

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

**DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA
SEZIONE DI GENETICA**

Dottorato di ricerca in Genetica Agraria

XIX CICLO

**Isolamento e caratterizzazione di sequenze cDNA
indotte da ozono in frumento duro**

AGR-07

Coordinatore: Prof. Enrico Porceddu

Tutori: Prof. Mario Ciaffi

Prof. Oronzo A. Tanzarella

Dottorando: Andrea Acampora

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag. 1
1.1. Caratteristiche chimico-fisiche dell'ozono	pag. 2
1.2. Effetto dell'ozono sulle specie vegetali	pag. 7
1.3. Azione dell'O ₃ e meccanismi molecolari di risposta cellulare	pag. 11
1.3.1. Flusso dell'ozono all'interno delle foglie	pag. 17
1.3.2. Influenza dell'O ₃ sui flussi ionici transmembrana	pag. 19
1.3.3. Effetti sulla struttura delle membrane	pag. 21
1.3.4. Effetti dell'O ₃ sui cloroplasti	pag. 21
1.3.5. Meccanismi di percezione e recettori associati alla membrana	pag. 22
1.4. Formazione e caratteristiche delle ROS	pag. 25
1.4.1. Ossigeno singoletto	pag. 26
1.4.2. Anione superossido	pag. 26
1.4.3. Perossido di idrogeno	pag. 27
1.4.4. Radicale idrossido	pag. 28
1.5. Metaboliti impegnati nel processo di detossificazione	pag. 30
1.5.1. Acido ascorbico	pag. 30
1.5.2. Glutazione	pag. 34
1.5.3. Antiossidanti enzimatici	pag. 38
1.5.4. Funzione antiossidante dei prodotti del metabolismo secondario	pag. 40
1.5.4.1. Terpeni	pag. 41
1.5.4.2. Composti fenolici	pag. 43
1.5.5. Poliammine	pag. 44
1.6. Produzione di ROS indotta O ₃	pag. 46
1.6.1. Attivazione indotta da O ₃ delle MAPK	pag. 49
1.7. Regolazione ormonale della formazione delle lesioni indotte da O ₃	pag. 51
1.7.1. Comparsa delle lesioni indotte da O ₃	pag. 53
1.7.2. Propagazione delle lesioni	pag. 55
1.7.3. Contenimento delle lesioni	pag. 57
1.7.4. Interazione tra le cascate di segnalazione ormonale	pag. 59
1.7.5. Sequenza degli eventi nel controllo ormonale	pag. 60
1.8. Geni bersaglio delle vie di segnalazione ossidative indotte da ozono	pag. 63

1.9. Il frumento	pag. 65
1.9.1. Tassonomia dei generi <i>Triticum</i> e <i>Aegilops</i>	pag. 67
1.9.2. Relazioni filogenetiche tra specie del genere <i>Triticum</i>	pag. 70
 2. SCOPO DELLA TESI	 pag. 72
 3. MATERIALI E METODI	 pag. 75
3.1 Materiale vegetale e fumigazione	pag. 75
3.2 Descrizione dei sintomi e analisi fisiologiche	pag. 76
3.2.1 Descrizione dei sintomi	pag. 78
3.2.2 Scambi gassosi fotosintetici	pag. 78
3.2.3 Fluorescenza della clorofilla α	pag. 79
3.2.4 Conducibilità elettrica dei dischetti fogliari	pag. 80
3.3 Analisi molecolare	pag. 81
3.3.1 Estrazione dell'RNA totale	pag. 81
3.3.2 Purificazione dell'mRNA	pag. 82
3.3.3 Analisi dei trascritti differenziali mediante cDNA-AFLP (cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphisms)	pag. 82
3.3.3.1 Sintesi del cDNA	pag. 83
3.3.3.2 Digestione e ligasi del cDNA	pag. 83
3.3.3.3 Reazione di amplificazione mediante PCR (RT-PCR)	pag. 84
3.3.3.4 Separazione elettroforetica dei prodotti di amplificazione	pag. 85
3.3.3.5 Recupero delle bande differenziali e loro amplificazione	pag. 86
3.3.3.6 Clonazione dei prodotti di amplificazione differenziali	pag. 86
3.3.4 Estrazione e purificazione di plasmidi da batteri	pag. 87
3.4 Determinazione ed analisi delle sequenze nucleotidiche	pag. 87
3.5 Analisi dell'espressione delle sequenze cDNA amplificate differenzialmente in seguito ad esposizione all'O ₃ .	pag. 89
 4. RISULTATI E DISCUSSIONE	 pag. 90
4.1 Risposta differenziale all'ozono di sedici varietà italiane di frumento duro valutata sulla base della manifestazione di sintomi e di una serie di parametri fisiologici.	pag. 90
4.2 Identificazione mediante cDNA-AFLP dei trascritti indotti da O ₃ .	pag. 98

4.3 Clonaggio, determinazione delle sequenze nucleotidiche ed analisi della specificità di espressione dei trascritti indotti da O ₃	pag. 103
4.4 Ricerca di omologia per le sequenze cDNA clonate	pag. 105
4.5 Funzioni metaboliche presunte delle sequenze indotte da O ₃	pag. 109
4.5.1 Gruppo funzionale 1: geni coinvolti nei processi di trasduzione del segnale	pag. 109
4.5.2 Gruppo funzionale 2: geni coinvolti nei processi di organizzazione cellulare	pag. 115
4.5.3 Gruppo funzionale 3: geni coinvolti nei processi di sintesi, dislocazione e degradazione cellulare	pag. 120
4.5.4 Gruppo funzionale 4: geni coinvolti nel metabolismo cellulare	pag. 127
4.5.5 Gruppo funzionale 5: geni coinvolti nella protezione/difesa cellulare	pag. 139
4.5.6 Gruppo funzionale 6: geni coinvolti nella regolazione della trascrizione	pag. 151
4.6 Analisi dell'espressione di alcune delle sequenze isolate in genotipi tolleranti e suscettibili	pag. 156
 5. CONCLUSIONI	 pag. 166
 6. BIBLIOGRAFIA	 pag. 170

1. INTRODUZIONE

La complessità delle interazioni che avvengono nel sistema ambiente rende inevitabile, per meglio comprendere i suoi effetti sui processi fisiologici e funzionali delle piante, la sua scomposizione nei singoli fattori che lo determinano. L'ambiente che agisce sulle colture agrarie e forestali può essere considerato come la risultante del clima, del suolo, dell'aria, dell'interazione tra le piante e delle pratiche colturali utilizzate. È rilevante tra questi fattori l'effetto inquinante delle attività antropiche industriali, urbane, stradali ed agricole, che possono alterare in modo sostanziale e permanente la normale composizione del suolo e dell'aria. Dai paesi industrializzati, ed in maniera continuamente crescente anche da quelli in via di sviluppo, innumerevoli sostanze inquinanti allo stato gassoso vengono immesse ogni giorno nell'atmosfera terrestre. Tali inquinanti atmosferici gassosi (IAG), sono classificati in due categorie: IAG primari e secondari.

I primi vengono rilasciati direttamente nell'atmosfera dalle fonti più disparate, quali impianti per la produzione di energia elettrica, stabilimenti, traffico veicolare e apparati per il riscaldamento domestico. Tra i principali IAG primari si annoverano anidride solforosa o biossido di zolfo (SO_2), ossidi d'azoto (indicati in modo collettivo come NO_x), composti volatili del carbonio (COV), cloro-fluorocarburi (CFC). A carico degli inquinanti atmosferici primari, in particolari condizioni di luce, di temperatura e di direzione e velocità del vento, avvengono determinate reazioni chimiche che producono gli IAG secondari. La concentrazione di IAG nell'aria viene normalmente espressa in ppm (parti per milione) o ppb (parti per miliardo), oppure, usando unità SI, come μL o nL per litro di aria o anche come μg per metro cubo d'aria. I più pericolosi tra gli IAG secondari, a causa sia della loro crescente diffusione che della loro elevata reattività chimica, sono ossidanti fotochimici. Tra questi, il gas quantitativamente preponderante e meglio caratterizzato negli effetti sull'ambiente, in particolare sulle piante, è l'ozono (O_3), che è il principale componente dello smog fotochimico e l'inquinante atmosferico con il maggior potenziale fitotossico. Il progressivo aumento della concentrazione nella troposfera (SAEFL, 1999), la distribuzione stagionale che fa registrare da maggio a settembre livelli estremamente nocivi, e geografica che coinvolge vaste aree, non solo urbane, ma anche rurali e forestali, fa sì che l' O_3 interagisca con il metabolismo delle piante provocando effetti subliminali (mancanza di danni visibili soprattutto a basse concentrazioni), tali da interferire con la loro crescita causando sensibili riduzioni della produttività agricola. In molti paesi europei, negli ultimi anni, oltre ad un aumento della concentrazione dell'ozono nella bassa atmosfera, è stato rilevato anche un incremento della frequenza di episodi con picchi di concentrazioni elevate e di breve durata, capaci di causare

danni diretti e visibili alle piante sensibili. Si ritiene, sulla base di risultati ottenuti in campo, che in siti in cui la presenza di O₃ resta al di sotto della soglia di danno visibile, in quella che viene definita fase cronica, questo agente atmosferico creerebbe nella pianta una predisposizione al danno. Si è osservato che l'arrivo di un secondo fattore di stress, quale freddo, siccità, patogeno o deficienza nutrizionale rende visibili, in quella che è stata definita fase acuta, i danni che, già indotti nella pianta a livello subliminale, si manifestano in sintomi aspecifici quali depigmentazione fogliare e caduta prematura delle foglie (Sandermann, 1996).

Come gli altri gas anche l'ozono partecipa alla circolazione gassosa atmosferica globale. Nella zona sub-equatoriale si determina un movimento dei gas ascensionale che spostandosi lungo i meridiani, arriva ai poli, dove la corrente gassosa si raffredda e discende verso l'equatore. La quantità massima di ozono rilevabile nell'atmosfera dipende dalla latitudine geografica e dalla stagione. È normalmente più maggiore a latitudini più elevate durante la stagione primaverile-estativa e scende in autunno.

La scoperta della fitotossicità dell'O₃, avvenuta negli anni '50 (Richards *et al.*, 1958) diede inizio a numerosi studi per valutare gli effetti di questo gas sui diversi processi fisiologici vegetali e determinò la definizione dei limiti internazionali per la sua concentrazione ambientale. Nonostante le misure di controllo adottate, la concentrazione troposferica di O₃ in molte aree urbane, ma anche in aree remote extraurbane delle nazioni industrializzate, spesso eccede i valori di 0,1-0,2 ppm (Krupa *et al.*, 1995). A 25 °C e 102.3 Kpa, 1 nL^{L-1} (= 1 ppb) di O₃ corrisponde a 2,00 µg di ozono per metro cubo d'aria (Lorenzini, 1999). Gli studi condotti dalla National Crop Loss Assessment Network (NCLAN) indicano che l'inquinamento troposferico da O₃ contribuisce significativamente al declino forestale (Preston e Tingey, 1998) e in base a valutazioni economiche preliminari, è stato stimato di rilevante entità l'impatto negativo di questo gas fitotossico sulle produzioni agricole (Nali *et al.*, 2002).

1.1. Caratteristiche chimico-fisiche dell'ozono

L'ozono (O₃) è diventato uno dei principali responsabili del deterioramento della qualità dell'aria in questi ultimi anni, infatti la sua concentrazione nell'atmosfera è in preoccupante crescita in tutti i paesi industrializzati. È un gas dannoso alla salute dell'uomo e può compromettere l'integrità dei sistemi agricoli e forestali. Mentre come normale componente della stratosfera svolge una azione utile e fondamentale per la vita sulla terra, assorbendo le radiazioni ultraviolette della luce solare (Baird, 1995; Ryerson *et al.*, 2001), la

sua presenza, oltre certi livelli, nella troposfera ha effetti deleteri su tutti gli organismi viventi. Le piante, in particolare, sono più sensibili agli inquinanti atmosferici rispetto all'uomo e agli animali. Questo scudo naturale ha cominciato a deteriorarsi circa trenta anni fa. Negli anni '80 la diminuzione dello strato di ozono nella stratosfera ha cominciato a subire decrementi costanti (Special of Atmospheric Science Panel, 1998). Nel corso degli anni '90 si è stimato che lo strato di ozono che circonda la Terra potesse andare incontro ad una riduzione in media del 3-4% in più rispetto a quanto osservato nella precedente decade. Nel 1992, in effetti, si è registrato un abbassamento del livello di O₃ pari ad un ulteriore 3% (Gleason *et al.*, 1993).

Le foglie hanno un elevato rapporto superficie/volume e al loro interno gli scambi gassosi sono 50 – 100 volte superiori a quelli degli animali. Le modalità con cui l'ozono si genera nell'aria coinvolgono meccanismi chimici e fisici complessi. Si forma, per azione della radiazione solare sull'ossigeno, in presenza di miscele di idrocarburi e ossidi di azoto, sostanze generate dall'attività industriale, dagli autoveicoli e dalla produzione di energia elettrica. Pertanto, ci si deve attendere un incremento progressivo di questo inquinante nella troposfera, a causa dell'aumento nell'aria dei suoi precursori prodotti dall'industrializzazione.

La caratterizzazione dell'impatto ambientale dell'O₃ non è di semplice definizione: a partire dalla seconda metà degli anni '80 ebbero inizio discussioni sulla necessità di introdurre nuovi parametri numerici diversi dagli indici classici. Fu introdotto il concetto di “esposizione integrata”. Nel 1988 in ambito UN/ECE (*United Nation / Economic Commission for Europe*) e LRTAP (Convenzione su *Long Range Transboundary Air Pollution*) venne utilizzato per la prima volta il concetto di “*livello critico*”, cioè la dose al di sopra della quale si manifestano effetti nocivi su recettori quali piante, ecosistemi e materiali (UN/ECE, 1996).

I livelli critici per l'ozono si basavano sul calcolo delle concentrazioni medie riscontrate in un determinato intervallo temporale. Ciò implicava l'attribuzione di uno stesso peso ad ognuna di esse e non si dava importanza alla durata dell'esposizione. Un simile approccio si dimostrò presto inadeguato (Fuhrer *et al.*, 1997) e, dopo numerose prove sperimentali, tra cui va menzionata quella in cui furono saggiati oltre 600 indici su cinque specie vegetali in luoghi e tempi diversi (Lee *et al.*, 1988), lo studio si orientò verso descrittori cumulativi e in particolar modo verso l'AOT40 (Accumulated exposure Over a Threshold of 40 ppb, esposizione accumulata sopra la soglia di 40 ppb), correlata ad una serie di “*livelli critici*” definiti per le colture agrarie, le foreste e la vegetazione spontanea (Tab. 1.1) (Kärenlampi e Skärby, 1996). Questi valori critici sono stati definiti nell'ambito di un approccio detto di “Livello I”, basato su dati ottenuti in esperimenti condotti in OTC (Open Top Chamber), usato per poter mappare quelle zone a rischio fotosmog. Esso non prendeva in esame l'effetto dei fattori climatici, della composizione del suolo, dello sviluppo della pianta, in grado di influenzare,

concretamente, l'assorbimento dell'O₃ da parte dei recettori. A tal proposito è stato introdotto il "Livello II", utile per caratterizzare in modo preciso il danno biologico e la sua conseguente valutazione economica (Fuhrer e Achermann, 1999).

Tabella 1.1 - Sintesi dei livelli critici per le colture agrarie, la vegetazione spontanea e le piante forestali (da Kärenlampi e Skärby, 1996).

Soglia	Effetto	AOT40 maggiore di (in ppb x h)	Periodo
Di lungo periodo per le colture agrarie e la vegetazione spontanea	Riduzione del 5% della biomassa	3000	3 mesi consecutivi (maggio-settembre)
Di breve periodo per le colture agrarie e la vegetazione spontanea	Comparsa di sintomi visibili	500	5 giorni consecutivi (maggio-settembre)
Di lungo periodo per le specie forestali	Riduzione del 10% della biomassa	10000	6 mesi consecutivi (aprile-settembre)

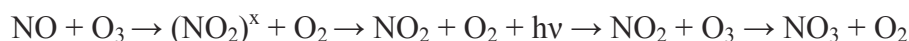
L'AOT40, associata alla minima diminuzione significativa nella resa quantitativa delle colture, rappresenta la somma delle differenze tra le concentrazioni medie orarie di O₃ in ppb e 40 ppb per ogni ora in cui la concentrazione eccede questo valore (De Leeuw e Zantvoort, 1997). I dati vanno però riferiti alle ore di luce (radiazione solare non inferiore a 50 w m²), in quanto l'azione tossica prevede la presenza di stomi aperti e quindi un minimo di radiazione luminosa.

L'O₃ è la forma allotropica triatomica dell'ossigeno. È un gas azzurrino di odore caratteristico, con una energica azione ossidante per il suo elevato potenziale ossidoriduttivo, non è termostabile e a temperature di 100 °C si trasforma in ossigeno. Può essere generato esponendo l'ossigeno puro a scariche elettriche. La sua concentrazione nell'aria è generalmente monitorata fotometricamente, mediante analizzatori operanti sul principio

dell'assorbimento UV di questo gas. I valori vengono normalmente espressi in ppb o come $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($1\text{ppb} = 1,96 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Essendo l'ozono troposferico generato da reazioni fotochimiche, è naturale la sua stretta dipendenza dalla luce solare ed in particolare dalla sua intensità. La concentrazione è massima nel periodo dell'anno in cui è maggiore l'energia radiante del sole. Va puntualizzato che l'incremento della concentrazione di O_3 nella troposfera non è un fenomeno limitato alle aree ad intensa urbanizzazione e industrializzazione. Spesso la sua presenza è più pronunciata nelle aree rurali, nelle quali i precursori, portati dalle correnti aeree, trovano le condizioni di radiazione solare più favorevoli al processo di formazione di O_3 . Come già accennato, è un composto altamente reattivo, ossida tutti i metalli esclusi l'argento ed il platino e reagisce con alcuni composti inorganici ed organici formando i cosiddetti ozonidi. Questi ultimi si originano quando l' O_3 reagisce con idrossidi di metalli alcalini, ad esempio:

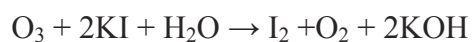


In modo analogo, gli ossidi di azoto possono reagire con l'ozono e formare ozonici secondo la reazione:



Nella quale il biossido di azoto rappresenta un prodotto intermedio; la reazione produce chemiluminescenza.

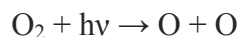
È possibile determinare la presenza dell' O_3 nell'aria utilizzando metodi chimici ed ottici, che si basano sulle sue proprietà. Il metodo chimico è quello iodometrico, nel quale lo ioduro di potassio, che reagisce con l'ossigeno, è ossidato dall'ozono secondo la reazione:



La determinazione ottica può essere effettuata con due metodi: il primo si basa sulla chemiluminescenza prodotta dall'ozono in alcuni coloranti, come la rodamina, il secondo rileva l'emissione di fluorescenza indotta dall'ossidazione, da parte dell'ozono, di una sostanza non luminescente, la deidroacridina, in acridina fluorescente.

Come sopra accennato, l'ozono si forma in conseguenza dell'azione fotochimica dell'energia solare. L'ossigeno molecolare sottoposto a radiazione inferiore a 240 nm si scinde in ossigeno

atomico che a sua volta reagisce con l'ossigeno molecolare, in presenza di particelle M (qualsiasi molecola o atomo), originando O₃.



Questa reazione avviene a quote superiori a 20 Km dalla superficie terrestre, infatti le radiazioni solari aventi una lunghezza d'onda inferiore ai 240 nm penetrano difficilmente oltre tale soglia. Circa il 90% dell'ozono è presente nella stratosfera, cioè quella parte dell'atmosfera che si estende dai 20 ai 40 Km al di sopra della superficie terrestre. Il restante 10% circa si trova nella troposfera dove la sua formazione è provocata dalle attività antropiche.

Grazie alle caratteristiche di assorbimento della luce solare a lunghezza d'onda inferiore a 290 nm, l'O₃ presente nella stratosfera svolge una fondamentale funzione nel proteggere la biosfera dagli effetti nocivi della componente ultravioletta della radiazione solare. Su questo strato gassoso incide, però, in modo negativo l'aumento delle emissioni di vari inquinanti di origine antropica, come gli ossidi di azoto ed i composti alogenati del carbonio. Questi ultimi distruggono le molecole di ozono stratosferico determinando una riduzione dello strato protettivo: questo è il fenomeno comunemente conosciuto come "buco dell'ozono".

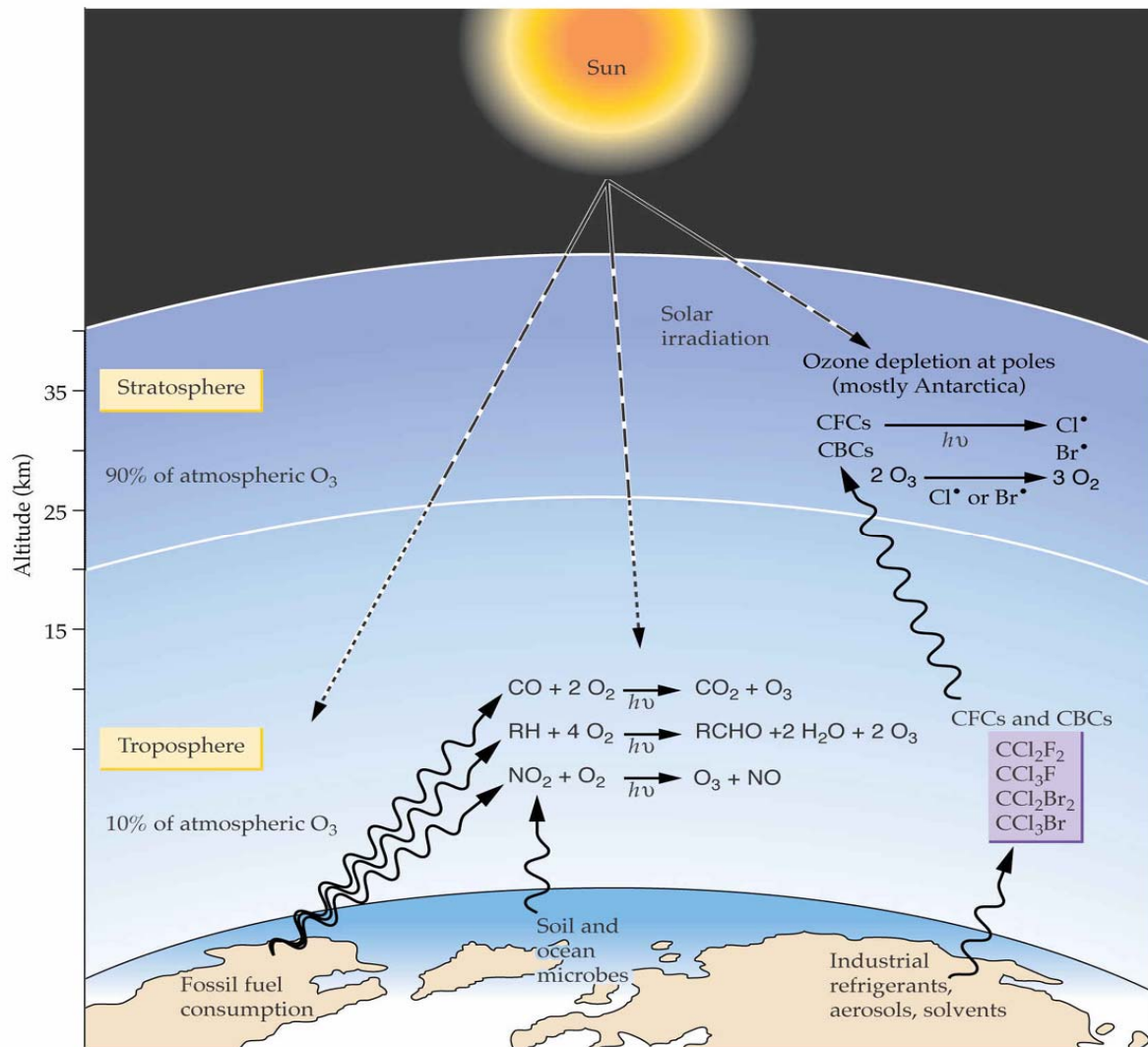


Fig. 1.1 – Produzione di ozono nell’atmosfera e sua distruzione nella stratosfera (Bray *et al.*, 2000).

1.2. Effetto dell’ozono sulle specie vegetali

Gli scambi gassosi tra esterno e interno della pianta avvengono attraverso gli stomi, aperture dell’epidermide degli organi erbacei contornati da due cellule di guardia che, con i loro cambiamenti di forma, ne regolano l’apertura e la chiusura. Il numero di stomi sulle foglie varia da 50 a 300 per mm² mentre la loro conformazione e disposizione dipende dalla specie. L’apertura o chiusura stomatica rispondono a particolari esigenze fisiologiche della pianta. Molteplici e complessi sono i fattori che, interagendo, influiscono su questo

movimento. L'aria, penetrando attraverso gli stomi, permea gli spazi intercellulari e l'O₃ presente viene assorbito dalle cellule in cui svolge un'azione fitotossica e interferisce con i sistemi enzimatici fondamentali, per esempio quelli che portano alla fissazione fotosintetica del carbonio. Il complesso delle alterazioni metaboliche indotte dall'inquinante sfocia in molteplici manifestazioni sintomatologiche non sempre facilmente rilevabili, sia perché sovrapponibili a sintomi provocati da agenti fungini, insetti o alterazioni metaboliche diverse, sia per l'ampia divergenza sintomatologica esistente tra una specie vegetale e l'altra e, a volte, tra le diverse varietà della stessa specie. La ridotta produttività delle piante dovuta all'O₃ non sempre è palesemente collegabile alle manifestazioni sintomatologiche del danno, ma appare ormai accertata l'induzione di un "danno invisibile" da parte dell'inquinante, che incide sulla produttività della coltura. Questa azione deleteria è documentata in studi di carattere fisiopatologico che mostrano, accanto o in assenza di lesioni percettibili visivamente, la presenza di un rilevante numero di cellule in stato di sofferenza che può essere evidenziata attraverso opportune reazioni istochimiche. La sintomatologia macroscopica più caratteristica consiste nella comparsa sulle foglie di aree puntiformi, di aspetto variabile dal verde tenue, al clorotico, biancastro o necrotico, localizzate nella zona internervale o esterna delle foglie delle dicotiledoni, nelle quali le aree di cellule danneggiate si manifestano sulla pagina superiore della foglia, in corrispondenza di una o più aperture stomatiche presenti nella pagina inferiore. La confluenza di tali lesioni, condizioni fisiologiche particolari della pianta, o la concentrazione elevata di ozono possono causare la bronzatura internervale o esterna della superficie fogliare. A questa sintomatologia, peculiare del danno da O₃, si possono associare altri effetti aspecifici quali clorosi, disseccamenti apicali, ridotta fioritura e allegagione, senescenza precoce, rilevabili in presenza di sensibilità estrema e/o di esposizioni acute (Fink, 1988; Violini *et al.*, 1992). In un intervallo realistico di concentrazioni, alcune specie o genotipi ipersensibili agli ossidanti fotochimici, come la varietà Bel W3 di tabacco (*Nicotiana tabacum* L.) per l'ozono e l'ortica minore (*Urtica urens* L.) per i perossiacilnitrati, mostrano un'entità di danno visibile correlata in modo lineare alla dose di inquinante ricevuta. In diversi paesi queste piante sono utilizzate come bioindicatori per organizzare una rete di monitoraggio della qualità dell'aria (Lorenzini, 1999). A concentrazioni più basse di quelle che determinano effetti fitotossici visibili, la presenza di ozono può determinare modifiche sostanziali dei processi fisiologici, che si ripercuotono negativamente sulla crescita e sulla produttività delle colture e sulla qualità dei prodotti agricoli. Runeckles e Krupa (1994) hanno dimostrato che l'O₃ influenza la crescita, lo stato sanitario e la capacità di adattamento delle specie sensibili, alterando la disponibilità e l'utilizzazione di carbonio, acqua ed elementi nutritivi.

Circa venti anni fa sono state fatte alcune ricerche negli USA mirate a quantificare le reali riduzioni nella resa di molte colture annuali di rilevante importanza commerciale. Questi studi hanno previsto l'utilizzo delle Open-Top Chambers (OTC, serre sperimentali a cielo aperto) come sistema standard di allevamento del materiale vegetale. Grazie alle OTC si è arrivati a prevedere riduzioni delle rese, delle specie coltivate, comprese tra il 2% ed il 56% in presenza di concentrazioni ambiente di ozono, inoltre, si è osservata un'elevata associazione nello spazio e nel tempo tra gli effetti visibili sulla vegetazione e le concentrazioni fitotossiche necessarie di ozono. Tra le numerose coltivazioni sensibili all'O₃, importanti dal punto di vista commerciale, vanno ricordate l'erba medica, il cotone, il mais, le colture foraggere, la soia, il riso ed il frumento, sia quello primaverile che quello invernale. Queste specie nel loro insieme rappresentano circa il 75% del valore della produzione agricola statunitense (Runeckles e Krupa, 1994). Anche in Europa sono stati avviati programmi di sperimentazione basati sull'utilizzo delle OTC, ed anche qui l'ozono è stato indicato come principale agente fitotossico presente in ampie aree rurali. Sintomi specifici di danno da ozono, quali clorosi e necrosi localizzate sono stati rilevati per la vite, la patata, il pisello ed il fagiolo, la segale ed il tabacco. È nella regione alpina e nell'Europa meridionale che l'ozono, a causa delle peculiari caratteristiche di tali ambienti, può esplicare effetti fortemente negativi (Lorenzini *et al.*, 1994; Sanz e Millan, 2000; Wotawa e Kromp-Kolb, 2000; Nolle *et al.*, 2002).

In Italia è stato possibile osservare effetti cronici ed acuti determinati dall'esposizione delle colture all'O₃ (Ferretti *et al.*, 1998; Bussotti *et al.*, 1998), effetti che sono ostacolati da una serie di fattori che, in ambito mediterraneo, operano nel ridurre la sensibilità nei riguardi dell'ozono degli alberi e della vegetazione naturale (Ferretti *et al.*, 2003). Normalmente le diverse specie vegetali mostrano una data variabilità genetica, sia inter-specifica che intra-specifica, per la risposta all'O₃. Entro la medesima specie è possibile evidenziare la presenza di genotipi suscettibili e resistenti, e questa è una condizione fondamentale al fine di poter prevedere programmi di miglioramento genetico volti ad aumentare la tolleranza della specie stessa all'ozono. Considerando la distribuzione del livello di suscettibilità di una data specie secondo una curva a campana, gli individui maggiormente suscettibili di una specie tollerante possono sovrapporsi a quelli più tolleranti di una specie suscettibile. Queste differenze di suscettibilità permettono l'instaurarsi di un'erosione genetica che determina la riduzione di quei genotipi più suscettibili. Questo è possibile laddove la pressione ambientale dell'inquinamento da ozono è alta (Chappelka e Samuelson, 1998).



Fig. 1.2a - Foglie di cipolla.



Fig. 1.2c - Foglia di soia.

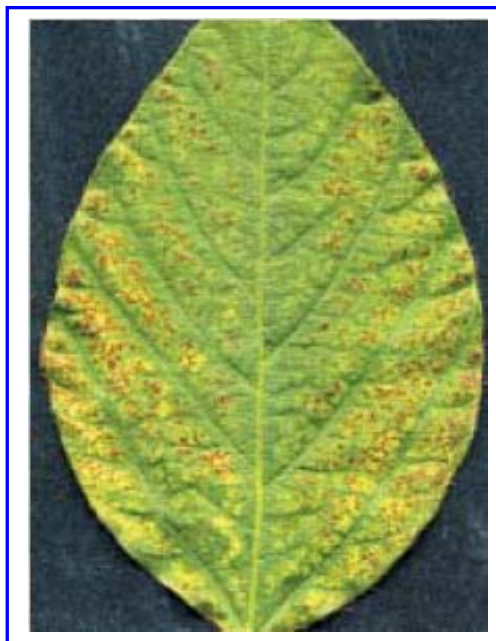


Fig. 1.2b - Foglia di tabacco.



Fig. 1.2d - Foglia a bandiera di frumento e particolare.

1.3. Azione dell'O₃ e meccanismi molecolari di risposta cellulare

È ampiamente dimostrato che l'O₃ è un gas altamente tossico, responsabile dello sviluppo di lesioni necrotiche fogliari. Non si conosce, tuttavia, l'intera sequenza delle reazioni che, partendo dall'esposizione della pianta al gas, porta allo sviluppo dei sintomi (Rao *et al.*, 2000). L'ozono, dal punto di vista chimico-fisico, è un gas polare ed idrofilico che non riesce a penetrare la cuticola fogliare, mentre è in grado, sebbene in modo non rilevante, a passare attraverso la membrana plasmatica. La penetrazione dell'ozono nello spazio periplasmatico avviene prevalentemente attraverso le aperture stomatiche (Laisk *et al.*, 1989; Heat e Taylor, 1997; Rao e Davis, 2000).

Analizzando le misurazioni del flusso di O₃ all'interno delle foglie, è stato ipotizzato che esso non persista nella sua forma originaria, una volta penetrato negli spazi aeriferi intercellulari, ma che venga decomposto nella parete cellulare e nella membrana plasmatica, dopo il suo dissolvimento nel mezzo acquoso apoplastico delle cellule del mesofillo (Heat e Taylor, 1997; Rao e Davis, 2000). In figura 1.3 è riportato lo schema d'azione dell'ozono e il probabile meccanismo di risposta vegetale.

La dissoluzione dell'O₃ nella soluzione acquosa apoplastica genera diverse specie reattive dell'ossigeno (ROS), come l'anione superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno (H₂O₂) ed il radicale ossidrilico (OH) (Byvoet, 1995). Sia l'anione superossido che il perossido d'idrogeno possono reagire con metalli di transizione (come il Fe²⁺), con ammine o con gruppi tiolici e fenolici, come l'acido caffeico, andando ad aumentare la produzione del radicale idrossido (Pell *et al.*, 1997). Tutto ciò avviene attraverso quella che è conosciuta come reazione di Haber-Weiss (Weiss, 1935).

Come già accennato, il meccanismo d'azione fitotossica esplicito dall'O₃ non è ancora del tutto definito. Non è ancora chiaro come l'ozono, una volta disciolto in prossimità della parete cellulare e della membrana plasmatica, interferisca con il metabolismo cellulare attivando le risposte fisiologiche di difesa.

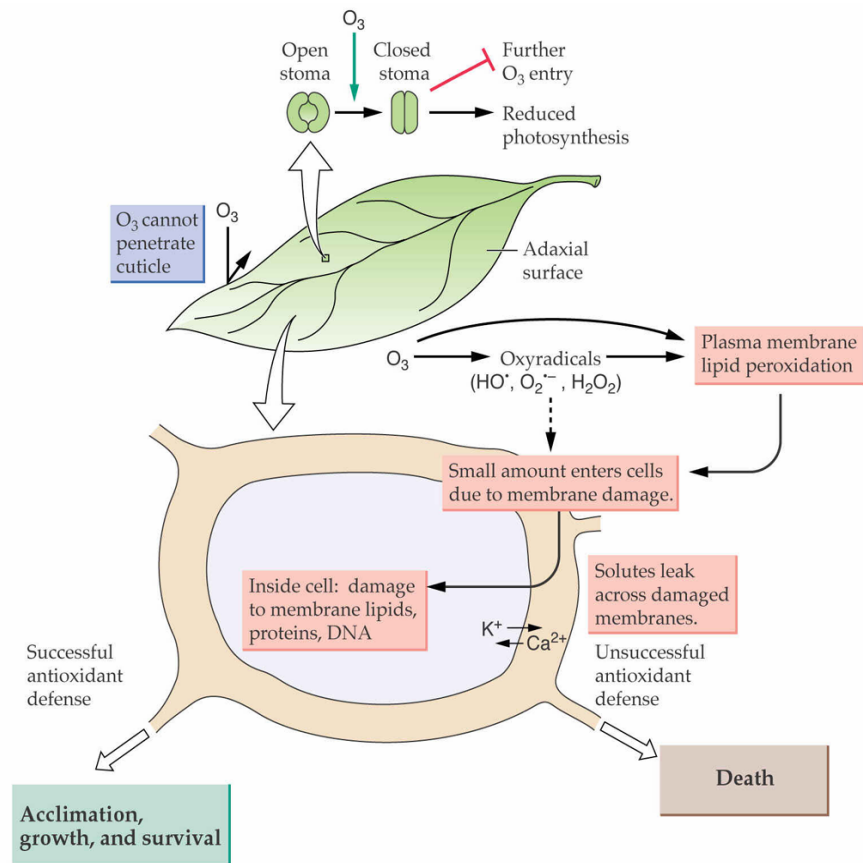


Fig. 1.3 - Azione dell'ozono e risposta della pianta (Bray *et al.*, 2000).

La parete cellulare vegetale contiene numerosi gruppi fenolici, composti olefinici e proteine; l'adiacente membrana plasmatica presenta, inoltre, un'elevata quantità di lipidi insaturi. È molto probabile che questi siano i primi composti con cui interagisce l'O₃ all'esterno della membrana plasmatica, formando le diverse ROS (Heath, 1987; Rao *et al.*, 2000). Queste specie reattive dell'ossigeno O₃-dipendenti potrebbero alterare le proprietà chimico-fisiche della membrana plasmatica, innescando una perossidazione lipidica (Paul e Thompson, 1981), responsabile della produzione di ulteriori ROS. Il danno che avviene a livello della membrana plasmatica altera il trasporto ionico, aumenta la sua permeabilità ed inibisce la funzionalità delle pompe protoniche. Tutto ciò va ad incidere sul potenziale di membrana, incrementando la penetrazione di Ca²⁺ nell'apoplasto (Castillo e Heath, 1990; Clayton *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 2000). Tali reazioni indotte dall'ozono andrebbero a perturbare la complessa serie di processi metabolici associati con lo sviluppo delle foglie e con il raggiungimento della massima efficienza fisiologica dell'apparato fotosintetico (Reich e Amundson, 1985; Heath e

Castillo, 1990). Le alterazioni dello status metabolico derivanti dall'inibizione del processo fotosintetico determinerebbero non solo il rallentamento della crescita, ma anche e soprattutto l'instaurarsi di una aumentata suscettibilità o resistenza ad altre forme di stress, sia di tipo biotico che abiotico.

Numerosi studi, finalizzati alla comprensione del meccanismo molecolare che è alla base della risposta all'ozono, sono stati stimolati dall'osservazione della capacità intrinseca della pianta di reagire all'azione di questo ossidante fotochimica. È stato rilevato che l'interazione molecolare pianta-ozono può essere strettamente correlata, in termini di percezione del segnale, trasduzione, espressione genica e difesa, alla reazione a cascata provocata da una serie di altri fattori di stress, sia biotici che abiotici (Sandermann, 1998). È verosimile che la pianta scambi l'ozono per un agente patogeno, dando origine alle tre reazioni normalmente attivate nei meccanismi di difesa: 1) produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS); 2) risposta di ipersensibilità (HR); 3) resistenza sistemica acquisita (SAR) (Sandermann, 1996; Sandermann *et al.*, 1998; Rao *et al.*, 2000). La risposta che si attiva è analoga a quella che si instaura a livello della membrana plasmatica in seguito all'interazione elicitore-recettore e induce una cascata di eventi regolati da molecole segnale che mediano le risposte molecolari quali PAL, acido jasmonico, acido salicilico, etilene, ACC, proteina G, canali del Ca^{2+} , proteine kinasi, NAD(P)H-ossidasi, ecc. L'esatta relazione tra l'azione dell'ozono e HR, SAR e altri meccanismi generali di difesa non è ancora del tutto chiara, perché non si conosce approfonditamente il ruolo delle ROS (in quello che viene definito "burst ossidativo") e dei messaggeri secondari (acido jasmonico e salicilico, oligosaccaridi, stato redox, gradiente ionico, etc.).

