



DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELL'AMBIENTE FORESTALE E DELLE SUE RISORSE

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
ECOLOGIA FORESTALE – XX CICLO**

**L'IMPATTO DELLO STRESS IDRICO E DELLE ALTE
TEMPERATURE SULL'EMISSIONE DI ISOPRENE, SULLA
FOTOSINTESI E RESPIRAZIONE**

Settore Scientifico Disciplinare – AGR/05

Dottorando: Federico Brilli

Firma _____

Coordinatore: Prof. Paolo De Angelis

Firma _____

Tutore: Dr. Francesco Loreto

Co-Tutore: Prof. Giuseppe Scarascia Mugnozza

Firma _____

Firma _____

Università degli Studi della Tuscia
Dipartimento di Scienze dell'Ambiente Forestale e delle sue Risorse (DISAFRI)
Via S. Camillo de Lellis, snc 01100 Viterbo

Corso di Dottorato di Ricerca in Ecologia Forestale
Coordinatore: Prof. Paolo De Angelis

Tesi di Dottorato di Ricerca in Ecologia Forestale (XX ciclo)
di: Federico Brilli

Gennaio 2008

1 - INTRODUZIONE

1.1 Cambiamenti globali ed effetto serra

Negli ultimi 150-200 anni, a partire dalla rivoluzione industriale, le attività produttive dell'uomo hanno introdotto cambiamenti nell'ambiente che stanno causando trasformazioni del clima a livello globale. Come conseguenza dell'uso sempre più intensivo di combustibili fossili (per es. petrolio e derivati) per produrre energia, la concentrazione atmosferica di anidride carbonica (CO_2) sta notevolmente variando. Infatti, stiamo assistendo ad un incremento di CO_2 di ~ 2 ppm all'anno, tanto che in 2 secoli il valore della sua concentrazione è passato da 280 ppm a 380 ppm (il valore più alto registrato negli ultimi 650000 anni) (IPCC, 2001).

L'aumento della concentrazione di CO_2 è il fattore più importante che influenza la temperatura dell'atmosfera, poiché questo gas, per le sue caratteristiche fisico-chimiche, è capace di assorbire le radiazioni termiche (infrarosse) riflesse dalla superficie terrestre impedendone la dispersione nello spazio. Questo effetto di riscaldamento dell'atmosfera è comunemente indicato come "effetto serra". Inoltre, a partire dalla rivoluzione agricola neolitica l'attività umana ha ridotto la biomassa vegetale in grado di assorbire la CO_2 , convertendo la maggior parte delle aree boschive in aree utili alle colture agrarie o in aree abitabili.

Comunque la CO_2 non è l'unico gas che contribuisce all'effetto serra presente in atmosfera, rappresentandone solo il 5% del totale. Infatti, anche se il vapor acqueo rappresenta $\sim 50\%$ del totale dei gas serra, sono presenti in atmosfera altri importanti gas serra come il metano (CH_4), la cui concentrazione a sua volta stà aumentando a causa della diffusione di allevamenti di tipo intensivo e di colture a sommersione (per es. il riso). Sebbene nella storia del clima le variazioni di CO_2 osservate siano state successive alle variazioni di temperatura e non viceversa, a partire dal 1900 sembra esserci una notevole corrispondenza tra l'incremento della temperatura e l'aumento della concentrazione di CO_2 nell'atmosfera (come è evidente dall'osservazione della Fig. 1).

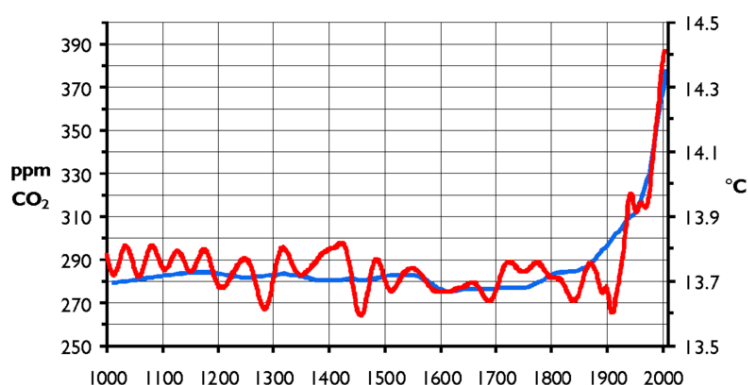


Fig. 1

Questa correlazione fa attribuire all'aumento della concentrazione di CO₂ nell'atmosfera un ruolo determinante nell'attuale riscaldamento globale.

1.2 Cambiamenti globali ed ozono – Effetto dell'ozono sul metabolismo

Nelle attuali condizioni climatiche, la concentrazione di ozono nella bassa troposfera può solo saltuariamente raggiungere livelli tali da causare seri danni alla vegetazione (Pell et al. 1997).

A causa dei cambiamenti globali in atto e del crescente aumento della quantità di NO_x di origine antropogenica e di gas serra (CO₂, CH₄) immessi nell'atmosfera, la concentrazione di ozono troposferico stà subendo un rapido incremento che alcuni modelli previsionali stimano possa arrivare fino ad un 50% dell'attuale concentrazione entro il 2100 (Fowler et al. 1999). In particolare, le aree del bacino del Mediterraneo risultano sensibilmente esposte all'incremento della concentrazione di ozono poichè sono caratterizzate sia da un'intensa radiazione luminosa per periodi prolungati di tempo durante l'anno e da elevate temperature medie, oltre che dalla presenza di molte specie di piante che emettono VOCs (composti organici volatili o *Volatile Organic Compounds*). Infatti, la presenza di radiazione luminosa ultravioletta attiva la reazione tra i VOCs e gli NO_x con formazione di ozono a livello della troposfera (Chameides et al. 1988) in maniera proporzionale all'aumentare della temperatura.

Il futuro incremento nella concentrazione di ozono troposferico potrà causare perdite rilevanti di produttività nelle colture agrarie e nelle foreste (Hopkin, 2007; UNECE, 2004) oltre che aggravare ulteriormente gli effetti derivanti dai cambiamenti climatici.

Sulla base di modelli matematici previsionali è stato recentemente osservato come a livello globale, la presenza di alte concentrazioni di ozono non contribuirebbero direttamente ad aggravare le cause l'effetto serra per l'incremento della forza radiativa di questo gas. Invece, poiché l'esposizione ad alte concentrazioni di ozono agirebbe maggiormente sulla vegetazione stimolando la chiusura degli stomi nelle foglie con conseguente limitazione della fotosintesi, la capacità delle piante di rimuovere la CO₂ dall'atmosfera diminuirebbe, favorendo ulteriormente l'accumulo di questo gas serra (Stich et al. 2007).

E' stato dimostrato come le lunghe esposizioni ad alte concentrazioni di ozono possano direttamente provocare alterazioni metaboliche con diminuzione della crescita e dello sviluppo delle piante (Fares et al, 2006). Durante numerosi esperimenti di fumigazione con ozono è stata spesso riscontrata un'inibizione della fotosintesi, sia a causa della diminuzione del contenuto delle clorofille, che per la diminuzione dell'attività e della quantità dell'enzima RUBISCO. E' stata inoltre osservata un'alterazione dell'allocazione del carbonio tra la chioma e le radici, oltre che una variazione del contenuto di amido e un'accelerazione del fenomeno di senescenza della foglie

(Oksanen et al. 2003a,b; Yamaji. et al, 2003). L'esposizione all'ozono causa anche modificazioni dell'anatomia e della struttura cellulare del mesofillo fogliare (Pääkkönen et al. 1995; Vollenweider et al. 2003), oltre che indurre l'attivazione del sistema antiossidante e l'accumulo di alcuni composti fenolici (Yamaji. et al, 2003).

In particolare, è stato recentemente evidenziato come l'ozono interferisca a livello genetico con il meccanismo di apertura/chiusura degli stomi (Vahisalu et al. 2008) alterando l'entità degli scambi gassosi di acqua e anidride carbonica tra le foglie e l'atmosfera. Infatti, l'esposizione prolungata ad alte concentrazioni di ozono, stimolando la chiusura degli stomi, determina sia una limitazione dell'assimilazione di CO₂ con la fotosintesi e della traspirazione, che una riduzione degli effetti dannosi dovuti all'assorbimento dell'inquinante.

1.3 Cambiamenti globali e stress idrico

E' ipotizzabile che l'impatto dei cambiamenti globali sul clima Mediterraneo potrà determinare un'alterazione nella quantità, frequenza e tipo di precipitazioni con conseguente aumento della lunghezza e dell'intensità dei periodi di siccità (Osburne et al. 2000). A causa dell'innalzamento della temperatura dell'aria (che in Europa è stato stimato di ~ 0.3 – 0.6 °C per ogni dieci anni) (IPCC, 2001), la superficie del suolo sarà sottoposta in futuro ad un progressivo incremento del livello di evapotraspirazione che potenzialmente ne potrà aumentare l'inaridimento (IPCC, 2007), con ulteriore aggravamento dello stress idrico nella vegetazione.

Queste previsioni possono essere confermate dall'analisi del PDSI (*Palmer Drought Severity Index*), un indice che descrive il livello di umidità del suolo calcolato sulla base dell'ammontare delle precipitazioni e del livello di evaporazione (che è direttamente correlato alla temperatura dell'aria).

Il PSDI è rappresentato nella Fig. 2 (IPCC, 2007): le aree di colore rosso ed arancione, rappresentano le zone dove il bilancio idrico (relativo alla media delle condizioni locali) della superficie del suolo risulta negativo (cioè il livello di evaporazione è maggiore delle precipitazioni e quindi c'è una tendenza alla siccità), mentre le aree di colore verde e blu rappresentano le zone dove il bilancio idrico (relativo alla media delle condizioni locali) della superficie del suolo risulta positivo (cioè la quantità delle precipitazioni è maggiore del livello di evaporazione e quindi c'è una tendenza all'arricchimento di acqua nel terreno).

A) nella parte alta della figura è descritta la distribuzione spaziale del PSDI (calcolato su base mensile) dal 1900 al 2002, che evidenzia sia in un forte aumento della siccità nel continente africano, che una tendenza all'inaridimento nelle zone tropicali e subtropicali (compresa la

regione Mediterranea). La figura mostra anche una tendenza all'incremento dell'umidità del suolo nelle zone orientali del Nord e Sud America e nella parte nord dell'Eurasia.

- B) Nella parte bassa della figura è descritta la variazione della tendenza annuale del PSDI dagli inizi del 1900 al 2002; la curva tracciata in nero descrive la normalizzazione della variazione calcolata per ogni decade. Risulta evidente come il PSDI stia assumendo valori sempre più negativi (e quindi sempre maggiore tendenza all'inaridimento del terreno) dagli inizi del 1900, con un forte incremento di questa tendenza a partire dal 1960.

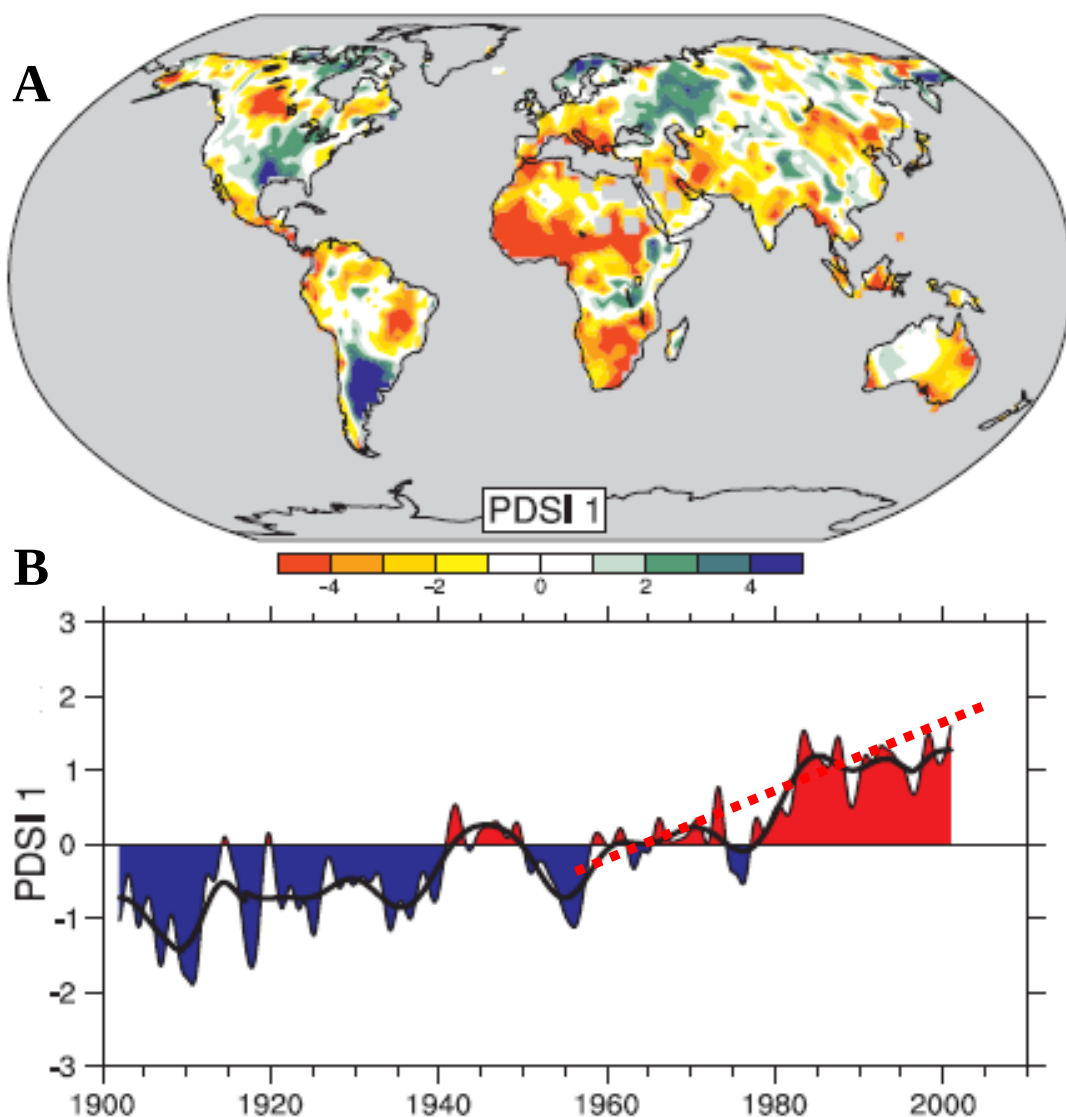


Fig. 2

Il clima della regione Mediterranea è caratterizzato da un'alternanza tra un periodo caldo e siccitoso d'estate, ed uno freddo e umido d'inverno. Da un punto di vista ecofisiologico, la variabilità e la poca prevedibilità delle precipitazioni impongono forti limitazioni alla

sopravvivenza ed allo sviluppo delle piante (Joffre et al. 1999). La carenza idrica, spesso accompagnata da elevate temperature, provoca uno degli stress più pericolosi per le piante, che induce modificazioni dirette del loro metabolismo come conseguenza dell'adattamento a condizioni ambientali sfavorevoli (Flexas et al. 2006). In particolare, sia la distribuzione che la composizione della vegetazione della regione Mediterranea sono maggiormente determinate dal carattere del periodo siccitoso in estate (Galmés et al. 2005).

1.4 L'impatto dello stress idrico sul metabolismo primario

Lo stress idrico determina una variazione del bilancio idrico all'interno delle piante (Sinclair & Ludlow, 1985). Quando l'acqua è liberamente disponibile nel suolo, viene assorbita facilmente dalle radici delle piante attraverso il processo di traspirazione. In questa situazione, le cellule sono completamente turgide (con un contenuto idrico relativo o *Relative Water Content* (RWC) intorno al 90-95%), il livello di traspirazione potenziale delle piante è massimo ed è predominantemente determinato dalla diffusione di vapore fra le foglie e l'atmosfera, senza nessuna regolazione stomatica. Nel momento in cui l'acqua comincia ad essere poco (o difficilmente) disponibile nel suolo ed il suo assorbimento non può più compensare la relativa perdita per traspirazione, le piante cominciano a regolare il loro bilancio idrico interno modulando le aperture stomatiche che, chiudendosi, permettono di mantenere il livello di traspirazione simile a quello di assorbimento di acqua dal suolo (ed il valore di RWC rimane costante). Quando non c'è più acqua disponibile nel suolo gli stomi si chiudono completamente per mantenere il valore di RWC costante nel tempo; se il periodo di stress idrico risulta molto prolungato nel tempo, il RWC comincia progressivamente a diminuire e le piante iniziano a disidratarsi. Quando il valore di RWC diminuisce sotto una certa soglia (caratteristica per ogni specie) le piante subiscono danni permanenti (Sinclair & Ludlow, 1986).

Dal un punto di vista della fisiologia del metabolismo primario, l'insorgere dello stress idrico determina un'iniziale limitazione della fotosintesi per l'aumento delle resistenze alla diffusione della CO₂ dall'atmosfera esterna verso l'interno del mesofillo fogliare. La conseguente riduzione della disponibilità di CO₂ all'interno dei cloroplasti, dove è presente l'enzima RUBISCO (ribuloso 1,5 bisfosfato carbossilasi), causa una diminuzione dell'assimilazione finale della CO₂. (Chavez & Olivera, 2004; Flexas et al. 2004). Questo effetto può essere compreso meglio dall'osservazione della Fig. 3.

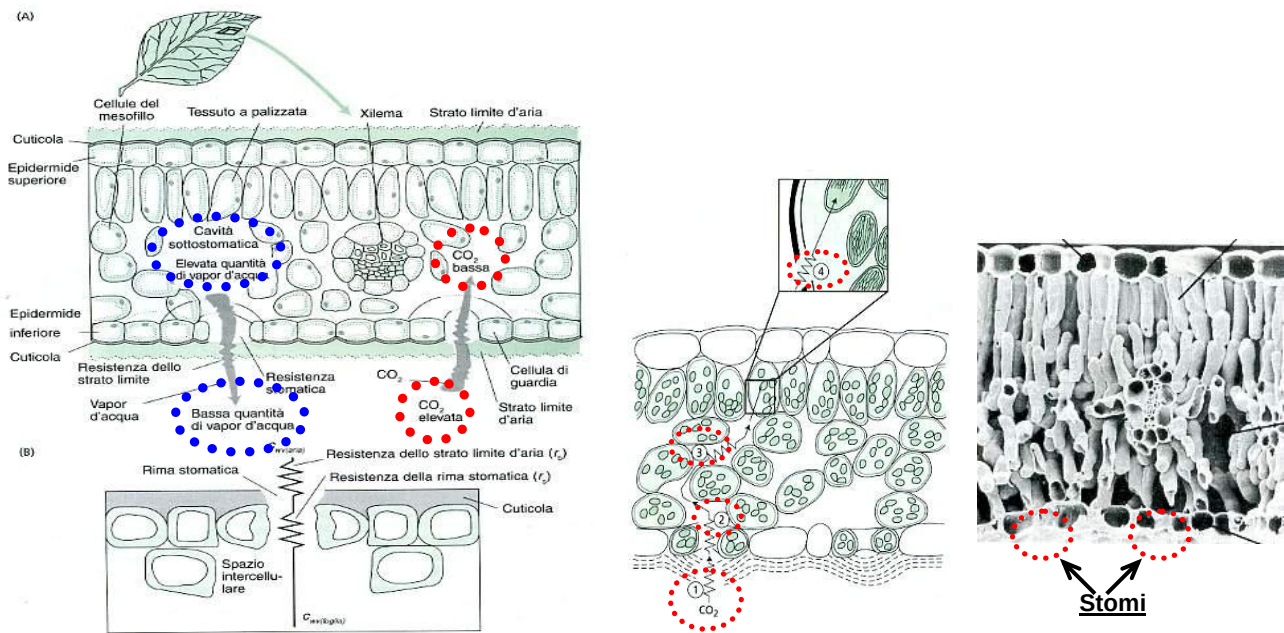


Fig. 3

La riduzione della diffusione della CO_2 all'interno del tessuto fogliare dipende non solo dalla chiusura stomatica, ma anche da una diminuzione della conduttanza del mesofillo (Grassi & Magnani 2005; Warren et al. 2004). Indipendentemente dalla natura delle resistenze diffusive, la loro somma contribuisce a limitare l'assimilazione della CO_2 , alterando il rapporto tra la concentrazione di O_2 e quella di CO_2 disponibile per l'enzima RUBISCO, e favorendo quindi la reazione di ossigenazione rispetto a quella di carbossilazione della CO_2 (Osmond et al. 1997).

Anche se la limitata disponibilità di CO_2 all'interno del mesofillo foglie è la causa principale della diminuzione della fotosintesi per effetto della scarsa disponibilità di acqua nel suolo, condizioni prolungate di stress idrico possono portare anche a limitazioni di ordine biochimico come la disattivazione (reversibile entro certi termini) e diminuzione della quantità dell'enzima RUBISCO (Bota et al. 2004; Lawlor & Cornic 2002), il danneggiamento del processo di sintesi dell'ATP e di fotofosforilazione (Tezara et al. 1999), la limitazione della disponibilità dell'enzima saccarosio fosfato sintasi (Vassey e Sharkey, 1999). Ulteriori limitazioni di ordine fotochimico a carico dei fotosistemi, del contenuto di clorofille e carotenoidi sembrano verificarsi solo in condizioni estreme di stress idrico, e di solito sono di carattere irreversibile (Flexas et al. 2002).

