

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA BASILICATA

POTENZA



FACOLTA' DI SCIENZE AGRARIE

DIPARTIMENTO DI PRODUZIONE VEGETALE

DOTTORATO DI RICERCA

IN

PRODUTTIVITA' DELLE PIANTE COLTIVATE

XV CICLO

Dissertazione finale

Analisi delle attività di enzimi antiossidanti e dei livelli di
molecole indicatrici dello stress idrico e ossidativo in olivo
(*Olea europaea* L.)

Candidato

Dott. Adriano Sofo

Tutore

Dott. Bartolomeo Dichio

Coordinatore del Dottorato

Chiar.mo Prof. Francesco Basso

Si ringraziano:

- Il Dott. Bartolomeo Dichio per la disponibilità dimostrata in questi anni e per gli utili consigli sulla predisposizione della prova sperimentale;
- il Dott. Giuseppe Montanaro per avermi mostrato l'uso dell'ADC-LCA 4;
- i Sig.ri Antonio Di Taranto e Angelo Mossuto per l'aiuto pratico in campo;
- le Dott.sse Stefania Pace, Anna Dinoi e Paola Sangiorgio per la raccolta e la conservazione dei campioni e per l'organizzazione della prova in campo;
- il Dott. Michele Romano per i consigli sull'uso del software per l'analisi statistica;
- il Prof. Andrea Masia per la messa a punto delle metodiche di estrazione ed analisi enzimatica;
- il Prof. Cristos Xiloyannis per la fiducia e la pazienza dimostrate nei miei confronti e per avermi consentito questa esperienza.

*“... l’esperienza insegna che proprio questa, l’affidabilità,
è la virtù più costante,
quella che non si acquista né si perde con gli anni.
Si nasce degni di fiducia, col viso aperto e gli occhi fermi,
e tali si resta per tutta la vita.
Chi nasce contorto e lasco, tale rimane ...”*

Primo Levi (da “Il sistema periodico”)

INDICE

1.	ABSTRACT	5
2.	INTRODUZIONE	
2. 1	Stress ossidativo associato al deficit idrico.....	8
2. 2	Sistemi di difesa antiossidanti.....	12
2. 3	Meccanismi di aggiustamento osmotico e reazioni di perossidazione lipidica.....	20
2. 4	Stress foto-ossidativo nelle piante sottoposte a stress idrico.....	24
2. 5	Meccanismi di resistenza dell'olivo allo stress idrico.....	28
2. 6	Obiettivo della ricerca.....	30
3.	MATERIALI E METODI	
3. 1	Materiale vegetale e disegno della prova.....	33
3. 2	Parametri ambientali e fisiologici.....	35
3. 3	Estrazione degli enzimi e determinazione delle attività enzimatiche.....	36
3. 3. 1	<i>SOD</i>	37
3. 3. 2	<i>APX</i>	38
3. 3. 3	<i>CAT</i>	39
3. 3. 4	<i>POD, IAAox, PPO</i>	41
3. 3. 5	<i>LOX</i>	42
3. 4	Contenuto in malondialdeide e prolina	
3. 4. 1	<i>MDA</i>	43
3. 4. 2	<i>PRO</i>	44
3. 5	Analisi statistica.....	44
4.	RISULTATI	
4. 1	Condizioni ambientali.....	45
4. 2	Parametri fisiologici.....	45
4. 3	Attività degli enzimi antiossidanti.....	48
4. 4	Livelli di <i>MDA</i> e <i>PRO</i> e attività <i>LOX</i>	51
4. 5	Figure e tabelle.....	53
5.	DISCUSSIONE	
5. 1	Effetti dello stress idrico sulle attività degli enzimi antiossidanti.....	72
5. 2	Effetti dello stress idrico sui livelli di <i>MDA</i> e <i>PRO</i> e sull'attività <i>LOX</i>	80
5. 3	Effetti del ripristino idrico.....	88
6.	CONCLUSIONI	96
7.	RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	100

1. ABSTRACT

Olive tree (*Olea europaea* L.) is a typical species of the Mediterranean basin, able to resist severe and prolonged drought.

The effects of water deficit on the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PPO) were investigated in 2-year old (cv. "Coratina") plants grown in environmental conditions characterized by high temperatures and PPFD levels and gradually subjected to a controlled water deficit stress. After 20 days without irrigation, mean predawn leaf water potential (LWP) fell from -0.37 to -5.37 MPa and this was accompanied by the suppression of net photosynthesis and transpiration. Before and during the experimental period, leaf and root samples were collected. The activities of SOD, APX, CAT and POD increased according to the severity of water stress in both leaves and roots. In particular, a significant five-fold increase in APX activity was found in leaves of plants at the maximum level of stress. POD and IAA oxidase activities showed a similar pattern and CAT activity increased during severe water deficit conditions in leaves and small roots. In contrast, the PPO activity decreased during the progression of stress in all the tissues studied. The results show that in olive tree the ability to increase antioxidant system activity, in order to limit cellular damage caused by active oxygen species (AOS), might be an important attribute linked to the drought tolerance.

Mechanisms of osmotic adjustment and appearance of damages due to drought-induced oxidative stress at cellular level, in particular in cell membranes, were studied. High levels of water stress induced the accumulation of proline (PRO) and malondialdehyde (MDA) in both leaves and roots, suggesting that water deficit is associated to osmotic adjustment and lipid peroxidation. A significant increment of

lipoxygenase (LOX) activity was observed during progressive water stress in all the tissues analyzed. The results confirmed that both PRO and MDA could be considered two convenient biomarkers for water stress and lipid peroxidation in olive tree, respectively. The effects of accumulated PRO and MDA in leaves and roots were discussed in relation to physiological and environmental parameters.

The effects of water recovery following a drought stress period on the activities of SOD, CAT, APX, POD, PPO and LOX and on MDA level were also investigated. After reaching the maximum level of water stress, stressed plants were subjected to a rewatering for 30 days, under both environmental irradiance and semi-shade conditions. The activities of SOD, APX, CAT, POD and LOX and the level of MDA decreased during the rewatering period in both leaves and roots and these decrements were faster in plants grown in semi-shade conditions (SHP) than in plants under environmental light (ICP). In contrast, PPO activity increased during rewatering in all the tissue studied. The effects of water recovery on changes of antioxidant enzymes activities were discussed in relation to physiological and environmental parameters. The results showed that the lower expression of the enzymatic antioxidant system in SHP with respect to ICP could be due to a reduced need of AOS removal. On the contrary, in ICP, higher enzymatic activities are required for a better protection against a more pronounced oxidative stress, as judged from the high levels of lipid peroxidation, caused by the synergic action of water deficit and high degree of irradiance.

Parole-chiave

Stress idrico, olivo, ripristino idrico, specie attive dell'ossigeno, superossido dismutasi, ascorbato perossidasi, catalasi, guaiacolo perossidasi, polifenolo ossidasi, lipossigenasi, aggiustamento osmotico, perossidazione lipidica, malondialdeide, prolina.

Abbreviazioni

AOS, specie attive dell'ossigeno; APX, ascorbato perossidasi; AsA, ascorbato; CAT, catalasi; DTT, ditioneitrato; GSH, glutatione ridotto; IAA, acido 3-indolacetico; IAAox, indolacetato ossidasi; ICP, piante sottoposte a ripristino idrico in condizioni di livelli di irraggiamento naturali; KPi, tampone potassio fosfato; LOX, lipossigenasi; LWP, potenziale idrico fogliare; MDA, malondialdeide; MDHA, monodeidroascorbato; MR, radici medie; NaKPi, tampone sodio-potassio fosfato; POD, guaiacolo perossidasi; PPFD, densità fotosintetica di flusso fotonico; PPO, polifenolo ossidasi; PRO, prolina; PS, fotosistema; PVPP, polivinilpolipirrolidone; SOD, superossido dismutasi; SHP, piante sottoposte a ripristino idrico in condizioni di ombreggiamento; TR, radici fini; WSP, piante sottoposte a stress idrico; WCP, piante di controllo normalmente irrigate.

2. INTRODUZIONE

2.1 Stress ossidativo associato al deficit idrico

La maggior parte delle piante va incontro a diminuzioni transienti del contenuto idrico in alcuni stadi della loro vita, e può produrre strutture tolleranti alla disidratazione quali semi, spore o polline (Ingram e Bartels, 1996). Lo stress idrico è la principale causa della riduzione della crescita e della produttività delle piante nelle 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 soggette a stress idrico, inoltre, vanno incontro ad un eccesso di potere riducente, dovuto alla limitazione dell'assimilazione di CO₂, che causa la sovrariduzione della catena di trasporto elettronica fotosintetica e il ri-direzionamento dell'energia fotonica in processi che favoriscono la produzione di specie attive dell'ossigeno (AOS). Nei casi in cui l'accumulo delle AOS supera la capacità del sistema antiossidante di rimuoverle, insorge il danno ossidativo, in particolare nell'apparato fotosintetico e nel sistema delle membrane cellulari. Questo tipo di danno provoca la perossidazione dei lipidi di membrana, la distruzione dei pigmenti fotosintetici, l'inattivazione degli enzimi coinvolti nelle reazioni della fissazione della CO₂ e, infine, la morte della cellula (Smirnov, 1993; Asada, 1999; Møller, 2001).

Contenuti idrici molto bassi causati da una forte disidratazione sono spesso associati ad aumentati livelli di AOS, quali l'anione superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno (H₂O₂), il radicale idrossile (OH^\cdot) e l'ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$), che a loro volta danneggiano le strutture cellulari e le macromolecole (Smirnov, 1993) e agiscono come molecole segnale che attivano le risposte di difesa (Wagner, 1995;

Van Breusegem et al., 2001; Vranovà et al., 2002). Le AOS hanno una funzione positiva perché sono coinvolte nella mediazione della comunicazione intra- ed inter-cellulare in seguito all'esposizione delle piante a stress ambientali e a patogeni, ma la loro elevata reattività determina il danno ossidativo nell'apparato cellulare (Fig. 1) (Noctor e Foyer, 1988).

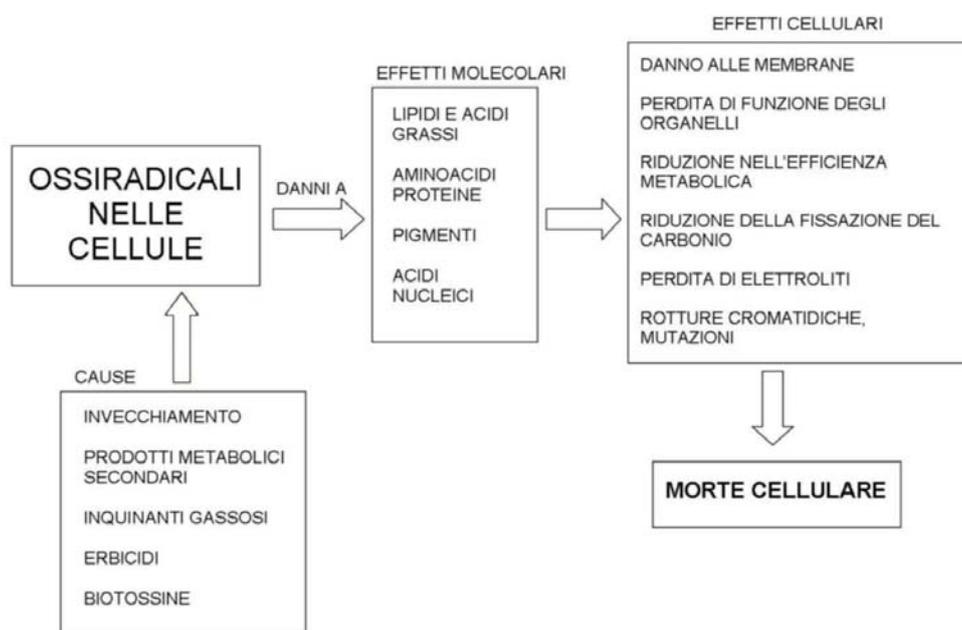


Figura 1. Agenti che favoriscono la produzione delle specie attive dell'ossigeno e conseguenze del danno ossidativo (da Scandalios, 1993).

Nel suo stato fondamentale, O_2 è relativamente poco pericoloso, benché sia capace di dare origine a stati eccitati reattivi come radicali liberi e loro derivati. L'utilizzazione di O_2 procede molto speditamente per mezzo di un percorso a tappe in cui avviene una riduzione a H_2O in cui prendono parte quattro elettroni, durante la quale si generano intermedi reattivi parzialmente ridotti (Fig. 2).

Da quanto detto, si evince che, sebbene O_2 sia essenziale per l'esistenza e la sopravvivenza della vita aerobia, esso sottopone gli organismi viventi ad una varietà di minacce fisiologiche che globalmente prendono il nome di "stress ossidativo". Queste minacce sono più gravose per le piante che non per gli altri eucarioti a causa della loro vita "sedentaria", soggetta a frequenti e continui cambiamenti ambientali. Le cellule degli organismi fotosintetici sono maggiormente sottoposte al danno ossidativo poiché presentano concentrazioni di O_2 molto alte, dal momento che non solo lo consumano durante la respirazione ma lo generano anche con la fotosintesi, possiedono membrane tilacoidali composte soprattutto da lipidi polinsaturi, queste ultime molecole soggette a reazioni di perossidazione, e, per mezzo dei numerosi pigmenti fotosintetici, assorbono energia fotonica, il cui eccesso favorisce la produzione di AOS (Smirnoff, 1993). Questa ipotesi è confermata dal fatto che le concentrazioni di $\cdot O_2^-$ e di H_2O_2 nelle cellule di mammifero sono rispettivamente 10^{-12} - 10^{-11} e 10^{-9} - 10^{-7} M, mentre nei tessuti vegetali in condizioni normali la concentrazione di H_2O_2 si aggira intorno a $5 \cdot 10^{-6}$ M e può anche raggiungere il valore di $5 \cdot 10^{-5}$ M quando CAT è inibita. Questi valori sono più sensibilmente più alti rispetto a quelli delle cellule di mammifero (Møller, 2001).

I cloroplasti, i mitocondri ed i perossisomi sono le maggiori fonti di AOS nelle cellule vegetali (van der Bosch et al., 1992; Inzé e Van Montagu, 1995; Asada, 1999) in quanto in questi organelli sono molto frequenti i trasferimenti di elettroni, che avvengono nella catena fotosintetica di trasporto elettronico nei cloroplasti e nella catena respiratoria di trasporto elettronico nei mitocondri (Figg. 3 e 4). In particolare, i mitocondri, subito dopo i cloroplasti, sono il sito più importante per la produzione di AOS nelle cellule vegetali ed il più importante in assoluto nelle cellule animali (Møller, 2001).

2.2 Sistemi di difesa antiossidanti

A causa della loro tossicità nella cellula, le AOS sono efficacemente eliminate da antiossidanti ad azione non-enzimatica (α -tocoferolo, β -carotene, composti fenolici, ascorbato, glutazione) (Smirnov, 2000; Foyer et al., 2001; Ryan et al., 2002) ed antiossidanti ad azione enzimatica (Smirnov, 1993; Noctor e Foyer, 1998).

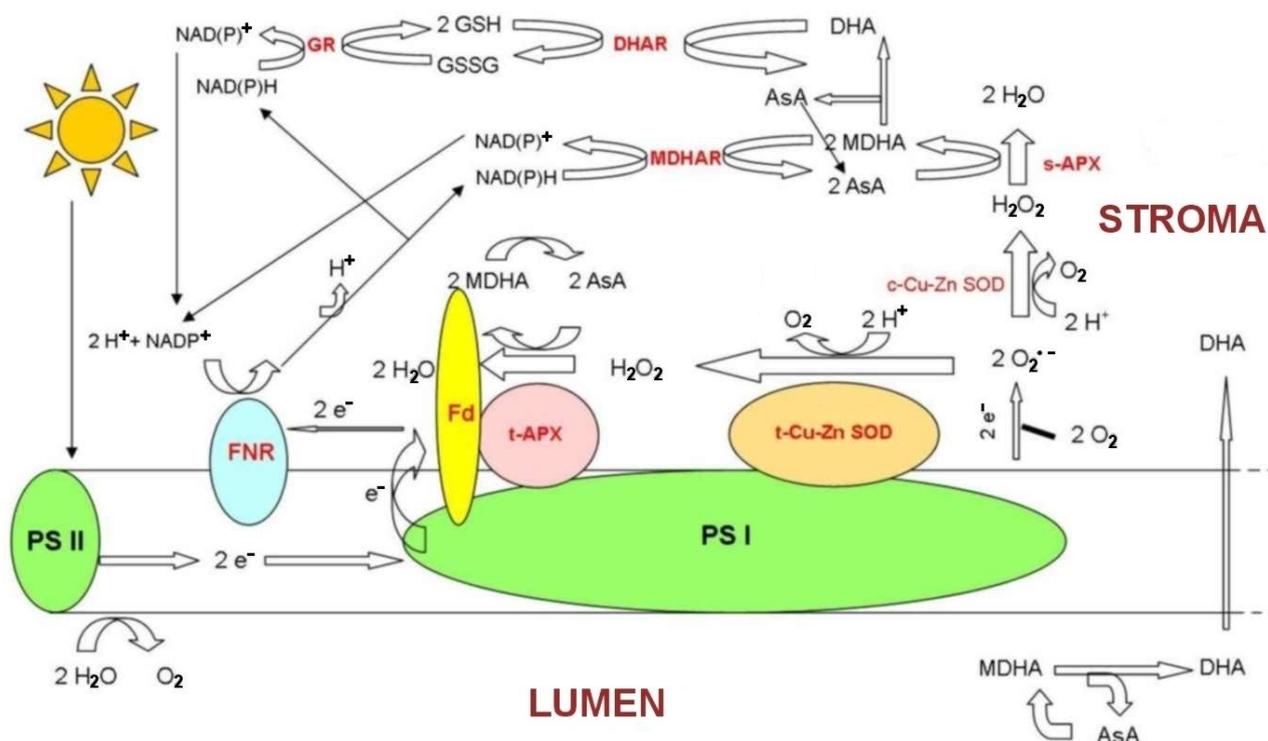


Figura 3. Meccanismo enzimatico del sistema foto-riducente di O_2 ad H_2O nel ciclo di detossificazione antiossidativa di Mehler-Asada e microcompartmentalizzazione degli enzimi che vi partecipano.

$\cdot O_2^-$ è foto-prodotto direttamente nel complesso del fotosistema I (PS I) o indirettamente mediante un fattore stromatico (SF). Un possibile candidato per SF è la MDHAR. Il sistema di detossificazione tilacoidale è composto da Cu/Zn-SOD presente sulla superficie dei tilacoidi (in molte piante Cu/Zn-SOD è sostituita da Fe-SOD), APX legata ai tilacoidi (t-APX) e ferredossina (Fd). Fd ricuce il monodeidroascorbato (MDHA) direttamente ad ascorbato (AsA). Il sistema di detossificazione stromatica è composto da Cu/Zn-SOD situata nello stroma, APX stromatico (s-APX), MDHAR, DHAR e GR. NAD(P)H per la riduzione di MDHA e deidroascorbato (DHA) è fotogenerato per mezzo della ferredossina-NADP⁺-ossidoreduttasi (FNR). MDHA è anche generato nel lume nella reazione della violaxantina de-epossidasi e quando AsA dona elettroni a PS II o a PS I. MDHA è rapidamente disproporzionato nel lume e DHA penetra dal lume attraverso le membrane tilacoidali ed è ridotto a AsA per mezzo del sistema di detossificazione stromatico (da Asada, 1999).

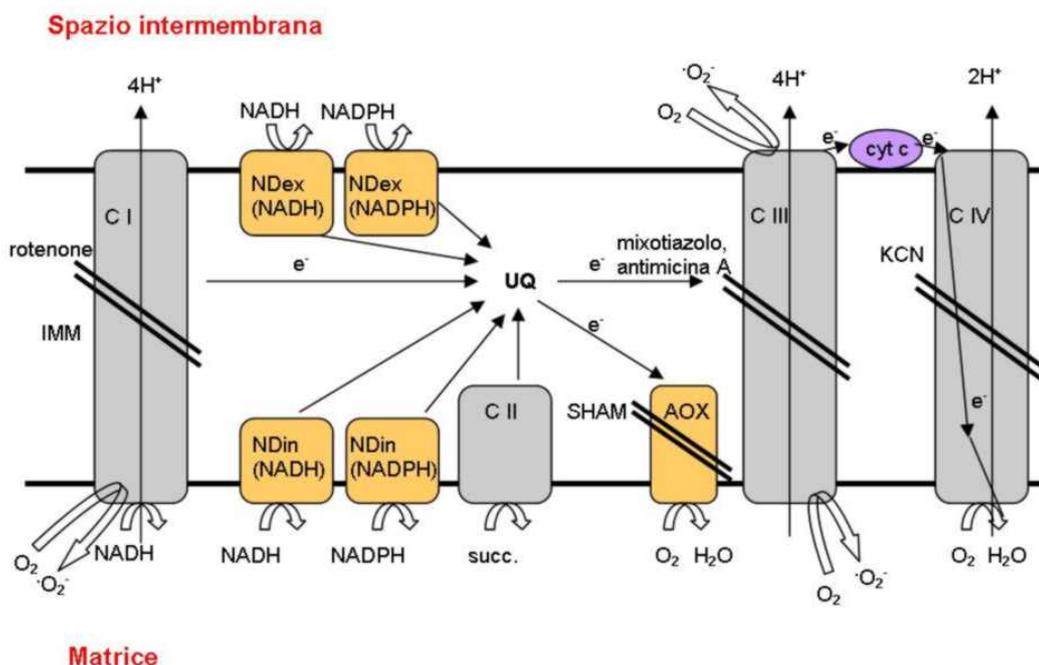


Figura 4. La catena di trasporto di elettroni nella membrana interna dei mitocondri delle cellule vegetali.

Gli enzimi specifici delle piante sono mostrati in arancione. Sono anche indicate pompe protoniche dei complessi I, III e IV (per $2e^-$), gli inibitori dei complessi I, III e IV, e i due principali siti di produzione di AOS (complessi I e III). Poiché UQ è legato a due siti nel complesso III, uno vicino alla superficie interna della membrana mitocondriale interna (IMM), l'altro vicino alla superficie esterna, le AOS potrebbero essere prodotte su entrambi i lati della IMM.

Abbreviazioni: C I-C IV = complessi respiratori; C I = complesso I, NADH deidrogenasi; C II = succinato deidrogenasi; C III = ubiquinolo-citocromo bc1 riduttasi; C IV = citocromo c ossidasi; cyt = citocromo; succ. = succinato; SHAM = acido salicilidrossamico (da Møller, 2001).

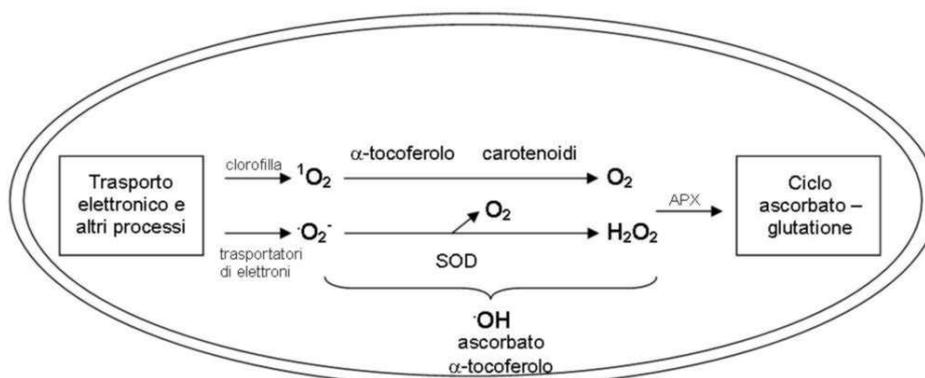
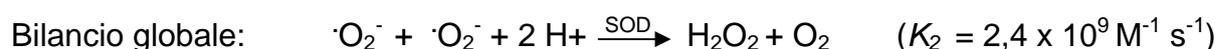
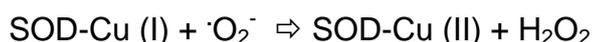
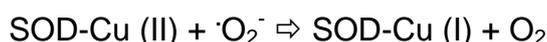


Figura 5. Un semplice schema che mostra la produzione di AOS nel cloroplasto e i meccanismi associati di detossificazione (da Foyer et al., 1994).

Il sistema enzimatico include la superossido dismutasi (SOD; EC 1.15.1.1), che catalizza la dismutazione di $\cdot\text{O}_2^-$ in H_2O_2 , insieme alla catalasi (CAT; EC 1.11.1.6), alla perossidasi guaiacolo-dipendente (POD; EC 1.11.1.7) ed agli enzimi del ciclo ascorbato-glutatione, quali l'ascorbato perossidasi (APX; EC 1.11.1.11), che eliminano H_2O_2 prodotto (Figg. 3 e 5). Gli isoenzimi della polifenolo ossidasi (PPO; EC 1.30.3.1) sono presenti soprattutto nel lume tilacoidale, dove ossidano i substrati orto-difenolici a orto-chinoni (Espín et al., 1997; Kuwubara e Katoh, 1999) e sono quindi coinvolti nel metabolismo dei fenoli, che hanno un'azione antiossidante non enzimatica (Rice-Evans et al., 1997).

Tutti gli enzimi sopra descritti sono presenti nelle piante in forme multiple. Le tre isoforme di SOD conosciute sono classificate in base al loro cofattore metallico: rame e zinco nelle Cu/Zn-SOD, manganese nelle Mn-SOD e ferro nelle Fe-SOD. Le Cu/Zn-SOD possono essere sia plastidiali che citosoliche, le Fe-SOD sono localizzate esclusivamente nei cloroplasti e le Mn-SOD nei mitocondri (Jackson et al., 1978; Asada, Bowler et al., 1992); questi ultimi sono isoenzimi molto efficaci per eliminare $\cdot\text{O}_2^-$ e i loro geni codificanti sono indotti dallo stress idrico, sebbene simultaneamente aumenti anche la loro velocità di ricambio (Møller, 2001). Le SOD sono proteine in grado di eliminare molto efficacemente $\cdot\text{O}_2^-$ catalizzando la reazione di dismutazione di tale radicale anionico a O_2 e H_2O_2 mediante le seguenti reazioni:

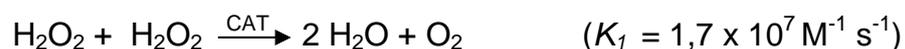


dove le forme SOD-Cu (II) e SOD-Cu (I) rappresentano rispettivamente l'enzima ossidato e ridotto. Le Cu/Zn-SOD, come la maggior parte delle Mn-SOD e Fe-SOD

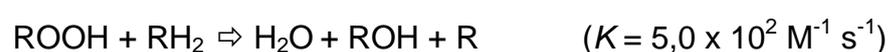
procariotiche, sono dimeri, e precisamente omodimeri contenenti un atomo di Cu ed uno di Fe in ciascuna delle due subunità, mentre le Mn-SOD presenti nei mitocondri e in alcuni batteri sono tetrametri. Da quanto detto, SOD è l'unico enzima in grado di regolare le concentrazioni di $\cdot\text{O}_2^-$ e H_2O_2 , i due substrati della reazione di Haber-Weiss, ed è quindi fondamentale nei meccanismi di difesa. Le SOD sono presenti in tutti gli organismi aerobi, ad eccezione di rarissimi casi, e in tutti i compartimenti cellulari in cui lo stress ossidativo può comparire; il numero di isoenzimi, inoltre, varia fortemente da pianta a pianta, come anche l'abbondanza relativa di ognuno di esso. Tutte le isoforme sono codificate nel nucleo e, quando necessario, sono trasportate agli organelli per mezzo di sequenze segnale NH_2 -terminali (Bowler et al., 1992).

Le CAT sono enzimi contenenti eme particolarmente abbondanti nei gliossisomi, dove eliminano H_2O_2 generato dalle ossidasi coinvolte nella β -ossidazione degli acidi grassi, e nei perossisomi delle foglie verdi, dove distruggono H_2O_2 prodotto dall'ossidazione del glicolato durante la fotorespirazione (Havir e McHale, 1987). Le CAT sono presenti nella matrice dei mitocondri di mammifero, ma ancora non si sa se esse siano presenti anche nei mitocondri delle cellule vegetali (Møller, 2001). Esse esercitano una duplice funzione:

- 1) decompongono H_2O_2 per produrre H_2O e O_2 (attività catalitica)

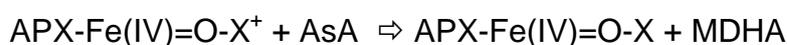
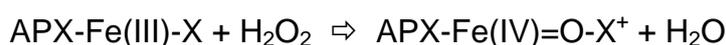


- 2) ossidano un donatore di elettroni (es. etanolo, metanolo o acido formico) con il consumo di una mole di perossido (azione perossidatica)

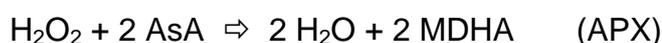
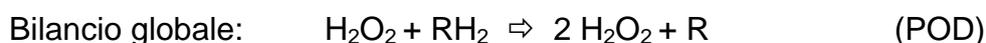


La prima reazione è predominante e dipende dalla concentrazione del donatore di H⁺ e dalla concentrazione o dal tasso di produzione di H₂O₂ nel sistema; le reazioni perossidative sono invece relativamente lente (Aebi, 1984). A discapito della sua collocazione molto ristretta, CAT può avere un ruolo fondamentale contro lo stress ossidativo, poiché H₂O₂ può facilmente diffondere attraverso le membrane (Mehlhorn et al., 1996).

Le POD sono glicoproteine contenenti Fe generalmente situate nel vacuolo, nell'apoplasto e nel citosol, mentre non sono presenti nei cloroplasti. Le POD, insieme alle APX, sono coinvolte nella detossificazione di H₂O₂ sia all'interno della cellula che nell'apoplasto mediante un ciclo di catalisi con meccanismo "a ping-pong":



dove X rappresenta una porfirina o un residuo di Trp conservato.