Ciò che sembra certo è che l'ozono induca rapidamente l'espressione di geni coinvolti nella sintesi di metaboliti secondari correlati alla difesa (fitoalessine), di molecole della barriera cellulare (lignina, fenilpropanoidi e flavonoidi) e di proteine PR (glucanasi, chitinasi e glutatione S-transferasi). Essa modula, inoltre, i geni che regolano i sistemi di difesa antiossidante nei diversi compartimenti cellulari (Sandermann *et al.*, 1998; Rao *et al.*, 2000; Langebartels, 2002). In passato si riteneva che i tre ormoni sopra vegetali (acido jasmonico, acido salicilico ed etilene) agissero in modo lineare e del tutto indipendente tra loro nel provocare differenti risposte di difesa. Recenti studi hanno invece dimostrato che, in presenza di vari tipi di stress, siano essi biotici o abiotici, questi tre ormoni sostanzialmente interagiscono in modo complesso nel regolare le risposte di difesa vegetale (Rao e Davis, 2001; Tamaoki *et al.*, 2003).

Nelle fasi iniziali della risposta si osserva una forte e rapida produzione di radicali liberi (ROS), a cui è stato dato il nome di "burst ossidativo", e di mediatori quali perossido

d'idrogeno, etilene, acido salicilico e jasmonico, che sembrerebbero in grado di attivare, nella cellula danneggiata, una risposta di ipersensibilità (HR) che determina lesioni clorotiche e necrotiche e l'acquisizione di una risposta di resistenza sistemica (SAR) da parte dei tessuti adiacenti.

Il meccanismo biochimico ipotizzato per spiegare l'origine della produzione apoplastica di ROS può essere schematizzato in due punti che, potrebbero coesistere:

1. I messaggeri secondari o mediatori di segnale, generati dall'interazione tra elicitori e recettori, attiverebbero la sintesi e l'assemblaggio dei componenti di una superossido sintetasi NAD(P)H-dipendente (definita altresì come NAD(P)H ossidasi associata alla membrana plasmatica). Questo complesso utilizzerebbe NADPH per generare O_2^- che verrebbe rapidamente dismutato a H_2O_2 da una superossido dismutasi associata alla parete cellulare o alla membrana plasmatica.
2. Una perossidasi pH-dipendente associata alla parete cellulare e alla membrana plasmatica verrebbe attivata per effetto dell'alcalinizzazione transitoria dell'apoplasto, causata dall'attivazione di canali ionici e delle pompe protoniche in risposta al riconoscimento ed al legame dell'elicitore con le molecole recettrici presenti sulla superficie della cellula. Questa POX pH-dipendente potrebbe essere responsabile della riduzione dell' O_2 a O_2^- a spese di un agente riducente dell'apoplasto (Vera-Estrella *et al.*, 1994; Mehdy, 1994; Bolwell, 1996; Van Gestelen *et al.*, 1997; Lamb e Dixon, 1997; Bolwell, 1999; Shell, 2002; Overmyer *et al.*, 2003).

La maggiore o minore produzione di ROS da parte della cellula potrebbe avvenire in relazione alla differente sensibilità manifestata dai genotipi nei confronti dell'ozono. Nei genotipi più tolleranti avverrebbe solo una produzione extra-cellulare precoce nel momento in cui si ha l'esposizione della pianta all' O_3 ; nei genotipi sensibili, invece, la formazione di ROS sembra continuare anche dopo l'interruzione dell'esposizione al gas. Le diverse ROS si diffonderebbero all'interno della cellula provocando la comparsa di necrosi fogliari e la risposta di ipersensibilità che determina la morte cellulare programmata (PCD), utilizzata come strategia per limitare la propagazione dei patogeni, analogamente all'apoptosi delle cellule animali (Dangl *et al.*, 1996; Wojataszek, 1997; Pellinel *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 2000).

La capacità di risposta intrinseca della pianta all' O_3 è modulata nello spazio e nel tempo da una moltitudine di fattori di origine endogena e ambientale, denominati nel loro insieme "fattori modificanti" (UN/ECE, 1996; SAEFL, 1999). Tra i fattori endogeni è stata rilevata da

tempo l'esistenza di variabilità intraspecifica nella sensibilità all'ozono (Welburn, 1997). Tra i numerosi fattori esogeni capaci di modulare la risposta della pianta all'ozono, il clima e i fattori climatici di stress, quali il freddo (Prasad, 1996), l'eccessiva luminosità (Karpinski *et al.*, 1999), la siccità (Scandalios, 1997) e le radiazioni UV (Rao *et al.*, 1996), hanno ricevuto molta attenzione in relazione allo studio del loro effetto sugli scambi gassosi ed alla dose di O₃ effettivamente assorbito dalla vegetazione (UN/ECE, 1996; SAEFL, 1999).

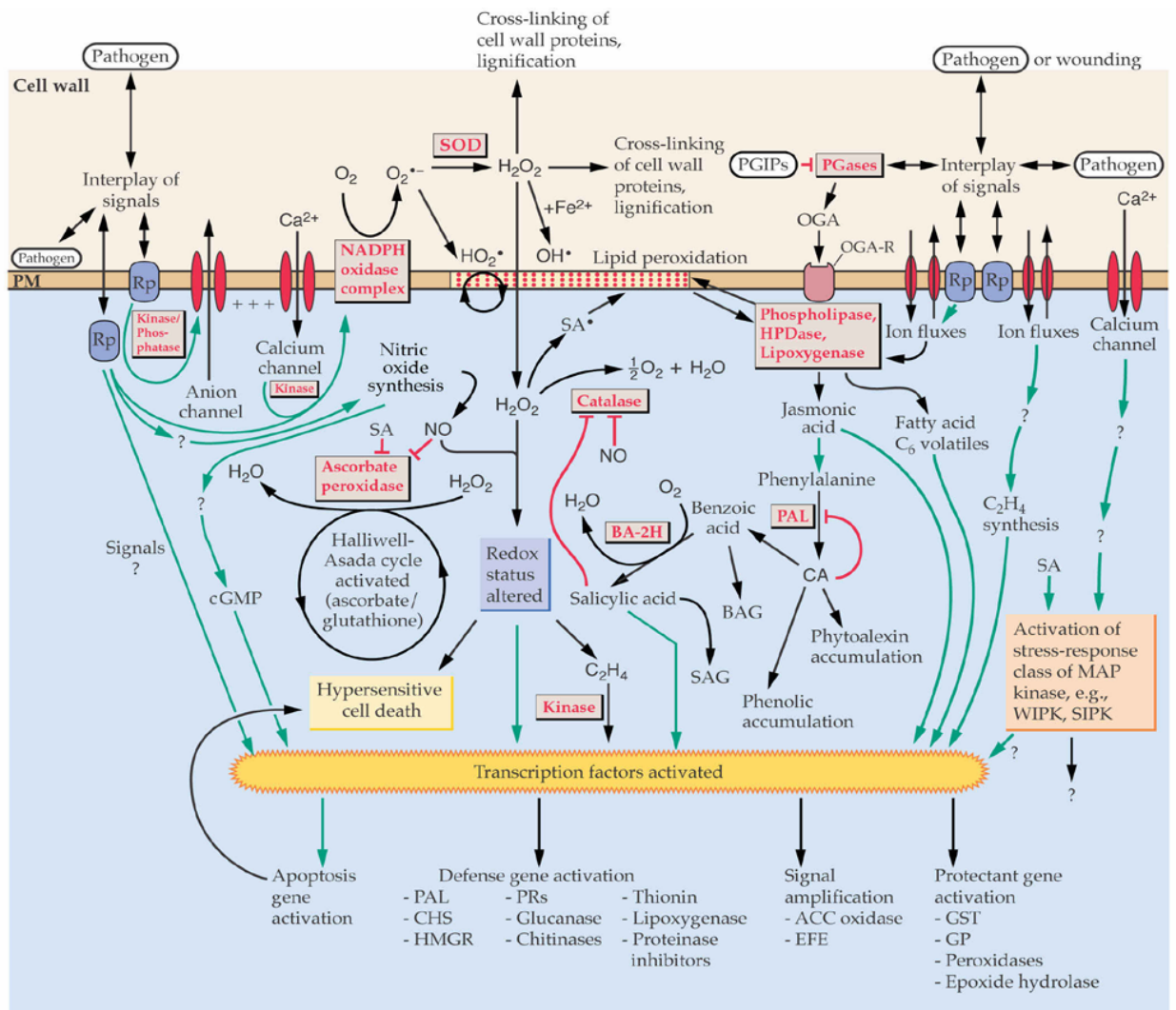


Fig. 1.4 – Panoramica delle vie di trasduzione del segnale che attivano e coordinano le risposte di difesa della pianta. Recettori proteici interagiscono con elicitori di natura biotica o abiotica (ozono). Non sono noti gli eventi immediatamente a valle della trasmissione del segnale, ma sono coinvolti chinasi, fosfatasi, proteine G e flussi ionici. Questi eventi producono e attivano rapidamente numerosi composti, tra cui le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e l'ossido d'azoto, e portano alla diretta induzione della trascrizione di geni di difesa (o forse geni dell'apoptosi). L'amplificazione della risposta difensiva iniziale avviene attraverso la produzione di ulteriori segnali molecolari, cioè altre ROS, perossidi dei lipidi, acido benzoico (BA), acido salicilico (SA), acido jasmonico (JA) ed etilene. Questi a loro volta inducono altri geni relativi alla difesa e modificano proteine di difesa ed enzimi. Le concomitanti alterazioni dello stato redox della cellula o il danno cellulare attivano meccanismi costitutivi per la protezione della cellula (ciclo di Halliwell-Asada e enzimi come la superossido dismutasi e la catalasi) e inducono geni coinvolti nella sintesi di vari composti con azioni protettiva. Lo stress relativo alle difese può indurre la morte cellulare. Un "cross-talk" tra le diverse vie indotte sembra coordinare le risposte. Le frecce verdi indicano le interazioni positive, le linee rosse quelle negative.

Il meccanismo d'azione dell'ozono di norma è diverso a seconda che l'esposizione sia acuta, cronica o ripetuta.

Tabella 1.2 - Relazione tra i parametri di esposizione all'ozono e la risposta delle piante.

Tipo di esposizione	Esposizione all'ozono	Risposta
Acuta	Elevata, breve	-Morte cellulare -Lesioni visibili -Perdita dell'integrità di membrana -Risposta di difesa antiossidante scarsa o assente -Tassi fotosintetici ridotti
Cronica	Da ridotta a moderata, prolungata	-Alcune lesioni visibili -Risposta di difesa antiossidante -Tassi fotosintetici ridotti -Perdita di clorofilla -Aumento della produzione di etilene -Resa ridotta -Senescenza precoce
Ripetuta	Da ridotta a moderata, periodica	-Lesioni scarse o assenti -Acclimatazione -Miglioramento della risposta antiossidante -Tassi fotosintetici più elevati -Migliore resa rispetto all'esposizione cronica

1.3.1. Flusso dell'ozono all'interno delle foglie

È ampiamente dimostrato che la penetrazione dell'ozono attraverso la cuticola fogliare è marginale (Kerstiens e Lendzian, 1989) e, quindi gli stomi svolgono un ruolo fondamentale nel determinare il flusso dell'ozono nello spazio apoplastico. La sensibilità degli stomi agli stimoli esterni è un'importante caratteristica per poter determinare la sensibilità/tolleranza della pianta all'ozono. Se l'apertura degli stomi è più ampia e, conseguentemente, il flusso delle sostanze gassose è più elevato in una pianta rispetto ad un'altra, anche la dose di ozono che penetra nello spazio intercellulare è maggiore (Heath e Taylor, 1997; Sandermann e Matyssek, 2004). La chiusura degli stomi in risposta all'ozono costituisce un fondamentale

meccanismo protettivo (Hill e Littlefield, 1969). Importante è il ruolo svolto dall'acido abscissico (ABA) nel regolare l'apertura e la chiusura degli stomi e il conseguente flusso di O_3 all'interno delle foglie. Tale meccanismo sembra sia dovuto a modificazioni dell'attività fotosintetica, determinate da una maggior produzione di ABA, dall'attivazione di una cascata ossidativa all'interno delle cellule di guardia ed infine dall'emissione di etilene che agirebbe sull'apertura degli stomi. Moldau, Sober e Sober (1990) hanno dimostrato che l'esposizione all' O_3 induce una rapida chiusura stomatica (in appena 12 minuti), allo stesso tempo non si rilevano modificazioni nell'efficienza del meccanismo di carbossilazione misurando la conduttanza del mesofillo alla CO_2 . Gli stessi Autori hanno dedotto che la chiusura degli stomi indotta da O_3 era dovuta ad un suo effetto diretto sulle cellule di guardia, che risultava in un decremento dell'attività fotosintetica delle cellule del mesofillo. Altri studi hanno in seguito avvalorato la tesi che la maggior parte delle risposte degli stomi all'ozono deriverebbero da modificazioni nell'attività fotosintetica del mesofillo (Martin *et al.*, 2000). Il coinvolgimento della fotosintesi nella risposta stomatica indotta da O_3 è inoltre confermato da un recente studio di Joo *et al* (2005), in cui è mostrato che una cascata ossidativa generata da O_3 è rilevabile dapprima nei cloroplasti delle cellule di guardia. È stato dimostrato, inoltre, che l'emissione di etilene indotta da O_3 causa la chiusura degli stomi (Gunderson e Taylor, 1991). Il coinvolgimento di un segnale mediato dall'ABA nella chiusura stomatica indotta da O_3 è stato dimostrato confrontando il genotipo wild-type Col-0 di *Arabidopsis* con il mutante insensibile all'ABA. La chiusura degli stomi avveniva molto velocemente sia nel wild-type che nel mutante (Ahlfors *et al.*, 2004a). Diverse ricerche hanno permesso di rilevare che la chiusura degli stomi dipendente da ABA è mediata dalle ROS (Pei *et al.*, 2000; Murata *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001), di conseguenza l' O_3 e le ROS prodotte dalla sua degradazione apoplastica, avrebbero un effetto diretto sulla normale funzionalità stomatica. Le ROS derivate dalla dissoluzione dell' O_3 sembrano intervenire sugli stomi sia agendo da parte di ricambio artificiale per la funzione delle ROS indotte da ABA, sia interessando i componenti nel perimetro delle cellule di guardia e stimolando a valle la segnalazione responsabile dell'attivazione della NADPH ossidasi. Le ROS, per di più, influenzano due fosfatasi proteiche, ABI1 ed ABI2, che inibiscono la segnalazione dell'ABA; inoltre è stato dimostrato che l' H_2O_2 inibisce l'attività di queste proteine (Meinhard e Grill, 2001; Meinhard, Rodriguez e Grill, 2002). Attraverso questa pathway ABA-dipendente, le ROS e, quasi certamente, anche l' O_3 influenzano l'afflusso degli ioni Ca^{2+} attraverso la membrana plasmatica. Infine, sembra che l' O_3 possa influenzare l'apertura degli stomi regolando i flussi di K^+ nelle cellule di guardia (Torsethaugen, Pell e Assmann, 1999). Tuttavia solo in alcuni lavori è stato preso in considerazione l'effetto dell' O_3 sui flussi ionici attraverso la membrana plasmatica in

generale (Castillo e Heath, 1990; McAinsh *et al.*, 1996; Clayton *et al.*, 1999) e, soltanto in uno di questi, si è fatto riferimento in modo specifico ai flussi all'interno delle cellule di guardia degli stomi (Torsethaugen *et al.*, 1999).

1.3.2. Influenza dell'O₃ sui flussi ionici transmembrana

È stato osservato, durante gli stadi iniziali di tossicità dell'O₃, l'efflusso di ioni K⁺ dalle cellule. Secondo alcuni Autori ciò porterebbe alla rimozione di ioni Ca²⁺ dalla parete cellulare e in ultima analisi, ad un'alterazione della sua rigidità (Barnes *et al.*, 1990). Numerosi studi hanno dimostrato l'influenza dell'ozono sul trasporto del Ca²⁺ e sul suo conseguente accumulo intracellulare. In una ricerca eseguita dal gruppo di lavoro di Clayton *et al.* (1999) hanno utilizzato piante di *Arabidopsis* trasformate con il gene dell'equorina, una proteina luminescente sensibile al calcio, al fine di analizzare gli effetti dell'ozono sull'accumulo del calcio citoplasmatico [Ca²⁺]_{cyt}. Si è potuto dimostrare che dosi realistiche di ozono (pari a 30-200 ppb) determinano aumenti sostanziali del [Ca²⁺]_{cyt}. È possibile distinguere due fasi nel processo di accumulo del Ca²⁺: entro i primi cinque minuti dall'esposizione all'inquinante si osserva un primo picco, caratteristico per la sua entità e brevità, che dura 2-3 minuti; nella seconda fase si registra un graduale aumento della concentrazione intracellulare del calcio. Il secondo picco, caratterizzato dalla minore quantità di ioni calcio accumulata nell'unità di tempo, comincia normalmente dopo quindici minuti dal momento in cui si è avuta l'esposizione all'ozono e continua fino alla fine del trattamento. La quantità di calcio citoplasmatico accumulato sembra essere correlata direttamente alla dose di ozono somministrata: l'ampiezza delle aree dei due picchi aumentava quasi proporzionalmente all'aumentare della concentrazione di ozono somministrato. È stato evidenziato che l'incremento della quantità di [Ca²⁺]_{cyt} è correlato all'aumentata espressione di un gene codificante per l'enzima antiossidante glutathione S-transferasi (GST). Alcuni lavori hanno dimostrato che la seconda fase di accumulo di calcio citoplasmatico può essere inibita sia pretrattando le plantule con cloruro di lantanio (LaCl₃), sia riducendo ad alcuni minuti (10 min) l'esposizione all'ozono. L'inibizione della seconda fase di accumulo determina, inoltre, la mancata induzione dell'espressione del gene GST. Per il Ca²⁺ è stato ipotizzato un ruolo come molecola segnale nell'induzione dell'espressione genica in condizioni di stress da ozono, ma attualmente quelli di Clayton *et al.* (1999) sono gli unici risultati che avvalorano questa ipotesi.

La veloce induzione O_3 -dipendente dei flussi ionici nella membrana plasmatica sembra sia correlata anche all'induzione del burst ossidativo (Overmyer *et al.*, 2003). È stato dimostrato che gli ioni Ca^{2+} giocano un ruolo fondamentale nell'induzione della produzione di O_2^- modulando l'attivazione della NADPH ossidasi. Questo processo avviene grazie alla presenza nelle NADPH ossidasi delle piante di un dominio "EF-hands" caratterizzato da un'elevata affinità per il Ca^{2+} . La ricerca di Clayton *et al.* (1999) non è riuscita ad assegnare un ruolo ben definito alla prima fase di accumulo di calcio citoplasmatico, tuttavia i risultati ottenuti suggeriscono che le due fasi di accumulo potrebbero interessare differenti tipi di cellule, oppure essere correlate a diverse risposte cellulari all' O_3 . Alcuni ricercatori hanno ipotizzato che la prima fase veloce di accumulo di $[Ca^{2+}]_{cyt}$ possa essere coinvolta nel processo di risposta degli stomi all'ozono (Mc Ains *et al.*, 2002). Sembra che l' O_3 provochi, tra l'altro, un incremento del calcio citoplasmatico nelle cellule di guardia e questo fenomeno potrebbe essere la causa principale, o uno degli eventi concomitanti, che portano alla chiusura degli stomi. Ricerche effettuate in *Picea abies* hanno valutato l'effetto dell'ozono sulla distribuzione dei cristalli di ossalato di calcio all'interno degli aghi (Fink, 1991). In piante non trattate con ozono, i cristalli erano normalmente localizzati nelle pareti delle cellule dell'epidermide degli aghi, mentre nelle piante esposte all'ozono si osservava la presenza di cospicui depositi di cristalli di ossalato nei vacuoli di cellule epidermiche, in cellule sussidiarie e, principalmente, nelle cellule di guardia degli stomi. Questi risultati suggerivano la presenza di un elevato flusso di ioni Ca^{2+} , causato dall'esposizione all'ozono, nelle cellule di guardia con conseguente alterazione dell'omeostasi del calcio e, in ultima analisi, delle vie di trasduzione del segnale mediate da questo ione.

Altri lavori sono stati incentrati sia sulla misura della conduttanza stomatica, sia sugli effetti che l' H_2O_2 determina sugli stomi, in relazione all'esposizione all'ozono. Nel primo caso è stata osservata una forte riduzione della conduttanza in piante di *Picea abies* e di *Leontodon hispidus* esposte ad O_3 , tale riduzione poteva essere determinata dal forte incremento della concentrazione di $[Ca^{2+}]_{cyt}$ all'interno delle cellule di guardia (Le Thiec *et al.*, 1994; De Silva *et al.*, 2001). Nel secondo caso è stata evidenziata una correlazione diretta tra accumulo di perossido d'idrogeno, aumento di $[Ca^{2+}]_{cyt}$ nelle cellule di guardia e chiusura degli stomi (Mc Ains *et al.*, 1996). In *Commelina communis* è stato dimostrato che l' H_2O_2 inibisce in modo reversibile l'apertura degli stomi e che questo fenomeno sembra essere dose-dipendente. L'aumento della concentrazione di Ca^{2+} nelle cellule di guardia e l'inibizione reversibile dell'apertura stomatica, entrambi indotti da perossido d'idrogeno, vengono inibiti dall'EGTA, un agente chelante il calcio. Questa evidenza indica l'esistenza di una relazione causale tra i due fenomeni.

Quindi l'esposizione all'ozono determina l'aumento nelle cellule di guardia del $[Ca^{2+}]_{cyt}$, che a sua volta influisce sugli stomi sia in modo diretto, attraverso processi di segnalazione mediati da questo ione, che indirettamente, alterando l'omeostasi del Ca^{2+} nelle cellule di guardia, danneggiando la capacità degli stomi di rispondere agli stimoli esterni. È stato proposto, infine, che l' O_3 possa influenzare altri componenti delle vie di trasduzione del segnale nelle cellule di guardia, come nel caso dei canali ionici che, regolando i flussi di anioni e cationi, mediano i cambiamenti degli stati di turgore delle cellule di guardia e, in definitiva, l'ampiezza delle aperture stomatiche (Mc Ains *et al.*, 2002).

1.3.3. Effetti sulla struttura delle membrane

I prodotti derivanti dalla dissoluzione apoplastica dell'ozono sono forti agenti ossidanti che, interagendo con i doppi legami degli acidi grassi poliinsaturi presenti nelle membrane cellulari, determinano la loro distruzione; questo sembra sia uno dei primi eventi provocati dall'esposizione all'ozono. Analizzando la composizione degli acidi grassi ed i cambiamenti nel loro grado di desaturazione, si è osservato che queste modifiche si verificavano solo con concentrazioni di O_3 alquanto elevate e non reali, o dopo prolungati periodi di trattamento. È apparso chiaro, quindi, che l'ozono non ossida direttamente gli acidi grassi insaturi durante lo stadio iniziale di esposizione (Heath e Taylor, 1997; Welburn e Welburn, 1997). Diverse ricerche hanno appurato che dopo l'esposizione della pianta all'ozono si osserva da un lato la marcata riduzione delle quantità di galattolipidi e di fosfolipidi, dall'altro un forte aumento dei triacilgliceroli. Nelle piante trattate vengono evidenziati incrementi nei livelli di steroli liberi, steroli glicosidici e glicosidi sterolici esterificati. Per quanto concerne il livello degli acidi grassi liberi, questo resta immutato, a meno che non ci sia un trattamento con dosi elevate di ozono. Considerando gli incrementi nei livelli di triacilgliceroli, importanti composti coinvolti nella trasduzione del segnale, si può ipotizzare che le variazioni indotte da ozono nella composizione lipidica delle piante potrebbero avere un ruolo importante nello sviluppo di risposte di difesa.

1.3.4. Effetti dell' O_3 sui cloroplasti

L'esposizione all'ozono determina una rapida modificazione dell'attività o della sintesi delle proteine dei cloroplasti, che si traduce in una sostanziale inibizione del processo fotosintetico. In alcune specie vegetali, l'esposizione all'ozono è causa di ridotta attività della

Rubisco; in presenza di O_3 il controllo della sintesi di questo enzima diviene alquanto complesso, in quanto vengono coinvolti diversi processi a livello trascrizionale, post-trascrizionale e post-traduzionale. La ridotta attività della Rubisco sembra sia dovuta principalmente alla maggiore degradazione a cui va incontro questa proteina, ma può anche dipendere dalla regolazione negativa dell'espressione dei geni che codificano per la subunità minore (rbcS) o per quella maggiore (rbcL), o dalla degradazione dei corrispondenti mRNA (Bray *et al.*, 2000). È stato osservato che la riduzione della trascrizione dei geni che codificano per proteine dei cloroplasti è preceduta da una maggiore sintesi di etilene, quindi è stato ipotizzato che l'espressione di questi geni possa essere inibita dalla sintesi di etilene indotta da O_3 (Pell *et al.*, 1997). Bray *et al.* (2000), hanno dimostrato che la riduzione dell'attività fotosintetica è da collegarsi all'inibizione dei fotosistemi I e II, alla ridotta quantità ed attività della Rubisco, all'aumento del turnover della proteina D1 del PSII ed alla fotoinibizione.

Altri Autori hanno suggerito che i cloroplasti potrebbero avere un ruolo importante nella percezione e nella trasduzione del segnale indotto da O_3 (Mullineaux e Karpinski, 2002). È stato evidenziato che in *Arabidopsis* la produzione di ROS indotta da O_3 inizia nei cloroplasti delle cellule di guardia stomatiche per poi diffondersi alle altre cellule (Joo *et al.*, 2005). L'utilizzo di DCMU, un composto che inibisce il trasporto elettronico nei cloroplasti, impedisce l'accumulo iniziale delle ROS nei cloroplasti, ma non l'induzione tardiva delle ROS nel citoplasma e nelle membrane delle cellule di guardia. La cascata ossidativa nei cloroplasti delle cellule di guardia è attivata anche quando sono inibite le NADPH-ossidasi, enzimi fondamentali per la segnalazione intercellulare durante la formazione e la diffusione delle lesioni. Questo fenomeno suggerisce l'ipotesi che il trasferimento del segnale dello stress ossidativo non derivi dall'attivazione delle ossidasi, ma dipenda da un segnale generato nell'apoplasto e percepito nel cloroplasto (Kangasjärvi *et al.*, 2005).

1.3.5. Meccanismi di percezione e recettori associati alla membrana

Da ricerche effettuate nell'arco dell'ultimo decennio, sembra ormai assodato che l'ozono sia percepito nell'apoplasto e che in questo comparto avvenga la sua degradazione nelle diverse specie reattive dell'ossigeno. Resta ancora in gran parte sconosciuto il meccanismo con cui le cellule percepiscono la presenza delle ROS apoplastiche. Normalmente l' O_3 determina diverse reazioni di risposta cellulare, che sfociano in notevoli variazioni nell'espressione genica globale. Per far sì che ciò avvenga è necessario che

l'ozono, o i prodotti che derivano dalla sua degradazione, vengano percepiti dalle cellule (Mahalingam *et al.*, 2003, 2005; Tamaoki *et al.*, 2003b, 2004; Tuominen *et al.*, 2004). Sono stati proposti tre meccanismi attraverso cui potrebbe avvenire la percezione del complesso O₃-ROS:

- 1) La percezione potrebbe coinvolgere una proteina recettrice apoplastica, che potrebbe essere modificata direttamente dal complesso O₃-ROS, oppure riconoscere modifiche che il complesso opera su un altro componente apoplastico (Baier *et al.*, 2005).
- 2) La percezione potrebbe avvenire attraverso l'ossidazione dei lipidi della membrana plasmatica, generando molecole di segnalazione lipidiche che potrebbero essere percepite a loro volta.
- 3) La percezione potrebbe derivare dalla modificazione dello stato redox e dall'omeostasi cellulare globale per azione del complesso O₃-ROS sulle sostanze redox-attive quali: acido ascorbico, glutatione o complesso NAD(P)H/NAD(P).

I tre meccanismi elencati potrebbero essere coinvolti collettivamente nelle diverse risposte individuali indotte dall'ozono.

Operando su cellule di tabacco coltivate in sospensione, è stato possibile dimostrare che la segnalazione ossidativa può essere regolata da alcuni recettori associati alla membrana plasmatica (Miles, Samuel e Ellis, 2002). Utilizzando un detergente incapace di attraversare la membrana si può impedire l'attivazione di una chinasi proteica indotta da acido salicilico (SIPK) di tabacco, che viene indotta dalla radiazione ultravioletta C (C-UV), dall'ozono e dall'H₂O₂. Il blocco dell'attivazione avviene in seguito all'interferenza che il detergente determina sulla segnalazione mediata dal recettore di membrana. L'attivazione della SIPK indotta da C-UV dipende dalla presenza delle ROS, visto che le strutture deputate alla loro eliminazione sopprimono del tutto l'attivazione delle MAPK da parte della C-UV. Infine, per il processo di attivazione di AtMPK6, un omologo di SIPK in *Arabidopsis*, risulta essenziale sia la presenza delle ROS che l'afflusso di ioni Ca²⁺, ma non sono coinvolte le subunità α e β della proteina G, una GTPasi associata alla membrana plasmatica, impegnata nella trasduzione degli stimoli extracellulari in segnali intracellulari in diversi processi metabolici (Miles *et al.*, 2004). Analogamente, risulta indipendente dalla GTPasi il processo di regolazione del gene AtMPK3 di *Arabidopsis* (Joo *et al.*, 2005). Come già accennato, la conducibilità stomatica sembra essere essenziale per determinare una maggiore o minore

sensibilità delle piante all'ozono. Le proteine G sono coinvolte nella segnalazione ABA delle cellule di guardia (Wang *et al.*, 2001; Coursol *et al.*, 2003; Pandey e Assmann, 2004). Disattivando il recettore *GCR1*, associato alla proteina G, si determina l'interazione con *GPA1*; *GCR1* rende ipersensibili all'acido abscissico le risposte degli stomi (Wang *et al.*, 2001). Le stesse piante manifestavano, inoltre, una maggiore tolleranza alla siccità rispetto al genotipo wild-type, ciò è dovuto, verosimilmente, ai tassi di traspirazione ridotti. Queste caratteristiche non incidono sulla sensibilità all'O₃ dei mutanti nulli per *GCR1*, che non differiscono dal tipo selvatico (Booker *et al.*, 2004). Tutto ciò fa ipotizzare che il ruolo svolto dalle proteine G nei processi legati all'ozono sia disgiunto da quello operato nella regolazione degli stomi. Una ricerca effettuata in riso ha dimostrato che l'attivazione della NADPH-ossidasi della membrana plasmatica durante la risposta di ipersensibilità (HR) necessita della GTPasi *Rac*. Quest'ultima attiva la produzione di ROS e la morte cellulare ROS-dipendente sia in cellule di riso coltivate che nelle foglie di piante transgeniche (Kawasaki *et al.*, 1999). *Rac* è attivato dalla subunità α della proteina G (Suharsono *et al.*, 2002). Analogamente, la proteina G media l'attivazione indotta da O₃ della NADPH-ossidasi e la conseguente cascata ossidativa (Joo *et al.*, 2005).

La degradazione dell'O₃ nell'apoplasto conduce alla formazione di varie ROS. Queste ultime vengono percepite, probabilmente, in seguito alla modificazione dell'equilibrio redox della cellula, determinato dall'accumulo delle stesse ROS, e non attraverso un'interazione diretta recettore-ligando (Lamb e Dixon, 1997; Vranová *et al.*, 2002). Tale processo sembra possa influenzare in modo diretto l'attività dei fattori di trascrizione, dei messaggeri secondari e degli enzimi coinvolti nei processi biochimici.

La condizione redox cellulare può essere percepita dalle molecole redox-sensibili tioredoxina e glutatione, che trasmettono il segnale in avanti (Vranová *et al.*, 2002). I bersagli finali sono o i gruppi tiolici dei residui di cisteina o le associazioni ferro-zolfo presenti nei centri catalitici degli enzimi. L'azione dell'O₃ sull'equilibrio redox cellulare può condurre a risposte simili, che rappresentano il tentativo delle cellule di reagire e adattarsi all'O₃, perché il livello delle ROS non ecceda la capacità antiossidante apoplastica.

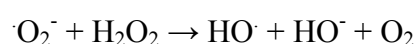
1.4. Formazione e caratteristiche delle ROS

Le specie reattive dell'ossigeno hanno fatto la loro comparsa fin dall'introduzione dell'ossigeno molecolare (O₂) nella nostra atmosfera grazie all'evoluzione degli organismi fotosintetici (Halliwell e Gutteridge, 1989). La reattività chimica delle ROS, e quindi gli effetti provocati all'interno delle cellule aerobiche, dipendono da alcune caratteristiche proprie della molecola diossigeno (Hauptmann e Cadenas, 1997). Lo stato basale dell'ossigeno (stato di tripletto) non è reattivo, in quanto contiene due elettroni non appaiati con spin parallelo nel livello energetico 2p. La conseguenza di ciò è che se l'ossigeno tenta di ossidare un altro atomo o una molecola accettando un paio di elettroni da questi, tali elettroni devono avere spin parallelo per poter occupare lo spazio vacante negli orbitali 2p. In accordo con il principio di Pauli, una coppia di elettroni in un orbitale atomico o molecolare deve avere spin antiparallelo. Tale condizione impone all'ossigeno di accettare i suoi elettroni uno per volta, in tal modo la velocità di reazione con molecole di tipo radicalico è molto ridimensionata. Al fine di "attivare" lo stato fondamentale dell'ossigeno deve mutare la situazione di spin nell'orbitale 2p. La variazione nella configurazione elettronica (o nel numero di elettroni) avviene come conseguenza di un consumo energetico, da un processo di catalisi, oppure da un partner di reazione (donatore di elettroni).

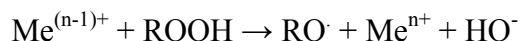
L'attivazione dell'O₂ può avvenire sia fisicamente che chimicamente. Nel primo caso, l'attivazione determina una variazione esclusivamente nello stato di spin, da parallelo ad antiparallelo, ma non nel numero di elettroni. Questo può essere indotto dalla luce e mediato da coloranti fotosensibili o pigmenti, i quali assorbono l'energia della radiazione e poi la trasferiscono allo stato basale di tripletto dell'O₂, che viene trasformato in ossigeno singoletto (¹O₂).

L'attivazione chimica dell'ossigeno può essere ottenuta in diversi modi. Alcune ossidasi possono produrre sia O₂^{•-} (per esempio, nel caso del sistema xantina-xantina ossidasi) che H₂O₂ (nel caso di aminoacido ossidasi, glucosio ossidasi, acido grasso desaturasi). Va ricordato che alcuni compartimenti cellulari sono caratterizzati dalla presenza elevati flussi elettronici, come avviene lungo la catena respiratoria del mitocondrio o dell'apparato fotosintetico del cloroplasto, e all'interno di questi complessi enzimatici si possono verificare perdite di elettroni, che risultano in intermedi transienti nello stato di radicali.

I radicali primari dell'O₂ possono partecipare alle reazioni di propagazione del trasferimento di radicali, come la reazione di Haber-Weiss:



Questa reazione in presenza di metalli di transizione, oppure con complessi Me-O_2 , può risultare essere maggiormente pronunciata. Altra importante reazione di propagazione è la reazione organica di Fenton, responsabile della formazione di perossidi organici estremamente aggressivi:



Di seguito vengono descritte le diverse specie reattive dell'ossigeno.

1.4.1. Ossigeno singoletto

Questa specie reattiva dell'ossigeno, molto aggressiva, quando viene in contatto con composti organici contenenti doppi legami (ad esempio gli acidi grassi delle membrane) produce endoperossidi, idroperossidi o dioxentani ed una gran varietà di prodotti intermedi e di frammentazione. Gli aminoacidi cisteina, metionina, istidina e triptofano reagiscono con l'ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$) a tassi costanti relativamente alti, risultanti nella produzione di perossidi, apertura di anello e formazione di aldeidi.

1.4.2. Anione superossido

Questa specie nucleofila può agire come riducente, ad esempio nella reazione di Haber-Weiss, con l' H_2O_2 con Fe-citocromo C ed alcuni chinoni. Può comportarsi come agente ossidante nei confronti di alcuni componenti del cloroplasto, come ad esempio nelle reazioni con citocromo f, plastocianina (Cu^{2+}), ferredoxina (Fe^{2+}), acido ascorbico (AA) e glutathione ridotto (GSH). Nelle cellule viventi, l'anione superossido (O_2^-) esiste in equilibrio con la sua forma protonata, il radicale idroperossido ($\text{HO}_2^\cdot$). Quest'ultima forma è più idrofobica rispetto alla forma non protonata e può facilmente penetrare attraverso il doppio strato lipidico delle membrane. Comunque, a pH fisiologico, l' O_2^- non è eccessivamente reattivo nei confronti dei maggior componenti macromolecolari della cellula. In soluzioni acquose, a pH neutro o leggermente acido, questo radicale in ciascuna delle due forme è convertito ad H_2O_2 e O_2 mediante un processo di disproporzionamento (dismutazione). Tale reazione può avvenire in modo spontaneo oppure può essere catalizzata dalla superossido dismutasi (SOD).

1.4.3. Perossido di idrogeno

Questa è una specie relativamente stabile e può comportarsi sia come agente riducente, che come ossidante. La reattività e la funzione ossidativa del perossido d'idrogeno (H_2O_2) può essere notevolmente aumentata o in presenza di catalizzatori enzimatici (formazione di complessi attivi con il ferro eme delle perossidasi) o dal suo decadimento nel più aggressivo radicale idrossilico. La stabilità chimica rende possibile il trasferimento attraverso le membrane cellulari dell' H_2O_2 , che in tal modo può raggiungere cellule collocate in zone remote e distanti dal sito in cui è avvenuta la sua formazione. Nelle cellule vegetali, molto perossido d'idrogeno si forma per azione della SOD; cospicua è comunque la quantità di H_2O_2 prodotta da altri processi, siano essi enzimatici e non.

Il principale sito di produzione dell' H_2O_2 è il cloroplasto. Nei perossisomi alcune ossidasi, come la glicolato-ossidasi, la urato-ossidasi e l'acil-CoA-ossidasi, possono generare H_2O_2 . Il perossido di idrogeno è il prodotto più abbondante derivante dalla fotorespirazione, una via biochimica la cui attività è grandemente aumentata in risposta all'elevata irradianza, alle elevate temperature e alla carenza di acqua. Nei mitocondri l' H_2O_2 è formato come sottoprodotto della respirazione. Situazioni di stress normalmente determinano un aumento della produzione di H_2O_2 sia nel cloroplasto ed in altri compartimenti cellulari, che nell'apoplasto. L' H_2O_2 formato di recente può essere:

1. Convertito spontaneamente, o con la partecipazione della catalasi, in H_2O ed O_2 .
2. Usato come substrato da varie perossidasi (ad esempio per la formazione di radicali fenolici, fondamentali per la sintesi della lignina).
3. Detossificato dalla ascorbato perossidasi (APX), che agisce in concerto con la deidroascorbato reduttasi (DHAR) e glutathione reduttasi (GR) nella via dell'ascorbato-glutatione.

In alcune condizioni, il perossido d'idrogeno può essere generato da POX in una serie di reazioni che coinvolgono la formazione del Composto III.

1.4.4. Radicale idrossido

È una specie attiva caratterizzata dall'avere un'emivita di pochi microsecondi ed un'affinità verso l'atomo di idrogeno estremamente alta. Il radicale idrossido ($\cdot\text{OH}$) non discrimina tra la maggior parte dei donatori organici, infatti il suo sito di reazione può essere chiuso alla sua generazione (questo processo è spesso definito come “sito chimico attivo”). L' $\cdot\text{OH}$ è talmente energetico che, di norma, reagisce con la prima molecola con cui collide ed il suo potenziale distruttivo e mutagenico nei sistemi biologici è enorme. Enzimi, piccoli metaboliti, acidi nucleici e membrane sono tutti candidati ad interagire con il radicale idrossido. I principali acidi grassi insaturi delle membrane vegetali, gli acidi linoleico e linolenico, possono subire l'attacco ossidativo del radicale; come prodotti di degradazione si possono formare corte catene di alcoli, aldeidi e alcheni. Il radicale idrossido può essere formato dalla reazione diretta tra H_2O_2 e $\cdot\text{O}_2^-$ nel processo di Haber-Weiss. Sotto condizioni normalmente presenti nelle cellule delle piante, questa reazione procede piuttosto lentamente ed è inefficiente nel produrre elevate quantità di $\cdot\text{OH}$. Inoltre, livelli significativi di radicale idrossido possono essere formati attraverso un ciclo di reazioni coinvolgenti l'ossidazione di metalli di transizione, quali il Fe^{2+} ed il Cu^+ (reazione di Fenton), e successiva rigenerazione degli ioni ossidati ai loro stati ridotti mediante reazione con $\cdot\text{O}_2^-$. I metalli di transizione agiscono come catalizzatori e la loro localizzazione ed accessibilità rappresenta il fattore principale che determina il sito cellulare di formazione di $\text{HO}\cdot$.