Lo stress idrico è quasi sempre abbinato alla presenze di elevate temperature, specialmente nelle regioni temperate Mediterranee. La fotosintesi è stimolata fino ad una temperatura minore di 30°C , anche se l'*optimum* risulta molto influenzato dall'andamento delle condizioni di crescita, poiché le foglie spesso sviluppano meccanismi capaci di ridurre l'assorbimento di calore e massimizzarne la dissipazione attraverso l'aggiustamento delle aperture stomatiche. Nell'ambito

delle temperature che normalmente si verificano nelle regioni temperate, il fattore che maggiormente regola l'efficienza della fotosintesi è l'impatto della temperatura sulla solubilità dell'O₂ e della CO₂ che influenza l'attività dell'enzima RUBISCO (Lea & Leegood, 1999). All'aumentare della temperatura, la maggiore solubilità dell'O₂ favorisce la reazione di fotorespirazione rispetto a quella di fotosintesi, diminuendo quindi la fissazione netta di CO₂. Alcuni autori ipotizzano che l'aumento delle temperature vada anche ad influire sull'attività enzimatica della RUBISCO attivasi, un enzima localizzato nello stroma tilacoidale che contribuirebbe a massimizzare l'attività della RUBISCO (Crafts-Brandner & Salvucci, 2000). Altri autori recentemente hanno evidenziato come l'aumento delle temperature agisca inizialmente sulle membrane tilacoidali (Schrader et al. 2004). Infatti le alte temperature riducono la capacità dei cloroplasti di sostenere un trasporto elettronico efficiente, diminuendo di conseguenza la rigenerazione del substrato ribulosio 1,5-difosfato (RuBP). Anche in questo caso l'esposizione ad alte temperature finirebbe con il comportare la disattivazione dell'enzima RUBISCO, che avverrebbe però in maniera indiretta. È già stato dimostrato come si possano determinare danneggiamenti a carico dei fotosistemi (PSII) (Yordanov et al. 1986) che risultano particolarmente sensibili alle alte temperature. Comunque, le piante possono essere diversamente influenzate dalla modalità di esposizione alle alte temperature: infatti, mentre rapidi ed elevati aumenti di temperatura possono direttamente causare danneggiamenti delle reazioni fotochimiche della fotosintesi, un lento e prolungato aumento della temperatura può andare ad influire sia sull'attività della RUBISCO che sulla velocità di rigenerazione del RuBP.

La respirazione mitocondriale è la maggiore sorgente di emissione di CO₂ dalle piante nell'atmosfera e perciò rappresenta un importante componente nel bilancio del carbonio degli ecosistemi (Valentini et al. 2000). La respirazione delle piante è molto influenzata dalla temperatura, aumentando esponenzialmente fino a 35-40 °C (Brooks & Farquhar 1985; Loreto et al. 2001), ma tende a diminuire durante il verificarsi di un evento di stress idrico, anche se questo comportamento non è univoco e dipende molto dalla specie interessata (Flexas et al. 2005, Ghasghaie et al. 2001). È però evidente come in risposta ad uno stress idrico il rapporto tra respirazione e fotosintesi tenda ad aumentare progressivamente, con conseguente diminuzione del bilancio complessivo del carbonio nelle piante (Flexas et al. 2005).

La maggior parte delle informazioni attualmente disponibili riguardanti l'andamento della respirazione in relazione allo stress idrico, si riferiscono a misurazioni effettuate in condizioni di buio, in assenza dei fenomeni di fotosintesi e di fotorespirazione. La stima della respirazione in condizioni di illuminazione, è complicata dalla predominante influenza dei processi di fissazione del carbonio. Misure dirette di respirazione mitocondriale alla luce hanno evidenziato un aumento

di questa componente in foglie esposte ad episodi di stress (Pinelli & Loreto, 2003). L'aumento della CO₂ emessa fotorespiratoriamente in foglie stressate indica probabilmente che la CO₂ respirata può anche essere “riciclata” dalla fotosintesi (Loreto et al. 2001a) e che questa componente è ridotta quando la fotosintesi è inibita in condizioni di stress.

1.4 VOCs (Volatile Organic Compounds)

Sia le piante che gli animali hanno la capacità di emettere molti composti organici nell'atmosfera. L'emissione di VOCs da parte delle piante supera di molti ordini di grandezza quella degli animali e su scala globale ammonta a circa 1- 1.5 Pg C per anno. L'emissione di VOCs è costituita per il 44% da isoprene, per l'11% da monoterpeni e per il 45% dalla somma degli altri composti (tra cui alcoli, aldeidi, chetoni ed esteri) (Guenther et al. 1995) (Fig. 4).

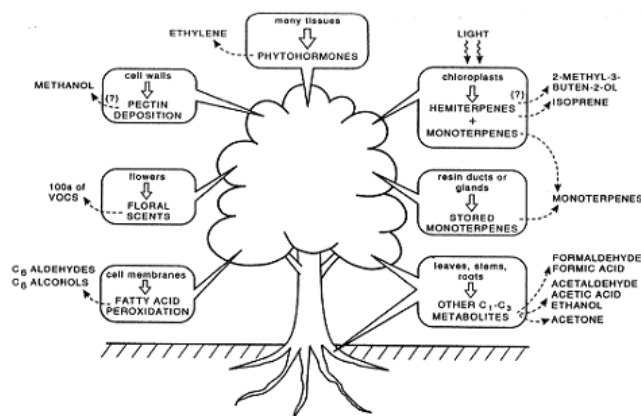


Fig. 4

Anche se il totale delle emissioni dei VOCs rappresenta solo il 2-3% del carbonio totale scambiato tra la biosfera e l'atmosfera (circa 69 Pg; Lal, 1999), la loro presenza ed alta reattività può influenzare le proprietà chimiche e fisiche dell'atmosfera. Infatti, i VOCs rimuovono i radicali idrossilici ($\cdot\text{OH}$) presenti nell'atmosfera reagendo in tempi molto brevi e provocando indirettamente l'accumulo di gas ad effetto serra, come ad esempio il metano (Brasseur & Chatfield, 1991). Inoltre i VOCs, reagendo con i gas inquinanti di origine antropogenica (specialmente NO_x) in presenza di raggi ultravioletti, possono contribuire alla formazione di ozono troposferico, smog fotochimico e particolato (Chameides et al. 1988; Kavouras et al. 1998; Di Carlo et al. 2004).

I VOCs possono anche essere utilizzati dalle piante per comunicare con altre piante o con altri organismi. Infatti, diversi studi hanno recentemente evidenziato il ruolo dei VOCs nelle interazioni tritrofiche (pianta-insetto-ambiente) e nella comunicazione tra le piante mostrando come questi composti, sia che siano emessi costitutivamente o che vengano indotti dagli attacchi biotici,

possano attrarre o orientare specifici parassitoidi e predatori oltre che costituire un potente e diretto deterrente contro patogeni ed erbivori (Gershenzon & Dudareva, 2007).

Come già accennato, tra tutti i VOCs l'isoprene (2-metil 1,3-butadiene) risulta essere il composto maggiormente emesso (Guenther et al. 1995) dalla vegetazione. In particolare, alcune specie di piante di interesse forestale (come quelle appartenenti alla famiglia *Salicaceae*) sono tra le più importanti emettitrici di isoprene (Kesselmeier & Staudt, 1999).

Anche se numerose prove hanno evidenziato come l'isoprene possa avere un ruolo protettivo contro stress ossidativi di origine sia biotica che abiotica (Sharkey et al. 2001; Peñuelas et al. 2005, Velikova & Loreto, 2005; Benke et al. 2007; Loreto & Velikova 2001b; Loreto & Fares 2007; Velikova et al. 2005; Holopainen et al. 2004; Velikova et al. 2006), i meccanismi fisiologici attraverso i quali l'isoprene svolge la propria funzione sono ancora poco chiari.

E' noto come il sopraggiungere di condizioni ambientali sfavorevoli possano indurre nelle piante lo sviluppo di uno stress ossidativo caratterizzato da una maggiore produzione di composti ROS (*reactive oxygen species*) come ossigeno singoletto (1 O_2), ione superossido ($\cdot\text{O}_2$), perossido di idrogeno (H_2O_2) e radicali idrossilici ($\cdot\text{OH}$). Normalmente, le piante metabolizzano i composti ROS utilizzando enzimi e/o metaboliti antiossidanti (Edreva 2005) per evitare un loro accumulo che causerebbe ossidazione dei lipidi, proteine ed altri costituenti delle membrane cellulari con conseguente perdita della fluidità e funzionalità di membrana fino a determinare la morte cellulare.

E' stato ipotizzato che l'isoprene possa avere un' azione antiossidante per la presenza nella sua molecola di doppi legami coniugati (con delocalizzazione degli elettroni di tipo π) altamente reattivi che reagirebbero facilmente con composti ROS (Affek & Yakir, 2002). Inoltre per le sue caratteristiche fisico-chimiche, la molecola di isoprene ha un carattere molto lipofilico che ne favorisce il legame con la parte lipidica delle membrane cellulari, prevenendo la denaturazione del doppio strato lipidico e la perdita di funzionalità (Loreto & Velikova, 2001b; Sharkey & Yeh, 2001).

La formazione di isoprene è catalizzata dall'enzima isoprene sintasi (*ISPS*) (Silver & Fall, 1995; Schnitzler et al. 1996) a partire dal substrato dimetil-allil pirofosfato (DMAPP) che può essere biosintetizzato attraverso due vie diverse: nel citosol (attraverso la via del mevalonato, presente in tutti gli organismi eucarioti) e nei cloroplasti (attraverso la via DOXP/MEP = 1-deossid-xilulosio 5-fosfato/2-C-metil-D-eritritolo 4-fosfato, recentemente scoperta, Lichtenthaler 1999). Circa il 72-91% del carbonio impiegato nella biosintesi dell'isoprene proviene direttamente da quello assimilato con la fotosintesi (Lichtenthaler et al. 1999) mentre la percentuale rimanente deriva da fonti di carbonio alternative di origine citoplasmatica (Sanadze et al. 1972; Delwiche & Sharkey, 1993; Karl et al. 2002; Affek & Yakir, 2003; Funk et al. 2004; Schnitzler et al. 2004). In

foglie di forti emettitori ed in condizioni ottimali di fotosintesi, l'emissione di isoprene utilizza circa l' 1-5 % del carbonio totale assimilato con la fotosintesi (Sharkey et. 1991), ma questa percentuale può notevolmente aumentare (Steinbrecher et al. 1997) a causa dell'azione combinata di più fattori di stress, come la presenza di elevate temperature accompagnate da siccità e forte irradiazione luminosa che spesso caratterizzano il clima estivo della regione Mediterranea (Rennenberg et al. 2003). Infatti è stato già evidenziato come lo stress idrico possa causare una sostanziale riduzione della fotosintesi, senza determinare grandi variazioni nell'emissione di isoprene (Tingey et al. 1981; Sharkey & Loreto, 1993), determinando un incremento del rapporto tra emissione di isoprene e fotosintesi all'aumentare dell'intensità dello stress idrico.

L'emissione di isoprene non è regolata dal grado di apertura degli stomi (Niinemets et al, 2003) ed è strettamente in relazione sia all'intensità della radiazione luminosa che alla temperatura (Monson & Fall, 1989; Loreto & Sharkey, 1990) con *optimum* termico intorno a 40 °C (Monson et al. 1992) e saturazione luminosa ad alte intensità di luce, addirittura superiori a quelle che saturano la fotosintesi (Sharkey e Loreto 1993). Inoltre l'emissione di isoprene è controllata da altri fattori ambientali come la disponibilità di composti nutritivi nel terreno e la concentrazione di CO₂ nell'atmosfera o, più probabilmente, negli spazi intercellulari.

Tuttavia luce e temperatura sono senz'altro i fattori per i quali la risposta dell'isoprene è forte e ripetibile. Il semplice ed empirico algoritmo elaborato da Guenther et al. (1995) e basato su parametri di luce e temperatura è stato quindi finora utilizzato come modello matematico per prevedere l'emissione di isoprene. Comunque, sono stati evidenziati nel tempo alcuni casi nei quali le variazioni dell'emissione di isoprene non risultano facilmente prevedibili utilizzando questo algoritmo (Sharkey et al. 1991; Sharkey & Yeah, 2001; Loreto et al. 2001c; Rosenstiel et al. 2003; Loreto et al. 2004a; Brilli et al. 2007), specialmente in corrispondenza di temperature particolarmente elevate ed al sopraggiungere di ulteriori limitazioni all'assimilazione di carbonio.

Ad esempio alcune recenti ricerche hanno contribuito ad elucidare l'esistenza di una competizione tra i processi biologici presenti nei mitocondri e la biosintesi di isoprenoidi per la disponibilità del substrato fosfoenolpiruvato (PEP) in corrispondenza di diverse condizioni ambientali (Loreto et al. 2007). Una maggiore attività respiratoria potrebbe attivamente indurre una competizione per l'approvvigionamento di composti fosforilati presenti nel citosol, limitandone la disponibilità per la biosintesi di isoprene, specialmente in condizioni di elevata CO₂ e quindi giustificando l'inibizione dell'emissione di isoprene in queste condizioni (Rosenstiel et al. 2004).

1.7 Obiettivi di ricerca

Considerando che le piante sono particolarmente vulnerabili a rapidi cambiamenti climatici che non consentono l'attivazione o l'evoluzione di meccanismi di adattamento, gli obiettivi di questa sperimentazione sono stati quelli di investigare la risposta dell'emissione di isoprene (come indicatore del metabolismo secondario del carbonio) e dei processi di fotosintesi e respirazione (come indicatori del metabolismo primario del carbonio) in seguito al verificarsi di uno stress idrico in presenza di alte temperature o di alte concentrazioni di ozono.

Per questa valutazione, sono stati utilizzati i parametri FTSW (*Fraction of Transpirable Soil Water*) e FASW (*Fraction of Available Soil Water*) che saranno di seguito definiti. In particolare, è stato calcolato il parametro FASW per identificare la soglia di acqua disponibile nel suolo in corrispondenza della quale si verificano delle variazioni nei processi di emissione di isoprene, fotosintesi e respirazione. Invece, il parametro FTSW è stato calcolato per paragonare differenze nella risposta fisiologica dei suddetti processi in piante allevate a temperature diverse durante il procedere dello stress idrico.

Per investigare più approfonditamente la regolazione biochimica dell'emissione di isoprene, è stata misurata *in vivo* con tecniche di marcamento isotopico delle molecole volatili, la variazione del contributo delle fonti di carbonio di origine cloroplastica o extra-cloroplastica alla formazione di isoprene, in condizioni di progressiva limitazione dell'assimilazione del carbonio al procedere dello stress idrico.

La fumigazione con elevate concentrazioni di ozono è stata abbinata ad uno stress idrico con l'intento di:

- a) modificare la sensibilità del meccanismo di apertura/chiusura degli stomi e confrontare gli effetti sull'assimilazione della CO₂;
- b) misurare la variazione della risposta dell'emissione di isoprene in relazione ad maggiore livello di stress ossidativo indotto dalla contemporanea fumigazione con ozono e dallo stress idrico rispetto alla semplice fumigazione con ozono.

Infine, è stata verificata la capacità dell'emissione di isoprene di indurre una maggiore resistenza al processo di fotosintesi in relazione al sopraggiungere di uno stress ossidativo attraverso l'applicazione di un trattamento con elevate temperature per un breve periodo di tempo.

Le informazioni ricavate da questa sperimentazione, oltre a fornire indicazioni sui meccanismi di resistenza delle piante a stress idrici ed ossidativi, potranno anche essere applicate nello sviluppo e nella correzione di parametri (a carattere ecologico) utilizzabili per validare modelli micrometeorologici di *up-scaling*, e per la stima con maggiore precisione dell'emissione di isoprene (e in generale dei flussi di carbonio) in relazione ai cambiamenti globali in atto.

2 – MATERIALI & METODI

2.1 – *Materiale vegetale*

Piante di *Populus nigra* L. e *Populus alba* L. sono state ottenute attraverso propagazione per talea prelevando (durante il periodo invernale) porzioni di rami da alberi adulti provenienti da una collezione clonale (clone CF40) situata nel centro Italia. Le talee sono state fatte radicare in vasi (5 dm³) riempiti di terreno commerciale e lasciate crescere in camere di crescita (Sanyo Gallenkamp, Loughborough, UK) in condizioni controllate di luce (800 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ per 12 ore al giorno), umidità relativa (50-60%) ed a 2 diverse temperature: un gruppo di talee a 25±2 °C, ed un altro gruppo a 35±2 °C. Tutte le piante sono state regolarmente irrigate ed anche fertilizzate con un soluzione Hoagland non diluita una volta alla settimana per fornire un adeguato apporto di nutrienti minerali.

Piante di *Platanus orientalis* L. di 1 e di 2 anni di età sono state cresciute in serre climatizzate fino alla comparsa delle prime foglie. Durante il primo periodo di crescita sono state innaffiate regolarmente e fertilizzate una volta alla settimana con una soluzione Hoagland non diluita. Dopo lo sviluppo delle prime foglie, le piante sono state trasferite in camere di crescita (Sanyo Gallenkamp, Loughborough, UK) caratterizzate da 2 diverse concentrazioni di CO₂: 380 ppm (concentrazione di CO₂ atmosferica), e 700 ppm (alta concentrazione di CO₂) e mantenute in condizioni controllate di: luce 350 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ per 12 ore al giorno), umidità relativa (50-60%) e temperature di 25±2 °C. Le piante sono state fatte crescere in queste condizioni per circa 1 mese prima dell'inizio del trattamento con elevate temperature. Le misurazioni sono state fatte in foglie completamente espanse sia in piante di 1 anno che in piante di 2 anni di età precedentemente recise dalla pianta madre, poi immerse in un recipiente (15 mL) contenente acqua ed immediatamente tagliate sott'acqua per evitare la cavitazione dei vasi (Loreto & Velikova, 2001b).

2.2 – *Trattamento con elevate temperature, inibizione dell'emissione di isoprene*

Il trattamento ad alta temperatura (38 °C) è stato applicato per 4 ore in foglie completamente espanse appartenenti a piante di *Platanus orientalis* L. di 1 anno e di 2 anni di età che naturalmente emettono isoprene, e anche in altre foglie delle stesse piante nelle quali l'emissione è stata inibita attraverso l'utilizzo della fosmidomicina (un potente e specifico inibitore della sintesi degli isoprenoidi nei cloroplasti). La fosmidomicina (in concentrazione di 5 μM) è stata aggiunta al recipiente contenente il picciolo delle foglie recise così da essere assorbita attraverso il flusso traspiratorio.

2.3 – Calcolo di FTSW (Fraction of Transpirable Water) e FASW (Fraction of Available Water)

Le tecniche del FTSW e FASW (Sinclair & Ludlow, 1986) permettono il monitoraggio della quantità di acqua traspirabile (FTSW) e disponibile (FASW) nel terreno attraverso il rilevamento del peso giornaliero del vaso contenente la pianta dal momento di inizio dell'applicazione dello stress idrico.

Lo stress idrico è stato applicato in giovani piante di *P. nigra* 2 mesi dopo il completo sviluppo delle prime foglie. Il pomeriggio precedente all'inizio dello stress idrico, le piante sono state irrigate in eccesso e l'acqua è stata lasciata drenare liberamente per tutta la notte. Il mattino seguente, tutti i vasi sono stati pesati utilizzando una bilancia di precisione (± 1 grammo) (modello QS32A; Sartorius Instrumentation, Goettingen, Germany) per determinarne il peso iniziale. Dopodiché ogni vaso è stato chiuso in un sacchetto di plastica che è stato adeguatamente stretto intorno allo stelo delle piante per evitare l'evapotraspirazione del terreno, e lo stress idrico è stato applicato sospendendo le irrigazioni. Successivamente, ogni giorno i vasi sono stati liberati dal sacchetto di plastica e pesati per stimare il loro rispettivo peso giornaliero, prima di richiudere il vaso nel sacchetto.

Nel caso del FASW, il peso finale del vaso è stato stimato nel momento in cui, confrontando la variazione di peso misurata per due giorni consecutivi, è stata rilevata una differenza $< 10\%$.

Nel caso de FTSW, il peso finale del vaso è stato stimato togliendo ogni pianta e mettendo il terreno in forno a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 24 ore.

I parametri di FASW e FTSW sono stati calcolati secondo la formula illustrata nella Fig. 5:

$$\left[\frac{\text{Peso}_{\text{giornaliero del vaso}} - \text{Peso}_{\text{finale del vaso}}}{\text{Peso}_{\text{iniziale del vaso}} - \text{Peso}_{\text{finale del vaso}}} \right]$$

Fig. 5

Dal momento in cui è stato deciso di interrompere il periodo di stress idrico, le piante sono state irrigate regolarmente per due settimane al fine di studiare la capacità di recupero dallo stress.

2.4 – Misure di scambio gassoso e stima dell'efficienza di carbossilazione

I parametri di fotosintesi, conduttanza stomatica e concentrazione intercellulare di CO₂ sono stati misurati *in vivo* attraverso la stima degli scambi gassosi di CO₂ ed H₂O tra le foglie e l'aria utilizzando un sistema portatile di scambi gassosi (LI-6400; Li-Cor, Lincoln, NE, USA). Tutte le misurazioni sono state fatte inserendo porzioni di lamina fogliare di foglie adulte completamente espanse (intatte nel caso di *P. nigra*; dopo il taglio del petiolo nel caso di *P. orientalis*) in una cuvetta di 6 cm² all'interno della quale sono state continuamente controllate e monitorate le condizioni di luce (1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPDF e 350 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPDF caso vengano utilizzate rispettivamente piante di *P. nigra* e *P. orientalis*), concentrazione di CO₂ (380 ppm), umidità relativa (40-50 %) e temperatura (25 °C e 35 °C nel caso vengano utilizzate piante di *P. nigra* cresciute rispettivamente a 25 °C e 35°C; 25 °C nel caso vengano utilizzate piante di *P. orientalis*).

L'attività della RUBISCO è stata studiata *in vivo* misurando la fotosintesi a concentrazioni crescenti di CO₂ e valutando la pendenza della curva che si ricava nel suo tratto lineare.

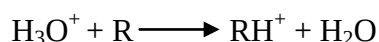
La respirazione in condizioni di buio (R_n) è stata misurata in foglie esposte al buio per 15 minuti, mentre l'entità della respirazione in foglie illuminate (R_d) è stata misurata arricchendo l'atmosfera interna della cuvetta con ¹³CO₂ (Aldrich, Milwaukee, WI, USA) e valutando il flusso di ¹²CO₂ emesso dalla porzione fogliare attraverso un analizzatore di CO₂ (LI-800 Gas Hound, Li-Cor, Lincoln, NE, USA) insensibile alla presenza di ¹³CO₂ (Loreto et al. 2001). L'emissione di CO₂ non marcata è stata attribuita totalmente alla respirazione, poiché i metaboliti dei rimanenti processi coinvolti nello scambio di CO₂ (fotosintesi e fotorespirazione) vengono marcati molto più rapidamente.

2.5 – Analisi di VOCs – PTR-MS (Proton Transfer Reaction Mass Spectrometer)

Le emissioni di isoprene e di metanolo sono state analizzate simultaneamente alla misurazione degli scambi gassosi utilizzando la nuova tecnologia della spettrometria di massa a trasferimento protonico (*Proton Transfer Reaction Mass Spectrometer*, PTR-MS; Ionicon, Innsbruck, Austria) (Lindinger et al. 1998), attraverso il campionamento di parte del flusso di aria in uscita dalla cuvetta. Questa tecnica analitica permette l'analisi *real time* ed *in vivo* di molti composti volatili con tempi di acquisizione molto rapidi (per es. 100 ms) e con un'elevatissima sensibilità (5-10 ppb) senza la necessità di un pre-trattamento del campione, risultando particolarmente utile per il monitoraggio nel tempo della variazione di un certo numero di composti, oltre che per analizzare velocemente un numero elevato di campioni.