Nel primo passaggio si formano un intermedio ossidato a due elettroni, detto Composto I, che ossida l'ascorbato (AsA) o un altro donatore di elettroni; successivamente si producono due molecole di monodeidroascorbato (MDHA) e l'intermedio viene ridotto nuovamente allo stato di Fe(III).

Varie isoforme forme di POD sono generalmente dirette verso il vacuolo e l'apoplasto per mezzo del reticolo endoplasmatico. Mentre la reazione chimica di base delle perossidasi, la riduzione di H_2O_2 per mezzo di una vasta gamma di donatori di idrogeno, è stata ben delineata, la funzione di questi isozimi e la loro differente regolazione rimane ancora sconosciuta. Le perossidasi sono state associate ad un gran numero di processi fisiologici: abscissione di foglie e fiori, invecchiamento e senescenza, dominanza apicale, tolleranza al freddo, dormienza, sviluppo e maturazione del frutto, germinazione, e risposte ipersensibili di resistenza nei confronti di parassiti (Mehlhorn et al., 1996). Le POD, inoltre, insieme ad altri enzimi, quali le laccasi, sono coinvolte nella polimerizzazione ossidativa dei precursori della lignina (monolignoli) e quindi nella sintesi di quest'ultima (McEldoon et al., 1995). Le POD possono utilizzare una gamma di substrati come donatori di elettroni, tra cui l'acido indolacetico (IAA), il quale viene ossidato per mezzo di ossigeno molecolare (Ricard e Job, 1974), e sono quindi coinvolte nel catabolismo dell'auxina (Shinshi e Noguchi, 1975). Le APX, invece, sono altamente specifiche per AsA quale donatore di elettroni, ma possono anche utilizzare il guaiacolo, pirogallolo o altri substrati, anche se con bassa affinità (Mehlhorn et al., 1996).

Gli isozimi della APX sono generalmente presenti nei cloroplasti ma ne esistono anche isoforme nei microsomi e nei perossisomi, come anche isoenzimi nel citosol e nell'apoplasto (Asada, 1992; Ohya et al., 1997; Noctor e Foyer, 1998). Wang et al. (1999), inoltre, hanno recentemente studiato le proprietà antiossidanti di una forma di APX legata alle membrane dei perossisomi. APX è un enzima molto labile, se confrontato con POD, ed è inattivato ad alte concentrazioni di H_2O_2 . Le isoforme APX all'interno dei cloroplasti, insieme alle SOD, alla MDHA reduttasi, alla deidroascorbato reduttasi e alla glutatione reduttasi, costituiscono il maggiore sistema di difesa contro le AOS prodotte dalla catena di trasporto elettronico presente nei

cloroplasti (Inzé e Van Montagu, 1995; Morell et al., 1997; Foyer e Mullineaux, 1998; Asada, 1999) (Figg. 3 e 5). APX è, quindi, l'enzima-chiave nella detossificazione di H_2O_2 nel cloroplasto, poiché in questo organulo non è presente CAT. APX è una proteina presente in tutte le piante superiori contenente eme e presenta una struttura primaria simile alla cyt c-perossidasi di lievito (Mehlhorn et al., 1996), molto diversa da quella di POD. Probabilmente, le APX e le POD potrebbero non essere mutuamente esclusive nelle loro capacità funzionali: questo aggiungerebbe un grado di flessibilità alle difese antiossidanti e potrebbe facilitare un importante segnale regolativo tra biosintesi di lignina nella parete cellulare ed eliminazione di H_2O_2 nell'apoplasto.

La situazione nei mitocondri delle cellule vegetali è meno chiara rispetto a quella dei cloroplasti, sia per la minore quantità di studi a proposito che per il possibile contributo di enzimi ancora non ben identificati. Si possono ad ogni modo trarre delle conclusioni generali sui pochi dati finora a disposizione: i mitocondri delle cellule vegetali producono sia $\cdot O_2^-$ che H_2O_2 a tassi uguali o maggiori rispetto ai mitocondri di cellule di mammifero, sia su base assoluta che in base percentuale del tasso di trasporto elettronico; i mitocondri delle cellule vegetali in stato di attiva respirazione producono AOS a tassi abbastanza alti; se i componenti della catena di trasporto elettronica mitocondriale si trovano nel loro stato ridotto si verifica una maggiore produzione di AOS; i principali siti di produzione di AOS nei mitocondri sono i complessi I e III (Fig. 4); nei mitocondri delle cellule vegetali potrebbe funzionare il ciclo di Mehler-Asada, che invece non è sicuramente presente nei mitocondri dei mammiferi (Møller, 2001) (Fig. 6).

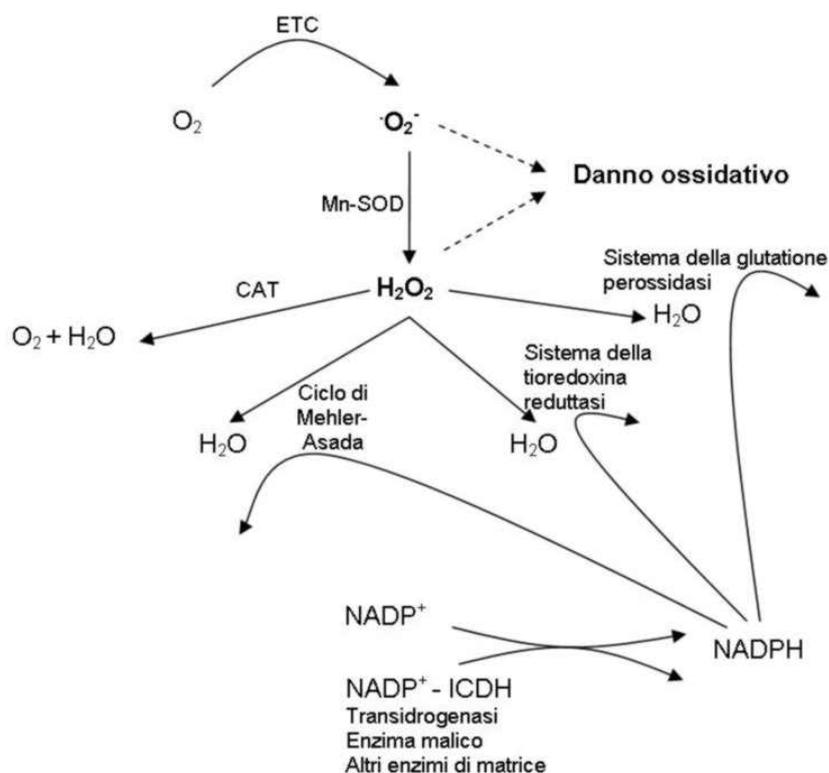


Figura 6. Schema riassuntivo dei sistemi enzimatici probabilmente coinvolti nella rimozione di AOS nei mitocondri delle cellule vegetali. Trx, tioredoxina; ICDH, isocitrato deidrogenasi; ETC, catena di trasporto elettronico respiratoria (da Møller, 2001).

Le PPO sono Cu/Zn mono-ossigenasi presenti in funghi, piante superiori, artropodi, anfibi e mammiferi, che catalizzano la *o*-idrossilazione dei fenoli e l'ossidazione dei difenoli (catecoli) nei corrispondenti *o*-chinoni, a spese di O_2 (Rescigno et al., 1997). Le PPO non possono eseguire la catalisi nelle cellule viventi, dal momento che la loro localizzazione intracellulare è differente da quella dei substrati: PPO è, infatti, localizzata nel lume tilacoidale dei plastidi, mentre i polifenoli sono nei vacuoli; sembra che essi s'incontrino solo quando il tonoplasto e le membrane plastidiali sono distrutte, vale a dire dopo la morte della cellula. Il ruolo fisiologico di PPO nelle cellule viventi è sconosciuto, ma probabilmente PPO ha qualche relazione con la fotosintesi. PPO possiede anche un'attività proteasica che potrebbe rappresentare il principale ruolo fisiologico dell'enzima.

Un esperimento condotto *in vitro* da Kuwabara e Katoh (1999) ha inoltre mostrato che PPO viene a contatto con H_2O_2 , AsA o altri composti riducenti non *o*-

difenolici nei cloroplasti, soprattutto in condizioni di stress o in seguito alla rottura delle membrane tilacoidali e che l'enzima ha la capacità di produrre AOS. In questo caso, la funzione di PPO sarebbe di degradare non solo le proteine, ma anche altre macromolecole, quali acidi nucleici, lipidi e pigmenti. Il ruolo di PPO, quindi, potrebbe essere quello di facilitare la morte cellulare.

Il coinvolgimento ed il ruolo degli enzimi antiossidanti fino ad ora descritti nella protezione contro lo stress ossidativo sono stati dimostrati usando piante transgeniche che esprimono livelli maggiori di alcuni enzimi antiossidanti (Allen et al., 1997; Wang et al., 1999), anche se i risultati sono a volte contrastanti (Shikanai et al., 1998). Variazioni di espressione e di attività degli enzimi antiossidanti, inoltre, sono state trovate in diverse specie di piante in risposta a condizioni ambientali avverse, quali deficit idrico (Sairam et al., 1998; Lima et al., 2002), stress salino ed ossidativo (Scalet et al., 1995; Fambrini et al., Sreenivasulu et al., 1999); durante la fioritura (Ye et al., 2000), maturazione dei frutti e dei semi (Schantz et al., 1995; Masia, 1998; Sakharov e Ardila, 1999), senescenza (Scebba et al., 2001), resistenza alle malattie e difesa nei confronti dei patogeni (Wendehenne et al., 1998; Bolwell, Yu et al., 1999); e in seguito all'esposizione a temperature basse o alte (Queiroz et al., 1998; Sairam et al., Sala e Lafuente 2000), a metalli pesanti (Marziah, 1995; Bakardjieva et al., 2000; MacFarlane e Burchett, 2001; Pereira et al., 2002), ad agenti inquinanti (Madamanchi et al., 1994) e ad anossia (Lee e Lin, 1995).

2.3 Meccanismi di aggiustamento osmotico e reazioni di perossidazione lipidica

Il mantenimento del potenziale idrico totale nelle piante durante il deficit idrico può essere raggiunto mediante aggiustamento osmotico, determinato dall'accumulo di

osmoliti compatibili (es. ioni inorganici, prolina, glicina-betaina, acidi organici, zuccheri come il mannitolo ed il saccarosio) nel citoplasma (Fig. 7) (Bray, 1993; Ingram e Bartels, 1996; Hare et al., 1998; Ghoulam, 2002). La prolina (PRO) può agire come soluto compatibile presente ad alte concentrazioni senza danneggiare le macromolecole cellulari, ma può anche fungere da fonte di azoto nella cellula (Chiang e Dandekar, 1995) o avere un'azione protettiva, prevenendo il danno alle membrane e la denaturazione delle proteine, in situazioni caratterizzate da stress idrico severo (Ain-Lhout et al., 2001), oppure ancora agire come fonte di energia (in quanto il NADH prodotto durante il suo catabolismo fornisce energia per la fosforilazione di ADP) o come agente riducente (perché NADP^+ generato durante la sua produzione può essere ridotto attraverso il ciclo dei pentoso-fosfati per rigenerare il potenziale riducente).

PRO può raggiungere anche il 6% del peso secco di un tessuto vegetale. In tessuti naturalmente disidratati, quali il polline o i semi, un'alta concentrazione di PRO è correlata alla protezione della germinazione contro temperature sfavorevoli. L'accumulo di PRO potrebbe anche avere un ruolo nell'attivazione di attività cellulari necessarie per il passaggio della pianta da uno stadio di sviluppo ad un altro (Smirnov, 1993).

Durante lo stress idrico, la perossidazione dei lipidi è una delle più importanti cause del deterioramento cellulare: essa genera variazioni nella composizione degli acidi grassi che influenzano la struttura e le proprietà funzionali delle membrane cellulari, quali l'inattivazione delle proteine legate alle membrane e l'aumento di permeabilità delle membrane stesse. Il danno perossidativo della membrana può influire negativamente sull'attività respiratoria nei mitocondri, danneggiare i pigmenti e causare perdite della capacità carbonio-fissatrice nei cloroplasti.

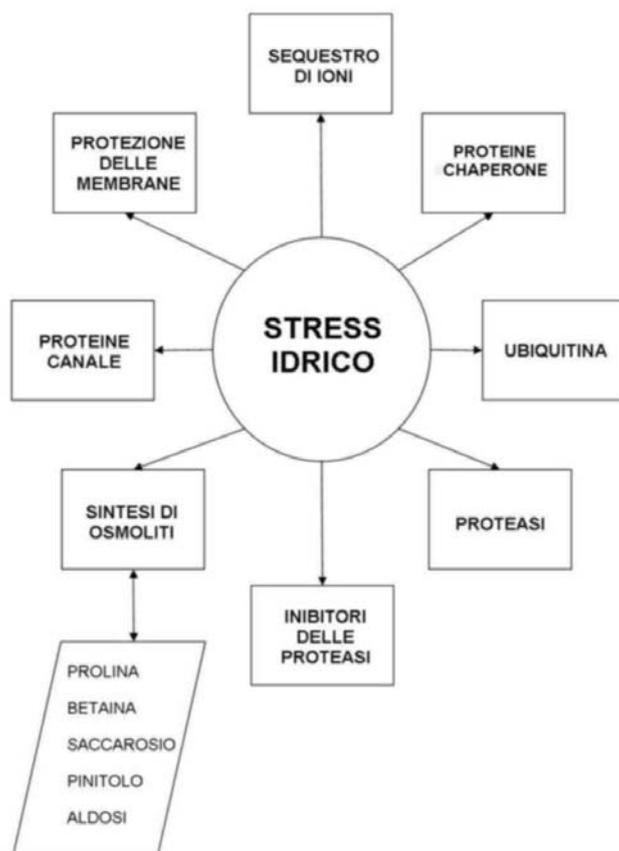


Figura 7. Funzioni dei prodotti dei geni indotti dallo stress idrico che permettono il mantenimento delle funzioni cellulari durante la perdita di acqua o quando si verifica l'aggiustamento osmotico (modificato da Bray, 1993).

Le lipossigenasi (LOX; EC 1.13.11.12) sono enzimi coinvolti nelle fasi di crescita e di sviluppo, nella sintesi di molecole regolative (es. acido traumatico e acido jasmonico), nella senescenza e nella risposta delle piante a stress esogeni (es. reazioni ipersensibili successive all'attacco di patogeni) (Siedow, 1991). Isoenzimi LOX differenti, che variano nella loro specificità per il substrato e per l'optimum di pH, sono presenti nel citosol (Siedow, 1991), nei microsomi (Feussner e Kindl, 1994), nel plasmalemma (Macri et al., 1994) e nei corpi grassi (Rodríguez-Rosales et al., 1998).

Le LOX catalizzano la diossigenazione di acidi grassi polinsaturi (es. acido linoleico, linolenico e arachidonico) che contengono una struttura *cis*, *cis*-1,4-pentadiene, producendo così i corrispondenti idroperossidi degli acidi grassi (Fig. 8). Questi ultimi sono composti altamente reattivi, tossici per la cellula, e sono

rapidamente degradati in metaboliti che portano alla produzione di jasmonato, acidi dienoici coniugati e aldeidi volatili, quali la malondialdeide (MDA) (Bird e Draper, 1984; Siedow, 1991). MDA è quindi un prodotto di decomposizione degli idroperossidi di acidi grassi poli-insaturi e quindi può essere considerata un conveniente bio-indicatore della perossidazione dei lipidi (Bailly et al., 1996), essendo quest'ultima un effetto del danno ossidativo. MDA, inoltre, reagisce con il DNA per formare addotti alla deossiguanosina e alla deossiadenosina (Marnett, 1999), danneggiandolo, ed inattiva la ribonucleasi e altri enzimi dei tessuti vegetali (Du e Bramlage, 1992).

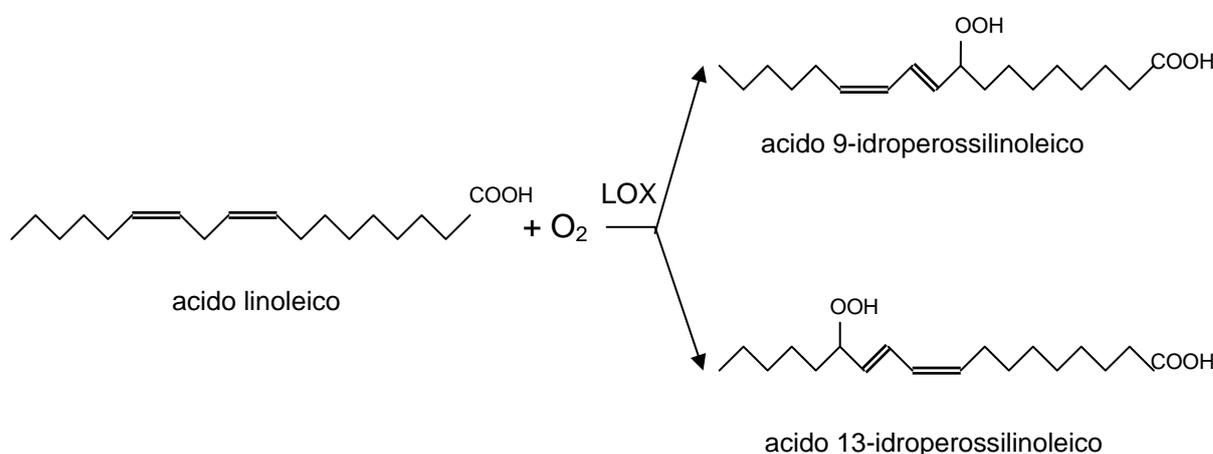


Figura 8. La reazione primaria catalizzata dalla lipossigenasi, utilizzando acido linoleico come substrato, indica due possibili prodotti, gli acidi 9- e 13-idroperossilinoleico (da Siedow, 1991).

L'attività LOX è pressoché ubiquitaria nel regno vegetale, ma, nonostante i numerosi studi, il suo ruolo fisiologico nelle piante non è ancora stato completamente compreso. Nelle piante sono presenti tre isoenzimi: LOX-1, LOX-2 e LOX-3. Le LOX sono proteine globulari, solubili in acqua, costituite da un singolo polipeptide associato ad un atomo di Fe(III), essenziale per la catalisi. I tre isozimi differiscono per il punto isoelettrico e per l'optimum di pH (Siedow, 1991). LOX-3 è l'isoenzima più abbondante ed è quello che presenta la maggiore attività (Suzuki e Matsukura, 1997).

Le LOX di olivo si dividono in solubili e associate alle membrane, queste ultime presenti soprattutto, ma non solo, nella frazione plastidiale. Nel frutto, le isoforme di LOX sono cinque, sono tutte state rilevate nella frazione solubile. I principali prodotti delle LOX in olivo sono costituiti, sia nel callo che nel frutto, dai 13-idroperossidi. Le isoforme solubili sono situate nella maggior parte dei tessuti della pianta, mentre le LOX con pH acido sono associate alle membrane plastidiali del frutto (Williams et al., 2000).

2.4 Stress foto-ossidativo nelle piante sottoposte a stress idrico

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 in condizioni di alta che di bassa luminosità e la conduttanza stomatica è determinata principalmente dal potenziale idrico. In condizioni di alta luminosità 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 alte intensità luminose causa una riduzione della capacità fotosintetica dovuta al ri-direzionamento 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 condizioni di alta luminosità, 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 (PS II), 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 PS II 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 le stress idrico, riciclando CO₂ e proteggendo la pianta dalla fotoinibizione (Smirnov, 1993). La fotorespirazione, infine, insieme al sink termico, è molto più efficace del ciclo perossidativo 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 PS II) che previene la sopra-riduzione della catena elettronica fotosintetica (in particolare del chinone Q_A , accettore primario di elettroni), evitando quindi la “pressione eccitatoria” a livello del PS II, 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 CO_2 (Fig. 9).

Fotorespirazione, retro-regolazione del PS II e assimilazione fotosintetica di CO_2 sono processi in grado di prevenire l'eccessiva fotoriduzione di O_2 , 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 H_2O a livello del PS II e li trasporta al PS I, consumando O_2 e producendo simultaneamente H_2O , ed impedendo così la diffusione di $\cdot O_2^-$ e H_2O_2 nello stroma (Fig. 3). Gli elettroni trasportati a O_2 , 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 fotorespirazione rimane quindi essenziale (Osmond et al., 1997).

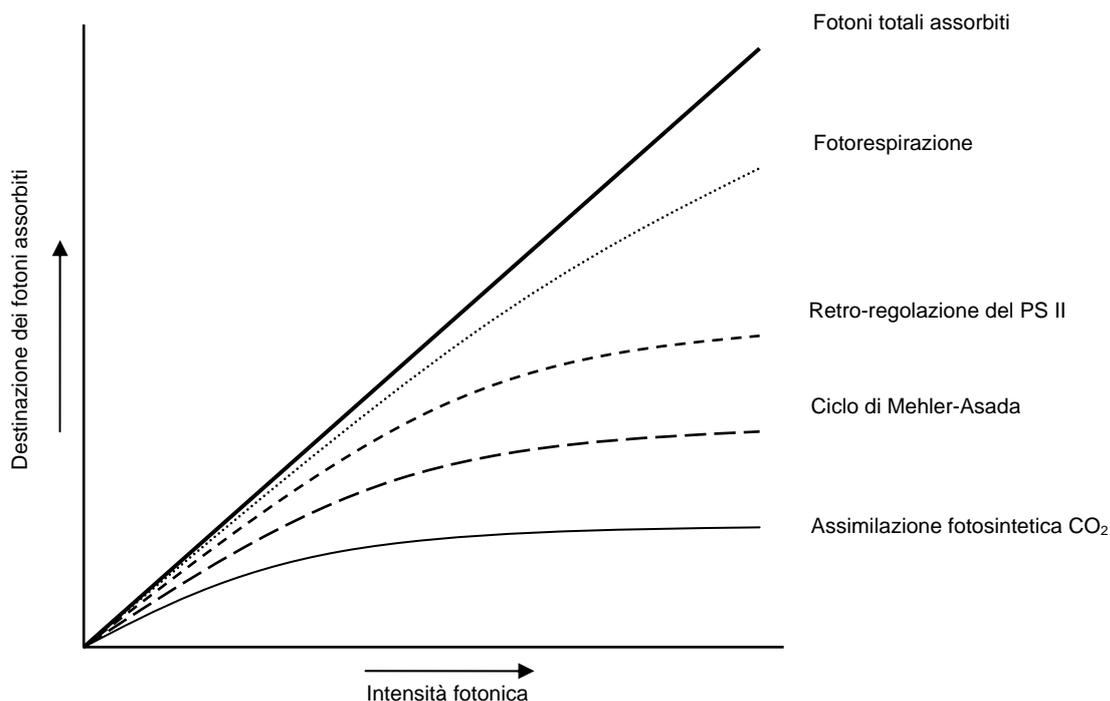


Figura 9. Destino dell'energia fotonica assorbita dalla clorofilla nei cloroplasti in condizioni di diversa intensità luminosa.

La capacità delle foglie di utilizzare energia luminosa per l'assimilazione di CO₂ è influenzata da diverse tipologie di stress ambientali quali siccità, basse temperature, stress da scambi gassosi, UV, luce intensa, stress minerale 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 CO₂, l'energia aggiuntiva è dissipata mediante la produzione di AOS a spese di O₂, la retro-regolazione del PS II e la fotorespirazione. Quando l'accettore fisiologico di elettroni, CO₂, 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).

E' singolare che, anche provocando la produzione di AOS, O₂ sia essenziale per evitare il danno ossidativo, in quanto la sua mancata disponibilità come accettore di elettroni nel PS I nel ciclo di Mehler-Asada impedisce il flusso lineare di elettroni, e mantiene i trasportatori di elettroni nel loro livello ridotto, che causa l'inibizione del PS II. La concentrazione di 1-2% di O₂ libera le cellule dalla fotoinibizione, non abbastanza da permettere il ripristino dell'attività fotorespiratoria, ma sufficiente per il funzionamento del ciclo acqua-acqua, anche se non alla velocità massima (Asada, 1999).

In condizioni di eccesso fotonico e nel caso in cui gli accettori di elettroni fisiologici non siano disponibili nel PS I, un ulteriore meccanismo protettivo può essere il flusso ciclico di elettroni nel PS I, il quale funziona preferibilmente quando la fornitura di elettroni dal PS II è limitata (Asada, 1999).

2.5 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), un consumo parsimonioso di acqua dal suolo (Moreno et al., 1996) 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; in condizioni di stress idrico, inoltre, le piante di olivo arrestano la crescita della chioma e riducono i processi traspirativi e fotosintetici (Xiloyannis et al., 1988; Angelopoulos et al., 1996). Questo permette una continua produzione di assimilati e il loro accumulo nei vari organi della pianta, in particolare nel sistema radicale, creando un maggiore rapporto radici/foglie rispetto alle piante irrigate (Fernández et al., 1992).

La risposta dell'olivo allo stress idrico è un processo ben documentato, ma la maggior parte degli studi a riguardo si sono focalizzati sugli aspetti fisiologici di questo fenomeno Xiloyannis et al., 1988; Angelopoulos et al., 1996; Fernández et al., 1997;

Moriana et al., 2002). Nell'olivo, periodi di stress idrico severo causano la chiusura degli stomi (Fernández et al., 1997), l'inibizione della fotosintesi (Angelopoulos et al., 1996), la riduzione degli scambi gassosi (Xiloyannis et al., 1988) e variazioni nell'accrescimento dell'apparato radicale (Fernández et al., 1992). L'olivo, inoltre, possiede la capacità di ripristinare il potenziale idrico fogliare (LWP) e la fluorescenza della clorofilla dopo il ripristino idrico, ma 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).

Lo stress idrico severo predispone il sistema fotosintetico dell'olivo alla fotoinibizione, dovuta ad un'inattivazione luce-dipendente delle reazioni fitochimiche primarie associate al PS II, che persiste anche dopo il ripristino idrico (Angelopoulos et al., 1996). I tassi assimilativi e traspirativi di questa specie diminuiscono con l'aumento dello stress idrico (Xiloyannis et al., 1988), 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) e ormonale della pianta (Busk e Pagès, Leung e Giraudat, 1998). Sebbene l'olivo sia capace di resistere ad uno stress idrico severo e prolungato (Lo Gullo e Salleo, 1988), non si ha ancora una conoscenza approfondita dei meccanismi di aggiustamento osmotico e di riparazione dei danni

causati dallo stress ossidativo indotto dal deficit idrico a livello cellulare, in particolare nel sistema delle membrane.

2.6 Obiettivo della ricerca

Una completa conoscenza dei fattori molecolari e metabolici coinvolti nelle strategie della resistenza dell'olivo allo stress idrico è fondamentale per il miglioramento colturale di questa specie, ma è attualmente carente.

Una varietà di geni sono indotti dallo stress idrico e le funzioni di molte delle proteine per le quali essi codificano sono state dedotte dall'omologia di sequenza con proteine a funzione conosciuta. I geni indotti durante lo stress idrico non hanno solo la funzione di proteggere le cellule dagli effetti del deficit idrico mediante la produzione di importanti proteine metaboliche, tra cui anche alcuni enzimi coinvolti nella risposta antiossidativa, ma anche nella regolazione di geni per la trasduzione del segnale nella risposta della pianta allo stress idrico (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997) (Fig. 10).

Molte ricerche hanno accertato il ruolo delle AOS, ed in particolare di H_2O_2 , nell'attivazione delle risposte di difesa a stress abiotici e biotici (Van Breusegem et al., 2001; Vranová et al., 2002) e l'attuale conoscenza degli effetti causati dalle AOS si è notevolmente ampliata negli anni recenti, ma i dettagli dei segnali di trasduzione del segnale che mediano le risposte di difesa rimangono ancora sconosciuti e non sono state ancora identificate tutte le proteine e le altre componenti strutturali che costituiscono la base del sistema di resistenza allo stress idrico.

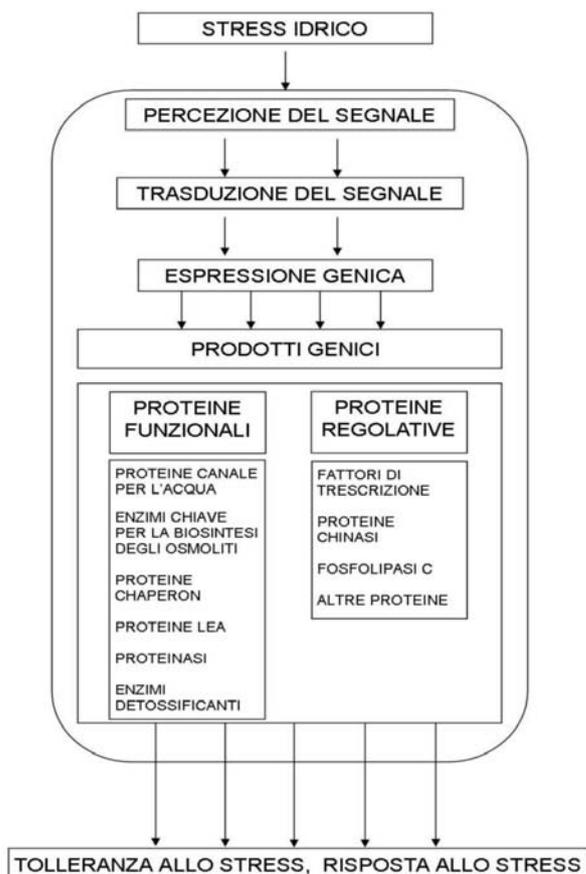


Figura 10. Funzioni dei prodotti genici inducibili dallo stress idrico nella tolleranza e nella risposta allo stress.