Compound	Shorthand notation(s)	Structural representation(s)	Sources
Molecular oxygen (triplet ground state)	$O_2; ^3\Sigma$	$\cdot\ddot{O}=\ddot{O}\cdot$ $1s^2 2s^2 (\sigma_s)^2 (\sigma_s^*)^2 (\sigma_x)^2 (\pi_y)^2 (\pi_z)^2 (\pi_y^*)^1 (\pi_z^*)^1$	Most common form of dioxygen gas
Singlet oxygen (first excited singlet state)	$^1O_2; ^1\Delta$	$\cdot\ddot{O}=\ddot{O}\cdot$ $1s^2 2s^2 (\sigma_s)^2 (\sigma_s^*)^2 (\sigma_x)^2 (\pi_y)^2 (\pi_z)^2 (\pi_y^*)^2$	UV irradiation, photoinhibition, photosystem II e^- transfer reactions (chloroplasts)
Superoxide anion	O_2^-	$[\cdot\ddot{O}=\ddot{O}\cdot]^-$	Mitochondrial e^- transfer reactions, Mehler reaction in chloroplasts (reduction of O_2 by iron-sulfur center F_X of Photosystem I), glyoxysomal photorespiration, peroxisome activity, plasma membrane, oxidation of paraquat, nitrogen fixation, defense against pathogens, reaction of O_3 and OH^- in apoplastic space
Hydrogen peroxide	H_2O_2	$H-\ddot{O}-\ddot{O}-H$	Photorespiration, β -oxidation, proton-induced decomposition of $O_2^{\cdot-}$, defense against pathogens
Hydroxyl radical	$OH^\cdot$	$\cdot\ddot{O}-H$	Decomposition of O_3 in presence of protons in apoplastic space, defense against pathogens
Perhydroxyl radical	$O_2H^\cdot$	$\cdot\ddot{O}=\ddot{O}-H$ $\cdot\ddot{O}=\ddot{O}-H$	Reaction of O_3 and OH^- in apoplastic space
Ozone	O_3	$\cdot\ddot{O}=\ddot{O}-\ddot{O}\cdot$ $\cdot\ddot{O}=\ddot{O}-\ddot{O}\cdot$	Electrical discharge or UV radiation in stratosphere, reactions involving combustion products of fossil fuels and UV radiation in troposphere

Fig. 1.5 - Struttura molecolare delle ROS che sono attive nelle piante

1.5. Metaboliti impegnati nel processo di detossificazione

Nella cellula aerobica, in condizioni di omeostasi, esiste un equilibrio stabile tra formazione di ROS e loro rimozione, che avviene attraverso enzimi, metaboliti e sistemi misti (Alscher *et al.*, 1997) che, nel loro insieme, vengono definiti antiossidanti. Gli organelli cellulari caratterizzati da un'elevata attività metabolica di ossidazione o da flussi elettronici intensi quali: cloroplasti, mitocondri e perossisomi, sono i principali produttori di ROS nelle cellule vegetali. In questi stessi organelli sono altresì presenti le diverse ossidasi che rendono possibile l'equilibrio tra formazione e rimozione dei vari radicali dell'ossigeno. In ultima analisi, la produzione delle ROS non deve superare la capacità antiossidante attuale e potenziale della cellula aerobica (Foyer *et al.*, 1997).

1.5.1. Acido ascorbico

L'acido ascorbico (AA) è fondamentale nella difesa dai radicali liberi dell'ossigeno prodotti in seguito all'esposizione della pianta all'ozono. Non sorprende, quindi, che il livello totale di AA sia correlato alla resistenza all'O₃ presente in diverse specie vegetali. Già nel 1960 esperimenti che prevedevano applicazioni fogliari di acido ascorbico avevano dimostrato che questo metabolita aveva un'azione protettiva nei confronti dell'ozono (Freebairn, 1960). In studi più recenti, esaminando foglie di tabacco controllo e trattate (150 p.p.b. di ozono per 5 ore), il livello di AA era circa due volte più elevato nel genotipo Bel B ozono-resistente rispetto a quello ozono-sensibile Bel W3 (Pasqualini *et al.*, 2002). Altre ricerche effettuate sul mutante *vtc1* di *Arabidopsis thaliana* hanno dimostrato che esso presentava circa un terzo della quantità di acido ascorbico mostrato dal wild type, risultando sensibile all'ozono. Il ripristino della resistenza all'O₃ in questo mutante si otteneva artificialmente trattandolo con L-galactono-1,4-lactone, un precursore biosintetico dell'AA (Conklin *et al.*, 1997), che determinava una maggiore sintesi di AA.

L'intercettazione all'interno dell'apoplasto e la detossificazione delle specie reattive dell'ossigeno, prodotte in seguito alla dissoluzione dell'O₃, è uno dei principali meccanismi di resistenza all'ozono della pianta. È stato dimostrato che circa il 10% dell'AA totale è localizzato all'interno dello spazio apoplastico (Burkey, Eason e Fiscus, 2003). Diversi studi, effettuati nel corso degli ultimi quindici anni, suggeriscono che la quantità apoplastica di AA è un'importante componente nella difesa contro danni da ozono (Castillo e Greppin, 1988; Luwe, Takahama e Heber, 1993; Polle, Wieser e Havranek, 1995). Ad esempio, in una di

queste ricerche, giovani foglie contenenti elevati livelli di AA apoplastico presentavano una maggiore resistenza all'O₃ (Luwe *et al*, 1993).

L'acido ascorbico, oltre che nello spazio apoplastico, è presente in elevate concentrazioni nei cloroplasti, nel citosol e nei vacuoli; esso è il principale substrato per la detossificazione riduttiva dell' H₂O₂ ed è rigenerato di continuo dalle sue forme ossidate (Noctor e Foyer, 1998; Vanacker *et al*, 1998).

L'ascorbato perossidasi (APX) è un'isoenzima presente in diversi compartimenti subcellulari della cellula vegetale e promuove la dismutazione dell' H₂O₂ ad H₂O e la concomitante ossidazione dell'AA in monodeidroascorbato (MDHA) (Shigeoka *et al*, 2002). È stato dimostrato che il perossido d'idrogeno svolge un ruolo importante nel regolare l'espressione genica della APX citosolica (Shigeoka *et al*, 2002). In risposta ad un'esposizione all'O₃, i livelli di mRNA codificante per l'APX sono molto elevati (Conklin e Last, 1995; Kubo *et al*, 1995; Orvar, McPherson e Ellis, 1997). Questo suggerisce che l'incremento dell'isoenzima è fondamentale nel processo di detossificazione delle ROS O₃-dipendenti. Infatti, piante di tabacco che esprimono una versione antisenso di APX citosolica mostrano una chiara diminuzione dell'attività dell'APX, che determina una maggior sensibilità delle piante nei confronti dell'O₃ (Orvar e Ellis, 1997).

Quindi la presenza di AA apoplastico è da considerarsi un'importante prima linea di difesa contro l'ozono, ma è altresì importante che questo antiossidante, al fine di esplicare la sua funzione protettiva, sia mantenuto in uno stato ridotto (Burkey *et al*, 2003). Che lo stato redox sia un importante fattore nella protezione contro i danni ossidativi O₃-indotti è dimostrato in esperimenti effettuati su piante transgeniche di tabacco che sovra-esprimono ascorbato ossidasi nell'apoplasto. In uno di essi, Sanmartin *et al* (2003) hanno verificato che la quantità di AA apoplastico ridotto crollava fino a livelli scarsamente rilevabili nelle piante transgeniche. Questa condizione portava all'aumento dei danni fogliari in seguito ad un'esposizione cronica di ozono.

Come già accennato, l'AA viene ossidato a MDHA grazie all'intervento della APX, che nello stesso tempo riduce l'H₂O₂ ad H₂O. Il MDHA può rigenerare direttamente l'AA per azione di una MDHA-reduttasi, oppure può andare incontro ad una mutazione spontanea formando AA e deidroascorbato (DHA). La monodeidroascorbato reduttasi (MDHAr) è un'enzima la cui presenza è stata localizzata in diversi compartimenti subcellulari, inclusi i plastidi, i mitocondri, i perossisomi e il citoplasma (Arrigoni e De Tullio, 2002). La MDHAr catalizza il passaggio da MDHA ad AA utilizzando NADPH come donatore di elettroni (Berczi e Moller, 1998). Il deidroascorbato, formato dalla disproporzione del MDHA, viene ridotto ad AA grazie all'intervento di una DHA reduttasi (DHAr) glutatione-dipendente; in questa reazione, il

glutathione ridotto (GSH) è ossidato a glutathione disolfuro (GSSG) che viene in seguito ridotto a GSH dalla glutathione reduttasi in presenza di NADPH. L'attività specifica della DHAr è stata purificata dalle piante, tuttavia la reazione tra GSH e DHA è catalizzata da altri enzimi, come la glutaredossina (tioltransferasi), la proteina disolfuro isomerasi e da un inibitore della tripsina tipo-Kunitz (Morell *et al*, 1997).

Molti studi suggeriscono che il DHA apoplastico potrebbe essere attivamente trasportato attraverso la membrana plasmatica e ridotto nel citosol grazie all'intervento della DHAr (Horemans, Foyer e Asard, 2000). Per molti anni si è avanzata l'ipotesi dell'esistenza di trasportatori di AA presenti sulla membrana plasmatica (Mozafar e Oertli, 1993), ma è solo nel 1997 che Horemans e colleghi hanno dimostrato che questi carrier esistono ed hanno un'elevata affinità per il DHA (Horemans, Asard e Caubergs, 1996). Questi carrier trans-membrana realizzano un gradiente protonico attraverso il plasmalemma per poter essere attivi (Horemans, Asard e Caubergs, 1998; Kollist *et al*, 2001) e si è potuto dimostrare che il trasporto di DHA nel citosol avviene simultaneamente all'uscita di AA dalla cellula (Horemans *et al*, 1998). L'attività dei trasportatori cambia a seconda degli stadi del ciclo cellulare, ciò indicherebbe che il trasporto DHA/AA attraverso la membrana plasmatica è un processo altamente regolato (Horemans *et al*, 2003). Non si conosce ancora bene se il trasporto DHA/AA viene alterato in risposta all'ozono; comunque le prime osservazioni riguardo l'accumulo di AA nell'apoplasto in seguito all'esposizione all'O₃ potrebbero far ipotizzare che questo trasporto venga regolato a seconda della presenza o meno dell'inquinante atmosferico (Horemans *et al*, 2000).

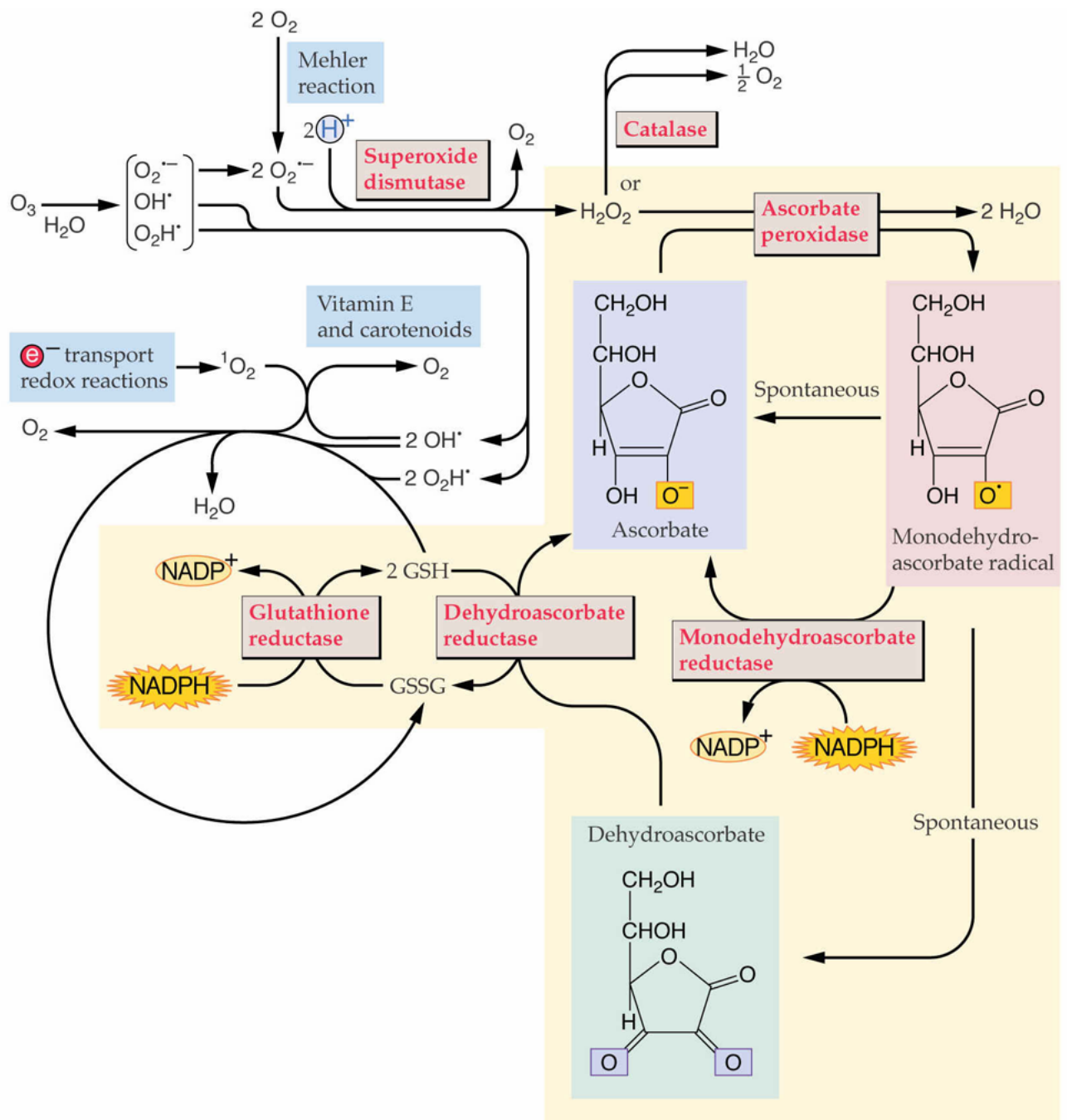


Fig. 1.6 - I sistemi di difesa antiossidanti, con descrizione degli antiossidanti enzimatici e non (Bray *et al.*, 2000).

1.5.2. Glutathione

Nelle cellule vegetali si trovano elevate quantità di glutathione, un composto tiolico non-proteico caratterizzato da numerose ed importanti funzioni molecolari, metaboliche e fisiologiche, svolte attraverso lo scambio tiolo-disolfuro (Noctor e Foyer, 1998; May *et al.*, 1998; Noctor *et al.*, 2002b; Gomez *et al.*, 2004b). Esso agisce come regolatore dell'assorbimento e del trasporto del solfato, come carrier e riducente nella riduzione del solfato e dei sali di selenio, infine come forma di trasporto e di deposito dello zolfo ridotto. Sembra fondamentale, inoltre, il suo coinvolgimento nei processi di trasduzione del segnale (Gomez *et al.*, 2004a). Il glutathione (γ -glutammina-cisteina glicina, GSH) è il principale composto tiolico a basso peso molecolare vegetale. I tioli sono antiossidanti coinvolti anche nella sintesi proteica, in quella del DNA e nell'attivazione/disattivazione enzimatica. In numerose reazioni che coinvolgono il GSH, il gruppo tiolico Cys viene ossidato e si ha la produzione della controparte ossidata del GSH, il glutathione disolfuro (GSSG); la reazione inversa è catalizzata dall'enzima glutathione reduttasi (Gr), che utilizza il NADPH come donatore di elettroni. Il mantenimento del glutathione nella sua forma ridotta è necessario per rendere attive varie funzioni proteiche, evitando la formazione di legami disolfuro che, di norma, provocano l'inattivazione delle proteine e, successivamente, la loro aggregazione. Proteine stabili con legami disolfuro sono relativamente rare, eccetto in tessuti quiescenti, come quelli dei semi, nei quali il GSSG è lasciato accumulare. In tessuti metabolicamente attivi il GSH, in concentrazioni millimolari, agisce nel mantenere un dato stato redox che è fondamentale nel formare una barriera tra proteine con gruppi Cys e ROS (Foyer e Noctor, 2005). Inoltre va ricordato che il GSH è il principale substrato per diversi enzimi riduttivi, inclusi quelli che riducono le perossidasi (Foyer e Noctor, 2005).

Il glutathione protegge le cellule vegetali dagli stress ossidativi ed ambientali, siano essi di natura biotica o abiotica; riduce direttamente molte ROS, come l'ossigeno singoletto e il radicale idrossido, ma è poco funzionale nel reagire con il perossido d'idrogeno. L'attivazione della sintesi di GSH e l'accumulo di glutathione sembra una caratteristica generale, che si osserva nel momento in cui aumenta lo stato ossidativo del citosol. L'esposizione all'O₃ provoca un marcato decremento nel rapporto GSH/GSSG, in seguito all'aumentato accumulo di glutathione (Sen Gupta, Alscher e McCune, 1991). Si è potuto dimostrare che una risposta simile precede la decolorazione delle foglie in mais sottoposto a basse temperature (Gomez *et al.*, 2004b) e che la correlazione tra modifica dello status del glutathione e morte fogliare è particolarmente evidente in piante catalasi-deficienti (Smith *et al.*, 1984; Willekens *et al.*, 1997; Noctor *et al.*, 2002a). Studi recenti suggeriscono che gli enzimi coinvolti nella sintesi

del GSH e nel suo metabolismo siano indotti insieme in risposta agli stress (Mittova *et al*, 2003). Questo implica che ci sia una considerevole sovrapposizione tra la cascata dei segnali di trasduzione che inducono la sintesi del GSH ed i meccanismi coinvolti in funzioni di difesa che usano GSH, come la glutathione-S-transferasi (GST) e la glutathione perossidasi (GPX), enzimi che mostrano una specifica e forte risposta alle ROS (Levine *et al*, 1994).

Una delle principali funzioni svolte dal GSH come antiossidante è la riduzione del deidroascorbato (DHA) ad acido ascorbico (AA), che può avvenire sia non-enzimaticamente, a pH alcalino, sia attraverso la via metabolica detta ciclo dell'ascorbato-glutathione (Fig. 1.7). In questa reazione, il GSH agisce come un composto intermedio nella riduzione dell' H_2O_2 , utilizzando elettroni provenienti dall'acqua. I componenti del ciclo sono presenti sia nel cloroplasto che nel citosol, di recente è stata verificata la loro presenza anche nei mitocondri, nei perossisomi e nell'apoplasto (Foyer *et al*, 1997; del Rio *et al*, 1998; Vanacker *et al*, 1998a). Durante la riduzione di DHA ad AA, il GSH viene ossidato a GSSG dall'azione della DHAr; il passaggio da GSSG a GSH avviene grazie alla glutathione reduttasi (Gr), che catalizza la riduzione NADPH-dipendente del legame disolfuro del glutathione ossidato (Bray *et al*, 2000). La Gr è di importanza fondamentale nel mantenere elevato il rapporto GSH/GSSG e la conseguente disponibilità del pool totale di GSH, unitamente alle sue vie di sintesi e degradative (Foyer *et al*, 1997; Mullineaux e Creissen, 1997).

Al contrario della glutathione reduttasi, caratterizzata dal catalizzare reazioni con substrato altamente specifico, la glutathione-S-transferasi (GST) è costituita da una complessa famiglia di proteine, raggruppate in sei classi, che svolgono numerose funzioni, molte delle quali ancora non del tutto conosciute (Frova, 2003). La principale funzione biochimica di alcune GST è quella di permettere la detossificazione attraverso la coniugazione di vari xenobiotici e loro prodotti intermedi (Frova, 2003). Inoltre alcune GST giocano un ruolo importante come perossidasi o nella rigenerazione dell'AA a partire dal DHA (Dixon, Davis e Edwards, 2002). Le GST sono coinvolte sia nell'eliminazione delle molecole endogene, ad esempio i metaboliti secondari come le antocianine (Frova, 2003), sia nei processi di attivazione selettiva di geni di difesa (Alvarez e Lamb, 1997). La riduzione del GSH o l'aumento di GSSG è da correlare con l'accumulo di fitoalessine conseguente all'attacco di un patogeno; è stato possibile identificare alcuni elementi di risposta al GSH nei promotori dei geni coinvolti nella sintesi delle fitoalessine. Sembra che l' H_2O_2 possa mimare questi effetti, di conseguenza il GSH ed il perossido d'idrogeno potrebbero interagire nel bilancio redox della cellula capace di regolare tali processi.

Nella sua funzione antiossidante, il GSH funge da diretto donatore di elettroni ai perossidi nelle reazioni catalizzate dalla glutathione-perossidasi (GPX). La GPX del mondo animale è

una selenio-proteina che detossifica H_2O_2 in elevate quantità; al contrario le GPX vegetali non sono costitutive, ma sono indotte in risposta a stress (Noctor *et al*, 2002). Esse non contengono selenio e catalizzano la riduzione di ridotte quantità di H_2O_2 GSH-dipendente se confrontate con le elevate quantità di perossido d'idrogeno normalmente prodotte dalle piante (Foyer e Noctor, 2000). Nelle piante, l'ascorbato perossidasi (APX) e le catalasi (CAT) svolgono un ruolo predominante nella detossificazione dell' H_2O_2 , mentre le GPX sono importanti anche in altre aree del metabolismo ossidativo, quali la rimozione dei lipidi e dei perossidialchilici.

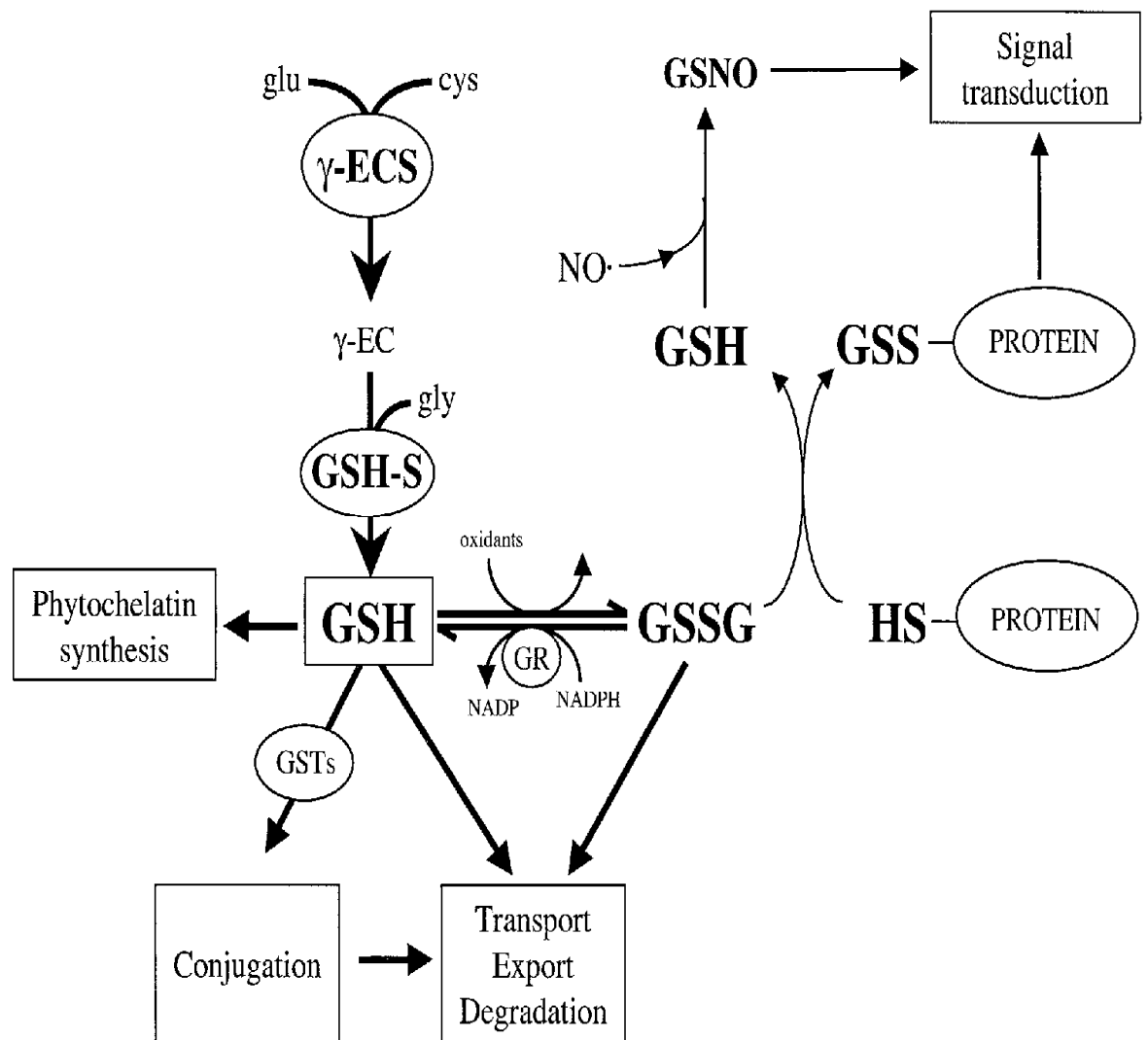


Fig. 1.7 - Biosintesi del glutathione e suo coinvolgimento in diversi processi cellulari

1.5.3. Antiossidanti enzimatici

Le diverse specie reattive dell'ossigeno vengono prodotte normalmente dalla cellula, anche in assenza di stress. Le piante hanno quindi sviluppato sistemi di difesa contro le ROS e, in assenza di stress, la formazione e la rimozione dei radicali dell' O_2 è in equilibrio. In condizioni di forti stress, che determinano una iper-produzione di ROS, il sistema di difesa potrebbe andare incontro ad una totale inattivazione. La pianta riesce a far fronte all'incremento delle specie reattive dell'ossigeno grazie alla presenza di processi antiossidanti di natura enzimatica e non-enzimatica (Alscher e Hess, 1993). All'interno della cellula, la superossido dismutasi (SOD) costituisce la prima linea di difesa contro le ROS (Alscher *et al*, 2002). L'anione superossido (O_2^-) viene prodotto in tutti i compartimenti cellulari dove è presente un flusso elettronico, quindi nei mitocondri, nei cloroplasti, nei perossisomi e nei gliossisomi, nell'apoplasto e nel citosol (Elstner, 1991). Le SOD sono presenti nel citosol, nei cloroplasti, nei mitocondri e nello spazio extracellulare (Scandalios, 1997; Schinkel *et al.*, 1998). È stato dimostrato che i fosfolipidi di membrana sono impermeabili al passaggio dell' O_2^- (Takahashi e Asada, 1983), quindi diventa cruciale la presenza delle SOD al fine di rimuovere l'anione superossido nei compartimenti dove esso si è formato (Takahashi e Asada, 1983). Questo antiossidante catalizza il disproportionamento dell' O_2^- ad ossigeno molecolare e perossido di idrogeno attraverso le reazioni tipo Haber-Weiss metallo-catalizzate. Le SOD vengono suddivise in tre classi, a seconda del diverso ione metallico presente nel sito attivo: le SOD che contengono rame e zinco (Cu-Zn-SOD), ferro (Fe-SOD) o manganese (Mn-SOD). Le Fe-SOD sono presenti generalmente nei procarioti, ma recentemente è stata rilevata la loro presenza nei cloroplasti di alcune specie vegetali; le Mn-SOD si trovano nella matrice dei mitocondri, nei perossisomi e nelle cellule dei procarioti; le Cu-Zn-SOD nei cloroplasti, nel citosol e negli spazi extracellulari. Confronti effettuati sulle sequenze amminoacidiche delle tre differenti SOD suggeriscono che le Mn e le Fe-SOD siano quelle più antiche, dal punto di vista evoluzionistico, e che probabilmente, derivino da uno stesso enzima ancestrale. Le Cu Zn-SOD, invece, non presentano similarità di sequenza con le altre due e, probabilmente, si sono evolute separatamente negli eucarioti (Kanematsu e Asada, 1990; Smith e Doolittle, 1992). La separazione evoluzionistica delle tre SOD potrebbe essere spiegata con la differente disponibilità dei composti metallici di transizione solubili presenti nella biosfera, in relazione al contenuto di O_2 nell'atmosfera nelle diverse ere geologiche (Bannister *et al*, 1991).

A parte la Mn-SOD, le altre due SOD possono essere inibite dal loro stesso prodotto di reazione, il perossido d'idrogeno, in un intervallo millimolare di concentrazione. Nelle piante

sono presenti forme multiple (isoenzimi) della SOD; l'esistenza di forme multiple, la loro complessa localizzazione all'interno della cellula, la distribuzione tra tessuti ed organi e la variazione che essi possono subire durante lo sviluppo o in risposta a vari segnali, denota la presenza di ruoli metabolici distinti per ogni isoenzima delle SOD (Akkapeddi *et al.*, 1999). Per la caratteristica catalica unica presentata da questo enzima, capace di orientare ed attrarre il suo substrato verso il sito attivo (effetto Circe) e per l'assenza di mutanti nulli in tutte le piante analizzate ad oggi, si può affermare che le SOD svolgono un ruolo fondamentale nella difesa delle cellule contro gli stress ossidativi.

Il perossido d'idrogeno viene eliminato dalla catalasi (CAT) e dalle perossidasi (POD o GPX) (Asada, 1997; Scandalios *et al.*, 1997). La catalasi vegetale è normalmente presente nei perossisomi e nei gliossisomi, dove è preposta alla rimozione del perossido d'idrogeno che si forma durante la fotorespirazione (o dell' H_2O_2 che si forma dall'ossidazione degli acidi grassi nei gliossisomi). Nonostante la localizzazione specifica, la catalasi sembra svolgere un ruolo fondamentale nella difesa contro gli stress ossidativi visto, che l' H_2O_2 va incontro ad un'agevole diffusione attraverso le membrane (Willekens *et al.*, 1997). Va comunque ribadito che la funzione protettiva svolta dalla CAT è limitata, in primo luogo, proprio dalla sua specifica localizzazione, oltre che a causa della sua bassa affinità verso il substrato e della facile inattivazione indotta dalla luce. Infine, la catalasi è caratterizzata da un elevato turnover, che determina una spiccata velocità nel dismutare H_2O_2 in ossigeno ed acqua.

Le perossidasi, al contrario delle catalasi, hanno bisogno di un donatore di idrogeno per poter rimuovere il perossido di idrogeno. Questi antiossidanti costituiscono una numerosa famiglia di enzimi che contengono un gruppo eme e si ipotizza che siano coinvolti in numerosi processi fisiologici, sia in presenza di stress che in condizioni normali. Va ricordato, infatti, che le perossidasi svolgono un ruolo fondamentale nel processo di lignificazione, nella suberizzazione, nell'ossidazione e nella polimerizzazione dei fenoli solubili, nella degradazione della clorofilla, nei processi di senescenza e degradazione dell'auxina, ed infine nella formazione dell' H_2O_2 (Foyer *et al.*, 1997). Nei vegetali è possibile trovare sia perossidasi che hanno un'ampia specificità per il substrato che dona idrogeno, sia perossidasi che per svolgere la loro funzione hanno bisogno di un donatore specifico. Le prime normalmente sono localizzate nello spazio apoplastico.

Nell'ambito dello stress ossidativo una maggiore attenzione merita l'ascorbato perossidasi (APX), che rimuove l' H_2O_2 in diversi compartimenti cellulari (Asada, 1997). È possibile distinguere numerose isoforme dell'APX, differenti tra loro per proprietà molecolari e catalitiche. Isoforme sono presenti nel cloroplasto (nello stroma, sAPX), associate alle membrane tilacoidali (tAPX), nel citosol (cAPX) e legate alle membrane dei perossisomi e

dei gliossisomi. La sAPX del cloroplasto svolge un importante ruolo sia per eliminare l'ossigeno singoletto che deriva dalla riduzione dell'ossigeno molecolare lungo la catena fotosintetica di trasporto degli elettroni, sia nella rigenerazione degli antiossidanti legati alle membrane, come le xantofille e l' α -tocoferolo. L'APX, inoltre, rimuove l' H_2O_2 che viene prodotto dalla SOD, che agisce a monte attraverso la via di detossificazione ascorbato-glutatione. Questo processo di rimozione viene svolto unitamente alla GR (glutatione redattasi) e alla DHAR (deidroascorbato reduttasi). Fino a pochi anni fa si pensava che la glutazione perossidasi (GSHPOX), fondamentale enzima Se-dipendente coinvolto nella detossificazione dell' H_2O_2 negli animali, fosse del tutto assente nel mondo vegetale. Invece, diversi gruppi di lavoro, indipendentemente hanno isolato una sequenza cDNA vegetale avente stretta omologia con la sequenza della GSHPOX animale. La versione vegetale della glutazione perossidasi, che si pensa possa ridurre gli idroperossidi fosfolipidici a spese del GSH ridotto, anziché rimuovere H_2O_2 , sembra sia indotta in risposta a stress esterni (Criqui *et al.*, 1992; Sabeh *et al.*, 1993; Edwards, 1996; Sugimoto *et al.*, 1997; Depege *et al.*, 1998; Mullineaux *et al.*, 1998; Roeckel-Drevet *et al.*, 1998).

In tutte le condizioni il bilancio tra formazione ed eliminazione di ROS è fortemente controllato. In molti organismi è stato riportato che un'elevata capacità antiossidante intrinseca, oppure la capacità di modulare il sistema di difesa antiossidante, rappresentano un requisito per tollerare o bilanciare gli effetti nocivi dello stress ossidativo. Di conseguenza, diventano verosimili e plausibili le ipotesi secondo cui la tolleranza allo stress ossidativo potrebbe essere migliorata attraverso la manipolazione genetica della capacità antiossidante endogena delle piante (Herouart *et al.*, 1993; Rennenberg e Polle, 1994b; Badiani *et al.*, 1996d; Allen *et al.*, 1997; Noctor *et al.*, 1998).

1.5.4. Funzione antiossidante dei prodotti del metabolismo secondario

Le piante producono una vasta e diversificata gamma di composti organici che non sembrano avere una funzione diretta sulla crescita e sullo sviluppo, tali sostanze sono conosciute come prodotti o metaboliti secondari. A differenza dei prodotti primari, come la clorofilla, gli aminoacidi, i nucleotidi o i carboidrati semplici, quelli secondari non hanno ruoli riconosciuti nei processi di assimilazione, respirazione, trasporto e così via. Differiscono inoltre dai prodotti primari perché hanno una distribuzione circoscritta nel regno vegetale, cioè i metaboliti secondari si trovano tipicamente solo in una specie o in un gruppo di specie

vegetali tassonomicamente vicine, mentre i prodotti primari sono presenti in tutto il regno vegetale.

A partire dalla fine del 1960, molti prodotti secondari hanno dimostrato possedere importanti funzioni adattative nelle piante (Harborne, 1982), la più importante è la difesa dagli animali erbivori e dalle infezioni microbiche. Tali sostanze si sono rivelate utili nell'attrarre gli impollinatori e gli animali capaci di disperdere i frutti, ma anche nella competizione fra le piante (Croteau *et al.*, 2000). Recentemente è stato dimostrato che alcuni prodotti secondari possono essere coinvolti nei meccanismi di risposta a diversi stress di natura abiotica, incluso l'ozono.

I prodotti del metabolismo secondario possono essere suddivisi in tre gruppi, a seconda della loro via biosintetica: terpeni, fenoli e composti contenenti azoto (alcaloidi). I terpeni sono lipidi sintetizzati a partire dall'acetil CoA attraverso la via dell'acido mevalonico; i composti fenolici sono sostanze aromatiche che si formano in vario modo attraverso la via dell'acido scichimico o dell'acido malonico; gli alcaloidi vengono sintetizzati principalmente a partire da aminoacidi. L'azione di questi metaboliti, unitamente a quella esplicita dalle poliammine, potrebbe essere rilevante, in alcuni compartimenti cellulari, nel regolare risposte metaboliche per contrastare diverse situazioni di stress (Kandaswani e Middleton, 1994; Rice-Evans, 1995; Wise, 1995; Decker, 1997; Shen *et al.*, 1997; Yamasaki *et al.*, 1997).

1.5.4.1. Terpeni

I terpeni, o terpenoidi, costituiscono la classe più vasta di prodotti secondari. Le sostanze appartenenti a questa classe sono di solito insolubili in acqua e sono incluse nello stesso gruppo a causa della comune origine biosintetica. Tutti i terpeni derivano dall'unione di elementi a 5 atomi di carbonio aventi lo scheletro ramificato dell'isopentano. Gli elementi strutturali di base dei terpeni sono talvolta chiamati unità isopreniche, poiché i terpeni si possono decomporre ad alte temperature per dare l'isoprene. I terpeni sono classificati in base al numero delle unità a 5 atomi di carbonio che contengono (Croteau *et al.*, 2000), quelli più piccoli, che presentano una singola unità isoprenica, sono detti emiterpeni. Il più noto di questa classe è lo stesso isoprene, un prodotto volatile rilasciato da tessuti fotosinteticamente attivi di molte piante C3. I monoterpeni, contenenti 10 atomi di carbonio, sono stati i primi terpenoidi isolati e caratterizzati e, quindi, costituiscono l'unità su cui si basa la nomenclatura di queste sostanze. I composti che presentano 15 atomi di C sono detti sesquiterpeni, quelli con 20 atomi di C diterpeni. Numerosi terpeni hanno una funzione ben definita e specifica

nella crescita o nello sviluppo e, per questo, possono essere considerati metabolici primari più che secondari. Ad esempio, un sesquiterpene è un precursore dell'acido abscissico e il diterpene *ent*-kaurene è un intermedio nella sintesi delle gibberelline. Gli steroidi sono derivati triterpenici e sono componenti essenziali delle membrane cellulari, che stabilizzano interagendo con i fosfolipidi. I carotenoidi sono tetraterpeni che svolgono la funzione di pigmenti accessori nella fotosintesi e di protettori dei tessuti fotosintetici nei fenomeni fotoossidativi. Essi sono presenti in tutti i tessuti verdi e sono localizzati esclusivamente nei plastidi (Bartley e Scolnik, 1995; Frank e Cogdell, 1996; Rice-Evans *et al.*, 1997). Si possono distinguere due classi di carotenoidi nelle piante: i caroteni, che sono composti idrocarburici, e le xantofille, che contengono uno o più atomi di ossigeno. Le sostanze carotenoidi svolgono un ruolo fondamentale nei meccanismi di fotoprotezione. Se grandi quantitativi di energia radiante non sono assorbiti nel processo fotochimico, le membrane fotosintetiche possono facilmente danneggiarsi. Se lo stato d'eccitazione della clorofilla non viene rapidamente smaltito attraverso il suo trasferimento o nel processo fotochimico, può avvenire una reazione con l'ossigeno molecolare, che porta alla formazione dell'ossigeno singoletto. Quest'ultimo può danneggiare diversi composti cellulari, specialmente lipidici. I carotenoidi esercitano la loro funzione protettiva estinguendo lo stato eccitato della clorofilla; il carotenoide eccitato non possiede sufficiente energia per formare singoletti d'ossigeno e decade nel suo stato basale, liberando l'energia sotto forma di calore.