La tecnica di analisi chimica con PTR-MS si basa sul trasferimento del protone H⁺ dallo ione H₃O⁺ a tutte quei composti che hanno un'affinità protonica maggiore di quella dell'acqua,

essendo la protonazione di massa una reazione acido-base che avviene (in fase gassosa) tra lo ione H_3O^+ (acido) e un qualsiasi altro composto capace di accettare il protone H^+ (base).



I costituenti maggiormente presenti in aria come N_2 , O_2 , Ar, CO_2 hanno un'affinità protonica minore di quella dell'acqua e quindi non possono ricevere il protone H^+ dallo ione H_3O^+ . Questa caratteristica fisico-chimica risulta essenziale per analizzare composti presenti in bassissime concentrazioni nell'aria (gas traccia o VOCs). Infatti, la maggior parte dei VOCs (tra cui isoprene, terpeni, benzene, aldeidi, alcoli, ecc.) hanno un'affinità protonica maggiore di quella dell'acqua e quindi possono ricevere il protone H^+ dallo ione H_3O^+ . La reazione di trasferimento protonico ha il vantaggio di indurre un basso livello di frammentazione del composto che riceve il protone H^+ (se paragonato all'impatto elettronico ed al trasferimento di carica) facilitando così sia l'interpretazione che l'elaborazione degli spettri di massa.

Il funzionamento del PTR-MS è brevemente rappresentato nella Fig. 6.

C. Warneke et al./International Journal of Mass Spectrometry 207 (2001) 167–182

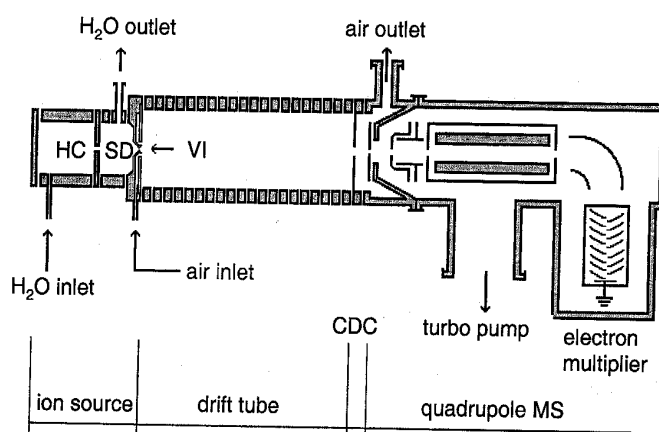


Fig. 6

Inizialmente il vapor acqueo è convertito in H_3O^+ all'interno della sorgente di ioni (*Ion Source*) rappresentata da un catodo mantenuto in condizioni di vuoto (HC = *Hollow Cathode*) al quale è applicato un elevato voltaggio di corrente continua. Gli H_3O^+ estratti dalla sorgente di ioni vengono ulteriormente concentrati in un piccolo spazio (SD = *Source Drift Region*) inducendo reazioni di collisione tra gli ioni (H_3O^+ , H^+ , O_2^+ , etc) e le molecole d'acqua. L'umidità in eccesso è evacuata dall'applicazione di una prima pompa turbomolecolare che inoltre crea le condizioni di vuoto necessarie nella prima parte dello strumento. Gli H_3O^+ sono accelerati dall'applicazione di un campo elettrico all'uscita della sorgente e, attraverso una valvola di Venturi (VI), vengono iniettati

nella camera di reazione (*Drift Tube*) dove incontrano l'aria (campione) da analizzare ad una pressione di circa 2 mbar.

La combinazione dei parametri di volume, temperatura e pressione della camera di reazione insieme all'intensità del campo elettrico applicato definiscono l'entità dell'energia di ionizzazione che determina la reazione di trasferimento protonico secondo la relazione E/N , dove E rappresenta la forza del campo elettrico applicato, ed N è la densità delle molecole presenti nella camera di reazione. L'energia di ionizzazione viene espressa in Townsend ($1 \text{ Td} = 10^{-17} \text{ cm}^{-2}\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$), ed è direttamente correlata alla velocità (e quindi alla mobilità) degli H_3O^+ nella camera di reazione.

Di solito l'energia di ionizzazione è mantenuta ad un valore di circa 120 Td che risulta un buon compromesso per mantenere la velocità degli H_3O^+ sufficientemente elevata in modo da ostacolare la formazione di grandi complessi idratati (*clusters*) con le molecole d' H_2O presenti (che consumerebbe inutilmente gli H_3O^+ non rendendoli più disponibili per la reazione di ionizzazione), oltre che evitare un'eccessiva frammentazione dei composti da analizzare come conseguenza del trasferimento del protone H^+ durante la reazione di ionizzazione. Comunque, la grande versatilità del PTR-MS permette di modulare il parametro E/N da un valore di 140 Td fino ad un valore di 80 Td. L'applicazione di una bassa energia di ionizzazione (80-90 Td) determina la diminuzione della concentrazione degli H_3O^+ con contemporanea formazione di ioni $\text{H}_2\text{O}\cdot\text{H}_3\text{O}^+$, che diventano la principale sorgente per il trasferimento degli H^+ . L'utilizzo degli ioni $\text{H}_2\text{O}\cdot\text{H}_3\text{O}^+$ come sorgente nella reazione di ionizzazione risulta particolarmente vantaggioso per l'analisi di alcuni VOCs (come per es. alcoli, esteri ed esteri che derivano dalle reazioni di ossidazione dei lipidi di membrana), che mostrano una maggiore affinità protonica nei confronti dello ione $\text{H}_2\text{O}\cdot\text{H}_3\text{O}^+$ rispetto allo ione H_3O^+ . È importante considerare che l'applicazione di una bassa energia di ionizzazione, mentre da un lato garantisce un bassissimo livello di frammentazione dei composti e quindi facilita l'interpretazione dei risultati delle analisi, dall'altro rende la concentrazione degli $\text{H}_2\text{O}\cdot\text{H}_3\text{O}^+$ sensibile ad un'eventuale variazione dell'umidità relativa del campione che può direttamente influenzare la reazione di ionizzazione con possibili riflessi sulla sensibilità di analisi.

Al contrario, l'utilizzo di un' elevata energia di ionizzazione (140-150 Td) risulta particolarmente idoneo nel caso si vogliano analizzare composti che hanno lo stesso peso molecolare. Infatti, per effetto di una maggiore quantità di energia trasferita durante la reazione di ionizzazione, si determina un maggiore livello di frammentazione delle molecole. Di conseguenza, possono essere generati dei frammenti caratteristici che rendono possibile l'identificazione dei composti analizzati, anche senza la loro preventiva separazione in una colonna cromatografica.

Le molecole che hanno ricevuto il protone H^+ dopo essere state concentrate in un piccolo spazio (CDC = *Collision Dissociation Chamber*) che impedisce la formazione di grandi complessi

idratati (*clusters*), sono selezionate all'interno di un quadrupolo (MS) in base al rapporto caratteristico massa /carica (m/z). L'applicazione di una seconda pompa turbomolecolare consente di mantenere un livello di vuoto sufficientemente elevato (circa $2 \cdot 10^{-5}$ mbar) da annullare ogni interazione tra le molecole e permettere quindi il corretto funzionamento del quadrupolo. Per le sue caratteristiche tecniche, il quadrupolo non è in grado di selezionare tutte le masse con la stessa efficienza. Infatti, un'efficienza del 100% viene raggiunta solo nella selezione delle molecole che hanno un m/z tra 80-100. Nell'analisi delle altre molecole con m/z maggiore o minore del suddetto intervallo, deve essere considerato un fattore di correzione che tiene conto della minore efficienza di selezione caratteristica di ogni quadrupolo.

Il flusso di molecole selezionate dal quadrupolo è poi convertito in segnale elettrico che viene successivamente amplificato attraverso una SEM (*Secondary Electron Multiplier*), prima di essere integrato da un contatore di ioni che fornisce la stima finale del segnale elettrico in *count per second* (cps).

Poiché solo una piccola frazione degli ioni utilizzati come sorgente di protonazione (H_3O^+ o $H_2O \cdot H_3O^+$) reagisce con i VOCs durante la reazione di ionizzazione, la concentrazione (ppb = parti per miliardo) delle molecole che hanno subito la protonazione (RH^+) può essere direttamente calcolata secondo la formula illustrata nella Fig. 7:

$$(RH^+)_{[ppb]} = \frac{(RH^+)_{[counts]} \cdot 1E9 \cdot 1,013 \cdot 22400 \cdot (273,15 + T_d) \cdot T_{H_3O^+}}{k \cdot t \cdot (H_3O^+)_{[counts]} \cdot P_d \cdot 6.022E23 \cdot 273,15 \cdot T_{RH^+}}$$

Fig. 7

dove: $(RH^+)_{[counts]}$ = segnale relativo ai composti da analizzare espresso in cps (*counts per second*); $(H_3O^+$ or $H_2O \cdot H_3O^+)_{[counts]}$ = segnale relativo agli ioni utilizzati come sorgente di protonazione in cps (*counts per second*); $(P_d)_{[Bar]}$ = pressione della camera di reazione (*Drift Tube*); $(T_d)_{[°C]}$ = temperatura della camera di reazione; $(k)_{[cm^{-1}]}$ = costante di reazione tra gli ioni (H_3O^+ or $H_2O \cdot H_3O^+$) e i composti da analizzare; $(t)_{[s]}$ = tempo di reazione che dipende dalla velocità di accelerazione degli ioni utilizzati come sorgente di protonazione (è circa 105 μs in corrispondenza di un'energia di protonazione di 120 Td); $(T_{H_3O^+}$ or $H_2O \cdot H_3O^+)$ = coefficiente di trasmissione del quadrupolo relativo alla sorgente di protonazione; (T_{RH^+}) = coefficiente di trasmissione del quadrupolo relativo al composto da analizzare.

Questo formula permette così il calcolo teorico della concentrazione del composto da analizzare senza la necessità di una preventiva calibrazione con un gas standard di riferimento. A causa dell'imprecisione nella stima di alcuni parametri presenti nella suddetta formula (come per es. k = costante di reazione tra gli ioni ed i composti da analizzare), questo tipo di calcolo può fornire però spesso un risultato molto diverso da quello realmente misurato utilizzando un gas standard di riferimento. Quindi, anche se il calcolo teorico offre il vantaggio di una stima veloce e più o meno accurata della concentrazione dei composti da analizzare, è sempre utile una validazione quantitativa del segnale del PTR-MS attraverso la misurazione di un gas standard di riferimento.

Attualmente il PTR-MS è una tecnica che trova applicazione in molti settori scientifici. Nell'industria alimentare il PTR-MS è utilizzato per caratterizzare in maniera non invasiva i composti volatili che costituiscono l'aroma dei cibi; nelle scienze ambientali è impiegato nel monitoraggio continuo dei composti inquinanti e per il controllo della qualità dell'aria negli ambienti di lavoro (uffici, locali pubblici, etc.); nello studio delle interazioni tri-trofiche pianta-insetto-ambiente risulta molto utile nell'analisi *on-line* ed *in vivo* dei VOCs emessi per effetto di un danneggiamento meccanico prodotto nelle foglie, o come conseguenza della presenza di insetti fitofagi.

Nella sperimentazione oggetto di questa tesi, il PTR-MS è stato utilizzato per misurare l'emissione di VOCs in piante esposte a stress idrico ed ossidativi, ed in particolare per la misura *in vivo* del contributo delle fonti di carbonio (cloroplastico ed extra-cloroplastico) all'emissione di isoprene. Questo studio è stato effettuato sostituendo nella cuvetta la $^{12}\text{CO}_2$ con la stessa concentrazione di $^{13}\text{CO}_2$ (Loreto et al. 2004b). L'assimilazione del ^{13}C (carbonio marcato) nella molecola di isoprene è stata analizzata seguendo *on-line* ed *in vivo* per 15 minuti la comparsa delle masse 70^+ ($^{13}\text{C}^{12}\text{C}_4\text{H}_9^+$), 71^+ ($^{13}\text{C}_2^{12}\text{C}_3\text{H}_9^+$), 72^+ ($^{13}\text{C}_3^{12}\text{C}_2\text{H}_9^+$), 73^+ ($^{13}\text{C}_4^{12}\text{C}_1\text{H}_9^+$), 74^+ ($^{13}\text{C}_5\text{H}_9^+$), corrispondenti alla molecola di isoprene con, rispettivamente, 1, 2, 3, 4 e 5 atomi marcati con $^{13}\text{CO}_2$. La percentuale di carbonio marcato è stata calcolata sommando tutti gli atomi ^{13}C incorporati negli isotopi dell'isoprene, e dividendo questo numero per la somma totale degli atomi di carbonio (sia marcati che non) (Schnitzler et al. 2004). Inoltre, è stato calcolato il rapporto tra la massa 69^+ (isoprene non-marcato) e la somma delle masse da 70^+ a 74^+ (considerando l'isoprene completamente marcato, indipendentemente dal numero degli atomi di ^{13}C effettivamente presenti nella molecola), ipotizzando che tutto l'isoprene si sarebbe comunque marcato se avessimo prolungato i tempi di esposizione alla $^{13}\text{CO}_2$ oltre i 15 minuti previsti (Loreto et al. 1996).

Per validare l'identità dei composti campionati, un'altra parte del flusso di aria in uscita dalla cuvetta è stata contemporaneamente analizzata con un gas cromatografo (Synthec Spectras

BTX Analyser GC855; Synthec, Groeningen, the Netherland). Entrambi gli strumenti (PTR-MS e GC) sono stati calibrati dopo ogni set di misurazioni utilizzando la stessa bombola standard di

2.5 – *Analisi Statistica*

Le curve relative agli andamenti dei parametri FASW e FTSW sono state ricavate utilizzando il programma SigmaStat32 (Systat Software, Inc. San Jose, CA, USA). I valori iniziali di: emissione di isoprene, fotosintesi, quantità di carbonio (%) impiegato per produrre isoprene, conduttanza stomatica, respirazione (Rd ed Rn) e i valori finali della FASW (per ognuno di questi parametri), sono stati ricavati dall'intersezione delle suddette curve con i rispettivi assi y ed x.

In tutti i casi dove la distribuzione normale dei data è stata statisticamente elaborata attraverso una semplice analisi della varianza (ANOVA), è stato utilizzato un test parametrico (Tukey) per verificare le differenze tra le medie delle diverse classi di dati.

CAP 3 – RISULTATI

3.1- Stress idrico ed elevate temperature

Prima dell'inizio del periodo di stress idrico, è stata rilevata un'emissione di isoprene nelle piante cresciute a 35 °C di $28.97 \pm 1.23 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, cioè due volte maggiore all'emissione delle piante cresciute a 25 °C ($17.77 \pm 1.39 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Fig. 8). Nelle piante cresciute a 25 °C l'emissione di isoprene, dopo aver subito una temporanea stimolazione (fino a $19.47 \pm 0.91 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) rispetto al valore iniziale in corrispondenza di un FASW = $50 \pm 3 \%$, ha raggiunto valori minimi ad una soglia molto bassa di FASW (= $24 \pm 3 \%$), non risultando tuttavia mai completamente inibita ($9.26 \pm 1.64 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Anche nelle piante cresciute a 35 °C è stata osservata una stimolazione temporanea dell'emissione di isoprene (fino a $31.32 \pm 1.29 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), che è risultata però meno evidente che a 25 °C, a causa dell'elevato livello di emissione che già è riscontrata ad elevate temperature. Alla temperatura di 35 °C, l'emissione di isoprene di piante soggette a stress idrico è diminuita più rapidamente, raggiungendo i valori più bassi ($6.29 \pm 0.68 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) in corrispondenza di una soglia di FASW di = $46 \pm 2 \%$.

Confrontando l'emissione di isoprene a 25 °C e 35 °C durante il periodo di stress idrico in base al parametro FTSW, è stato osservato un andamento simile a quello riscontrato per il parametro FASW. Anche in questo caso, infatti, una temporanea stimolazione dell'emissione di isoprene rispetto al valore misurato prima dell'inizio dello stress idrico, è stata evidenziata, e si è verificata anticipatamente a 35 °C (a FTSW = $66 \pm 3 \%$) rispetto che a 25 °C (a FTSW = $34 \pm 3 \%$). Al proseguire dello stress idrico è stata riscontrata una diminuzione dell'emissione di isoprene più accentuata a 35 °C che a 25 °C. In corrispondenza di FTSW = 0%, a 35 °C l'emissione di isoprene è stata quasi completamente inibita, mentre a 25 °C è stata misurata un'emissione di ~ 50% del valore misurato prima dell'applicazione dello stress idrico.

Contrariamente a quanto è stato osservato per l'emissione di isoprene, prima dell'inizio dello stress idrico, la fotosintesi delle piante cresciute a 25 °C ha mostrato valori (= $17.59 \pm 0.61 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) maggiore del 30 % rispetto a quella delle piante cresciute a 35 °C (= $10.49 \pm 0.72 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Fig. 9). Nelle piante cresciute a 25 °C, la fotosintesi ha iniziato ad essere limitata dallo stress idrico ad un valore di FASW di = $76 \pm 2 \%$ ed è stata totalmente inibita a valori di FASW di = $20 \pm 3 \%$. Invece, nelle piante cresciute a 35 °C la fotosintesi ha iniziato a diminuire a causa dello stress idrico quasi immediatamente (a FASW di = $93 \pm 2 \%$) ed è stata completamente inibita quando la FASW ha raggiunto valori di ~ $44 \pm 2 \%$. Quindi la fotosintesi è risultata più sensibile allo stress idrico rispetto all'emissione di isoprene.

Riguardo al secondo parametro, la FTSW, nelle piante cresciute a 25 °C la soglia di FTSW alla quale la fotosintesi ha iniziato ad essere limitata dallo stress idrico è stata di 68 ± 2 %, mentre nelle piante cresciute a 35 °C questa limitazione si è verificata anticipatamente, in corrispondenza di una soglia di FTSW di 87 ± 2 %. La fotosintesi è diminuita con una tendenza simile al progredire dello stress alle due temperature, ma con un andamento più veloce a 35 °C rispetto che a 25 °C.

Come evidente anche dall'analisi comparata dei dati finora esposti, l'applicazione di uno stress idrico ha determinato l'aumento esponenziale della quantità di carbonio emesso sotto forma di isoprene rispetto alla quantità totale di carbonio assimilato con la fotosintesi, indipendentemente dalla temperatura di crescita (Fig. 10). Questa quantità comincia a variare considerevolmente quando la FASW è 77 ± 3 % o 55 ± 3 % in piante cresciute rispettivamente a 35 °C ed a 25 °C. La variazione della quantità % di carbonio impiegata per produrre isoprene durante lo stress idrico in relazione parametro FTSW ha mostrato un andamento simile a quello osservato per la FASW sia nelle piante cresciute a 25 °C che a 35 °C.

La sostituzione della $^{12}\text{CO}_2$ con la stessa concentrazione di $^{13}\text{CO}_2$ nella cuvetta utilizzata per misurare gli scambi gassosi, ha causato un rapido ed evidente cambiamento nella composizione isotopica dell'isoprene emesso dalle foglie di *P. nigra* (Fig. 11a). Infatti, prima dell'applicazione dello stress idrico (FTSW = 100%), l'emissione dell'isoprene non-marcato (m/z 69⁺) è diminuita rapidamente, seguita da un aumento temporaneo dell'emissione delle masse m/z 70⁺, m/z 71⁺ m/z 72⁺. Questo andamento del marcamento ha evidenziato la progressiva allocazione di uno, due o tre atomi di ^{13}C nella molecola di isoprene (marcamento intra-molecolare). Dopo aver raggiunto un picco in corrispondenza di un valore massimo, l'emissione di isoprene parzialmente marcato è diminuita mentre il completo il marcamento di tutti e cinque gli atomi di ^{13}C della molecola è stato evidenziato dalla crescita del segnale dello ione di massa m/z 74⁺. Alla fine dell'esposizione alla $^{13}\text{CO}_2$, la percentuale di ^{13}C incorporata nell'isoprene è risultata circa il 78% del carbonio totale presente nella molecola, anche se va osservato come dopo 15 minuti di esposizione alla $^{13}\text{CO}_2$ la quantità della massa m/z 74⁺ tendeva ancora ad aumentare, determinando probabilmente una stima incompleta della percentuale di ^{13}C incorporato nella molecola di isoprene. Ipotizzando che tutte le molecole di isoprene che hanno assimilato almeno un atomo di ^{13}C completino con il tempo il marcamento e siano alla fine tutte convertite in m/z 74⁺, la percentuale di ^{13}C incorporata nella molecola è risultata circa il 90% del carbonio totale presente nella molecola di isoprene (Fig. 12).

In condizioni di scarsa disponibilità di acqua nel suolo (FTSW = 10%), l'esposizione alla $^{13}\text{CO}_2$ non ha causato una sostanziale assimilazione del ^{13}C nella molecola di isoprene. Infatti la quantità dell'isoprene non marcato (massa m/z 69⁺) è diminuita solamente del ~ 20% mentre

nessun contemporaneo apprezzabile aumento delle masse da m/z 70⁺ a m/z 74⁺ e' stato evidenziato (Fig. 11b). Alla fine dei 15 minuti di esposizione alla $^{13}\text{CO}_2$, solo il 16% del carbonio totale presente nella molecola di isoprene è stato marcato da ^{13}C . Questo valore aumenta fino al 42% quando viene calcolato il rapporto tra isoprene non-marcato (m/z 69⁺) e la somma delle masse da m/z 70⁺ a m/z 74⁺ (Fig. 12). Comunque, sette giorni dopo l'irrigazione delle piante, l'assimilazione del ^{13}C ha mostrato un andamento molto simile a quello già osservato prima dell'inizio dello stress idrico, con un nuovo abbondante marcamento del carbonio incorporato in isoprene (Fig. 11c). La percentuale di ^{13}C presente nella molecola di isoprene risulta essere nuovamente circa il 90% (Fig. 12).

