dall'analisi dei risultati ottenuti (Figure 3.6 e 3.7) si evince che sia lo stress idrico che l'effetto sinergico di stress idrico e luminoso hanno influenzato l'efficienza del PSII, causando una diminuzione dei valori di resa quantica del PSII (Φ_{PSII} e F_v/F_m). È importante ricordare che questi due parametri sono influenzati non solo dai fattori ambientali a cui sono sottoposte le piante ma anche da fattori fisiologici della pianta quali l'età della foglia e lo stato di salute della pianta. Questi fattori di variabilità sono stati eliminati scegliendo per le misurazioni foglie della stessa età di piante allo stesso livello di stress idrico e sottoposte alle stesse condizioni di luce (*light history*).

Nel nostro esperimento, i valori di Φ_{PSII} , F_v/F_m e qP sono stati più alti in condizioni di ombreggiamento perché gran parte della luce assorbita è stata utilizzata nelle reazioni fotochimiche (Figure 3.5 e 3.6), mentre sono stati più bassi nelle piante esposte, in cui la maggior parte dell'energia assorbita è stata dissipata mediante processi non-fotochimici (*NPQ*). Lo stesso andamento si è verificato per i valori di A (Figure 3.3 e 3.4). Nel complesso, si può dire che le foglie delle piante ombreggiate sono state più efficienti nell'utilizzo della luce incidente per tutte e due le cultivar durante tutta la durata dell'esperimento (Figure 3.5 e 3.6). Questo comportamento è spiegabile perché, a basse intensità luminose, c'è una minore energia luminosa in eccesso, che permette alla maggior parte delle piante di essere più efficienti nell'assorbimento della luce (Demmig-Adams e Adams III, 1992; Ruban e Horton, 1995).

I risultati ottenuti provano che le piante di olivo di entrambe le cultivar sono state influenzate dal livello di luce sperimentato. La luce sembra influire profondamente sui processi fisiologici e biochimici di questa specie, come già osservato da Sofo *et al.* (2004) nella regolazione di alcuni enzimi antiossidanti. I dati ottenuti indicano che la maggiore intensità

luminosa causa una maggiore saturazione delle reazioni fotochimiche e questo si riflette nei valori più bassi di F_v/F_m , Φ_{PSII} e qP nelle piante esposte. Contemporaneamente allo stress radiativo, le piante di olivo sono state sottoposte a deficit idrico crescente, che ha causato una riduzione dell'efficienza fotochimica e quindi un grado di saturazione ancora maggiore. I risultati dimostrano quindi che l'intensità luminosa ha una grande influenza sulla capacità fotosintetica delle piante, come dimostrato recentemente in una ricerca condotta da Schlüter *et al.* (2003) con mutanti di *Arabidopsis* adattati a basse ($200\text{--}250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e alte intensità luminose ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Le misurazioni di fluorescenza possono fornire prove evidenti sulla capacità di una pianta di tollerare gli stress ambientali e sul grado di danneggiamento dell'apparato fotosintetico ad opera di questi stress. In generale, diminuzioni dei valori di F_v/F_m indicano la comparsa di un danno fotoinibitorio in risposta a stress abiotici quali, temperature alte (Gamon e Pearcy, 1989), eccesso di luce (Ögren e Sjöström, 1990) e deficit idrico (Epron *et al.*, 1992). In olivo, Angelopoulos *et al.* (1996) hanno provato lo stress idrico causa riduzioni nei valori di efficienza quantica ma gli autori hanno esaminato solo andamenti giornalieri di fluorescenza in piante con un LWP medio di -5.7 MPa, senza misurare il tasso di fotoinibizione ma solo stimandolo in base ai dati di fluorescenza. Sempre in olivo, lo stesso andamento decrescente di F_v/F_m e Φ_{PSII} a livelli crescenti di stress è stato notato in foglie sottoposte a stress da basse (*chilling stress*) e alte temperature (Bongi e Long, 1987).