Le piante emettono nell'atmosfera alcuni terpenoidi volatili, l'emissione stimata di isoprene annua è rilevante, pari a circa 5×10^8 tonnellate di carbonio. I legami olefinici rendono i terpenoidi molto reattivi nell'atmosfera; essi reagiscono rapidamente con il radicale ossidrilico e con altri ossidanti, tra cui l'O₃. Bisogna ricordare che l'O₃, oltre a reagire con questi idrocarburi, è formato da queste molecole in presenza di ossidi di azoto (NO_x) e luce ultravioletta. Alcune ricerche hanno determinato che alcuni stress ambientali, come la siccità e le alte temperature, possono provocare un aumento della sintesi e della conseguente emissione di isoprenoidi (Sharkey e Loreto, 1993). Quindi è stata appurata l'ipotesi che i terpeni emessi dalle piante abbiano il ruolo di proteggere le foglie esposte a stress ambientali. Studi effettuati su piante forestali esposte ad elevate dosi di O₃, in presenza o assenza di isoprene, hanno fatto ipotizzare che i terpeni abbiano una generale funzione antiossidante, piuttosto che una azione protettiva nei confronti di uno stress ambientale specifico (Loreto *et al.*, 2001). Queste ricerche hanno evidenziato che le specie che non emettono isoprenoidi sono in genere più sensibili all'esposizione a dosi elevate di O₃ e che il danno può essere ridotto, o del tutto scongiurato, con fumigazioni di isoprene. È stato dimostrato, inoltre, che la protezione non si esplica attraverso la riduzione di O₃ assorbito, ma con la dispersione del gas

all'interno della foglia in seguito a reazioni chimiche. Si può affermare che questi isoprenoidi volatili possono avere una forte azione antiossidante e che la tolleranza ad altri tipi di stress abiotici sia da attribuire alla stessa azione detossificante. Infatti è stato dimostrato un accumulo ridotto di prodotti ossidativi e sostanze derivanti dalla denaturazione delle membrane nelle piante che emettono isoprene dopo esposizione all'O₃, mentre la soppressione della sintesi di isoprene determina un incremento nella concentrazione di tali sostanze (Loreto *et al.*, 2001).

1.5.4.2. Composti fenolici

Le piante producono molti prodotti secondari contenenti un gruppo fenolico, cioè un ossidrile legato ad un anello aromatico, queste sostanze sono classificate come composti fenolici. I composti fenolici rappresentano un gruppo chimicamente eterogeneo: alcuni sono solubili solo in solventi organici, altri sono acidi carbossilici e glucosidi solubili in acqua o sono polimeri insolubili di grandi dimensioni.

Le caratteristiche chimiche dei fenoli determinano i loro ruoli funzionali nella pianta. Essi possono avere funzioni di difesa contro erbivori e patogeni, di sostegno meccanico, di attrazione per gli impollinatori, di inibitori di crescita sulle piante in competizione che crescono in prossimità della pianta che li produce. Le classi di composti fenolici secondari vegetali derivano principalmente dal metabolismo della fenilalanina e della tiroxina; il passaggio chiave in queste sintesi è la conversione della fenilalanina in acido cinnamico per eliminazione di una molecola di ammoniaca. Questa reazione è catalizzata dalla fenilalanina ammonio-liasi (PAL), un importante enzima regolatore del metabolismo secondario. L'attività della PAL nelle piante è influenzata da numerosi fattori esterni e interni come gli ormoni, la disponibilità di elementi nutritivi, la luce, le infezioni fungine e le ferite. L'attacco fungino induce la trascrizione di mRNA della PAL, incrementando la sintesi dell'enzima nella pianta e stimolando quindi la produzione di composti fenolici.

Una delle classi più vaste di fenoli vegetali è quella dei flavonoidi, che presentano uno scheletro carbonioso di 15 atomi disposti a formare una struttura costituita da due anelli aromatici collegati da un ponte a tre atomi di C. I flavonoidi vengono classificati in gruppi diversi sulla base del grado di ossidazione del ponte a tre atomi di carbonio. I più importanti sono: le antocianine, i flavoni, i flavonoli e gli isoflavoni. Alcuni studi hanno dimostrato un elevato accumulo di antocianine e di vari isoflavonoidi durante lo sviluppo di lesioni necrotiche indotte da ozono (Langerbatels *et al.*, 1997). È noto che diversi flavonoidi

costitutivi ed inducibili agiscono come sistemi efficienti per eliminare alcuni radicali pericolosi e potrebbero svolgere un ruolo importante nel rimuovere i radicali prodotti da O₃. In studi effettuati su piantine di pino esposte a fumigazione di ozono di varia durata, è stata rilevata un'induzione O₃-dipendente di stilbeni; un'esposizione di circa otto ore stimolava in modo rilevante l'attività della PAL e della stilbene sintasi (STS). L'attività della calcione sintasi (CHS), enzima principale della sintesi dei flavonoidi che compete per gli stessi substrati con STS, aumentava subito dopo. I livelli di attività di PAL e CHS nelle piante controllo erano più bassi rispetto a quelli rilevati nelle piante trattate, mentre era assente l'attività della STS (Schraudner *et al.*, 1997). Sembra, quindi, che classi ben definite di composti fenolici rispondano in modo specifico all'O₃.

Per quanto riguarda i flavoni e i flavonoli, si è ipotizzato che queste classi di composti proteggano le cellule da un eccesso di radiazioni UV, grazie alla loro capacità di assorbire fortemente nella regione UV, lasciando passare le lunghezze d'onda comprese nel visibile (Caldwell *et al.*, 1983).

Negli ultimi anni è stato riconosciuto il ruolo degli isoflavonoidi come fitoalessine, composti antimicrobici che si accumulano in concentrazioni elevate in risposta ad infezioni batteriche o fungine, limitando la diffusione dei patogeni invasori. Le fitoalessine posseggono numerose e interessanti caratteristiche: 1) prima dell'infezione non sono di solito rilevabili nella pianta; 2) sono sintetizzabili molto rapidamente nell'arco di poche ore dall'attacco esterno; 3) la loro formazione è circoscritta alla regione specifica intorno al sito d'infezione. Alcuni studiosi hanno suggerito l'ipotesi che le fitoalessine siano generici metaboliti vegetali da stress, poiché la loro sintesi può essere indotta da fattori diversi da quelli di natura biotica. Stress come le ferite, il congelamento, elevati livelli di luce UV, l'applicazione di fungicidi o di sali di diversi metalli pesanti e l'esposizione all'ozono possono indurre la produzione di fitoalessine. Poiché le fitoalessine sono tossiche per molti erbivori e patogeni, esse possono essere utili alle piante come difese aspecifiche da stress di varia natura.

1.5.5. Poliammine

Le poliammine derivano dalla L-arginina e sono presenti in tutti gli organismi viventi. Solo recentemente è stata confermata l'importanza del loro ruolo nella fisiologia delle piante (Crozier *et al.*, 2000). Esiste una stretta correlazione tra concentrazione di poliammine e frequenza di divisioni cellulari, inoltre, ed è stato dimostrato un effetto induttivo su diverse reazioni di sintesi di DNA, RNA e proteine. Questi composti possono interagire con le

gibberelline ed altri ormoni nel controllo della crescita e dello sviluppo delle piante superiori (Crozier *et al.*, 2000). Infine, sembra siano indotte da un'ampia gamma di agenti di stress ossidativi, dei quali potrebbero contrastare gli effetti negativi (Podila *et al.*, 2001). Nei vegetali le poliammine si trovano sia sotto forma di ammine libere, che di coniugati amidici di acidi idrossicinnamici, come gli acidi ferulico, caffeico e para-cumarico (composti fenolici). Questi composti coniugati svolgono importanti funzioni nello sviluppo di fiori, semi e frutti, oltre ad intervenire nella risposta ipersensibile alle infezioni microbiche (Crozier *et al.*, 2000). Alcuni studi hanno avvalorato un coinvolgimento delle poliammine nei meccanismi di difesa delle piante contro l'ozono; infatti la sintesi dei composti arginina-derivati aumenta in seguito ad esposizione all'O₃ sia in piante erbacee che arboree (Tuomainen *et al.*, 1996; Langerbatels *et al.*, 1997), mentre si osserva la riduzione dei danni da ozono somministrando poliammine esogene (Ormrod e Beckerson, 1986).

Le poliammine spermidina e spermina, insieme al loro precursore putrescina, sono ubiquitarie nel regno vegetale (Smith, 1985). In specie forestali, è stato dimostrato che l'accumulo di putrescina e della sua forma coniugata fortemente indotto in piantine trattate con O₃. Perciò si ritiene che le poliammine possano far parte del complesso sistema, comprendente anche i composti fenolici che interviene nella difesa dei vegetali dallo stress da O₃ (Langerbatels *et al.*, 1997; Maccarone *et al.*, 1997; Welburn e Welburn, 1997). Diversi studi hanno riguardato l'attività dell'arginina decarbossilasi (ADC), l'enzima che catalizza la sintesi delle poliammine. È stata osservata una correlazione tra esposizione all'ozono, induzione dell'attività dell'ADC e contenuto di poliammine. I trattamenti con l'O₃, oltre ad incrementare l'attività della ADC, determinavano la riduzione dell'attività della diammina ossidasi, l'enzima che catalizza la deaminazione ossidativa dei gruppi amminici terminali nel catabolismo delle poliammine. Queste informazioni potrebbero avvalorare ulteriormente l'ipotesi che putrescina, spermidina e spermina vengano prodotte in maggior quantità nelle piante sottoposte a condizioni di stress da ozono (Health e Taylor, 1997; Langerbatels *et al.*, 1997). Nonostante gli importanti ruoli svolti nella fisiologia vegetale, il meccanismo d'azione delle poliammine non è ancora del tutto chiaro.

Alcuni studi hanno proposto che le poliammine libere possano agire da elementi di rimozione dei radicali liberi dell'ossigeno (Drolet *et al.*, 1986); secondo altri, le poliammine coniugate con gli acidi idrossicinnamici rappresenterebbero il principale meccanismo protettivo nei confronti della iper-produzione di ROS O₃-indotte (Bors *et al.*, 1989). La sintesi delle poliammine può competere con la via di produzione dell'etilene, infatti la S-adenosil-metionina (SAM) risulta essere un precursore comune, quindi non si può escludere che l'inibizione della sintesi di un composto possa promuovere la sintesi dell'altro. L'etilene O₃-

indotto potrebbe amplificare gli effetti dell'ozono, mentre le poliammine O₃-indotte potrebbero limitare tali effetti come conseguenza del loro ruolo protettivo. A tal proposito, sono stati effettuati alcuni studi sulle varietà di tabacco Bell W3, O₃-sensibile, e Bell B, O₃-tollerante. La varietà sensibile, in condizioni di stress da ozono, produce elevate quantità di etilene, mentre nella varietà tollerante Bell B si osservano maggiori quantità di poliammine, a scapito dell'etilene. La ridotta sintesi dell'etilene, che svolge un ruolo fondamentale nella produzione di ROS e nel regolare lo sviluppo dei meccanismi che portano alla PCD, e l'elevata produzione di poliammine, che possono fungere da agenti di rimozione delle ROS, possono rappresentare due dei meccanismi che intervengono nel determinare la tolleranza in Bell B rispetto a Bell W3.

Un recente studio effettuato da Navakouidis *et al.* (2003) ha evidenziato che la forma associata ai tilacoidi di putrescina potrebbe essere la poliammina più importante nei meccanismi coinvolti nella protezione dell'apparato fotosintetico contro i danni prodotti da esposizione a ozono. Nella cv. Bell W3 non si osserva l'aumento del contenuto di poliammine endogene, principalmente di putrescina, in seguito alla somministrazione di 180 ppb di O₃ per 5h. Il trattamento determina la riduzione dell'efficienza fotosintetica, che si traduce in una riduzione della biomassa finale. Se il tempo d'esposizione è prolungato, si osserva la comparsa di lesioni necrotiche, ma solo nella cv. sensibile Bell W3. Somministrando putrescina esogena si osserva una netta riduzione degli effetti negativi dovuti al gas, inoltre nel genotipo O₃-sensibile la forma associata ai tilacoidi aumenta fino a raggiungere livelli che sono caratteristici di quello O₃-tollerante. Applicazioni esogene di un inibitore specifico della sintesi della putrescina, l'1,4-diammino-butanone (1,4-DB), al genotipo tollerante Bell B, lo rende suscettibile al trattamento con O₃, in quanto viene inibita la possibilità di sintetizzare putrescina associata ai tilacoidi. Sulla base di questi risultati si può ipotizzare un nuovo ed importante ruolo svolto dalle poliammine nel proteggere l'apparato fotosintetico da condizioni di stress ossidativo.

1.6. Produzione di ROS indotta O₃

La formazione delle ROS, prodotte dal processo di dissoluzione dell'O₃ nell'apoplasto, provoca la loro endogena ed attiva autopropagazione quando viene sovrastata la capacità antiossidante apoplastica. Questa attiva cascata ossidativa, che continua anche quando è terminata l'esposizione all'O₃, è simile a quella osservata nella risposta di ipersensibilità (HR) dovuta a fattori biotici (Schraudner *et al.*, 1998; Rao e Davis, 1998;

Overmyer *et al.*, 2000) e si può considerare un fattore essenziale nel processo conosciuto come morte cellulare programmata (PCD). Il coinvolgimento della PCD nella formazione di lesioni dovute all'ozono è ampiamente accettato (Beers e Mc Dowell, 2001; Rao e Davis, 2001; Berger, 2002), sebbene le sue caratteristiche morfologiche e biochimiche siano state analizzate solo in tabacco (Pasqualini *et al.*, 2003) e *Arabidopsis* (Overmyer *et al.*, 2005). Le similitudini esistenti tra HR e formazione delle lesioni da O₃ sono evidenti nella cultivar di tabacco O₃-sensibile Bel-W3 è stata rilevata un'accentuata cascata ossidativa bifasica simile sia nella risposta all'O₃, sia durante l'HR, ma la cultivar tollerante Bel B ha manifestato un discreto aumento solo nella prima fase di produzione endogena di radicali (Schraudner *et al.*, 1998). Una simile produzione attiva bifasica delle ROS è stata osservata in genotipi di *Arabidopsis* sensibili all'ozono, in betulla (*Betula pendula*), nel pomodoro e in genotipi di *Rumex* e di *Malva*, mentre i genotipi tolleranti hanno mostrato soltanto un burst iniziale di formazione delle ROS (Pellinen *et al.*, 2002; Wohlgemuth *et al.*, 2002). Le analogie tra i sintomi provocati dall'ozono e dalla risposta ipersensibile ai patogeni e tra i meccanismi biochimici e molecolari che li determinano fanno considerare l'ozono come un elicitore abiotico capace di simulare risposte di difesa della pianta (Kangasjärvi *et al.*, 1994; Sharma *et al.*, 1996; Sandermann *et al.*, 1998; Rao *et al.*, 2000a), attivare le cascate molecolari provocate dalla la formazione apoplastica delle ROS e di indurre l'espressione genica e la morte cellulare.

Vari studi hanno dimostrato che la produzione delle ROS nei cloroplasti è un meccanismo fondamentale nell'acclimatazione delle piante ai diversi stress abiotici (Karpinski *et al.*, 1999; Mullineaux e Karpinski, 2002). Considerando il ruolo svolto dalle ROS prodotte nei cloroplasti nel segnalare eventuali danni sia da ferita che da elevate intensità di luce (Fryer *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2004), è verosimile che i cloroplasti siano coinvolti nelle risposte della pianta all'O₃, e negli altri processi cellulari che coinvolgano le ROS o le segnalazioni redox. In *Arabidopsis* la produzione delle ROS O₃-indotte si osserva, inizialmente, nei cloroplasti delle cellule di guardia degli stomi e, successivamente, si diffonde nelle cellule contigue (Joo *et al.*, 2005). Utilizzando un inibitore del trasporto di elettroni del cloroplasto, il DCMU [3-(3',4'-diclorofenil)-1,1-dimetilurea] si realizza la soppressione della produzione cloroplastica iniziale delle ROS, senza che avvenga, però, il blocco della produzione delle ROS nel citoplasma e nelle membrane delle cellule di guardia.

Il DCMU è in grado, inoltre, di sopprimere il picco ritardato di produzione delle ROS nelle cellule adiacenti alle cellule di guardia. Il burst ossidativo iniziale osservato nei cloroplasti richiedeva la segnalazione attraverso la proteina G eterotrimerica (o complesso Gβγ) ed era

distingubile dall'attivazione $G\alpha$ -mediata delle NADPH ossidasi associate alla membrana plasmatica, indispensabile per la segnalazione intercellulare per la morte cellulare.

In seguito si è stato dimostrato che il passaggio del segnale di stress ai cloroplasti è reso possibile da un segnale originato nell'apoplasto e successivamente percepito nel cloroplasto. Infatti, il burst ossidativo si attivava nei cloroplasti delle cellule di guardia anche quando le NADPH ossidasi erano eventualmente assenti o inibite. L'aver verificato l'esistenza di un processo di regolazione negativa di molti geni nucleari codificanti per proteine del cloroplasto, ha fornito un'ulteriore prova sulla connessione dei cloroplasti alle risposte della pianta esposte a O_3 ed al nuovo equilibrio raggiunto con la modificata condizione redox (Mahalingam *et al.*, 2005).

Per molto tempo si è ritenuto che una NADPH-ossidasi fosse la più importante fonte di ROS prodotte durante lo sviluppo della cascata ossidativa nella HR. Utilizzando un inibitore delle NADPH ossidasi, il DPI (Diphenyleneiodonium), si è potuto osservare la riduzione dell'estensione dei sintomi da esposizione ad ozono in *Arabidopsis*, pomodoro e *Malva sylvestris* (Rao & Davis, 1999; Overmyer *et al.*, 2000; Wohlgemuth *et al.*, 2002). In pomodoro, tabacco e in betulla (*Betula pendula*) l'inibitore DPI influenza anche la produzione di H_2O_2 indotta da O_3 (Pellinen, Palva & Kangasjärvi, 1999; Wohlgemuth *et al.*, 2002); infatti, il superossido formato dalla NADPH-ossidasi verrà dismutato, in modo spontaneo o tramite l'azione delle SOD, a H_2O_2 . L'attivazione della NADPH ossidasi da parte di O_3 è proteina G-dipendente (Joo *et al.*, 2005). Il primo picco del burst ossidativo bifasico indotto da O_3 , osservato nelle piante wild-type di *Arabidopsis*, mancava quasi del tutto nei mutanti per la subunità α e β della proteina G. La produzione tardiva delle ROS nelle cellule adiacenti le cellule di guardia era normale nelle piante che erano prive della subunità $G\beta$, ma era assente nelle piante senza subunità $G\alpha$, dimostrando che l'accumulo delle ROS nelle cellule contigue era dovuto alle ROS extracellulari prodotte dalle NADPH ossidasi delle cellule di guardia, codificate dai geni *ATRBOHF* e *ATRBOHD* (Joo *et al.*, 2005). Analogamente in tabacco l' O_3 attivava il gene *NtrbohF*, che codifica per una NADPH ossidasi (Langebartels *et al.*, 2002b). Langebartels *et al.* (2002b) hanno dimostrato che l'accumulo di H_2O_2 nell'apoplasto di tabacco, dopo esposizione all' O_3 , è il risultato della dismutazione a H_2O_2 del superossido generato dalla NADPH ossidasi. Oltre alle NADPH ossidasi, le perossidasi della parete cellulare e le ossalato ossidasi sono state proposte come fonti possibili delle ROS (Lamb e Dixon, 1997; Bolwell *et al.*, 2002).

Come già descritto, le NADPH-ossidasi sono associate alla membrana plasmatica, dove svolgono la loro normale attività, però si è osservato un accumulo rapido di H_2O_2 indotto da O_3 anche nella parete cellulare di betulla esposta all'ozono (Pellinen *et al.*, 1999). Questo

suggerisce l'esistenza di due diverse fonti di H_2O_2 indotte da O_3 . In *Arabidopsis* e in betulla si è osservata anche una produzione citoplasmatica e mitocondriale di H_2O_2 durante le ultime fasi della morte cellulare (Pellinen *et al.*, 1999; Joo *et al.*, 2005). In prove di campo di lunga durata con esposizione a dosi elevate di ozono è stata rilevata l'importanza dell'accumulo delle ROS sia nei compartimenti apoplastici che simplastici. È stato accertato che la produzione cellulare di H_2O_2 è presente in genotipi sensibili all' O_3 di pioppo tremulo (*Populus tremuloides*) e di betulla (*Betula pendula*) (Oksanen *et al.*, 2003). Tutti gli esperimenti effettuati, sia controllati che in campo, mostrano che nella produzione delle ROS indotta da O_3 sono coinvolti numerosi e complessi meccanismi biochimici e molecolari.

1.6.1. Attivazione indotta da O_3 delle MAPK

Nell'ambito della regolazione ormonale dello sviluppo e del contenimento delle lesioni, sembrano fondamentali il ruolo e la funzione svolti dalle MAP chinasi nelle piante esposte all' O_3 . Le cascate di MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) rappresentano un sistema di trasduzione del segnale conservato in tutti gli eucarioti ed è ben dimostrata la loro importanza anche nelle piante (Jonak *et al.*, 2002; Baier *et al.*, 2005). La struttura universale di questo sistema di segnalazione consiste di una MAP chinasi chinasi chinasi (MAPKKK) che fosforila una MAP chinasi chinasi (MAPKK) la quale, a sua volta, fosforila una MAP chinasi (MAPK). Nel genoma di *Arabidopsis* sono presenti 20 MAPK, ma solo due, AtMPK6 ed AtMPK3, sono correlate allo stress ossidativo. Stress di diversa natura, tra questi l'ozono, inducono i geni che codificano per queste chinasi e per i loro ortologhi in tabacco (SIPK e WIPK) (Samuel, Miles e Ellis 2000; Samuel e Ellis 2002; Ahlfors *et al.*, 2004b; Joo *et al.*, 2005). Alcuni studi hanno permesso di dimostrare che AtMPK6/SIPK ed AtMPK3/WIPK sono anche attivati dal perossido di idrogeno e dal superossido (Kovtun *et al.*, 2000; Samuel *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2003). Oltre ad essere attivati dalle ROS, AtMPK6 ed AtMPK3 di *Arabidopsis* sono attivati anche da AtMKK4 ed AtMKK5, geni costitutivi codificanti MAPKK, che determinano la produzione endogena di perossido di idrogeno e la morte cellulare (Ren, Yang e Zhang, 2002). L'esposizione della pianta all'ozono determina la rapida attivazione di AtMPK3 e AtMPK6, anche se differisce il tipo di regolazione della loro attività. La AtMPK3 è sovraregolata dall'ozono a livello trascrizionale, traduzionale e post-traduzionale, la AtMPK6 è invece caratterizzata da una attivazione post-traduzionale della sua attività chinastica (Ahlfors *et al.*, 2004b). In un recente lavoro Samuel ed Ellis (2002) hanno appurato che sia la soppressione che la sovraespressione di SIPK del tabacco (ortologo di

AtMPK6) provocano una aumentata sensibilità della pianta all'O₃ unitamente ad alcune modificazioni nell'espressione di APX e GST. Questa ricerca ha dimostrato che la sensibilità della pianta all'ozono e l'espressione dei geni antiossidanti sono influenzate da queste categorie di chinasi. Inoltre è stato osservato che SIPK sembra coinvolta nella regolazione dell'attività di WIPK (ortologo di AtMPK3), infatti l'attività di WIPK indotta da O₃ presentava una riduzione significativa nelle linee con sovraespressione di SIPK, mentre nelle linee caratterizzate dalla soppressione di SIPK l'attività di WIPK aumentava (Samuel e Ellis, 2002). L'attivazione delle MAP chinasi per fosforilazione conduce, normalmente, alla localizzazione nucleare e all'attivazione dei fattori di trascrizione mediante MAPK. AtMPK3 e AtMPK6 fosforilate, infatti, vengono trasferite rapidamente nel nucleo, entro 30 minuti dall'inizio dell'esposizione all'O₃ (Ahlfors *et al.*, 2004b).

In figura 1.8 sono mostrate le possibili interazioni e funzioni delle diverse MAPK presenti nelle piante.

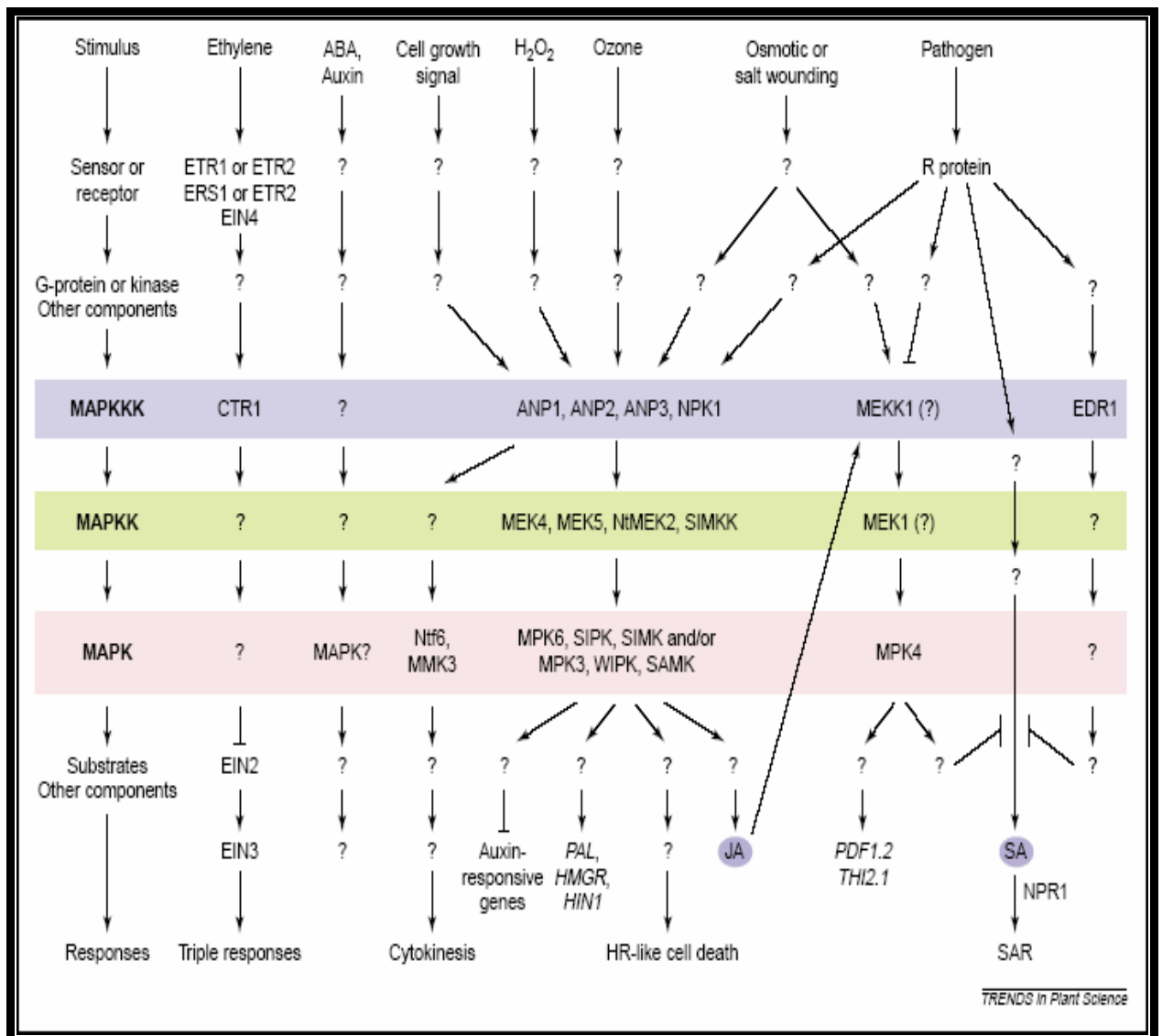


Fig. 1.8 – Possibili funzioni delle diverse cascate di MAPK nelle piante.

1.7. Regolazione ormonale della formazione delle lesioni indotte da O_3

La propagazione sia della HR che delle lesioni O_3 -indotte sembra essere sotto il controllo ormonale della pianta. I differenti ormoni e le loro interazioni regolano la produzione di ROS e rendono competente la cellula nel percepire e reagire ai segnali indotti dalle ROS. In quadro d'insieme si può affermare che le ROS, l'acido salicilico (SA) e la morte cellulare agiscono secondo una sorta di autoamplificazione nel regolare la PCD. L'etilene (ET) permette l'ulteriore accumulo di ROS che determina la morte cellulare, secondo alcuni Autori, infatti, l'ET svolgerebbe un ruolo fondamentale come regolatore nella

PCD (Rao *et al.*, 2002). L'acido jasmonico (JA), infine, sembra coinvolto nel contenimento della propagazione delle lesioni (Overmyer, Broschè e Kangasjarvi, 2003). Il ruolo di ABA nella regolazione dell'apertura degli stomi e dell'afflusso di O₃ è stato discusso in precedenza. L'etilene e l'acido salicilico sono necessari per lo sviluppo delle lesioni visibili di O₃, mentre l'acido jasmonico interviene per limitare e contenere la diffusione delle lesioni. Ciò è anche dimostrato dal fatto che i mutanti e le accessioni di *Arabidopsis* e di altre specie, inizialmente descritte come O₃-sensibili, sono risultate essere o parzialmente insensibili al JA (mutanti di *Arabidopsis oji1*, *rcd1*, ecotipo Cvi-0, clone Ne-388 di pioppo), o iper-produttori di etilene (mutanti *rcd1* e *oji1* ed ecotipi Ws e Kas-1 di *Arabidopsis*) (Koch *et al.*, 2000; Overmyer *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2000b; Kanna *et al.*, 2003; Tamaoki *et al.*, 2003a).

Lo sviluppo lineare dei tre processi, cioè l'inizio, la propagazione ed il contenimento delle lesioni indotte da O₃, che si osservano dopo il controllo stomatico, il meccanismo antiossidante apoplastico e la percezione delle ROS, potrebbe essere dovuto ad un meccanismo auto-amplificante, a cui si dà il nome di ciclo ossidativo di morte cellulare (mostrato in fig. 1.9) (Van Camp, Van Montagu e Inzé, 1998; Overmyer *et al.*, 2000; 2003). In questo ciclo, la morte cellulare determinata dalla produzione di ROS O₃-indotta è etilene dipendente (Overmyer *et al.*, 2003; Kanna *et al.*, 2003). La produzione di ROS conduce ad una morte cellulare SA-dipendente ed il processo continua fino a quando il terzo componente del ciclo, l'acido jasmonico, antagonista della propagazione della lesione, non interviene nel contenere l'allargamento della lesione stessa.

Le proteine chinasi mitogeno-attivate (MAPK) sono connesse sia alla produzione di ROS, che allo sviluppo della morte cellulare (Kovtun *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2002) e il coinvolgimento delle stesse in processi-segnali indotti da ET, SA e ABA è stato dimostrato in differenti contesti (Zhang e Klessig, 1997; Kim *et al.*, 2003; Ouaked *et al.*, 2003; Xiong e Yang, 2003). Il problema di come gli ormoni vegetali regolino il segnale indotto dalle MAPK nella morte cellulare indotta da O₃, o viceversa, è stato analizzato da Ahlfors *et al.* (2004b). In questa ricerca è stato dimostrato che l'attivazione iniziale ozono-indotta di AtMPK6 e di AtMPK3 era indipendente o avveniva a monte del segnale dato da SA, ET e JA e che il pattern di attivazione era simile in mutanti che erano deficitari delle rispettive cascate. Comunque gli ormoni sono intimamente connessi con le MAPK dato che l'attivazione della AtMPK6 si prolungava, mentre quella della AtMPK3 veniva ritardata in mutanti *etr1* etilene-insensibili. Inoltre il livello di espressione basale della AtMPK3 era dimezzato rispetto a quello osservato nelle accessioni wild-type insensibili all'SA o prive di SA. Questi risultati confermano la stretta relazione esistente tra sintesi dell'ormone, segnalazione ozono-indotta e cascata delle MAPK.

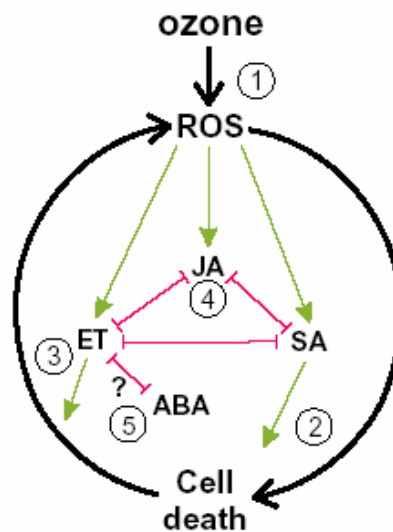


Fig. 1.9 - Il ciclo ossidativo della morte cellulare - I radicali derivanti dall'ozono inducono la produzione endogena di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (1), che causano l'accumulo di acido salicilico (SA) e la morte cellulare programmata (PCD) (2). La PCD attiva la produzione di etilene (ET), che è richiesta per la continuazione della produzione delle ROS necessaria per la propagazione della morte cellulare (3). I jasmonati contrastano la progressione del ciclo contrapponendosi all'azione dell'SA e dell'etilene, che promuovono la morte cellulare (4). L'acido abscissico (ABA) si oppone all'azione dell'etilene in molte situazioni e potrebbe anche avere questo ruolo nella morte cellulare ozono-indotta (5). Le interazioni mutuamente antagonistiche fra etilene, SA e acido jasmonico (JA) sono indicate con le barre rosse.

1.7.1. Comparsa delle lesioni indotte da O₃

Numerosi lavori hanno dimostrato che l'esposizione all'ozono determina la morte di un piccolo numero di cellule, questo fenomeno è visibile a livello microscopico anche in piante resistenti (Overmyer *et al.*, 2000). In prove effettuate su piante di tabacco esposte all'O₃ per più giorni consecutivi, il numero di lesioni era determinato durante il primo giorno. Esponendo successivamente le stesse piante al gas si notava semplicemente un'espansione delle lesioni preesistenti, senza che se ne producessero altre ex-novo (Wohlgemuth *et al.*, 2002). Le lesioni non sono distribuite a caso lungo la foglia, ma sono localizzate in modo preferenziale in prossimità delle regioni internodi di secondo e terzo livello (Schraudner *et al.*, 1998; Wohlgemuth *et al.*, 2002). Nel caso della SAR (resistenza sistemica acquisita), un'analogia morte di un piccolo numero di cellule ROS-dipendente è localizzata nella zona

internervale. Questa, che è definita micro-HR, sembra sia essenziale ai fini dello sviluppo della SAR (Alvarez *et al.*, 1998). Nelle foglie con sintomi sistemici, la morte cellulare costituisce la risposta ad un segnale trasmesso dalle cellule in contatto con il patogeno (nel caso di interazione pianta-fattore biotico), al fine di circoscrivere l'infezione al punto in cui è avvenuto il contatto, impedendone l'espansione ai tessuti circostanti. Ciò è in contrasto con quanto si osserva nelle prime foglie infettate dal patogeno, in cui le cellule intorno al sito d'infezione primario vanno incontro a PCD, il cui instaurarsi risulta da un segnale non identificato, che proviene dalle cellule morte nel sito d'inizio dell'infezione. Tutto ciò solleva la questione di come la formazione delle lesioni O₃-indotte possa sfruttare lo stesso processo e, quindi, se il numero limitato di cellule morte nelle foglie di piante O₃-tolleranti sia determinato da micro-HR analoga a quella delle foglie sistemiche, e se lo sviluppo delle lesioni in piante O₃-sensibili sia riconducibile all'espansione delle lesioni HR-indotte nelle prime foglie delle piante infettate dal patogeno (Kangasjärvi *et al.*, 2005). Nelle piante è ben conosciuto il ruolo svolto, che sembra sia essenziale, dall'acido salicilico (SA) nello sviluppo della SAR (Raskin, 1995; Hoeberichts e Woltering, 2002). La sua presenza è richiesta anche per la morte cellulare HR-simile (Durner, Shah e Klessing, 1997). In piante esposte all'ozono, o all'attacco di un patogeno, si osserva la sintesi di SA entro poche ore dopo l'inizio dell'esposizione (Örvar *et al.*, 1997). Il ruolo dell'SA è stato dimostrato grazie a studi effettuati su piante transgeniche, piante NahG SA-degradanti e mutanti di *Arabidopsis npr1* SA-insensitive. Queste ricerche hanno dimostrato che la morte cellulare O₃-indotta non avviene in assenza dell'azione di SA (Örvar *et al.*, 1997; Rao e Davis, 1999; Overmyer *et al.*, 2005). In altri lavori si è visto che applicazioni esogene di SA incrementano in modo significativo la sensibilità all'ozono, anche in piante che normalmente sono tolleranti (Rao *et al.*, 2000a; Mazel e Levine, 2001). Analisi di mutanti doppi di *Arabidopsis* hanno indicato che accessioni O₃-sensibili diventano tolleranti quando il transgene NahG o una mutazione del gene al locus *npr1* sono introdotti nel background di partenza (Örvar *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 2000a; Overmyer *et al.*, 2005). In definitiva si può affermare che l'acido salicilico svolge un ruolo centrale nello sviluppo della morte cellulare e che senza di esso non si osserva un'attiva PCD in piante esposte ad ozono. Rao e Davis (1999) hanno dimostrato che inibendo l'accumulo di SA in piante esposte all'ozono si osserva una morte cellulare dovuta, probabilmente, a necrosi o ad una PCD HR-simile, in relazione alla durata dell'esposizione. Con esposizioni di breve durata, piante di *Arabidopsis* NahG SA-deficienti erano molto più tolleranti all'O₃ rispetto alle piante wild-type, mentre con esposizioni di lunga durata le piante NahG sviluppavano lesioni necrotiche senza che fosse coinvolta la produzione di superossido, che normalmente si osserva nelle lesioni derivanti da esposizioni all'O₃ di breve durata. La

morte cellulare per necrosi si potrebbe interpretare come il risultato di una graduale diminuzione della capacità antiossidante, che porterebbe in primo luogo ad un drastico cambiamento dello stato redox cellulare e poi alla morte della cellula stessa. Quindi l'SA svolgerebbe un ruolo importante sia come attivatore del sistema antiossidante durante lo sviluppo delle lesioni, sia di protezione quando la concentrazione di SA aumenta durante lo sviluppo della lesione (Kangasjärvi, Jasper e Kollist, 2005).

È possibile che, in determinate condizioni, l'O₃ possa anche danneggiare direttamente le strutture cellulari causando la morte della cellula. È stato suggerito che la morte cellulare dovuta o alla cascata ossidativa o alla PCD possa dipendere dalla concentrazione dell'ozono (Pell *et al.*, 1997). Questo fa pensare che nei tessuti esposti ad O₃ potrebbero verificarsi contemporaneamente danni dovuti alla PCD e alla necrosi cellulare. I segnali emessi dalle cellule necrotiche a causa delle ROS, prodotte dalla dissoluzione dell'ozono, potrebbero, infatti, scatenare la morte per PCD delle cellule adiacenti. Questi eventi determinano sia la formazione che la propagazione lesioni visibili (Kangasjärvi, Jasper e Kollist, 2005). La propagazione delle lesioni è un processo etilene-dipendente ma è stato suggerito che la sintesi dell'ET O₃-indotta possa essere SA-dipendente (Rao, Lee e Davis, 2002). Non è stato del tutto chiarito, comunque, se la ridotta sintesi di ET nelle piante NahG o in quelle *npr1* sia dovuta alla regolazione diretta operata dall'SA, oppure dipenda da una limitata morte cellulare derivante dall'assenza di SA.

1.7.2. Propagazione delle lesioni

La produzione di etilene indotta da stress è strettamente collegata ai danni da ozono in diverse specie (Tingey, Standley e Field, 1976; Mehlohorn e Wellburn, 1987; Overmyer *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2002) ed è stato dimostrato che la propagazione delle lesioni O₃-indotte è sotto il controllo dell'etilene (Overmyer *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2000a, 2002; Moeder *et al.*, 2002; Kanna *et al.*, 2003; Tuominen *et al.*, 2004). La sintesi di etilene è una delle risposte più rapide che si osservano in piante esposte all'O₃ (Tuominen *et al.*, 1997; Vahala, Schlagnhauser e Pell, 1998; Overmyer *et al.*, 2000) ed è da collegarsi con lo sviluppo della morte cellulare (Langebartels *et al.*, 1991; Tuominen *et al.*, 1997; Tamaoki *et al.*, 2003a). In *Arabidopsis*, i mutanti ET-insensibili (*etr1*, *ein2*, *ein3*) sono tolleranti all'ozono; anche alberi transgenici di betulla (*Betula pendula*), che esprimono il gene del recettore dell'etilene di *Arabidopsis* che porta la mutazione dominante *etr1-1*, oltre a presentare insensibilità all'ET, sono più tolleranti all'O₃ rispetto al clone di controllo (Vahala *et al.*, 2003). In alcuni mutanti

di *Arabidopsis* (*eto1*, *eto2*, *eto3*), caratterizzati dalla sovrapproduzione di etilene, la propagazione della lesione è aggravata dall'aumentata sintesi dell'etilene. Sembra inevitabile attribuire all'etilene un ruolo importante nella promozione della morte cellulare da PCD ROS-dipendente (de Jong *et al.*, 2002; Overmyer *et al.*, 2003).