I prodotti genici sono classificati in due gruppi: proteine funzionali che sono coinvolte nella tolleranza allo stress idrico e nell'adattamento cellulare, e proteine regolative che potrebbero avere un ruolo nell'espressione genica e nella trasduzione del segnale durante la risposta allo stress (modificato da Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

Nelle piante superiori, molti geni coinvolti nei meccanismi di trasduzione del segnale, quali quelli che codificano per proteine LEA, enzimi coinvolti nella riparazione di proteine danneggiate, endochitinasi, proteasi, lipossigenasi, molecole segnale, heat shock proteins, calmoduline, proteine G, proteine chinasi e fattori di trascrizione, sono indotti da stimoli ambientali quali il deficit idrico (Ingram e Bartels, 1996). In condizioni di stress idrico, inoltre, l'acido abscissico, un fitormone in grado di indurre molti geni implicati nelle risposte delle piante agli stress ambientali, è sintetizzato *de novo* e questo incremento richiede la biosintesi di proteine specifiche (Busk e Pagès, 1998).

E' ormai riconosciuto, inoltre, che lo stress ossidativo risulta essere causato da molte tipologie di stress (fenomeno di overlapping genico) e che promuove l'induzione

di specifici enzimi coinvolti nella risposta antiossidativa (Scandalios, Smirnoff, 1993; Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Asada, 1999).

Alla luce di tutti questi fattori, l'obiettivo di questa ricerca è stato quello di studiare le variazioni intracellulari delle attività degli enzimi antiossidanti (SOD, CAT, APX, POD, PPO), di misurare il danno ossidativo in termini di concentrazione di MDA e di attività LOX, di investigare sui meccanismi di aggiustamento osmotico dovuti all'accumulo di PRO e di esaminare i parametri fisiologici (tasso fotosintetico, tasso traspirativo, conduttanza stomatica e concentrazione di CO₂ substomatica) in foglie e radici di piante di olivo sottoposte a condizioni ambientali caratterizzate da alte temperature e alti livelli di irraggiamento, durante un periodo di stress idrico progressivo seguito da un periodo di ripristino idrico.

La ricerca ha consentito la messa a punto di metodiche biochimiche per la misurazione delle attività enzimatiche degli enzimi antiossidanti SOD, APX, CAT, POD, PPO e LOX, e delle concentrazioni di PRO e MDA, e ha permesso il confronto dei dati ottenuti con i valori dei parametri fisiologici e fenologici che possono indicare un certo grado di resistenza dell'olivo allo stress idrico. I dati ottenuti permetteranno in futuro l'individuazione di cultivar di olivo che presentano alti valori di attività enzimatica dei suddetti enzimi antiossidanti 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.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiale vegetale e disegno della prova

Le prove sono state condotte su piante auto-radiccate di *Olea europaea* L., cv. "Coratina", di due anni d'età e con altezza di 130-150 cm. Il sito della ricerca è stato l'azienda agricola sperimentale "Pantanello", presso Metaponto (Basilicata - N 40° 24', E 16° 48'). Il periodo sperimentale è iniziato il giorno 3 luglio ed è terminato il 22 agosto 2001.

Le piante di olivo sono state disposte in campo e allevate uniformemente in vasi di 0,016 m³ riempiti con una miscela di torba, terriccio e sabbia (nella proporzione di 1:1:1), e coperti con una pellicola di plastica e con carta argentata, al fine di ridurre l'evaporazione dalla superficie del suolo e di minimizzare gli aumenti di temperatura all'interno dei vasi. Tutte le piante sono state pesate ogni sera al fine di calcolare la quantità d'acqua traspirata da ogni pianta per mezzo della differenza di peso. Il contenuto idrico del suolo è stato mantenuto ad un valore costante di circa 85% della capacità di campo integrando la quantità d'acqua persa con la traspirazione durante il giorno. Le piante sono state fertilizzate ad intervalli regolari di 25 giorni durante il periodo di crescita vegetativa con 3-4 g di fertilizzante azotato a lento rilascio (Nitrophoska Gold 15N-9P-16K + 2Ca + 7Mg).

Nel disegno sperimentale sono state previste 14 piante di controllo con disponibilità luminosa naturale e idrica ottimali (WCP), in cui la quantità d'acqua aggiunta quotidianamente durante tutto il periodo sperimentale è stata pari alla quantità traspirata durante il giorno. Le 36 piante in condizioni di stress idrico (WSP), invece, nei primi 10 giorni del periodo sperimentale, sono state sottoposte ad un graduale e controllato deficit idrico, applicando una riduzione giornaliera del 10% della

quantità d'acqua totale traspirata; nei successivi 10 giorni, l'irrigazione è stata completamente soppressa.

Dopo aver raggiunto il massimo livello di stress idrico, misurato per mezzo dei valori di LWP, le WSP sono state suddivise in due gruppi: piante ombreggiate (SHP) e piante non ombreggiate (ICP), ognuno dei quali composto da 12 piante. Le SHP sono state sottoposte ad un ripristino idrico in condizioni di semi-ombreggiamento di circa il 60% dei valori di densità di flusso fotonico fotosinteticamente attivo (PPFD) per mezzo di un telone ombreggiante di plastica, mentre le ICP sono state sottoposte ad un ripristino in condizioni di PPFD ambientale. Il periodo di ripristino idrico è durato 30 giorni (24 luglio – 22 agosto) e la quantità d'acqua aggiunta alle SHP e alle ICP durante questo periodo è stata pari alla quantità traspirata durante il giorno.

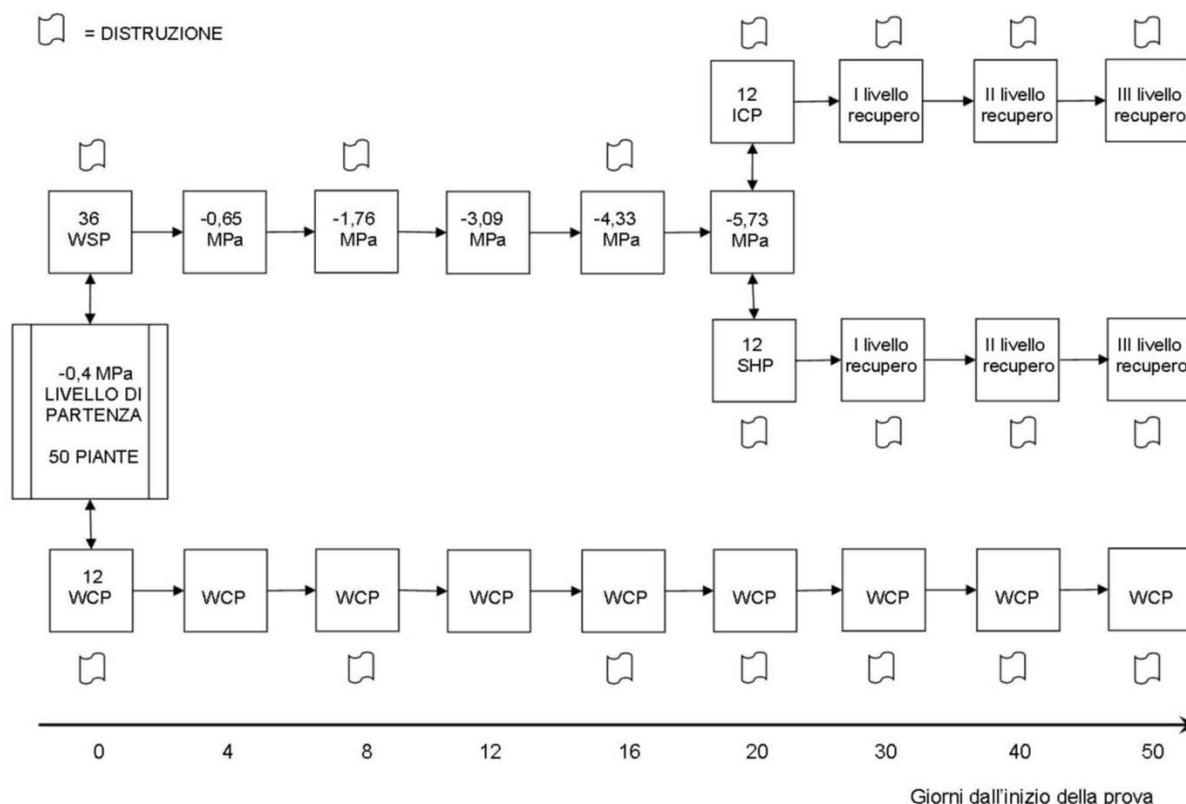


Figura 11. Articolazione della prova in campo.

Al fine di facilitare la discussione, i valori di LWP tra -0,65 e -1,76 MPa (corrispondenti a 4 e 8 giorni dall'inizio del periodo di stress idrico) sono stati definiti come stress idrico "lieve", quelli tra -3,09 MPa e -4,33 MPa (12 e 16 giorni dall'inizio) come stress idrico "moderato" e quelli a -5,73 MPa (20 giorni dall'inizio) come stress idrico "severo". Per quanto riguarda il ripristino idrico, è stato definito il decimo giorno dall'inizio del recupero idrico come "primo livello di recupero", il ventesimo come "secondo livello" e il trentesimo come "terzo livello"

3.2 Parametri ambientali e fisiologici

I parametri ambientali sono stati monitorati mediante una stazione ambientale situata in un raggio 20 m dall'area sperimentale. Sono state registrate le misurazioni delle temperature atmosferiche massime, l'umidità relativa (RH), il deficit di pressione di vapore (VPD) e la PPFD per ogni giorno del periodo sperimentale. I valori di PPFD sono stati raccolti ad intervalli di 1 min e sono stati determinati i valori integrali giornalieri.

Tre piante per trattamento (WCP, WSP, SHP e ICP) sono state scelte casualmente per misurare i valori dei parametri fisiologici a 0, 4, 8, 12, 16 e 20 giorni dall'inizio del periodo di stress e a 10, 20 e 30 giorni dall'inizio del periodo di ripristino usando tre foglie pienamente espanse selezionate da ciascuna pianta lungo il segmento mediano dei germogli di nuova crescita e marcate all'inizio dell'esperimento.

I valori di LWP sono stati misurati prima dell'alba (4.00-5.00 AM) usando una camera a pressione Sholander (PMS Instrument Co. Corvallis, OR, USA), in base alla procedura di Turner (1981). I valori di LWP sono stati misurati all'alba, nel corso del

periodo sperimentale, utilizzando tre foglie pienamente espanse della stessa età e con la stessa posizione all'interno della chioma per ogni trattamento.

Le misurazioni del tasso traspirativo, del tasso fotosintetico, della conduttanza stomatica, della concentrazione di CO₂ substomatica e della temperatura della superficie fogliare sono state determinate utilizzando un analizzatore con camera fogliare LCA-4 (ADC, UK), operante ad un tasso di flusso di 200 μmol m⁻² s⁻¹, in condizioni climatiche naturali e di massimo irraggiamento (1.00 - 2.00 PM), e sono state espresse in base all'area fogliare.

3.3 Estrazione degli enzimi e determinazione delle attività enzimatiche

Per ogni trattamento, sono stati raccolti campioni di foglie nelle prime ore del mattino (6.00-7.00 AM) a 0, 4, 8, 12, 16 e 20 giorni dall'inizio del periodo di stress e a 10, 20 e 30 giorni dall'inizio del periodo di ripristino. Ogni campione ha contenuto sette-otto foglie pienamente espanse selezionate da ciascuna pianta lungo il segmento mediano dei germogli di nuova crescita e marcate all'inizio dell'esperimento.

Le radici, raccolte alle 6.00-7.00 PM dopo la distruzione delle piante, a 0, 8, 16 e 20 giorni dall'inizio del periodo di stress idrico e a 10, 20 e 30 giorni dall'inizio del periodo di ripristino, sono state suddivise in due gruppi: "radici fini" (TR, con un diametro < 1 mm) e "radici medie" (MR, con un diametro da 1 a 5 mm). I campioni di foglie e radici sono stati lavati con acqua distillata, asciugati con carta da filtro e immediatamente congelati in azoto liquido a -80°C.

I tessuti congelati sono stati finemente sminuzzati in azoto liquido usando un mortaio e un pestello precedentemente raffreddati e la polvere ottenuta è stata immediatamente utilizzata per l'estrazione dei differenti enzimi, della MDA e della

PRO. Tutte le procedure per l'estrazione enzimatica e per la determinazione delle attività enzimatiche sono state condotte a 0°C in un bagno a ghiaccio, tranne durante alcuni passaggi in cui la temperatura sarà precisata in seguito.

Le attività di tutti gli enzimi sono state espresse come unità su mg di peso secco e i livelli di MDA e PRO rispettivamente come nmol e μmol su g di peso secco. Questa procedura è sembrata la più adeguata, dal momento che il peso secco totale è non è variato sensibilmente durante le condizioni di stress, mentre il peso fresco e la concentrazione totale di proteine solubili sono stati maggiormente variabili (dati non mostrati).

3.3.1 SOD

Un'aliquota di 1,0 g di polvere surgelata è stata aggiunta a 10 mL di etanolo assoluto freddo per 30 min, poi centrifugata a 0°C e 10.000g per 10 min, e il supernatante è stato scartato. L'estrazione in etanolo è stata ripetuta due volte. Il pellet è stato in seguito risospeso in 5,0 mL di tampone sodio-potassio fosfato (NaKPi) 100 mM freddo, pH 7,0, 0,1% (w/v) PVPP, preparato e conservato a 4°C il giorno prima e, dopo 30 min, centrifugato a 10.000g per 30 min. Il supernatante è stato recuperato e usato per il saggio di attività enzimatica.

L'attività SOD totale è stata determinata per mezzo della reazione di riduzione fotochimica delle flavine con la trasformazione di blu di tetrazolio (NBT), incolore, in formazano, di colore blu. SOD è in grado di inibire la formazione del formazano. È stato seguito il procedimento di Masia (1998). Per ogni campione esaminato, sono state preparate sei provette contenenti 10, 20, 40, 60, 80 e 500 μL dell'estratto enzimatico. La miscela di reazione conteneva riboflavina 2 μM , L-metionina 10 μM , nitro blu tetrazolio (NBT) 50 μM , KCN 20 μM , Na_2EDTA 6,6 μM , da 10 a 500 μL

dell'estratto enzimatico, e NaKP_i 65 μM , pH 7,8, per ottenere un volume finale di 3,0 mL. L'attività SOD è stata determinata misurando la capacità dell'estratto enzimatico di inibire la riduzione fotochimica di NBT a blu formazano. Le provette di vetro sono state poste in bagno termostatico a 25°C per 10 min in assenza di luce diretta. La reazione ha avuto inizio con l'esposizione della miscela a quattro lampadine fluorescenti a luce bianca (15 WTS pre-riscaldate, 6500°K) in un contenitore (80 x 50 x 50 cm) con pareti ricoperte di carta argentata. I bianchi sono stati ottenuti con duplicati non illuminati. Il colore blu sviluppato nella reazione è stato misurato per via spettrofotometrica a 560 nm e i campioni corrispondenti non esposti sono stati usati come bianco. Il volume del campione che ha causato il 50% di inibizione nella comparsa del colore è stato considerato come un'unità di attività SOD.

3.3.2 APX

Un'aliquota di 1,0 g di polvere surgelata è stata aggiunta a 10 mL di etanolo assoluto freddo a 0°C per 30 min, centrifugata a 0°C e 10.000g per 10 min a 0°C, e il supernatante è stato scartato. L'estrazione in etanolo è stata ripetuta due volte. Il pellet è stato risospeso in 10,0 mL di tampone potassio fosfato (KP_i) 50 mM, pH 7,8, EDTA 100 μM , AsA 500 μM , PVPP 0,1% (w/v), preparato e conservato a 4°C il giorno prima e, dopo 30 min, centrifugato a 15.000g per 30 min. AsA è stato aggiunto al mezzo di estrazione per evitare l'inattivazione dell'enzima stesso durante l'estrazione ed il saggio. Il supernatante è stato recuperato, desalinizzato su una colonna Sephadex™ G-25M pre-equilibrata con il medium di macinazione che ha incluso AsA 100 μM , e usato per il saggio di attività enzimatica. La desalinizzazione è essenziale per l'eliminazione di molecole a basso peso molecolare, quali i radicali fenossilici e aminossilici generati da POD e H_2O_2 , che ossidano AsA.

L'attività APX è stata rilevata registrando per via spettrofotometrica la diminuzione del contenuto in AsA a 290 nm, in base al procedimento di Ushimaru et al. (1997). Un'aliquota di 1 mL di estratto enzimatico è stata trattata con 100 μ L di H₂O₂ 10 mM e 100 μ L di idrossilammina 80 mM per 5 min a temperatura ambiente. L'idrossilammina è un inibitore selettivo della APX, così l'attività APX "genuina" è stata stimata escludendo il contributo dell'attività POD nell'estratto all'ossidazione di AsA. La stessa procedura, ma con 200 μ L di acqua distillata, è stata utilizzata per determinare l'attività totale (APX + GPX) in una seconda aliquota di 1,0 g dello stesso estratto. La miscela di reazione ha previsto KP_i 50 mM, pH 7,0, AsA 500 μ M, EDTA 100 μ M, H₂O₂ 100 μ M e 100 μ L dell'estratto enzimatico, in un volume finale di 3,0 mL. La reazione ha avuto inizio con l'aggiunta di H₂O₂. Un'unità di attività APX è stata definita come la quantità di enzima che ha ossidato 1 μ mol di AsA per min a temperatura ambiente. Per i calcoli è stato utilizzato un coefficiente di assorbimento di 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹.

3.3.3 CAT

Un'aliquota di 1,0 g di polvere surgelata è stata aggiunta a 10 mL di etanolo assoluto freddo per 30 min e centrifugata a 0°C e 10.000g per 10 min, e il supernatante è stato scartato. L'estrazione in etanolo è stata ripetuta tre volte. Il pellet è stato in seguito risospeso in 10,0 mL di NaKP_i 10 mM freddo, pH 7,0, PVPP 0,1% (w/v), preparato e conservato a 4°C il giorno prima e, dopo 30 min, centrifugato a 15.000g per 15 min. Il supernatante è stato recuperato e utilizzato per il saggio di attività enzimatica.

L'attività CAT è stata misurata in base al procedimento di Aebi (1984). L'estratto enzimatico è stato posto in un bagno termostatico a 20°C per 5 min. L'attività è stata misurata in una miscela di reazione (3,0 mL di volume finale) composta da H₂O₂ 30 mM in NaKPi 30 mM, pH 7,0, e 2,0 mL di estratto enzimatico. I campioni senza H₂O₂ sono stati utilizzati come bianco.

La decomposizione di H₂O₂ è stata seguita per via spettrofotometrica mediante la diminuzione di A₂₄₀. Il principio del metodo di determinazione si basa sul fatto che in U.V., l'acqua mostra un continuo incremento dell'assorbanza al diminuire della lunghezza d'onda. La decomposizione di H₂O₂ in seguito all'azione dell'enzima può essere così seguita misurando la diminuzione in A₂₄₀. Un'unità di attività CAT è stata definita come la quantità di enzima che ha decomposto 1 μmol di H₂O₂ al minuto, in base al procedimento di Havir e McHale (1987). La cinetica della catalasi non obbedisce ai normali parametri. Non è possibile saturare l'enzima con il substrato perché avviene una rapida inattivazione di CAT a concentrazioni di H₂O₂ maggiori di 0,1 M. Le misurazioni dell'attività enzimatica in condizioni di saturazione del substrato o la determinazione della K_s è quindi impossibile. La decomposizione enzimatica di H₂O₂ avviene secondo una reazione di primo ordine, la cui velocità è sempre proporzionale alla concentrazione di H₂O₂. Per evitare una rapida diminuzione della velocità iniziale della reazione, il saggio deve essere condotto usando concentrazioni di H₂O₂ relativamente basse (non maggiori di 0,05 M).

3.3.4 *POD, IAAox, PPO*

Un'aliquota di 1,0 g di polvere surgelata è stata aggiunta a 10,0 mL di NaP_i 200 mM freddo, pH 7,0, Na₂EDTA 5 mM, PVPP 0,1% (w/v), ditioneitolato (DTT) 3 mM, β-mercaptoetanolo 15 mM, sodio metabisolfito 10 mM, preparata e conservata a 4°C il giorno prima e, dopo 30 min, centrifugata a 15.000g per 30 min. Il supernatante è stato recuperato e utilizzato per il saggio di attività enzimatica.

L'attività POD è stata misurata in base al metodo di Chance e Maehly (1955). La miscela di reazione (3,0 mL di volume finale) conteneva 50 μL di guaiacolo 10 mM, 2,9 mL di NaP_i 10 mM, pH 7,0, 10 μL di H₂O₂ 40 mM. 40 μL di estratto enzimatico crudo sono stati aggiunti per avviare la reazione. L'attività della miscela è stata misurata per via spettrofotometrica a 470 nm dopo aver posto la miscela in bagno termostatico a 20°C per 10 min.

L'attività indolacetato-ossidativa (IAAox), dovuta all'attività POD, è stata misurata per via spettrofotometrica a 247 nm e 254 nm, punti di massimo assorbimento per il 3-metilenossindolo, dopo un'incubazione a 30°C per 30 min, usando una miscela di reazione contenente: 5,0 mL di MnCl₂ 10 mM, 5,0 mL di acido *p*-cumarico 1 mM, 5,0 mL di NaP_i 500 mM, pH 7,0, e 2,5 mL di IAA 1 mM (Rubery, 1972; Ricard e Job, 1974). La miscela è stata portata a pH 4,5 mediante l'aggiunta di H₃PO₄ ed è stata aggiunta acqua distillata per raggiungere un volume finale di 50 mL. 30 μL di sodio ditionite 10 mM sono stati aggiunti a 3,0 mL della miscela al fine di inibire l'attività PPO e la reazione ha avuto inizio con l'aggiunta di 30 μL di estratto enzimatico.

L'attività PPO è stata determinata in base al metodo di Cañal et al. (1988) con alcune modifiche. La miscela di reazione (3,0 mL di volume finale) ha previsto 0,1 mL di pirogallolo 25 mM, 2,8 mL di NaP_i 100 mM, pH 7,0 e 100 μL dell'estratto

enzimatico. La temperatura della miscela è stata mantenuta a 30°C per 30 min e l'attività è stata letta a 420 nm.

L'attività totale per questi tre enzimi è stata espressa come aumento di assorbanza al minuto.

3.3.5 LOX

L'attività LOX è stata determinata seguendo il metodo di Williams et al. (2000) con alcune modifiche. Un'aliquota di 1,0 g di polvere surgelata è stata sospesa in 10 mL di acetone a -20°C per 30 min, in seguito centrifugata a 10.000g per 15 min e il supernatante è stato scartato. L'estrazione in etanolo è stata ripetuta tre volte. Il pellet è stato poi risospeso per 1 h in 10,0 mL di HEPES 50 mM, pH 7,2, contenente DTT 3 mM, MgCl 10 mM e EDTA 1 mM, e poi centrifugato a 10.000g per 10 min. Il supernatante risultante è stato desalinizzato su una colonna SephadexTM G-25M e usato per il saggio di attività enzimatica.

L'attività di idroperossidazione del linoleato è stata determinata per via spettrofotometrica a 25°C monitorando l'incremento di A_{234} , causato dalla conversione del linoleato nel corrispondente idroperossido. L'attività LOX è stata misurata in una miscela reagente di 120 μ L di linoleato 10 mM, 1,25 mL di NaP_i 100 mM, pH 6,5, Tween 80 0,1% (w/v) e 25 μ L di estratto enzimatico. Un'unità di enzima è stata definita come la quantità che ha generato 1 μ mol di diene coniugato al minuto, alla temperatura di 25°C, in base al procedimento di Axelrod (1981).

3. 4 **Contenuto in malondialdeide e prolina**

3. 4. 1 **MDA**

Il contenuto in MDA è stato misurato seguendo il metodo di Du e Bramlage (1992). Dal momento che la MDA reagisce con molti composti derivati che assorbono fortemente nel visibile e nell'U.V., il metodo più utilizzato per la sua determinazione prevede la reazione con acido tiobarbiturico (TBA) e la conseguente formazione di due molecole d'acqua e di un complesso MDA-TBA di colore rosa, che presenta un picco di massimo assorbimento a 532-535 nm.

Un'aliquota di 0,5 g di polvere surgelata è stata aggiunta a 5,0 mL di acido tricloroacetico (TCA) 0,1% (w/v) e poi centrifugata a 10.000g per 5 min. 1 mL di supernatante è stato aggiunto a 4,0 mL di acido tiobarbiturico (TBA) 0,5% (w/v) in TCA 20% (w/v). La miscela è stata mantenuta a 100°C per 30 min e poi velocemente raffreddata in un bagno a ghiaccio.

Dopo la centrifugazione a 10.000g per 10 min, sono state registrate A_{532} , A_{600} e A_{440} del supernatante. In seguito è stato sottratto il valore per l'assorbanza non specifica a 600 nm ed è stata utilizzata una curva standard di saccarosio (da 2,5 a 10,0 $\mu\text{mol mL}^{-1}$) per eliminare l'effetto dell'interferenza degli zuccheri solubili nei campioni, leggendo A_{532} e A_{440} . Il contenuto in MDA è stato calcolato usando il suo coefficiente di assorbimento di $157 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ed espresso come nmol MDA g^{-1} (DW).

3. 4. 2 **PRO**

La concentrazione di prolina libera nelle foglie e nelle radici è stata determinata seguendo il metodo di Bates et al. (1973) modificato. 5,0 mL di acido sulfosalicilico al 3% (w/v) sono stati aggiunti ad un'aliquota di 0,5 g di polvere, e poi bolliti in bagnomaria a 100°C per 30 min in provette di vetro coperte alla sommità.

La miscela è stata raffreddata a temperatura ambiente e centrifugata a 2000g per 5 min. 200 µL dell'estratto sono stati incubati con 400 µL di acqua distillata e 2,0 mL della miscela reagente (30 mL di acido acetico glaciale, 20 mL di acqua distillata e 0,5 g di ninidrina) a 100°C per 60 min. Dopo aver raffreddato la miscela, sono stati aggiunti 6,0 mL di toluene, è stato separato il cromoforo che contiene il toluene ed è stata letta A_{520} per via spettrofotometrica, usando toluene come bianco. La concentrazione di PRO è stata calcolata usando L-prolina per disegnare la curva standard.

3. 5 **Analisi statistica**

I valori dei parametri fisiologici sono stati rappresentati come medie di nove misurazioni (\pm SE) da tre piante selezionate (tre misurazioni per pianta), mentre i valori di attività enzimatica sono stati espressi come medie di nove misurazioni (\pm SE) da tre piante aventi un livello simile di stress idrico (un estratto da ciascuna pianta e tre repliche per estratto).

L'analisi statistica è stata effettuata usando ANOVA. Le differenze significative dai valori delle WCP e delle WSP sono state determinate al valore di $P \leq 0,05$, in base al test a campo multiplo di variabilità di Duncan. Per ulteriori dettagli si rimanda alle didascalie delle tabelle.

4. RISULTATI

4.1 Condizioni ambientali

Il valore più alto tra le temperature massime è stato 37,5°C (29 luglio), mentre la media di tutti i valori di temperatura massima giornaliera è stata 32,6°C; il valore massimo di RH (44,4%) si è verificato il 22 agosto, con una media di 29,2%; il range dei valori di VPD è stato compreso tra 2,2 (5 luglio) e 5,0 KPa (11 agosto), con un valore medio di 3,6 KPa; i livelli di PPFD hanno mostrato un leggero decremento durante tutto il periodo sperimentale, soprattutto negli ultimi giorni della prova (Fig. 12).

4.2 Parametri fisiologici

Il valore medio di LWP nelle CP è stato di -0,35 MPa, mentre quello delle WSP è diminuito durante tutto il periodo dello stress idrico, raggiungendo un minimo di -5,73 MPa dopo 20 giorni di stress. Durante le misurazioni, le temperature della superficie fogliare sono variate tra 31 e 39°C (Fig. 13).

In seguito al ripristino idrico, i LWP delle WSP sono aumentati durante l'intero periodo di recupero, partendo da un valore di -5,73 MPa e raggiungendo successivamente un massimo di -0,36 MPa nel terzo livello di recupero. L'andamento dei valori di LWP nelle ICP è stato simile a quello delle SHP, mostrando un incremento di LWP da -5,84 a -0,39 MPa durante tutto il periodo di ripristino. Nel primo livello di recupero, sia nelle SHP che nelle ICP, il LWP si è ripristinato quasi completamente e ha raggiunto valori simili a quelli delle WCP (Fig. 14).

Le WSP hanno mostrato una diminuzione dei valori di fotosintesi netta da 15,10 a 0,16 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, rispettivamente al minimo e massimo livello di stress idrico. La riduzione della fotosintesi è stata graduale durante un lieve livello di stress idrico, mentre ha mostrato un rapido declino nelle piante con un LWP minore di -1,76 MPa (Figg. 15A e 16A).

Le SHP hanno mostrato un aumento di fotosintesi netta da 0,16 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, all'inizio del periodo di ripristino idrico a 15,04 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, nel terzo livello di recupero, valori comparabili a quelli delle ICP, con la differenza che le SHP hanno mostrato un recupero di fotosintesi netta più veloce di quello delle ICP: nel primo livello di recupero, le SHP hanno mostrato tassi di fotosintesi netta simili a quelli delle WCP, mentre i valori delle ICP erano ancora significativamente bassi rispetto a quelli delle WCP. Dopo 20 giorni di ripristino anche le ICP hanno recuperato quasi completamente la funzionalità fotosintetica (Fig. 17A).