Il parametro qP include sia la fotosintesi che la respirazione ed è stato maggiore nelle piante ombreggiate, poiché in queste la luce è utilizzata con maggiore efficienza (Figure 3.5 e 3.6). Le stesse differenze di qP tra EP e OP sono state riscontrate nelle curve di risposta alla luce (Figure 3.7 e 3.8). Al contrario, il parametro NPQ comprende meccanismi quali la dissipazione del calore ed è stato più alto in piante esposte, indicando probabilmente un meccanismo di protezione messo in atto dalle piante per evitare la sovra-eccitazione delle membrane tilacoidali (Figure da 3.6 a 3.8). Inoltre, confrontando i dati di qP e di NPQ nelle due tesi, non si può fare a meno di notare che i primi non hanno subito oscillazioni

significative durante il periodo di stress, mentre i secondi hanno presentato fluttuazioni più ampie (Figure 3.6 e 3.7). Ciò suggerisce che la regolazione del tasso di *NPQ* in condizioni di elevati livelli di irraggiamento e stress idrico è un processo fisiologico essenziale per la sopravvivenza delle piante ed è dimostrato dalla buona correlazione tra efficienza fotosintetica (Φ_{PSII}) e *NPQ* che si osserva soprattutto nelle EP (Figura 3.9).

L'efficienza di assorbimento della luce da parte delle piante è infatti soggetta a regolazione (Demmig–Adams e Adams III, 1992; Ruban e Horton, 1995). La funzione di questa regolazione è di aggiustare il tasso di dissipazione della radiazioni assorbita in modo tale che la densità dell'energia di eccitazione nell'antenna del PSII sia solo quella richiesta per guidare il trasporto fotosintetico di elettroni al tasso consentito dalle reazioni di assimilazione nella cellula vegetale. Nelle piante di olivo oggetto della ricerca, soprattutto nelle ore più calde, *qP* si è mantenuto abbastanza costante anche in presenza di bassi valori di Φ_{PSII} (Figure 3.6 e 3.7), come è stato osservato anche da altri autori (Ruban e Horton, 1995). I valori di *NPQ*, invece, hanno subito variazioni più marcate quando i valori di Φ_{PSII} hanno cominciato a decrescere (Figure 3.6 e 3.7). La comprensione dei fattori che regolano *NPQ* e delle sue cinetiche di formazione e rilassamento è quindi fondamentale perché negli ambienti naturali, l'intensità luminosa può aumentare e diminuire rapidamente. Infatti, se l'inizio di *NPQ* è in ritardo rispetto ad un aumento di intensità radiativa, si possono verificare fenomeni di fotoinibizione; allo stesso modo, se il rilassamento di *NPQ* è in ritardo rispetto ad una diminuzione di intensità luminosa, il mantenimento di livelli eccessivi di dissipazione di energia provocheranno una perdita in fotosintesi (Ruban e Horton, 1995).

Rispetto alle piante esposte, le piante adattate all'ombra hanno mostrato una bassa capacità di dissipazione termica (*NPQ*) (Figure da 3.5 a 3.8). Al contrario, le piante adattate alla luce piena sono state in grado di dissipare la maggior parte dell'energia fotonica in eccesso attraverso la combinazione di alti tassi di dissipazione termica, che rientra nelle risposte fotoprotettive di energia associate al ciclo dei carotenoidi (Figure da 3.5 a 3.8). L'estinzione non–fotochimica di energia radiante sembra essere quindi il parametro discriminante tra EP e OP di entrambe le cultivar (Figura 3.9).

In condizioni di laboratorio, Φ_{PSII} e fotosintesi solitamente sono correlate (Genty *et al.*, 1989, Edwards and Baker, 1993; Maxwell e Johnson, 2000), ma in campo il livello di questa correlazione, pur essendo sempre presente, diminuisce a causa di processi competitivi quali fotorespirazione, metabolismo dell'azoto e donazione di elettroni all'ossigeno (reazione di Mehler). Per questo motivo, insieme alla misurazione degli indici di fluorescenza, sono stati misurati anche gli scambi gassosi delle piante di olivo (Figure 3.3 e 3.4). Se si confronta la tesi ombreggiata con quella esposta, i più alti valori di CO_2 substomatica (C_i) nelle piante ombreggiate (Figure 3.3 e 3.4) accompagnati dai più bassi valori di g_s e dai maggiori valori di F_v/F_m (Figura 3.5) indicano che la ridotta attività del PSII non è la sola causa primaria della diminuzione di assimilazione di carbonio durante lo stress idrico ma sono coinvolti anche meccanismi di tipo stomatico.