La biosintesi dell'etilene è regolata attraverso la produzione del suo immediato precursore, l'acido 1-amminociclopropan-1-carbossilico (ACC), sintetizzato mediante la ACC sintetasi (ACS) a partire dalla S-adenosil-metionina. Si ritiene che la conversione dell'ACC ad etilene da parte della ACC ossidasi sia controllata meno rigorosamente (Wang, Li e Ecker, 2002). La biosintesi dell'etilene O₃-indotta sembra sia la conseguenza dell'induzione di membri specifici della famiglia genica di ACS, che racchiude molteplici membri che mostrano modelli differenziati di espressione negli organi della pianta durante lo sviluppo e come risposta agli stimoli esterni. In pomodoro è stata osservata un'induzione bifasica e sequenziale dei geni ACS da parte dell'ozono (Nakajima *et al.*, 2001; Moeder *et al.*, 2002): inizialmente i geni *LE-ACS1B* e *LE-ACS6* erano attivati rapidamente dall'ozono, successivamente si verificava un'improvvisa riduzione dei loro mRNA e un'induzione contemporanea di *LE-ACS2*. Anche in *Arabidopsis* un membro di questa famiglia genica, *At-acs6*, è indotto rapidamente dall'ozono (Vahala *et al.*, 1998; Overmyer *et al.*, 2000; Tamaoki *et al.*, 2003a).

Il silenziamento di *LE-ACS2*, effettuato mediante la tecnica antisense, determina un blocco quasi completo della sintesi di etilene durante lo sviluppo della bacca del pomodoro (Oeller *et al.*, 1991). Nelle foglie delle piante antisense per *LE-ACS2* esposte all'ozono la biosintesi dell'etilene aumentava velocemente durante la fase iniziale di induzione di *LEACS-1B* e *LE-ACS6*, ma si bloccava durante la seconda fase, quando cioè avviene l'induzione di *LE-ACS2* nelle piante wild-type (Moeder *et al.*, 2002). La sensibilità all'O₃ delle piante antisense per *LE-ACS2* non si differenziava, inoltre, dal controllo non trasformato. L'inserimento in piante di tabacco del gene *LE-ACS6* di pomodoro in orientamento antisense ha determinato una riduzione del tasso iniziale di produzione dell'ET O₃-indotto ed un'entità dei danni minore rispetto ai controlli non trasformati (Nakajima *et al.*, 2002). Questo suggerisce che gli enzimi codificati dai membri della famiglia dei geni ACS, indotti in sequenza, possano avere funzioni distinte nel processo e che la prima fase di sintesi dell'etilene possa essere sufficiente per innescare i processi etilene dipendenti che provocano la formazione di lesioni.

La veloce attivazione della biosintesi dell'etilene, che precede l'espressione del gene della ACC sintetasi, potrebbe essere regolata a livello post-traduzionale. È stato appurato, infatti, che nel pomodoro la stabilità della proteina *LE-ACS2* è regolata dalla fosforilazione di un residuo *Ser-460* nella regione C-terminale dell'enzima (Tatsuki e Mori, 2001), che verosimilmente influenza il legame della proteina *ETO1* al dimero ACS, impedendo la

degradazione del dimero attivo da parte del proteasoma 26S (Wang *et al.*, 2004). Studi effettuati su tabacco da Kim *et al.* (2003) hanno evidenziato il coinvolgimento di *SIPK* (omologo di *AtMPK6*) nell'attivare la biosintesi dell'etilene e nel sottoregolare la chinasi stessa attraverso un ciclo a retroazione (feedback) etilene-dipendente (Kim *et al.*, 2003). Inoltre, si è potuto dimostrare che *MPK6* di *Arabidopsis* fosforila senza intermediari la proteina *AT-ACS6*, impedendo la sua degradazione proteolitica e causando la sovraregolazione della sintesi dell'etilene (Liu e Zhang, 2004). Questo modello sembra essere in accordo sia con l'attività prolungata di *AtMPK6* nel mutante ET-insensibile *etr1* di *Arabidopsis* esposto all'O₃ (Ahlfors *et al.*, 2004b), sia con l'attivazione più veloce di *AtMPK6* (Overmyer *et al.*, 2005) e con la più elevata biosintesi di etilene ed induzione di *At-acs6* (Overmyer *et al.*, 2000) nel mutante O₃-sensibile *rcd1*. In modo analogo, inibendo l'attività della chinasi proteica con l'inibitore generale K25a delle chinasi si bloccava l'aumento dell'attività dell'ACC sintetasi O₃-indotta in pomodoro (Tuomainen *et al.*, 1997) e anche il danno da ozono nel mutante O₃-sensibile *rcd1* di *Arabidopsis* era molto limitato (Overmyer *et al.*, 2005). Alcuni lavori hanno dimostrato che inibendo l'attività della fosfatasi proteica con *calyculina A* si osserva un aumento dello sviluppo di etilene e dell'attività dell'ACC sintetasi, in assenza di qualsiasi stimolazione esterna (Spanu *et al.*, 1994; Tuomainen *et al.*, 1997); questo trattamento ha determinato un'aumentata morte cellulare nel mutante O₃-sensibile *rcd1* (Overmyer *et al.*, 2005). Alla luce di questi risultati, si può affermare che saranno necessari ulteriori studi per dimostrare se la fosforilazione *AtMPK6*-dipendente di *At-acs6* (Liu e Zhang, 2004) sia coinvolta nell'attivazione della sintesi dell'etilene O₃-indotto come conseguenza dell'aumentata morte cellulare o, viceversa, se i due processi siano indipendenti.

1.7.3. Contenimento delle lesioni

L'insieme delle conoscenze e dei risultati riportati dimostra l'esigenza di un sistema regolatore che possa contrastare la diffusione della lesione, visto che l'induzione e la diffusione della morte cellulare provocherebbe, infatti, la distruzione progressiva dell'intero organo. Ciò è evidente, ad esempio, nelle lesioni spontanee del mutante *lsd1* di *Arabidopsis* (Jabs, Dietrich e Dangl, 1996), nel quale, una volta iniziata la lesione, la morte cellulare si diffonde attraverso l'intera foglia. I meccanismi ormonali che, normalmente, possono essere ritenuti responsabili del contenimento della diffusione della lesione sono due, uno si basa sulla presenza dell'etilene, l'altro su quella dell'acido jasmonico.

Responsabile del contenimento della propagazione della lesione da O₃ etilene-dipendente può

essere l'etilene stesso, in quanto quest'ormone determina la desensibilizzazione delle cellule alla sua azione (Wang *et al.*, 2002). Il recettore dell'etilene agisce da soppressore della sua segnalazione quando non è in contatto con l'ormone, tale soppressione è rilasciata quando l'etilene si lega al recettore. È stato ipotizzato che la sintesi indotta da etilene di nuove molecole recettrici libere sia responsabile della desensibilizzazione della segnalazione dell'etilene. La sovraregolazione dei geni codificanti per i recettori dell'etilene è stata anche osservata in pomodoro esposto all'O₃ (Moeder *et al.*, 2002). La sintesi O₃-indotta di nuove proteine recettrici dell'etilene potrebbe determinare una ridotta sensibilità all'ET e il contenimento della diffusione delle lesioni ET-dipendenti. Attualmente non è del tutto chiaro se la sovraregolazione della sintesi ex-novo del recettore avvenga all'interno della lesione in via di sviluppo o nelle aree limitrofe.

Nel complesso processo di contenimento della lesione sono fortemente coinvolti anche altri ormoni: l'acido jasmonico (JA) e il suo estere metilico, il metil jasmonato (MeJA). Queste sono le molecole di segnalazione delle piante meglio studiate, tra quelle che hanno origine dall'acido linoleico, e nel loro insieme sono denominate ossilipine o jasmonati (Farmer, Weber e Vollenweider, 1998). È ben dimostrato che esponendo le piante all'ozono si osserva un'elevata biosintesi di jasmonato (Rao *et al.*, 2000a; Tuominen *et al.*, 2004). Nel ciclo ossidativo della morte cellulare JA e i suoi derivati svolgono un'importante funzione di protezione dei tessuti dalla morte cellulare ROS-indotta limitando, e quindi neutralizzando, gli effetti dell'SA e dell'etilene. Si è osservato, infatti, che pretrattando le piante di tabacco con jasmonati veniva inibita la morte cellulare ozono-indotta (Örvar *et al.*, 1997). In *Arabidopsis* il trattamento con jasmonato determinava la riduzione della quantità di SA prodotta in risposta all'ozono (Rao *et al.*, 2000b). I mutanti di *Arabidopsis* insensibili (o carenti) al jasmonato *jar1*, *coi1*, *fad3/fad7/fad8* e *oji1* erano, inoltre, ipersensibili all'ozono (Overmyer *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2000b; Kanna *et al.*, 2003; Tuominen *et al.*, 2004) e l'applicazione di MeJA dopo l'esposizione all'ozono arrestava la diffusione delle lesioni nel mutante ozono-sensibile *rcd1* e nell'ecotipo *Ws* (Overmyer *et al.*, 2000; Kanna *et al.*, 2003). Tuttavia non tutti i mutanti JA-insensibili sono sensibili all'O₃, infatti *jin1* è tollerante all'O₃ (Nickstadt *et al.*, 2004), facendo ipotizzare che l'JA svolga due ruoli differenti nelle risposte della pianta all'O₃. È stato dimostrato, inoltre, che il fattore di trascrizione di tipo MYC AtMYC2, codificato da *JIN1*, è essenziale per distinguere fra due vie differenti di risposta al jasmonato (Lorenzo *et al.*, 2004). Entrambe le vie di segnalazione di JA sembrano essere coinvolte, ciò nonostante, nei processi O₃-correlati, uno nella formazione della lesione e l'altro nel suo contenimento, poiché la formazione della lesione sembra richiedere AtMYC2 (*JIN1*), mentre il suo contenimento richiede *JAR1* e *COI1*.

1.7.4. Interazione tra le cascate di segnalazione ormonale

Numerosi studi hanno dimostrato che esiste un forte controllo ormonale che modula le risposte della pianta all'O₃. E' molto probabile che l'equilibrio esistente tra SA, etilene e JA, che sembra essere realizzato dalle interazioni reciproche, sia largamente responsabile dei processi coinvolti (Overmyer *et al.*, 2003; Tamaoki *et al.*, 2003b; Tuominen *et al.*, 2004). Poiché JA impedisce l'accumulazione di SA O₃-indotto (Örvar *et al.*, 1997), sembra che l'antagonismo del JA alla morte cellulare sia mediato, almeno parzialmente, attraverso il suo effetto su SA. JA si contrappone, inoltre, alla segnalazione dell'etilene; tale interazione è mutuamente antagonistica, poiché anche l'etilene inibisce l'espressione genica indotta da JA (Tamaoki *et al.*, 2003b; Tuominen *et al.*, 2004). Poiché i livelli di etilene nel mutante *jar1* JA-insensibile trattato con ozono erano simili al tipo selvatico (Overmyer *et al.*, 2000) e l'applicazione di MeJA non riduceva l'emissione dell'etilene in *eto1* (Tuominen *et al.*, 2004), l'antagonismo di JA nei confronti dell'etilene quasi certamente non avviene a livello di biosintesi. I risultati di lavori che prevedevano triplici saggi di risposta hanno evidenziato che l'azione di JA sull'etilene avviene a valle della biosintesi ma a monte di CTR1, una chinasi proteica di tipo raf attiva nella segnalazione dell'etilene appena a valle del recettore (Tuominen *et al.*, 2004). Quindi, JA è capace di influenzare la segnalazione dell'etilene a livello del recettore, determinando la riduzione della sensibilità da etilene in modo recettore-dipendente. La sovraregolazione indotta da JA di un'isoforma del recettore dell'etilene è stata rilevata in studi con microarray (Schenk *et al.*, 2000). In *Arabidopsis* ed in betulla (*Betula pendula*), sia l'accumulo di etilene che di JA era elevato nelle accessioni O₃-sensibili, mentre in quelle O₃-tolleranti la concentrazione di JA non aumentava (Vahala *et al.*, 2003; Tuominen *et al.*, 2004). Il ruolo svolto da JA nel contenimento della lesione potrebbe apparire in contrasto con il suo accumulo nelle accessioni sensibili, tuttavia, poiché la biosintesi di JA sembra essere legata alla disponibilità del substrato (Laudert, Schaller e Weiler, 2000; Ziegler, Keinänen e Baldwin, 2001), è anche possibile che l'accumulo di JA sia un effetto della morte cellulare. Il substrato per la sintesi di JA (acido alinoleico o acido 13-(S)-idroperossilinenico) potrebbe avere origine dalle membrane nelle cellule morenti, con conseguente aumento della sintesi di JA, che impedisce la propagazione della lesione ET-dipendente e realizza una riduzione della sensibilità delle cellule all'etilene. A livello del tessuto si può osservare una modifica sia temporale che spaziale dell'equilibrio, in modo tale che nelle prime cellule prevalgano i processi guidati da ET e SA, mentre più lontano dal sito di inizio le pathway di sintesi di JA sarebbero gradualmente indotte determinando il contenimento della morte cellulare.

1.7.5. Sequenza degli eventi nel controllo ormonale

Come già descritto, la prima struttura con cui l'ozono viene a contatto nelle piante è rappresentata dalle cellule di guardia degli stomi, che sono interessate entro pochi minuti. Le ROS derivanti dalla dissoluzione apoplastica dell'O₃ inducono immediatamente la chiusura e/o l'inibizione dell'apertura degli stomi, riducendo la conduttanza stomatica. Ad elevate concentrazioni esterno l'afflusso di O₃ durante la fase iniziale eccede la capacità degli antiossidanti apoplastici di detossificare le ROS formate dalla degradazione dell'O₃. Ciò determina un aumento del livello apoplastico delle ROS oltre, una data soglia, che stimola numerose risposte a valle. Sono indotte diverse linee di eventi. In primo luogo l'O₃ induce la produzione delle ROS nei cloroplasti delle cellule di guardia attraverso la proteina G eterotrimerica (o il complesso Gβγ), successivamente la produzione delle ROS da parte della NADPH ossidasi associata alla membrana plasmatica delle cellule di guardia è attivata dalla subunità α di una proteina G. Segue la diffusione delle ROS alle cellule contigue e l'inizio della morte cellulare SA-dipendente. Anche le cascate delle MAP chinasi sono attivate entro pochi minuti dall'inizio dell'esposizione all'O₃. Questi due processi hanno uno sviluppo ed un decorso indipendente, poiché l'attivazione precoce delle MAP chinasi avviene sia nelle accessioni O₃-sensibili, sia in quelle resistenti e non richiede la proteina G. Quindi le MAP chinasi non sembrano essere coinvolte direttamente nell'attivazione della produzione delle ROS per mezzo dell'NADPH ossidasi. Ciò nonostante, l'attivazione di *AtMPK6* (*SIPK* in tabacco) è coinvolta nella fosforilazione dell'ACC sintetasi, che determina un'aumentata sintesi dell'etilene e, probabilmente, l'attivazione autocatalitica e bifasica dei geni che codificano i membri O₃-indotti della famiglia dell'ACC sintetasi. L'attivazione autocatalitica ottenuta attraverso l'aumento della stabilità dell'ACC sintetasi per mezzo della fosforilazione non è, tuttavia, l'unico processo tramite il quale l'O₃ regola la sintesi dell'etilene, dato che la sintesi decisamente aumentata dell'etilene si rileva solo nelle accessioni sensibili. In ultima analisi, sono richiesti altri componenti, insieme all'autocatalisi, oppure la sottoregolazione della sintesi dell'etilene è più lenta o più inefficiente nelle accessioni O₃-sensibili.

È noto che la cascata ossidativa O₃-indotta è attivata in seguito alla percezione dell'O₃ nel sito di inizio della lesione. Il segnale responsabile della comunicazione tra cellule è prodotto dalla NADPH ossidasi, la cui attivazione richiede la subunità α della proteina G. Le ROS prodotte dalla NADPH ossidasi nel sito di inizio della lesione vengono percepite dalle cellule circostanti nelle quali l'attivazione, mediata dalla proteina G, della produzione delle ROS è indotta in numerosi compartimenti subcellulari. La diffusione del segnale alle cellule vicine, la competenza di queste cellule nel percepire il segnale delle ROS o nel rispondere ad esso

sembra essere etilene-dipendente. Questo è il processo che si osserva nel ciclo ossidativo della morte cellulare, che determina la formazione delle lesioni visibili da ozono. Il burst ossidativo differisce nelle accessioni sensibili e tolleranti all'O₃, in entrambe si rileva una cascata iniziale veloce delle ROS come risposta all'O₃, ma solo nelle accessioni sensibili è evidente un secondo burst, dipendente dall'etilene e dalla proteina G che è necessario per la diffusione della morte cellulare.

La morte cellulare durante la diffusione delle lesioni crea un'aumentata concentrazione dei prodotti di perossidazione dei lipidi di membrana, che fungono da substrato per la biosintesi dell'acido jasmonico, quindi soltanto nelle accessioni sensibili si osserva un elevato accumulo di JA. La segnalazione a breve distanza indotta dall'aumento dell'accumulo di JA riduce la sensibilità all'etilene nelle cellule all'interno del perimetro di diffusione della lesione, che determina una riduzione graduale della produzione di ROS dipendente dall'etilene e conseguente contenimento della morte cellulare.

In figura 1.10 è riportato quanto sopra descritto circa la sequenza di eventi osservati nelle piante esposte all'ozono.

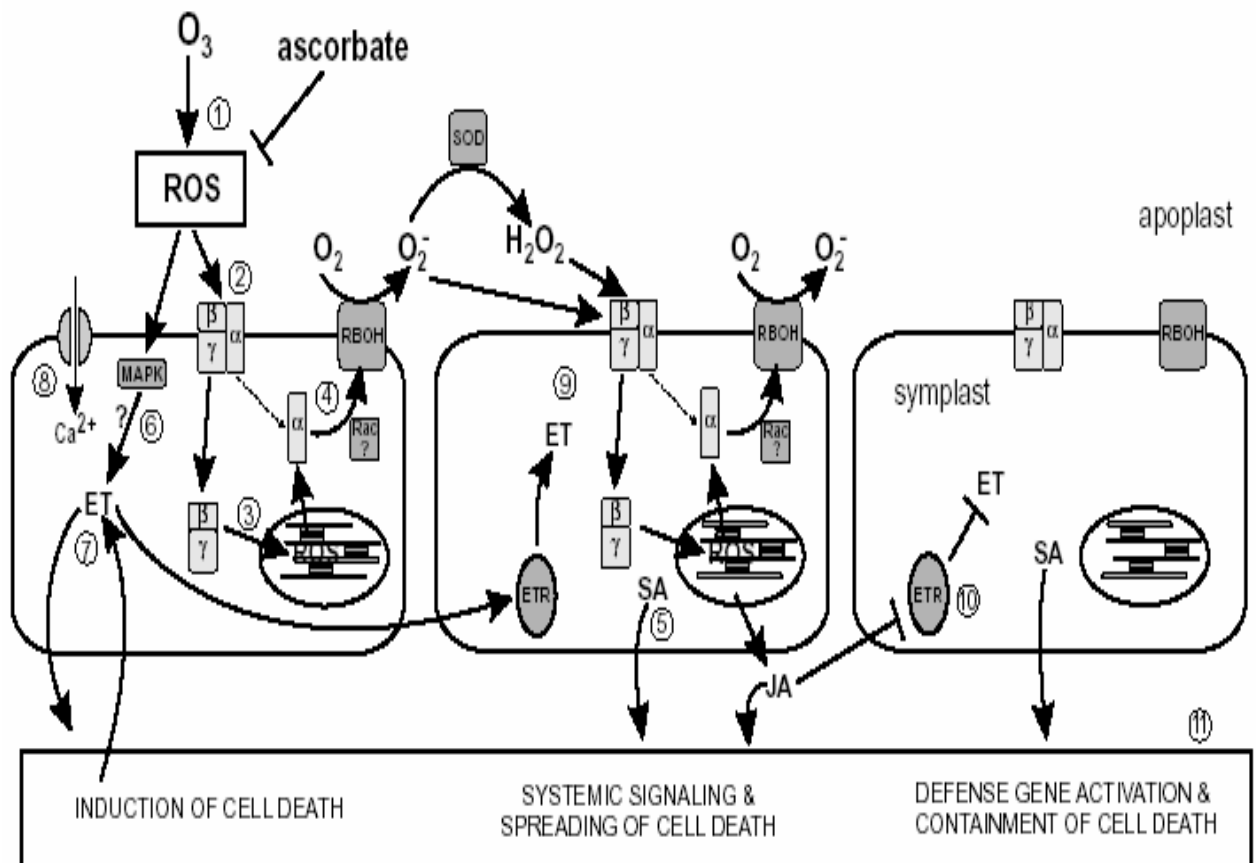


Fig. 1.10 - Trasduzione del segnale e sua progressione spaziale indotta tramite l'esposizione all'ozono.

L'ozono è dissociato in specie reattive dell'ossigeno (ROS) nell'apoplasto (1). Il loro accumulo è influenzato da antiossidanti come l'ascorbato. Le ROS apoplastiche attivano una catena di trasduzione del segnale dipendente dalle proteine G eterotrimeriche (2). La prima fase di questa catena dipende dall'eterodimero $\beta\gamma$ ed induce la produzione delle ROS nel cloroplasto (3). L'ulteriore trasmissione del segnale cloroplastico delle ROS richiede la subunità α della proteina G e determina l'attivazione di una NADPH ossidasi (RBOH) della plasmamembrana, probabilmente attraverso una piccola GTPasi Rac (4). In parallelo con le proteine G, è attivata una cascata di MAP kinasi (6). Anche se i bersagli a valle di questa cascata non sono conosciuti, essa potrebbe essere collegata con la sovraregolazione della biosintesi dell'etilene (ET) (7). Oltre all'etilene, è indotta anche la biosintesi dell'acido salicilico (5). L'afflusso del calcio avviene nelle fasi iniziali della trasduzione del segnale (8) e sia l'attivazione delle MAP kinasi, sia quella della NADPH ossidasi sono calcio-dipendenti. La produzione delle ROS mediante la NADPH ossidasi è essenziale per la diffusione del segnale indotto da ozono. Le proteine G eterotrimeriche sono coinvolte, inoltre, nella ricezione del segnale e nel suo trasferimento in maniera etilene-dipendente (9). Quando la diffusione della morte cellulare indotta da ozono è bloccata, la biosintesi di jasmonato è sovraregolata, bloccando la segnalazione dell'etilene, molto probabilmente a livello della sua percezione (10). I processi descritti precedentemente regolano un insieme di risposte ozono-indotte, compresa la morte cellulare e la trascrizione dei geni coinvolti nei meccanismi di difesa (11).

1.8. Geni bersaglio delle vie di segnalazione ossidative indotte da ozono

Negli ultimi anni, grazie all'utilizzo di metodologie che rendono possibile l'analisi dell'espressione genica su larga scala, è stato possibile accrescere le conoscenze riguardanti le risposte delle piante allo stress ossidativo indotto dall'ozono. Il gruppo di ricerca di Tamaoki (2003) ha realizzato un'analisi del trascrittoma di *Arabidopsis* mediante macroarray, dopo aver esposto l'accessione *Col-0* di *Arabidopsis* ad un trattamento acuto di ozono per 12 ore. Sono state utilizzate membrane macroarray contenenti più di 12000 EST di *Arabidopsis*, che rappresentano circa il 40% del trascrittoma di questa specie vegetale, e sono stati individuati 205 geni regolati dall'ozono, di cui 157 indotti o sovraregolati e 48 soppressi o sottoregolati. Sulla base delle loro funzioni presunte, 109 dei 205 trascritti che presentavano omologie significative con sequenze geniche caratterizzate nei vegetali sono stati assegnati a 8 classi: 33 sono coinvolti nel metabolismo, ad esempio glutaredoxina, fruttosio-bifosfatasi, UDP-glucuronosil-transferasi; 24 nell'organizzazione cellulare, ad esempio proteine del ribosoma, trasportatori ABC; 25 nei meccanismi di difesa e riparazione cellulare, come glutatione-S-transferasi, proteine PR e ascorbato perossidasi; 11 nella trasduzione del segnale, come diverse chinasi, proteine leganti il Ca, calmodulina; 6 nella produzione di energia metabolica (proteine leganti le clorofille a/b); 5 nella sintesi e degradazione di proteine; 3 nella trascrizione; 2 nel trasporto cellulare. È rilevante che più del 47% dei trascritti isolati corrispondono a geni la cui funzione non è nota e che la classe funzionale più rappresentata è quella dei geni coinvolti nei meccanismi di difesa e riparazione cellulare. Solo il 20% dei trascritti relativi a geni precedentemente caratterizzati corrispondono a sequenze geniche il cui ruolo nella risposta all'ozono era stato già documentato. Studi effettuati in anni recenti hanno indicato che la trascrizione di geni che codificano per l'ascorbato perossidasi citosolica (Kubo *et al.*, 1995), per la lipossigenasi (Maccarone *et al.*, 1992), per glutatione S-transferasi, proteine PR e catalasi (Lim *et al.*, 2003) risultava essere molto elevata in condizioni di stress da ozono. D'altro canto si è potuto osservare che il livello di trascrizione dei geni coinvolti nella fotosintesi (proteine leganti le clorofille a/b, la subunità minore della Rubisco) (Miller *et al.*, 1999) o codificanti per le superossido dismutasi (SOD) contenenti rame e zinco era considerevolmente ridotto se non del tutto soppresso (Kliebenstein *et al.*, 1998). Per la maggior parte dei trascritti identificati, quindi, non era stato dimostrato ancora nessun coinvolgimento nelle risposte allo stress da ozono, tranne, per le sequenze sopra citate. Si è comunque ipotizzato, per diversi trascritti, sia un ruolo nella risposta a stress ossidativi di natura biotica e/o abiotica, che un coinvolgimento in processi di sviluppo mediati dalla

produzione di ROS, ciò potrebbe spiegare la risposta correlata allo stress da O₃ (Tamaoki *et al.*, 2003).

I 157 EST attivati dall'ozono sono stati inoltre utilizzati per determinare come i tre ormoni etilene, acido jasmonico e salicilico interagiscono nel regolare l'espressione di geni indotti da questo inquinante atmosferico in tre mutanti di *Arabidopsis* in cui le vie metaboliche dei tre ormoni sono alterate: *ein2-1* (ET-*insensitive*), *jar1-1* (JA-*resistant*) e *npr1-1* (SA-*insensitive*). L'induzione dei geni da parte dell'O₃ veniva soppressa in maniera differenziale nei tre mutanti. La trascrizione di più del 50% dei geni O₃-indotti veniva inibita nei mutanti *ein2-1* e *jar1-1*, solo circa il 20% di trascritti era inibito nel mutante *npr1*. Grazie a questo lavoro di ricerca si è potuto dimostrare che le vie di segnalazione mediate da ET e da JA prevalgono su quella mediata da SA per l'induzione delle risposte all'ozono. L'espressione di più del 70% dei geni coinvolti nei meccanismi di difesa e riparazione cellulare indotti da O₃, inoltre, veniva inibita nei mutanti *ein2-1* e *jar1-1*, ma non in *npr1-1*, indicando che le vie di segnalazione mediate da ET e JA sono particolarmente importanti per attivare le risposte di difesa in *Col-0*. Solo la trascrizione di 16 dei 157 geni O₃-inducibili veniva indotta da tutte le tre vie di segnalazione. I risultati ottenuti in questo studio hanno evidenziato che l'induzione di più del 30% di geni è indipendente dalle vie di segnalazione mediate dai tre ormoni, ciò dimostra che l'espressione di un elevato numero di geni O₃-inducibili è controllata da altri fattori ancora sconosciuti.

I cambiamenti nell'espressione genica indotti dall'ozono possono essere notevolmente differenti in funzione delle modalità e dell'intensità dell'esposizione all'ozono. Un'esposizione cronica in pieno campo ha determinato, infatti, modificazioni molto più blande nel trascrittoma di *Arabidopsis* di quelle riscontrate in seguito ad un trattamento acuto, con un numero di geni sottoregolati cinque volte superiori rispetto a quelli indotti o sovraregolati (Miyazaki *et al.*, 2004). Il gruppo di ricerca di Mahalingam (2003) ha isolato, utilizzando un metodo definito "suppression subtractive hybridisation" (SSH), 203 geni indotti da un trattamento acuto con ozono, solo l'8% dei quali corrispondeva a quelli identificati da Tamaoki *et al.* (2003). In questo caso le differenze riscontrate nell'espressione genica potrebbero dipendere dalla diversa durata del trattamento applicato nei due studi per l'analisi del trascrittoma di *Arabidopsis*, tenendo conto che il genotipo utilizzato era lo stesso. Mahalingam *et al.* (2003) hanno isolato geni indotti dopo 1-3 ore di esposizione all'O₃, mentre Tamaoki *et al.* (2003) hanno condotto le analisi macroarray dopo un trattamento di 12 ore. Utilizzando un approccio proteomico per studiare l'effetto di un trattamento acuto di O₃ prolungato per 8 ore su riso, Agrawal *et al.* (2002) hanno ottenuto risultati abbastanza concordanti con quelli di Tamaoki *et al.* (2003). L'esposizione all'ozono ha infatti indotto

l'accumulo di ascorbato-perossidasi, catalasi e proteine PR, mentre ha determinato una riduzione nell'accumulo di proteine coinvolte nella fotosintesi.

Questi risultati indicano che per comprendere chiaramente le risposte indotte dall'O₃ a livello molecolare è necessario condurre analisi di espressione in condizioni di esposizione all'ozono diversificate sia per modalità che per tempi. La caratterizzazione funzionale delle sequenze geniche e delle proteine identificate negli studi del trascrittoma e del proteoma di diverse specie vegetali permetterà di ottenere ulteriori informazioni sui meccanismi molecolari, biochimici e fisiologici coinvolti nelle complesse risposte attivate dall'ozono nelle piante.

1.9. Il frumento

Il frumento è, insieme al mais ed al riso, fra le principali specie coltivate. Esso rappresenta l'alimento base per circa il 35% della popolazione mondiale, apportando il 20% circa delle calorie consumate nella dieta. Si stima che la produzione annuale di frumento nel 2005 sia stata di 460 milioni di tonnellate circa, coltivate su un'area totale di 190 milioni di ettari circa (Tab. 1.3 e 1.4). Questi dati giustificano l'interesse e i numerosi lavori di ricerca che hanno come oggetto questa specie. L'impegno del mondo scientifico è rivolto sia al miglioramento genetico delle specie coltivate, che allo studio e alla comprensione dei processi evolutivi, della filogenesi e della struttura genetica dei frumenti coltivati e selvatici, nonché alla conservazione delle risorse genetiche.

Tab. 1.3 - Produzione mondiale di frumento negli ultimi cinque anni (Annuari FAO)

Produzione mondiale (milioni di tonnellate)	2001	2002	2003	2004	2005
Asia	95,076,374	97,227,013	94,244,153	96,322,533	96,177,966
Africa	18,135,572	16,978,941	21,855,242	21,879,231	20,304,585
Europa	202,078,760	211,828,221	153,733,374	219,792,314	208,180,742
Nord e Centro America	77,178,165	63,506,455	90,124,655	87,510,539	85,664,791
Sud America	21,416,154	18,148,122	23,590,470	23,789,839	24,557,784
Oceania	24,663,037	10,433,508	26,452,519	20,647,010	24,344,010

Il frumento rappresenta la principale componente alimentare a livello mondiale per una serie di caratteristiche: l'adattabilità agronomica; la facilità di conservazione; il valore nutrizionale e la possibilità di ottenere, grazie a diversi processi di trasformazione, un'elevata e diversificata quantità di prodotti (pane, paste alimentari, dolci ed altro). Dalle farine di frumento si ottiene un impasto che si differenzia da quello di altri cereali per una serie di peculiari caratteristiche visco-elastiche. Il frumento e i suoi prodotti costituiscono un'importante risorsa nutritiva. Essi sono ricchi di fibre, carboidrati proteine, vitamine, ferro, calcio, potassio, zinco, fosforo e magnesio.

Tab. 1.4 - Superficie coltivata a frumento negli ultimi cinque anni (Annuari FAO)

Area coltivata (milioni di ha)	2001	2002	2003	2004	2005
Asia	95,076,374	97,227,013	94,244,153	96,322,533	96,177,966
Africa	8,914,969	7,990,048	9,490,545	9,728,168	9,647,273
Europa	58,372,224	60,307,648	48,640,305	56,978,101	58,097,782
Nord e Centro America	30,980,658	28,059,399	32,574,677	30,703,190	30,664,000
Sud America	9,694,973	9,275,024	9,392,320	9,731,478	9,629,497
Oceania	11,578,020	11,212,192	13,109,620	12,239,068	11,398,006

Tutti i cereali sono ricchi di carboidrati, poiché la componente principale dell'endosperma è l'amido, la cui quantità relativa varia a seconda della varietà e delle condizioni di coltivazione. Il frumento, mediamente, presenta una quantità di proteine maggiore rispetto agli altri cereali, anche se non risulta essere il migliore se si considera il bilanciamento tra gli aminoacidi, vista la scarsa presenza di quelli basici come la lisina ed il triptofano, essenziali in quanto non sintetizzati dall'organismo umano. Dalle proteine del seme derivano le proprietà caratteristiche delle farine nei processi di pastificazione e panificazione. Durante l'idratazione della farina, le proteine interagiscono per formare una matrice visco-elastica, il glutine, capace di inglobare i granuli di amido e lipidi, e alla quale vengono attribuite le proprietà funzionali degli impasti. La specie più coltivata al mondo è il *Triticum aestivum*, essa include le varietà di frumento tenero usate nei processi di panificazione (Orth e Shellenberger, 1988), mentre il *Triticum turgidum*, che include le varietà di frumento duro usate nei processi di pastificazione, rappresenta solo il 5% circa della superficie coltivata a frumento (Dick e Matsuo, 1988).

1.9.1. Tassonomia dei generi *Triticum* e *Aegilops*

La classificazione delle specie di frumento è tuttora oggetto di numerose dispute e continue revisioni. L'ostacolo al raggiungimento di una classificazione unanime è dovuto da un lato al fatto che esse comprendono sia specie selvatiche che coltivate, queste ultime di difficile classificazione mediante i criteri classici, basati su caratteristiche morfologiche, anatomiche e di distribuzione geografica, dall'altro alla natura stessa di queste specie a diverso livello di allopoliploidia, caratterizzate da possibilità di incrocio interspecifico, principalmente tra specie poliploidi, o tra queste e le specie diploidi da cui derivano. Esistono numerose classificazioni, molte delle quali si basano sulle conoscenze acquisite grazie a studi citogenetici.

Linneo nel 1753, basandosi su differenze morfologiche, assegnò 7 specie al genere *Triticum*. Analogamente, sempre usando criteri morfologici, Shultz (1913) suddivise il genere in tre gruppi chiamati einkorn, emmer e dinkel. I tre gruppi differivano tra loro anche nella risposta agli attacchi dell'oidio e delle ruggini (Vavilov, 1914). Nel 1918 Sakamura suddivise i tre gruppi del genere *Triticum* sulla base del numero cromosomico. Il primo gruppo si caratterizzava per la presenza di 14 cromosomi e comprendeva il *T. monococcum*; nel secondo gruppo erano presenti 28 cromosomi e comprendeva il *T. turgidum*; il terzo era caratterizzato da 42 cromosomi e ad esso veniva ascritto il *T. aestivum*. Grazie a questi studi Kihara (1919; 1924) poté affermare che le specie di *Triticum* riunite nei tre gruppi corrispondevano a tre livelli di ploidia: nel primo gruppo si aveva un livello diploide ($2n=2x=14$), il secondo gruppo era caratterizzato da un livello tetraploide ($2n=4x=28$), nel terzo si osservava un'esaploidia ($2n=6x=42$). Studi successivi confermarono che ognuno dei genomi presenti nelle specie del genere *Triticum* era costituito da un numero base di 7 cromosomi (Sax e Sax, 1924; Kihara, 1937; McFadden e Sears, 1944; 1946). Inoltre, Kihara fornì le prove sulla diversità genomica dei frumenti tetraploidi ed esaploidi, ipotizzando una loro origine allopoliploide. La sua ipotesi si basava sul numero di associazioni cromosomiche bivalenti osservate, durante la meiosi, in ibridi derivanti da incroci tra il frumento diploide *T. monococcum* e il tetraploide *T. turgidum* e con l'esaploide *T. aestivum*. Il set di cromosomi comune a tutte e tre le specie di *Triticum* doveva essere quello del *T. monococcum*, definito da Kihara con la lettera A. Il genoma in comune tra il frumento tetraploide e quello esaploide, diverso dal tipo A, venne definito B, mentre quello presente solo in *T. aestivum* venne designato come genoma D.

Sono state proposte numerose nomenclature al fine di poter classificare le varie specie appartenenti al genere *Triticum*, ma nessuna classificazione è stata definitivamente ed

univocamente accettata. Nel 1966, MacKey ne propose una che si basava su dati morfologici, fisiologici, citologici, genetici, botanici e biochimici e da allora è rimasta la più utilizzata. Va ricordato che l'ultima classificazione è stata proposta da Van Slageren nel 1994.

Anche il genere *Aegilops* comprende specie diploidi e poliploidi, con numero cromosomico base pari a 7. Nel 1928 Zhukovsky attribuì a questo genere 11 specie diploidi e 9 specie poliploidi, che suddivise in 9 sezioni. L'anno successivo, Eig (1929) individuò nello stesso genere 11 specie diploidi e 11 poliploidi, raggruppate in due sottogeneri e 6 sezioni. La classificazione proposta da entrambi gli studiosi era basata su criteri morfologici. Nel 1954 Kihara analizzò le relazioni che si avevano a livello citogenetico tra le differenti specie diploidi e poliploidi di *Aegilops*, prendendo in esame l'appaiamento cromosomico alla meiosi. Furono individuate 9 specie diploidi diverse che, in relazione alle loro affinità genomiche, vennero inserite in tre gruppi caratterizzati dai genomi C, M e S. A quest'ultimo gruppo erano ascritte tutte le specie della sezione *Sitopsis* (*Ae. speltoides*, *Ae. longissima*, *Ae. sharonensis*, *Ae. bicornis*, *Ae. searsii*). Quando fu chiara l'esistenza di stretti rapporti filogenetici tra i due generi, diversi Autori proposero di unire in un unico genere le specie ad essi appartenenti. Nel 1956, Stebbins propose di utilizzare il solo genere *Triticum* per includere tutte le specie che erano state suddivise nei due generi precedenti; nel 1960, Chennaveeraiah trasferì nel genere *Triticum* le sole specie appartenenti alla sezione *Sitopsis*. Questa classificazione non è unanimamente riconosciuta. Alla fine anche i due studiosi sopracitati hanno accettato la distinzione tra i generi *Triticum* e *Aegilops*.

Tabella 1.5 - Tassonomia del genere *Triticum*

DIPLOIDI Genoma AA <i>T. urartu</i> Tum <i>T. monococcum</i> L.	Subsp. <i>boeoticum</i> (Boiss.) MK. Subsp. <i>monococcum</i> L.	FORMA selvatico " coltivato
TETRAPLOIDI Genoma AABB <i>T. turgidum</i> (L.) Thell	Subsp. <i>dicoccoides</i> (Korn) Thell Subsp. <i>dicoccon</i> (Schränk) Thell Subsp. <i>paleocolchicum</i> (Men.) MK Subsp. <i>carthlicum</i> (Nevski) MK Subsp. <i>turgidum</i> L. conv. <i>turgidum</i> L. conv. <i>durum</i> (Desf) MK conv. <i>turanicum</i> (L.) MK conv. <i>polonicum</i> (L.) MK conv. <i>aethiopicum</i> Jakub	selvatico coltivato " " " " " " " "
Genoma AAGG <i>T. timopheevii</i> Zhuk	Subsp. <i>araraticum</i> (Jakubz.) MK Subsp. <i>timopheevii</i> Zhuk	selvatico coltivato
ESAPLOIDI Genoma AAAAGG <i>T. zhukovskyi</i> Men. Er.		coltivato
Genoma AABBDD <i>T. aestivum</i> (L.) Thell	Subsp. <i>compactum</i> (Host) MK. Subsp. <i>macha</i> (Dek. Et Men.) MK. Subsp. <i>spelta</i> (L.) Thell Subsp. <i>sphaerococcum</i> (Perc.) MK. Subsp. <i>vavilovii</i> (Tum.) Sears Subsp. <i>vulgare</i> (Vill.) MK.	" " " " " "

1.9.2. Relazioni filogenetiche tra specie del genere *Triticum*

I frumenti diploidi formano un gruppo con formula genomica AA, che comprende anche la specie coltivata *T. monococcum*. I frumenti diploidi selvatici sono separati nelle due specie *T. boeoticum* e *T. urartu*, che pur avendo il medesimo areale di distribuzione, si differenziano sulla base di diverse caratteristiche isoenzimatiche e risultano, inoltre, riproduttivamente isolate (Johnson e Dhaliwal, 1976). Il *T. boeoticum* comprende due sottospecie: il *T. boeoticum* ssp. *aegilopoides*, che produce un solo seme per spighetta, e la ssp. *thaoudar*, che ne produce due. Il *T. monococcum* molto probabilmente è derivato da *T. boeoticum* ssp. *aegilopoides*, come conseguenza della coltivazione e selezione per tipi a rachide resistente alla disarticolazione.