I valori del tasso traspirativo e della conduttanza stomatica della WSP hanno seguito un andamento parallelo e hanno mostrato una rapida diminuzione rispettivamente del 43% e del 58% rispetto ai valori delle WCP, già al primo livello di stress (-0,65 MPa). In seguito, i valori di traspirazione sono gradualmente diminuiti fino a 0,80 $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ad un livello di stress di -5,73 MPa, mentre i valori di conduttanza stomatica hanno mostrato una fase di plateau prima di raggiungere il valore più basso (Figg. 15B-C e 16B-C).

Durante il ripristino idrico, gli andamenti del tasso traspirativo delle SHP e delle ICP sono stati abbastanza differenti. Le ICP hanno recuperato l'efficienza traspirativa più velocemente delle SHP: al primo livello di recupero, il tasso traspirativo nelle ICP è stato il 79% di quello delle WCP, mentre il tasso di traspirazione nelle SHP è stato il 41% di quello delle WCP; nel secondo livello di recupero, i valori di traspirazione delle SHP erano ancora più bassi di quelli delle ICP, e le SHP hanno recuperato

completamente la funzionalità traspirativa solo dopo 30 giorni dall'inizio del periodo di ripristino idrico (Fig. 17B).

I valori della conduttanza stomatica nelle SHP e nelle ICP hanno seguito un andamento parallelo anche durante il ripristino idrico, aumentando nel primo e secondo livello di recupero, e differendo solo nel terzo, in cui le ICP hanno mostrato una lieve diminuzione rispetto alle SHP. In particolare, nelle SHP, i valori di conduttanza stomatica sono aumentati gradualmente da $10 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, all'inizio del recupero, a $180 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, nel terzo livello di recupero, mentre i valori di conduttanza stomatica iniziale e finale nelle ICP sono stati rispettivamente 10 e $160 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 17C).

La concentrazione substomatica di CO_2 è inizialmente aumentata in base alla severità dello stress idrico, raggiungendo una fase di plateau (circa $310 \mu\text{L L}^{-1}$) e successivamente è lievemente diminuita fino al valore di $236,6 \mu\text{L L}^{-1}$, in condizioni di stress idrico severo (Figg. 15D e 16D)

Sia nelle SHP che nelle ICP, la concentrazione substomatica di CO_2 è diminuita durante tutto il periodo di ripristino idrico, mostrando un recupero più veloce nelle ICP rispetto alle SHP: nel primo livello di recupero, le ICP hanno presentato un livello di CO_2 di $201,5 \mu\text{L L}^{-1}$, mentre le SHP un valore di $221,3 \mu\text{L L}^{-1}$ (rispettivamente 109% e 119% dei valori delle WCP) (Fig. 17D).

Nelle WCP, il tasso di fotosintesi netta, il tasso traspirativo, la conduttanza stomatica e la concentrazione substomatica di CO_2 sono rimasti relativamente stabili.

4.3 Attività degli enzimi antiossidanti

SOD e APX, due enzimi delle reazioni di perossidazione di Mehler, giocano un importante ruolo nella protezione delle cellule viventi contro la tossicità e la mutagenicità rispettivamente di $\cdot\text{O}_2^-$ e H_2O_2 .

I valori di attività SOD sono aumentati in maniera significativa in condizioni di stress idrico in tutti i tessuti delle WSP (195%, 389% e 251% dei valori delle WCP, rispettivamente in foglie, TR e MR, ad un livello di stress idrico severo) (Tabb. da I a III).

Nelle SHP, l'attività SOD è partita da alti valori all'inizio del periodo di recupero e in seguito è diminuita, raggiungendo i livelli delle WCP alla fine del periodo sperimentale; nelle ICP, l'attività SOD ha mostrato un andamento simile, anche se le foglie hanno mostrato avere valori più alti di quelli delle SHP in tutte le date di campionamento (Tabb. da VII a IX).

A stress idrici severi, le foglie delle WSP hanno presentato un'attività APX circa cinque volte maggiore di quella delle foglie delle WCP, mentre le TR e le MR hanno mostrato incrementi meno marcati (155% e 146% dei valori delle WCP, rispettivamente nelle TR e nelle MR).

I valori di attività APX sono diminuiti in tutti i tessuti delle SHP durante il ripristino idrico, mentre nelle ICP la diminuzione ha avuto inizio dal secondo livello di recupero. Le ICP hanno mantenuto alti valori di attività APX nel primo livello di recupero, se comparate con le SHP nelle stesse condizioni (196%, 173% e 141% rispettivamente nelle foglie, nelle TR e nelle MR). Solo nelle foglie, l'attività APX nelle ICP si è mantenuta più alta rispetto a quella della SHP anche al secondo livello di stress (9,21 e 4,26 unità mg^{-1} , rispettivamente nelle ICP e nelle SHP).

Le isoforme CAT e POD sono coinvolte nella detossificazione di H_2O_2 al di fuori dei plastidi. L'attività CAT ha mostrato un marcato incremento nelle foglie e nelle TR durante il periodo di stress idrico, raggiungendo alti livelli a gradi di stress idrico moderato (175% del valore delle WCP nelle foglie e 218% nelle TR, a -4,33 MPa) e raggiungendo successivamente una fase di plateau. L'attività CAT non è cambiata significativamente nelle MR.

L'attività CAT è variata in relazione al livello di ripristino idrico, sia nelle SHP che nelle ICP: in particolare, nel primo livello di recupero, l'attività CAT sia nelle foglie che nelle radici delle SHP e delle ICP è leggermente aumentato; successivamente, l'attività CAT ha cominciato a diminuire a partire dal secondo livello di recupero in tutti i tessuti. La diminuzione nelle SHP è stata più lenta di quella nelle ICP e, al terzo livello di recupero, le attività CAT nelle SHP erano ancora più alte di quelle nelle ICP (156%, 114% e 119% dei valori registrati rispettivamente nelle foglie, nelle TR e nelle MR delle ICP).

I valori delle attività POD e IAAox, quest'ultima anch'essa dipendente dall'azione di POD, hanno mostrato un andamento parallelo in tutti i tessuti studiati. Nelle foglie delle WSP, entrambe le attività hanno subito un graduale incremento durante i primi giorni del periodo di stress e, nelle foglie e nelle MR, un lieve declino solo in condizioni di stress idrico severo. L'attività POD dopo 16 giorni di deficit idrico (a valori di LWP di -4,33 MPa) è stata il 201% e il 190% dei valori delle WCP, rispettivamente nelle TR e nelle MR. L'incremento dell'attività POD nelle foglie dopo 16 giorni è stato invece meno consistente (169% del valore delle WCP). L'attività IAAox nelle foglie dopo 16 giorni di stress è stata il 153%, il 196% e il 239% dei valori delle WCP, rispettivamente nelle foglie, nelle TR e nelle MR.

In tutti i tessuti delle SHP e delle ICP, le attività POD e IAAox hanno mostrato una forte diminuzione a partire dal primo livello di ripristino idrico (99%, 106% e 93%

dei valori delle WCP per l'attività POD, e 119%, 86% e 129% dei valori delle WCP per l'attività IAAox, rispettivamente in foglie, TR e MR delle SHP). Gli andamenti delle attività POD e IAAox nelle foglie e nelle TR delle ICP nel terzo livello di recupero sono stati diversi da quelli delle SHP, mostrando un incremento rispetto ai valori del secondo livello di recupero.

L'attività PPO nelle WSP è stata inversamente proporzionale al livello di stress idrico in tutti i tessuti studiati: le TR e le MR hanno mostrato una marcata diminuzione di attività PPO a cominciare da valori di LWP di -1,76 MPa fino a -5,73 MPa (rispettivamente 21% e 45% dei valori delle WCP, ad un livello di stress idrico severo), mentre nelle foglie l'attività è leggermente diminuita (61% del valore delle WCP). PPO, quindi, è stato l'unico enzima chiaramente inibito dal deficit idrico.

I valori delle attività PPO sono stati direttamente proporzionali al grado di ripristino idrico in tutti i tessuti studiati. Sia le SHP che le ICP hanno mostrato un marcato incremento di attività PPO durante il periodo di recupero, ma, nel terzo livello di recupero, nelle SHP si è verificato un marcato aumento di attività enzimatica, mentre le ICP hanno mantenuto valori più bassi di quelli delle WCP (116%, 112% e 110% dei valori delle WCP, rispettivamente in foglie, TR e MR delle SHP, e 65%, 70% e 61% dei valori delle WCP, rispettivamente in foglie, TR e MR delle ICP).

Nelle WCP, tutte le attività degli enzimi sopra descritti non hanno subito variazioni significative durante il periodo ad eccezione di PPO nelle MR che ha raddoppiato la sua attività dopo 8 giorni, seguito da una fase di plateau; le attività degli enzimi descritti sopra non hanno, inoltre, mostrato marcate variazioni durante il periodo di ripristino idrico nelle WCP.

4.4 Livelli di MDA e PRO e attività LOX

I livelli di MDA sono stati influenzati dal deficit idrico in tutti i tessuti esaminati, mostrando un leggero incremento a livelli di stress idrico lieve e aumentando velocemente a livelli di stress maggiori, soprattutto nelle foglie, in cui si è verificato un incremento del 328% rispetto al valore delle WCP. Incrementi significativi dei livelli di MDA di circa tre volte rispetto a quelli delle WCP sono stati evidenziati durante il massimo livello di stress idrico nelle TR e nelle MR (Tabb. da IV a VI).

I livelli di MDA sono diminuiti in seguito al livello di ripristino idrico in tutti i tessuti esaminati, sia nelle SHP che nelle ICP. Nel primo livello di recupero, i livelli di MDA nelle foglie nelle TR e nelle MR delle SHP sono stati rispettivamente il 75%, il 74% e il 68% di quelli presenti nelle ICP; differenze meno marcate tra SHP e ICP sono state riscontrate nei tessuti raccolti a partire dal secondo livello di recupero. Le foglie delle SHP, al secondo e terzo livello di recupero, hanno dimostrato possedere livelli di MDA più bassi di quelli delle WCP (rispettivamente 83% e 68%) (Tab. X).

La concentrazione di PRO è aumentata significativamente in relazione alla severità dello stress idrico, in particolare nelle foglie e nelle MR (rispettivamente 245% e 193% dei valori delle WCP, al massimo livello di stress), mostrando un rapido incremento in corrispondenza di LWP minori di -3,09 MPa. L'incremento nelle TR è stato invece meno marcato (162% del valore delle WCP ad un livello di stress idrico severo).

L'attività LOX è variata in relazione al livello di stress idrico sia nelle foglie che nelle radici. Nelle WSP, uno stress idrico moderato ha causato un marcato incremento di attività LOX (317% del valore delle WCP nelle foglie, 151% nelle TR e 157% nelle MR, a -4,33 MPa), che poi è aumentata leggermente fino al massimo livello di stress. In particolare, i tessuti fogliari sono stati i più influenzati dal deficit

idrico, mostrando un aumento di attività LOX tre volte maggiore rispetto a quella delle WCP a livelli di stress idrico severi. Le attività LOX al massimo livello di stress nelle TR e nelle MR sono state rispettivamente il 165% e il 159% dei valori delle WCP.

Il progressivo ripristino idrico ha determinato una diminuzione dell'attività LOX sia nelle SHP che nelle ICP. La diminuzione di attività LOX è stata più veloce nelle SHP rispetto alle ICP: al primo livello di recupero, i valori di attività LOX nelle SHP sono stati comparabili a quelli delle WCP (rispettivamente 120%, 114% e 119% nelle foglie, nelle TR e nelle MR), mentre i valori presenti nelle ICP nello stesso livello di recupero sono stati maggiori di quelli delle WCP (rispettivamente 171%, 145% e 137% nelle foglie, nelle TR e nelle MR).

Le WCP non hanno mostrato variazioni significative dei livelli di PRO e MDA e dell'attività LOX durante il periodo sperimentale.

4.5 Figure e tabelle

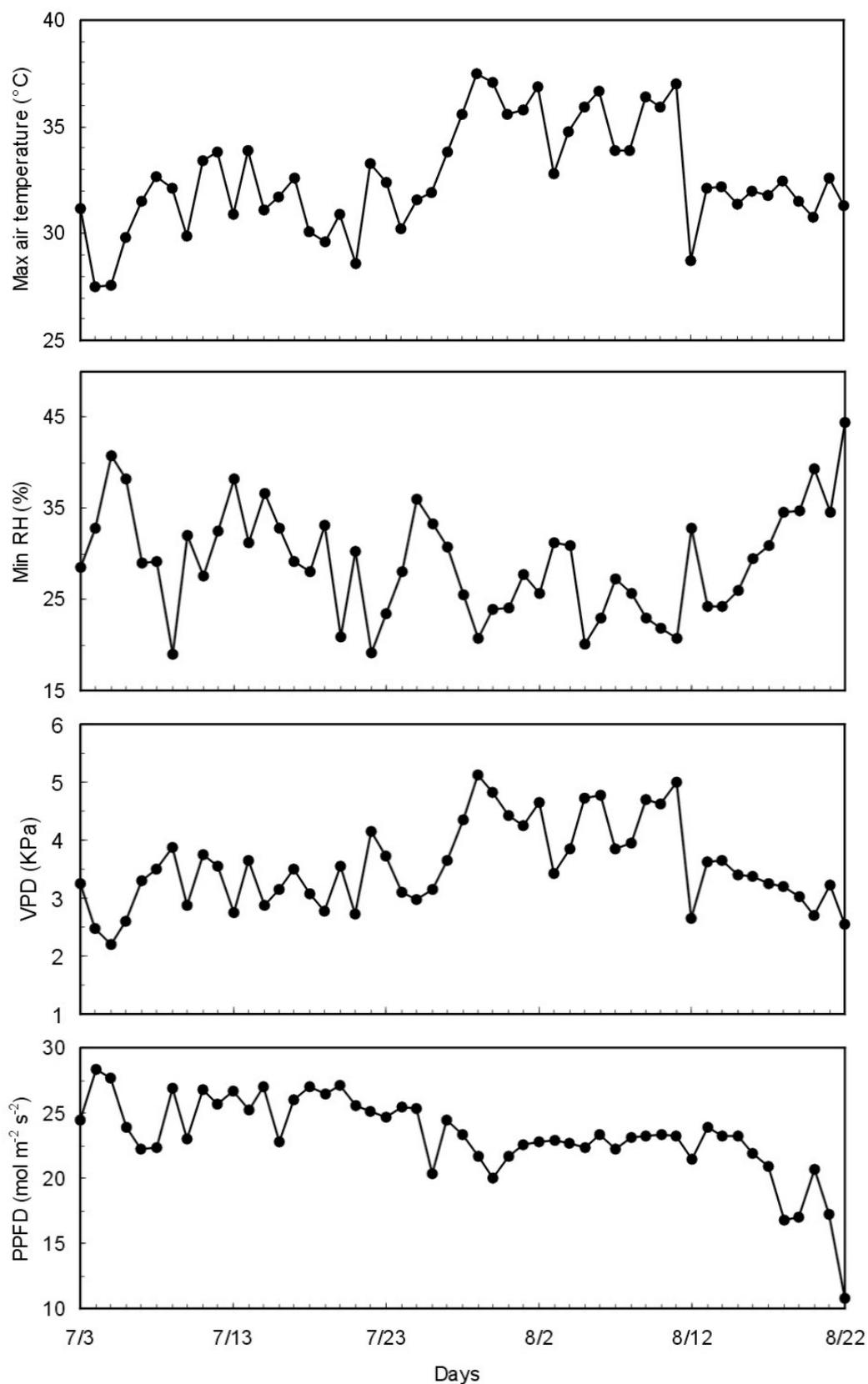


Figura 12. Temperature massime, umidità relativa (RH), deficit di pressione di vapore (VPD) e integrali giornalieri densità fotosintetica di flusso fotonico (PPFD) registrati durante il periodo sperimentale.

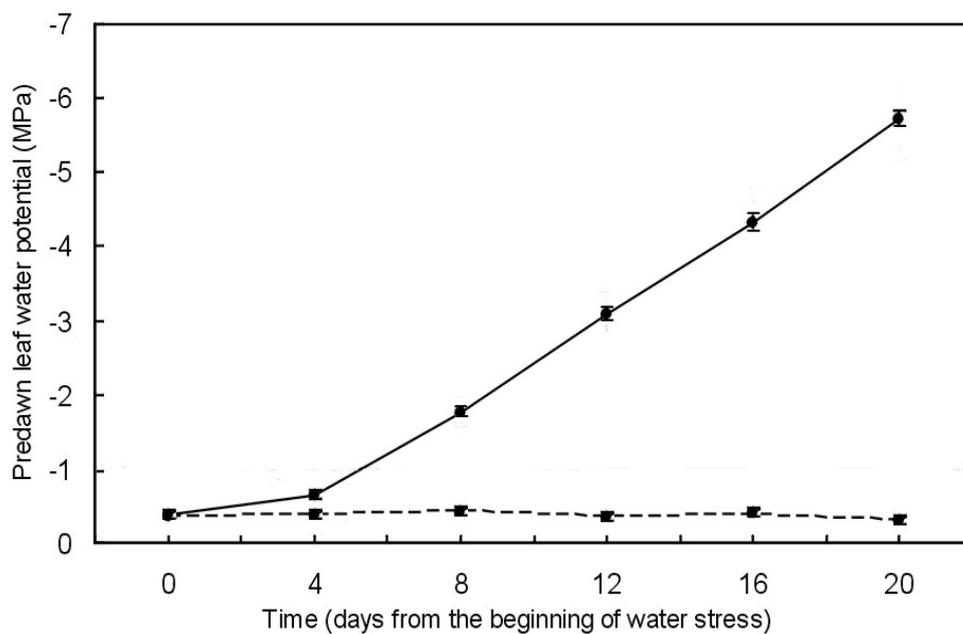


Figura 13. Andamento del potenziale idrico fogliare in piante sottoposte a stress idrico (linea continua) e irrigate (linea tratteggiata), misurato alle ore 4.00-5.00 AM, a 0, 4, 8, 12, 16 e 20 giorni dall'inizio del periodo di stress. Ogni punto rappresenta la media di nove misurazioni (\pm SE) da tre piante.

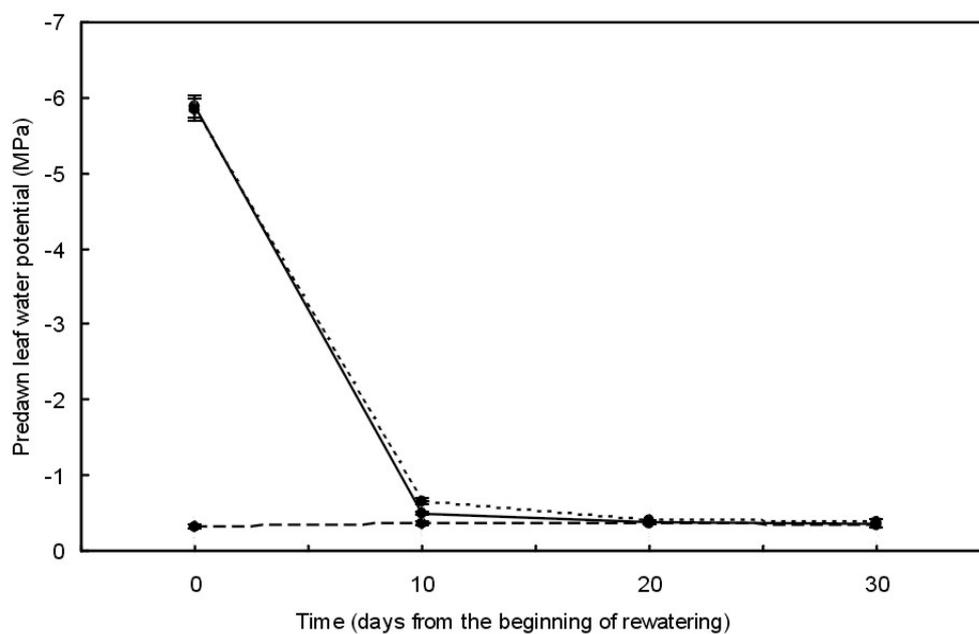
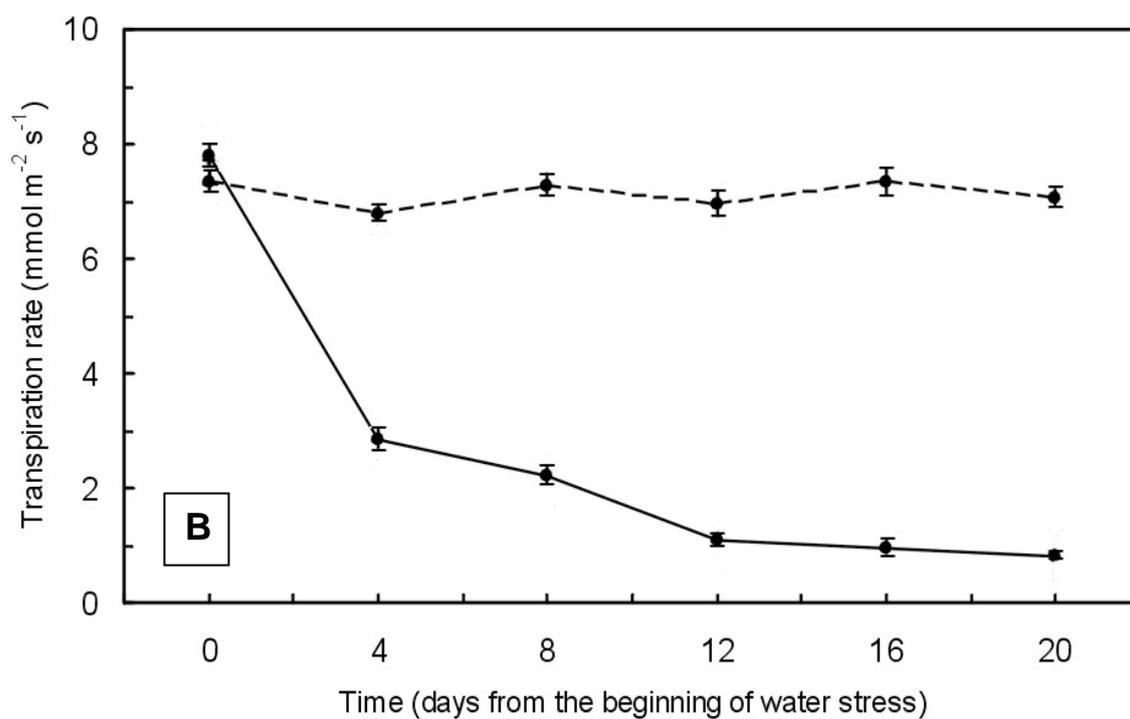
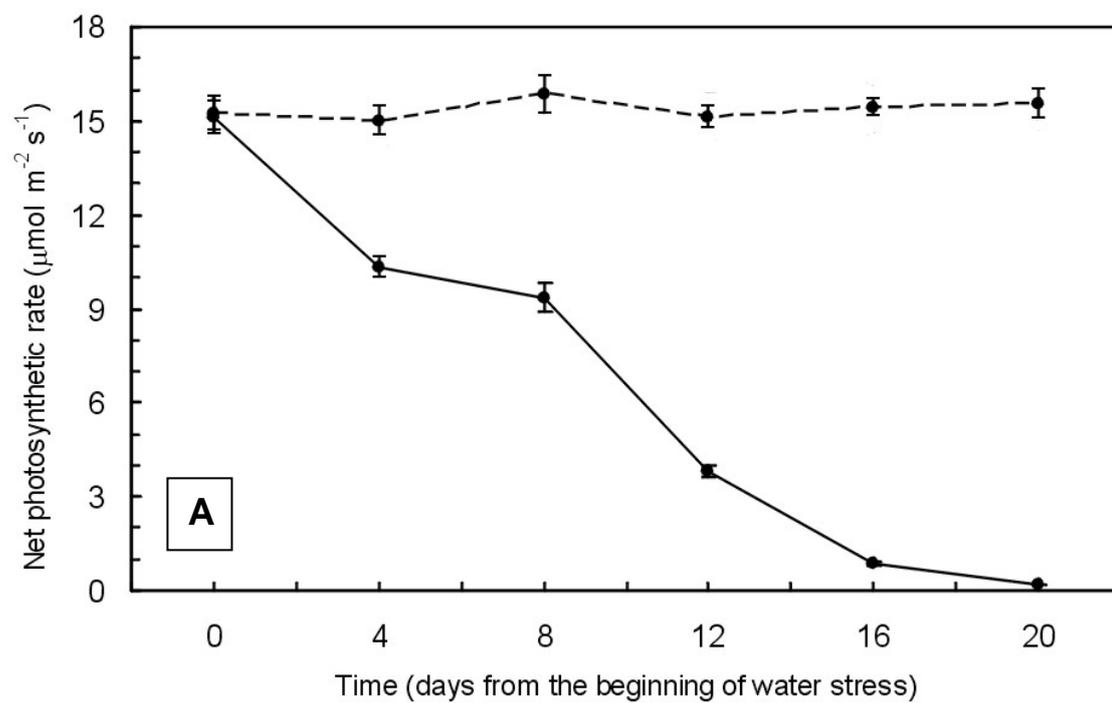


Figura 14. Andamento del potenziale idrico fogliare in piante ombreggiate (linea continua), non ombreggiate (linea punteggiata) e di controllo (linea tratteggiata), misurato alle ore 4.00-5.00 AM, a 10, 20 e 30 giorni dall'inizio del periodo di ripristino idrico. Ogni punto rappresenta la media di nove misurazioni (\pm SE) da tre piante.



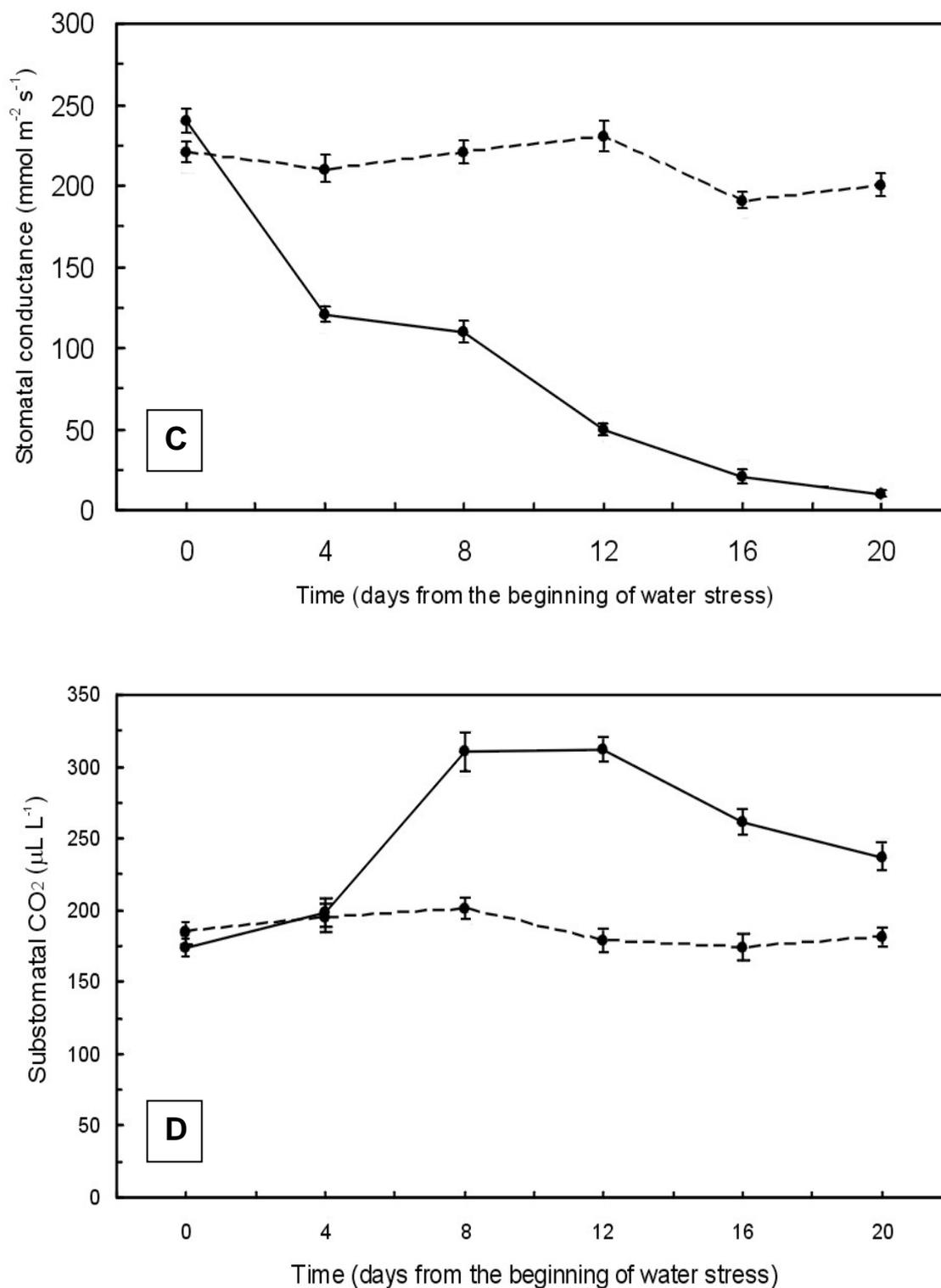
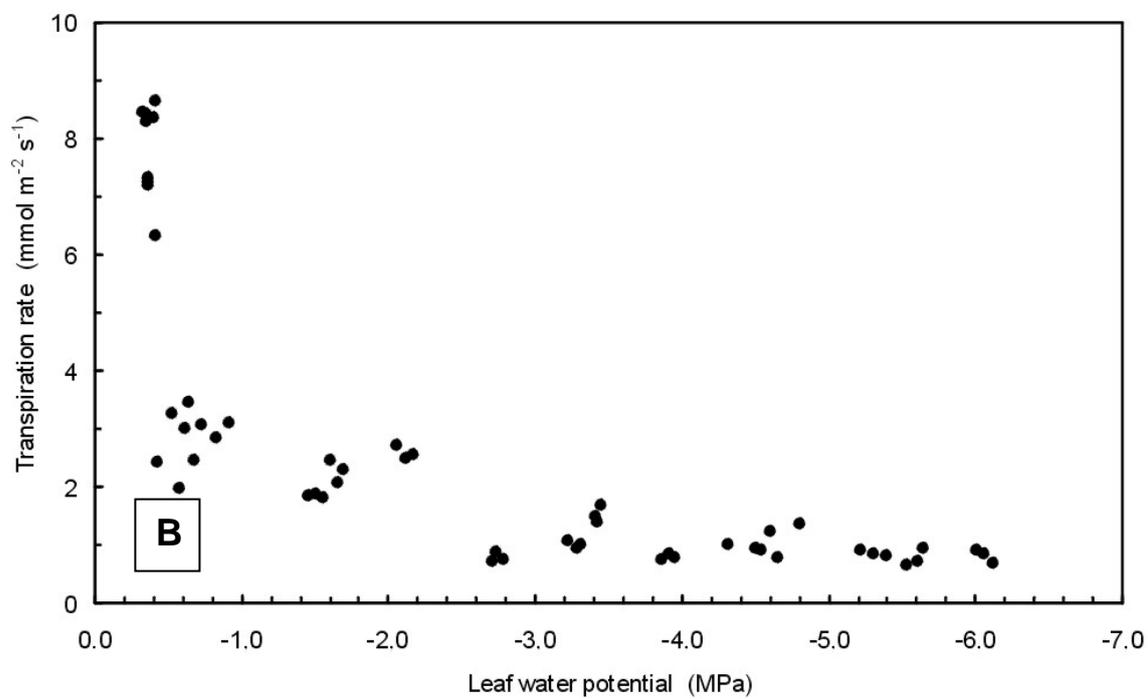
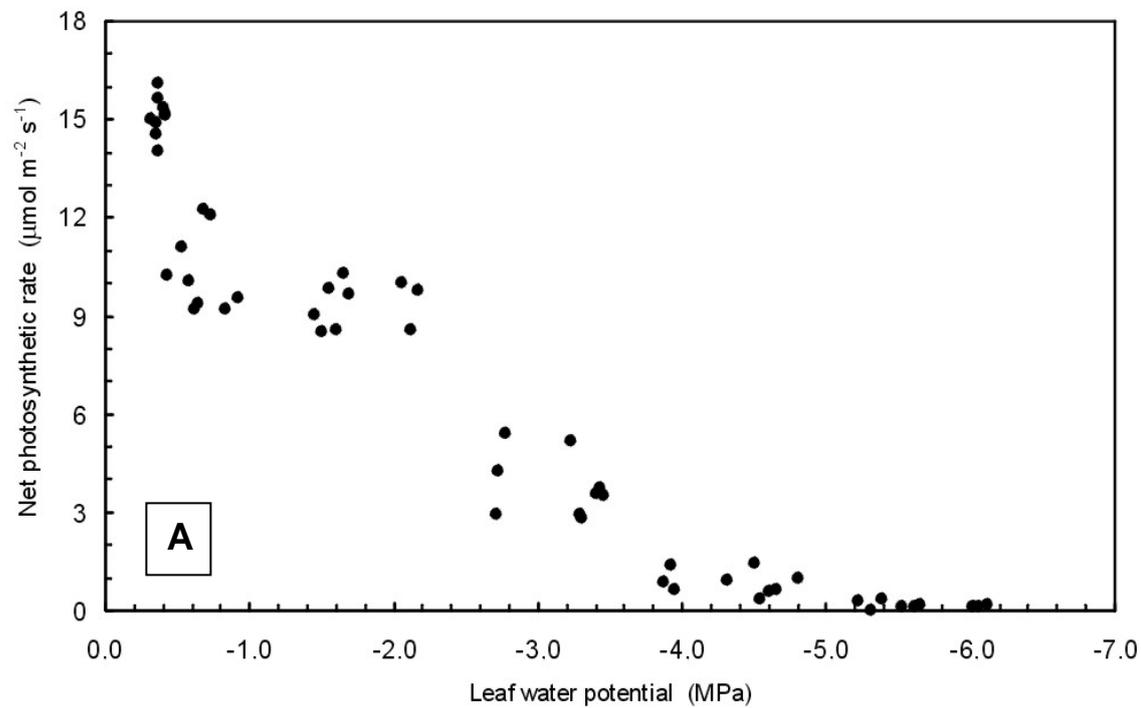