Tassi di conduttanza stomatica più bassi nelle piante ombreggiate di olivo sono stati osservati anche da Sofo *et al.* (2004a). In condizioni in cui la capacità fotosintetica non è ancora limitante e l'esposizione alla luce è saturante, la scarsa conduttanza alla CO_2 può essere la causa principale della limitazione della fotosintesi. Nelle tesi esposte, al contrario, i valori più bassi di C_i sono spiegabili dal fatto che nelle due cultivar la g_s è maggiore nelle piante esposte (Figure 3.3 e 3.4). I dati sembrano quindi confermare che, in presenza di stress idrico severo, le due cultivar di olivo esaminate possiedono una buona capacità di adattamento fisiologico per evitare la limitazione non stomatica della fotosintesi (Figura 3.3) e che le piante ombreggiate hanno una maggiore efficienza quantica rispetto a quelle esposte (Figure 3.5 e 3.6).

Anche se in accordo con molti altri autori, non mancano casi discordanti a questo comportamento. Ad esempio, Valladares e Pearcy (2002) hanno dimostrato che, in una popolazione di *Heteromeles arbutifolia*, una pianta sclerofilla sempreverde con habitus cespuglioso seguita per un'intera stagione, la capacità di fronteggiare un periodo di stress severo non solo non è maggiore all'ombra ($700\text{--}1100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) rispetto che alla luce piena ($1200\text{--}2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) [quindi simili a quelli di questo esperimento, n.d.r.] ma anzi diminuisce in condizioni di ombreggiamento.

Le piante ombreggiate hanno infatti mostrato una minore efficienza fotosintetica, mentre le piante più esposte alla luce hanno presentato un efficiente grado fisiologico di fotoprotezione nei confronti di alti livelli di irraggiamento.

Dal confronto tra i dati delle tesi ombreggiate e quelle esposte, si può affermare che le OP hanno mostrato efficienze quantiche maggiori, tassi traspirativi più bassi ed un grado di estinzione fotochimica maggiore rispetto ai corrispettivi valori riscontrati nelle EP (Figure da 3.3 a 3.6). Per quanto riguarda il recupero idrico, le OP hanno recuperato gli indici di fluorescenza e gli scambi gassosi più rapidamente e ed in maggior misura rispetto alle EP (Figure da 3.3 a 3.6). Nelle EP risulta invece maggiore la capacità di estinzione non-fotochimica, che persiste ben oltre lo stress, durante tutto il periodo di ripristino idrico (Figure da 3.3 a 3.6), dimostrando che nelle piante contemporaneamente esposte a luce intensa e a sottoposte a stress idrico sono indotti meccanismi di dissipazione energetica mediante il ciclo delle xantofille che rimangono attivi anche nelle fasi successive ai periodi di stress intenso. Per quanto riguarda invece il confronto tra le due cultivar, i risultati di efficienza quantica (Figure 3.5 e 3.6) dimostrano che la cultivar Coratina sembra soffrire maggiormente dell'azione sinergica dei due tipi di stress ma ha una capacità di recupero maggiore rispetto alla cultivar Biancolilla. A sostegno di ciò, la cultivar Biancolilla ha mostrato più alti valori di correlazione tra Φ_{PSII} e NPQ durante il periodo lo stress idrico rispetto, sia nelle piante esposte che in quelle ombreggiate. Questo indica che la Biancolilla è capace di regolare meglio la dissipazione non fotochimica di energia durante il periodo di stress idrico. La regolazione dipendente dalla luce di NPQ qui osservata per l'olivo (Figura 3.9) è stata trovata anche in alcune piante erbacee (Johnson *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1996) ma finora mai nelle specie arboree.