I dati riguardanti la conduttanza stomatica (Fig. 13) hanno evidenziato un maggior valore di apertura stomatica ($= 0.292 \pm 0.014 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) nelle piante cresciute a 25 °C rispetto a quelle cresciute a 35 °C ($\sim 0.14 \pm 0.071 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) prima dell'inizio del periodo di stress idrico. Come conseguenza della progressiva diminuzione d'acqua nel terreno, nelle piante cresciute a 25 °C gli stomi hanno cominciato a chiudersi in corrispondenza di FASW di $= 80 \pm 3 \%$ e sono risultati quasi completamente chiusi a FASW di $= 30 \pm 3 \%$. Nelle piante cresciute a 35 °C, gli stomi cominciano a chiudersi in maniera graduale quasi immediatamente dopo l'inizio dello stress idrico, quando la FASW era ancora $= 93 \pm 3 \%$, e si sono chiusi quasi del tutto in corrispondenza di FASW di $= 50 \pm 2 \%$. Anche in relazione al secondo parametro, la FTSW, la conduttanza stomatica ha mostrato un andamento diverso alle due temperature. Infatti, mentre a 35 °C la chiusura stomatica sembra avvenire in maniera lineare fin dall'inizio dell'applicazione dello stress idrico, a 25 °C diminuisce velocemente dopo una fase iniziale più o meno stazionaria.

La risposta della fotosintesi a concentrazioni crescenti di CO_2 in corrispondenza di tre diversi valori di FTSW (100%, 50%, 10%) e' mostrata nelle Fig.14A e 14B. Tale risposta è descritta dall'equazione:

$$f(x) = a(1 - e^{-bx})$$

La pendenza della retta tangente alla suddetta curva nel tratto lineare è correlata all'attività *in vivo* dell'enzima RUBISCO (von Caemmerer and Farquhar, 1981). Questa retta tangente è descritta dall'equazione lineare:

$$f(x) = ax + b$$

poichè il parametro a rappresenta la pendenza della curva, esso esprime l'attività della RUBISCO.

Prima dell'applicazione dello stress idrico (FTSW = 100%) nelle piante cresciute a 25 °C l'attività della RUBISCO è risultata maggiore ($a = 0.11 \pm 0.04$) di quella delle piante cresciute a 35 °C ($a = 0.052 \pm 0.007$), confermando l'optimum termico tipico delle piante C3. Dopo l'applicazione dello stress idrico, in corrispondenza di un valore intermedio di FTSW = 50%, l'attività della

RUBISCO e' diminuita sia nelle piante cresciute a 25 °C ($a = 0.049 \pm 0.006$) che nelle piante cresciute a 35 °C ($a = 0.033 \pm 0.0031$). In condizioni di scarsa disponibilit  di acqua nel terreno (FTSW = 10%), l'attivit  della RUBISCO   stata quasi completamente inibita nelle piante cresciute a 25 °C ($a = 0.0033 \pm 0.00007$) che in quelle cresciute a 35 °C ($a = 0.009 \pm 0.007$), anche se a 35 °C   risultata leggermente maggiore.

Prima dell'esposizione allo stress idrico, la respirazione delle piante cresciute a 25 °C misurata sia in condizioni di luce ($R_d = 1.4 \pm 0.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Fig. 15) che di buio ($R_n = 1.8 \pm 0.2 \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Fig. 16) ha mostrato un valore simile a quella delle piante cresciute a 35 °C ($R_d = 1.5 \pm 0.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ed $R_n = 2.2 \pm 0.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Come frequentemente riportato dalla letteratura, la respirazione alla luce e' risultata piu' bassa di quella misurata al buio (Pinelli e Loreto 2003). Dopo l'applicazione dello stress idrico, nelle piante cresciute a 25 °C R_n ha iniziato a diminuire in corrispondenza di una FASW di $= 55 \pm 3 \%$, maggiore rispetto alla FASW ($= 40 \%$) per la quale si e' osservata la diminuzione di R_d . Anche nelle piante cresciute a 35 °C R_n inizia a diminuire prima di R_d a seguito dello stress idrico. R_n e R_d hanno iniziato a diminuire, rispettivamente, a FASW di $= 80 \pm 3 \%$ e $= 62 \pm 3 \%$. Inoltre, e' da osservare che il valore minimo di respirazione (sia R_d che R_n) e' stato raggiunto a FASW = 10% nelle piante cresciute a 25 °C, ed a FASW di $= 30\%$ nelle piante cresciute a 35 °C.

L'andamento di R_d ed R_n con il procedere dello stress idrico in relazione a FTSW e' risultata molto simile nelle piante cresciute a 25 °C ed a 35 °C. Ad entrambe le temperature R_n ha iniziato a diminuire prima di R_d , a FTSW di $= 70 \pm 3 \%$ invece che di $= 50 \pm 3 \%$. Inoltre, il valore minimo di respirazione e' stato raggiunto a FTSW = 0%, sia per la R_d ($= 0.5 \pm 0.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) che per la R_n ($= 0.8 \pm 0.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), senza differenze significative tra le piante cresciute a 25 °C o a 35 °C.

Dopo aver irrigato le piante sottoposte a stress idrico, l'emissione di isoprene ha cominciato a recuperare velocemente, gi  dopo tre giorni (Fig. 17B e Fig. 17D), sia a 25 °C che a 35 °C. Dopo 15 giorni di regolari irrigazioni, lo stesso livello di emissione ($= 19.20 \pm 1.26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $= 18.52 \pm 0.95 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ rispettivamente a 25 °C ed a 35 °C) e' stato raggiunto ad entrambe le temperature, mostrando un'interessante inibizione della stimolazione termica dell'emissione di isoprene in piante esposte a stress idrico. L' emissione di isoprene e' stata simile a quella rilevata prima dell'evento di stress idrico nelle piante cresciute a 25 °C ($17.77 \pm 1.39 \text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), mentre e' risultata minore di $\sim 40 \%$ rispetto a quella misurata prima dell'applicazione dello stress idrico nelle piante cresciute a 35 °C ($28.97 \pm 1.23 \text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Diversamente dall'emissione di isoprene, la fotosintesi ha recuperato molto pi  velocemente nelle piante cresciute a 25 °C rispetto a quelle cresciute a 35 °C, raggiungendo gi  dopo 3-4 giorni

valori simili ($= 18.38 \pm 0.42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a quelli precedenti all'applicazione dello stress idrico (Fig. 17A e Fig.17C). Comunque, dopo 15 giorni di regolari irrigazioni, anche la fotosintesi delle piante cresciute a 35 °C ha raggiunto esattamente i valori rilevati prima dell'inizio dello stress idrico ($= 10.86 \pm 0.49 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), indicando che il trattamento di stress idrico imposto era completamente reversibile.

3.2- Stres idrico e trattamento con elevate concentrazioni di ozono

Nel corso di una diversa sperimentazione, piante di *Populus nigra* L. di cresciute a 25 °C, e sottoposte a fumigazione con elevate concentrazioni di ozono ($= 150 \pm 10$ ppb) per due settimane, sono state paragonate ad altre piante che hanno anche contemporaneamente subito uno stress idrico per investigare:

1) la risposta dell'emissione di isoprene alla presenza di un forte stress ossidativo indotto dalla presenza di ozono su foglie già esposte a stress idrico nei confronti del quale la sintesi e l'emissione di isoprene è risultata resistente; 2) l'andamento della fotosintesi durante un evento di stress idrico quando la sensibilità degli stomi è probabilmente alterata dalla fumigazione con ozono; 3) l'effetto dell'azione combinata di ozono e stress idrico sullo sviluppo fogliare, monitorato attraverso la misura dell'emissione di una sostanza volatile, il metanolo, che viene sintetizzata a seguito di processi di espansione o degradazione delle pareti cellulari (Nemecek et al, 1995; Huve et al. 2007).

La fumigazione con ozono ha mostrato un forte effetto di depressione nei riguardi dell'emissione di isoprene, esacerbata dalla combinazione con lo stress idrico (Fig 18B).

Nelle piante sottoposte contemporaneamente alla fumigazione con ozono ed a stress idrico, la fotosintesi (Fig. 18A) è stata inibita meno velocemente dell'emissione di isoprene e ha raggiunto un valore minimo quando la FASW era $= 50 \pm 3$ %. Nelle piante fumigate con ozono ma non esposte a stress idrico, questo andamento è stato ancora più lento, ed un valore di fotosintesi del 50 % rispetto al valore iniziale è stato osservato anche dopo 15 giorni di fumigazione. La conduttanza stomatica è diminuita con un andamento simile a quello della fotosintesi (Fig. 18C), sia nelle piante sottoposte a fumigazione con ozono e stress idrico che nelle piante solamente fumigate con ozono. A seguito della contemporanea riduzione di fotosintesi e conduttanza stomatica, i valori calcolati della concentrazione intercellulare di CO_2 (C_i) sono rimasti costanti durante la fumigazione con ozono, anche in presenza di un contemporaneo stress idrico (Fig. 18D).

Infine, forti differenze sono state rilevate per l'emissione di isoprene e metanolo da parte di giovani foglie che hanno raggiunto il 50% della completa espansione e che si sono sviluppate

durante i trattamenti con ozono o con ozono + stress idrico (Fig. 19), rispetto a foglie dello stesso stadio ontogenetico di crescita che sono state sottoposte solo a stress idrico o che non hanno subito nessun tipo di stress. Infatti, sia le foglie che non hanno subito nessun tipo di stress che le foglie che hanno subito solo lo stress idrico, hanno evidenziato basse emissioni di isoprene ed elevate emissioni di metanolo, due caratteri che di solito sono associati ad uno stadio giovanile di sviluppo. Al contrario, le foglie appartenenti allo stesso stadio ontogenetico delle precedenti, ma sviluppate durante la fumigazione con ozono o durante la contemporanea esposizione ad ozono e stress idrico, hanno mostrato elevate emissioni di isoprene e basse emissioni di metanolo (caratteri che di solito sono associati al raggiungimento di uno stadio di completo sviluppo). E' interessante osservare che dal confronto delle emissioni di tutti i diversi casi analizzati, e' stata evidenziata una relazione inversa tra l'emissione di isoprene e quella di metanolo (Fig. 20).

3.3 - Trattamento con elevata temperatura

Un ultimo esperimento ha riguardato la stima dell'effetto di un rapido e temporaneo innalzamento della temperatura, rappresentativo di situazioni di "ondate di calore" spesso presenti sul Mediterraneo, sull'emissione di isoprene. Il trattamento e' stato effettuato mantenendo le piante a condizione di CO₂ ambiente o simulando il contemporaneo probabile innalzamento della CO₂ atmosferica. E' stata utilizzata come specie oggetto di studio il *Platanus orientalis*, una specie a rischio di estinzione nella parte occidentale del Mediterraneo, che emette forti quantita' di isoprene.

L'emissione di isoprene misurata a 25 °C è risultata leggermente maggiore nelle piante di *Platanus orientalis* L. di due anni di età rispetto a che in quelle di un anno di età, anche se tale differenza non e' risultata statisticamente significativa (Fig. 21). Tuttavia, quando le piante sono state esposte alla temperatura di 38 °C per 4 ore, l'emissione di isoprene e' stata stimolata in maniera diversa nelle foglie appartenenti a piante di diversa età. Rispetto all'emissione a 25 °C, infatti, l'emissione di isoprene e' aumentata del 175% in piante di un anno di età, e del 400% in piante di due anni di età.

Il trattamento ad alta temperatura nelle piante di *P. orientalis* ha evidenziato una piccola, ma non statisticamente significativa, diminuzione della fotosintesi in foglie appartenenti a piante di diversa età e cresciute a concentrazioni di CO₂ ambientale (Fig. 22A). Come già osservato per l'isoprene, la fotosintesi delle foglie appartenenti a piante di due anni di età e' risultata leggermente più elevata di quella delle foglie di piante di un anno di età. Nelle foglie nelle quali è stata precedentemente inibita l'emissione di isoprene con l'inibitore chimico fosmidomicina, il trattamento ad alta temperatura ha provocato però una maggiore diminuzione della fotosintesi rispetto a quelle rilevata nelle foglie che emettono isoprene (Fig. 22). In particolare nelle piante di

un anno di età l'inibizione della fotosintesi è stata completa, mentre in quelle di due anni di età la fotosintesi è diminuita solo del 37%.

La fotosintesi è stata stimolata dalla crescita in presenza di elevate concentrazioni di CO₂ (Fig. 22B). In queste condizioni, l'effetto negativo dovuto al trattamento ad alta temperatura sulla fotosintesi è stato osservato sia nelle foglie delle piante in cui l'isoprene è stato inibito, indipendentemente dall'età della pianta, che nelle foglie delle piante di un anno che emettono isoprene. Tuttavia, nelle piante di due anni di età che emettono isoprene, il trattamento ad alta temperatura e ad elevata CO₂ non ha causato una significativa riduzione della fotosintesi.

CAP 4 – DISCUSSIONE

L'uso di un indice che correli lo stato di stress idrico con l'effettiva quantità di acqua disponibile, senza essere influenzato da altre variabili come la durata o la velocità dello sviluppo dello stress, o la diversa temperatura a cui lo stress idrico si sviluppa, è sempre stato difficilmente reperibile. Io ho adottato l'indice FASW che ha dimostrato di avere queste caratteristiche (Sinclair et al. 1985), per stabilire la risposta all'acqua disponibile nel terreno dell'emissione di isoprene, un processo che nel passato è stato considerato resistente allo stress idrico monitorato da parametri fogliari (Sharkey e Loreto 1993, Pegoraro et al. 2004b). Poiché il metabolismo secondario che produce isoprene dipende pressoché esclusivamente dal carbonio fissato fotosinteticamente (Sharkey and Yeh 2001), ed in piccola parte anche dalla rifissazione di carbonio proveniente dal catabolismo respiratorio (Loreto et al. 2004) ho anche concorrentemente investigato i cambiamenti indotti dalla diminuzione della FASW su fotosintesi, conduttanza stomatica e respirazione. Al contrario dei precedenti studi sull'argomento, ho focalizzato l'attenzione sull'impatto della temperatura sull'emissione di isoprene quando le piante sono esposte allo stress idrico. Questa ricerca ha un doppio razionale. Dal punto di vista ecologico, lo stress idrico è spesso accoppiato ad elevate temperature e la maggior frequenza di episodi di carenza idrica sarà certamente associata ad una maggior frequenza di ondate di calore (Rennenberg et al. 2003). Dal punto di vista fisiologico, l'emissione di isoprene è controllata fortemente da processi enzimatici dipendenti dalla temperatura. Quindi è importante conoscere se lo stress idrico, modificando le caratteristiche dell'enzima isoprene sintasi responsabile dell'emissione di isoprene (Monson et al. 1992), direttamente o indirettamente (per esempio via la riduzione del substrato per l'enzima stesso) può influire sulla dipendenza dell'emissione di isoprene dalla temperatura. Il calcolo della FASW permette di stabilire il livello di acqua presente nel terreno in corrispondenza del quale si verificano delle variazioni negli andamenti dell'emissione di isoprene, fotosintesi e respirazione in relazione allo sviluppo progressivo di uno stress idrico. Inoltre, la stima della FTSW che assume sempre valori che vanno da 100 a 0 (a differenza della FASW), permette di confrontare gli andamenti dei suddetti parametri fisiologici tra cicli di stress idrico che avvengono in condizioni diverse, come in questo caso in corrispondenza di due temperature (25 °C e 35 °C).

I risultati ottenuti hanno innanzitutto evidenziato la sensibilità dell'emissione di isoprene ad un aumento delle temperature di crescita di 10 °C. Infatti, l'emissione di isoprene di giovani piante di *P. nigra* allevate a 35 °C è doppia rispetto a quella delle piante allevate a 25 °C. Come già accennato, la dipendenza dell'emissione di isoprene dalla temperatura è nota (Loreto e Sharkey 1990) ed è da attribuire all'attivazione dell'enzima isoprene sintasi (Niinemets et al. 2004) che ha

un optimum termico a circa 42 °C (Monson et al. 1992). Tuttavia e' da notare che in questo lavoro la notevole variazione dell'emissione di isoprene e' stata osservata in piante cresciute e non esposte ad alte temperature. Si puo' quindi ipotizzare che il processo di biosintesi di isoprene non si acclimati ad un'incremento a lungo termine della temperatura prodotto dai cambiamenti climatici. Evidentemente non sono presenti meccanismi di feedback in grado di retro-regolare l'attività enzimatica e/o l'espressione genica dell'enzima isoprene sintasi, e non intervengono limitazioni da substrato in piante cresciute a temperature che limitano la fotosintesi e quindi la sorgente primaria di carbonio per la formazione di isoprene.

Inoltre, l'applicazione dei nuovi indici di stress idrico ha confermato la bassa sensibilità dell'emissione di isoprene alla progressiva diminuzione della disponibilità idrica, almeno rispetto a fotosintesi e conduttanza stomatica (Tingey et al. 1981; Sharkey & Loreto, 2003; Fang et al. 1996; Pegoraro et al. 2004; Funk et al. 2005; Brilli et al. 2007). In particolare, sia a 25 °C che a 35 °C l'emissione di isoprene tende a rimanere costante durante le prime fasi di stress idrico, dopodiché subisce una leggera e temporanea stimolazione che precede una progressiva diminuzione verso valori minimi, in corrispondenza di una quantità molto bassa di acqua nel suolo. Confrontando l'andamento dell'emissione di isoprene con quello della conduttanza stomatica, è evidente come, sia a 25 °C che a 35 °C, la stimolazione dell'emissione di isoprene osservata durante le prime fasi di stress idrico avvenga alla FASW alla quale la conduttanza stomatica comincia a diminuire. Chiaramente, al procedere di uno stress idrico gli stomi si chiudono progressivamente per limitare la traspirazione e mantenere così una quantità d'acqua costante all'interno delle foglie. Contemporaneamente però, la chiusura stomatica provoca una diminuzione della dissipazione del calore latente rilasciato come vapore acqueo. La riduzione della capacità della foglia di raffreddarsi, a sua volta determina un aumento della temperatura interna del tessuto fogliare (Sharkey, 2005). Poiché è stato già dimostrato come l'emissione di isoprene e' molto sensibile alla variazione della temperatura (Monson et al. 1992), è ragionevole ipotizzare che la stimolazione provvisoria dell'emissione di isoprene osservata, sia essenzialmente dovuta all'aumento della temperatura interna della foglia. Naturalmente, nel caso delle piante cresciute a 35 °C, la stimolazione è risultata meno evidente a causa dell'elevato livello di emissione osservato prima dell'applicazione dello stress idrico, essendo questa temperatura molto vicina all'*optimum* relativo all'emissione di isoprene (stimato intorno a 42 °C) (Monson et al. 1992). Alternativamente e' possibile che il transiente aumento dell'emissione di isoprene a FASW intermedie rifletta un aumento della biosintesi di isoprene. Come già dimostrato in presenza di stress ossidativi (Fares et al. 2007) l'espressione genica dell'mRNA che codifica per la sintesi dell'enzima isoprene sintasi puo'

aumentare allorché lo stress è prolungato. Una simile situazione potrebbe verificarsi anche in dipendenza di stress idrico.

All'intensificarsi dello stress idrico, gli esperimenti hanno confermato (Pegoraro et al. 2004a,b) come l'inibizione all'emissione di isoprene avvenga solo in corrispondenza di una bassissima soglia di acqua disponibile nel terreno, quando la fotosintesi è ormai totalmente inibita e gli stomi non hanno più la capacità di regolare il bilancio idrico della pianta. Il mantenimento di un livello sostenuto di emissione di isoprene anche quando la fotosintesi risulta essere completamente inibita è dovuto all'incremento della quantità di carbonio proveniente da vie metaboliche alternative a quella dell'assimilazione mediante la fotosintesi. Infatti, dai dati raccolti durante l'analisi *on-line* del ^{13}C incorporato nella molecola di isoprene, risulta che il carbonio proveniente dalla fotosintesi prima dell'inizio dello stress idrico nelle piante cresciute a 25 °C (78 – 90% del carbonio totale incorporato nella molecola di isoprene), scende al 16 – 42% in condizioni di scarsa disponibilità di acqua nel suolo (Brilli et al. 2007). È stato già osservato come in foglie non stressate, la re-assimilazione della CO_2 proveniente dalla respirazione (in condizioni di illuminazione) può rappresentare ~ 12% del carbonio presente nella molecola di isoprene (Loreto et al. 2004b). Tuttavia, poiché la respirazione è sostanzialmente inibita all'intensificarsi dello stress idrico, non sembra che possa aver contribuito in maniera determinante alla formazione di isoprene da parte delle foglie stressate idricamente. Inoltre, non sembra nemmeno possibile che il carbonio immagazzinato sotto forma di amido possa contribuire molto alla sintesi di isoprene quando il carbonio proveniente dalla fotosintesi non risulta più disponibile (Funk et al, 2004; Brilli et al, 2007). Queste evidenze rinforzano l'ipotesi che durante uno stress idrico, nel momento in cui il carbonio proveniente dalla fotosintesi risulta essere limitato, buona parte della frazione di carbonio utilizzata nella formazione di isoprene provenga da una via biosintetica di origine extra-cloroplastica ma ancora ignota (Karl et al. 2002; Funk et al. 2004; Brilli et al. 2007).

Calcolando la percentuale di carbonio utilizzata per produrre isoprene durante il procedere dello stress idrico, è possibile osservare come questa quantità rimanga costante fino ad una FASW = 77 ± 3 % o 55 ± 3 % in piante cresciute rispettivamente a 35 °C ed a 25 °C, tendendo poi ad aumentare in maniera esponenziale una volta che questo livello viene superato. Dall'analisi di questo parametro, è stato possibile determinare la soglia di acqua disponibile nel suolo in corrispondenza della quale l'emissione di isoprene comincia a diminuire con un andamento più lento rispetto a quello della fotosintesi. Tale soglia viene raggiunta anticipatamente ad alte temperature, quando l'emissione di isoprene e la frazione di carbonio investito nella sintesi di questa molecola sono particolarmente cospicui.

L'osservazione che dopo alcuni giorni di regolari irrigazioni, l'emissione di isoprene da parte delle foglie stressate idricamente recupera il livello precedente allo stress a 25 °C ma non a 35 °C e' particolarmente interessante. **Questo e' il primo esperimento in cui si e' riusciti a manipolare la forte dipendenza dell'isoprene dalla temperatura.** Dalle analisi relative all'attività, ed alla concentrazione dell'enzima isoprene sintasi ed all'espressione dell'mRNA che codifica per questo enzima (Fortunati et al. 2008), è possibile ipotizzare che l'emissione di isoprene sia regolata diversamente durante lo stress idrico rispetto al successivo periodo di recupero. Mentre l'attività enzimatica sembra limitare fortemente l'emissione di isoprene in condizioni di severo stress idrico (Brilli et al. 2007), la limitazione dell'emissione in piante che recuperano da stress idrico puo' essere attribuita ad un differente uso del substrato o ad un minore livello della proteina isoprene sintasi (Fortunati et al. 2008). Dal punto di vista ecologico la diretta conseguenza di questa osservazione e' che episodi di stress idrico da cui le piante recuperano in maniera pressoché completa possono tuttavia ridurre l'emissione di isoprene emesso ad alte temperature. Questa osservazione puo' avere notevoli conseguenze per l'elaborazione dei modelli di previsione dell'emissione di questo VOC di grande importanza per la chimica ambientale (Guenther et al 1995). Inoltre, se l'isoprene ha una funzione protettiva nei confronti di stress termici od ossidativi (Sharkey e Yeh 2001, vedi anche l'ultimo esperimento di questa tesi), ricorrenti stress idrici che provocano la riduzione o l'annullamento della termo-dipendenza dell'emissione possono anche ridurre la termo-tolleranza delle piante o le loro funzioni antiossidanti. Queste possibili conseguenze indirette dell'effetto dello stress idrico sulla dipendenza dell'isoprene dalla temperatura devono ancora essere verificate sperimentalmente.