Figura 15. Andamenti di fotosintesi netta (A), traspirazione (B), conduttanza stomatica (C) e concentrazione substomatica di CO₂ (D) in piante sottoposte a stress idrico (linea continua) e irrigate (linea punteggiata), misurati alle ore 1.00-2.00 PM, a 0, 4, 8, 12, 16 e 20 giorni dall'inizio del periodo di stress. Ogni punto rappresenta la media di nove misurazioni (\pm SE) da tre piante.



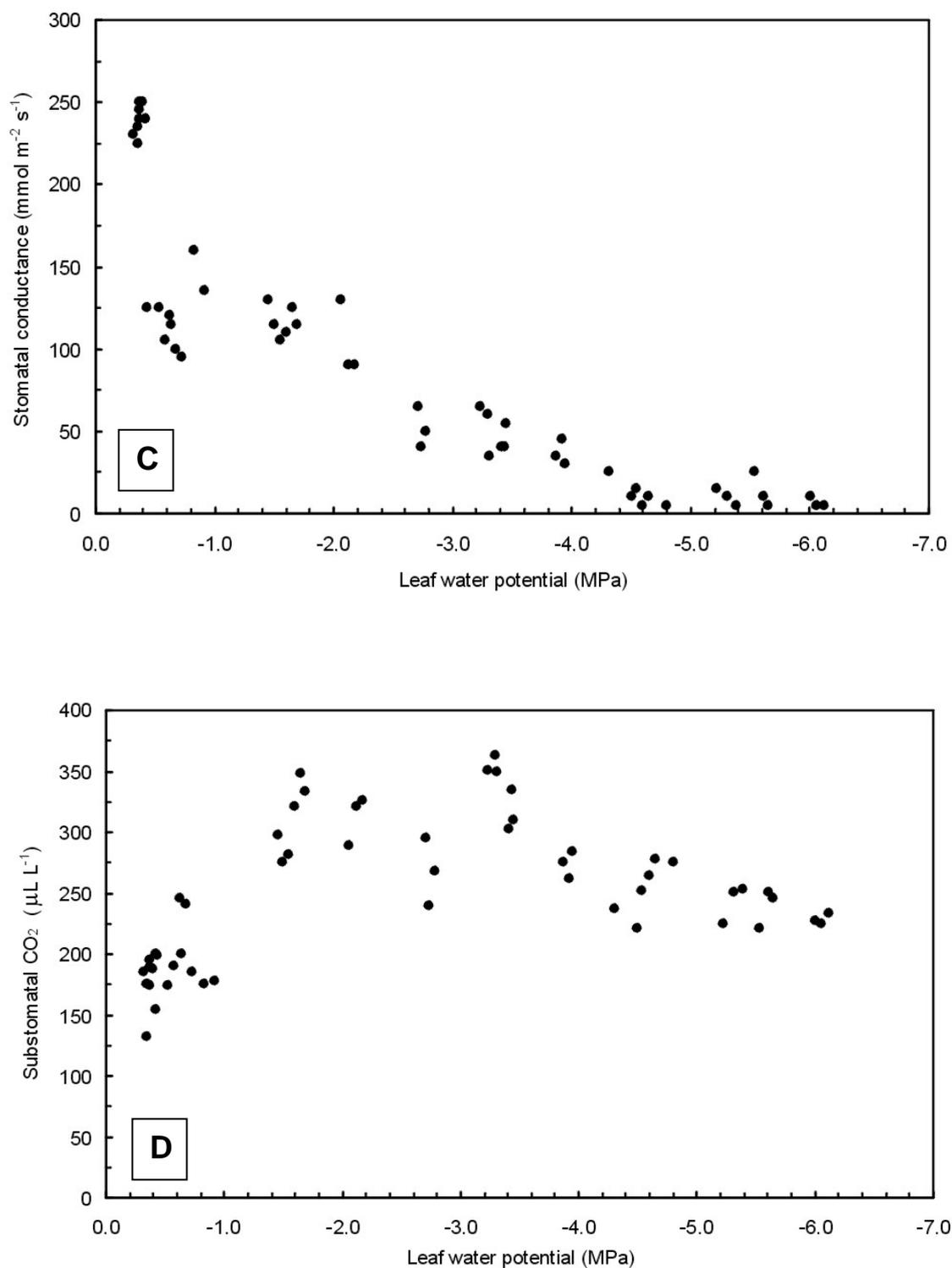
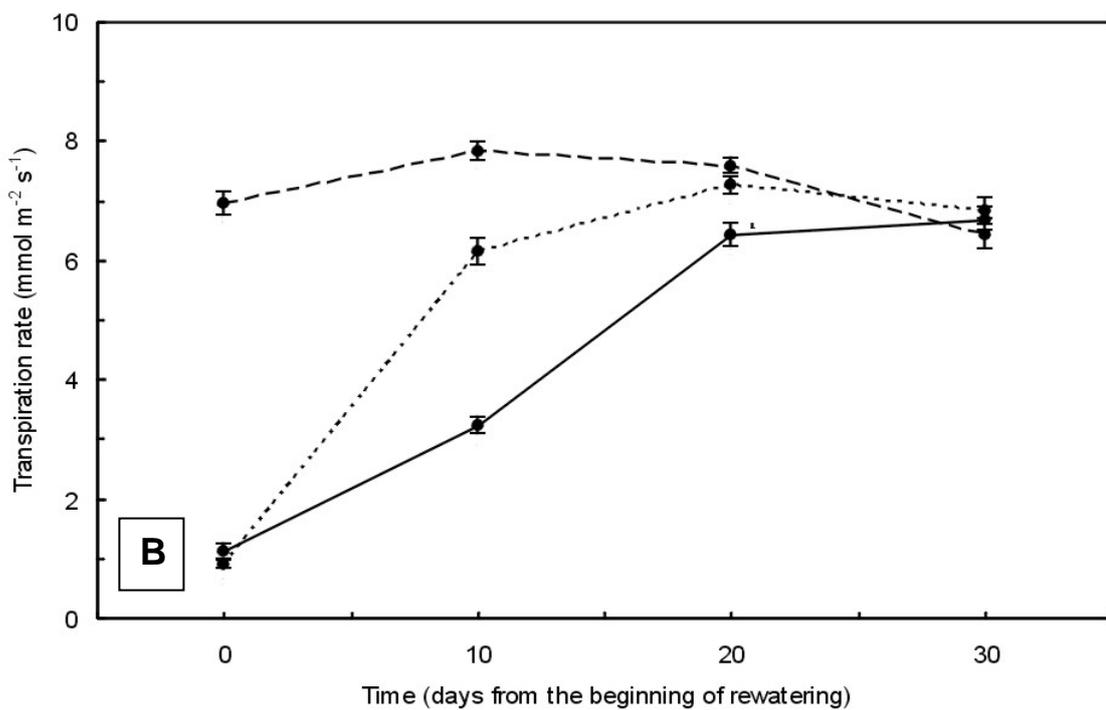
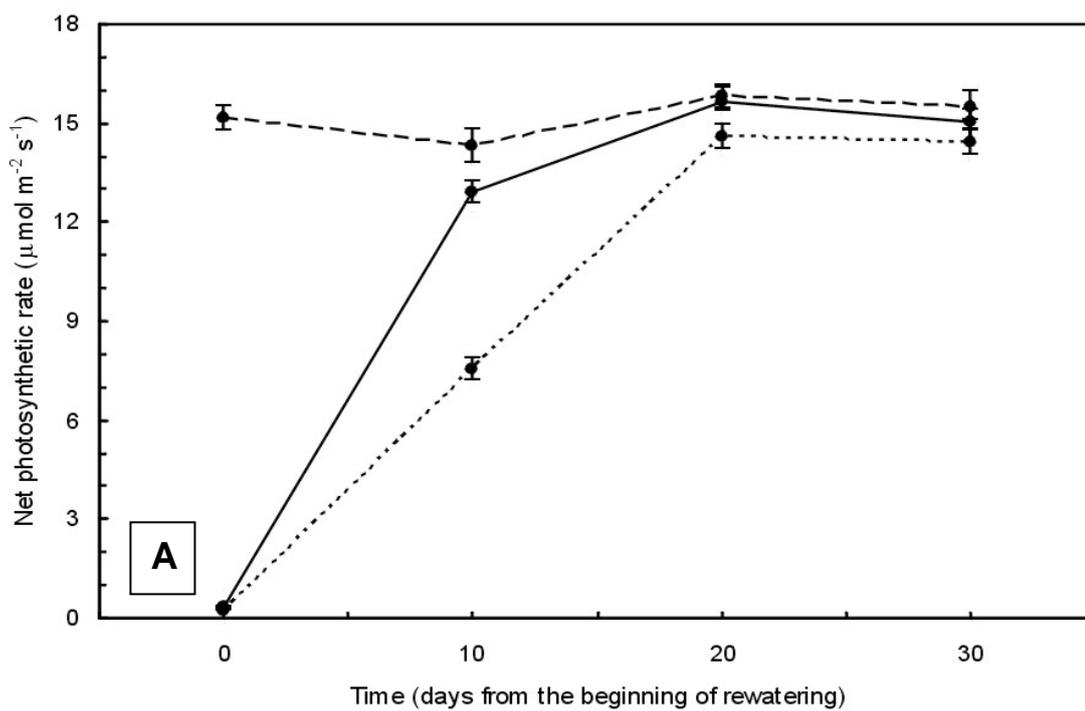


Figura 16. Correlazioni tra potenziale idrico fogliare e fotosintesi netta (A), traspirazione (B), conduttanza stomatica (C) e concentrazione substomatica di CO_2 (D) in piante sottoposte a stress idrico. Ogni punto rappresenta la media di tre misurazioni per pianta.



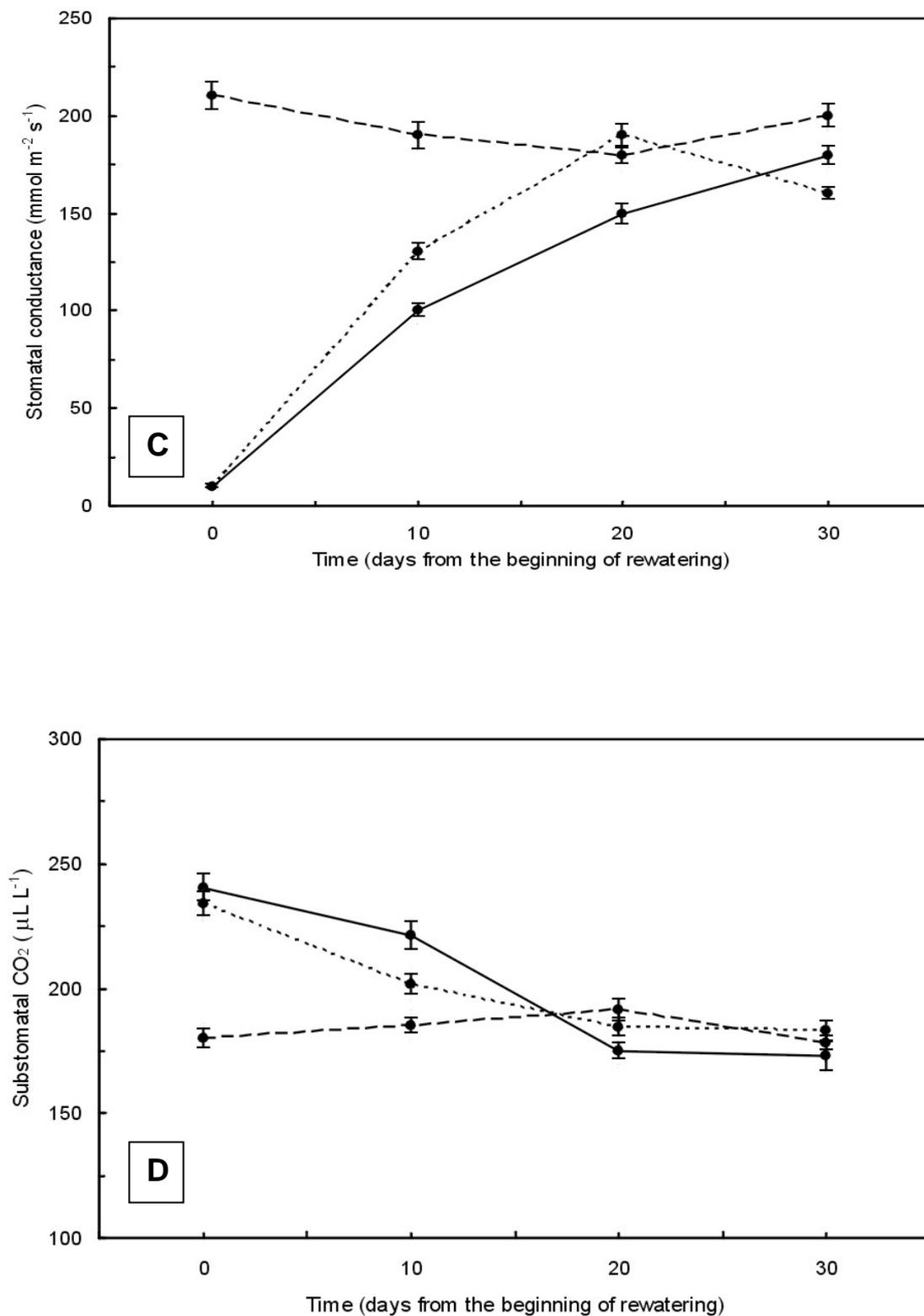


Figura 17. Andamenti di fotosintesi netta (A), traspirazione (B), conduttanza stomatica (C) e concentrazione substomatica di CO₂ (D) in piante ombreggiate (linea continua), non ombreggiate (linea punteggiata) e di controllo (linea tratteggiata), misurati alle ore 1.00-2.00 PM, a 0, 10, 20 e 30 giorni dall'inizio del periodo di ripristino idrico. Ogni punto rappresenta la media di nove misurazioni (\pm SE) da tre piante.

Tabella I. Attività degli enzimi antiossidanti di foglie da piante sottoposte a stress idrico (WSP) e irrigate (WCP). I campioni sono stati raccolti, alle ore 6.00-7.00 AM, a 0, 4, 8, 12, 16 e 20 giorni dall'inizio del periodo di stress. Ogni valore rappresenta la media di nove misurazioni (\pm SE) da tre piante con un valore simile di stress idrico.

Giorni dall'inizio dello stress idrico	Attività enzimatica (unità mg^{-1} DW)					
	SOD		APX		CAT	
	WSP	WCP	WSP	WCP	WSP	WCP
0	15.21 \pm 0.82	14.23 \pm 0.52	3.88 \pm 0.20	3.13 \pm 0.15	4.52 \pm 0.18	4.45 \pm 0.15
4	18.24 \pm 0.50	16.35 \pm 0.38	3.24 \pm 0.05	2.97 \pm 0.12	5.06 \pm 0.13	4.50 \pm 0.12
8	30.73 \pm 0.89 ^a	15.87 \pm 0.65	7.36 \pm 0.07 ^a	2.43 \pm 0.12	6.81 \pm 0.05 ^a	4.87 \pm 0.12
12	34.34 \pm 1.27 ^a	14.39 \pm 0.19	11.06 \pm 0.46 ^a	2.76 \pm 0.10	11.94 \pm 0.74 ^a	5.33 \pm 0.10
16	31.69 \pm 1.90 ^a	15.49 \pm 0.41	12.11 \pm 0.26 ^a	2.62 \pm 0.15	11.44 \pm 0.15 ^a	6.53 \pm 0.15
20	25.17 \pm 1.06 ^a	12.90 \pm 0.97	13.77 \pm 0.55 ^a	2.80 \pm 0.14	11.78 \pm 0.18 ^a	7.36 \pm 0.14
	POD		IAAox		PPO	
	WSP	WCP	WSP	WCP	WSP	WCP
	0	29.21 \pm 1.24	28.72 \pm 1.17	14.30 \pm 0.49	13.23 \pm 0.13	33.49 \pm 0.87
4	30.73 \pm 1.35	27.43 \pm 0.95	16.15 \pm 0.75 ^a	11.27 \pm 0.45	31.87 \pm 1.06	33.42 \pm 1.29
8	39.06 \pm 1.97 ^a	28.84 \pm 0.91	19.00 \pm 0.47 ^a	12.70 \pm 0.56	26.55 \pm 0.85 ^a	35.21 \pm 0.96
12	45.80 \pm 1.77 ^a	27.56 \pm 1.28	22.56 \pm 0.60 ^a	13.76 \pm 0.46	25.47 \pm 1.04 ^a	35.73 \pm 0.85
16	48.17 \pm 2.01 ^a	28.52 \pm 1.05	16.28 \pm 0.34 ^a	10.61 \pm 0.28	24.13 \pm 1.34 ^a	34.13 \pm 1.20
20	40.66 \pm 0.73 ^a	28.67 \pm 0.85	16.50 \pm 0.41 ^a	11.49 \pm 0.24	20.36 \pm 0.91 ^a	33.26 \pm 0.66

^a Differenze significative a livello del 5% tra valori ottenuti dal controllo e le corrispondenti piante sottoposte a stress idrico ($P \leq 0,05$, in base al test a campo di variabilità multiplo di Duncan).

Tabella II. Attività degli enzimi antiossidanti di radici fini da piante sottoposte a stress idrico (WSP) e irrigate (WCP). I campioni sono stati raccolti, alle ore 6.00-7.00 AM, a 0, 8, 16 e 20 giorni dall'inizio del periodo di stress. Ogni valore rappresenta la media di nove misurazioni (\pm SE) da tre piante con un valore simile di stress idrico.

Giorni dall'inizio dello stress idrico	Attività enzimatica (unità mg^{-1} DW)					
	SOD		APX		CAT	
	WSP	WCP	WSP	WCP	WSP	WCP
0	7.23 \pm 0.15	6.96 \pm 0.26	0.23 \pm 0.01	0.19 \pm 0.01	2.86 \pm 0.09	2.98 \pm 0.05
8	17.32 \pm 0.38 ^a	7.56 \pm 0.10	0.24 \pm 0.01	0.20 \pm 0.01	4.57 \pm 0.20 ^a	3.26 \pm 0.09
16	19.37 \pm 0.66 ^a	6.31 \pm 0.18	0.32 \pm 0.02 ^a	0.21 \pm 0.01	8.16 \pm 0.13 ^a	3.74 \pm 0.13
20	25.00 \pm 1.12 ^a	6.42 \pm 0.17	0.34 \pm 0.01 ^a	0.22 \pm 0.01	5.98 \pm 0.13 ^a	3.14 \pm 0.12
	POD		IAAox		PPO	
	WSP	WCP	WSP	WCP	WSP	WCP
	0	18.77 \pm 0.31	17.68 \pm 0.74	8.56 \pm 0.14	7.54 \pm 0.12	30.31 \pm 0.42
8	26.51 \pm 0.34 ^a	18.77 \pm 0.65	12.19 \pm 0.63 ^a	7.28 \pm 0.11	28.47 \pm 0.47	31.79 \pm 0.48
16	39.37 \pm 1.37 ^a	19.61 \pm 0.51	17.11 \pm 0.60 ^a	8.73 \pm 0.38	10.90 \pm 0.34 ^a	31.72 \pm 0.34
20	39.52 \pm 0.90 ^a	16.86 \pm 0.70	14.76 \pm 0.45 ^a	6.77 \pm 0.11	7.16 \pm 0.12 ^a	33.63 \pm 0.79

^a Differenze significative a livello del 5% tra valori ottenuti dal controllo e le corrispondenti piante sottoposte a stress idrico ($P \leq 0,05$, in base al test a campo di variabilità multiplo di Duncan).

Tabella III. Attività degli enzimi antiossidanti di radici medie da piante sottoposte a stress idrico (WSP) e irrigate (WCP). I campioni sono stati raccolti, alle ore 6.00-7.00 AM, a 0, 8, 16 e 20 giorni dall'inizio del periodo di stress. Ogni valore rappresenta la media di nove misurazioni (\pm SE) da tre piante con un valore simile di stress idrico.

Giorni dall'inizio dello stress idrico	Attività enzimatica (unità mg^{-1} DW)					
	SOD		APX		CAT	
	WSP	WCP	WSP	WCP	WSP	WCP
0	7.99 \pm 0.20	8.12 \pm 0.38	0.36 \pm 0.01	0.37 \pm 0.02	2.08 \pm 0.05	2.35 \pm 0.04
8	11.20 \pm 0.28 ^a	7.61 \pm 0.35	0.42 \pm 0.01 ^a	0.33 \pm 0.01	3.10 \pm 0.07 ^a	2.36 \pm 0.07
16	15.94 \pm 0.59 ^a	8.27 \pm 0.20	0.56 \pm 0.02 ^a	0.40 \pm 0.02	2.74 \pm 0.10	2.57 \pm 0.22
20	17.19 \pm 0.49 ^a	6.85 \pm 0.09	0.51 \pm 0.02 ^a	0.35 \pm 0.02	2.58 \pm 0.07	2.25 \pm 0.13
	POD		IAAox		PPO	
	WSP	WCP	WSP	WCP	WSP	WCP
	0	23.88 \pm 0.34	25.62 \pm 0.85	11.22 \pm 0.13	10.67 \pm 0.35	38.19 \pm 0.99
8	39.05 \pm 1.56 ^a	23.52 \pm 1.35	15.74 \pm 0.51 ^a	9.36 \pm 0.48	35.63 \pm 0.74	40.46 \pm 1.28
16	47.77 \pm 2.11 ^a	25.09 \pm 0.67	24.00 \pm 1.04 ^a	10.04 \pm 0.13	21.43 \pm 0.43 ^a	39.61 \pm 1.60
20	44.56 \pm 1.27 ^a	22.97 \pm 0.85	23.17 \pm 0.56 ^a	11.81 \pm 0.41	19.05 \pm 0.33 ^a	41.88 \pm 1.84

^a Differenze significative a livello del 5% tra valori ottenuti dal controllo e le corrispondenti piante sottoposte a stress idrico ($P \leq 0,05$, in base al test a campo di variabilità multiplo di Duncan).

Tabella IV. Livelli di prolina (PRO) e malondialdeide (MDA) e attività della lipossigenasi (LOX) di foglie da piante sottoposte a stress idrico (WSP) e irrigate (WCP). I campioni sono stati raccolti, alle ore 6.00-7.00 AM, a 0, 4, 8, 12, 16 e 20 giorni dall'inizio del periodo di stress. Ogni valore rappresenta la media di nove misurazioni (\pm SE) da tre piante con un valore simile di stress idrico.

Giorni dall'inizio dello stress idrico	PRO ($\mu\text{mol g}^{-1}$ DW)		MDA (nmol g^{-1} DW)		Attività LOX (unità mg^{-1} DW)	
	WSP	WCP	WSP	WCP	WSP	WCP
0	0.53 \pm 0.01	0.56 \pm 0.02	74.36 \pm 5.32	77.11 \pm 4.03	149.93 \pm 7.35	152.38 \pm 8.02
4	0.56 \pm 0.02	0.59 \pm 0.02	73.78 \pm 2.39	68.33 \pm 5.30	151.65 \pm 8.27	159.82 \pm 5.24
8	0.73 \pm 0.02 ^a	0.50 \pm 0.01	119.96 \pm 5.77 ^a	69.00 \pm 7.66	240.10 \pm 9.12 ^a	173.11 \pm 10.37
12	1.09 \pm 0.02 ^a	0.47 \pm 0.02	116.83 \pm 6.01 ^a	74.31 \pm 6.90	336.87 \pm 18.36 ^a	161.59 \pm 11.41
16	1.22 \pm 0.03 ^a	0.54 \pm 0.01	176.95 \pm 9.21 ^a	73.62 \pm 5.34	461.35 \pm 28.20 ^a	145.65 \pm 5.02
20	1.59 \pm 0.03 ^a	0.65 \pm 0.01	256.06 \pm 13.27 ^a	78.00 \pm 8.39	492.43 \pm 34.29 ^a	168.80 \pm 8.29

^a Differenze significative a livello del 5% tra valori ottenuti dal controllo e le corrispondenti piante sottoposte a stress idrico ($P \leq 0,05$, in base al test a campo di variabilità multiplo di Duncan).

Tabella V. Livelli di prolina (PRO) e malondialdeide (MDA) e attività della lipossigenasi (LOX) di radici fini da piante sottoposte a stress idrico (WSP) e irrigate (WCP). I campioni sono stati raccolti, alle ore 6.00-7.00 AM, a 0, 8, 16 e 20 giorni dall'inizio del periodo di stress. Ogni valore rappresenta la media di nove misurazioni (\pm SE) da tre piante con un valore simile di stress idrico.

Giorni dall'inizio dello stress idrico	PRO ($\mu\text{mol g}^{-1}$ DW)		MDA (nmol g^{-1} DW)		Attività LOX (unità mg^{-1} DW)	
	WSP	WCP	WSP	WCP	WSP	WCP
0	0.50 \pm 0.01	0.48 \pm 0.01	37.51 \pm 1.33	31.18 \pm 0.57	59.49 \pm 2.13	64.30 \pm 2.84
8	0.63 \pm 0.02 ^a	0.50 \pm 0.01	57.12 \pm 1.65 ^a	27.37 \pm 0.84	89.56 \pm 6.29 ^a	76.32 \pm 5.39
16	0.63 \pm 0.01 ^a	0.40 \pm 0.01	98.20 \pm 4.90 ^a	34.58 \pm 0.64	110.40 \pm 3.84 ^a	73.16 \pm 4.51
20	0.73 \pm 0.03 ^a	0.45 \pm 0.02	102.67 \pm 7.88 ^a	34.60 \pm 0.55	112.50 \pm 4.11 ^a	68.02 \pm 2.39

^a Differenze significative a livello del 5% tra valori ottenuti dal controllo e le corrispondenti piante sottoposte a stress idrico ($P \leq 0,05$, in base al test a campo di variabilità multiplo di Duncan).