I frumenti tetraploidi vengono divisi in due gruppi, quelli aventi genoma AABB (*T. turgidum*) e quelli con genoma AAGG (*T. timopheevi*); i due gruppi presentano una forma selvatica, rispettivamente *T. dicoccoides* (AABB) e *T. araraticum* (AAGG). Queste due specie selvatiche sono caratterizzate dall'avere un'areale di distribuzione sovrapposto e risultano morfologicamente simili, anche se sono geneticamente isolati a causa della sterilità degli ibridi da essi prodotti. I due gruppi potrebbero essere derivati l'uno dall'altro e cioè il *T. dicoccoides* dal *T. araraticum* o viceversa (Gill e Chen, 1987). Questa ipotesi è stata contestata dal gruppo di ricerca di Miyashita (1994), che sulla base della variabilità osservata nelle mappe di restrizione di alcune regioni di DNA cloroplastico ha ipotizzato un'origine difiletica per i due gruppi di tetraploidi.

I frumenti esaploidi comprendono due specie: *T. zhukovskyi* (AAAAGG) e *T. aestivum* (AABBDD), quest'ultimo rappresenta il gruppo principale. Utilizzando la tecnica del bandeggio C sul complesso dei cromosomi somatici di *T. monococcum* e *T. aestivum* si è potuto mettere in evidenza l'elevata affinità tra i due genomi A (Gill e Kimber, 1974), confermando i risultati delle ricerche di Kihara. Numerose conferme sono giunte da altre ricerche (Fernandez de Caleyra *et al.*, 1976; Jones *et al.*, 1982; Kerby, 1986). Analizzando i profili elettroforetici delle proteine di riserva della cariosside o degli isoenzimi, altri Autori sono giunti a differenti conclusioni. Secondo questi Autori il genoma A presente nei frumenti tetraploidi aventi formula genomica AABB risulta essere più simile a *T. urartu*, mentre il *T. boeoticum* sembrerebbe essere il donatore del genoma A ai frumenti di formula genomica AAGG (Konarev *et al.*, 1976; Caldwell e Kasarda, 1978; Jaaska, 1987). Nel 1983 Nishikawa, sulla base della variabilità genetica osservata per le α e β amilasi, ipotizzò che il *T. urartu* potesse essere il donatore del genoma A sia per i frumenti aventi formula genomica AABB che per quelli aventi formula AAGG. Quest'ipotesi è stata poi confermata da altre ricerche

effettuate utilizzando marcatori biochimici e molecolari, quali proteine di riserva (Ciaffi *et al.*, 1997; 1998), sequenze ripetute di DNA (Dvorak *et al.*, 1988; 1993) e geni codificanti per l'RNA ribosomiale (Jiang e Gill, 1994a).

Sull'origine dei genomi B e G sono stati portati avanti numerosi studi e riflessioni (Kerby e Kuspira, 1987). Un'ipotesi abbastanza accreditata è quella che considera come donatore del genoma B una delle cinque specie diploidi di *Aegilops* appartenenti alla sezione *Sitopsis*, aventi in comune il genoma S, anche se non si può escludere la sua origine polifiletica oppure la possibile estinzione della specie donatrice (Kerby e Kuspira, 1987). Numerosi studi hanno messo in rilevanza l'elevata affinità tra il genoma G e la specie *Ae. speltoides* (Miller, 1987), dimostrando la probabile derivazione del genoma da questa specie.

I frumenti esaploidi con formula genomica AABBDD comprendono numerose sottospecie che derivano dalla poliploidizzazione di un ibrido tra i frumenti tetraploidi (*T. dicoccum*) e la specie diploide *Ae. tauschii*, donatrice del genoma D. Quest'ultima fu indicata come specie donatrice da Pathak (1940) sulla base di analisi morfologiche della pianta, dei suoi cromosomi e della sua distribuzione geografica. L'ipotesi venne confermata dall'analisi dell'aloesaploide sperimentale *T. turgidum* x *Ae. tauschii*, ottenuto per fusione di gameti non ridotti (Kihara, 1944) e per raddoppiamento cromosomico dell'ibrido F₁ (McFadden e Sears, 1944; 1946). Anche l'analisi dell'appaiamento cromosomico nell'ibrido tra frumento esaploide e *Ae. tauschii*, ottenuto mediante la tecnica di "embryo rescue", ha confermato che questa specie diploide è la donatrice del genoma D (Riley e Chapman, 1960). I vari studi cariotipici (Gill e Kimber, 1974), biochimici (Fernandez de Caleyra *et al.*, 1976; Lafiandra *et al.*, 1992) e genetico molecolari (Lafiandra *et al.*, 1992; Ciaffi *et al.*, 1997; 1998) hanno fornito ulteriori conferme circa la derivazione del genoma D da *Ae. tauschii*.

Il *T. zhukovskyi* (AAAAGG) è stato rinvenuto in popolazioni miste di *T. monococcum* e *T. timopheevi*. Diverse analisi effettuate su sequenze ripetute di DNA hanno indicato che il secondo genoma A presente in questa specie è stato fornito dal *T. monococcum* (Dvorak *et al.*, 1993).

2. SCOPO DELLA TESI

L'ozono è ampiamente riconosciuto, da alcuni decenni, come un gas di origine antropica dalle elevate potenzialità di inquinamento ambientale. L'ozono, oltre agli effetti tossici per l'uomo e per gli animali e alle possibili alterazioni della struttura chimica di manufatti, determinate dall'azione fortemente ossidante, provoca danni significativi alla vegetazione spontanea ed alle colture agrarie. E' stato dimostrato che gli effetti deleteri dell'ozono sulle piante non si limitano ai sintomi rilevabili visivamente, ma riguardano anche alterazioni strutturali, metaboliche e funzionali non evidenti che, tuttavia, possono avere un impatto anche rilevante sulle caratteristiche qualitative e sulle potenzialità produttive delle colture. Tali effetti subliminali sono dovuti prevalentemente ad alterazioni strutturali e funzionali delle membrane cellulari e dell'apparato fotosintetico. L'ozono troposferico si forma per azione della radiazione solare sui precursori chimici rappresentati dalle sostanze inquinanti emesse dagli impianti industriali e dal traffico veicolare, in particolare l'ossido di azoto e gli idrocarburi volatili. Ne consegue che le aree urbane ed intensamente antropizzate costituiscono i siti preferenziali di formazione del gas, prodotto per reazione fotochimica. I moti convettivi atmosferici, tuttavia, determinano la dispersione dei gas inquinanti anche in aree rurali distanti, nelle quali è possibile rilevare concentrazioni significative di ozono, tali da determinare danni alle colture agrarie ed alla vegetazione spontanea. Il continuo incremento delle emissioni inquinanti e, conseguentemente, dell'ozono rende sempre più preoccupanti e consistenti i rischi di danneggiamento delle colture agrarie, con consistenti alterazioni delle caratteristiche qualitative dei prodotti agricoli e riduzione delle produzioni. Lo stress abiotico provocato dall'ozono presenta caratteristiche peculiari, ma i suoi effetti presentano notevoli analogie sintomatiche, biochimiche e fisiologiche con quelli determinati dalla reazione ipersensibile allo stress biotico indotto da patogeni. La reazione della pianta e, quindi, l'entità dei sintomi sono fortemente influenzate, ovviamente, dalla concentrazione del gas inquinante, ma anche da una serie di altri fattori concomitanti, quali il genotipo, le condizioni ambientali e lo stadio di sviluppo. L'O₃ si presenta come un agente di *stress* peculiare: fattori genetici, ontogenetici e ambientali condizionano la risposta del vegetale all'inquinante. E' stato dimostrato, in particolare, che la risposta delle piante e, quindi, la loro suscettibilità all'ozono possono variare estesamente non solo in funzione della specie, ma anche tra genotipi della stessa specie. E' verosimile che la pressione selettiva determinata da altri agenti di stress ossidativo, quali lo stress idrico e da alte temperature, abbia contribuito a determinare un'ampia diversificazione genetica anche nei confronti della resistenza o suscettibilità intra ed interspecifica all'ozono. Le particolari condizioni climatiche e la forte antropizzazione delle

regioni mediterranee favorisce la formazione di elevate concentrazioni di ozono, a causa delle quali sono state rilevate lesioni su numerose colture erbacee particolarmente sensibili, quali: tabacco, fagiolo, trifoglio, spinacio e frumento, ma anche su specie più tolleranti, quali : mais, soia, pomodoro e patata.

Numerosi fattori agronomici (condizioni pedoclimatiche) ed economici (domanda di semola da parte dei pastifici) hanno favorito la coltivazione del frumento duro in Italia. Nell'ultimo anno le superfici investite hanno raggiunto un milione e 520.061 ettari, ed una produzione di circa 4,6 milioni di tonnellate. Ciò spiega e giustifica l'interesse crescente della comunità scientifica per questa specie, che ha determinato l'attivazione ed il finanziamento di numerosi programmi di ricerca e, tra questi, lo studio delle basi molecolari coinvolte nella risposta della pianta di frumento duro allo stress da ozono. L'importanza di questo studio deriva anche dalla considerazione che questo gas raggiunge la massima concentrazione, a causa della forte radiazione solare, proprio durante la formazione della spiga e la maturazione delle cariossidi, rendendo massimo il suo impatto negativo sulla produzione di granella. La maggior parte delle ricerche sulla risposta molecolare allo stress da ozono sono state condotte su dicotiledoni e, in particolare, in *Arabidopsis*, mentre nelle monocotiledoni e nel frumento le conoscenze su questo argomento sono molto più limitate. Il frumento sviluppa sintomi meno evidenti rispetto ad altre specie sensibili, tuttavia l'ozono, come è stato dimostrato in frumento tenero, provoca fenomeni di precoce senescenza fogliare, con conseguenze negative sulla produttività la cui entità dipende dalla varietà. Non si conoscono le basi fisiologiche e molecolari che determinano la risposta diversificata dei genotipi di frumento, ma in numerosi studi che hanno utilizzato trattamenti acuti, cioè di breve durata con dosi elevate di ozono, è stata rilevata una riduzione dell'attività fotosintetica, che è risultata correlata a specifiche alterazioni strutturali e funzionali.

La prima fase di questa ricerca ha riguardato l'esposizione a dosi realistiche di ozono (cioè concentrazioni simili a quelle riscontrabili in pieno campo, per periodi prolungati) in ambiente controllato (camera di crescita) di sedici varietà di frumento duro. In base all'osservazione dei sintomi fogliari ed al rilievo di una serie di parametri fisiologici è stata determinata una scala di tolleranza/suscettibilità all'ozono, identificando la varietà più tollerante (Portorico) e quella più suscettibile (Duilio). Queste due varietà sono state utilizzate per eseguire l'analisi differenziale basata su cDNA-AFLP ed identificare i trascritti di geni la cui espressione è indotta dall'ozono. I trascritti indotti sono stati clonati ed è stata determinata la loro sequenza nucleotidica. L'analisi RT-PCR ha permesso di verificare la loro espressione differenziale nelle piante trattate con ozono. In base all'omologia con sequenze geniche in banche dati di

cui si conosce la funzione è stato possibile dedurre il possibile ruolo metabolico dei geni di frumento duro la cui espressione era stata indotta dall'ozono.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Materiale vegetale e fumigazione

L'esposizione all'ozono di giovani piante di 16 varietà di frumento duro (tabella 3. 1) è stata effettuata nell'impianto di fumigazione ubicato presso la sede di San Piero a Grado della Sezione di Patologia Vegetale del Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose "Giovanni Scaramuzzi" dell'Università di Pisa (per dettagli, cfr. Lorenzini *et al.*, 1994). La cella climatica (Bertagnin) nella quale sono state allevate le piante ha una dimensione utile di 2,70 x 2,90 x 2,0 m, al suo interno i parametri ambientali (luce, temperatura e umidità relativa) sono controllati e mantenuti sui valori fissati attraverso sistemi automatici di controllo. Nella cella è presente un box di *perspex* (dimensioni: 1,30 x 0,75 x 1,0 m) ventilato in continuo con un flusso di ricambio totale in grado di garantire due cambi di aria al minuto, previa filtrazione con carbone attivo. L'ingresso dell'aria nel box è resa possibile da 5 fori ($\varnothing$ 0,05 m), disposti su uno dei lati minori, ed è mediato dalla presenza della piastra di *perspex*, anch'essa forata, che, rompendo i filetti d'aria in ingresso, ne assicura una sufficiente omogeneizzazione.

L'aria viene aspirata attraverso un foro ($\varnothing$ 0,1 m) praticato nel lato opposto a quello di entrata, filtrata ed immessa all'esterno mediante un aspiratore/depuratore (Maczero Toxigas 900, Aeron). Tale flusso è intercettato, ad una distanza di 0,4 m dal punto di ingresso nella camera, da un tubetto di *teflon* ($\varnothing$ 5×10^{-3} m) che convoglia l'ozono all'interno del box, permettendo un'adeguata miscelazione con la massa d'aria in entrata. L'O₃ viene generato, a partire da O₂ puro in bombola, attraverso la scarica elettrica prodotta da uno specifico generatore (Fisher 500) raffreddato ad aria; la sua quantità in uscita è funzione dell'intensità della scarica elettrica e del flusso di O₂ in entrata al generatore. La concentrazione dell'inquinante all'interno delle camere è misurata in continuo; la miscela aria-O₃, campionata mediante un tubetto in teflon posto all'altezza delle piante, è convogliata ad un analizzatore automatico (Mod. 8810 Monitor Labs, San Diego, CA USA), funzionante in base al principio dell'assorbimento della radiazione UV. Lo strumento è connesso ad un registratore su carta (Mod. 2210 LKB) e ad un sistema computerizzato basato su un PC, dotato di specifico *software*.

Le piante sottoposte a trattamento sono disposte, in maniera del tutto casuale rispetto alla tesi di appartenenza, all'interno del box sopra un letto di perlite umida. Il materiale di controllo è mantenuto nelle stesse condizioni, ad esclusione del trattamento con l'inquinante, all'interno

della cella climatica. Dopo il rilevamento dei sintomi e le analisi fisiologiche le foglie delle piantine controllo e quelle sottoposte a stress da ozono sono state raccolte e suddivise in campioni di un grammo che sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C fino all'estrazione dell'RNA totale per l'analisi differenziale.

Tab. 3.1. - Le sedici varietà di frumento duro sottoposte a fumigazione con ozono.

1)	Appio
2)	Claudio
3)	Duilio
4)	Flaminio
5)	Iride
6)	Latino
7)	Meridiano
8)	Mongibello
9)	Neodur
10)	Orobel
11)	Portobello
12)	Portorico
13)	San Carlo
14)	Simeto
15)	Svevo
16)	Vetrodur

3.2. Descrizione dei sintomi e analisi fisiologiche

Dopo aver sottoposto le piantine (di circa 15 giorni, allo stadio di prima foglia espansa) delle 16 varietà, indicate nella tabella 3.1, a fumigazione (200 ppb di O_3 , 5 h) è stato adottato il seguente protocollo sperimentale:

1. La valutazione dei sintomi è stata effettuata al termine del trattamento e nelle successive 5, 24 e 48 h; entro questo limite di tempo si manifestano le lesioni

necrotiche fogliari, delle quali è stata determinata la percentuale rispetto alla parte verde; è stata valutata, inoltre, la comparsa di clorosi attraverso la misurazione del contenuto relativo di clorofilla totale.

2. Al fine di indagare gli effetti precoci (che si realizzano prima della manifestazione dei sintomi) dell'esposizione all'inquinante, sono state utilizzate tecniche rapide e non invasive, quali la misura dei parametri degli scambi gassosi e della fluorescenza della clorofilla *a*. L'analisi degli scambi gassosi permette di rilevare le variazioni, anche giornaliere, nel processo fotosintetico, studiando l'attività carbossilativa mediante l'efficienza di assimilazione della CO₂ ed evidenziando l'eventuale capacità della pianta di reagire e rispondere allo *stress*. E' ormai accertato che, a seguito di trattamenti con O₃, la fotosintesi subisce una riduzione (Heath, 1994), ma ancora controversa risulta l'interpretazione della natura delle limitazioni. Le determinazioni sono state effettuate sulla prima foglia delle piante fumigate (con la stessa tempistica riportata al punto precedente) e su quelle mantenute in aria filtrata (utilizzate come termine di confronto). I parametri presi in considerazione sono stati: attività fotosintetica a luce saturante (P_{net}), conduttanza stomatica (G_w) e concentrazione intercellulare di CO₂ (C_i). Dall'analisi della fluorescenza della clorofilla *a* sono stati determinati i parametri indicatori dell'efficienza del trasporto elettronico al PSII: fluorescenza di base (F₀) e massima (F_m), resa quantica ottimale (F_v/F_m) ed effettiva del PSII (Φ_{PSII}), *quenching* fotochimico (q_p) e non fotochimico (q_{NP}).
3. Dopo 5, 24 e 48 h dalla fumigazione, sono stati effettuati i prelievi per la conducibilità elettrica (CE) dei dischi fogliari, come indicatore dello stato di integrità delle membrane.

Prima di procedere con la fumigazione, i rilievi descritti sono stati effettuati sulle piante tal quali, al fine di verificare eventuali differenze nei livelli costitutivi.

3.2.1. Descrizione dei sintomi

Sono state esaminate le prime foglie di 25 piante per varietà esposte ad O₃ ed è stata calcolata la percentuale di area necrotica rispetto alla parte verde. L'estensione del danno è stata valutata utilizzando una scala patometrica, comprendente le seguenti classi di intensità: 0 = nessun danno; 1 = 0-1% di lesioni; 2 = 1-3%; 3 = 3-5%; 4 = 5-10%; 5 = 10-15%; 6 = 15-20%; 7 = 20-25%; 8 = 25-30%; 9 = 30-40%; 10 = oltre il 40%.

L'incidenza (I) è stata, quindi, valutata mediante l'indice di Mackinney:

$$I = [\sum (\text{classe di intensità} \times \text{numero di diffusione}) / \text{totale piante esaminate}]$$

dove:

- *classe di intensità* = numero della classe a cui appartiene la pianta esaminata;
- *numero di diffusione* = numero di piante appartenenti a una determinata classe di intensità.

È stata valutata, inoltre, la comparsa di clorosi fogliare mediante misurazione non distruttiva del contenuto relativo di clorofilla totale effettuata con analizzatore portatile (SPAD-502 Meter, Minolta), secondo la tecnica riportata da Neilsen *et al.* (1995). I valori relativi sono stati calcolati in base al rapporto tra la quantità di luce trasmessa dalla foglia nelle regioni a lunghezza d'onda di 650 nm (picco di assorbimento della clorofilla) e 940 nm (basso assorbimento). La luce, penetrando attraverso la foglia, raggiunge un ricevitore capace di trasformarla in segnale elettrico, a sua volta convertito in dato digitale. Il calcolo del valore dell'unità arbitraria avviene tramite il confronto tra il rapporto ottenuto in fase di calibrazione e quello del campione.

3.2.2. Scambi gassosi fotosintetici

I parametri degli scambi di H₂O_(vap) e CO₂ sono stati analizzati mediante un sistema aperto (CIRAS-1, PP-Systems), costituito da un analizzatore differenziale a raggi infrarossi collegato ad una camera fogliare di tipo Parkinson, capace di effettuare misurazioni sulla singola foglia. Le determinazioni sono state effettuate, seguendo il protocollo di Castagna *et al.* (2001), a concentrazione ambiente di CO₂ (340-360 ppm) ed umidità relativa dell'80%; la camera è stata illuminata con lampade alogene al quarzo e la temperatura della foglia mantenuta a 26±0,4°C. Le misurazioni sono state eseguite sulla porzione verde della prima foglia, utilizzandone quattro per varietà e per trattamento. P_{net} è stata misurata a 800 µmol di

fotoni $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e il calcolo della C_i è stato effettuato sulla base sull'equazione descritta da von Caemmerer e Farquhar (1981).

3.2.3. Fluorescenza della clorofilla *a*

Questa metodologia, che rientra fra le alternative tecniche per lo studio della fotosintesi *in vivo*, offre la possibilità di eseguire analisi di tipo non distruttivo sulla foglia.

L'analisi della fluorescenza della clorofilla *a* viene effettuata sulla porzione verde della prima foglia, utilizzandone tre per varietà e per trattamento. I parametri vengono misurati utilizzando un fluorimetro a luce modulata (PAM-2000, Walz, Effeltrich, Germania) dopo 40 minuti di adattamento al buio, al fine di assicurare che l'accettore primario del PSII (Q_a) sia completamente ossidato. La fluorescenza viene eccitata con luce rossa modulata (lunghezza d'onda 650 nm), avente un'intensità sufficientemente ridotta, tale da non provocare emissione di fluorescenza variabile, ma solo di F_0 . La foglia viene, quindi, illuminata per 0,8 s ad elevata intensità ($15000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), in modo da indurre la produzione di F_m , corrispondente alla completa riduzione del Q_a .

Dai parametri così determinati si ottiene il rapporto $F_v/F_m [(F_m - F_0)/F_m]$, che indica l'efficienza fotochimica ottimale del PSII e nelle foglie di piante sane, tipicamente, raggiunge valori compresi tra 0,75 e 0,85 (Butler e Kitajima, 1975). La foglia viene poi sottoposta a luce attinica, che attiva il processo fotosintetico e il trasporto elettronico: in queste condizioni si programma una serie di impulsi saturanti che portano il valore massimo della fluorescenza a F_m' (minore di F_m), mentre il nuovo valore di fluorescenza minima è portato a F_0' (in genere maggiore di F_0). Quando la frazione di Q_a ossidati è in equilibrio con quella di Q_a ridotti, si raggiunge lo stato stazionario della fotosintesi e il valore della fluorescenza è detto F_t . Il rapporto $\Delta F/F_m'$ (con $\Delta F = F_m' - F_t$) definisce la resa quantica effettiva del PSII (Φ_{PSII}) e rappresenta l'efficienza con cui il PSII è in grado di effettuare il trasporto elettronico.

Per la registrazione della cinetica di fluorescenza, lo strumento è collegato a un PC. L'elaborazione dei dati viene effettuata utilizzando il programma fornito dalla Walz (DA-2000), in grado di determinare anche i componenti del *quenching* della fluorescenza, fotochimico (q_p) e non fotochimico (q_{NP}).

3.2.4. Conducibilità elettrica dei dischetti fogliari

La misurazione della conducibilità elettrica (CE) è stata effettuata, utilizzando il metodo di Beckerson e Hofstra (1980) con alcune modifiche, su 30 porzioni di tessuto fresco di forma quadrata (lato = 0,5 cm), per un totale di tre ripetizioni per varietà. Dopo lavaggio con H₂O distillata, per rimuovere gli elettroliti rilasciati dalla superficie di taglio, i frammenti di tessuto sono stati tamponati con carta assorbente per eliminare l'H₂O in eccesso e posti in agitazione in 20 ml di H₂O distillata, al fine di favorire la diffusione degli elettroliti in soluzione. Ad intervalli regolari di 1 h, per 4 h consecutive, la CE è stata misurata tramite conducimetro (Conducimetro CM 35, CRISON Instruments). Al completamento del rilievo, i contenitori sono stati collocati a -20°C per una notte, al fine di indurre la rottura delle membrane cellulari ed il rilascio totale degli elettroliti. Il giorno successivo, previo scongelamento a temperatura ambiente, si è proceduto ad un ulteriore rilievo della CE. Questi dati sono stati utilizzati per ottenere il Membrane Injury Index (MII), un indice utilizzato per valutare lo stato di integrità delle membrane e determinato usando la formula di Odlum e Blake (1996):

$$MII = (CE_t - CE_c) / (CE_{dc} - CE_c) \times 100$$

dove:

- CE_t = conducibilità elettrica del trattato (in µs, s= Siemens)
- CE_c = conducibilità elettrica del controllo (in µs)
- CE_{dc} = conducibilità elettrica dopo il congelamento (in µs).

Gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte, con un minimo di trenta piante per varietà e per trattamento. I confronti a coppie fra le piante trattate con O₃ e quelle appartenenti alle stesse varietà, allevate in aria filtrata, sono stati analizzati mediante il test *t-Student*. La verifica del rapporto di dipendenza tra variabili (indici di danno e livello di clorosi, Pnet e Gw) è stata effettuata mediante il metodo delle correlazioni.

3.3. Analisi molecolare

3.3.1. Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale è stato estratto da foglie di un anno di piante trattate con O₃ e di controllo seguendo il metodo descritto da Colot e collaboratori (1989).

- 1 Il materiale vegetale (0,5-1 g), dopo l'aggiunta di azoto liquido, è stato polverizzato finemente con pestello e mortaio.
- 2 Il tessuto polverizzato è stato trasferito in un tubo da centrifuga e, dopo completa evaporazione dell'azoto, risospeso in 5 ml di tampone di estrazione (150 mM LiCl; 50 mM tris-idrossimetil-amminometano (Tris)-HCl pH 9,0; 5 mM EDTA; 5% (v/v) di sodio dodecil solfato (SDS).
- 3 Alla sospensione è stato aggiunto un uguale volume di fenolo-cloroformio a pH 8,0 emulsionando il tutto mediante agitazione.
- 4 Il materiale così preparato è stato mantenuto in ghiaccio per 5 minuti e successivamente centrifugato a 4.000 rivoluzioni per minuto (rpm) per 10 minuti alla temperatura di 4°C.
- 5 Al supernatante, trasferito in un nuovo tubo da centrifuga, veniva quindi aggiunto un uguale volume della miscela fenolo-cloroformio. Dopo averlo agitato, il campione è stato centrifugato a 4.000 rpm per 10 minuti alla temperatura di 4°C. Questo passaggio veniva ripetuto tre volte, usando solo cloroformio nell'ultima estrazione.
- 6 Alla fase acquosa, nuovamente trasferita in un tubo da centrifuga, veniva aggiunto LiCl 8 M, in modo da ottenere una concentrazione finale 2 M (333 µl ml⁻¹).
- 7 Il campione veniva quindi lasciato a -20°C per almeno due ore oppure durante tutta la notte.
- 8 Dopo scongelamento, il campione veniva centrifugato a 10.000 rpm per 30 minuti alla temperatura di 4°C.
- 9 Il pellet veniva quindi risospeso in 1 ml di acqua, alla quale era stato aggiunto precedentemente dietil pirocarbonato (DEPC, 1ml l⁻¹ di acqua) e, successivamente, veniva aggiunto LiCl 8 M.
- 10 Il campione veniva quindi lasciato a -20°C per almeno due ore oppure durante tutta la notte.
- 11 Dopo centrifugazione a 15.000 rpm per 30 minuti a 4°C, il pellet veniva risospeso in acqua DEPC ed utilizzato per la purificazione di mRNA, o conservato a -20°C dopo

l'aggiunta di 2,5 volumi di etanolo assoluto e sodio acetato (NaAc) a pH 5,2.

3.3.2. Purificazione dell'mRNA

L'mRNA è stato purificato usando il sistema magnetico PolyATract System IV, secondo la procedura consigliata dal produttore (Promega).

1. 5 mg di RNA totale, sospesi in 500 µl di acqua DEPC, sono stati riscaldati a 65°C per 10 minuti. Al campione sono stati aggiunti 10 µl di sonda biotinilata-oligo (dT), che si è ibridata con la regione poli(A) in 3' dell'mRNA.
2. Gli ibridi formati sono stati catturati aggiungendo alla provetta streptavidina accoppiata a particelle paramagnetiche e poi lavati ad alta stringenza. Mediante un supporto magnetico, la fase solida che si è formata (MagneSphere) è stata ancorata sul fondo della provetta.
3. L'mRNA è stato eluito dalla fase solida con l'aggiunta di acqua deionizzata priva di Rnasi.

3.3.3. Analisi dei trascritti differenziali mediante cDNA-AFLP (cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphisms).

Per l'analisi differenziale dei trascritti estratti da piante trattate con O₃ e di controllo è stata messa a punto una tecnica cDNA-AFLP modificata rispetto a quella classica. Le principali modifiche apportate alla tecnica AFLP standard sono state:

1. l'utilizzazione di un solo enzima di restrizione, di un adattatore e quindi di un solo primer per le successive reazioni di amplificazione;
2. l'aggiunta nelle reazioni PCR di formamide al fine di ottenere bande più intense ed uniformi;
3. la separazione elettroforetica dei prodotti di amplificazione mediante gel denaturanti di poliacrilammide di dimensioni relativamente piccole e di uno spessore maggiore (1 mm) rispetto ai gel di sequenza normalmente utilizzati nei metodi tradizionali di analisi differenziale. Questo al fine di agevolare il successivo rilevamento dei

prodotti di amplificazione, che viene effettuato mediante colorazione con etidio bromuro ed illuminazione UV.

Qui di seguito verranno descritte in dettaglio le diverse fasi che caratterizzano la tecnica utilizzata nell'analisi differenziale.

3.3.3.1. Sintesi del c-DNA

Per la sintesi del primo filamento cDNA la reazione di trascrizione inversa è stata condotta in un volume di 20 µl contenente 5 unità di enzima trascrittasi (ExpandTM Reverse Transcriptase, Roche), il tampone di reazione 5X (Roche), 10 mM DTT, 20 unità di inibitore della Rnasi, una concentrazione pari a 1 mM di ciascun dNTP, 2,5 M di primer oligo (dT)₁₆ e 300 ng di mRNA. In particolare, in provette da 0,5 mL è stata preparata una miscela di 4 µl contenente 300 ng di mRNA (3µl) e 2,5 µM di primer oligo (dT)₁₆ (1 µl) che è stata incubata a 65°C per 10 minuti e lasciata in ghiaccio per almeno 1 minuto. Successivamente, dopo l'aggiunta degli altri reagenti, la reazione di trascrizione inversa è stata effettuata a 42°C per un'ora. Per disattivare l'enzima le provette sono state riscaldate ad una temperatura di 95°C per 2,5 minuti e poi a 5°C per 5 minuti.

La sintesi del secondo filamento cDNA è stata condotta in un volume di 150 µl contenente 10 unità di DNA Polimerasi I (USB Corporation), il tampone di reazione 10X (0,5 M Tris HCl pH 7,5; 0,1 M MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mg/ml BSA), una concentrazione pari a 200 µM di ciascun dNTP ed i 20 µl della reazione di trascrizione inversa. La sintesi del secondo filamento veniva effettuata a 16°C per 2 ore e la reazione veniva successivamente bloccata mediante l'aggiunta di 1 µl di EDTA 0,5 M. Il cDNA è stato quindi estratto con fenolo-cloroformio, precipitato con etanolo e risospeso in 17,5 µl di H₂O deionizzata e conservato, se necessario, a -20°C.

3.3.3.2. Digestione e ligasi del c-DNA

Come già accennato, per questa ricerca sono stati utilizzati tre diversi enzimi di restrizione, con cui sono stati digeriti i doppi filamenti di c-DNA al fine di preparare i templati usati nelle reazioni di ligasi e successive amplificazioni PCR. Le reazioni di digestione e ligasi sono state effettuate contemporaneamente in un volume di 25 µl

contenente: 10 U dell'enzima di restrizione (1 µl), il tampone 10X One-Phor-All (1,4 All) (100 mM Tris-acetato, pH 7,5, 100 mM Mg-acetato, 500 mM K-acetato), 10 mM ATP (1 µl), 50 pmoli di adattatore (1 µl), 2 U dell'enzima T4 DNA ligasi (USB Corporation) (2 µl) e i 17,5 µl in cui è stato risospeso il doppio filamento di cDNA. La reazione è stata condotta per 6 ore a 37°C. Il templatato ligato con l'adattatore è stato quindi precipitato con etanolo al 95%, risospeso in 25 µl di H₂O deionizzata e conservato a -20°C prima della sua utilizzazione nelle successive reazioni di amplificazione.

Per la preparazione dei tre adattatori sono stati utilizzati due primer per ciascun enzima di restrizione:

EcoRI (+) 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'

EcoRI (-) 5'-AATTGGTACGCAGTC-3'

Hind III (+) 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'

Hind III (-) 5'-AGCTGGTACGCAGTC-3'

BamH I (+) 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'

BamH I (-) 5'-GATCGGTACGCAGTC-3'

Per ottenere i tre adattatori, 15 µg del primer (+) e 17 µg del primer (-), da una soluzione stock 1 µg/µl, sono stati diluiti in un volume finale di 60 µl di H₂O deionizzata, riscaldati a 95°C e lasciati raffreddare gradualmente a temperatura ambiente. Questo permette di ottenere una concentrazione finale di 50 pmoli/µl e una quantità sufficiente di adattatore per 60 reazioni di amplificazione.

3.3.3.3. Reazione di amplificazione mediante PCR (RT-PCR)

La reazione di amplificazione è stata condotta in un volume di 22 µl contenenti 20 pmoli di primer, 2% di formamide, 1% di BSA, 1 µl di templatato e 10 µl della miscela di reazione di amplificazione Hot Master Mix contenente: 1 unità di Taq DNA polimerasi, 45 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM per ciascun dNTP. Dopo una fase di denaturazione iniziale di 2 minuti a 94°C la reazione di amplificazione prevedeva 39 cicli, ciascuno a 94°C per 30 secondi, 56°C per 30 secondi, 72°C per 1,5 minuti, seguiti da una estensione finale a 72°C per 7 minuti.

Per le reazioni di amplificazione sono stati utilizzati 40 primer *EcoRI*: 4 con un nucleotide selettivo, 10 con due e 26 con tre; 40 primer *HindIII*: 10 con due basi selettive e 30 con tre; 25 primer *BamHI*: 8 con due basi selettive e 17 con tre. Ogni primer comprendeva una sequenza di DNA complementare alla sequenza dell'adattatore ed al sito di ognuno dei tre enzimi di restrizione, con l'aggiunta arbitraria di una, due o tre basi all'estremità del primer.

3.3.3.4. Separazione elettroforetica dei prodotti di amplificazione

La separazione elettroforetica dei prodotti cDNA-AFLP è stata effettuata su gel di poliacrilammide, in condizioni denaturanti, utilizzando un sistema elettroforetico Hoefer, con gel di dimensioni 18x24 cm e spessore di 1 mm. I prodotti di amplificazione sono stati separati in un sistema discontinuo in tampone di corsa 25 mM Tris e 192 mM glicina con un pH finale pari a 8,8. In questo sistema si utilizzano due tipi di gel: il gel di separazione (separating o main gel) ed il gel di impilamento (stacking gel). Nel "main gel", contenente un tampone 375 mM Tris-HCl pH 8,8 e 7 M urea, la concentrazione dei due monomeri (acrilammide e bis-acrilammide), espressa da T, era uguale al 15%, mentre la concentrazione del legante incrociato (bis-acrilammide), espressa da C, risultava uguale al 2,67%. Per la polimerizzazione del "main gel" sono stati aggiunti $2,5 \times 10^{-5}$ volumi di una soluzione di ammonio persolfato (APS) al 10% e 5×10^{-4} volumi di tetrametiletilenediammina (TEMED). Nel gel di impilamento, contenente un tampone 125 mM Tris-HCl pH 6,8, T risultava uguale al 3,75%, mentre C (2,67%) era identica al gel di separazione. Per la polimerizzazione dello "stacking gel" sono stati aggiunti 5×10^{-3} volumi di APS e 1×10^{-3} volumi di TEMED. Dopo la polimerizzazione del gel di impilamento e il lavaggio dei pozzetti, effettuato con una siringa per allontanare i residui di acrilammide non polimerizzata, in ciascun pozzetto sono stati caricati 15 µl della reazione di amplificazione. La separazione è stata condotta a corrente costante (12 mA per gel) per circa 16 ore. Dopo la separazione i gel sono stati trasferiti in una vaschetta di vetro contenente una soluzione $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ di etidio bromuro per il rilevamento dei prodotti di amplificazione, che è stato effettuato dopo 2-3 ore ponendo il gel su un transilluminatore a luce ultravioletta.

3.3.3.5. Recupero delle bande differenziali e loro amplificazione

Le bande differenziali sono state prelevate dal gel di poliacrilammide, mediante una lama da bisturi sterile, ed il frammento di gel è stato posto in una provetta da 1,5 ml contenente 100 μl di acqua deionizzata e sterilizzata, che è stata lasciata per almeno 24 ore a 4°C. Successivamente la provetta è stata posta a 37°C per 2 ore e la soluzione contenente la banda eluita è stata concentrata a 10 μl , 5 dei quali venivano utilizzati come stampo per la reazione di amplificazione con il relativo primer, a seconda che si trattasse di *EcoRI*, di *HindIII* o *BamHI*, nelle stesse condizioni descritte nel paragrafo 3.3.3.3.

3.3.3.6. Clonazione dei prodotti di amplificazione differenziali

Le bande differenziali riamplicate sono state separate in gel di agarosio all'1,5% contenente 0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ di etidio bromuro. I prodotti di amplificazione sono stati prelevati da gel e purificati mediante il kit Sephaglas BandPrep (Amersham Pharmacia).

L'agarosio contenente la banda di amplificazione è stato disciolto in tampone di solubilizzazione a 65°C per 5-10 minuti. Successivamente è stata aggiunta la resina Sephaglas BP e la soluzione è stata lasciata ad incubare per 5 minuti a temperatura ambiente, in modo che il DNA venisse adsorbito sulla resina. Dopo centrifugazione, il pellet è stato lavato per tre volte con il tampone di lavaggio (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA e 0,1 mM NaCl) addizionato con etanolo assoluto. Il pellet, costituito dalla resina e dal DNA, è stato lasciato ad essiccare all'aria e quindi il DNA è stato eluito con tampone di eluizione (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 e 1 mM EDTA).

I prodotti di amplificazione differenziali sono stati inseriti mediante ligasi nel sito di restrizione modificato *EcoRV* del vettore plasmidico pGEM-T (Promega). La trasformazione è stata eseguita in cellule competenti di *Escherichia coli*, ceppo DH5 α . Le cellule sono state piastrate su terreno di coltura LB (Luria Bertani) contenente ampicillina (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$), necessaria per selezionare le cellule contenenti il plasmide, dato che quest'ultimo reca un gene *amp^r* per la resistenza a questo antibiotico. Analogamente l'aggiunta al terreno di coltura contenente X-gal, un analogo cromogenico del galattosio, ha permesso la selezione delle cellule contenenti plasmidi ricombinanti. Questi ultimi, dopo essere stati estratti, sono stati digeriti con gli enzimi *EcoRI* e *NotI*, i cui siti di restrizione sono presenti alle due estremità del polylinker del vettore plasmidico pGEM-T, e separati elettroforeticamente su gel di

agarosio, insieme al marcatore costituito da DNA del batteriofago λ digerito con *HindIII* e *EcoRI*, per valutare le dimensioni dei frammenti inseriti.