Ho precedentemente osservato che l'emissione di isoprene non si acclimata alla diverse temperature, cioè la dipendenza dalla temperatura non cambia (prima dello stress idrico) sia che le piante siano cresciute o esposte ad alte temperature. La stessa osservazione puo' essere ripetuta per quanto riguarda il metabolismo fotosintetico. Infatti, un incremento di 10 °C della temperatura di crescita (da 25 °C a 35 °C) ha sostanzialmente determinato una riduzione della fotosintesi del 30%, esattamente come nelle piante esposte per breve tempo alle due temperature. Questa riduzione è probabilmente dovuta ad una minore attività dell'enzima RUBISCO a temperature superiori al suo optimum, normalmente intorno ai 25 - 30 °C (Berry et al. 1980). Infatti l'analisi *in vivo* dell'attività della RUBISCO, estrapolata dalla pendenza delle curve di risposta a concentrazioni crescenti di CO₂ (von Caemmerer et al. 1981) è risultata nettamente maggiore nelle piante cresciute a 25 °C rispetto a quelle cresciute a 35 °C prima dell'applicazione dello stress idrico. Tuttavia va notato che lo stress idrico ha un effetto molto piu' drammatico sulla RUBISCO a 25 °C che a 35 °C. In corrispondenza della minore frazione di acqua traspirabile nel suolo (FTSW10), infatti, a 25 °C

l'attività della RUBISCO è quasi completamente assente, mentre a 35 °C essa risulta ancora apprezzabile. Quindi le limitazioni biochimiche non sembrano essere preponderanti nel controllare la diminuzione della fotosintesi nelle piante stressate idricamente a 35 °C.

Diversamente da quanto osservato per la fotosintesi, la respirazione (sia che venga misurata in condizioni di luce che di buio) non varia molto in seguito ad un aumento della temperatura di crescita delle piante, mentre aumenti istantanei di temperatura provocano un immediato aumento della CO₂ rilasciata dalla respirazione (Loreto et al. 2001). Questi dati supportano e complementano quelli ricavati in una recente sperimentazione (Ow et al. 2008), nella quale piante di pioppo allevate a temperature di 15, 20 e 25 °C (inferiori a quelle a cui sono state esposte le piante nel mio esperimento) hanno pure mostrato che la respirazione si acclimata alla temperatura di crescita. Questi risultati quindi dimostrano che l'acclimatamento della respirazione nelle piante di *Populus spp.* avviene in un ampio intervallo di temperatura.

L'acclimatamento è definito come l'aggiustamento dei processi fisiologici per garantire alle piante le stesse performances (e la stessa fitness) rispetto a nuove e diverse temperature di crescita (Berry et al. 1980). Poiché esistono notevoli differenze tra la risposta delle piante in relazione a cambiamenti a breve o a lungo termine delle condizioni ambientali, nello studio degli effetti dei cambiamenti climatici risulta importante investigare la risposta del metabolismo delle piante a cambiamenti prolungati delle condizioni di crescita. Inoltre, esistono ancora poche informazioni riguardanti il grado di acclimatamento dei processi di emissione di isoprene, fotosintesi e respirazione delle diverse specie di piante rispetto ad incrementi della temperatura di crescita e di sviluppo. I dati ricavati da questi esperimenti hanno aggiunto nuove informazioni relative agli effetti dell'acclimatamento in relazione al progredire di uno stress idrico. In particolare, anche se è stato postulato che la respirazione potrebbe essere un processo che indurrebbe una competizione con la biosintesi di isoprene per la disponibilità del substrato fosfoenolpiruvato (PEP) (Loreto et al. 2007), l'esposizione ad una temperatura di crescita e di sviluppo più elevata non ha direttamente stimolato questa competizione, poichè l'emissione di isoprene è raddoppiata mentre la respirazione non ha subito variazioni.

Comunque, l'approvvigionamento dei composti fosforilati presenti nel citosol per la respirazione e per l'emissione di isoprene ha subito delle variazioni durante il progredire dello stress idrico a causa della diversa attività dell'enzima fosfoenolpiruvato carbossilasi (PEPC) che è stata rilevata in corrispondenza delle due diverse temperature di 25 °C e 35 °C (Fortunati et al. 2008).

L'esposizione ad uno stress ossidativo contemporaneamente al trattamento di stress idrico ha provocato una sorprendente risposta in termini di emissione di isoprene in piante di *P. nigra* cresciute 25 °C. Diversamente a quanto precedentemente osservato per le piante esposte a stress

idrico, infatti, l'emissione di isoprene è diminuita con una velocità anche maggiore della fotosintesi. Quindi un forte stress ossidativo e' in grado di ridurre il meccanismo che rende resistente la via metabolica di produzione dell'isoprene allo stress idrico. I risultati contrastano con quelli raccolti precedentemente, e relativi ad esposizioni acute ad ozono (Loreto et al. 2001b), nei quali e' stato osservato un aumento dell'emissione di isoprene dopo il trattamento, una stimolazione dell'intera via metabolica di sintesi degli isoprenoidi (Fares et al. 2007) ed una sostanziale riduzione del danno alla fotosintesi nelle piante che emettono isoprene. Tuttavia esposizioni croniche ad ozono hanno mostrato che il processo di sintesi dell'isoprene e' infatti sensibile all'inquinante e che l'emissione puo' essere largamente ridotta quando l'ozono provoca comunque un forte danno alla fotosintesi (Calfapietra et al. 2007), superando le barriere antiossidanti alle quali contribuiscono anche gli isoprenoidi costitutivi (carotenoidi e xantofille) e quelli volatili (Loreto et al. 2007). Questo sembra essere stato il caso anche nell'esperimento in oggetto, nel quale infatti e' stata osservata anche una forte riduzione della fotosintesi conseguente sia allo stress ossidativo (valutato sulla base dei giorni dall'applicazione del trattamento) che, soprattutto alla combinazione tra stress ossidativo e stress idrico (valutato sulla base della FASW). Va assolutamente escluso che l'emissione di isoprene sia stata limitata dalla chiusura anticipata degli stomi, non essendo regolata da questo fattore (Niinemets et al. 2003). Inoltre, può essere esclusa l'ipotesi che l'inibizione dell'isoprene sia stata determinata da un accumulo della CO₂ negli spazi intercellulari a causa della diminuzione della fotosintesi poiché non è stata riscontrata nessuna variazione nella stima della concentrazione di CO₂ negli spazi intercellulari (Ci) durante l'esposizione delle piante all'ozono. Poiché gli stomi non chiudono mai completamente, può essere anche avanzata l'ipotesi che l'ozono, una volta penetrato all'interno del mesofillo fogliare, possa aver reagito con l'isoprene presente negli spazi intercellulari del tessuto lacunoso, provocando una rapida diminuzione della quantità di isoprene misurata all'esterno come emissione (Loreto et al. 2007). Naturalmente, quest'ultimo effetto potrebbe essere avvenuto contemporaneamente alla riduzione della biosintesi di isoprene causata dal forte danneggiamento a carico della fotosintesi

Inoltre, si deve osservare che l'ozono ha direttamente interferito sul meccanismo di chiusura degli stomi, riducendone l'apertura rispetto alle piante non ozonate. La combinazione di stress ossidativi ed idrico ha esacerbato questa risposta e la chiusura stomatica si e' verificata a FASW molto superiori (circa il 60%) rispetto a quelle a cui l'effetto del solo ozono e' stato piu' drammatico. L'effetto dell'ozono puo' avere indirettamente influenzato diverse performances fisiologiche delle piante riducendo sia la capacità delle foglie di raffreddarsi, che limitando l'ingresso della CO₂ disponibile per la fotosintesi, aumentando quindi la soglia di FASW in corrispondenza della quale la fotosintesi comincia ad essere inibita.

Lo studio circa l'effetto dell'ozono sull'emissione di isoprene ha anche riguardato la possibilità che l'inquinante possa accelerare i processi di invecchiamento e senescenza fogliare (Fares et al. 2006). Ho utilizzato come marcatori specifici dell'età della foglia due composti volatili che sono noti per essere largamente modulati dall'ontogenesi fogliare. L'isoprene comincia di solito ad essere emesso in piccole quantità subito dopo che la foglia ha assunto la piena capacità fotosintetica, raggiungendo gradualmente un massimo e stabilizzandosi successivamente in corrispondenza della piena maturità fogliare (Wiberley et al, 2005). Il metanolo invece, viene emesso maggiormente durante le prime fasi di crescita fogliare, come diretta conseguenza dell'attività delle pectin metil esterasi che agiscono sulle membrane cellulari in continua espansione (Nemecek et al, 1995). Come ipotizzato, le foglie di *P. nigra* che non hanno completato l'espansione della lamina fogliare e che si sono sviluppate in presenza di ozono, hanno mostrato una più elevata emissione di isoprene ed una minore emissione di metanolo rispetto a quelle cresciute senza l'inquinante. Questo risultato si è verificato anche quando l'esposizione ad ozono è avvenuta concorrentemente allo stress idrico. Quindi, come è già stato recentemente evidenziato (Fares et al. 2007), la presenza di ozono potrebbe effettivamente aver agito indirettamente sul metabolismo delle piante, inducendo anticipatamente fenomeni di senescenza, con conseguente diminuzione dei tempi di accrescimento delle foglie a scapito della loro dimensione finale, e con un indiretto effetto sulle caratteristiche fisiologiche alla base del metabolismo primario e secondario.

Infine, ho condotto un esperimento per contribuire ulteriormente allo studio dell'impatto dell'isoprene sulla termotolleranza, postulato da Sharkey e Singsaas (1995). L'esposizione a brevi periodi di elevate temperature ha evidenziato chiaramente come le foglie di *Platanus orientalis* in cui l'emissione di isoprene è stata precedentemente inibita dal trattamento con fosmidomicina, siano più sensibili alle alte temperature di quelle che emettono isoprene. L'esperimento ha evidenziato tuttavia che le foglie appartenenti a piante di due anni di età hanno mostrato una maggiore tolleranza al trattamento rispetto a quelle di un anno di età. La termotolleranza è senz'altro associabile ad una più elevata capacità di emissione di isoprene nelle foglie delle piante di due anni, e ad una maggiore stimolazione dell'emissione in queste foglie quando esposte allo stress termico. La termotolleranza delle foglie di piante di due anni sembra anche essere associata ad una maggiore efficienza del fotosistema II. Confermando i risultati recentemente ottenuti da Sharkey (2005), è ipotizzabile che il fotosistema II possa essere stato preservato dal danno termico proprio grazie alla maggiore quantità di isoprene emesso dalle piante di due anni di età. Un ampio dibattito è tutt'ora aperto nella comunità scientifica circa il sito di azione dell'isoprene. Una delle possibilità proposte è che l'isoprene sia direttamente coinvolto nella stabilizzazione delle

membrane tilacoidali ed esattamente dei macrocomplessi lipo-proteici che costituiscono i fotosistemi all'interno dei cloroplasti (Sharkey et al. 1995). Questa osservazione confermerebbe ulteriormente il ruolo di protezione dell'isoprene sulle membrane dei cloroplasti contro il sopraggiungere di stress termici.

In ultima analisi, in questo esperimento gli effetti di una rapida variazione della temperatura sono stati valutati anche in piante di *P. orientalis* cresciute in presenza di elevate concentrazioni di CO₂. Infatti, come conseguenza dei cambiamenti climatici, il verificarsi di uno stress dovuto alle elevate temperature sarà inevitabilmente associato anche alla presenza di elevate concentrazioni di questo gas serra nell'atmosfera. Inizialmente, i risultati ottenuti hanno evidenziato una leggera stimolazione della fotosintesi come conseguenza della crescita in presenza di elevate concentrazioni di CO₂, rispetto alla crescita a concentrazione di CO₂ ambientale. E' stato interessante osservare che le foglie appartenenti a piante di *P. orientalis* di un anno di età cresciute in presenza di elevate concentrazioni di CO₂ hanno mostrato una particolare sensibilità al trattamento ad alta temperatura indipendentemente dall'inibizione dell'emissione di isoprene. Al contrario, le foglie di piante di *P. orientalis* di due di età cresciute in presenza di elevate concentrazioni di CO₂ hanno mostrato una particolare tolleranza all'elevata temperatura del trattamento solo quando l'emissione di isoprene non è stata inibita. In conclusione, la crescita in presenza di elevati livelli di CO₂, anche se potrebbe aumentare la sensibilità delle foglie giovani a variazioni improvvise della temperatura, non altererebbe la capacità dell'isoprene di indurre una maggiore tolleranza contro il sopraggiungere di stress termici.

Legenda delle figure

Figura 1. Relazione tra l'andamento della temperatura e l'andamento della concentrazione di CO₂ valutata durante l'ultimo secolo.

Figura 2. Visualizzazione dell'indice PDSI (*Palmer Drought Severity Index*): distribuzione spaziale (A); variazione della tendenza annuale valutata nell'ultimo secolo (B).

Figura 3. Rappresentazione schematica dello scambio gassoso di CO₂ ed H₂O nelle foglie.

Figura 4. Emissione di *Volatile Organic Compounds* dalle piante.

Figura 5. Formula per il calcolo dei parametri di FASW (*Fraction of Available Soil Water*) e FTSW (*Fraction of Soluble Soil Water*).

Figura 6. Rappresentazione dello schema di funzionamento del PTR-MS (*Proton Transfer Reaction Mass Spectrometer*).

Figura 7. Formula utilizzata per il calcolo teorico della concentrazione di composti volatili analizzati con il PTR-MS (*Proton Transfer Reaction Mass Spectrometer*).

Figura 8. Misurazioni dell'emissione di isoprene in piante di *P. nigra* cresciute a 25°C ed a 35 °C durante lo stress idrico in funzione della frazione di acqua disponibile (FASW) e traspirabile (FTSW) nel terreno. Le misurazioni sono state eseguite a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{PPFD}$ e ad una concentrazione di CO₂ = 380 ppm. Le linee indicano le curve relative all'andamento dell'emissione di isoprene rispetto alla FASW e FTSW. Le frecce indicano i punti in corrispondenza dei quali si verificano delle variazioni significative negli andamenti delineati.

Figura 9. Misurazioni di fotosintesi (*Pn*) in piante di *P. nigra* cresciute a 25 °C ed a 35 °C durante lo stress idrico in funzione della frazione di acqua disponibile (FASW) e traspirabile (FTSW) nel terreno. Le misurazioni sono state eseguite a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{PPFD}$ e ad una concentrazione di CO₂ = 380 ppm. Le linee indicano le curve relative all'andamento della fotosintesi rispetto alla FASW e FTSW. Le frecce indicano i punti in corrispondenza dei quali si verificano delle variazioni significative negli andamenti delineati.

Figura 10. Calcolo della quantità di carbonio impiegato per l'emissione di isoprene in piante di *P. nigra* cresciute a 25°C ed a 35 °C durante lo stress idrico in funzione della frazione di acqua disponibile (FASW) e traspirabile (FTSW) nel terreno. Le linee indicano le curve relative all'andamento della quantità di carbonio impiegato per l'emissione di isoprene rispetto alla FASW e FTSW. Le frecce indicano i punti in corrispondenza dei quali si verificano delle variazioni significative negli andamenti delineati.

Figura 11. Andamento dell'assimilazione del ^{13}C nella molecola di isoprene emesso da piante di *P. nigra* allevate a 25 °C in corrispondenza di un livello di FTSW = 100% (a), 10% (b) e 7 giorni dopo l'irrigazione (c). La $^{12}\text{CO}_2$ è stata sostituita dalla $^{13}\text{CO}_2$ nel punto contraddistinto dalla freccia. I diversi colori rappresentano le diverse masse: $m/z = 69$ (isoprene non-marcato), e m/z da 70 a 74 (isoprene parzialmente o totalmente marcato). I cerchi si riferiscono alla percentuale di ^{13}C totale presente nella molecola di isoprene. I dati si riferiscono ad una singola foglia, ma rappresentano i dati di esperimenti replicati quattro volte in quattro foglie diverse appartenenti a piante di *P. nigra* cresciuta a 25 °C.

Figura 12. Emissione totale di isoprene in piante di *P. nigra* allevate a 25 °C (barre bianche) e la rispettiva frazione di ^{13}C (barre tratteggiate) e di ^{12}C (barre doppiamente tratteggiate) misurate dopo 15 minuti di somministrazione di $^{13}\text{CO}_2$. La frazione dell'isotopo ^{12}C corrisponde alla massa $m/z = 69^+$ (isotopo dell'isoprene non- marcato), mentre la frazione dell'isotopo ^{13}C è data dalla somma degli isotopi dalla massa $m/z = 70^+$ alla massa $m/z = 74^+$ (ipotizzando che prolungando i tempi di somministrazione della $^{13}\text{CO}_2$ tutti gli isotopi di massa m/z da 70^+ a 73^+ si sarebbero convertiti in massa $m/z = 74^+$). I valori rappresentano la media di 5 piante ± 1 e le rispettive barre l'errore standard. Le diverse lettere indicano le differenze significative con $P < 0.05$. Le misurazioni sono state effettuate in corrispondenza di in FTSW = 100% (FTSW₁₀₀), FTSW = 10% (FTSW₁₀) e 7 giorni dopo l'irrigazione (7 DAR).

Figura 13. Misurazioni di conduttanza stomatica (g_c) in piante di *P. nigra* cresciute a 25 °C ed a 35 °C durante lo stress idrico in funzione della frazione di acqua disponibile (FASW) e traspirabile (FTSW) nel terreno. Le misurazioni sono state eseguite a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD e ad una concentrazione di $\text{CO}_2 = 380$ ppm. Le linee indicano le curve relative all'andamento della conduttanza stomatica rispetto alla FASW e FTSW. Le frecce indicano i punti in corrispondenza dei quali si verificano delle variazioni significative negli andamenti delineati.

Figura 14. Curve di risposta della fotosintesi (P_n) a concentrazioni crescenti di CO_2 intercellulare (C_i) in piante di *P. nigra* durante lo stress idrico in corrispondenza di 3 diversi valori di FASW (100%; 50%; 10%) in piante cresciute a 25 °C (figura A) ed a 35 °C (figura B). Le misurazioni sono state eseguite a $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD.

Figura 15. Misurazioni della respirazione in condizioni di luce (R_d) in piante di *P. nigra* cresciute a 25 °C ed a 35 °C durante lo stress idrico in funzione della frazione di acqua disponibile (FASW) e traspirabile (FTSW) nel terreno. Le misurazioni sono state eseguite a $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD e ad una concentrazione di $\text{CO}_2 = 380$ ppm. Le linee indicano le curve relative all'andamento della respirazione in condizioni di luce (R_d) rispetto alla FASW e FTSW. Le frecce indicano i punti in corrispondenza dei quali si verificano delle variazioni significative negli andamenti delineati.

Figura 16. Misurazioni della respirazione in condizioni di buio (R_n) in piante di *P. nigra* cresciute a 25 °C ed a 35 °C durante lo stress idrico in funzione della frazione di acqua disponibile (FASW) e traspirabile (FTSW) nel terreno. Le misurazioni sono state eseguite a $0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD e ad una concentrazione di $\text{CO}_2 = 380$ ppm. Le linee indicano le curve relative all'andamento della respirazione in condizioni di buio (R_n) rispetto alla FASW e FTSW. Le frecce indicano i punti in corrispondenza dei quali si verificano delle variazioni significative negli andamenti delineati.

Figura 17. Misurazioni di fotosintesi (figura A) (figura C) ed emissione di isoprene (figura B) (figura D) in piante di *P. nigra* cresciute a 25 °C ed a 35 °C durante 15 giorni di irrigazione successivi al termine dello stress idrico. Le misurazioni sono state eseguite a $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD e ad una concentrazione di $\text{CO}_2 = 380$ ppm.

Figura 18. Normalizzazioni delle misurazioni di fotosintesi (figura A), emissione di isoprene (figura B), conduttanza stomatica (figura C) e concentrazione intercellulare di CO_2 (figura D) in piante di *P. nigra* cresciute a 25 °C e sottoposte a fumigazione con ozono (cerchi bianchi) rispetto ai valori misurati inizialmente in relazione al numero dei giorni del trattamento, ed in piante di *P. nigra* cresciute a 25 °C contemporaneamente sottoposte a fumigazione con ozono ed a stress idrico (cerchi neri) in relazione alla frazione d'acqua disponibile nel terreno. Le misurazioni sono state eseguite a 25 °C, $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD e ad una concentrazione di $\text{CO}_2 = 380$ ppm. Ogni punto rappresenta la media con la relativa deviazione standard ($n = 3$).

Figura 19. Misurazioni di fotosintesi (barre nere), emissione di isoprene (barre rosse) ed emissione di metanolo (barre verdi) in giovani foglie di piante di *P. nigra* cresciute a 25 °C in fase di sviluppo dopo una settimana dalla loro comparsa in corrispondenza: del trattamento con ozono, dello stress idrico abbinato al trattamento con ozono, del solo stress idrico o dell'applicazione di nessun tipo di stress. Le misurazioni sono state eseguite a 25 °C, 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD e ad una concentrazione di $\text{CO}_2 = 380$ ppm. Ogni barra rappresenta la media con le relative deviazioni standard ($n = 3$). Le medie sono state separate con il t-test e le diverse lettere indicano le differenze significative con $P < 0.05$.

Figura 20. Retta di regressione calcolata tra l'emissione di metanolo e l'emissione di isoprene in tutti i casi analizzati in Fig. 19.

Figura 22. Effetto del trattamento ad elevata temperatura (38 °C per 4 ore) in foglie di *P. orientalis* di uno e due anni di età di piante cresciute a concentrazioni di CO_2 ambiente (380 ppm). Le misurazioni sono state eseguite a 350 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD e 380 ppm CO_2 . Le barre di errore rappresentano le medie e le relative deviazioni standard ($n = 5$). Le medie sono state separate con il t-test e le diverse lettere indicano le medie statisticamente differenti con $P < 0.05$.