Tabella VI. Livelli di prolina (PRO) e malondialdeide (MDA) e attività della lipossigenasi (LOX) di radici medie da piante sottoposte a stress idrico (WSP) e irrigate (WCP). I campioni sono stati raccolti, alle ore 6.00-7.00 AM, a 0, 8, 16 e 20 giorni dall'inizio del periodo di stress. Ogni valore rappresenta la media di nove misurazioni (\pm SE) da tre piante con un valore simile di stress idrico.

Giorni dall'inizio dello stress idrico	PRO ($\mu\text{mol g}^{-1}$ DW)		MDA (nmol g^{-1} DW)		Attività LOX (unità mg^{-1} DW)	
	WSP	WCP	WSP	WCP	WSP	WCP
0	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.01	33.28 ± 0.64	38.18 ± 1.92	50.82 ± 2.73	54.45 ± 2.57
8	0.44 ± 0.01^a	0.29 ± 0.01	65.72 ± 2.11^a	36.27 ± 1.01	64.22 ± 7.39^a	59.27 ± 1.20
16	0.45 ± 0.02^a	0.27 ± 0.01	77.30 ± 2.28^a	33.05 ± 1.45	74.67 ± 7.57^a	55.21 ± 2.54
20	0.54 ± 0.02^a	0.28 ± 0.01	92.67 ± 3.48^a	35.63 ± 1.20	79.51 ± 9.84^a	50.79 ± 1.42

^a Differenze significative a livello del 5% tra valori ottenuti dal controllo e le corrispondenti piante sottoposte a stress idrico ($P \leq 0,05$, in base al test a campo di variabilità multiplo di Duncan).

Tabella VII. Attività degli enzimi antiossidanti di foglie da piante ombreggiate (SHP), non ombreggiate (ICP) e di controllo (WCP). I campioni sono stati raccolti, alle ore 6.00-7.00 AM, a 0, 10, 20 e 30 giorni dall'inizio del periodo di recupero idrico. Ogni valore rappresenta la media di nove misurazioni (\pm SE) da tre piante con un valore simile di stress idrico.

Attività enzimatica (unità mg^{-1} DW)									
	SOD			APX			CAT		
	SHP	ICP	WCP	SHP	ICP	WCP	SHP	ICP	WCP
10	25.08 \pm 0.49	28.47 \pm 0.88	13.74 \pm 0.21	7.26 \pm 0.20	14.24 \pm 0.63	3.19 \pm 0.05	11.23 \pm 0.20	12.02 \pm 0.35	5.74 \pm 0.18
20	19.36 \pm 0.30	21.36 \pm 0.55	14.26 \pm 0.58	4.26 \pm 0.06	9.21 \pm 0.45	3.18 \pm 0.06	8.48 \pm 0.17	5.26 \pm 0.12	4.92 \pm 0.21
30	13.02 \pm 0.47	17.93 \pm 0.87	14.77 \pm 0.34	4.60 \pm 0.10	3.67 \pm 0.08	2.97 \pm 0.18	9.97 \pm 0.32	6.40 \pm 0.29	5.36 \pm 0.10
	POD			IAAox			PPO		
	SHP	ICP	WCP	SHP	ICP	WCP	SHP	ICP	WCP
10	27.06 \pm 0.53	29.73 \pm 0.47	27.43 \pm 0.39	13.36 \pm 0.32	12.87 \pm 0.34	11.26 \pm 0.49	36.47 \pm 0.51	23.87 \pm 0.66	33.42 \pm 1.18
20	31.95 \pm 0.74	30.07 \pm 1.04	28.93 \pm 0.60	14.91 \pm 0.26	13.40 \pm 0.22	12.25 \pm 0.52	37.11 \pm 0.88	25.13 \pm 1.00	35.21 \pm 1.33
30	31.49 \pm 0.82	37.80 \pm 1.17	27.57 \pm 0.53	12.37 \pm 0.39	14.47 \pm 0.58	10.60 \pm 0.29	41.54 \pm 1.18	23.26 \pm 0.72	35.73 \pm 0.88

Tabella VIII. Attività degli enzimi antiossidanti di radici fini da piante ombreggiate (SHP), non ombreggiate (ICP) e di controllo (WCP). I campioni sono stati raccolti, alle ore 6.00-7.00 AM, a 0, 10, 20 e 30 giorni dall'inizio del periodo di recupero idrico. Ogni valore rappresenta la media di nove misurazioni (\pm SE) da tre piante con un valore simile di stress idrico.

Attività enzimatica (unità mg^{-1} DW)									
	SOD			APX			CAT		
	SHP	ICP	WCP	SHP	ICP	WCP	SHP	ICP	WCP
10	16.21 \pm 0.71	18.34 \pm 0.37	7.26 \pm 0.32	0.22 \pm 0.01	0.38 \pm 0.02	0.26 \pm 0.01	6.97 \pm 0.18	5.37 \pm 0.10	3.79 \pm 0.06
20	11.08 \pm 0.25	8.41 \pm 0.25	6.21 \pm 0.25	0.27 \pm 0.01	0.25 \pm 0.01	0.21 \pm 0.01	6.13 \pm 0.11	4.48 \pm 0.11	2.87 \pm 0.03
30	7.44 \pm 0.19	8.67 \pm 0.41	6.76 \pm 0.41	0.20 \pm 0.01	0.29 \pm 0.02	0.20 \pm 0.01	4.35 \pm 0.12	3.81 \pm 0.14	3.36 \pm 0.13
	POD			IAAox			PPO		
	SHP	ICP	WCP	SHP	ICP	WCP	SHP	ICP	WCP
10	17.28 \pm 0.53	20.20 \pm 0.89	16.23 \pm 0.65	7.17 \pm 0.28	6.75 \pm 0.31	8.38 \pm 0.37	26.86 \pm 0.71	12.37 \pm 0.29	31.87 \pm 0.72
20	15.39 \pm 0.31	20.38 \pm 0.50	17.03 \pm 0.73	6.98 \pm 0.13	6.23 \pm 0.13	6.90 \pm 0.14	35.90 \pm 1.45	16.18 \pm 0.48	29.47 \pm 0.78
30	17.30 \pm 0.46	18.99 \pm 0.60	15.69 \pm 0.22	7.25 \pm 0.17	7.81 \pm 0.12	7.13 \pm 0.30	38.28 \pm 1.69	23.80 \pm 0.54	34.08 \pm 0.93

Tabella IX. Attività degli enzimi antiossidanti di radici medie da piante ombreggiate (SHP), non ombreggiate (ICP) e di controllo (WCP). I campioni sono stati raccolti, alle ore 6.00-7.00 AM, a 0, 10, 20 e 30 giorni dall'inizio del periodo di recupero idrico. Ogni valore rappresenta la media di nove misurazioni (\pm SE) da tre piante con un valore simile di stress idrico.

Attività enzimatica (unità mg^{-1} DW)									
	SOD			APX			CAT		
	SHP	ICP	WCP	SHP	ICP	WCP	SHP	ICP	WCP
10	10.31 \pm 0.15	10.47 \pm 0.20	7.36 \pm 0.10	0.49 \pm 0.03	0.69 \pm 0.02	0.39 \pm 0.02	3.46 \pm 0.11	3.10 \pm 0.08	2.49 \pm 0.09
20	6.35 \pm 0.14	10.35 \pm 0.37	7.58 \pm 0.14	0.45 \pm 0.02	0.41 \pm 0.01	0.37 \pm 0.01	3.18 \pm 0.11	2.70 \pm 0.05	3.11 \pm 0.13
30	7.27 \pm 0.17	9.89 \pm 0.61	7.53 \pm 0.18	0.31 \pm 0.01	0.25 \pm 0.02	0.31 \pm 0.01	2.91 \pm 0.05	2.45 \pm 0.09	2.83 \pm 0.04
	POD			IAAox			PPO		
	SHP	ICP	WCP	SHP	ICP	WCP	SHP	ICP	WCP
10	22.47 \pm 0.84	36.89 \pm 1.43	24.26 \pm 0.59	12.11 \pm 0.35	13.63 \pm 0.59	9.37 \pm 0.36	43.08 \pm 0.91	23.17 \pm 0.42	39.57 \pm 1.60
20	20.16 \pm 0.78	22.32 \pm 0.81	23.63 \pm 0.75	10.85 \pm 0.38	11.65 \pm 0.22	10.46 \pm 0.21	45.27 \pm 1.60	24.28 \pm 0.68	39.43 \pm 1.53
30	20.99 \pm 0.50	24.72 \pm 0.70	25.23 \pm 0.84	13.50 \pm 0.40	11.12 \pm 0.19	10.85 \pm 0.34	47.20 \pm 1.77	26.37 \pm 0.74	42.95 \pm 1.16

Tabella X. Attività della lipossigenasi (LOX) e livello di malondialdeide (MDA) di foglie, radici fini e radici medie da piante ombreggiate (SHP), non ombreggiate (ICP) e di controllo (WCP). I campioni sono stati raccolti, alle ore 6.00-7.00 AM, a 0, 10, 20 e 30 giorni dall'inizio del periodo di recupero idrico. Ogni valore rappresenta la media di nove misurazioni (\pm SE) da tre piante con un valore simile di stress idrico.

Attività LOX (unità mg^{-1} DW)										
Foglie			Radici fini			Radici medie				
SHP	ICP	WCP	SHP	ICP	WCP	SHP	ICP	WCP		
10	195.62 \pm 9.17	278.39 \pm 15.61	163.00 \pm 10.79	82.75 \pm 4.27	105.28 \pm 6.21	72.48 \pm 1.44	85.08 \pm 4.93	98.26 \pm 6.14	71.73 \pm 4.85	
20	166.42 \pm 6.05	202.50 \pm 6.94	171.16 \pm 5.28	65.46 \pm 2.98	85.68 \pm 2.73	72.10 \pm 2.57	53.93 \pm 2.17	76.09 \pm 2.60	64.29 \pm 1.95	
30	162.10 \pm 10.44	164.29 \pm 10.26	155.75 \pm 9.34	71.19 \pm 3.45	67.37 \pm 4.99	65.27 \pm 1.99	55.31 \pm 1.83	63.18 \pm 2.95	69.86 \pm 3.72	

MDA (nmol g^{-1} DW)										
Foglie			Radici fini			Radici medie				
SHP	ICP	WCP	SHP	ICP	WCP	SHP	ICP	WCP		
10	90.88 \pm 5.38	121.37 \pm 9.33	75.89 \pm 6.91	54.39 \pm 5.93	73.53 \pm 3.05	32.79 \pm 2.17	53.32 \pm 2.59	78.39 \pm 3.53	35.31 \pm 0.99	
20	62.11 \pm 4.17	86.38 \pm 2.10	74.72 \pm 2.35	37.28 \pm 0.75	40.38 \pm 1.53	33.13 \pm 0.69	40.89 \pm 1.54	51.69 \pm 3.08	37.11 \pm 1.15	
30	54.26 \pm 1.07	68.37 \pm 4.37	79.26 \pm 4.30	34.46 \pm 2.04	35.27 \pm 1.98	32.35 \pm 0.97	44.55 \pm 2.06	48.10 \pm 2.14	40.81 \pm 2.80	

5. DISCUSSIONE

5.1 Effetti dello stress idrico sulle attività degli enzimi antiossidanti

Il trattamento di stress idrico ha causato nette diminuzioni dei LWP e dei parametri degli scambi gassosi fotosintetici (Figg. 15A-D e 16A-D). La rapida diminuzione del tasso traspirativo (Figg. 15B e 16B) è andata di pari passo con la diminuzione della conduttanza stomatica (Figg. 15C e 16C), che induce come conseguenza principale un marcato aumento di temperatura fogliare. I nostri dati, quindi, confermano quelli precedenti raccolti da Nogués e Baker (2000) e da Moriana et al. (2002). E' ormai accertato che a temperature che superano l'optimum per l'assimilazione, ma ben al di sotto del limite di tolleranza, diminuisce il retro-controllo delle reazioni luminose da parte del metabolismo del carbonio e aumentano di importanza altri processi che permettono la dissipazione dell'energia in eccesso. L'effetto principale è una limitata assimilazione di CO₂ e un aumento della concentrazione di CO₂ substomatica (Figg. 15D e 16D) dovuta ad uno sbilanciamento del metabolismo del carbonio che si riflette in una "sotto-regolazione" della Rubisco (Weis e Berry, 1988).

Il successivo recupero idrico ha causato un rapido incremento di LWP, accompagnato da un più lento aumento degli scambi gassosi fotosintetici (Figg. 17A-D). Il ritardo del recupero del tasso fotosintetico durante il ripristino idrico, molto marcato nelle ICP, potrebbe essere stato causato dall'inattivazione dipendente dalla luce delle reazioni fotochimiche primarie associate al PSII avvenuta durante il periodo di stress idrico precedente (Angelopoulos et al., 1996) o alla "sotto-regolazione" del trasporto elettronico, come recentemente sottolineato da Nogués e Baker (2000). Il rapido incremento del tasso traspirativo (Fig. 17B) è stato parallelo a quello della

conduttanza stomatica (Fig. 17C). Sia nelle SHP che nelle ICP, ancora al primo livello di ripristino il tasso traspirativo non si era ancora ripristinato e al secondo livello di ripristino i valori delle SHP erano ancora più bassi rispetto a quelli delle WCP. Questo ritardo nel recupero della traspirazione potrebbe essere stato causato dall'incapacità delle piante di olivo di riempire nuovamente i vasi xilematici che avevano subito un processo di cavitazione durante il precedente periodo di stress idrico, come osservato da Moreno et al. (1986). L'andamento della conduttanza stomatica ha mostrato che sia le SHP che le ICP hanno recuperato lentamente dopo il periodo di deficit idrico. Questo risultato è in contrasto con quello di Fernández et al. (1987), che ha osservato un rapido ripristino di conduttanza stomatica durante il ripristino idrico, anche se su piante di 26 anni della cv. Manzanillo con acqua piovana come unica fonte di acqua.

Le piante soggette a stress idrico vanno incontro ad un eccesso di potere riducente, dovuto alla limitazione dell'assimilazione della CO₂, che a sua volta causa un aumento dei livelli di AOS e l'accumulo di radicali liberi (Schwanz e Polle, 2001; Vranovà et al., 2002). In queste condizioni di stress solitamente avvengono aumenti delle attività degli enzimi antiossidanti. Nella presente ricerca, infatti, le attività di tutti gli enzimi sono variate significativamente da condizioni di stress idrico lieve a condizioni di deficit severo e, inoltre, hanno mostrato valori e andamenti diversi a seconda del tessuto esaminato.

L'efficiente rimozione di $\cdot\text{O}_2^-$ e H₂O₂ richiede l'azione di vari enzimi antiossidanti che agiscono in sincronia (Asada, 1999). SOD e APX sono gli enzimi-chiave del sistema antiossidante nei cloroplasti, essendo coinvolti nella rimozione rispettivamente di $\cdot\text{O}_2^-$ e H₂O₂, ma possono contribuire alla detossificazione di AOS anche in altri compartimenti cellulari. CAT e POD, invece, sono coinvolti nell'eliminazione di H₂O₂ al di fuori dei cloroplasti.

I nostri risultati mostrano che le attività specifiche di SOD, CAT, APX e POD sono aumentate in base alla severità dello stress idrico (Tabb. I, II e III), suggerendo che questi enzimi del sistema antiossidante sono co-regolati (Shigeoka et al., 2002). Lo stress idrico, combinato con alti livelli di irraggiamento e alte temperature, causa perturbazioni nel metabolismo della pianta, diminuendo il tasso di assimilazione di CO₂ e, di conseguenza, la capacità del sistema fotosintetico di trasporto elettronico (Asada, 1999). Come evidenziato da Angelopoulos et al. (1996), nelle piante di olivo soggette a stress idrico avviene una inattivazione luce-dipendente delle reazioni fotochimiche associate al PS II, anche se una recente ricerca sottolinea che nelle foglie di olivo si verifica soltanto un modesto danno fotochimico a livello del PS II durante lo stress idrico e che le diminuzioni di resa quantica del trasporto elettronico nel PS II (ϕ_{PSII}) indotte dallo stress sono attribuibili principalmente alla “sotto-regolazione” del trasporto elettronico (Nogués e Baker, 2000). Questo potrebbe spiegare la diminuzione dei tassi fotosintetici nelle WSP, recentemente osservate da Flexas et al. (1999) in piante di vite soggette a deficit idrico.

La produzione di AOS aumenta in condizioni di stress idrico perché l'energia intercettata dai pigmenti fotosintetici è maggiore della loro capacità di dissiparla termicamente (Foyer et al., 1994). Gli aumentati livelli di AOS sono fattori determinanti per il tipo di risposta della pianta allo stress idrico. In particolare, $\cdot O_2^-$ e H₂O₂ sembrano indurre geni differenti, in combinazione o separatamente, confermando che le AOS sono anche efficaci molecole-segnale durante la risposta della pianta allo stress (Van Breusegem et al., 2001; Vranovà et al. 2002) e sono capaci di regolare il proprio livello variando lo stato redox di specifici fattori di trascrizione (Bowler et al., 1992). Questo potrebbe spiegare l'incremento delle attività enzimatiche durante la fase di stress.

Tra tutti gli enzimi esaminati, APX e SOD sembrano essere i principali enzimi coinvolti nella detossificazione delle AOS. Il radicale $\cdot\text{O}_2^-$ prodotto nei diversi compartimenti della cellula è velocemente convertito in H_2O_2 dall'azione di SOD, mentre, nei cloroplasti, che contengono un'alta concentrazione di AsA, la riduzione diretta di $\cdot\text{O}_2^-$ per formare H_2O_2 , usando AsA come donatore di elettroni, è molto rapida (Mehlhorn et al., 1996). Dal momento che H_2O_2 è un forte ossidante in grado di ossidare rapidamente i gruppi tiolici, la cellula non può permettersi di accumularlo in eccesso in organelli quali i cloroplasti, dove la fotosintesi dipende dagli enzimi tiolo-regolati (Noctor e Foyer, 1998).

SOD e APX hanno mostrato un forte incremento di attività direttamente correlato all'aumento del livello di stress idrico, in tutti i tessuti studiati per SOD (Tabb. I, II e III) e soprattutto nelle foglie per APX (Tab. I). L'attività SOD regola i livelli di $\cdot\text{O}_2^-$ prodotto principalmente per mezzo della ferredossina ridotta nei cloroplasti, ma determina anche i livelli di $\cdot\text{O}_2^-$ nei mitocondri e nel citoplasma. SOD, inoltre, riduce la possibilità di formazione di $\cdot\text{OH}$, un ossidante molto forte con un'alta affinità per le molecole biologiche, per mezzo della reazione di Haber-Weiss o della reazione di Fenton (Scandalios, Smirnoff, 1993). Nei tessuti di olivo esposti a stress idrico severo, l'attività SOD è stata circa due volte maggiore nelle foglie, circa quattro volte nelle TR e più di due volte nelle MR, rispetto ai valori nelle WCP.

SOD è un importante enzima antiossidante, ma esso converte un composto tossico in un altro, attraverso la dismutazione di $\cdot\text{O}_2^-$. APX è, invece, l'enzima antiossidante maggiormente diffuso in tutte le specie vegetali. Esso riduce H_2O_2 , un forte inibitore della fotosintesi, a H_2O , attraverso la dismutazione di $\cdot\text{O}_2^-$, usando AsA come donatore di elettroni (Mehlhorn et al., 1996). AsA può in seguito essere rigenerato mediante il ciclo ascorbato-glutatione (Foyer and Mullineaux, 1998; Smirnoff, 2000).

Le APX sono enzimi-chiave coinvolti nell'eliminazione di H_2O_2 ed il loro ruolo durante lo stress idrico potrebbe essere di primaria importanza: l'attività APX è, infatti, aumentata in tutti i tessuti studiati, in particolare nelle foglie (circa cinque volte maggiore se comparata con i valori delle WCP, ad un livello di stress severo), i cui cloroplasti presentano flussi di elettroni sostenuti e sono i principali produttori e bersagli dell'azione delle AOS. APX delle radici di olivo ha mostrato bassi livelli di attività rispetto alle foglie; questo suggerisce che l'attività APX può essere attribuita soprattutto alla sua forma localizzate nel cloroplasto (chlAPX) nei tessuti fogliari. In tale caso, il livello di AsA è critico per l'attività degli isoenzimi chlAPX. A bassi livelli di AsA, infatti, una concentrazione di H_2O_2 minore di $2 \mu M$ può inattivare gli isoenzimi chlAPX entro pochi secondi (Shigeoka et al., 2002). I nostri risultati suggeriscono che lo stress ossidativo causato dal deficit idrico induce l'attività di SOD e APX; questo potrebbe essere un importante meccanismo di protezione dell'olivo nei confronti dell'aumento di AOS durante questo tipo di stress abiotico.

La fotorespirazione nei perossisomi per mezzo della glicolato ossidasi è un'altra fonte di produzione di H_2O_2 , in seguito rimossa da CAT. L'aumento di attività fotorespiratoria durante lo stress idrico è anche accompagnata da elevati livelli di attività glicolato-ossidasi, che causa l'incremento della concentrazione di H_2O_2 . Questo potrebbe spiegare perché i geni che codificano alcuni enzimi che eliminano le AOS, quali APX e SOD, sono sopraregolati durante il periodo di stress idrico (Ingram e Bartels, 1996).

Le piante di olivo soggette a lievi e moderati deficit idrici mostrano maggiore valori di CO_2 substomatica (Figg. 15D e 16D), un risultato che conferma l'incremento di assorbimento di O_2 per mezzo della fotorespirazione e la conseguente produzione di CO_2 . Tuttavia, soprattutto in condizioni di stress, la fotorespirazione agisce anche come una fonte di energia prevenendo la sopra-riduzione della catena di trasporto

elettronica fotosintetica e la fotoinibizione. La fotorespirazione, inoltre, produce glicina, necessaria per i meccanismi protettivi e per la sintesi di glutatione ridotto (GSH) (Wingler et al., 2000; Foyer et al., 2001). Le CAT convertono H_2O_2 in H_2O e O_2 . Questi enzimi hanno tassi catalitici molto alti ma basse affinità di substrato, dal momento che la reazione richiede l'accesso simultaneo di due molecole di H_2O_2 nel sito attivo. L'assenza di CAT nei cloroplasti, inoltre, preclude un loro ruolo nella protezione degli enzimi tiolo-regolati del ciclo di Calvin.

L'attività CAT, alta durante uno stress idrico lieve e moderato, soprattutto nelle foglie e nelle TR (Tabb. I e II) , è leggermente diminuita durante condizioni di stress idrico severo, a causa della inattivazione e della degradazione dell'enzima, come osservato da Feierabend et al. (1992) e Streb et al. (1993) in piante soggette a condizioni ambientali avverse. Dal momento che, nelle piante di olivo oggetto della ricerca, l'andamento di CO_2 substomatica, dopo un primo incremento, ha raggiunto una fase di plateau (Figg. 15D e 16D), noi ipotizziamo che si è verificata una diminuzione dei processi fotorespiratori a causa dell'accumulo di H_2O_2 , in seguito all'inattivazione di CAT. Questo eccesso di H_2O_2 è probabilmente generato dalla fotorespirazione che avviene nei perossisomi piuttosto che dalla sovra-espressione di SOD; infatti, una minore disponibilità di CO_2 , causata dallo stress idrico, induce la produzione fotorespiratoria di H_2O_2 (Noctor et al., 2000; Rubio et al., 2002).

Durante livelli di stress idrico moderato e severo, la CO_2 atmosferica non può facilmente diffondere nel mesofillo perché le piante di olivo riducono drasticamente i loro scambi gassosi con l'ambiente, chiudendo i loro stomi; questo conferma i risultati di Xiloyannis et al. (1988) e Fernández et al. (1997). La nostra ipotesi, quindi, è che l'inattivazione di CAT durante uno stress idrico severo causa la diminuzione della concentrazione di CO_2 substomatica, poiché quest'ultima deriva quasi interamente dai processi fotorespiratori.

Un modo alternativo di distruzione di H_2O_2 avviene per mezzo delle perossidasi, presenti in vari compartimenti cellulari, che hanno un'affinità maggiore per H_2O_2 rispetto alle CAT. Le perossidasi richiedono un agente riducente, dal momento che essi riducono H_2O_2 a H_2O . Negli animali, le perossidasi che usano il GSH sono molto importanti per la detossificazione di H_2O_2 (Foyer et al., 2001). Oltre alla glutatione S-trasferasi (GSTs), altri enzimi capaci di catalizzare la riduzione glutatione-dipendente di H_2O_2 nelle piante non sono stati ancora caratterizzati (Noctor e Foyer, 1998). Le POD possono ossidare e quindi eliminare H_2O_2 usando preferibilmente alcuni composti fenolici (ad es. guaiacolo o pirogallolo) come agenti riducenti primari (Mehlhorn et al., 1996). Il ruolo degli isoenzimi POD è basato principalmente sul loro coinvolgimento nella biosintesi di lignina e nell'ossidazione di IAA; IAA, inoltre, sembra causare un aumento di attività POD e quindi anche di deposizione di lignina a livello delle pareti cellulari (Sitbon et al., 1999). Gli isoenzimi POD partecipano alla modulazione delle proprietà della parete cellulare durante la crescita della pianta, in parte catalizzando la formazione di legami crociati covalenti dopo l'ossidazione di acidi fenolici con legami estere o etere e in parte attraverso l'accoppiamento ossidativo dei residui di alcool cinnamoilico per generare lignina (Gaspar et al., 1985; Lee e Lin, 1995; Bacon et al., 1997).

Dai risultati della nostra ricerca emerge che le attività POD e IAAox sono aumentate in tutti i tessuti studiati durante la progressiva imposizione dello stress idrico, soprattutto nelle TR e nelle MR (Tabb. II e III), mentre le variazioni nelle foglie sono state meno evidenti (Tab. I). Noi suggeriamo che l'incremento dell'attività POD potrebbe riflettere variazioni delle proprietà meccaniche della parete cellulare, che a loro volta, potrebbero essere correlate ad un adattamento allo stress idrico. L'alto grado di attività POD potrebbe causare una limitazione della crescita nelle piante di olivo sottoposte a stress idrico per due ragioni: l'aumentato livello di lignificazione, e

l'ossidazione, con conseguente inattivazione, di IAA. Questo potrebbe spiegare la ridotta crescita della chioma e i cambiamenti delle dinamiche radicali di olivo in risposta al deficit idrico osservati rispettivamente da Dichio et al. (2002) e da Fernández et al. (1992). A questo riguardo, è importante rilevare che lo stress idrico causa alterazioni nella composizione chimica e nelle proprietà fisiche della parete cellulare (ad es. estensibilità), e che tali variazioni possono coinvolgere i geni che codificano per la S-adenosilmetionina sintetasi e per le perossidasi, due dei principali responsabili della lignificazione della parete cellulare. L'allungamento cellulare si arresta quando i tessuti vanno incontro ad un periodo di deficit idrico, e quindi i processi di lignificazione e di aggiustamento strutturale sembrano essere indotti dallo stress (Ingram e Bartels, 1996).

I fenoli sono composti secondari fisiologicamente attivi con azione non-enzimatica. Essi sono molto abbondanti nelle foglie di olivo (Le Tutour e Guedon, 1992; Ryan et al., 2002) come anche nel suo olio (Owen et al., 2000) e possono essere trovati nel citoplasma, nei vacuoli e nelle pareti cellulari. I composti fenolici sono anche coinvolti nella protezione e nel catabolismo delle auxine (Mato et al., 1994, Faivre-Rampant et al., Hrubcová et al., 2000), nella modulazione della plasticità della parete cellulare (Fry, 1986) e nelle dinamiche degli scambi gassosi, dal momento che la chiusura stomatica indotta dall'acido abscissico (ABA) è contrastata da alcuni composti fenolici (Purohit et al., 1991). Le PPO possiedono un'attività proteolitica (Kuwabara e Kato, 1999) che suggerisce un ruolo dell'enzima nella rimozione delle proteine danneggiate dalle AOS.

L'attività PPO ha mostrato una diminuzione significativa, soprattutto nelle TR e nelle MR delle WSP, rispetto ai valori delle WCP (Tabb. II e III). Noi suggeriamo che l'attività PPO potrebbe essere inibita dallo stress ossidativo causato da un deficit idrico al fine di mantenere i composti fenolici nel loro stato ridotto.

I nostri risultati evidenziano la grande capacità di resistere ad ambienti aridi e di mantenere un alto tasso fotosintetico dell'olivo anche ad alti livelli di stress idrico, quando il tasso traspirativo diminuisce drasticamente. Sembra quindi evidente che questa specie attiva un sistema enzimatico antiossidativo che gli consente un certo grado di controllo nei confronti del danno ossidativo dovuto da AOS. Probabilmente, nell'olivo, l'efficienza del sistema antiossidante consente una rapida successione degli eventi che seguono il danno ossidativo e permettono la riparazione dell'apparato fotosintetico; questi eventi sono il tempestivo e parziale disassemblaggio del complesso enzimatico del PS II, l'esposizione del core del PSII danneggiato allo stroma del cloroplasto, la degradazione della proteina D1 fotodanneggiata, la sintesi *de novo* di D1 e la sua inserzione nella membrana tilacoidale, e il riassetto dell'olocomplesso del PSII, seguito dall'attivazione del processo di trasporto degli elettroni grazie alla ricostruzione dell'eterodimero proteico D1/D2 (Melis, 1999).