Infine, i dati ottenuti dalle misure puntuali di scambi gassosi finora discussi sono stati confermati pienamente dai grafici ottenuti mediante le curve di risposta alla luce (Figure 3.7 e 3.8), in cui si evidenziano, in particolare in corrispondenza dei livelli di luce più elevati (1600–2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), le differenze delle risposte vegetative tra piante esposte ed ombreggiate e tra le due cultivar studiate. La risposta alla luce della cultivar

Biancolilla sembra essere più efficiente di quella della Coratina (Figure 3.7 e 3.8), a conferma dei dati commentati precedentemente. Inoltre, in condizioni di stress idrico severo, la capacità di estinzione non-fotochimica (*NPQ*) della cultivar Biancolilla è superiore a quella della Coratina sia in condizioni di luce piena che di ombreggiamento (Figure 3.7 e 3.8) e ciò indica una sovra-regolazione del ciclo della xantofille. La diminuzione di efficienza fotosintetica in seguito a stress abiotici è stata messa in evidenza anche da Bongi e Long (1987) in foglie di olivo, in cui i valori di Φ_{PSII} sono diminuiti, in seguito a stress da basse temperature (*chilling*), del 10% in condizioni di luce debole ($PAR = 95 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e del 75% in condizioni di luce intensa ($PAR = 650\text{--}1850 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); la differenza tra questi valori è probabilmente attribuibile al diverso grado di fotoinibizione.

4.2 Risposta fotosintetica e grado di fotoinibizione

Gli effetti sinergici dei differenti tipi di stress abiotici, quali luce intensa, temperature estreme e scarsità di acqua sono difficili da studiare contemporaneamente, in quanto è necessario separare il contributo di ogni singolo stress abiotico dal grado di fotoinibizione totale. Gli studi di questo genere sulle piante legnose di interesse economico non sono infatti molti rispetto a quelli compiuti su altri tipi di piante. Gamon e Pearcy (1990) hanno riscontrato che nella vite californiana coltivata, lo stress idrico (fino ad un valore di pre-dawn LWP = -0.8 MPa raggiunto dopo 5 giorni di stress) accompagnato ad alti livelli di irraggiamento ($\text{max PAR} = 2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) provoca una diminuzione del tasso fotosintetico netto maggiore se comparato a piante esposte a livelli di irraggiamento minori ($\text{max PAR} = 1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Inoltre solo pochi studi hanno misurato il grado di fotoinibizione mediante specifiche curve di rilassamento fluorescenza (Walters e Horton, 1991; Johnson *et al.*, 1993), deducendo invece questo valore dalla semplice diminuzione di Φ_{PSII} e F_v/F_m , validi indicatori della minore efficienza fotosintetica ma non della fotoinibizione vera e propria.

I valori di I_c durante il periodo sperimentale sono stati più alti nelle tesi esposte rispetto a quelle ombreggiate (Tabella 3.2); ciò suggerisce che le

piante ombreggiate subiscono una minore inattivazione dei processi fotosintetici rispetto alle piante adattate alla luce piena. A livelli di luce alti ($2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), nelle foglie adattate all'ombra si verifica l'inattivazione dei centri di reazione del PSII e il recupero da questa inattivazione può dipendere dalla sintesi di componenti di questi centri. La cultivar Biancolilla, al contrario della Coratina, non ha recuperato pienamente i valori di I_c delle piante di controllo (Tabella 3.2), confermando che la cultivar Coratina ha maggiori capacità di recupero in seguito a stress idrico rispetto alla Biancolilla. Mentre l'assorbimento della luce da parte dei pigmenti fotosintetici è proporzionale all'intensità della luce incidente, la fotosintesi non lo è (Heber *et al.*, 2006). Infatti, tutta la luce assorbita è usata per le reazioni fotosintetiche dalle foglie non stressate solo quando il flusso fotonico è molto basso, cioè quando quasi tutti i fotoni assorbiti sono utilizzati nelle reazioni fotosintetiche. Questo è dimostrato dal fatto che la pendenza iniziale delle curve di risposta alla luce della fotosintesi è praticamente identica in molte specie differenti in condizioni ambientali simili (Heber *et al.*, 2006). Nel nostro esperimento, i valori di α_c delle OP sono stati nel complesso più alti di quelli delle EP, riflettendo i dati di efficienza quantica ottenuti dalle misure di fluorescenza e confermando così che l'efficienza fotosintetica di piante di olivo adattate a livelli di luce minori di quelli ambientali è maggiore. Infine, i valori di R_d sono stati in linea di massima inferiori nelle piante esposte di entrambe le cultivar (Tabella 3.2). Molto verosimilmente, i bassi valori di I_c nelle OP sono dovuti al fatto che R_d sono stati più alti e quindi è necessario un ridotto tasso fotosintetico per portare annullare lo scambio netto di CO_2 . Bassi valori di R_d , insieme ad alti valori di α_c , permettono alle OP di adattarsi ad ambienti meno luminosi, di usare una maggiore proporzione di energia luminosa per la fotosintesi e di evitare la fotoinibizione.