Figura 22. Misurazioni di fotosintesi in piante di *P. orientalis* cresciute a 380 ppm (figura A) e 770 ppm CO_2 (figura B) in relazione al trattamento ad elevata temperatura (38 °C per 4 ore). Le misurazioni sono state eseguite a 350 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PPFD e 380 ppm CO_2 per le piante cresciute in condizioni di CO_2 ambiente, e $\text{CO}_2 = 800$ ppm per le piante cresciute in presenza di elevate concentrazioni di CO_2 . Le barre delineate con linea continua rappresentano la fotosintesi delle piante di un anno di età mentre le barre striate rappresentano la fotosintesi nelle piante di due anni di età. Le barre scure rappresentano la fotosintesi dopo il trattamento ad elevata temperatura sia nelle piante di un anno di età che in quelle di due anni di età. Le barre di errore rappresentano le medie e le relative deviazioni standard ($n = 5$). Le medie sono state separate con il t-test e le diverse lettere indicano le medie statisticamente differenti con $P < 0.05$.

Grafici

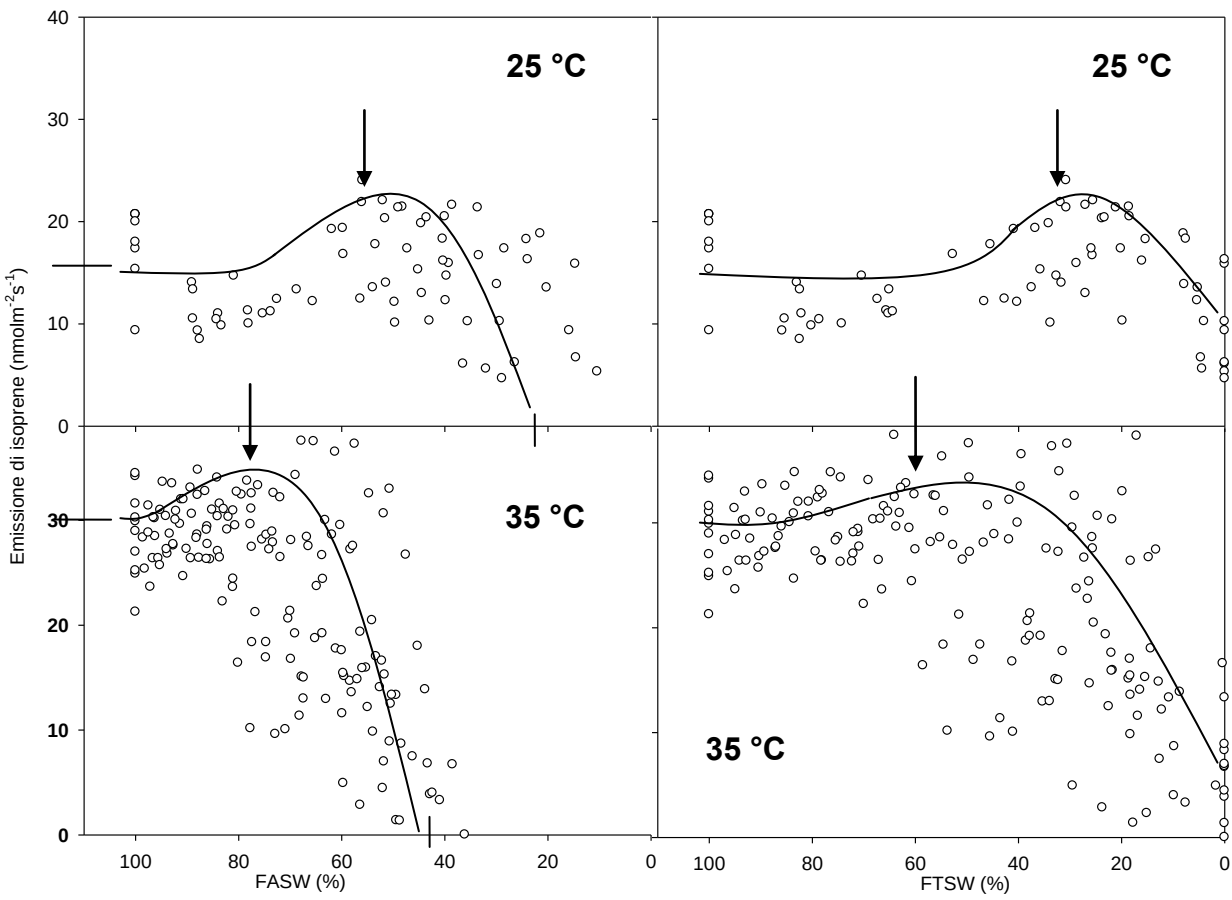


Fig. 8

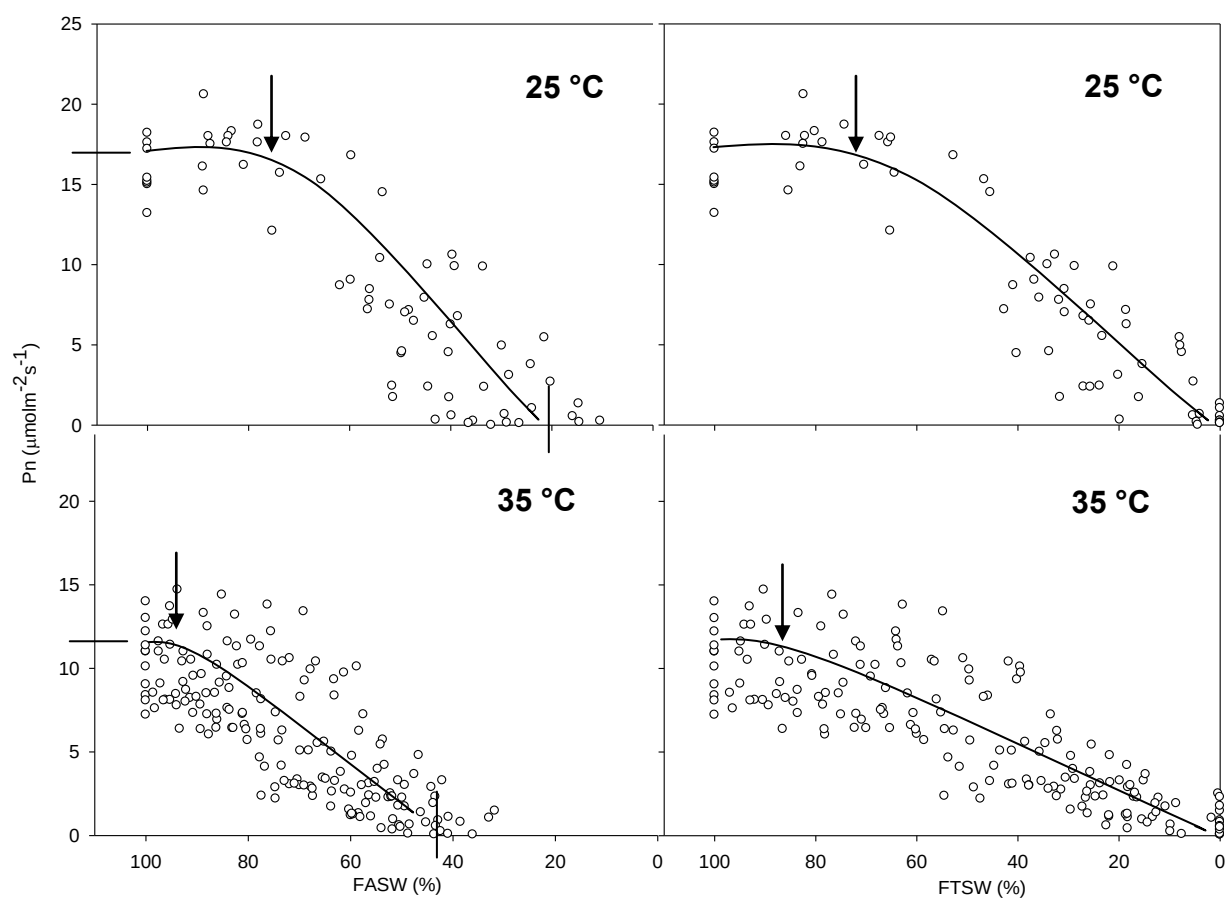


Fig. 9

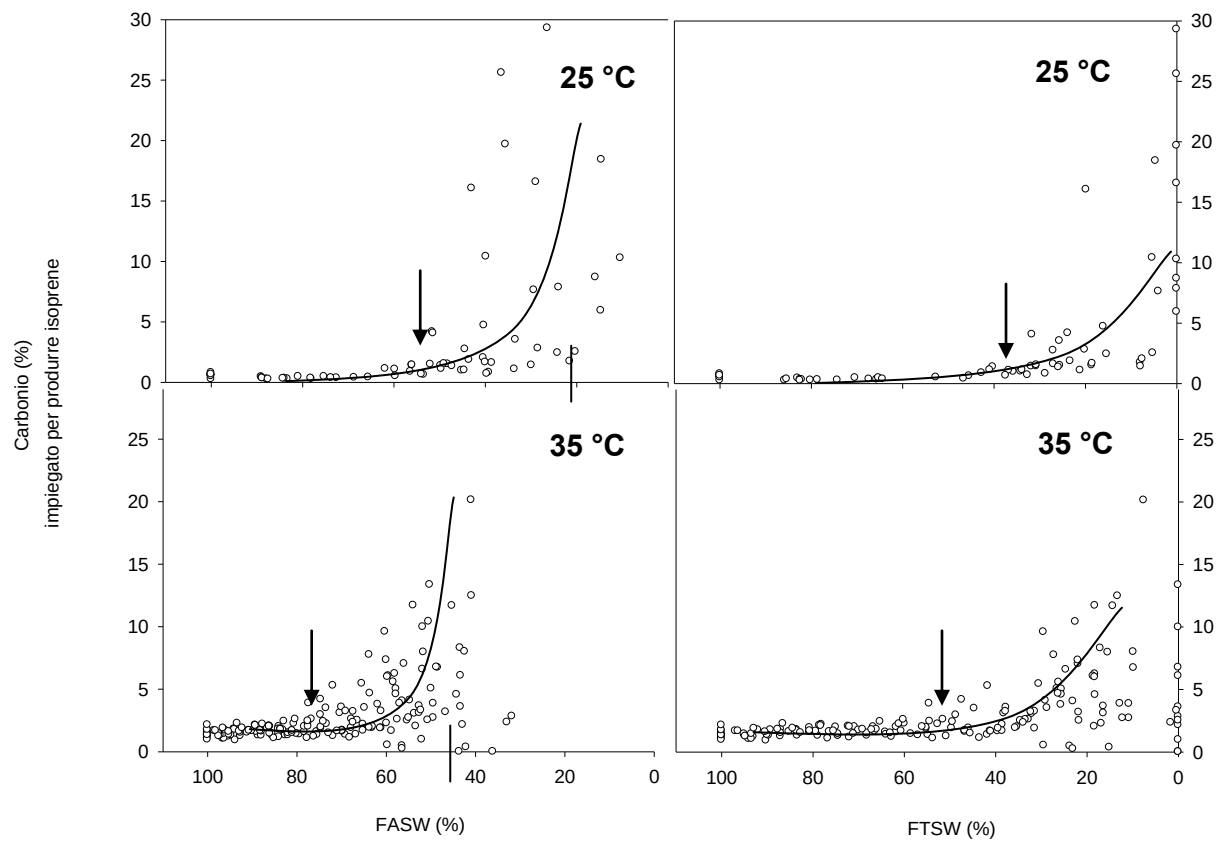


Fig. 10

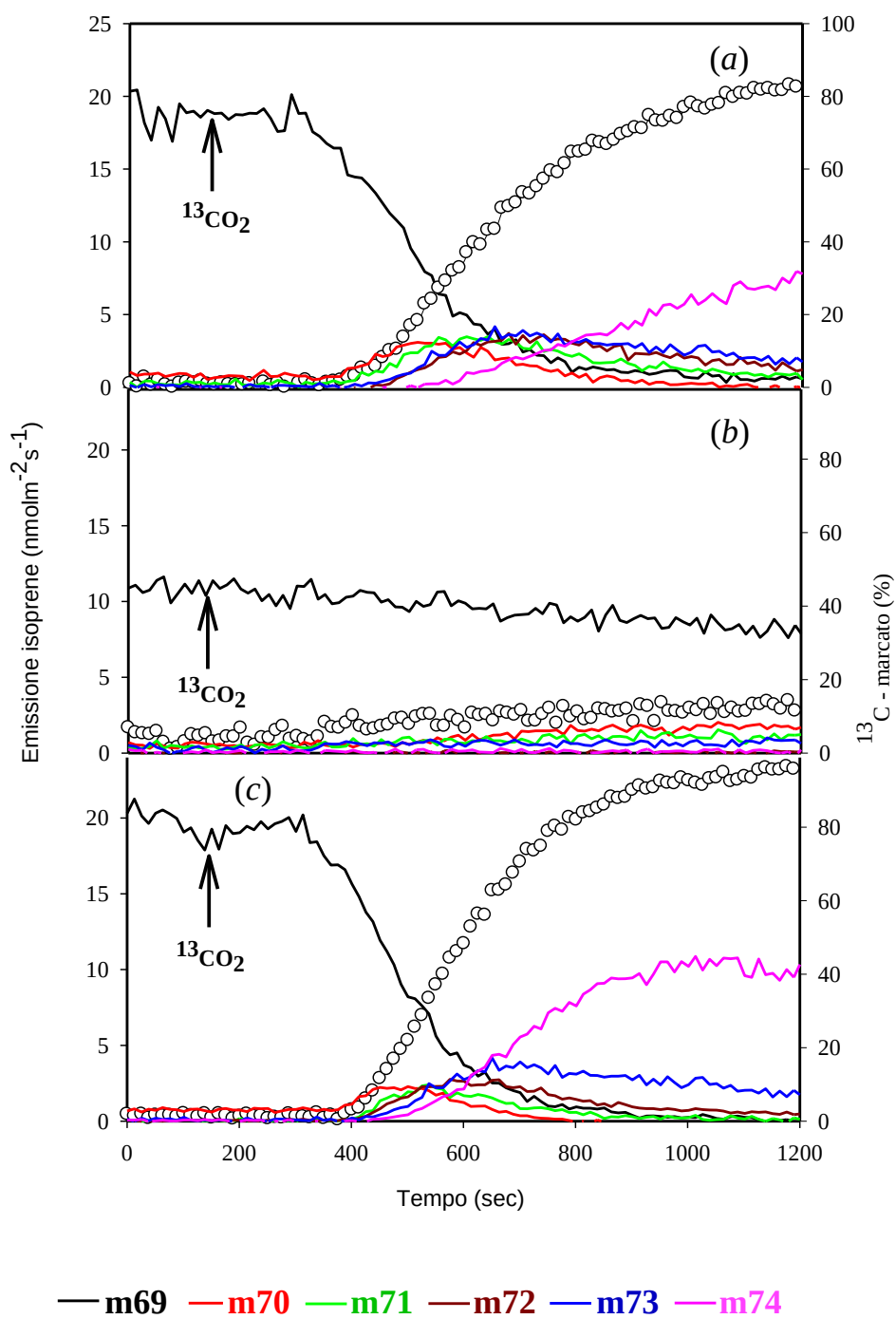


Fig. 11

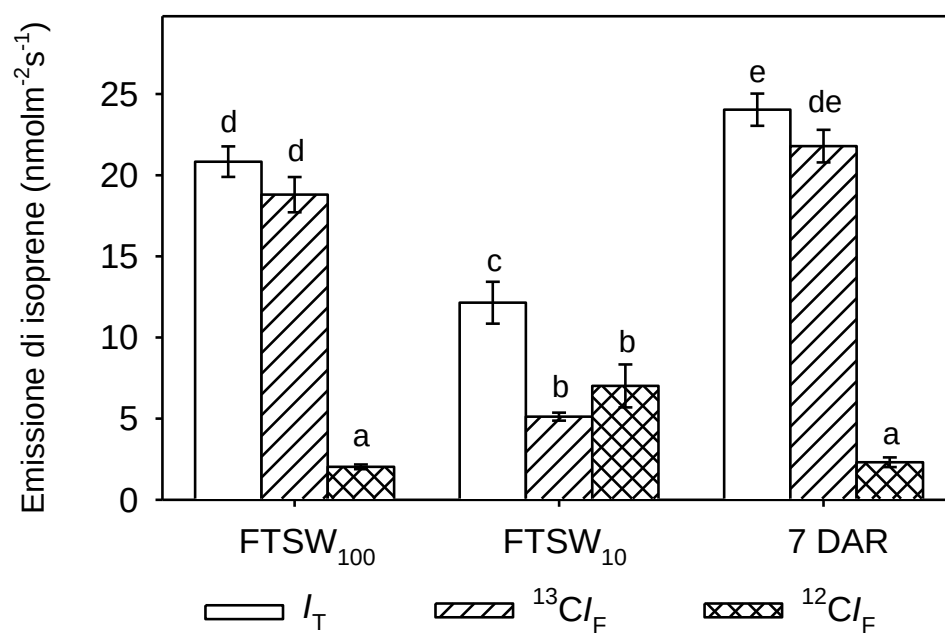


Fig. 12

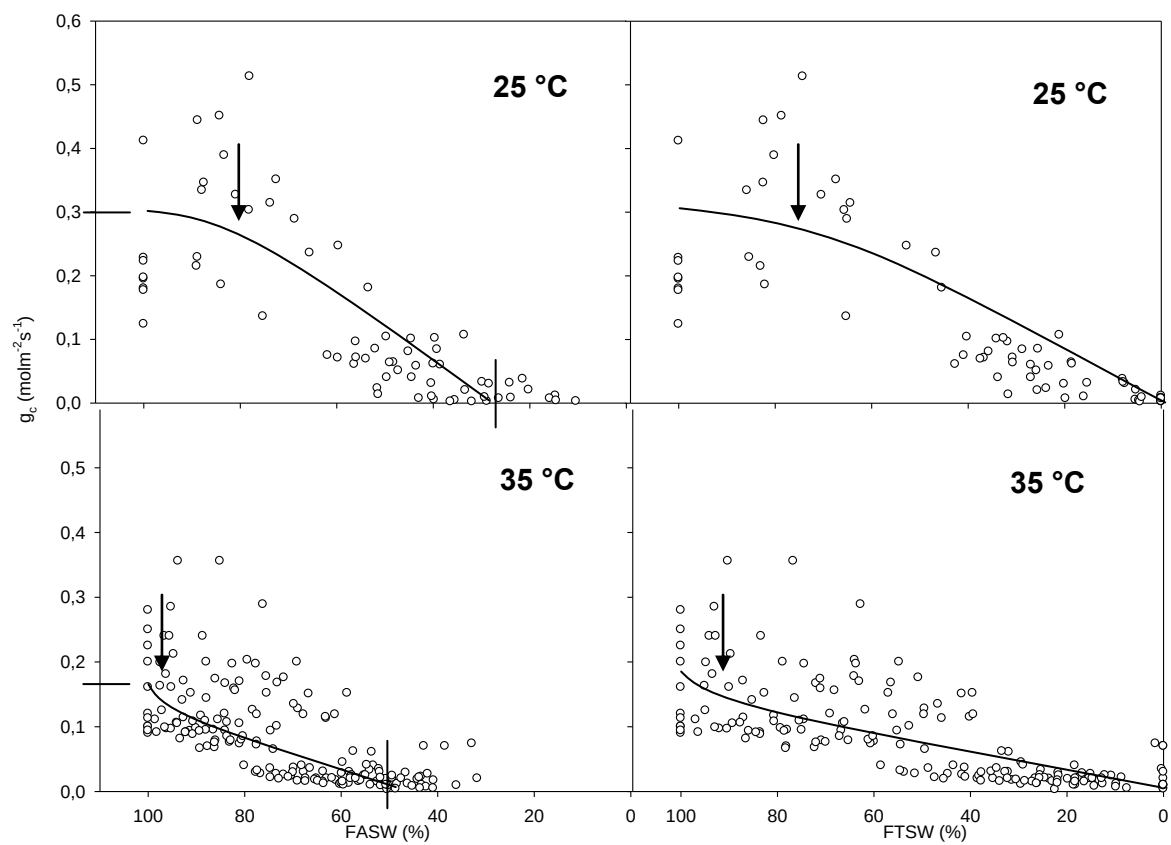


Fig. 13

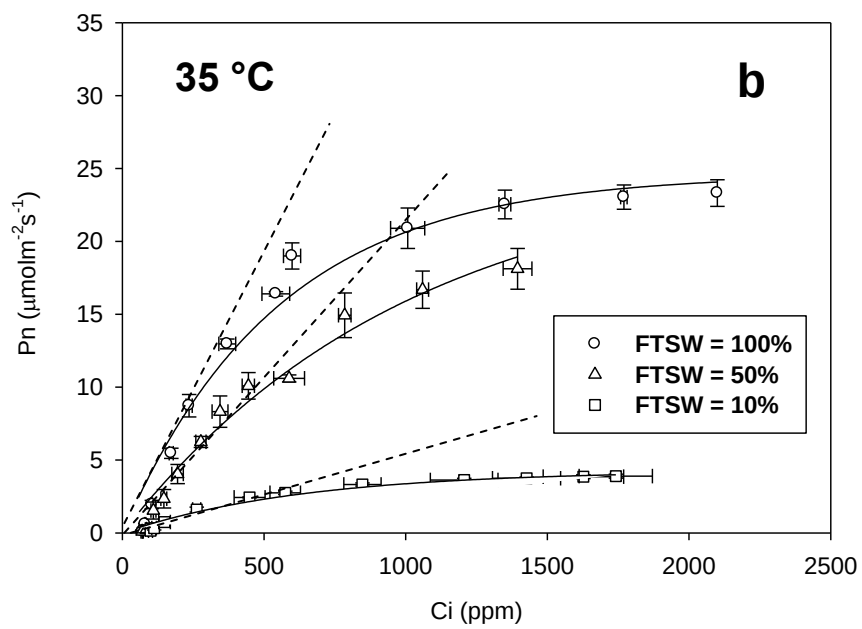
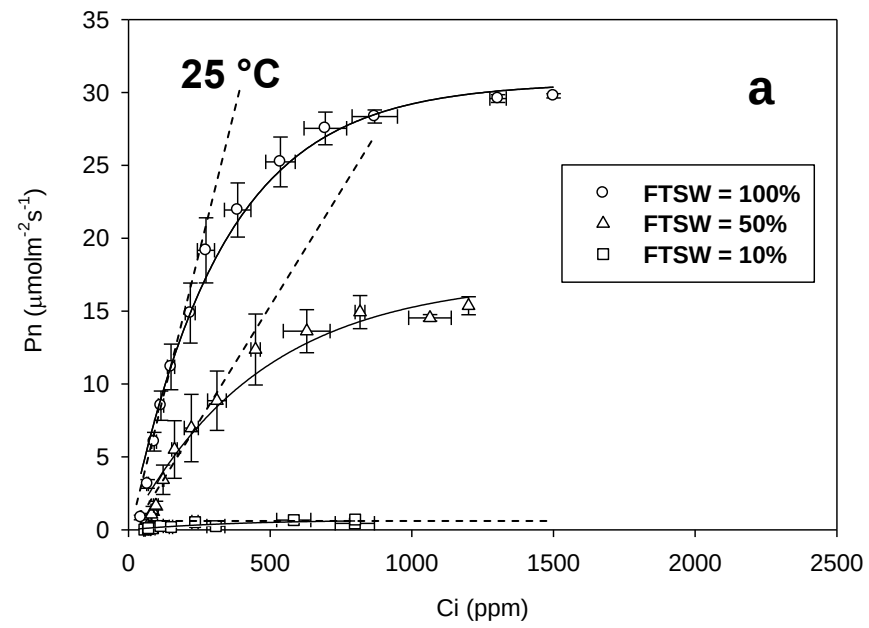