I differenti valori di attività enzimatica nei vari organi della pianta (foglie, TR e MR) confermano la loro differente funzionalità: i tessuti fogliari hanno mostrato variazioni di attività più pronunciate, dovute all'effetto sinergico di alta intensità luminosa e perdita di acqua dalle cellule; le TR sono sembrate più sensibili allo stress idrico e ai suoi conseguenti effetti, mentre le MR hanno mantenuto una funzionalità prolungata e hanno presentato meno reattività, anche a condizioni di stress idrico. Nei tessuti radicali, variazioni più marcate di attività enzimatica si sono verificate nelle TR piuttosto che nelle MR.

5.2 Effetti dello stress idrico sui livelli di MDA e PRO e sull'attività LOX

Il mantenimento del potenziale idrico nelle piante sottoposte a stress idrico può essere ottenuto per mezzo dei meccanismi di aggiustamento osmotico: una riduzione

del potenziale idrico cellulare al di sotto del potenziale idrico esterno, causato da una diminuzione del potenziale osmotico, permette infatti l'entrata di acqua nella cellula. Le piante sono capaci di diminuire il potenziale osmotico all'interno della cellula mediante l'accumulo di osmoliti nel citoplasma. Alcuni dei geni che codificano per gli enzimi coinvolti nella biosintesi di questi osmoliti sono stati identificati e, in alcuni casi, è stato dimostrato che essi sono indotti dal deficit idrico (Bray, 1993; Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

La regolazione del potenziale osmotico e la compartimentalizzazione degli ioni avviene a spese del gradiente elettrochimico di H^+ e richiede il controllo integrato di differenti ATPasi presenti nelle membrane cellulari (Ingram e Bartels, 1996). Un evento importante durante i meccanismi di aggiustamento osmotico è la produzione di alcune proteine con domini intra-membrana e con strutture simili a canali: i membri di questa famiglia di proteine formano canali specifici per l'acqua, gli ioni o i soluti. Alcuni dei geni che codificano per queste proteine sono anch'essi indotti dallo stress idrico e potrebbero avere un ruolo importante nei meccanismi di aggiustamento osmotico perché, non appena le proteine canale si accumulano nel citoplasma in seguito a stress idrico, la cellula può avviare il movimento di acqua o di soluti dal vacuolo al citoplasma, variando così il contenuto idrico e il potenziale osmotico del citoplasma (Bray, 1993).

In aggiunta alla protezione contro il deficit idrico, la cellula può attivare anche meccanismi di difesa nei confronti dei patogeni per mezzo dell'osmotina e di un gruppo di proteine che ha la capacità di trasportare i lipidi. Anche i geni che codificano per le proteasi e l'ubiquitina, macromolecole coinvolte nei meccanismi di degradazione delle proteine, sono indotte dal deficit idrico; i prodotti di questi geni sono coinvolti nella degradazione delle proteine che sono denaturate durante la perdita di acqua nella cellula (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1996). In

opposizione a questi meccanismi di degradazione agiscono le proteine chaperone e gli inibitori delle proteasi, i cui geni sono anch'essi indotti dallo stress idrico. Sono stati identificati anche geni potenzialmente coinvolti nella regolazione e nella trasduzione del segnale durante i periodi di stress idrico, quali proteine chinasi, proteine nucleari e proteine che si legano all'RNA. Lo studio dei livelli di cDNA ha inoltre evidenziato che, in condizioni di stress idrico, sono espresse proteine inducibili dalla luce (ELIP) coinvolte nell'assemblaggio dei fotosistemi e nei cambiamenti morfologici dei cloroplasti: probabilmente queste proteine hanno la proprietà di legare i pigmenti o di aiutare a mantenere assemblate le strutture fotosintetiche essenziali per il ripristino delle funzioni alla fine dello stress (Ingram e Bartels, 1996). Sono stati identificati, infine, anche specifici fattori di trascrizione che riconoscono sequenze di DNA regolative facenti parte di geni indotti dallo stress idrico (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

I dati presentati in questa ricerca mostrano che il contenuto di PRO è influenzato significativamente dallo stress idrico (Tabb. IV, V e VI), in particolare nelle foglie e nelle MR (Tabb. IV e VI), e che il suo rapido incremento ha inizio con la diminuzione del potenziale idrico dei tessuti a diversi livelli di stress.

PRO può agire come soluto ad alta compatibilità con gli enzimi e con le altre macromolecole presenti nella cellula, proteggendole dai danni causati dallo stress idrico, e quindi può essere tranquillamente accumulata all'interno della cellula. L'aggiustamento osmotico per mezzo di PRO causa una diminuzione del potenziale osmotico nei tessuti delle piante esposte a basse disponibilità idriche ed è una risposta comune di alcune specie vegetali legnose ed erbacee durante lo stress osmotico indotto da deficit idrico, sia *in vivo* (Gzik, 1996; Sánchez et al., 1998; Hernandez et al., 2000) che *in vitro* (Martinez et al., 1996; Watanabe et al., 2000).

Un valore minore di potenziale osmotico potrebbe permettere alle foglie di contrastare una maggiore domanda evapotraspirativa evitando l'appassimento, al fine di mobilitare l'acqua nonostante una maggiore resistenza, causata da suoli asciutti o troppo profondi, come evidenziato da Holbrook e Putz (1996). La capacità dell'aggiustamento osmotico per mezzo dell'accumulo di soluti nell'olivo, considerata come un meccanismo di tolleranza in condizioni di siccità, è stata riportata da Larcher et al. (1981), ma è stata anche riscontrata durante lo stress idrico nelle foglie di vite (Downton, 1983; During, 1984; Schultz e Matthews, 1993), nel melo (Lakso et al., 1984, Wang et al., 1995), in *Citrus* spp. (Syvertsen et al., 1981) e nel ciliegio (Ranney et al., 1991). Al contrario, durante lo stress salino, l'olivo evita i danni principalmente per mezzo dell'esclusione del sale, mentre i meccanismi di regolazione attiva e l'accumulo di soluti organici sono meccanismi secondari (Gucci e Tattini, 1997). È stato anche proposto che PRO potrebbe agire come accettore di elettroni, evitando il danno dei fotosistemi causati dalla fotoinibizione ad opera delle AOS (Hare et al., 1998).

La comparazione dell'accumulo di PRO tra olivo e alcune cultivar di pero allo stesso livello di stress indica che il grado di accumulo di PRO in queste due specie arboree è quasi lo stesso (Sánchez et al., 1998), mentre il contenuto di PRO in due specie arbustive mediterranee (*Halimium halimifolium* L. e *Pistacia lentiscus* L.) durante periodi di deficit idrico è invece il doppio di quello dell'olivo (Ain-Lhout et al., 2001). Le variazioni di potenziale osmotico nell'olivo durante la nostra ricerca, inoltre, sono state maggiori di quelle osservate in *Ceratonia siliqua* e *Laurus nobilis* (Lo Gullo e Salleo, 1988).

Poiché l'olivo è una specie ben adattata a condizioni di stress durante i mesi estivi nelle aree mediterranee, caratterizzate da alti livelli di temperatura e di irraggiamento insieme a stress idrico, se comparato con altre specie arboree, noi

suggeriamo che questa specie possiede probabilmente altri meccanismi per contrastare lo stress idrico, oltre all'accumulo di PRO, come la chiusura stomatica e la disidratazione fogliare. Le piante di olivo, infatti, tendono a chiudere i loro stomi per evitare perdite mediante traspirazione, come osservato da Xiloyannis et al. (1988) e Fernández et al. (1997), prevenendo quindi l'assorbimento di CO₂ e la perdita di acqua. Queste osservazioni sono confermate dai nostri dati, i quali dimostrano diminuzioni del tasso traspirativo e della conduttanza stomatica durante l'esperimento, in parallelo con i valori di LWP (Figg. 15B-C e 16B-C), e, al contrario, un graduale incremento della concentrazione di CO₂ substomatica (Figg. 15D e 16D).

Altri osmoliti organici che si accumulano all'interno delle cellule potrebbero essere alcuni zuccheri come lo stachiosio e il mannitolo, prodotti nelle foglie e trasportati per mezzo del floema delle piante di olivo (Flora e Madore, 1993). Dichio et al. (1997), inoltre, hanno trovato che il glucosio e il mannitolo sono i carboidrati che maggiormente contribuiscono all'abbassamento dei valori potenziale osmotico in foglie di olivo anche, dal momento che soprattutto il mannitolo mantiene alte concentrazioni intracellulari.

Il danno ossidativo si manifesta con l'inattivazione delle componenti cellulari. Gli effetti di questo danno includono l'accumulo intracellulare dei perossidi degli acidi grassi e di MDA, l'ossidazione dei gruppi -SH dei residui di cisteina, la produzione di aldeidi delle proteine e di basi alterate negli acidi nucleici, e la comparsa di residui di istidina, tiroxina, triptofano e metionina nelle proteine danneggiate e/o soggette a proteolisi (Siedow, 1991). Le AOS prodotte durante lo stress ossidativo possono reagire con proteine, lipidi e acidi nucleici, determinando, rispettivamente, una minore attività enzimatica, un aumento della permeabilità delle membrane e una serie di mutazioni geniche.

Nei cloroplasti e probabilmente anche nei mitocondri delle cellule vegetali, le AOS sono eliminate per mezzo del sistema di enzimi antiossidanti nel ciclo di Mehler-Asada. Nei mitocondri delle cellule vegetali potrebbe essere presente un enzima chiave nella detossificazione delle AOS nei mitocondri di mammifero, la glutatione perossidasi, che agisce di concerto con la glutatione reduttasi nella riduzione di H_2O_2 e degli idroperossidi degli acidi grassi. Un ultimo sistema, costituito dalla proteina tioredoxina e dell'enzima tioredoxina riduttasi, potrebbe essere coinvolto nella regolazione dell'attività enzimatica come anche nell'eliminazione degli idroperossidi degli acidi grassi e di H_2O_2 (Møller, 2001).

Recenti studi hanno evidenziato che la perossidazione dei lipidi causata dall'incremento della produzione di $\cdot O_2^-$ nei tilacoidi, è rallentata da un aumento di concentrazione di ioni ferro, rame e manganese, assorbiti dalle radici e poi trasportati alle foglie delle piante sottoposte a stress idrico. Questo effetto può essere causato da un aumento della velocità della reazione di Haber-Weiss, la quale richiede metalli di transizione. Probabilmente, la pianta sottoposta a stress idrico aumenta la concentrazione di questi ioni metallici nelle foglie, per contrastare il danno ossidativo (Price e Hendry, 1991).

Durante lo stress idrico, avvengono grandi cambiamenti delle membrane cellulari, ed in particolare di quelle plastidiali, in particolar modo se i processi di riparazione non tengono il passo con i danni. Nelle membrane cellulari si assiste alla diminuzione del grado di insaturazione delle catene aciliche degli acidi grassi, alla de-esterificazione che rilascia acidi grassi e causa quindi variazioni della composizione lipidica. Lo stress idrico influenza la composizione ed il turnover dei lipidi di membrana, anche se le risposte al deficit idrico variano a seconda della specie, dell'entità e durata dello stesso (Smirnoff, 1993). Nel contesto dello stress ossidativo, gli studi sui lipidi dei tilacoidi (principalmente glicolipidi che contengono acido

linolenico) sono i più significativi perché è in queste membrane avvengono i maggiori cambiamenti. Non è ancora chiaro se tutti questi effetti siano da attribuire direttamente agli ossiradicali, ma quasi sicuramente lo stress idrico altera la composizione delle membrane tilacoidali (Siedow, 1991).

L'entità della maggior parte dei danni causati dallo stress ossidativo è difficile da misurare, ma una delle molecole indicatrici più importanti è la MDA, un prodotto della perossidazione degli acidi grassi.

Nell'ambito della nostra ricerca, il contenuto in MDA nelle WSP è aumentato più di tre volte nelle foglie (Tab. IV) e di circa tre volte nelle TR e nelle MR (Tabb. V e VI) durante il deficit idrico, rispetto ai valori delle CP. L'accumulo di MDA dovuto alle reazioni di perossidazione lipidica, come conseguenza del danno ossidativo, è stato osservato anche durante il deterioramento dei semi in girasole (Bailly et al., 1996) e in radici di *Coffea arabica* sottoposte a basse temperature (Queiroz et al., 1998).

L'aumento della produzione di AOS durante lo stress idrico, prodotte a causa dell'inattivazione dei centri di reazione del PS II (Schansker e van Rensen; 1996), potrebbe attivare specifici isoenzimi LOX, come osservato da Ye et al. (2000) nei fiori di *Arabidopsis*, e quindi causare la conseguente perossidazione dei lipidi di membrana. Questo potrebbe spiegare l'aumento di tre volte dell'attività LOX nei tessuti fogliari di olivo (Tab. IV) e l'incremento meno marcato nelle TR e nelle MR (Tabb. V e VI) durante il progressivo stress idrico. Il ruolo fisiologico specifico degli isoenzimi LOX nelle piante non è stato ancora stabilito. Le LOX sono in pratica ubiquitarie nel regno vegetale (Hildebrand, 1989) e sono coinvolte in molti processi fisiologici come la fioritura (Ye et al., 2000), la germinazione dei semi (Suzuki e Matsukura, 1997), lo scolorimento dei pigmenti (Pastore et al., 2000), la formazione del sapore e dell'aroma dei prodotti vegetali (Williams e Harwood, Williams et al., 2000), la crescita e lo sviluppo (Hildebrand et al., 1991). LOX, inoltre, potrebbe avere

un ruolo-chiave nella senescenza, nella resistenza ai pesticidi, nello stress fisico da ferita e nella biosintesi di molecole regolative come l'acido jasmonico e la traumatina (Siedow, 1991).

L'alto grado di perossidazione lipidica osservata in olivo potrebbe causare la produzione di messaggeri secondari di natura lipidica in grado di attivare alcuni geni associati allo stress idrico, in modo gerarchico, per mezzo di specifici fattori di trascrizione, al fine di dare inizio alla risposta della pianta alla disidratazione (Ingram e Bartels, 1996; Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1996). L'acido jasmonico, un altro prodotto del catabolismo degli idroperossidi degli acidi grassi, potrebbe agire come molecola regolativa con proprietà che inibiscono la crescita, analoghe a quelle dell'acido abscissico (Siedow, 1991), e ridurre la crescita dell'olivo durante condizioni di stress idrico, come anche osservato da Fernández et al. (1992).

I nostri risultati sull'attività LOX e sul livello di MDA dimostrano un maggiore danno ossidativo, in termini di perossidazione lipidica, nelle WSP rispetto alle WCP. Sebbene l'olivo sia una specie molto resistente nei confronti dello stress idrico, noi suggeriamo che la perdita di funzionalità fotosintetica osservata (Figg. 15A e 16A) sia stata causata dalla perossidazione lipidica indotta da AOS, come confermato dall'accumulo di MDA e dall'alta attività LOX in piante sottoposte a stress idrico, recentemente sottolineato da Lima et al. (2002). Questa ricerca dimostra che il danno delle membrane cellulari, in termini di perossidazione lipidica, dovuta ai meccanismi enzimatici (LOX) e non-enzimatici (AOS), è una diretta conseguenza del deficit idrico. Durante condizioni di stress idrico, i cloroplasti di olivo diventano più sensibili al danno ossidativo, in quanto le membrane tilacoidali sono più soggette al danno causato dalle AOS (Asada, 1999), e questo potrebbe essere la causa della perdita di funzionalità fotosintetica a livelli di stress idrico moderati e severi (Figg. 15A e 16A), come evidenziato da Angelopoulos et al. (1996).

L'aumento della concentrazione di MDA nei tessuti di olivo in condizioni di stress idrico suggeriscono che i meccanismi di riparazione non tengono il passo con il danno e che il deficit idrico influenza la composizione ed il ricambio dei lipidi di membrana. In particolare, avviene la perossidazione dei glicolipidi presenti nei tilacoidi, caratterizzati da un'alta proporzione di acidi grassi insaturi, e la conseguente produzione di diacilglicerolo, triacilglicerolo e acidi grassi liberi (Smirnoff, 1993). I livelli di MDA nelle piante di olivo sottoposte a stress idrico sembrano essere maggiori di quelli osservati in specie erbacee cresciute nelle medesime condizioni (Sairam et al., 1997/98); questa specie, quindi, anche se molto resistente alla siccità, dimostra avere un alto grado di danno ossidativo.

5.3 Effetti del ripristino idrico

I nostri risultati mostrano che le attività specifiche di SOD, CAT, APX, POD e LOX diminuiscono durante la fase di ripristino idrico, mentre PPO sembra essere l'unico enzima chiaramente indotto dal ripristino idrico (Tabb. VII, VIII e IX).

L'azione sinergica di deficit idrico, alti livelli di irraggiamento e alte temperature, produce perturbazioni nel metabolismo vegetale, diminuendo il tasso di assimilazione della CO₂ e, di conseguenza, la capacità della catena fotosintetica di trasporto elettronico (Asada, 1999; Jung 2000). Questo causa l'aumento dei livelli di AOS, poiché l'energia intercettata dai pigmenti fotosintetici è maggiore della capacità delle dissipazione termica di energia (Foyer et al., 1994). La curva di saturazione della fotosintesi indica che il tasso fotosintetico inizialmente aumenta linearmente all'aumentare dell'intensità luminosa per poi mantenersi stabile quando l'intensità luminosa raggiunge il livello di saturazione, oltre il quale le piante vanno incontro ad uno sbilanciamento tra i processi di assorbimento e di utilizzazione della luce; l'entità

di questo sbilanciamento dipende dall'intensità luminosa incidente e dal livello di saturazione della fotosintesi (Melis, 1999). Per esempio, ad intensità luminose oltre il livello di saturazione, l'apparato fotosintetico assorbe fotoni che non possono essere efficacemente utilizzati nel processo di produzione di fissazione di CO₂ e questo eccesso di fotoni è dissipato per mezzo di processi fotochimici non assimilatori, la grandezza dei quali aumenta linearmente con l'intensità luminosa oltre il livello di saturazione (Osmond et al., 1997).

Alti livelli di AOS sono determinanti per la risposta della pianta allo stress idrico. In particolare, O₂⁻ e H₂O₂ sembrano indurre diversi geni, in combinazione o separatamente, confermando che le AOS agiscono come molecole segnale durante le risposte allo stress (Van Breusegem et al., 2001), e che esse sono capaci di regolare il proprio livello intracellulare cambiando lo stato redox di specifici fattori di trascrizione (Bowler et al., 1992). Dal momento che le piante soggette a stress idrico sembrano aumentare le attività degli enzimi antiossidanti al fine di limitare il danno ossidativo (Martinez et al., 2001; Lima et al., 2002), di conseguenza, durante la fase di ripristino idrico sarebbe degno di nota un andamento opposto, cioè una diminuzione delle attività degli enzimi che eliminano le AOS, come infatti emerge dai nostri risultati. L'ipotesi dell'azione protettiva antiossidante durante gli stress ambientali è stata inoltre confermata da studi condotti su piante transgeniche con sovra-espressione dei geni codificanti per alcuni enzimi antiossidanti (Allen et al., 1997; Kornyeyev et al., 2001).

I differenti valori di attività enzimatica nei tessuti delle SHP e delle ICP provano il ruolo-chiave dell'intensità luminosa nella risposta delle piante durante il ripristino idrico. In particolare, le SHP hanno mostrato minori valori delle attività di SOD, APX e LOX e minori livelli di MDA di quelli presenti nelle ICP, soprattutto nel primo livello di recupero (Tabb. VII, VIII e IX).

SOD e APX sono i principali enzimi antiossidanti dei cloroplasti (Bowler et al. 1992, Mehlhorn et al., 1996; Asada, 1999): l'attività SOD regola i livelli di $\cdot\text{O}_2^-$ prodotto principalmente per mezzo della ferredossina ridotta nei cloroplasti, determina i livelli di $\cdot\text{O}_2^-$ nei mitocondri e nel citosol, e riduce la possibilità di formazione di $\cdot\text{OH}$, un ossidante molto forte con un'alta affinità per le molecole biologiche, per mezzo della reazione di Haber-Weiss e/o la reazione di Fenton catalizzata da ioni metallici (Scandalios, Smirnoff, 1993); APX è uno dei più diffusi enzimi antiossidanti nella cellula vegetale ed è coinvolto nella riduzione di H_2O_2 , un forte inibitore della fotosintesi, ad H_2O , usando AsA come donatore di elettroni (Mehlhorn et al., 1996). La maggiore riduzione delle attività di SOD e APX nelle SHP, rispetto alle ICP nello stesso livello di recupero (Tabb. VII, VIII e IX), suggerisce che minori livelli di PPFD potrebbero causare una diversa risposta dell'olivo allo stress ossidativo perché, in condizioni di ombreggiamento, il tasso di produzione di AOS, e conseguentemente la necessità di difese antiossidanti, è ridotta (Smirnoff, 1993). I nostri risultati, inoltre, mostrano che, dal momento che l'attività APX nelle radici (Tabb. VIII e IX) presenta valori minori di quelli delle foglie (Tab. VII), essa può essere attribuita soprattutto a chiAPX. La risposta delle ICP durante la fase di recupero, quindi, sembra coinvolgere la capacità di mantenere più alte le attività di SOD e APX, riducendo quindi il danno ossidativo causato dalle AOS.

Le piante sono maggiormente suscettibili alla fotoinibizione quando sono esposte a forti livelli di irraggiamento (Greer e Laing, 1992; Schansker e van Rensen, 1996; Hideg e Murata, 1997) e a stress ambientali quali deficit idrico (Angelopoulos et al., 1996), basse temperature (Solhaug e Haugen, 1998; Sonoike, 1999; Lidon et al., 2001) ed eccessivo calore (Law e Crafts-Brandner, 1999); esse quindi cercano di proteggersi dalla luce mediante risposte fisiologiche che determinano una diminuzione della radiazione incidente, come ad esempio il movimento delle foglie e

dei cloroplasti o la produzione di cuticole cerose, ma questi non sono i soli meccanismi che mettono in atto. Quando, infatti, le piante sono esposte ad un livello d'intensità luminosa in eccesso rispetto a quella che può essere utilizzata nella catena fotosintetica di trasporto elettronico, la dissipazione non-fotochimica dell'eccesso di energia, in parte ottenuta per mezzo del ciclo delle xantofille, costituisce un meccanismo fotoprotettivo. Nelle piante superiori sottoposte ad un eccesso di energia luminosa, i centri del PS II soggetti a fotoinibizione si accumulano in regioni impilate della membrana in cui la degradazione della proteina D1 è impedita; quando sopraggiunge nuovamente il livello normale di irraggiamento, questi centri danneggiati del PS II sono velocemente riparati (Anderson et al., 1998). A questo proposito, Angelopoulos et al. (1996) hanno scoperto che nell'olivo, durante lo stress idrico, avviene un'inattivazione dipendente dalla luce delle reazioni fotochimiche primarie associate al PS II, con una conseguente diminuzione dei tassi fotosintetici, non dovuta alla componente stomatica.

Gli andamenti dei parametri fisiologici indicano che sia le SHP che le ICP sono capaci di ripristinare il LWP durante i primi giorni di ripristino idrico e che le SHP presentano un recupero più veloce dei tassi fotosintetici (Fig. 17A), ma un ritardo nel recupero della funzionalità traspirativa (Fig. 17B), se comparate con le ICP. Questo potrebbe essere determinato da una migliore risposta delle SHP contro lo stress idrico o, al contrario, da un minore danno ossidativo nelle SHP. Noi suggeriamo che l'effetto di danneggiamento sinergico di deficit idrico, alti livelli di irraggiamento e alte temperature nei cloroplasti, è alleviato se le piante crescono in condizioni di livelli minori di PPFD. Nelle ICP, le maggiori attività di SOD e APX durante il periodo di recupero potrebbero permettere all'apparato cellulare una migliore risposta allo stress ossidativo determinato dall'azione delle AOS. I maggiori livelli di fotosintesi nelle SHP, quindi, non sono quindi causati dalla regolazione stomatica, dal momento che i valori

di tasso traspirativo e conduttanza stomatica nelle SHP sono minori di quelli delle ICP nei primi due livelli di recupero, ma da un minore grado di fotoinibizione (Figg. 17B-C)

Gli isoenzimi LOX nelle piante sono coinvolti in molti processi fisiologici quali la fioritura (Ye et al., 2000), la germinazione dei semi (Suzuki e Matsukura, 1997), la formazione del sapore e dell'aroma dei prodotti vegetali (Williams et al., 2000), la crescita e lo sviluppo (Hildebrand et al., 1991), lo scolorimento dei pigmenti, la senescenza, la resistenza ai patogeni, lo stress fisico da contatto e la biosintesi di molecole regolative quali la traumatina e l'acido jasmonico, quest'ultimo con proprietà che inibiscono la crescita analoghe a quelle dell'acido abscissico (Siedow, 1991). La perossidazione lipidica, inoltre, produce secondi messaggeri derivanti dai lipidi in grado di attivare alcuni geni associati allo stress idrico (Ingram e Bartels, 1996; Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997), e molecole regolative, quali l'acido jasmonico, al fine di dare inizio alla risposta della pianta alla disidratazione.

I nostri risultati riguardanti l'attività LOX e il livello di MDA (Tab. X) forniscono la prova di un danno ossidativo limitato, in termini di perossidazione lipidica, nelle SHP, rispetto alle ICP. L'incremento di produzione delle AOS durante lo stress idrico potrebbe attivare specifici isoenzimi LOX, come osservato da Ye et al. (2000), e questo effetto potrebbe essere più pronunciato nelle piante di olivo sottoposte a livelli di PFD ambientali. Sebbene l'olivo sia molto resistente allo stress idrico, l'osservata perdita di funzionalità fotosintetica sembra sia causata dalla perossidazione lipidica indotta dalle AOS, quest'ultima confermata dall'accumulo di MDA e dall'alta attività LOX nelle piante sottoposte a stress idrico, come studiato da Lima et al. (2002).

Le AOS sono prodotte dall'inattivazione dei centri di reazione del PS II (Schansker e van Rensen, 1996). La diminuzione della concentrazione di MDA nelle SHP e nelle ICP indica che, durante il ripristino idrico in seguito al deficit idrico, i meccanismi di riparazione cominciano a tenere il passo al danno ossidativo e che il

recupero della composizione e il ricambio dei lipidi di membrana è più veloce nelle piante cresciute in condizioni di bassi valori di PPFD. Le variazioni del grado di perossidazione lipidica osservate in questa ricerca (Tab. X) sono in accordo con i risultati di altri studi (Bailly et al., 1996; Queiroz et al., 1998) e supportano l'ipotesi che un ripristino idrico dopo un deficit idrico severo può ridurre la perossidazione dei lipidi di membrana; tale riduzione potrebbe causare una riduzione della fluidità di membrana, che a sua volta potrebbe condurre ad una minore perdita di elettroliti (Smirnov, 1993).

Gli isoenzimi CAT hanno tassi di attività catalitica molto alti, ma basse affinità di substrato (Noctor e Foyer, 1998); CAT, inoltre, è molto sensibile alla fotoinattivazione e alla degradazione (Feierabend et al., 1992; Shang e Feierabend, 1999). I nostri risultati mostrano che l'attività CAT sembra essere influenzata da differenti livelli di PPFD: il ripristino idrico, infatti, ha causato marcati aumenti di attività CAT, sia nelle SHP che nelle ICP, ma il recupero nelle ICP è più veloce (Tabb. VII, VIII e IX). Dal momento che CAT è confinata principalmente nei microsomi, e in particolare nei perossisomi (Havir e McHale, 1987), dove essa elimina H_2O_2 prodotto dalla glicolato ossidasi, una diminuzione della sua attività potrebbe essere considerata una prova indiretta di una ridotta fotorespirazione, ipotesi confermata anche dall'andamento della concentrazione della CO_2 substomatica nelle SHP e nelle ICP (Fig. 17D).

Alti valori di CO_2 substomatica nelle ore più calde del giorno, quando gli stomi dell'olivo sono chiusi (Xiloyannis, 1988; Fernández, 1997), indicano un'attiva fotorespirazione. La nostra ipotesi, quindi, è che la riattivazione di CAT durante il ripristino idrico in seguito ad uno stress idrico severo causa la diminuzione della concentrazione di CO_2 substomatica, perché quest'ultima deriva quasi interamente dai processi fotorespiratori.

Un modo differente per eliminare H_2O_2 è per mezzo delle perossidasi, che hanno una maggiore affinità per H_2O_2 rispetto a CAT e richiedono alcuni composti fenolici (es guaiacolo o pirogallolo) come substrati (Mehlhorn et al., 1996). Come per gli enzimi sopra descritti, le diminuzioni delle attività POD e IAAox durante il ripristino idrico sono avvenute sia nelle SHP che nelle ICP (Tabb. VII, VIII e IX). I risultati mostrano che le attività POD e IAAox sono state scarsamente influenzate dai livelli di PPFD durante il recupero, ad eccezione dell'attività POD nelle TR e nelle MR, in cui i valori nelle ICP sono stati più alti di quelli delle SHP in tutti e tre i livelli di recupero (Tabb. VIII e IX). Le isoforme POD rivestono una grande importanza nelle specie legnose: esse sono coinvolte nella biosintesi della lignina, nell'ossidazione di IAA e nella modulazione delle proprietà della membrana cellulare durante la crescita (Gaspar et al., Lee e Lin, 1995). IAA, inoltre, agisce come molecola regolativa, causando un aumento dell'attività POD e quindi anche della deposizione di lignina nelle pareti cellulari (Sitbon et al., 1999). Noi suggeriamo che l'aumento dell'attività POD durante lo stress idrico potrebbe causare una limitazione della crescita nelle piante di olivo, soprattutto nelle radici (Fernández et al., 1992), dovuta all'alto grado di lignificazione e dell'ossidazione di IAA, e che il ripristino dell'attività POD durante il successivo ripristino idrico potrebbe permettere alle piante una ripresa della crescita, in particolare nelle SHP, i cui valori di attività POD nelle radici sono più bassi di quelli delle ICP (Tabb. VIII e IX).