3.3.4. Estrazione e purificazione di plasmidi da batteri

I batteri sono stati inoculati in 1,5 ml di terreno di coltura LB contenente $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ di ampicillina. La coltura batterica è stata incubata a 37°C per 18-20 ore e quindi trasferita in una provetta da 1,5 ml e centrifugata (Microfuge) a 1200 rpm per 1 minuto facendo precipitare i batteri. Rimosso il supernatante, il pellet è stato risospeso in 1 ml di TE pH 7,4 usando il vortex. Dopo una nuova centrifugazione, il pellet è stato risospeso in $150 \mu\text{l}$ di 20% (p/v) saccarosio, 50 mM EDTA e 50 mM Tris (SET). Alla sospensione sono stati quindi aggiunti $350 \mu\text{l}$ di “Mistura litica” [0,2 M NaOH e 1% (v/v) SDS] e, dopo aver mescolato delicatamente, le provette sono state incubate in ghiaccio per 10 minuti. Sono stati quindi aggiunti $250 \mu\text{l}$ di potassio acetato 3 M, pH 5,2, affinché precipitassero le pareti cellulari e le proteine degradate. I campioni sono stati agitati delicatamente e incubati nuovamente in ghiaccio per 15-20 minuti prima di centrifugarli a 1200 rpm (Microfuge) per 10 minuti. A questo punto il supernatante è stato trasferito in provette nuove. L’aggiunta di un uguale volume di 2-propanolo a -20°C ha precipitato il DNA plasmidico e, dopo centrifugazione ed eliminazione del supernatante, il pellet è stato essiccato per 10-15 minuti per mezzo di una pompa da vuoto e risospeso in $20 \mu\text{l}$ di TE. L’RNA presente nel campione veniva digerito aggiungendo $1 \mu\text{g}$ di RNasi per 20 minuti a 37°C . Per l’analisi delle sequenze è stata effettuata una purificazione mediante il “Plasmid Mini Prep Kit” della Quiagen.

3.4. Determinazione ed analisi delle sequenze nucleotidiche

Le sequenze nucleotidiche sono state determinate con il metodo di Sanger (Sanger *et al.*, 1977) utilizzando il kit ABI Prism Dye Terminator DNA Sequencing della Perkin Elmer. L’amplificazione è stata condotta in $20 \mu\text{l}$ totali di miscela di reazione, contenenti $8 \mu\text{l}$ di Terminator Ready Reaction Mix, fornito dalla Perkin Elmer (contenente l’AmpliTaQ DNA Polimerasi), $3,2 \text{ pmol}$ di primer vettore-specifico e, come stampo, circa 200 ng di DNA plasmidico. Tutti i cloni sono stati sequenziati utilizzando i primer:

T7 (5'- AATACGACTCACTATAG) e

SP6 (5'-TACAGGAAACAGCTATGACC-3').

Le reazioni sono state condotte utilizzando il seguente programma: 96°C per 10 secondi, 50°C per 5 secondi, 60°C per 4 minuti per 25 cicli, seguiti da raffreddamento a 4°C. L'analisi delle sequenze amplificate è stata condotta utilizzando un sistema di separazione dei frammenti amplificati tramite elettroforesi capillare.

I dati relativi alle sequenze ottenute sono state analizzati mediante il software DNAMAN (Sequence Analysis Software for Windows) (Lynnon BioSoft, 1999) per rimuovere le sequenze nucleotidiche del vettore e correggere eventuali errori.

L'esistenza di sequenze omologhe già caratterizzate dei diversi cloni ottenuti è stata verificata mediante ricerca in diverse banche dati proteiche (GenBank, PDB, SwissProt, PIR e PRF), nucleotidiche (EMBL, Genbank, DDBJ e PDB) ed EST (GenBank, EMBL e DDBJ) con il programma BLAST (Altschul *et al.*, 1997) utilizzando EMB-BLAST (European Molecular Biology network – Swiss node -), disponibile presso il sito Internet:

<http://www.ch.embnet.org/software/aBLAST.html>.

In particolare, il confronto con le banche dati nucleotidiche e EST è stato effettuato tramite il programma BLASTN, mentre tutti i sei possibili “reading frames” dei trascritti differenziali isolati sono stati confrontati nelle banche proteiche con il programma BLASTX. Questi programmi effettuano confronti singoli (a coppia) tra la sequenza isolata da caratterizzare e tutte le sequenze presenti in una determinata banca dati. Per ogni confronto viene calcolato uno “score”, che è un indice del grado di similarità tra la sequenza incognita isolata e quella da confrontare presente in banca dati. I valori di “score” considerati indicativi di una similarità significativa sono stati: ≥ 200 per le ricerche effettuate in banche dati di sequenze nucleotidiche con il programma BLASTN; ≥ 150 per quelle effettuate in dbEST con lo stesso programma; e ≥ 80 per le ricerche effettuate nelle banche dati proteiche con il programma BLASTX. Questi valori sono stati precedentemente utilizzati per l'analisi delle sequenze EST isolate da diverse specie vegetali (Newman *et al.*, 1994; Cooke *et al.*, 1996; Faccioli *et al.*, 2001).

3.5. Analisi dell'espressione delle sequenze cDNA amplificate differenzialmente in seguito ad esposizione all'O₃.

Dopo la determinazione delle sequenze nucleotidiche sono stati disegnati dei primer specifici per ciascuno dei 45 cloni derivanti da trascritti indotti da ozono e la loro espressione in piante controllo e trattate è stata verificata mediante analisi RT-PCR. La reazione di trascrizione inversa è stata condotta secondo quanto descritto nel paragrafo 3.3.3.1., con la sola differenza che come template per la sintesi del primo filamento cDNA sono stati utilizzati 5 µg di RNA totale anzichè 300 ng di mRNA. Le reazioni di amplificazione PCR in condizioni di elevata specificità sono state condotte utilizzando il sistema Expand Long Template PCR (Roche) con il relativo tampone di reazione 3 in dotazione (10X PCR buffer con 22,5 mM di MgCl₂). Il volume finale della reazione era di 50 µl e conteneva 0,75 µl di una miscela di Taq e Pwo DNA polimerasi, il tampone di reazione 10X, una concentrazione pari a 500 µM di ciascun dNTP, 0,25µM di ciascun primer specifico per le diverse sequenze espresse differenzialmente e 5 µl di reazione di trascrittasi inversa come stampo. Come controllo della qualità dell'mRNA estratto dalle foglie, sono state condotte analisi RT-PCR utilizzando due specifiche sequenze oligonucleotidiche dei geni codificanti per la β-tubulina in frumento:

TUB-F1 5'-TCTTCATGGTGGGCTTCGC- 3' e

TUB-R1 5'-CGCCTCGGGTGAAGTCCATCT-3'.

Questa coppia di primers è stata sintetizzata in modo da amplificare una zona conservata di 440 paia di basi (bp) della regione codificante C-terminale dei 5 geni della β-tubulina di frumento riportati in banca dati (N° di accessione U76744, U76745, U76746, U76895, U76896).

Dopo denaturazione iniziale a 94°C per 2 minuti, sono seguiti una serie di cicli di amplificazione, ciascuno così composto: 94°C per 30 secondi, 60-63°C per 1 minuto, a seconda della temperatura ottimale di annealing di ogni coppia di primer, 68°C per 2 minuti. Le reazioni di amplificazione sono state condotte utilizzando un numero di cicli variabile da 20 a 30 per evidenziare le reali differenze nel livello di trascrizione dei diversi geni analizzati, in modo tale da evitare che i prodotti RT-PCR ottenuti nelle diverse condizioni sperimentali analizzate presentassero la stessa intensità solo a causa del raggiungimento del punto di "plateau" durante l'amplificazione.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Risposta differenziale all'ozono di sedici varietà italiane di frumento duro valutata sulla base della manifestazione di sintomi e di una serie di parametri fisiologici.

L'esposizione all'O₃ ha indotto la manifestazione di sintomi, che si presentano sotto forma di aree necrotiche bianco-avorio bifacciali (Fig. 4.1), in tutte le 16 varietà di frumento duro esaminate, sebbene con intensità variabile, mostrato in Fig. 4.2 nelle varietà Mongibello e Portorico. Come evidenziato in Tab. 4.1, in tredici di esse i sintomi sono comparsi 48 h dopo la fumigazione, mentre in Latino, Meridiano e Mongibello il danno fogliare è stato osservato già dopo 24 h dalla fine del trattamento.



Fig. 4.1 – Sintomi sulla prima foglia di frumento duro dopo esposizione ad un singolo impulso di ozono (200 ppb, 5 h) (A); ingrandimento allo stereomicroscopio (B).



Fig. 4.2 - Sintomi sulla prima foglia di frumento duro dopo esposizione ad un singolo impulso di ozono (200 ppb, 5 h) in Mongibello (A) e Portorico (B) (ingrandimento allo stereomicroscopio). I cerchi in rosso circoscrivono le aree necrotiche bianche avorio indotte dal trattamento con ozono e indicano la diversa rilevanza dei sintomi nelle due varietà.

Mongibello è la varietà con incidenza più elevata, mentre Portorico, Orobel e Iride mostrano i valori minimi (Tab. 4.1). Tra queste ultime, inoltre, solo pochi degli individui analizzati presentavano sintomi macroscopici. La comparsa di clorosi fogliare è stata valutata dopo 5 h dalla fine della fumigazione e al momento della comparsa delle necrosi. Nel primo caso, soltanto Appio presentava una riduzione statisticamente significativa del contenuto relativo in clorofilla (-5,6%); nel secondo, invece, in sette varietà sono stati registrati decrementi statisticamente significativi, con riduzioni percentuali che variavano, rispetto ai controlli, tra il 4,9 e il 16,7%, la diminuzione più elevata essendo stata evidenziata in Vetrodur. L'analisi della correlazione indicava che la superficie necrotizzata e il livello di clorosi fogliare non erano significativamente correlati ($R^2 = 0,003$).

Tab. 4.1 - Indice di Mackinney, riduzione percentuale del contenuto relativo in clorofilla del trattato rispetto al controllo allevato in aria filtrata e tempo di manifestazione dei sintomi nelle prime foglie delle 16 varietà di *Triticum durum* esposte a un singolo impulso di ozono (200 ppb, 5 h). Il simbolo “-” indica l’assenza di valori statisticamente significativi.

Varietà	Tempo di manifestazione dei sintomi dopo la fine della fumigazione (h)	Indice di Mackinney	Contenuto relativo in clorofilla (%)
Mongibello	24	6,18	-4,9
Appio	48	4,32	-10,8
Duilio	48	3,54	-
Svevo	48	3,23	-
Simeto	48	3,08	-
Flaminio	48	2,45	-
Vetrodur	48	2,37	-16,7
Latino	24	2,25	-
Portobello	48	2,09	-
San Carlo	48	1,93	-9,5
Meridiano	24	1,90	-4,9
Neodur	48	1,81	-7,1
Claudio	48	1,70	-
Portorico	48	1,34	-
Orobel	48	1,32	-
Iride	48	1,28	-

Nelle Tabelle 4.2 A e B sono riportate le variazioni percentuali dei parametri relativi agli scambi gassosi ed alla fluorescenza della clorofilla *a*, osservate nelle piante trattate rispetto a quelle allevate in aria filtrata, a distanza di 5 e 24 h dalla fumigazione.

A)

Varietà	Pnet	Gw	Ci	Fv/Fm
Mongibello	-40,6	-	-	-1,71
Portobello	-33,3	-54,4	-15,9	-2,44
Duilio	-25,5	-	-	-1,76
Flaminio	-24,6	-29,5	-	-0,92
Portorico	-23,6	-41,6	-18,7	-
Appio	-21,4	-45,1	-	-3,44
Claudio	-	-	-	-
Iride	-	-	-	-
Latino	-	-21,7	-12,2	-
Meridiano	-	-	-	-
Neodur	-	-	-	-
Orobel	-	+24,6	+14,0	-1,95
San Carlo	-	-	-	-
Simeto	-	-	-	-
Svevo	-	-	-	-
Vetrodur	-	-	-	-

B)

Varietà	Pnet	Gw	Ci	Fv/Fm
Duilio	-41,2	-	-24,2	-1,5
Orobel	-35,0	-	+8,0	-1,1
Simeto	-34,8	-53,5	-	-
Mongibello	-29,7	-	-	-1,5
Appio	-25,4	-	-	-2,1
Meridiano	-11,5	-25,5	-	-
Latino	-12,7	-28,6	-	-
Portorico	-	-34,9	-	-
Claudio	-	-	-	-
Iride	-	-	-	-
Flaminio	-	-	-	-
Neodur	-	-	-	-
Portobello	-	-	-	-
San Carlo	-	-	-	-
Svevo	-	-	-	-
Vetrodur	-	-	-	-

Tab. 4.2 - Variazioni percentuali dei parametri relativi agli scambi gassosi fotosintetici e alla fluorescenza della clorofilla *a* rilevati su 16 varietà di *Triticum durum* esposte ad un singolo impulso di ozono (200 ppb, 5 h). Il simbolo “-” indica l’assenza di valori statisticamente significativi. I rilievi sono stati effettuati a 5 **(A)** e 24 h **(B)** dopo la fine della fumigazione. Pnet, attività fotosintetica; Gw, conduttanza stomatica; Ci, concentrazione intercellulare di CO₂; F_v/F_m, rapporto tra la fluorescenza variabile e quella massima.

Sulla base dei risultati relativi ai parametri utilizzati per valutare l'integrità funzionale dell'apparato fotosintetico, le 16 varietà possono essere suddivise in tre gruppi con risposta differenziale all'O₃:

- *gruppo 1*: varietà che mostrano riduzioni significative dell'attività fotosintetica, ma non di conduttanza stomatica (Appio, Duilio, Mongibello, Orobel);
- *gruppo 2*: varietà che mostrano riduzioni significative di attività fotosintetica e di conduttanza stomatica (Flaminio, Latino, Meridiano, Portobello, Portorico, Simeto);
- *gruppo 3*: varietà che non mostrano alterazioni di attività fotosintetica (Claudio, Iride, Neodur, San Carlo, Svevo, Vetrodur).

Le varietà appartenenti al primo gruppo presentano decrementi statisticamente significativi di attività fotosintetica, con riduzioni percentuali che variano, rispetto ai controlli, tra 21,4 e 41,2%, la diminuzione più elevata è stata evidenziata in Duilio (Tab. 4.2). La riduzione del livello di fissazione della CO₂ non è accompagnata da una proporzionale diminuzione dei valori di Gw, dimostrando quindi che esse non sono in grado di contrastare la penetrazione dell'inquinante tramite la chiusura stomatica. L'analisi della correlazione (Tab. 4.3) mostra che, nelle varietà appartenenti a questo gruppo, c'è disaccoppiamento fra Pnet e Gw ($R^2 < 0,40$), quindi l'aumento dei valori di Gw non è accompagnato da un aumento proporzionale dei livelli di Pnet. Questo risultato indica che le cadute di Pnet sono causate dal funzionamento non corretto del mesofillo e, quindi, da una ridotta capacità di fissare la CO₂. Mongibello, Duilio e Appio, che presentano anche l'indice di Mackinney più elevato (Tab. 4.1), mostrano diminuzioni significative di Pnet sia dopo 5 h dalla fine del trattamento (pari a -40,6, -25,5 e -21,4%, rispettivamente) che dopo 24 h (pari a -29,7, -41,2 e -25,4%, rispettivamente). Anche Orobel, pur presentando un indice di danno fra i più bassi registrati (1,32 in Tab. 4.1), mostra diminuzioni significative di Pnet, che si osservano, però, soltanto a distanza di 24 h dalla fine della fumigazione. Dopo 5 h dal trattamento, infatti, si osserva un incremento significativo di Gw (+24,6%) e di Ci (+14,0%). Questo aumento di CO₂ intercellulare potrebbe essere in parte dovuto alla maggiore apertura stomatica, ma i risultati ottenuti dopo 24 h dal trattamento con l'inquinante lasciano supporre che in questa varietà si è verificato anche un danno a livello del mesofillo. La Pnet risulta diminuita, infatti, del 35,0% rispetto alle stesse piante mantenute in aria filtrata, mentre la Gw presenta valori non significativamente diversi dai controlli e la Ci, invece, continua a mostrare un aumento significativo, pari all'8,0%. Che l'O₃ abbia provocato alterazioni al funzionamento del

mesofillo è confermato dal fatto che la riduzione di Pnet si registra anche a distanza di 48 h dalla fine del trattamento (-43,1% rispetto alle stesse piante mantenute in aria filtrata). Il comportamento di Orobel dimostra, quindi, quanto già sostenuto da altri Autori, i quali affermano che i danni visibili non sono un indice significativo dell'effetto dell'O₃ sul frumento (Davison e Barnes, 1998; Ollerenshaw e Lyons, 1999). Nella varietà Appio, a 5 h dalla fine della fumigazione, si osserva una riduzione significativa di Gw (-45,1%) e di Pnet (-21,4%). La diminuzione dei valori di Gw potrebbe essere, quindi, la causa della caduta di Pnet. Tuttavia, a 24 h di distanza dal trattamento, nonostante i valori di Gw tornino ad essere non significativamente diversi dai controlli, i valori di Pnet si mantengono su livelli notevolmente inferiori (-25,4%). In Mongibello e Duilio, dopo 5 e 24 h dal trattamento, si hanno riduzioni significative della Pnet, mentre non si segnalano riduzioni di Gw (Tab. 4.2).

Tab. 4.3 - Correlazioni relative ad attività fotosintetica e conduttanza stomatica nelle varietà di *Triticum durum* che hanno mostrato riduzioni percentuali significative di attività fotosintetica dopo 5 e/o 24 h dalla fine della fumigazione (200 ppb, 5 h). R² corrisponde al coefficiente di determinazione.

Varietà	Equazione	R ²
Appio	$y = 42,6 + 12,6 x$	0,14
Duilio	$y = 22,3 + 9,2 x$	0,37
Flaminio	$y = -25,7 + 23,4 x$	0,49
Latino	$y = 60,8 + 9,4 x$	0,01
Meridiano	$y = 89,9 + 38,8 x$	0,46
Mongibello	$y = 57,7 + 15,4 x$	0,14
Orobel	$y = 55,1 + 8,3 x$	0,03
Portobello	$y = -70,3 + 35,4 x$	0,71
Portorico	$y = -126,5 + 41,6 x$	0,72
Simeto	$y = -29,7 + 22,5 x$	0,69

L'analisi della fluorescenza della clorofilla *a* mostra che nelle varietà appartenenti al primo gruppo il parametro F_v/F_m è significativamente disturbato dal trattamento (Tabelle 4.2), evidenziando verosimilmente la presenza di fotoinibizione e confermando l'alterazione dell'attività del mesofillo. Un effetto negativo su F_v/F_m, dovuto ad O₃ associato ad una diminuzione della Pnet, è indicativo di un effetto primario dell'O₃ sulla fase oscura della fotosintesi (Gupta *et al.*, 1991; Reichenauer *et al.*, 1997).

Le varietà appartenenti al secondo gruppo mostrano effetti macroscopici estremamente variabili, con incidenza compresa tra 3,08 in Simeto e 1,34 in Portorico (Tab. 4.1). La Pnet risulta significativamente ridotta a 5 h o a 24 h dalla fine del trattamento e questa diminuzione è, tuttavia, correlata ad una risposta stomatica ($R^2 > 0,40$). All'interno di questo gruppo si evidenziano tre tipi di risposta differenziale all'O₃. Alcune *cultivar*, ovvero Flaminio, Portobello e Portorico, presentano una risposta allo stress causato dall'inquinante già dopo 5 h dal trattamento, con riduzioni significative del livello di fissazione di CO₂ e una forte limitazione stomatica; la riduzione di Gw, infatti, avviene con percentuali molto alte, variabili tra 29,5 e 54,4% rispetto ai controlli, la diminuzione più elevata essendo stata evidenziata in Portobello. Le varietà Simeto e Meridiano, invece, non mostrano alterazioni significative dei parametri di scambi gassosi a 5 h dalla fine della fumigazione, mentre dopo 24 h presentano cadute significative di Pnet (34,8 e 11,5%) e Gw (53,5 e 25,5%) (Tab. 4.2). Queste riduzioni nella fissazione della CO₂ sono evidentemente dovute al meccanismo di chiusura stomatica che si è attivato a distanza di 24 h dal trattamento. Latino, infine, mostra una riduzione significativa di Gw (-21,7%) già dopo 5 h dal trattamento, associata anche a una riduzione di Ci (-12,2%), ma riesce a mantenere la Pnet su valori non significativamente diversi dai controlli; dopo 24 h, invece, si registra una diminuzione di Pnet del 12,7%, ma questa riduzione è dovuta al fatto che Latino continua a mantenere gli stomi chiusi anche a 24 h di distanza dalla fumigazione, come dimostrano i valori di Gw ancora inferiori ai controlli (-28,6%). La diminuzione della fissazione di CO₂ e della Gw come conseguenza dell'esposizione ad O₃ è stata ben documentata in altre specie vegetali (Farage *et al.*, 1991; Nie *et al.*, 1993; Ciompi *et al.*, 1997; Guidi *et al.*, 2004). I risultati osservati sono in accordo con quanto riportato da altri Autori sulla risposta stomatica di varietà di *Triticum* (Amundson *et al.*, 1987; Winner *et al.*, 1988), i quali hanno osservato come, in seguito a trattamenti con O₃, le piante reagiscono con una diminuzione dei valori di Gw. In effetti, secondo la “teoria generale di risposta agli stress” di Levitt (1980), la pianta tenterebbe di “escludere” fisicamente l'O₃, impedendone la penetrazione tramite le aperture stomatiche.

Infine le varietà appartenenti al terzo gruppo non presentano alterazioni dei parametri degli scambi gassosi, né a 5 né a 24 h di distanza dalla fine del trattamento. In effetti, esse sembrano non risentire dello stress causato dall'O₃, dal momento che non mostrano riduzioni significative del livello di fissazione della CO₂ né di Gw. All'interno di questo gruppo, tuttavia, si registrano effetti macroscopici molto variabili, dato che le varietà presentano indici di Mackinney variabili tra 3,23 in Simeto e 1,28 in Iride (Tab. 4.1).

Nella tabella 4.4 è riportato un quadro riassuntivo dei risultati relativi alla diagnosi sintomatica ed alle analisi fisiologiche delle 16 varietà di frumento duro, distinte nei tre

gruppi con risposta contrastante all'ozono sulla base dei dati ottenuti per le misurazioni degli scambi gassosi fotosintetici. Riassumendo i risultati della prima fase di attività di ricerca, al primo gruppo sono state assegnate 4 varietà (Appio, Duilio, Mongibello, Orobel) per le quali sono state evidenziate riduzioni percentuali significative dell'attività fotosintetica rispetto ai controlli, senza riscontrare variazioni significative per i valori di conduttanza stomatica, indicando che queste varietà non sono in grado di contrastare la penetrazione dell'inquinante tramite la chiusura stomatica. La riduzione dell'attività fotosintetica potrebbe essere ascritta ad un non corretto funzionamento del mesofillo, come evidenziato dalle diminuzioni percentuali significative riscontrate rispetto ai controlli per il rapporto F_v/F_m che è un indice dell'efficienza fotochimica ottimale del PSII. Ad eccezione di Orobel, questo gruppo di varietà presenta i valori dell'indice di Mackinney tra i più elevati e per tutte sono stati rilevati aumenti significativi per il Membrane Injury Index (MII %), un indice utilizzato per valutare lo stato di integrità delle membrane. Le varietà appartenenti al secondo gruppo (Flaminio, Latino, Meridiano, Portobello, Portorico, Simeto) mostrano riduzioni significative dell'attività fotosintetica, correlate ad una sensibile limitazione stomatica e con riduzioni percentuali di conduttanza stomatica molto elevate già dopo 5h dal trattamento, indicando che queste varietà tentano di limitare i danni provocati dall'ozono escludendo fisicamente l'inquinante mediante la chiusura degli stomi. E' interessante notare, comunque, come a livello sintomatologico le varietà appartenenti a questo secondo gruppo manifestino una risposta all'inquinante molto variabile, con valori di incidenza delle lesioni necrotiche compresi tra 3,08 in Simeto e 1,34 in Portorico. Infine le sei varietà appartenenti al terzo gruppo sembrano non risentire dello stress ossidativo causato dall'ozono, dal momento che non mostrano riduzioni significative del livello di fissazione della CO_2 , della conduttanza stomatica e dei parametri legati all'analisi della fluorescenza della clorofilla *a*. All'interno di questo gruppo si registrano, tuttavia, effetti macroscopici molto variabili, con valori di indice del danno compresi tra 3,23 in Svevo ed 1,28 in Iride, il più basso tra le 16 varietà. Incrementi significativi dei valori di MII sono stati osservati in Svevo, Vetrodur e S. Carlo sia dopo 5 che 24h dal trattamento, indicando che in queste varietà la fumigazione ha indotto delle lesioni alle membrane.

Sulla base di questi risultati la varietà mediamente tollerante Portorico, appartenente al secondo gruppo, e, solo nella prima fase di attività, la varietà suscettibile Duilio, appartenente al primo gruppo, sono state utilizzate per l'analisi differenziale. Per alcune delle sequenze identificate mediante cDNA-AFLP e clonate sono state condotte analisi di espressione, mediante RT-PCR, in sei varietà di frumento duro selezionate per la risposta contrastante allo stress da ozono: oltre che in Duilio e Portorico, anche nelle varietà suscettibili Mongibello e Appio e nelle varietà tolleranti Claudio e Iride.

Tab. 4.4 – Indice di Mackinney, Membrane Injury Index (MII, %) e variazioni percentuali relative agli scambi gassosi fotosintetici (Pnet, GW) e alla fluorescenza della clorofilla a (Fv/Fm) rilevati su 16 varietà di frumento duro distinte in tre gruppi per la loro risposta contrastante all'O₃.

VARIETA'	Indice Mackinney	MII		Pnet (%)		GW (%)		Fv/Fm (%)	
		5h	24h	5h	24h	5h	24h	5h	24h
1) Mongibello	6,18	6,92	4,52	-40,6	-29,7	-	-	-1,71	-1,5
2) Duilio	3,54	3,12	2,02	-25,5	-41,2	-	-	-1,76	-1,5
3) Appio	4,32	2,30	-	-21,4	-25,4	-45,1	-	-3,44	-2,1
4) Orobel	1,37	1,27	1,15	-	-35,0	24,6	-	-1,95	-1,1
5) Flaminio	2,45	1,32	-	-24,6	-	-29,5	-	-0,92	-
6) Portobello	2,09	2,61	-	-33,3	-15,9	-54,4	-	-2,44	-
7) Simeto	3,08	-	-	-	-34,8	-	-53,5	-	-
8) Meridiano	1,90	3,14	2,27	-	-11,5	-	-25,5	-	-
9) Portorico	1,34	-	-	-23,6	-	-41,6	-34,9	-	-
10) Latino	2,25	-	1,57	-	-12,7	-21,7	-28,6	-	-
11) Svevo	3,23	3,65	4,40	-	-	-	-	-	-
12) Vetrodur	2,37	2,89	2,80	-	-	-	-	-	-
13) San Carlo	1,93	2,14	2,15	-	-	-	-	-	-
14) Neodur	1,81	-	-	-	-	-	-	-	-
15) Claudio	1,70	-	-	-	-	-	-	-	-
16) Iride	1,28	-	-	-	-	-	-	-	-

4.2. Identificazione mediante cDNA-AFLP dei trascritti indotti da O₃.

Da foglie di piante trattate con O₃ e di controllo è stato estratto l'RNA totale, dal quale è stato purificato l'mRNA. L'analisi differenziale dei trascritti è stata effettuata mediante una tecnica cDNA-AFLP modificata e precedentemente utilizzata in uno studio dell'espressione genica indotta da O₃ in *Phillyrea latifolia* (Miraldi, 2005). Come descritto nei materiali e metodi, le principali modifiche apportate alla tecnica standard sono state: 1) l'utilizzazione di un singolo enzima di restrizione, di un solo adattatore e di un solo primer; 2) l'aggiunta di formammide durante le amplificazioni PCR al fine di ottenere bande più intense ed uniformi; 3) la separazione elettroforetica dei frammenti cDNA mediante gel denaturanti di poliacrilammide colorati con etidio bromuro. Questo metodo modificato risulta sensibilmente meno costoso e

prevede un numero notevolmente inferiore di passaggi rispetto al metodo cDNA-AFLP convenzionale, pur mantenendo un'elevata riproducibilità ed un potere analitico uguale o superiore al metodo del “*differential display*” (DDRT-PCR).

Il doppio filamento di cDNA sintetizzato da mRNA estratto da piante trattate e di controllo, è stato digerito separatamente con tre enzimi di restrizione, *EcoRI* (Duilio e Portorico), *HindIII* e *BamHI* (Portorico), per la preparazione dei templati usati nelle successive reazioni di ligasi e di amplificazione, per le quali sono stati utilizzati 40 primer *EcoRI*, 40 primer *HindIII* e 25 primer *BamHI* come descritto al paragrafo 3.3.3.3. Per i templati preparati con i tre enzimi di restrizione l'amplificazione con i 4 primer aventi un solo nucleotide selettivo ha prodotto un numero molto elevato di bande, determinato dall'amplificazione aspecifica di sequenze mRNA. L'aggiunta di un secondo o di un terzo nucleotide selettivo ha ridotto il numero dei prodotti di amplificazione ad una media di circa 15 per ciascun primer e con dimensioni comprese tra 0,1 e 1,5 kb, migliorando la specificità e permettendo di rilevare geni con un livello più basso di espressione (Figure 4.3, 4.4 e 4.5). Quattro dei 93 primer selezionati non hanno rilevato differenze nei profili di amplificazione dei trascritti delle piante trattate e di controllo (ad esempio profili 11 e 12 in Fig. 4.3 e profili 15 e 16 in Fig. 4.4), mentre i rimanenti 89 hanno prodotto profili di espressione diversi, con un numero di trascritti differenziali nelle piante ozonate, ben distinguibili da quelli delle piante di controllo, compreso tra uno (profili 21 e 22 in Fig. 4.4) e cinque (profili 11 e 12 in Fig. 4.4).

L'affidabilità e riproducibilità dei profili di amplificazione è stata verificata effettuando due esperimenti indipendenti con 12 (4 per ciascuno dei tre enzimi utilizzati) degli 89 primer selezionati, costituiti da 2 sequenze rispettivamente con due e tre nucleotidi selettivi (dati non mostrati).

L'analisi di circa 2500 prodotti di amplificazione dei trascritti da piante trattate e di controllo ha permesso di identificare 236 prodotti differenziali, 165 O₃-indotti (presenti nelle piante trattate ma non in quelle di controllo) e 71 O₃-soppressi (presenti nelle piante di controllo ma non in quelle ozonate). In particolare, utilizzando i 36 primer *EcoRI* sono stati identificati 80 prodotti differenziali, di cui 55 O₃-indotti (35 in Duilio e 20 in Portorico) e 25 O₃-soppressi (15 in Duilio e 10 in Portorico); con i 36 primer *HindIII* sono stati identificati 98 prodotti differenziali (70 O₃-indotti e 28 O₃ soppressi in Portorico); con i 21 primer *BamHI* sono stati rilevati 58 frammenti differenziali (40 O₃-indotti e 18 O₃-soppressi in Portorico). Poiché l'obiettivo della presente ricerca era quello di studiare l'espressione genica attivata dall'ozono, sono stati clonati e successivamente caratterizzati solo i prodotti differenziali indotti.

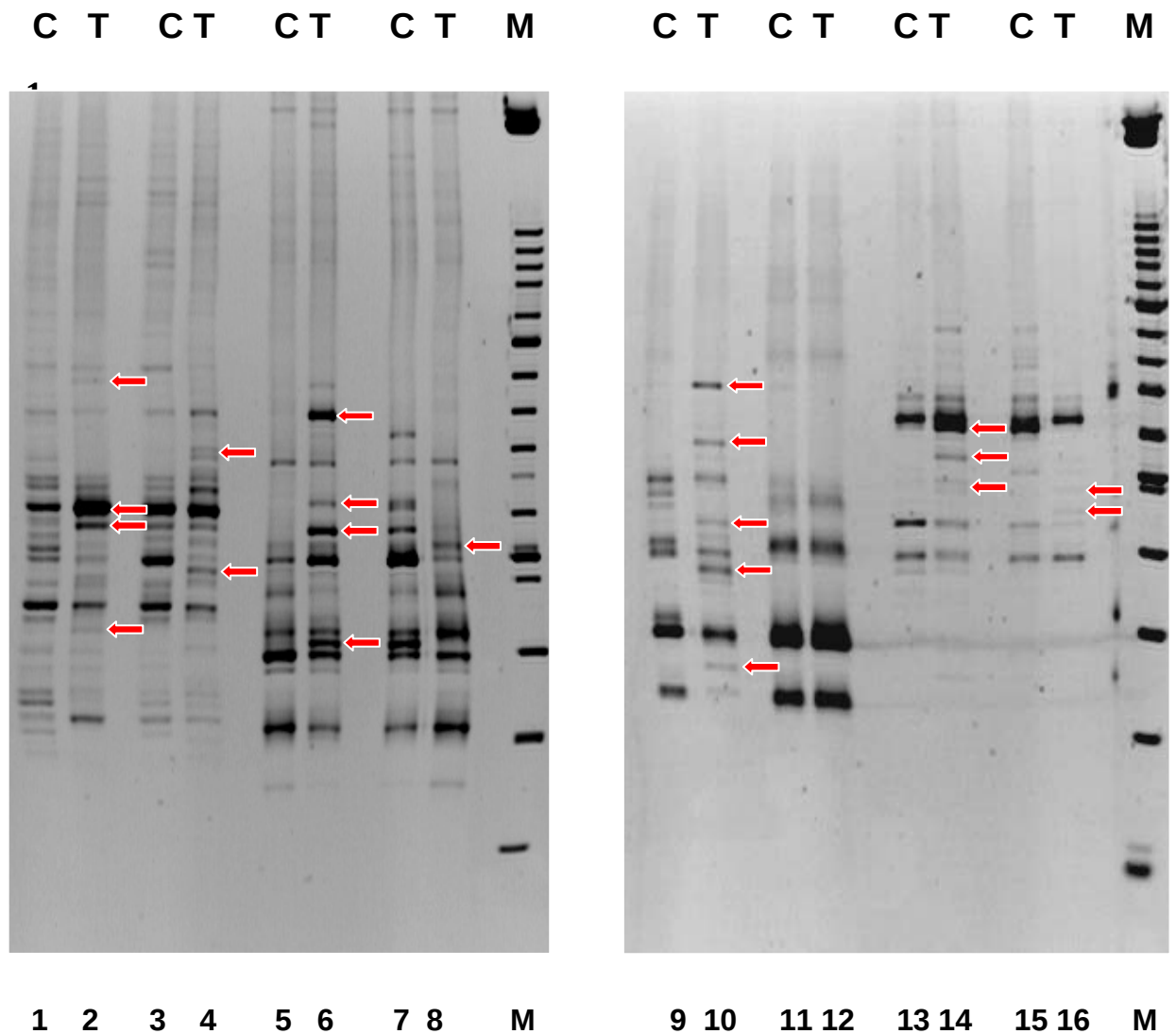


Fig. 4.3 - Separazione elettroforetica in gel di poliacrilammide dei prodotti cDNA-AFLP ottenuti da mRNA estratti da foglie di piante di controllo (C) e trattate con O_3 (T) utilizzando 4 primer *EcoRI* con due (a) e tre (b) basi selettive. Le frecce indicano i prodotti differenzialmente espressi nelle piante ozonate.

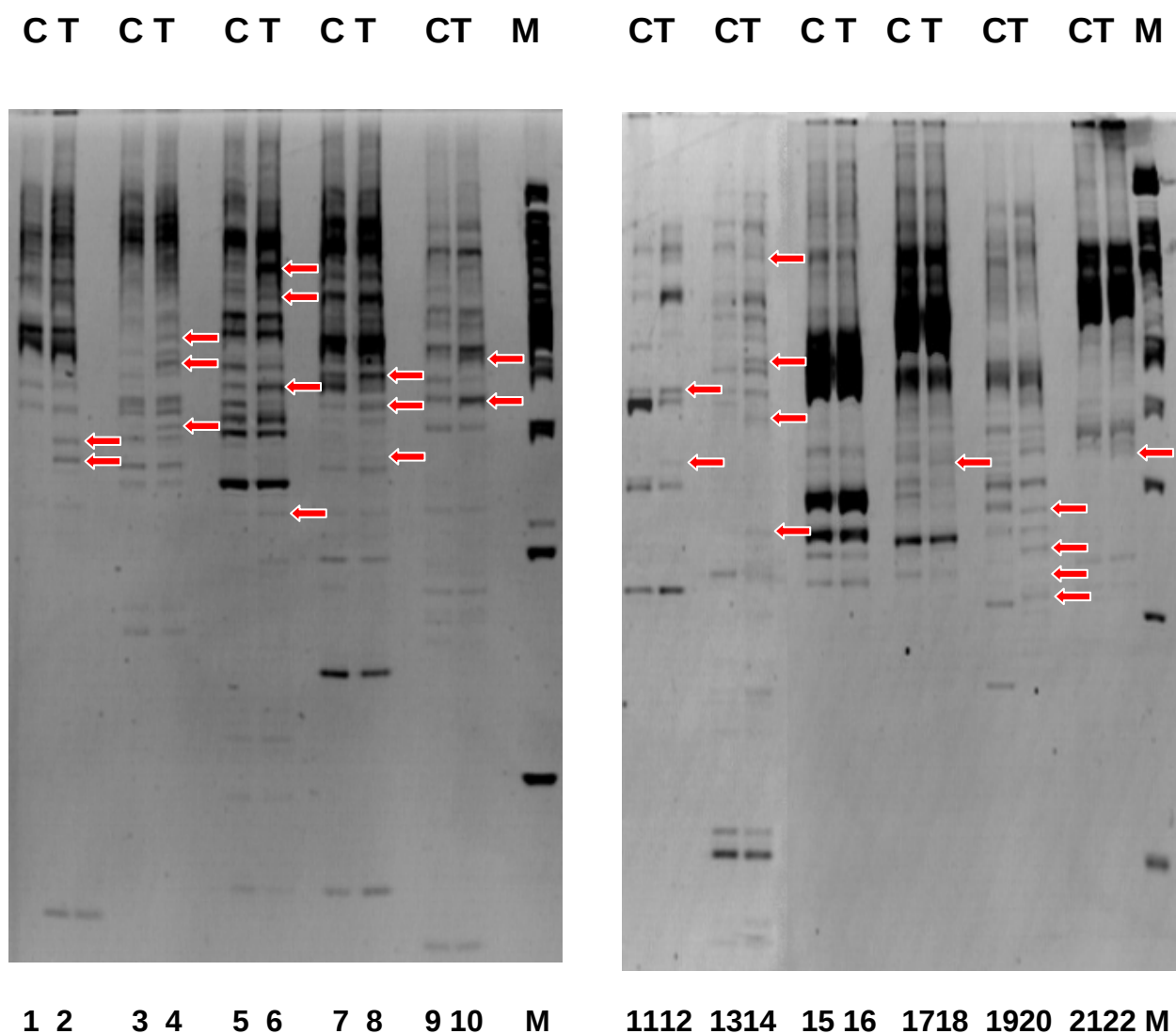


Fig. 4.4 - Separazione elettroforetica in gel di poliacrilammide dei prodotti cDNA-AFLP ottenuti da mRNA estratti da foglie di piante di controllo (C) e trattate con O₃ (T) utilizzando 5 primer *Hind*III con due (a) e tre (b) basi selettive. Le frecce indicano i prodotti differenzialmente espressi nelle piante ozonate.