Fig. 14

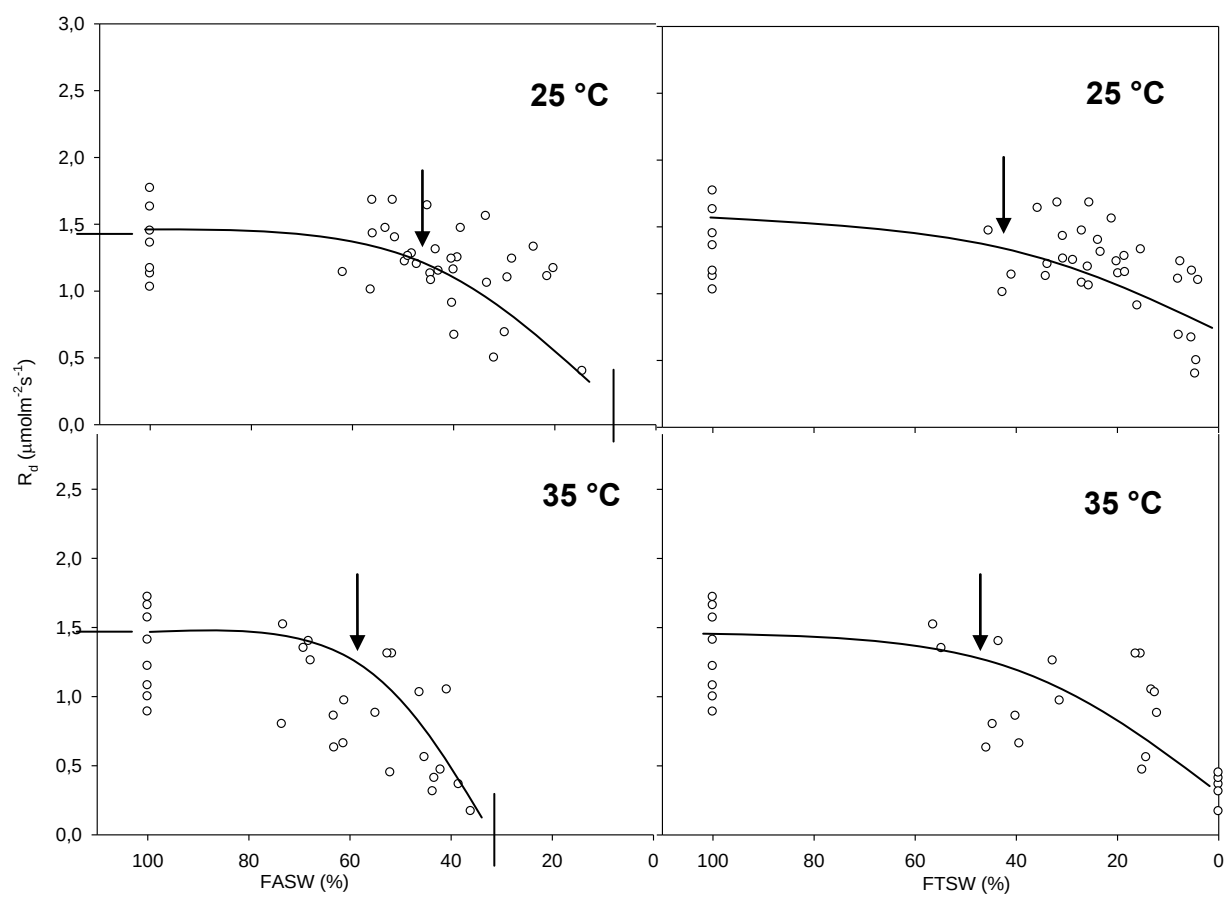


Fig. 15

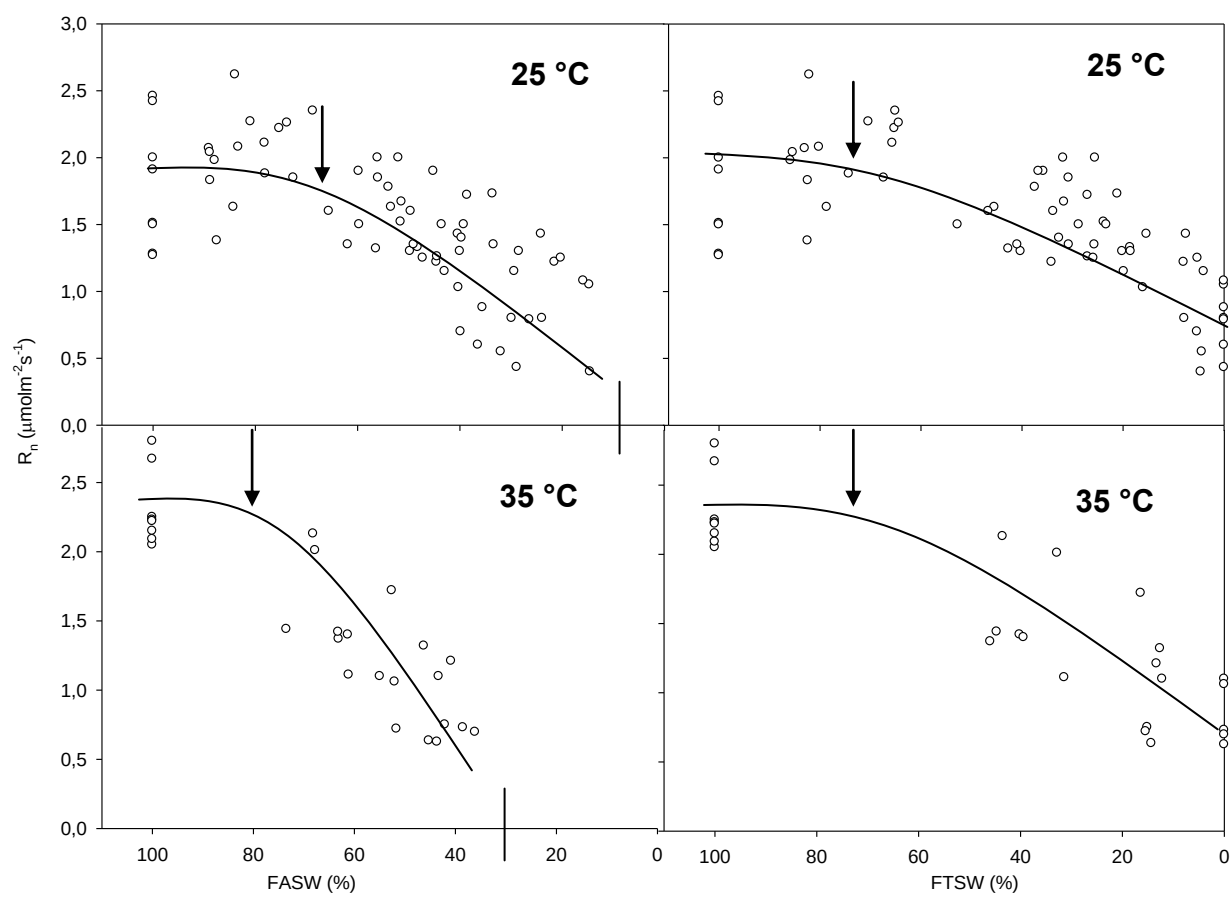


Fig. 16

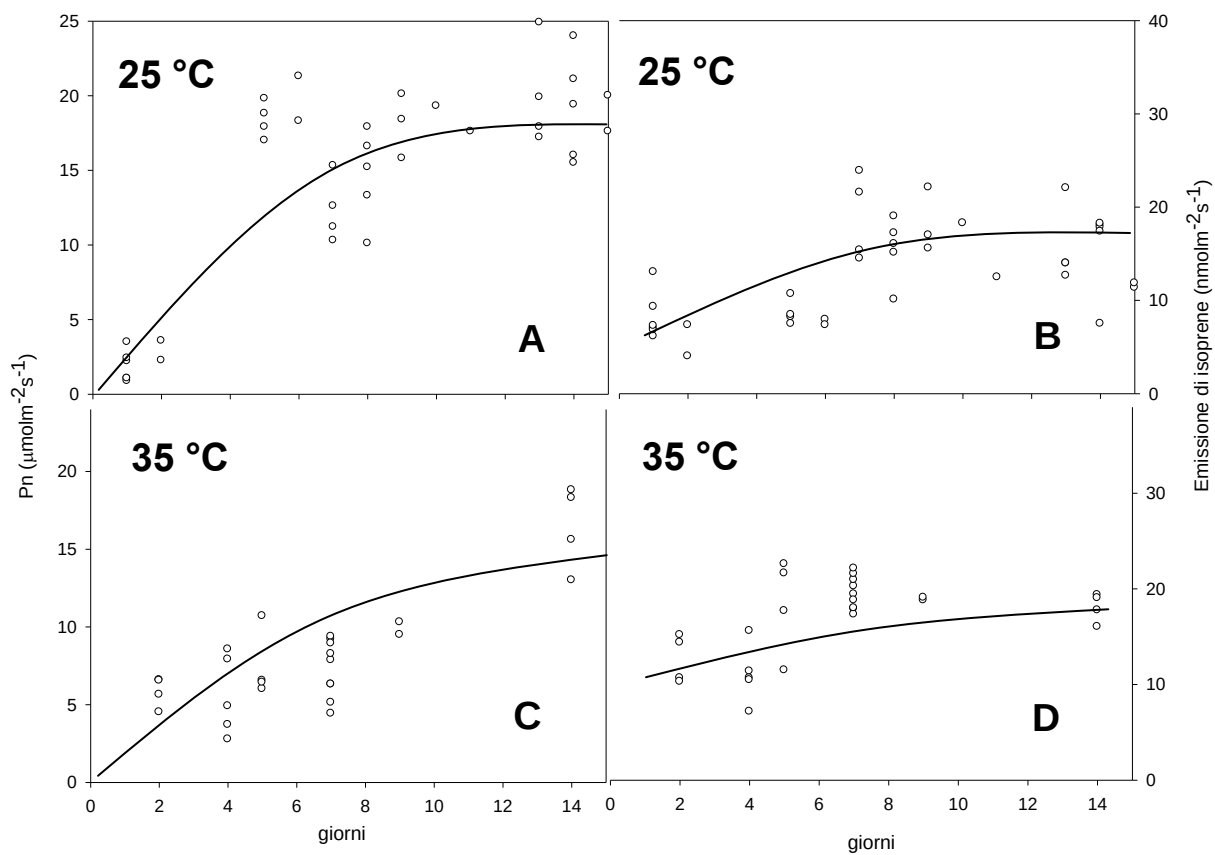


Fig. 17

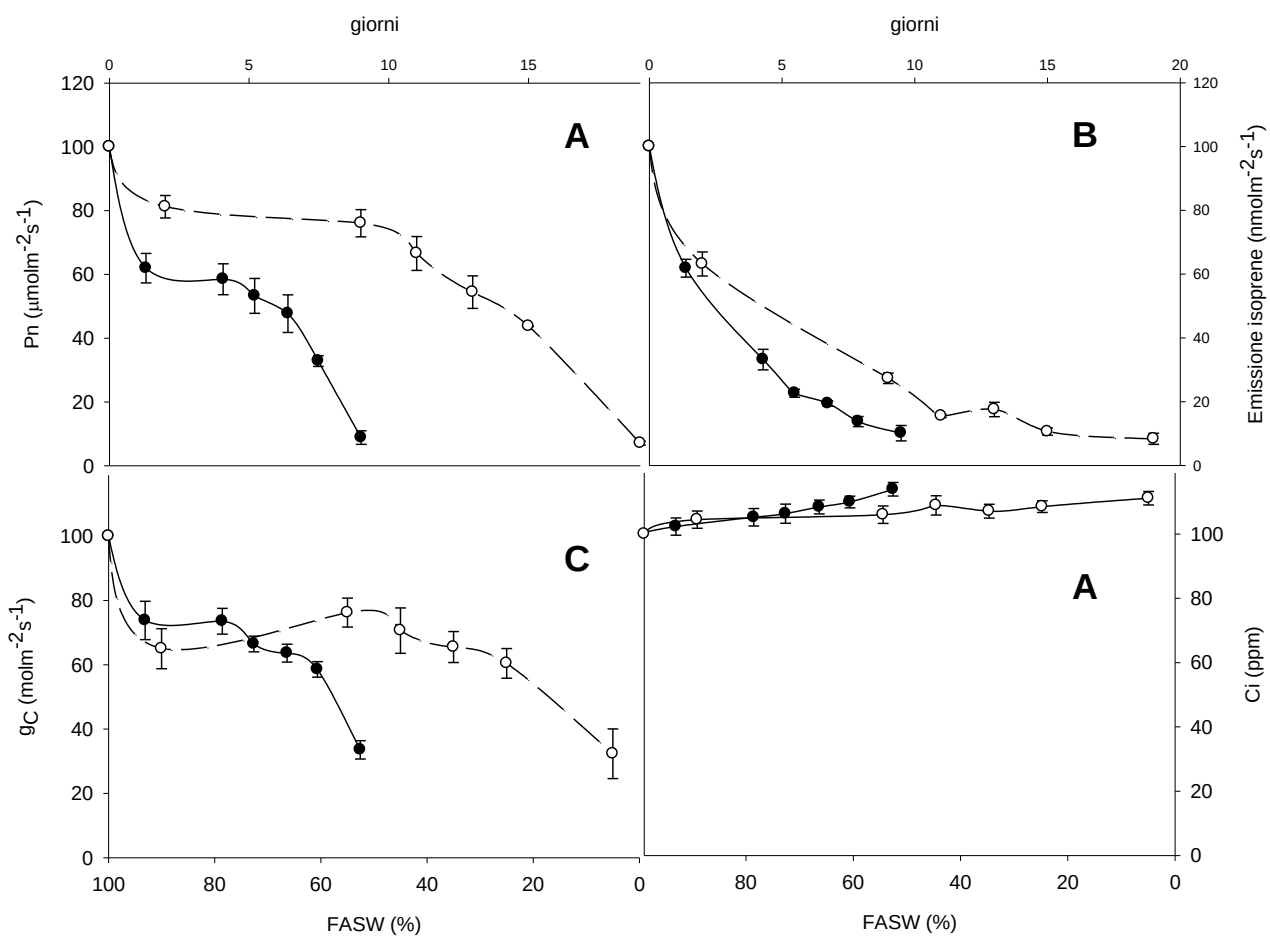


Fig. 18

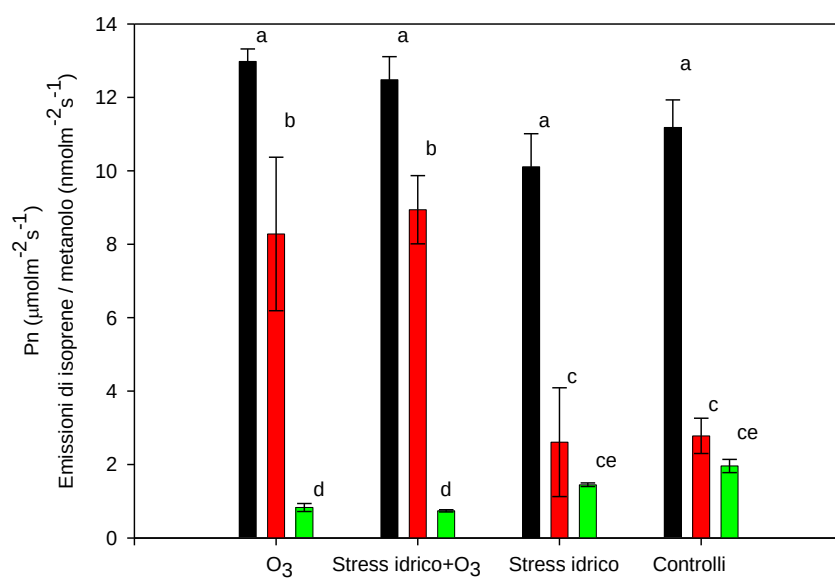


Fig. 19

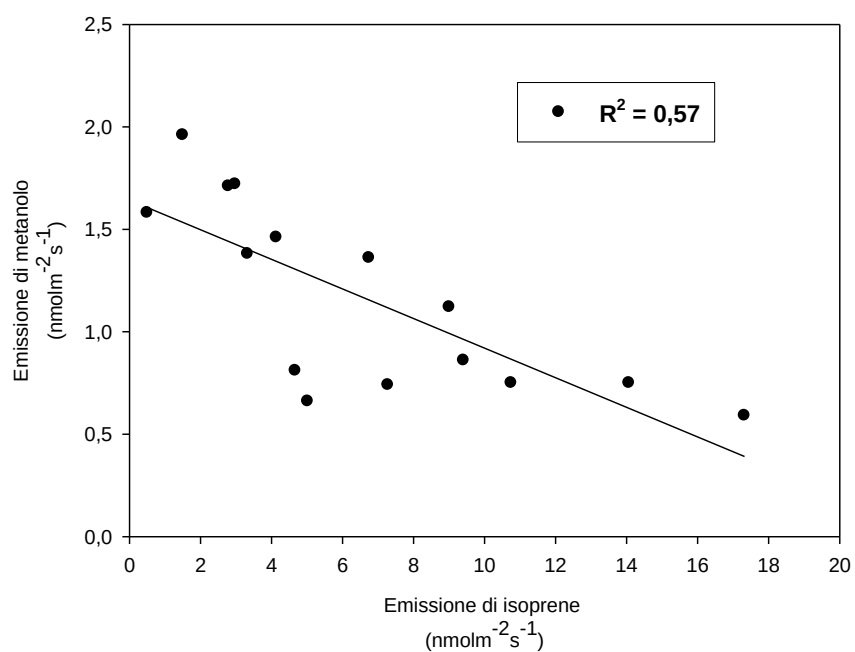


Fig. 20

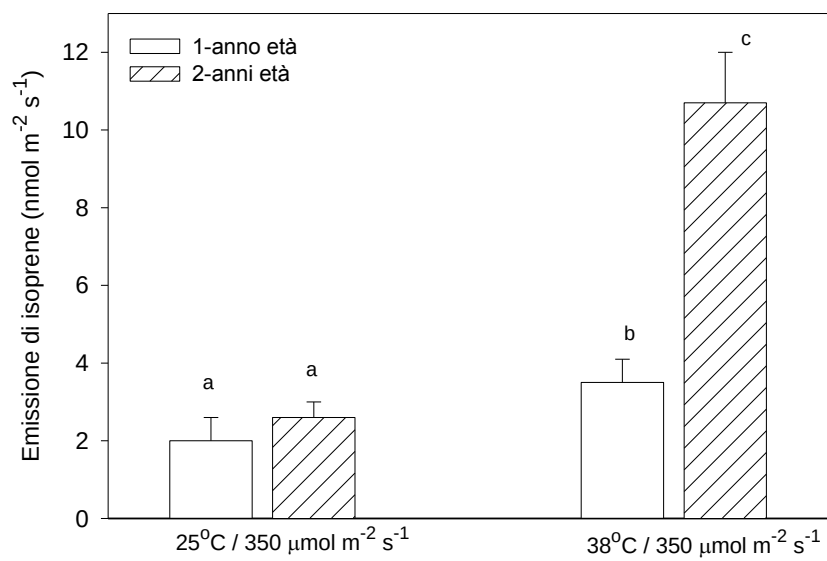


Fig. 21

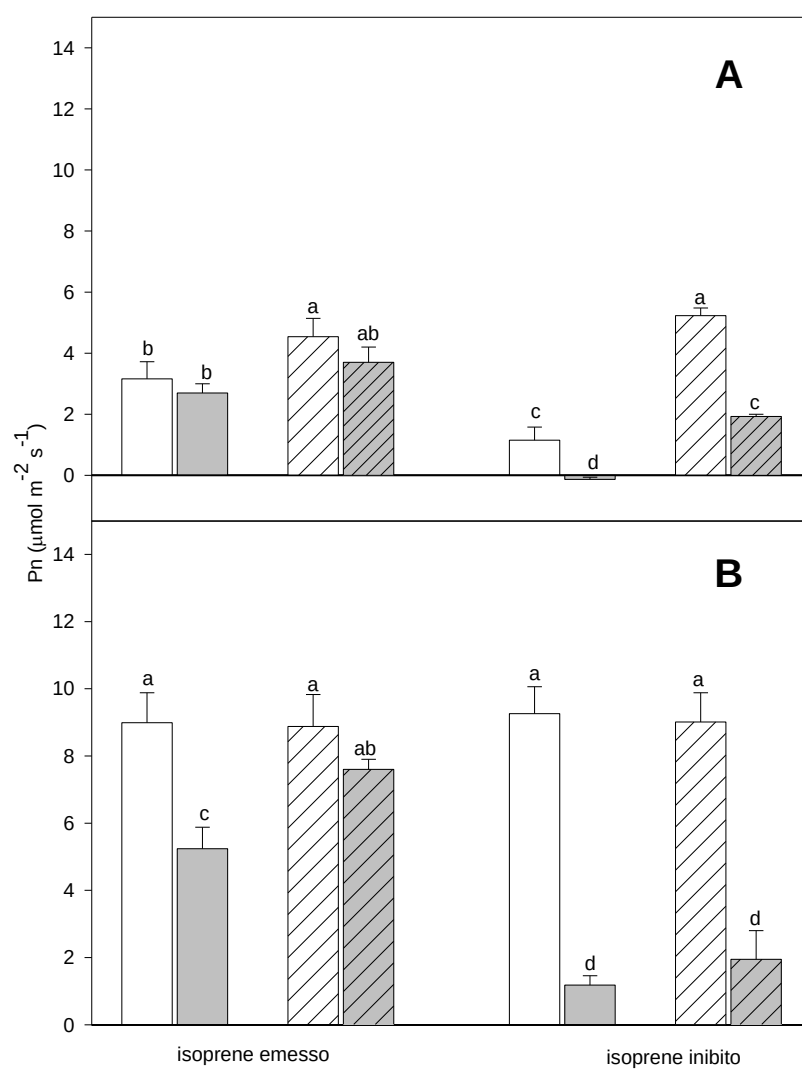


Fig. 22

BIBLIOGRAFIA

Affek HP, Yakir D (2002). Protection by isoprene against singlet oxygen in leaves. *Plant Physiology* 129: 269-277.