La maggior parte degli studi sull'influenza della luce sulla fotoinibizione sottolineano che maggiori livelli di luce provocano un grado di fotoinibizione maggiore. A titolo di esempio, Einhorn *et al.* (2004) hanno osservato il grado di fotoinibizione in piante di *Fraxinus* e *Fagus* in tre diversi livelli di luce naturale (max PAR del livello di luce maggiore = $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) dimostrando la regolazione della dissipazione termica dell'energia

(*NPQ*) è bassa in entrambe le specie e che l'acclimatazione delle due specie ai diversi livelli di luce avviene principalmente attraverso la regolazione del tasso di quenching fotochimico (*qP*). Krause *et al.* (2001) hanno osservato che le piante pioniere di foreste tropicali subiscono un minore grado di fotoinibizione (stimata come diminuzione di F_v/F_m) rispetto a quelle degli stadi più avanzati della successione quando sono esposte a luce diretta. Un altro studio di Kitao *et al.* (2000) ha dimostrato che tre specie di una foresta di latifoglie presentano differenze nel grado di fotoinibizione in base ai diversi livelli di irraggiamento a cui sono state sottoposte precedentemente. Kamaluddin e Grace (1992) hanno esaminato la capacità di acclimatazione alla luce di piante di *Bischofia javanica*, una specie arborea tropicale: le piante, allevate in condizioni di forte ombreggiamento ($PAR = 40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e poi trasferite a livelli di luce più alti ($PAR = 1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), hanno mostrato fotoinibizione immediatamente dopo il trasferimento alla luce intensa e questa è durata per parecchi giorni, prima dell'adattamento della fotosintesi ai nuovi livelli di luce.

La maggiore capacità di recupero da parte della Coratina è ulteriormente confermato dal fatto che i valori di NPQ_R e NPQ_S aumentano in seguito a deficit idrico per poi recuperare completamente alla fine del periodo di ripristino, mentre ciò non avviene per la cultivar Biancolilla (Tabella 3.1). Le piante esposte hanno inoltre un grado di fotoinibizione più alto, dal momento che i valori di NPQ_S nelle piante esposte sono più alti dei corrispettivi nelle ombreggiate (Tabella 3.1). Sebbene le foglie di olivo siano quindi apparentemente meno suscettibili al danno foto-ossidativo rispetto ad altre specie, i risultati mostrano che la fotoinibizione durante lo stress luminoso ed idrico è potenzialmente un fattore principale che influenza la produttività fotosintetica di questa specie.

5. CONCLUSIONI

In conclusione, possiamo affermare che le misurazioni di fotosintesi mediante l'analisi simultanea di scambi gassosi e di fluorescenza hanno fornito chiare indicazioni sullo stato fisiologico delle piante di olivo e potrebbero quindi essere utilizzate anche in campo applicativo. Lo studio della fluorescenza della clorofilla ha fornito nuovi indizi per la comprensione e l'interpretazione dei processi fotosintetici e è uno strumento veloce e non invasivo. E' bene ricordare però che gli indici di fluorescenza consentono lo studio di grande numero di campioni in relativamente poco tempo ma nello stesso tempo è richiesto un grande impegno nella predisposizione delle prove, nello studio teorico e nell'interpretazione e analisi dei risultati.