In controtendenza rispetto agli altri enzimi studiati, un maggiore incremento di attività PPO, in relazione al livello di recupero, è stato riscontrato nelle SHP, rispetto alle ICP (Tabb. VII, VIII e IX). I composti fenolici, substrati di PPO, sono composti secondari fisiologicamente attivi con un'azione antiossidante non enzimatica. I fenoli sono molto abbondanti nelle foglie di olivo (Le Tutour e Guedon, 1992; Ryan et al., 2002) e sono coinvolti nella protezione dell'auxina o nel suo catabolismo (Mato et al.,

1994, Faivre-Rampant et al., Hrubcová et al., 2000), nella modulazione della plasticità della parete cellulare (Fry, 1986) e nelle dinamiche degli scambi gassosi (Purohit et al., 1991). Dal momento che PPO possiede un'attività proteolitica (Kuwabara e Katoh, 1999), l'osservato aumento della sua attività durante il ripristino idrico, particolarmente marcato nei tessuti delle SHP (Tabb. VII, VIII e IX), permetterebbe all'olivo di rimuovere le proteine danneggiate dalle AOS durante lo stress idrico e riparare la membrana cellulare per mezzo di legami crociati dei polimeri della matrice (Fry, 1986). L'attività PPO, inoltre, potrebbe regolare lo stato redox dei composti fenolici, al fine di permettere l'efficace funzionamento del sistema antiossidante ad azione non-enzimatica.

6. CONCLUSIONI

Dai dati di questa ricerca, riguardante i meccanismi di difesa antiossidativi in olivo, emerge che questa specie presenta un evidente incremento di attività degli enzimi antiossidanti quando le piante sono sottoposte a condizioni di stress idrico. Questo processo è finemente regolato e permette l'espressione di vari enzimi, tutti coinvolti in un meccanismo di difesa comune contro le AOS, causa principale del danno ossidativo.

I risultati ottenuti da questa ricerca pongono l'accento sul ruolo fondamentale di alcuni enzimi antiossidanti nella protezione dell'apparato cellulare durante condizioni di deficit idrico, anche se ricerche sulle variazioni delle attività di altri enzimi antiossidanti (es. MDHA riduttasi, deidroascorbato riduttasi e glutazione riduttasi) e dell'azione di altre molecole che presentano un'azione non-enzimatica (in particolar modo composti fenolici, α -tocoferolo, GSH e AsA) potrebbero fornire una quadro completo delle risposte dell'olivo allo stress idrico e spiegare meglio il suo alto grado di resistenza a questo specifico stress abiotico.

Una maggiore tolleranza allo stress idrico potrebbe dipendere da una moltitudine di fattori, tra cui la natura ed il grado dello stress imposto, la sovraespressione di specifici isoenzimi, l'età della pianta e le condizioni di crescita. Il ruolo degli enzimi antiossidanti nelle situazioni di stress non sarebbe solo quello di controllare l'accumulo di AOS e di limitare così il danno ossidativo, ma anche di orchestrare l'espressione genica attraverso la produzione di appropriate molecole segnale (H_2O_2 , GSH, AsA, deidroascorbato). Oltre alla funzione di sistema enzimatico per eliminare le AOS, il sistema antiossidativo potrebbe avere anche la funzione di regolare lo stato redox cellulare e attivare così alcuni meccanismi redox di trasduzione del segnale. Poiché H_2O_2 è una molecola in grado di tradurre il segnale

ed è molto diffusibile, esso potrebbe “avvertire” i processi metabolici cellulari della presenza di stress biotici e abiotici, causando specifiche risposte della pianta, soprattutto a breve termine (Noctor e Foyer, 1998).

I nostri risultati dimostrano che le variazioni delle attività enzimatiche e la concentrazione di MDA dipendono dall'effetto dei diversi livelli di irraggiamento durante il ripristino idrico, sia nelle foglie che nelle radici. Su questa base, possiamo confermare che l'intensità luminosa ha un ruolo-chiave nella funzionalità dei processi metabolici delle piante soggette a condizioni di stress (Schansker e van Rensen, 1996; Hideg e Murata, 1997). La riparazione del danno dovuto allo stress ossidativo, generato dall'azione sinergica di stress idrico e alti livelli di irraggiamento, è quindi associato ad una diversa risposta antiossidante nelle piante cresciute in condizioni di ombreggiamento (SHP), rispetto a quelle cresciute in condizioni di irraggiamento naturale (ICP). Possiamo quindi affermare che, in questa ricerca, le SHP hanno affrontato un minore stress ossidativo rispetto alle ICP e che bassi livelli di PPFD hanno permesso un'efficace protezione antiossidante del PS II dal danno fotochimico dovuto all'azione delle AOS. Questo è stato confermato dai valori più bassi di concentrazione di MDA e di attività LOX nelle SP, rispetto alle ICP.

In base ai dati in nostro possesso, possiamo asserire che la fotoinibizione in olivo è accentuata quando è presente un'azione sinergica di deficit idrico e alta intensità luminosa, durante la quale avviene uno sbilanciamento tra assorbimento di energia luminosa e sua utilizzazione nel PS II (Smirnoff, 1993; Asada, 1999; Jung, 2000). Dai nostri dati, sembra evidente che la minore espressione del sistema enzimatico antiossidante nelle SHP rispetto alle ICP sia dovuta ad una ridotta necessità di rimozione di AOS, sebbene sufficiente per permettere alle SHP un certo grado di controllo del danno ossidativo.

Al contrario, nelle ICP, l'aumento del danno cellulare sembra riflettere uno sbilanciamento dell'equilibrio tra produzione di AOS e meccanismi di difesa, in favore della formazione di AOS (Osmond et al., 1997; Noctor e Foyer, 1998), e di conseguenza è richiesto un maggiore tasso di protezione contro lo il danno ossidativo. Dal momento che la fotoinibizione è funzione sia del fotodanno che della riparazione (Melis, 1999), la conoscenza delle variazioni di attività di altri enzimi antiossidanti e le misurazioni dei perdita di elettroliti e di fotoinibizione potrebbero fornire una visione più esauriente sulla risposta dell'olivo allo stress idrico.

I risultati qui discussi, infine, supportano l'ipotesi che un accumulo di PRO durante lo stress idrico è parte di una risposta fisiologica dell'olivo ad un intenso stress idrico. In condizioni di stress idrico, le piante attivano meccanismi di aggiustamento osmotico non solo nelle foglie, ma anche nelle radici, aumentando così la capacità di estrarre acqua dal suolo, come osservato da Holbrook e Putz (1996).

I nostri risultati forniscono prove sul fatto che esiste una correlazione diretta tra il grado di stress idrico e la concentrazione di PRO, anche se questo non è il principale contributo all'alto grado di resistenza di questa specie. PRO, di conseguenza, potrebbe essere utilizzata come indicatore biochimico del livello di stress idrico nelle piante di olivo. Dal nostro studio sull'andamento dei livelli di MDA in risposta al deficit idrico, possiamo concludere che anche MDA può essere considerata un efficace indicatore del danno ossidativo indotto da stress idrico nei tessuti di olivo, in particolare ad alti livelli di stress. L'aumento dell'attività LOX, inoltre, durante il progressivo deficit idrico suggerisce che questo enzima è indotto da condizioni di stress idrico.

I dati qui discussi possono essere importanti per una migliore comprensione dell'andamento della crescita vegetativa delle piante di olivo in regioni semi-aride e

delle conseguenti ripercussioni sullo sviluppo e sulla qualità dei frutti e dell'olio. Tutte queste informazioni, insieme con l'utilizzo di nuove tecniche molecolari, permetteranno in futuro, di stimare le concentrazioni di AOS e di composti antiossidanti, e contribuire in questo modo al vigore e alla sostenibilità della produttività agricola, nonché ai programmi di miglioramento genetico di questa specie.

7. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121-126
2. Ain-Lhout F, Zunzunegui, FA, Diaz Barradas, MC, Tirado R, Clavijio A, Garcia Novo F (2001) Comparison of proline accumulation in two Mediterranean shrubs subjected to natural and experimental water deficit. *Plant Soil* 230: 175-183
3. Allen RD, Webb RP, Schake SA (1997) Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. *Free Radical Biol Med* 23 (3): 473-479
4. 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
5. 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
6. Asada K (1992) Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* 85: 235-241
7. 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
8. Axelrod B, Cheesbrough TM, Laakso S (1981) Lipoxygenase from soybeans. *Methods Enzymol* 71: 441-451
9. Bacon MA, Thompson DS, Davies WJ (1997) Can cell wall peroxidase activity explain the leaf growth response of *Lolium temulentum* L. during drought? *J Exp Bot* 48 (317): 2075-2085
10. Bailly C, Benamar A, Corbineau F, Côme D (1996) Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seed as related to deterioration during accelerated aging. *Physiol Plant* 97: 104-110
11. Bakardjieva NT, Christov KN, Christova NV (2000) Effect of calcium and zinc on the activity and thermostability of superoxide dismutase. *Biol Plant* 43 (1): 73-78
12. Bates LS, Waldren R P, Teare IK (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39: 205-208
13. Bird RP, Draper HH (1984) Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. *Methods Enzymol* 105: 299-305
14. Bolwell GP (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr Opin Plant Biol* 2: 287-294
15. Bowler C, Van Montagu M, Inzé D (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 83-116
16. Bray EA (1993) Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol* 103: 1035-1040
17. Busk, P. K., Pagès, M. (1998) Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol Biol* 37: 425-435
18. Cañal MJ, Tamés RS, Fernández B (1988) Peroxidase and polyphenol oxidase activities in *Cyperus esculentus* leaves following glyphosate applications. *Physiol Plant* 74: 125-130
19. Chance B, Maehly AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol* 2: 764-775.
20. Chiang HH, Dandekar AM (1995) Regulation of proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh during development and in response to desiccation. *Plant Cell Environ* 18: 1280-1290
21. Dichio B, Nuzzo V, Xiloyannis C, Celano G, Angelopoulos K (1997) Drought stress-induced variation of pressure-volume relationships in *Olea europaea* L. cv. "Coratina". *Acta Hort* 449 (3): 401-409
22. 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
23. Douce R, Neuburger M (1999) Biochemical dissection of photorespiration. *Curr Opin Plant Biol* 2: 214-222

24. Downton WJS (1983) Osmotic adjustment during water stress protects the photosynthetic apparatus against photoinhibition. *Plant Sci Lett* 30:137-143
25. Du D, Bramlage WJ (1992) Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *J Agric Food Chem* 40: 1566-1570
26. During H (1984) Evidence for osmotic adjustment to drought in grapevines (*Vitis vinifera* L.). *Vitis* 23: 1-10
27. Espín JC, Morales M, Varón R, Tudela J, García-Cánovas F (1997) Monophenolase activity of polyphenol oxidase from blanquilla pear. *Phytochemistry* 44 (1): 17-22
28. Faivre-Rampant O, Kevers C, Gaspar T (2000) IAA-oxidase activity and auxin protectors in nonrooting, rac, mutant shoots of tobacco in vitro. *Plant Sci* 153: 73-80
29. Fambrini M, Rossi VD, Sebastiani L, Verzieri P, Pugliesi C (1999) Characterization of electrophoretic variants for Cu/Zn SOD in sunflower: response to oxidative stress. *Helia* 22 (30): 152-162
30. Feierabend J, Schaan C, Hertwig B (1992) Photoinactivation of catalase occurs under both high and low temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II. *Plant Physiol* 100: 1554-1561
31. Fernández, JE, Moreno F, Martín-Aranda J, Fereres E (1992) Olive-tree root dynamics under different soil water regimes. *Agricultura Mediterranea* 122: 225-235
32. Fernández JE, Moreno F, Girón IF, Blázquez OM (1997) Stomatal control of water use in olive tree leaves. *Plant Soil* 190: 179-192
33. Feussner I, Kindl H (1994) Particulate and soluble lipoxygenase isozymes. Comparison of molecular and enzymatic properties. *Planta* 194: 22-28
34. Flexas J, Escalona JM, Medrano H (1999) Water stress induces different levels of photosynthesis and electron transport rate regulation in grapevines. *Plant Cell Environ* 22: 39-48
35. Flora LL, Madore MA (1993). Stachyose and mannitol transport in olive (*Olea europaea* L.). *Planta* 189: 484-490
36. Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiol Plant* 92: 696-717
37. Foyer CH, Mullineaux PM (1998) The presence of dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase in plant tissues. *FEBS Lett* 425: 528-529
38. Foyer CH, Theodoulou FL, Delrot S (2001) The functions of inter- and intracellular glutathione transport system in plants. *Trends Plant Sci* 6 (10): 486-492
39. Fry SC (1986) Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu Rev Plant Physiol* 37: 165-186
40. Gaspar T, Penel C, Castillo FJ, Greppin H (1985) A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiol Plant* 64: 418-423
41. Ghoulam C, Foursy A, Fares K (2002) Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environ Exp Bot* 47: 39-50
42. Greer DH, Laing WA (1992) Photoinhibition of photosynthesis in intact kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) leaves: Changes in susceptibility to photoinhibition and recovery during the growth season. *Planta* 186: 418-425
43. Gucci R, Tattini M (1997) Salinity tolerance in olive. *Hort Rev* 21: 177-214
44. Gzik A (1996) Accumulation of proline and pattern of α -amino acids in sugar beet plants in response to osmotic, water and salt stress. *Environ Exp Bot* 36: 29-38
45. Hare PD, Cress WA, Van Staden J (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ* 21: 535-553
46. Havir EA, McHale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* 84: 450-455
47. Hernandez S, Deleu C, Larher F (2000) Accumulation de proline dans les tissus foliaires de tomate en réponse à la salinité. *Life Sci* 323 : 551-557

48. Hideg É, Murata N (1997) The irreversible photoinhibition of the photosystem II complex in leaves of *Vicia faba* under strong light. *Plant Sci* 130: 151-158
49. Hildebrand DF (1989) Lipoxygenases. *Physiol Plant* 76: 249-253
50. Hildebrand DF, Versluys GB, Collins GB (1991) Changes in lipoxygenase isozyme levels during soybean embryo development. *Plant Sci* 75: 1-8
51. Holbrook NM, Putz FE (1996) From epiphyte to tree: differences in leaf structure and leaf water relation associated with the transition in growth form in eight species of hemiepiphytes. *Plant Cell Environ* 19: 631-642
52. Hrubcová M, Cvikrová M, Eder J, Zon' J, Macháčková I (2000) Effect of inhibition of phenylpropanoid biosynthesis on peroxidase and IAA-oxidase activities and auxin content in alfalfa suspension cultures. *Plant Physiol Biochem* 38: 949-956
53. Ingram J, Bartels D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 377-403
54. Inzé D, Van Montagu M (1995) Oxidative stress in plants. *Curr Opin Biotech* 6: 153-158
55. Jackson C, Dench J, Moore L, Halliwell B, Foyer CH, Hall DO (1978) Subcellular localisation and identification of superoxide dismutase in the leaves of higher plants. *Eur J Biochem* 91: 339-344
56. Jung S, Kim JS, Cho KY, Tae GS, Kang BG (2000) Antioxidant responses of cucumber (*Cucumis sativus*) to photoinhibition and oxidative stress induced by norflurazon under high and low PPFDs. *Plant Sci* 153: 145-154
57. Kornyejev D, Logan BA, Payton P, Allen RD, Holaday AS (2001) Enhanced photochemical light utilization and decreased chilling-induced photoinhibition of photosystem II in cotton overexpressing genes encoding chloroplast-targeted antioxidant enzymes. *Physiol Plant* 113: 323-331
58. Kuwabara T, Katoh Y (1999) Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant Cell Physiol* 40 (10): 1029-1035
59. Lakso AN, Geyer AS, Carpenter SC (1984) Seasonal osmotic relations in apple leaves of different ages. *J Amer Soc Hort Sci* 109: 544-547
60. Larcher W, Moraes JAPV, Bauer H (1981) Adaptive responses of leaf water potential, CO₂ gas exchange and water use efficiency of *Olea europaea* during drying and rewatering. In NS Margaris, HA Mooney, eds, Components of productivity of Mediterranean-climate regions. Basic and applied aspects, The Hague: Dr W. Junk Publisher, pp 77-84
61. Law RD, Crafts-Brandner SJ (1999) Inhibition and acclimation of photosynthesis to heat stress is closely correlated with activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiol* 120: 173-181
62. Le Totour B, Guedon D (1992) Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry* 31 (4): 1173-1178
63. Lee TM, Lin YH (1995) Changes in soluble and cell wall-bound peroxidase activities with growth in anoxia-treated rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles and roots. *Plant Sci* 106: 1-7
64. Leung J, Giraudat J (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Physiol Plant Mol Biol* 49: 199-222
65. Lidon FC, Ribeiro G, Santana H, Marques H, Correia K, Gouveia S (2001) Photoinhibition in chilling stressed leguminosae: comparison of *Vicia faba* and *Pisum sativum*. *Photosynthetica* 39 (1): 17-22
66. Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environ Exp Bot* 47: 239-247
67. 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
68. MacFarlane GR, Burchett MD (2001) Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Mar Pollut Bull* 42 (3): 233-240
69. Macri F, Braidot E, Petrusa E, Vianello A (1994) Lipoxygenase activity associated to isolated soybean plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 1215: 109-114

70. Madamanchi NR, Donahue JL, Cramer CL, Alscher RG, Pedersen K (1994) Differential response of Cu,Zn superoxide dismutases in two pea cultivars during a short-term exposure to sulfur dioxide. *Plant Mol Biol* 26: 95-103
71. Marnett LJ (1999) Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424: 83-95
72. Martinez CA, Maestri M, Lani EG (1996) In vitro salt tolerance and proline accumulation in Andean potato (*Solanum* spp.) differing in frost resistance. *Plant Sci* 116: 177-184
73. Martinez CA, Loureiro ME, Oliva MA, Maestri M (2001) Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. *Plant Sci* 160: 505-515
74. Marziah M, Ariffin SZ, Shamsuddin H (1995) Effects of Al on growth, nodulation and polyphenol oxidase activities in groundnut. *Soil Biol Biochem* 27 (4/5): 697-681
75. Masia A (1998) Superoxide dismutase and catalase activities in apple fruit during ripening and post-harvest and with special reference to ethylene. *Physiol Plant* 104: 668-672
76. Mato MC, Méndez J, Vázquez A (1994) Polyphenolic auxin protectors in buds of juvenile and adult chestnut. *Physiol Plant* 91: 23-26
77. McEldoon JP, Pokora AR, Dordick JS (1995) Lignin peroxidase-type activity of soybean peroxidase. *Enz Microb Techn* 17: 359-365
78. Mehlhorn H, Lelandais M, Korth HG, Foyer CH (1996) Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Lett* 378: 203-206
79. 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
80. Møller IM (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 561-591
81. Morell S, Follmann H, De Tullio M, Häberlein I (1997) Dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase are phantom indicators of oxidative stress in plants. *FEBS Lett* 414: 567-570
82. Moreno F, Fernández JE, Clothier BE, Green SR (1996) Transpiration and root water uptake by olive trees. *Plant Soil* 184: 85-96
83. 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
84. 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
85. Nilsen ET, Orcutt DM (1994) Antagonistic interactions between stressors: Light intensity and water stress. In “The physiology of plants under stress - Abiotic Factors”, John Wiley & Sons, Inc., Virginia Polytechnic Institute and State University: 533-534.
86. Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 249–279
87. Noctor G, Veljovic-Jovanovic, Foyer CH (2000) Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signalling. *Phil Trans R Soc Lond B* 355: 1465-1475
88. Nogués S, Baker NR (2000) Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. *J Exp Bot* 51 (348): 1309-1317
89. Ohya T, Morimura Y, Saji H, Mihara T, Ikawa T (1997) Purification and characterization of ascorbate peroxidase in roots of Japanese radish. *Plant Sci* 125: 137-145
90. 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

91. Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalder B, Bartsch H (2000) Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem Toxicol* 38: 647-659
92. Pastore D, Trono D, Padalino L, Simone S, Valenti D, Di Fonzo N, Passerella S (2000) Inhibition by α -tocopherol and L-ascorbate of linoleate hydroperoxidation and β -carotene bleaching activities in durum wheat semolina. *J Cereal Sci* 31: 41-54
93. Pereira GJG, Molina SMG, Lea PJ, Azevedo RA (2002) Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. *Plant Soil* 239: 123-132
94. Price AH, Hendry GAF (1991) Iron-catalysed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. *Plant Cell Environ* 14: 477-484
95. Purohit S, Laloraya MM, Bhartu S (1991) Effect of phenolic compounds on abscisic acid-induced stomatal movement: structure – activity relationship. *Physiol Plant* 81: 79-82
96. Queiroz CGS, Alonso A, Mares-Guia M, Magalhães AC (1998) Chilling-induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea arabica* L. roots. *Biol Plant* 41 (3): 403-413
97. Ranney TG, Bassuk NL, Whitlow TH (1991) Osmotic adjustment and solute constituents in leaves and roots of water-stressed cherry (*prunus*) trees. *J Amer Soc Hort Sci* 116: 684-688
98. Rescigno A, Sollai F, Rinaldi AC, Soddu G, Sanjust E (1997) Polyphenol oxidase activity staining in polyacrylamide electrophoresis gels. *J Bioch Biophys Meth* 34: 155–159
99. Ricard J, Job D (1974) Reaction mechanisms of indole-3-acetate degradation by peroxidases (a stopped-flow and low-temperature spectroscopic study). *Eur J Biochem* 44: 359-374
100. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga, G (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 2 (4): 152-159
101. Rodríguez-Rosales MP, Kerkeb L, Ferrol N, Donaire JP (1998) Lipoxygenase activity and lipid composition of cotyledons and oil bodies of two sunflower hybrids. *Plant Physiol Bioch* 36 (4): 285-291
102. Rubery PH (1972) Studies on indole acetic acid oxidation by liquid medium from crown gall tissue culture cells: the role of malic acid and related compounds. *Biochim Biophys Acta* 261: 21-34
103. Rubio MC, González EM, Minchin FR, Webb KJ, Arrese-Igor C, Ramos J, Becana M (2002) Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases. *Physiol Plant* 115: 531-540
104. Ryan D, Antolovich M, Prenzler P, Robards K, Lavee S (2002) Biotransformation of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Sci Hort* 92: 147-176
105. Sairam RK, Shukla DS, Saxena DC (1997/98) Stress induced injury and antioxidant enzymes in relation to drought tolerance in wheat genotypes. *Biol Plant* 40 (3): 357-364
106. Sairam RK, Deshmukh PS, Saxena DC (1998) Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biol Plant* 41 (3): 387-394
107. Sairam RK, Deshmukh PS, Saxena DC (2000) Increased antioxidant activity under elevated temperatures: a mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes. *Biol Plant* 43 (2): 245-251
108. Sakharov IY, Ardila GB (1999) Variations of peroxidase activity in cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans during their ripening, fermentation and drying. *Food Chem* 65: 51-54
109. Sala JM, Lafuente MT (2000) Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling. *Postharvest Biol Tec* 20: 81-89
110. Sánchez FJ, Manzanares M, de Andrei EF, Tenorio JL, Ayerbe L (1998) Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. *Field Crop Res* 59: 225-235
111. Scalet M, Federico R, Guido MC, Manes F (1995) Peroxidase activity and polyamine changes in response to ozone and simulated acid rain in aleppo pine needles. *Environ Exp Bot* 35 (5): 417-425

112. Scandalios JG (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol* 101: 7-12
113. Scebba F, Sebastiani L, Vitagliano C (2001) Activities of antioxidant enzymes during senescence of *Prunus armeniaca* leaves. *Biol Plant* 44 (1): 41-46
114. Schansker G, van Rensen JJS (1996) Mechanism of photoinhibition in pea thylakoids: effects of irradiance level and pH. *Bioch Bioph Acta* 1276: 239-245
115. Schantz ML, Schreiber H, Guillemaut P, Schantz R (1995) Changes in ascorbate peroxidase during fruit ripening in *Capsicum annuum*. *FEBS Lett* 358: 149-152
116. Schultz HR, Matthews MA (1993) Growth, Osmotic Adjustment, and Cell-Wall Mechanics of Expanding Grape Leaves during Water Deficits. *Crop Sci* 33: 287-294
117. Schwanz P, Polle A (2001) Differential stress responses of antioxidative systems to drought in pendunculate oak (*Quercus robur*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) grown under high CO₂ concentrations. *J Exp Bot* 52 (354): 133-143
118. Shang W, Feierabend J (1999) Dependence of catalase photoinactivation in rye leaves on light intensity and quality and characterization of a chloroplast-mediated inactivation in red light. *Photosynthesis Research* 59: 201-213
119. Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot* 53 (372): 1305-1319
120. Shikanai T, Takeda T, Yamauchi H, Sano S, Tomizawa K, Yokota A, Shigeoka S (1998) Inhibition of ascorbate peroxidase under oxidative stress in tobacco having bacterial catalase in chloroplasts. *FEBS Lett* 428: 47-51
121. Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1996) Molecular responses to drought and cold stress. *Curr Opin Biotech* 7: 161-167
122. Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol* 115: 327-334
123. Shinshi H, Noguchi M (1975) Relationship between peroxidase, IAA oxidase and polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 14: 1255-1258
124. Siedow JN (1991) Plant lipoxygenase: structure and function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 145-188
125. Sitbon F, Hennion S, Little CHA, Sundberg B (1999) Enhanced ethylene production and peroxidase activity in IAA-overproducing transgenic tobacco plants is associated with increased lignin content and altered lignin composition. *Plant Sci* 141: 165-173
126. Smirnov N (1993) The role of active oxygen in the response to water deficit and desiccation. *New Phytol* 125: 27-58
127. Smirnov N (2000) Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-facetted molecule. *Curr Opin Plant Biol* 3: 229-235
128. Solhaug KA, Haugen J (1998) Seasonal variation of photoinhibition of photosynthesis in bark from *Populus tremula* L. *Photosynthetica* 35 (3): 411-417
129. Sonoike K (1999) The different roles of chilling temperatures in the photoinhibition of photosystem I and photosystem II. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 48: 136-141
130. Sreenivasulu N, Ramanjulu S, Ramachandra-Kini K, Prakash HS, Shekar-Shetty H, Savithri HS, Sudhakar C (1999) Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet with differential salt tolerance. *Plant Sci* 141: 1-9
131. Streb P, Michael-Knauf A, Feierabend J (1993) Preferential photoinactivation of catalase and photoinhibition of photosystem II are common early symptoms under various osmotic and chemical stress conditions. *Physiol Plant* 88: 590-598
132. Suzuki Y, Matsukura U (1997) Lipoxygenase activity in maturing and germinating rice seeds with and without lipoxygenase-3 in mature seeds. *Plant Sci* 125: 119-126

133. Syvertsen JP, Smith MLJ, Allen JC (1981) Growth rate and water relations of citrus leaf flushes. *Ann Bot* 47: 97-105
134. 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
135. 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
136. Turner NC (1981) Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant Soil* 58: 339-366
137. Ushimaru T, Maki Y, Sano S, Koshiba K, Asada K, Tsuji H (1997) Induction of enzymes involved in the ascorbate-dependent antioxidative system, namely, ascorbate peroxidase, monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase, after exposure to air of rice (*Oriza sativa*) seedlings germinated under water. *Plant Cell Physiol* 38 (5): 541-549
138. Van Breusegem F, Vranová E, Dat JF, Inzé D (2001) The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci* 161: 405-414
139. van der Bosch H, Schutgens RBH, Wanders RJA, Tager JM (1992) Biochemistry of peroxisomes. *Annu Rev Biochem* 61: 157-197
140. Verhoeven AS, Bugos RC, Yamamoto BY, Yamamoto HY (2001) Transgenic tobacco with suppressed zeaxanthin formation is susceptible to stress-induced photoinhibition. *Photosynthesis Research* 67: 27-39
141. Vranová E, Inzé D, Van Breusegem F (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot* 53 (372): 1227-1236
142. Wagner AM (1995) A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells. *FEBS Lett* 368: 339-342
143. Wang J, Zhang H, Allen RD (1999) Overexpression of an *Arabidopsis* peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant Cell Physiol* 40 (7): 725-732
144. Wang Z, Quebedeaux B, Stutte GW (1995) Osmotic adjustment : Effect of water stress on carbohydrates in leaves, stems and roots of apple. *Aust J Plant Physiol* 22: 747-754
145. Watanabe S, Kojima K, Ide Y, Sasaki S (2000) Effects of saline and osmotic stress on proline and sugar accumulation in *Populus euphratica* in vitro. *Plant Cell Tiss Org* 63: 199-206
146. Weis E, Berry JA (1988) Plants and high temperature stress. *Symp Soc Exp Biol* 42: 329-346
147. Wendehenne D, Durner J, Chen Z, Klessig F (1998) Benzothiadiazole, an inducer of plant defenses, inhibits catalase and ascorbate peroxidase. *Phytochemistry* 47 (4): 651-657
148. Williams M, Harwood JL (2000) Characterization of lipoxygenase isoforms in olive callus cultures. *Biochem Soc Trans* 28 (6): 830-831
149. Williams M, Salas JJ, Sanchez J, Harwood JL (2000) Lipoxygenase pathway in olive callus cultures (*Olea europaea*). *Phytochemistry* 53: 13-19
150. Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC (2000) Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Phil Trans R Soc Lond B* 355: 1517-1529
151. 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
152. Ye Z, Rodriguez R, Tran A, Hoang H, de los Santos D, Brown S, Vellanoweth L (2000) The developmental transition to flowering repress ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 158: 115-127
153. Yu D, Xie Z, Chen C, Fan B, Chen Z (1999) Expression of tobacco class II catalase gene activates the endogenous homologous gene and is associated with disease resistance in transgenic potato plants. *Plant Mol Biol* 39: 477-488