Affek HP, Yakir D (2003). Natural abundance carbon isotopes composition of isoprene reflects incomplete coupling between isoprene synthesis and photosynthetic carbon flow. *Plant Physiology* 131: 1727-1736.

Berry J, Björkman O (1980). Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review Plant Physiology* 31: 491-543.

Bota J, Medrano H, Flexas J (2004). Is photosynthesis limited by decreased RUBISCO activity and RuBP content under progressive water stress? *New Phytologist* 162: 671-681.

Brasseur GP, Chatfield RB (1991). The fate of biogenic trace gases in the atmosphere. In *Trace Gas Emission by Plants*. Sharkey TD, Holland B, Money HA, eds. New York, Academic Press: 1-28.

Brilli F, Barta C, Fortunati A, Lerdau M, Loreto F, Centritto M (2007a). Response of isoprene emission and carbon metabolism to drought in white poplar (*Populus alba*) saplings. *New Phytologist* 175: 244-254.

Calfapietra C, Wiberley AE, Falbel TG, Linskey AR, Mugnozza GS, Karnosky DF, Loreto F, Sharkey TD (2007). Isoprene synthase expression and protein levels are reduced under elevated O₃ but not under elevated CO₂ (FACE) in field-grown aspen trees. *Plant, Cell and Environment* 30(5): 662-669.

Centritto M, Lucas ME, Jarvis PG (2002). Gas exchange, biomass, whole-plant water-use efficiency and water uptake of peach (*Prunus persica*) seedlings in response to elevated carbon dioxide concentration and water availability. *Tree Physiology* 22: 699-706.

Chameides WL, Lindsay RW, Richardson J, Kianf CS (1988). The role of biogenic hydrocarbons in urban photochemical smog: Atlanta as a case-study. *Science* 241: 1473-1475.

Chavez MM, Olivera MM (2004). Mechanism underlying plant resilience to water deficit: prospect for water saving agriculture. *Journal of Experimental Botany* 55: 2365-2384.

Crafts-Brandner SJ, Salvucci ME (2000). Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO₂. *PNAS* 97: 13430-13435.

Delwiche CD, Sharkey TD (1993). Rapid appearance of ¹³C in biogenic isoprene when ¹³CO₂ is fed to intact leaves. *Plant, Cell and Environment* 16: 587-591.

Di Carlo P, Brunw WH, Martinez M, Harder H, Leshner R, Ren XR, Thornbelly T, Carroll MA, Young V, Shepson PB, Riemer D, Ape E, Campbell C (2004). Missing OH reactivity in a forest: evidence for unknown reactive VOCs. *Science* 304: 722-725.

Drake BG, Gonzalez Meler MA, Long SP (1997). More efficient plants: A consequence of rising atmospheric CO₂? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 609-639.

Edreva A (2005). Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplast: a submolecular approach. *Agriculture Ecosystems & Environment* 106: 119-133.

Fang C, Monson RK, Cowling EB (1996). Isoprene emission, photosynthesis, and growth in sweetgum (*Liquidambar styraciflua*) seedlings exposed to short- and long- term drying cycles. *Tree Physiology* 16: 441-446.

Fares S, Brilli F, Nogues I, Velikova V, Tsonev T, Dagli S, Loreto F (2007). Isoprene emission and primary metabolism in *Phragmites australis* grown under different phosphorus level. *Plant Biology*: DOI 10.1055/s-2007-965429

Fares S, Barta C, Brilli F, Centritto M, Ederli L, Ferranti F, Pasqualini S, Reale L, Tricoli D, Loreto F (2006). Impact of high ozone on isoprene emission, photosynthesis and histology of developing *Populus alba* leaves directly or indirectly exposed to the pollutant. *Physiologia Plantarum* 128: 456-465.

Farquhar GD, von Caemmerer S, Berry JA (1980). A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* 149: 78-90.

Flexas J, Bota J, Escalona JM, Sampol B, Medrano H (2002). Effect of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation os stomatal and mesophyll limitations. *Functional Plant Biology* 29: 461-471.

Flexas J, Bota J, Loreto F, Cornic G, Sharkey TD (2004). Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C₃ plants. *Plant Biology* 6: 269-279.

Flexa J, Galmés J, Ribas-Carbó M, Medrano H (2005). The effect of drought in plant respiration. In: Lambers H, Ribas-Carbó M (eds). *Advances in Photosynthesis and Respiration* 18. Plant Respiration: from Cell to Ecosystem. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 85-94.

Flexas J, Bota J, Galmés J, Medrano H, Ribas-Carbó M (2006). Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum* 127: 343-352.

Fortunati A, Barta C, Brilli F, Centritto M, Zimmer I, Schnitzler JP, Loreto F (2008). Isoprene emission is not temperature-dependent in drought-stressed *Populus nigra* leaves: a physiological and biochemical analysis. *The Plant Cell* (submitted).

Fowler D, Cape JN, Coyle M, Flechard C, Kuulenstierna J, Hicks K, Johnson C, Stevenson D (1999). The global exposure of forests to air pollutants. *Water Air Soil Pollution* 116: 5-23.

Fuhrer J, Skärbi L, Asmore MR (1997). Critical levels for ozone effects on vegetation in Europe. *Environmental Pollution* 97: 91-106.

Funk JL, Mark JE, Lerdau MT (2004). Stress-induced changes in carbon sources for isoprene production in *Populus deltoides*. *Plant, Cell and Environment* 27: 747-755.

Galmés J, Cifre J, Medrano H, Flexas J (2005). Modulation of relative growth rate and its components by water stress in Mediterranean species with different growth forms. *Oecologia* 145: 21-31.

Gershenzon J, Dudareva N (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology* 3: 408-414.

Ghashghaie J, Duranceau M, Badeck FW, Cornic G, Adeline M-T, Deleens E (2001). $\delta^{13}\text{C}$ of CO_2 respired in the dark in relation to $\delta^{13}\text{C}$ of leaf metabolites: comparison between *Nicotiana glauca* and *Helianthus annuus* under drought. *Plant, Cell and Environment* 28: 834-849.

Grassi G, Magnani F (2005). Stomatal mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. *Plant, Cell and Environment* 28: 834-849.

Griffin KL, Anderson OR, Gastrich MD, Lewis JD, Lin G, Schusteri W, Seemann JR, Tissue DT, Turnbull MT, Whitehead D (2001). Plant growth in elevated CO_2 alters mitochondrial numbers and chloroplast fine structure. *PNAS* 98: 2473-2478.

Guenther A, Hewitt CN, Erickson D, Fall R, Geron C, Graedel T, Harley P, Klinger L, Lerdau M, McKay WA, Pierce T, Scholes B, Steinbrecher R, Tallamraju R, Tjallingii J, Zimmerman P (1995). A Global model of natural volatile organic compounds emissions. *Journal of Geophysical Research* 100: 8873-8892.

Holopainen JK (2004). Multiple function of inducible plant volatiles. *Trends in Plant Sciences* 9: 529-533.

Hopkin M (2007). Carbon sinks threatened by increasing ozone. *Nature* 448: 396-397.

Huvenne K, Christ MM, Kleist E, Uerlings R, Niinemets Ü, Walter A, Wildt J (2007). Simultaneous growth and emission measurements demonstrate an interactive control of methanol release by leaf expansion and stomata. *Journal of Experimental Botany* 58: 1783-1793.

IPCC (2001). Climate change 2001. *IPCC Third Assessment Report*.

IPCC (2007). Climate change 2007: the physical sciences bases. *IPCC Fourth Assessment Report* Chap. (3).

Joffre R, Rambald S, Damesin C (1999). Functional attributes in Mediterranean-type ecosystems. In: Pugnaire, FI, Valladares F (eds) Handbook of functional plant ecology. Marcel Dekker Inc., New York, pp 347-380.

Karl T, Fall R, Rosentiel TN, Prazzeler P, Larsen B, Seufert G, Lindinger W (2002). On-line analysis of the $^{13}\text{CO}_2$ labelling of leaf isoprene suggests multiple subcellular origins of isoprene precursors. *Planta* 215: 894-905.

Kavouras LJ, Mihalopoulos N, Stephanou EG (1998). Formation of atmospheric particles from organic acids produced by forest. *Nature* 395: 683-686.

Kesselmeier J, Staudt M (1999). Biogenic volatile compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology. *Journal of Atmospheric Chemistry* 33: 23-88.

Lai R (1999). World soils and the greenhouse effect. *IGBP Newsletter* 37: 4-5.

Lawlor DW, Cornic G (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficit in higher plants. *Plant, Cell and Environment* 25: 275-294.

Lea PJ, Leegood RC (1999). Plant Biochemistry and Molecular Biology. Chichester, UK: Wiley.

Lichtenthaler HK (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Ann. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 50: 47-65.

Lindinger W, Hansel A, Jordan A (1998). Proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS): On-line monitoring of volatile organic compounds at pptv level. *Chemical Society Reviews* 27: 347-354.

Loreto F, Sharkey T (1990). A gas-exchange study of photosynthesis and isoprene emission in *Quercus rubra* L. *Planta* 182: 523-531.

Loreto F, Ciccioli P, Brancaleoni E, Frattoni M, Fabozzi C, Tricoli D (1996). Evidence of the photosynthetic origin of monoterpenes emitted by *Quercus ilex* L. leaves by ^{13}C labeling. *Plant Physiology* 135: 1903-1907.

Loreto F, Velikova V, Di Marco G (2001a). Respiration in the light measured by $^{12}\text{CO}_2$ emission in $^{13}\text{CO}_2$ atmosphere in maize leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 1103-1108.

Loreto F, and Velikova V (2001b). Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology* 127: 1781-1787.

Loreto F, Fischbach RJ, Schnitzler JP, Ciccioli P, Brancaleoni E, Calfapietra C, Seufert G (2001c). Monoterpene emission and monoterpene synthase activities in the

Mediterranean evergreen oak *Quercus ilex* L. grown at elevated CO₂ concentrations. *Global Change Biology* 7: 709-717.

Loreto F, Pinelli P, Manes F, and Kollist H (2004a). Impact of ozone on monoterpene emissions and evidences for an isoprene-like antioxidant action of monoterpenes emitted by *Quercus ilex* (L.) leaves. *Tree Physiology* 24: 361-367.

Loreto F, Pinelli P, Brancaloni E, Ciccioli P (2004b). ¹³C labelling reveals chloroplastic and extra-chloroplastic pools of dimethylallil piropospahte and their contribution to isoprene formation. *Plant Physiology* 135: 1903-1907.

Loreto F, and Fares S (2007). Is ozone flux inside leaves only a damage indicator? Clues from volatile isoprenoid studies. *Plant Physiology* 143: 1096-1100.

Loreto F, Centritto M, Barta C, Calfapietra C, Fares S, Monson KR (2007). The relationship between isoprene emission rate and dark respiration rate in white poplar (*Populus alba* L.) leaves. *Plant, Cell and Environment* 30: 662-669.

Monson RK, Fall R (1989). Isoprene emission from aspen leaves. *Plant Physiology* 90: 267-274.

Monson RK, Jaeger CH, Adams WW, Driggers EM, Silver GM, and Fall R (1992). Relationships among isoprene emission rate, photosynthesis, and isoprene synthase activity as influenced by temperature. *Plant Physiology* 98 (3): 1175-1180.

Neal C, Reynolds B, Neal M, Hughes S, Wickham H, Hill L, Rowland P, Pugh B (2003). Soluble reactive phosphorus levels in rainfall, cloud water, throughfall, stemflow, soil waters, stream waters and groundwaters for the Upper River Severn area, Plynlimon, mid Wales. *The Science of the Total Environment* 1: 99-120.

Nemecek-Marshall M, MacDonald RC, Franzen JJ, Wojciechowski, Fall R (1995). Methanol emission from leaves. *Plant Physiology* 108: 1395-1368.

Niinemets U, Loreto F, Reichstein M (2003). Physiological and physicochemical controls on foliar volatile organic compounds emission. *Trends in Plant Sciences* 9 (4): 180-186.

Oksanen E (2003a). Responses of selected birch (*Betula pendula*) clones to ozone change over time. *Plant, Cell and Environment* 26: 875-886.

Oksanen E (2003b). Physiological response of birch (*Betula pendula*) to ozone: a comparison between open-soil-grown trees exposed for six growing seasons and potted seedlings exposed for one season. *Tree Physiology* 23: 603-614.

Osburne CP, Mitchell PL, Shelly JE, Woodward FI (2000). Modelling the recent historical impacts of atmospheric CO₂ climate change on Mediterranean vegetation. *Global Change Biology* 6: 445-458.

Osmond B, Badger M, Maxwell K, Bjorkman O, Leegood R (1997). Too many photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends in Plant Science* 2: 119-121.

Ow LF, Griffin KL, Whitehead D, Walcroft AS, Turnbull MH (2008). Thermal acclimation of leaf respiration but not photosynthesis in *Populus deltoids x nigra*. *New Phytologist* 178: 123-134.

Pääkkönen E, Holopainen T, Kärenlampi L (1995). Ageing-related anatomical and ultrastructural changes in leaves of birch (*Betula pendula*) clones as affected by low ozone exposure. *Annals of Botany* 75: 285-294.

Pell EJ, Schlagnhauser CD, Arteca RN (1997). Ozone induce oxidative stress: mechanism of action and reaction. *Physiologia Plantarum* 100: 264-273.

Pegoraro E, Rey A, Bobich EG, Barron-Gafford G, Grieve KA, Malhi Y, Murthy R. (2004a). Effect of CO₂ concentration and vapour pressure deficit on isoprene emission from leaves of *Populus deltoides* during drought. *Functional Plant Biology* 31: 1-11.

Pegoraro E, Rey A, Greenberg J, Harley P, Grace J, Malhi Y, Guenther A (2004b). Effect of drought on isoprene emission from leaves of *Quercus virginiana* Mill. *Atmospheric Environment* 38: 6149-6156.

Peñuelas J, Llusià J, Asensio D, Munné-Bosch S (2005). Linking isoprene with plant thermotolerance, antioxidants, and monoterpene emissions. *Plant, Cell and Environment* 28: 278-296.

Rennenberg H, Loreto F, Polle A, Brilli F, Fares S, Beniwal RS, and Gesslet A (2003). Physiological responses of forest trees to heat and drought. *Plant Biology* 8: 1-16.

Rosenstiel TN, Ebbets AL, Khatri WC, Fall R, Monson RK (2004). Induction of poplar leaf nitrate reductase: a test of extrachloroplastic control on isoprene emission rate. *Plant Biology* 6: 12-21.

Rosenstiel TN, Potosnak MJ, Griffin KL, Fall R, Monson RK (2003). Increased CO₂ uncouples growth from isoprene emission in an agriforest ecosystem. *Nature* 421: 256-259.

Sanadze GA, Dzhami GI, Tevzadze TM (1972) Incorporation into the isoprene molecule of carbon from ¹³CO₂ assimilated during photosynthesis. *Plant Physiology* 19: 17-20.

Schnitzler JP, Arenz R, Steinbrecher R, Lehning A (1996). Characterization of an isoprene synthase from leaves of *Quercus petraea* (Mattuschka) Liebl. *Botanical Acta* 109 (3): 216–221.

Schnitzler JP, Graus M, Kreuzwieser J, Heizmann U, Renneberg H, Wisthaler A, Hansel A (2004). Contribution of different carbon sources to isoprene biosynthesis in poplar leaves. *Plant Physiology* 135: 152-160.

Schrader SM, Wise RR, Wacholtz WF, Ort DR, Sharkey TD (2004). Thylacoid membrane responses to moderately high leaf temperature in Pima cotton. *Plant, Cell and Environment* 27: 725-735.

Sharkey TD, Loreto F, Delwiche CF (1991). The biochemistry of isoprene emission from leaves during photosynthesis. In Trace Gas Emissions by Plants (in Sharkey TD, Holland B, and Money HA, eds), New York: Academic Press Publ.: 153-184.

Sharkey TD, Loreto F, Delwiche F (1991). High carbon dioxide and sun/shade effects on isoprene emission from oak and aspen tree leaves. *Plant, Cell and Environment* 14: 333-338.

Sharkey TD, and Loreto F (1993). Water stress, temperature and light effects on the capacity for isoprene emission and photosynthesis in kudzu leaves. *Oecologia* 95: 328-333.

Sharkey TD, Singsaas EL (1995). Why plants emit isoprene. *Nature* 374-769.

Sharkey TD, Chen XY, Yeh S (2001). Isoprene increases thermotolerance of fosmidomycin-fed leaves. *Plant Physiology* 125: 2001–2006.

Sharkey TD, Yeh S (2001). Isoprene emission from plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 407-436.

Sharkey TD (2005). Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. *Plant, Cell and Environment* 28: 269-277.

Silver GM, and Fall R. (1995). Characterization of aspen isoprene synthase, an enzyme responsible for leaf isoprene emission to the atmosphere. *Journal of Biological Chemistry* 270: 13010-13016.

Sinclair TR, Ludlow MM (1986). Influence of soil water supply on the plant water balance of four tropical grains legumes. *Australian Journal of Plant Physiology* 13: 329-341.

Sinclair TR, Ludlow MM (1985). Who taught plants the thermodynamics of water? The unfulfilled potential of plant water potential. *Australian Journal of Plant Physiology* 12: 213-217.

Sinclair TR, Ludlow MM (1986). Influence of soil water supply on the plant water balance of four tropical grain legumes. *Australian Journal of Plant Physiology* 13: 329-341.

Singsaas EL, Lerdau M, Winter K, Sharkey TD (1997). Isoprene increases thermotolerance of isoprene emitting species. *Plant Physiology* 115: 1413-1420.

Steinbrecher R, Hauff K, Kabong R, Steinbrecher J (1997). Isoprenoid emission of oak species typical for the Mediterranean area: source strength and controlling variables. *Atmospheric Environment* 31 (1): 78-88.

Stich S, Cox PM, Collins WJ, Huntingford C (2007). Indirect radiative forcing of climate change through ozone effects on land-carbon sink. *Nature* 448: 791-794.

Stitt M (1991). Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell and Environment* 14: 741-762.

Tezara W, Mitchell VJ, Driscoll SD, Lawlord DW (1999). Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature* 401:914-917.

Tingey DT, Evans RC, Gumpertz ML (1981). Effect of environmental conditions on isoprene emission from live oak. *Planta* 152: 565-570.

UNECE (2004). Revised manual on methodologies and criteria for mapping critical levels/loads and geographical areas where they are exceeded. www.icpmapping.org (February 12, 2006).

Vahisalu T, Kollist H, Wang Y, Nishimura N, Chan W, Valerio G, Lamminma A, Brosche M, Moldau H, D Radhika, Schroeder JI, Kangasja J (2008). SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* doi:10.1038/nature06608

Valentini R, Matteucci G, Dolman AJ, Schulze ED, Rebmann C, Moors EJ, Granier A, Gross P, Jensen NO, Pilegaard K, Lindroth A, Grelle A, Bernhofer G, Grunwald T, Aubinet M, Ceulemans L, Kowalski AS, Vesala T, Rannik U, Berbigier P, Loustau D, Guomundsson J, Thorgeirsson H, Ibrom A, Morgenstern K, Clement R, Moncrieff J, Montagnali L, Minerbi S, Jarvis PG (2000). Respiration as the main determinant of carbon balance in European forests. *Nature* 404, 861-865.

Vassey TJ, Sharkey TD (1989). Mild water stress of *Phaseolus vulgaris* plants leads to reduced starch synthesis and extractable sucrose phosphate activity. *Plant Physiology* 89: 1066-1070.

Velikova V, and Loreto F (2005). On the relationship between isoprene emission and thermotolerance in *Phragmites australis* leaves exposed to high temperatures and during the recovery from heat stress. *Plant, Cell & Environment* 28: 318-327.

Velikova V, Pinelli P, Pasqualini S, Reale L, Ferranti F. and Loreto F (2005). Isoprene decreases the concentration of nitric oxide in leaves exposed to elevated ozone. *New Phytologist* 166 (2): 419-425.

Velikova V, Loreto F, Tsonev T, Brilli F, Edreva A (2006). Isoprene prevents the negative consequences of high temperature stress in *Platanus orientalis* leaves. *Functional Plant Biology* 33: 1-10.

Vollenweider P, Ottiger M, Günthardt-Goerg MS (2003). Validation of leaf ozone symptoms in natural vegetation using microscopical methods. *Environmental Pollution* 124: 101-118.

von Caemmerer S. and Farquhar GD (1981). Some relationship between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153: 376-387.

Yamaji K, julkunen-Tiitto R, Rousi M, Freiwald V, Oksanen E (2003). Ozone exposure over two growing season alters root to shoot ratio and chemical composition of birch (*Betula pendula*). *Global Change Biology* 9: 1363-1377.

Yordanov I, Dilova S, Petkova R, Pangelova T, Goltsev V, Suess KH (1986). Mechanism of the temperature damage and acclimation of the photosynthetic apparatus. *Photobiochemistry and Photobiophysic* 12: 147-155.

Wang XZ, Lewis JD, Tissue DT, Seemann JR, Griffin KL (2001). Effect of elevated atmospheric CO₂ concentration on leaf dark respiration of *Xanthium strumarium* in light and in darkness. *PNAS* 98: 2479-2484.

Warneke C, van der Veen C, Luxembourg S, de Gouw JA, Kok A (2001). Measurements of benzene and toluene in ambient air using proton-transfer-reaction mass spectrometry: calibration, humidity dependence, and field intercomparison. *International Journal of Mass Spectrometry* 207(3): 167-182.

Wiberley A, Linskey AR, Falbel TG, Sharkey TD (2005). Development of the capacity for isoprene emission in kudzu. *Plant, Cell & Environment* 28: 898-905.