Nei climi mediterranei è molto frequente la combinazione di condizioni ambientali avverse. Questo studio ha mostrato che è possibile individuare il contributo di ciascun fattore di stress al grado di fotoinibizione totale in olivo. Questa specie arborea ha certamente un alto grado di tolleranza nei confronti dello stress idrico ma, in questo esperimento, è stato dimostrato che le piante di olivo sono fortemente influenzate dai livelli di luce a cui sono sottoposte e sono vulnerabili alla fotoinibizione dovuta alla combinazione di deficit idrico ed eccesso di luce. Queste informazioni potrebbero essere importanti per comprendere meglio i meccanismi mediante i quali le piante di olivo minimizzano gli effetti della fotoinibizione e potrebbero essere utili per la selezione di cultivar di olivo più tolleranti alla siccità e quindi per il risparmio delle risorse idriche in aree semi-aride.

6. BIBLIOGRAFIA

- Adams III WW, Demmig-Adams B, Logan BA, Barker DH, Osmond CB (1999) Rapid changes in xanthophyll cycle-dependent energy dissipation and photosystem II efficiency in two vines, *Stephania japonica* and *Smilax australis*, growing in the understorey of an open *Eucalyptus* forest. *Plant Cell Environ* 22: 125–136
- Anderson JM, Park Y, Chow WS (1998) Unifying model for the photoinactivation of Photosystem II *in vivo* under steady-state photosynthesis. *Photosynth Res* 56: 1–13
- Angelopoulos K, Dichio B, Xiloyannis C (1996) Inhibition of photosynthesis in olive trees (*Olea europaea* L.) during water stress and rewatering. *J Exp Bot* 47 (301): 1093–1100
- Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601–639
- Bilger W, Björkman O (1990) Role of xanthophyll cycle and energy dissipation in differently oriented faces of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in *Hedera canariensis*. *Photosynth Res* 25: 173–185
- Bongi G, Long OP (1987) Light-dependent damage to photosynthesis in olive leaves during chilling and high temperature stress. *Plant Cell Environ* 10: 241–249
- Bowler C, Van Montagu M, Inzé D (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 83–116
- Bray EA (1993) Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol* 103: 1035–1040
- Busk PK, Pagès M (1998) Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol Biol* 37: 425–435
- Connor DJ, Fereres E (2005) The physiology of adaptation and yield expression in olive. *Hortic Rev* 31, 155–229.
- Demmig-Adams B (1990) Carotenoids and photoprotection in plants. A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim Biophys Acta* 1020: 1–24
- Demmig-Adams B, Adams III WW (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 599–626
- Demmig-Adams B, Adams III WW, Logan BA, Verhoeven AS (1995) Xanthophyll-cycle-dependent energy dissipation and flexible photosystem II efficiency in plants acclimated to light stress. *Aust J Plant Physiol* 22: 249–260
- Dichio B, Romano M, Nuzzo V, Xiloyannis C (2002) Soil water availability and relationship between canopy and roots in young olive trees (cv Coratina). *Acta Hort* 586: 255–258
- Dichio B, Xiloyannis C, Sofo A, Montanaro G. (2006) Osmotic adjustment in leaves and roots of olive tree (*Olea europaea* L.) during drought stress and rewatering. *Tree Physiol* 26: 179–185
- Douce R, Neuburger M (1999) Biochemical dissection of photorespiration. *Curr Opin Plant Biol* 2: 214–222
- Drake BG, Read M (1981) Carbon dioxide assimilation, photosynthetic efficiency, and respiration of a Chesapeake Bay Salt Marsh. *J Ecol* 69: 405–422
- Einhorn KS, Rosenqvist E, Leverenz JW (2004) Photoinhibition in seedlings of *Fraxinus* and *Fagus* under natural light conditions: implications for forest regeneration? *Oecologia* 140: 241–251
- Epron D, Dreyer E, Bréda N (1992) Photosynthesis of oak trees (*Quercus petraea* (Matt) Liebl.) during drought stress under field conditions; diurnal course of net CO₂ assimilation and photochemical efficiency of photosystem II. *Plant Cell Environ* 15: 809–820.

- Erik T. Nilsen, David M. Orcutt 1996. *The Physiology of Plants Under Stress: Abiotic Factors*. (Wiley; ISBN: 0471031526)
- Fernández JE, Moreno F, Girón IF, Blázquez OM (1997) Stomatal control of water use in olive tree leaves. *Plant Soil* 190: 179–192
- Fernández, JE, Moreno F, Martín–Aranda J, Fereres E (1992) Olive–tree root dynamics under different soil water regimes. *Agricultura Mediterranea* 122: 225–235
- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiol Plant* 92: 696–717
- Gamon JA, Pearcy RW (1989) Leaf movement, stress avoidance and photosynthesis in *Vitis californica*. *Oecologia* 79: 475–481
- Gamon JA, Pearcy RW (1989) Photoinhibition in *Vitis californica*: interactive effects of sunlight, temperature and water status. *Plant Cell Environ* 13: 267–275.
- Genty B, Briantais J–M, Baker NR (1989) The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 990: 87–92
- Goudrian J, Van Laar HH (1994) *Modeling potential crop growth processes*. Dordrecht: Kluwer Academic: p. 238.
- Griffiths H, Maxwell K (1999) In memory of CS Pittendrigh: photoprotective strategies in epiphytic bromeliads in relation to exposure within the forest canopy. *Funct Ecol* 13: 15–23
- He J, Chee CW, Goh CJ (1996) 'Photoinhibition' of *Heliconia* under natural tropical conditions: the importance of leaf orientation for light interception and leaf temperature. *Plant Cell Environ* 19: 1238–1248
- Heber U, Lange OL, Shuvalov VA (2006) Conservation and dissipation of light energy as complementary processes: homoiohydric and poikilohydric autotrophs. *J Exp Bot* 57: 1211–1223
- Horton P, Ruban AV, Walters RG (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 655–684
- Ingram J, Bartels D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 377–403
- Johnson GN, Young AJ, Scholes JD, Horton P (1993) The dissipation of excess excitation energy in British plant species. *Plant Cell Environ* 16: 673–679
- Kamaluddin M, Grace J (1992) Photoinhibition and light acclimation in seedlings of *Bischofia javanica*, a tropical forest tree from Asia. *Ann Bot* 69: 47–52
- Kitao M, Lei TT, Koike T, Tobita H, Maruyama Y (2000) Susceptibility to photoinhibition of three deciduous broadleaf tree species with different successional traits raised under various light regimes. *Plant Cell Environ* 23: 81–89
- Krause GH, Koroleva OY, Dalling JW, Winter K (2001) Acclimation of tropical tree seedlings to excessive light in simulated tree–fall gaps. *Plant Cell Environ* 24: 1345–1352
- Leung J, Giraudat J (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Physiol Plant Mol Biol* 49: 199–222
- Lo Gullo AM, Salleo S (1988) Different strategies of drought resistance in three Mediterranean sclerophyllous trees growing in the same environmental conditions. *New Phytol* 108: 267–276
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659–668

- Melis A (1999) Photosystem–II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo*? Trends Plant Sci 4: 130–135
- Moreno F, Fernández JE, Clothier BE, Green SR (1996) Transpiration and root water uptake by olive trees. Plant Soil 184: 85–96
- Moriana A, Villalobos FJ, Fereres E (2002) Stomatal and photosynthetic responses of olive (*Olea europaea* L.) leaves to water deficits. Plant Cell Environ 25: 395–405
- Natali S, Bignami C, Fusari A (1991) Water consumption, photosynthesis, transpiration and leaf water potential in *Olea europea* L., cv “Frantoio”, at different levels of available water. Agricoltura Mediterranea 121: 205–212
- Ögren E, Sjöström M (1990) Estimation of the effect of photoinhibition on the carbon gain leaves of a willow canopy. Planta 181: 560–567
- Osmond B, Badger M, Maxwell K, Björkman O, Leegood R (1997) Too many photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation. Trends Plant Sci 2 (4): 119–121
- Øvreås L (2000) Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. Ecol Lett 3: 236–251
- Park YI, Chow WS, Anderson JM, Hurry VM (1996) Differential susceptibility of photosystem II to light stress in light–acclimated pea leaves depends on the capacity for photochemical and non–radiative dissipation of light. Plant Sci 115: 137–149.
- Quick WP, Horton P (1984) Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in barley protoplast. I. Factors affecting the observation of oscillations in the yield of chlorophyll fluorescence and the rate of oxygen evolution. P Roy Soc–Biol Sci 220: 361–370
- Roberts A, Borland AM, Maxwell K, Griffiths H (1998) Ecophysiology of the C₃–CAM intermediate *Clusia minor* L. In Trinidad: seasonal and short–term photosynthetic characteristics of sun and shade leaves. J Exp Bot 49: 1563–1573
- Ruban AV, Horton P (1995) Regulation of non–photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in plants. Aust J Plant Physiol 22: 221–230
- Schlüter U, Muschak M, Bergen D, Altmann T (2003) Photosynthetic performance of an *Arabidopsis* mutant with elevated stomatal density (*sdd1–1*) under different light regimes. J Exp Bot 54: 867–874
- Shinozaki K, Yamaguchi–Shinozaki K (1997) Gene expression and signal transduction in water–stress response. Plant Physiol 115: 327–334
- Skillman JB, Winter K (1997) High photosynthetic capacity in a shade–tolerant Crassulacean acid metabolism plant. Plant Physiol 113: 441–450
- Smirnov N (1993) The role of active oxygen in the response to water deficit and desiccation. New Phytol 125: 27–58
- Sofa A, Dichio B, Xiloyannis C, Masia A (2004a) Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. Plant Sci 166 (2): 293–302
- Sofa A, Dichio B, Xiloyannis C, Masia A (2004b) Lipoxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive tree in response to drought stress. Physiol Plant 121 (1): 58–65
- Sofa A, Dichio B, Xiloyannis C, Masia A (2005) Antioxidant defences in olive tree during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. Funct Plant Biol 32 (1): 45–53
- Thiele A, Schirwitz K, Winter K, Krause H (1996) Increased xanthophyll cycle activity and reduced D1 protein inactivation related to photoinhibition in two plant systems acclimated to excess light. Plant Sci 115: 237–250

- Tombesi A, Proietti P, Nottiani G (1986) Effect of water stress on photosynthesis, transpiration, stomatal resistance and carbohydrate level in olive tree. *Olea* 17: 35–40
- Turner NC (1981) Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant Soil* 58: 339–366
- Valladares F, Pearcy RW (1997) Interactions between water stress, sun–shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*. *Plant Cell Environ* 20: 25–36
- Valladares F, Pearcy RW (2002) Drought can be more critical in the shade than in the sun: a field study of carbon gain and photo–inhibition in a Californian shrub during a dry El Nifio year. *Plant Cell Environ* 25: 749–759
- Verhoeven AS, Bugos RC, Yamamoto BY, Yamamoto HY (2001) Transgenic tobacco with suppressed zeaxanthin formation is susceptible to stress–induced photoinhibition. *Photosynth Res* 67: 27–39
- Wagner R (1994) The regulation of ribosomal RNA synthesis and bacterial cell growth. *Arch Microbiol* 161: 100–109
- Walters RG, Horton P (1991) Resolution of components of non–photochemical chlorophyll fluorescence quenching in barley leaves. *Photosynthesis Research* 27: 121–133
- Xiloyannis C, Pezzarossa B, Jorba J, Angelici P (1988) Effects on soil water content on gas exchange in olive trees. *Adv Hort Sci* 2: 58–63
- Xiloyannis C, Gucci R, Dichio B (2003) Irrigazione. In: *Olea: Trattato di Olivicoltura*, ed. P. Fiorino, ISBN 88–50649–38–X, Il Sole 24 ORE Edagricole S.r.l., pp. 365–389