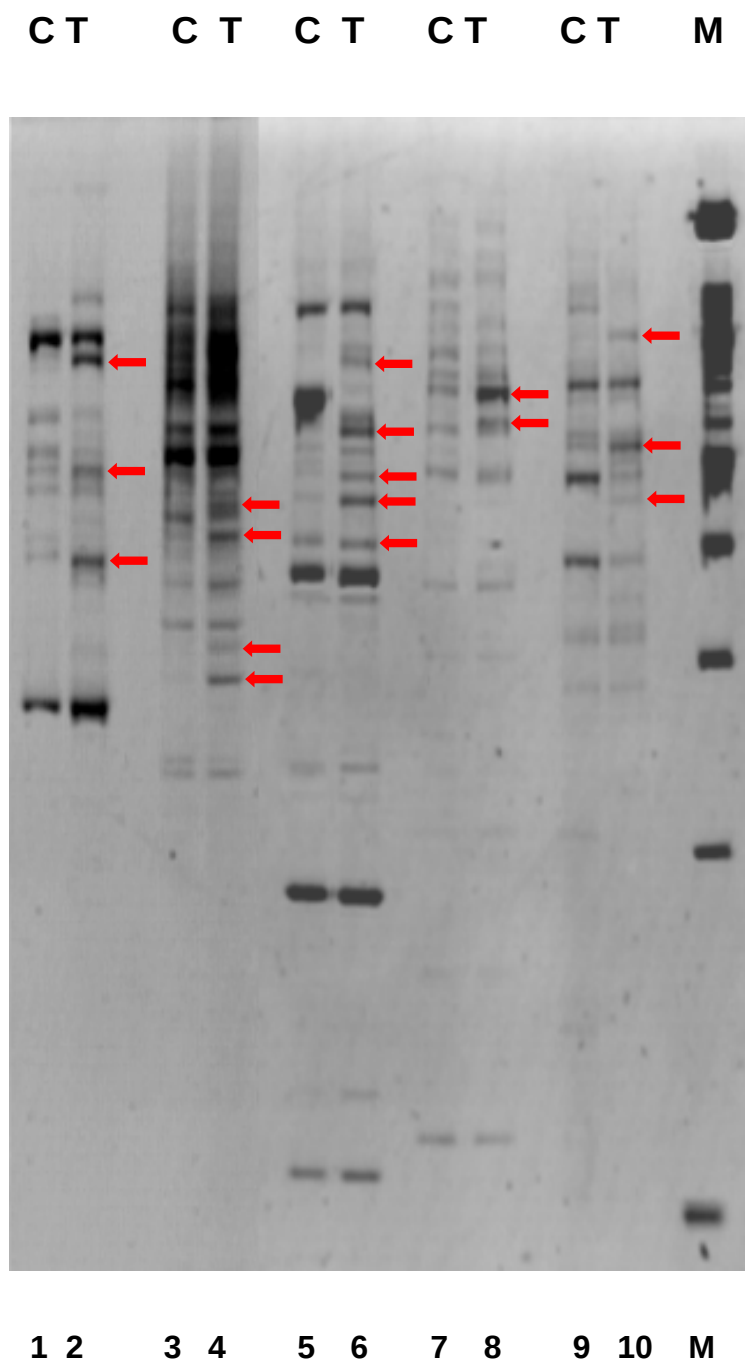


Fig. 4.5 - Separazione elettroforetica in gel di poliacrilammide dei prodotti cDNA-AFLP ottenuti da mRNA estratti da foglie di piante di controllo (C) e trattate con O₃ (T) utilizzando primer *Bam*HI con due (profili, 1,2,3 e 4) e tre (profili 5,6,7,8,9 e 10) basi selettive. Le frecce indicano i prodotti differenzialmente espressi nelle piante ozonate.

4.3. Clonaggio, determinazione delle sequenze nucleotidiche ed analisi della specificità di espressione dei trascritti indotti da O₃

Ciascuna delle 165 bande differenziali indotte da ozono (55 ottenute con *EcoRI*, 70 con *HindIII* e 40 con *BamHI*) è stata purificata da gel di poliacrilammide, riamplicata con lo stesso primer *EcoRI*, *HindIII* o *BamHI* utilizzato in precedenza e, dopo separazione elettroforetica in gel d'agarosio e successiva purificazione, è stata clonata nel plasmide pGEM-T. I 165 cloni sono stati contrassegnati con un codice di 3 lettere (O= ozono; P= Portorico; D= Duilio; E= *EcoRI*; B= *BamHI* e H= *HindIII*) seguite da un numero corrispondente al prodotto recuperato dal gel di poliacrilammide. Almeno tre plasmidi ricombinanti, per ciascuna delle 165 bande clonate, sono stati digeriti con gli enzimi *EcoRI/NotI*, al fine di rimuovere l'inserito dal vettore per valutarne le dimensioni, separati in gel d'agarosio e successivamente sequenziati. Le sequenze nucleotidiche dei frammenti clonati sono state determinate in entrambi gli orientamenti utilizzando i primer vettore-specifici per le sequenze dei promotori T7 e SP6. I tre plasmidi ricombinanti relativi a ciascuno dei 165 prodotti O₃-indotti possedevano frammenti clonati delle stesse dimensioni e con sequenze identiche.

Dopo la determinazione delle sequenze nucleotidiche sono stati disegnati primer specifici per ciascuno dei 165 cloni derivanti da trascritti indotti da ozono e la loro espressione in piante di controllo e trattate è stata verificata mediante analisi RT-PCR. Per determinare le differenze effettive nella quantità dei trascritti sono stati prelevati campioni di 3µl dopo 20, 25 e 30 cicli di amplificazione, cioè durante la fase lineare e dopo il raggiungimento del plateau della reazione di amplificazione. L'affidabilità e la riproducibilità delle analisi RT-PCR sono state verificate effettuando due esperimenti indipendenti per ognuno dei 165 prodotti differenziali.

In relazione all'analisi RT-PCR, i 165 cloni cDNA differenziali indotti da ozono sono stati classificati in tre gruppi (Fig. 4.6): al primo gruppo, indicato con la lettera A, sono stati assegnati 42 cloni (11 cloni per *EcoRI*, 20 per *HindIII* e 11 per *BamHI*) i cui trascritti sono stati rilevati solo nelle piante trattate durante tutte le fasi di amplificazione analizzate (geni indotti da O₃); il secondo gruppo, designato dalla lettera B, è costituito da 80 cloni (28 cloni per *EcoRI*, 32 per *HindIII* e 20 per *BamHI*) che presentavano un livello di trascritti più elevato nelle piante trattate che in quelle di controllo dopo 30 cicli di amplificazione (trascritti relativi a geni sovraespressi in condizioni di stress da O₃); il terzo gruppo (C) è costituito dai rimanenti 43 cloni (16 cloni per *EcoRI*, 18 per *HindIII* e 9 per *BamHI*), nei quali l'espressione differenziale non è stata confermata dall'analisi RT-PCR, avendo rilevato un livello di trascrizione simile nelle piante trattate e di controllo durante tutte le fasi di amplificazione analizzate.

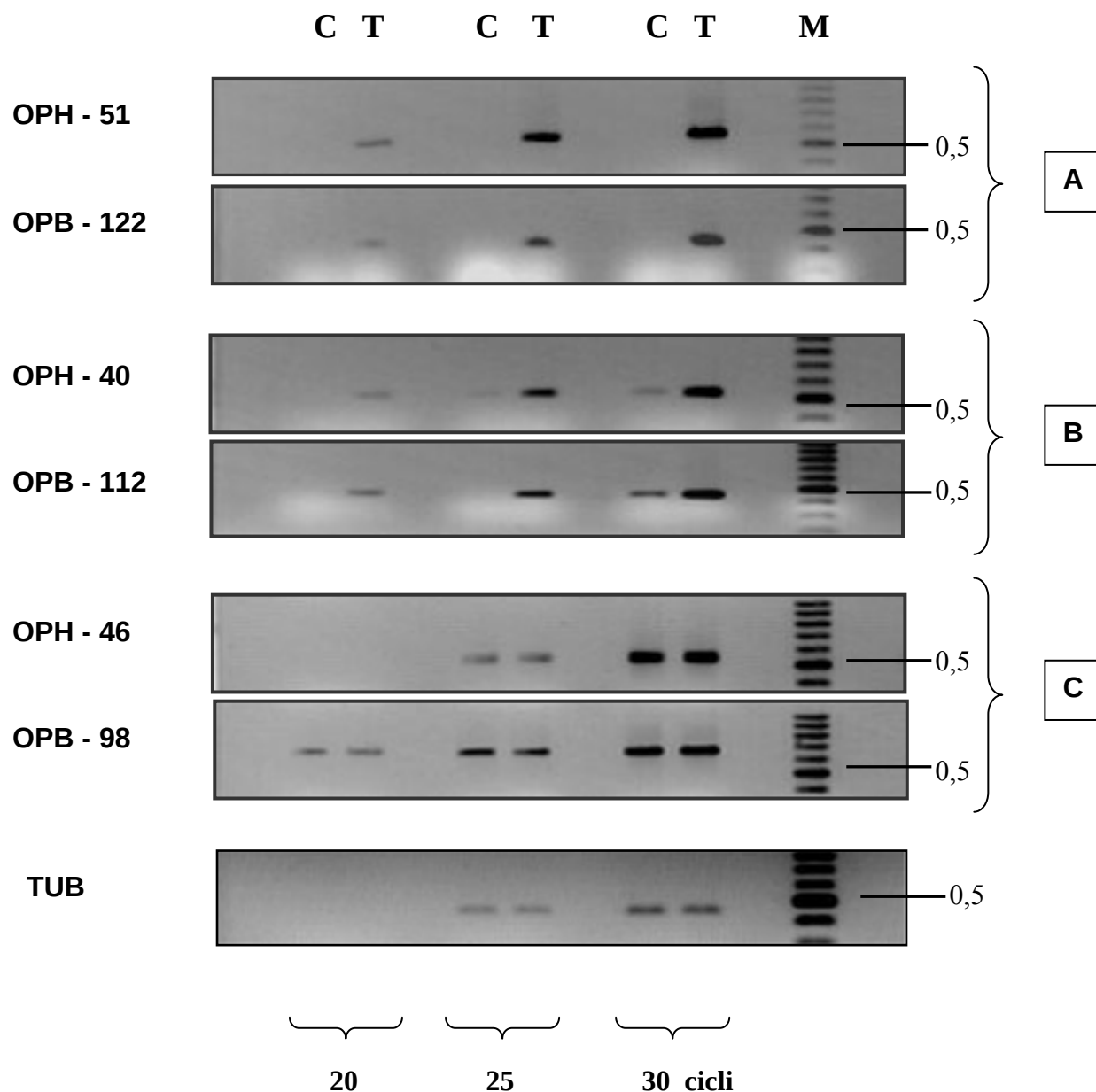


Fig. 4.6 - Analisi dell'espressione differenziale di sei dei 165 prodotti cDNA-AFLP isolati effettuata mediante RT-PCR di RNA totale estrato da piante di controllo (C) e trattate (T) dopo 20, 25 e 30 cicli di amplificazione. I sei profili di espressione qui riportati sono rappresentativi delle analisi RT-PCR condotte per determinare la specificità delle 165 sequenze cDNA clonate. Come controllo nelle reazioni di RT-PCR è stata amplificata la sequenza del gene costitutivo della β -tubulina (TUB).

4.4 . Ricerca di omologia per le sequenze cDNA clonate

Le sequenze nucleotidiche ed aminoacidiche dedotte dei 122 cloni, la cui espressione differenziale o preferenziale in piante ozonate è stata verificata mediante analisi RT-PCR, sono state confrontate con quelle depositate in diverse banche dati nucleotidiche (GenBank, EMBL, DDBJ e PDB, incluso il settore EST di ciascuna di esse) e proteiche (GenBank, PDB, SwissProt, Pir e PRF) utilizzando il programma BLAST (BLASTN per sequenze nucleotidiche e BLASTX, con tutte le sei ORF, per le sequenze EST). Con le stesse sequenze è stata effettuata una ricerca in “TIGR wheat gene index” (TaGi, versione 10), un database contenente più di 580.000 sequenze EST di *T. aestivum*, allo scopo di individuare sequenze identiche o simili a quelle identificate come O₃-inducibili in frumento.

Per 34 delle 122 sequenze analizzate non è stata rilevata alcuna omologia significativa nei database utilizzati (Tab. 10); le spiegazioni più verosimili per la mancata identificazione di omologie sono: i) si tratta di sequenze geniche mai clonate e caratterizzate; ii) i frammenti cDNA-AFLP clonati sono troppo brevi e/o derivano dalla regione 3', scarsamente conservata, dei trascritti differenziali. Per 79 cloni, invece, sono state rilevate omologie significative con sequenze genomiche, cDNA o proteiche isolate nelle piante. Le sequenze di 16 cloni sono risultate omologhe con presunti geni codificanti per proteine con funzione sconosciuta. E' interessante notare che, tra i 79 cloni che hanno rilevato omologie significative in tutti i database analizzati, solo 13 corrispondono a sequenze di frumento precedentemente riportate in banche dati proteiche e nucleotidiche, mentre per 44 di essi sono state individuate sequenze EST di frumento identiche o molto simili (Tab. - 4.5).

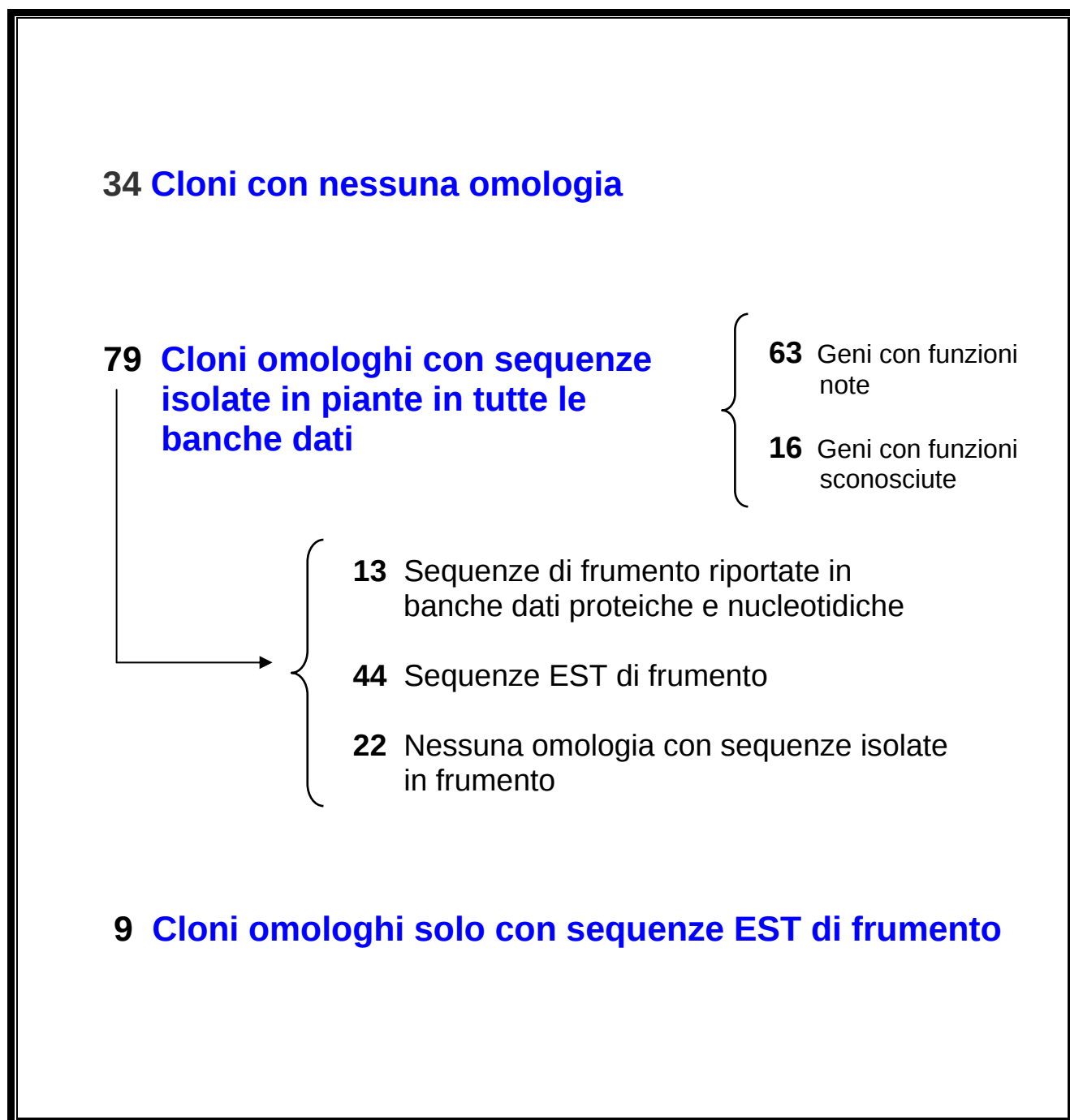
Infine le rimanenti 9 sequenze sono risultate omologhe solo a EST (Expressed Sequence Tags) di frumento, indicando, probabilmente, la loro elevata specificità per questa specie. E' interessante notare che alcuni di questi cloni hanno evidenziato un'elevata omologia con EST di frumento ottenuti da librerie cDNA di diversi tessuti sottoposti a particolari condizioni di stress, indicando che queste sequenze potrebbero svolgere un ruolo importante e specifico in questa specie vegetale nella risposta a diversi tipi di stress, sia biotici che abiotici, compreso lo stress ossidativo indotto dall'ozono (Tab. 4.6).

I 79 cloni, che presentano omologie significative con sequenze precedentemente caratterizzate di specie vegetali sono stati classificati, in base alle loro funzioni presunte, in sette gruppi: 1) trasduzione del segnale (15 cloni); 2) organizzazione cellulare (9 cloni); 3) sintesi, dislocazione e degradazione delle proteine (9 cloni); 4) metabolismo (11 cloni); 5)

protezione/difesa cellulare (12 cloni); 6) regolazione della trascrizione (7 cloni); 7) con funzione sconosciuta (16 cloni) (Tab. 4.7).

Quarantacinque dei 63 trascritti relativi a geni precedentemente caratterizzati corrispondevano a sequenze geniche il cui ruolo nella risposta all'ozono era stato già documentato nelle analisi condotte sul trascrittoma di *Arabidopsis* (Tamaoki *et al.*, 2003; Mahalingam *et al.*, 2003; Miyazaky *et al.*, 2004; Ludwikow *et al.*, 2004). Questa osservazione suggerisce che il procedimento adottato (metodologia cDNA-AFLP modificata) sia risultato efficace per l'individuazione di geni coinvolti nella risposta allo stress da ozono in frumento duro. L'assenza di alcune delle 63 sequenze isolate in questo studio nel trascrittoma di *Arabidopsis*, tuttavia, potrebbe essere spiegata dalle ovvie differenze tra specie filogeneticamente distanti o dalle differenti condizioni di esposizione all'ozono adottate nei lavori precedentemente citati per l'analisi del trascrittoma di *Arabidopsis*, rispetto alla presente ricerca. Ad esempio Tamaoki *et al.* (2003) hanno studiato l'espressione genica O₃-dipendente dopo un trattamento acuto con ozono (200 ppb) della durata di 12 h, mentre in questa ricerca sono stati individuati geni preferenzialmente espressi in condizioni di stress da ozono in seguito ad un trattamento della stessa intensità ma di durata notevolmente inferiore (5h). Mahalingam *et al.* (2003) hanno studiato l'espressione genica indotta da un trattamento acuto con ozono dopo 1 e 3 ore di esposizione, mentre Miyazaky *et al.*, (2004) hanno condotto le analisi microarray dopo un trattamento cronico con ozono (80-100 ppb per la durata di circa due mesi).

Tab. 4.5 - Omologie rilevate tra i 122 cloni selezionati e le sequenze presenti nelle banche dati.



Tab. 4.6 – Omologie tra sequenze cDNA preferenzialmente espresse in piante ozonate e EST di frumento in “TIGR wheat gene index” (BLASTN).

Clone	Bp	Omologia (Accessione)	Blast score	Libreria cDNA
1) OPH – 52	792	CA656375	1519	Semenzali inoculati con <i>E. graminis</i>
2) OPH – 63	432	CV765921	1077	Foglie esposte a basse temperature
3) OPH – 69	676	CA745079	1251	Foglie inoculate con <i>S. tritici</i>
4) OPH – 78	316	BE497560	1420	Semenzali con stress da alte temperature
5) OPH – 83	368	BG906383	1099	Foglie inoculate con <i>P. triticina</i>
6) OPH – 93	339	AJ601598	839	Semenzali, stress da alte temperature
7) OPH – 95	438	CK161768	1426	Semenzali, stress da siccità
8) OPH – 55	645	BJ304439	1277	Spighette in fioritura tardiva
9) OPH – 59	627	BJ261173	1182	Spighe in fioritura completa

Tab. 4.7 – Classificazione delle 79 sequenze clonate in base alla funzione potenziale dedotta dall’omologia con sequenze in banche dati proteiche.

Gruppo	Cloni	Funzione delle sequenze omologhe
1	15	Trasduzione del segnale
2	9	Organizzazione cellulare
3	9	Sintesi/ destinazione/ degradazione proteine
4	11	Metabolismo
5	12	Protezione/ difesa cellulare
6	7	Trascrizione
7	16	Sconosciuta

4.5. Funzioni metaboliche presunte delle sequenze indotte da O₃

Nei paragrafi successivi saranno descritte in dettaglio le caratteristiche di alcuni dei 63 cloni appartenenti ai sei gruppi funzionali e si discuterà il loro potenziale coinvolgimento nella risposta allo stress da O₃ sulla base dei risultati più recenti riportati in letteratura.

4.5.1. Gruppo funzionale 1: geni coinvolti nei processi di trasduzione del segnale

Quattro dei 15 cloni appartenenti al primo gruppo funzionale (OPH44, OPH54, OPH61 e ODE12 in Tab. 4.8) hanno evidenziato un'omologia significativa con sequenze geniche codificanti per una classe di chinasi definite "Mitogen-Activated Protein Kinases" (MAPKs) che, attraverso processi di fosforilazione a cascata, mediano la trasduzione di una grande varietà di segnali extracellulari correlati a stress biotici ed abiotici, al ciclo cellulare, allo sviluppo ed alla differenziazione cellulare in tutti gli eucarioti (Bent, 2000). Le MAP chinasi (MAPK) costituiscono le componenti terminali di un processo di fosforilazione a cascata, che comprende anche le MAPK chinasi (MAPKK), a cui è riconducibile il clone ODE-12, e le MAPKK chinasi (MAPKKK), con il clone OPH-61 che risulta significativamente correlato a quest'ultimo gruppo di proteine. Sebbene un certo numero di geni codificanti per MAPK, MAPKK e MAPKKK sia stato isolato nelle piante, attualmente solo un modulo completo MAPK, relativo ad un elicitore batterico, è stato completamente caratterizzato nei vegetali (Jonak *et al.*, 2002). Tuttavia, l'attivazione di specifiche proteine MAPK è stata osservata nel corso di numerose risposte cellulari a segnali quali ormoni, eventi legati allo sviluppo e fattori di stress di origine sia biotica che abiotica (Jonak *et al.*, 2002). In *Arabidopsis* sono stati isolati 10 geni codificanti per MAPKKK, 80 per MAPKK e 23 per MAPK (Jonak *et al.*, 2002), che nel loro insieme costituiscono una complessa rete di segnalazioni ed agiscono in maniera sinergica o antagonistica nella regolazione delle risposte cellulari. Tra le 20 MAPK codificate da geni isolati in *Arabidopsis*, AtMPK3, omologa alla sequenza dedotta di OPH-44, e AtMPK6, omologa a OPH-54, sono attivate da diversi stress biotici ed abiotici e sembrano costituire gli elementi centrali della trasduzione del segnale per tutti quei fattori che determinano condizioni di stress ossidativo (Baier *et al.*, 2005). I geni codificanti per queste due MAPK e i corrispondenti ortologhi in tabacco (WIPK e SIPK, rispettivamente) sono indotti, tra i diversi tipi di stress, anche dall'O₃ (Ahlfors *et al.*, 2004). AtMPK6/SIPK e AtMPK3/WIPK sono inoltre attivate dal perossido d'idrogeno e dallo ione superossido (Samuel *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2003). Oltre ad essere attivate dalle ROS, la

fosforilazione di AtMPK6 e AtMPK3 da parte di due forme di MPKKs (AtMPKK4 e AtMPKK5), in grado di attivarle in maniera specifica, induce la produzione endogena di ROS e la morte cellulare (Ren *et al.*, 2002). Nonostante AtMPK6 e AtMPK3 vengano entrambe attivate rapidamente durante lo stress da O₃, la regolazione della loro attività da parte dell'inquinante è differente. Infatti, la regolazione di AtMPK3 avviene a livello trascrizionale, traduzionale e post-traduzionale, mentre per AtMPK6 è stata osservata solo un'attivazione post-traduzionale dell'attività chinasi (Ahlfors *et al.*, 2004). L'attivazione di AtMPK3 è risultata, inoltre, più prolungata rispetto a quella di AtMPK6. La sensibilità delle piante all'O₃ e l'espressione di geni codificanti per enzimi antiossidanti, come l'ascorbato perossidasi (APX) e la glutatione-S-tranferasi (GST), sono notevolmente influenzate da queste due MAPKs. Piante di tabacco in cui l'espressione di SIPK (ortologo di AtMPK6) è stata sovraregolata o soppressa risultano, in entrambi i casi, più sensibili all'O₃ rispetto a piante "wild-type" e mostrano una ridotta attività di APX e GST (Samuel e Ellis, 2002). In tabacco, inoltre, SIPK sembra regolare l'attività di WIPK (ortologo di AtMAPK3), in quanto, nelle linee che sovraesprimono SIPK, l'attività O₃-indotta di WIPK risulta nettamente ridotta, mentre la sua espressione risulta elevata nelle linee in cui è soppressa l'attività di SIPK (Samuel e Ellis, 2002). Uno dei meccanismi attraverso i quali le MAPKs, attivate da un processo di fosforilazione a cascata dopo la percezione del segnale, possono regolare l'espressione genica è la fosforilazione di diversi fattori di trascrizione. In accordo con ciò AtMPK3 e AtMPK6 fosforilate sono traslocate rapidamente nel nucleo entro 30 min dall'inizio dell'esposizione all'O₃ (Ahlfors *et al.*, 2004). La funzione svolta da queste MAPKs nelle piante sottoposte a stress da O₃ ancora non è stata completamente chiarita, anche se recenti studi hanno indicato che esse potrebbero essere collegate in maniera complessa con le risposte mediate dagli ormoni SA (acido salicilico), ET (etilene) e JA (acido jasmonico) (Baier *et al.*, 2005; Kangasjarvi *et al.*, 2005).

E' interessante sottolineare che al primo gruppo funzionale sono state assegnate, inoltre, 4 sequenze (OPB-97, ODE-22, ODE-14 e OPE-1 in Tab. 4.8) che codificano per enzimi e proteine che intervengono nella via di segnalazione del fosfatidilinositolo (Fig. 4.7), il cui coinvolgimento nello stress da ozono non era stato sino ad ora documentato. Nella via metabolica dell'inositolo, il fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂), che è prodotto grazie all'attività di due chinasi, la fosfatidilinositol-3-4-chinasi e la fosfatidilinositol-4-fosfato-5-chinasi (PIP₅K), che sono risultate significativamente correlate a due sequenze isolate in questa ricerca (OPB-97 e ODE-22), viene idrolizzato da una specifica fosfolipasi C (PI-PLC), producendo due messaggeri di secondo livello: inositolo-1,4,5-trifosfato (IP₃), che è coinvolto nel rilascio di Ca²⁺ dalle riserve intracellulari, e diacil-glicerolo (DAG), che è

coinvolto nell'attivazione di varie isoforme della protein kinasi C. PIP2 regola svariati processi cellulari, quali l'architettura del citoscheletro, il segnale mitogenico e il traffico vescicolare. E' ampiamente dimostrato che nelle piante il livello transiente di Ca^{2+} aumenta in seguito a diverse condizioni di stress, compreso quello da O_3 (Clayton *et al.*, 1999). E' stato dimostrato, recentemente, che l'espressione di due geni di *Arabidopsis* codificanti per isoforme di PLC (*AtPLC1S*) e per una PIPK5 (*AtPIP5K1*) era indotta rapidamente dalla siccità, dalla salinità e dal freddo (Mikami *et al.*, 1998), suggerendo che i due geni possano essere implicati nelle risposte agli stress e che l'attivazione delle vie metaboliche del fosfatidilinositolo contribuisca all'amplificazione del segnale di stress nelle piante superiori.

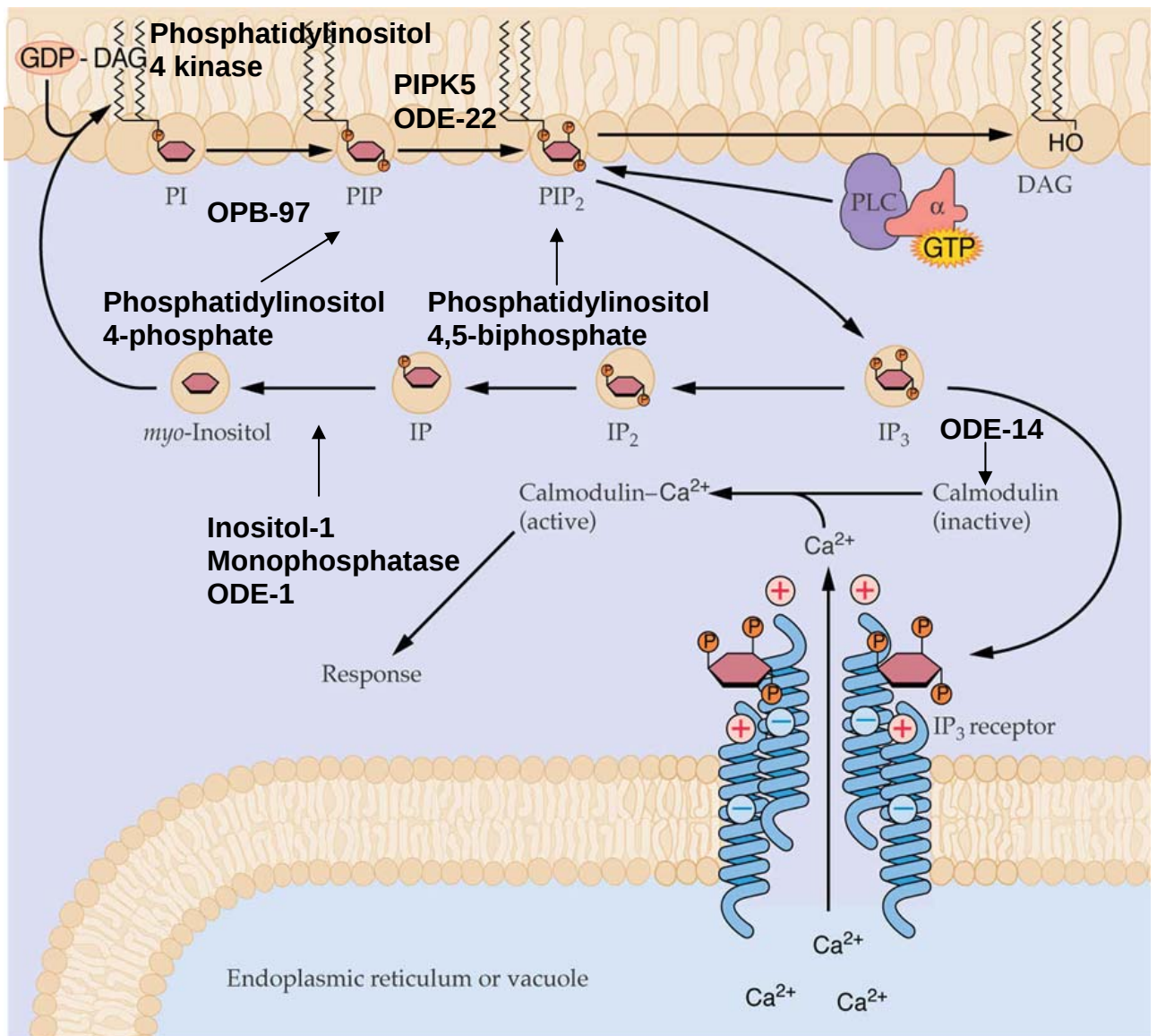


Fig. 4.7 - Sequenza degli eventi che portano dall'attivazione della fosfolipasi C (PLC) all'aumento del calcio citosolico. La PLC legata alla membrana plasmatica è attivata da una proteina G. Il fosfatidilinositolo 4,5-difosfato (PIP₂) è idrolizzato dalla PLC a dare i secondi messaggeri IP₃ e diacilglicerolo (DAG). L'IP₃ attiva un suo recettore attaccato al vacuolo o all'ER, facendo quindi iniziare il rilascio di Ca²⁺. I componenti fosfolipidici sono riciclati: il fosfatidilinositolo (PI), il fosfatidilinositolo 4-monofosfato (PIP), l'inositolo 1,4-difosfato (IP₂) e l'inositolo 1-fosfato (IP).

Il clone OPH-51 è risultato significativamente correlato a sequenze geniche codificanti per lipasi contenenti un motivo GDSL (Tab. 4.8), che intervengono nella degradazione dei fosfolipidi. Le vie di trasduzione del segnale mediate dai prodotti di degradazione della membrana cellulare, quali lisofosfolipidi, diacilglicerolo ed acidi grassi liberi, costituiscono aspetti di estremo interesse nello studio delle risposte comuni a stress di origine diversa

(Wang *et al.*, 2004). Le fosfolipasi A (PLA) ed alcune acil idrolasi contengono un motivo GDSL nella loro regione N-terminale. Nelle piante le PLA catalizzano l'idrolisi dei fosfolipidi per dare lisofosfolipidi e acidi grassi liberi (Trewavas, 2000). Esse possono essere suddivise nelle due classi PLA1 e PLA2, a seconda della specificità del sito di taglio che provoca il distacco degli acidi grassi (Wang *et al.*, 2004). L'acido linoleico, un prodotto rilasciato probabilmente dai lipidi di membrana ad opera di una PLA2, è un precursore nella via degli ottadecanoidi che sintetizzano JA, un'importante molecola segnale prodotta in risposta a vari stress biotici ed abiotici. Le PLA non solo partecipano e/o regolano la via metabolica che porta alla sintesi del JA, ma producono altri prodotti lipidici che possono agire da molecole segnale, influenzando diversi processi cellulari. Ad esempio dall'idrolisi della fosfatidicolina, uno dei componenti lipidici delle membrane cellulari, si ottiene la lisofosfatidilcolina, che è in grado di provocare un aumento dell'attività della H⁺-ATPasi della membrana plasmatica, con conseguente acidificazione del citoplasma, condizioni essenziali affinché vengano attivate le risposte di difesa e la produzione di fitoalessine. I risultati da noi ottenuti sembrerebbero perciò suggerire un coinvolgimento delle fosfolipasi e dei meccanismi di trasduzione del segnale da esse attivate nelle risposte all'O₃ in *T. durum*. In una varietà come Portorico, dove l'O₃ non ha provocato evidenti lesioni necrotiche fogliari, in particolare, l'induzione di enzimi in grado di produrre acidi grassi, quali l'acido linoleico, potrebbe indicare un'attiva partecipazione nelle risposte all'O₃ di prodotti della via degli ottadecanoidi, compreso JA, che è considerato uno dei fattori importanti per limitare lo sviluppo e la diffusione delle lesioni necrotiche dipendenti dall'iperproduzione delle ROS durante lo stress ossidativo provocato da questo inquinante (Overmyer *et al.*, 2003).

Il clone ODE-37 è risultato omologo ad un gene di *Arabidopsis* codificante per una proteina recettore-simile del glutammato. Diversamente dai sistemi animali, nei quali è stato dimostrato il loro ruolo nella neurotrasmissione e nell'attivazione elettrica delle cascate di segnale Ca²⁺, attualmente non si conosce se i recettori vegetali del glutammato siano in grado di formare canali ionici funzionanti. Malgrado queste scarse conoscenze, il completamento del sequenziamento del genoma di *Arabidopsis* ha permesso di identificare circa 20 geni codificanti per queste proteine, alcuni di essi sono risultati coinvolti in numerosi processi di segnalazione e fisiologici, ad esempio nella trasduzione del segnale luminoso, nell'omeostasi del calcio e nella regolazione del metabolismo del carbonio e dell'azoto (Chiu *et al.*, 2002).

Tabella 4.8 - Omologia di sequenze cDNA differenzialmente espresse in piante ozonate appartenenti alle cv Duilio e Portorico: geni coinvolti nella trasduzione del segnale.

CLONE	Bp	Profili di espressione	Omologia (n° Acc.)	Blast (score)	Specie	Proteina omologa
1) OPH-44	640	B	AY173962	437	<i>T. aestivum</i>	MAP Kinase-NtSIPK e AtMPK3-like
2) OPH-54	796	B	AF079318	435	<i>T. aestivum</i>	MAP Kinase-NtSIPK e AtMPK3-like
3) OPH-61	470	B	AP005297	181	<i>O. sativa</i>	MAP kinase kinase kinase
4) ODE-12	431	A	AY26514	178	<i>L. esculentum</i>	Putative MAP kinase kinase
5) OPH-81	612	A	AP004212	168	<i>O. sativa</i>	Transducin-like prot. (WD rep. Protein like)
6) OPH-87	347	A	AF069442	161	<i>A. thaliana</i>	Putative WD-repeat protein
7) OPH-51	644	A	AE016959	372	<i>O. sativa</i>	Putat. GDSL-motif lipase/hydrolase
8) OPB-97	533	B	AP006169	187	<i>O. sativa</i>	Phosphatidylinositol 3- and 4- kinase family like
9) ODE-22	780	B	AJ439082	431	<i>O. sativa</i>	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase (PIP1)
10) ODE-14	485	B	U48692	285	<i>T. aestivum</i>	Calmodulin
11) OPE-1	597	B	AP005071	356	<i>O. sativa</i>	Inositol-1-monophosphatase
12) ODE-37	729	B	Q8GXJ4	332	<i>A. thaliana</i>	Glutamate-receptor
13) ODE-5	472	B	AL162295	155	<i>A. thaliana</i>	Phosphatidate cytidyltransferase
14) OPE-39	653	B	AF325197	391	<i>T. aestivum</i>	LRR Receptor-like protein
15) ODE-7	378	B	AP004871	246	<i>O. sativa</i>	EH and EF protein

4.5.2. Gruppo funzionale 2: geni coinvolti nei processi di organizzazione cellulare

Le sequenze cDNA comprese in questo gruppo funzionale, OPH-48, OPH-57 e OPE-2 hanno evidenziato significative omologie con tre geni di *Arabidopsis* codificanti per trasportatori ABC solubili con un solo dominio NBD, il cui coinvolgimento nella risposta allo stress da ozono è stato ampiamente documentato. Uno di essi (*LAF6*), omologo al clone OPH-48, è stato caratterizzato funzionalmente da Møller *et al.* (2001). Essi hanno isolato un mutante in *Arabidopsis* denominato *laf6* (*long after far-red 6*), che mostra insensibilità all'assorbimento della luce nel rosso lontano, con un fenotipo caratterizzato da un notevole accrescimento dell'ipocotile, da una ridotta espansione dei cotiledoni e da una colorazione verde-pallido delle foglie. Il gene *laf6* codifica per la proteina atABC1, di 557 aminoacidi, che evidenzia un'elevata omologia con i trasportatori ABC di procarioti ed eucarioti meno evoluti ed è risultata caratterizzata dalla presenza di un segnale peptidico per la traslocazione (transit peptide) nei cloroplasti. Poichè nel mutante *laf6* si assiste ad un accumulo eccessivo di un precursore della clorofilla, la protoporfirina IX, è stato proposto che atABC1 possa avere la funzione di favorire la sua traslocazione attraverso la membrana cloroplastica, dove il precursore viene sintetizzato, affinché la sintesi della clorofilla possa essere completata all'interno del cloroplasto (Fig. 4.8). Nel mutante *laf6*, quindi, la protoporfirina IX si accumula nella membrana cloroplastica e si diffonde nell'ambiente circostante esterno, in quanto non è accessibile agli enzimi della via biosintetica della clorofilla localizzati nello stroma. Non è stato ancora chiarito, tuttavia, come un'alterazione della biosintesi della clorofilla, che avviene nel cloroplasto, possa influenzare la risposta alla luce nel vicino rosso, un processo che coinvolge geni nucleari. Una delle possibilità proposte è che la protoporfirina IX agisca come segnale plastidico negativo per attenuare l'espressione dei geni nucleari regolati dalla luce.

Un'ipotesi particolarmente suggestiva sulla funzione dei tre trasportatori ABC O₃-indotti è che possano svolgere un'importante funzione nel mediare il trasporto tra cloroplasto e nucleo di molecole segnale necessarie per la regolazione dell'espressione genica in condizioni di stress da O₃. Un potenziale coinvolgimento dei trasportatori ABC nelle segnalazioni tra cloroplasto e nucleo è stato recentemente proposto per spiegare l'immediata induzione di geni nucleari in seguito a fenomeni di stress foto-ossidativo provocati da un'elevata produzione di ossigeno singoletto (op den Camp *et al.*, 2003). Questo è una ROS (Specie Reattive dell'Ossigeno) molto reattiva, ma, avendo una vita media di pochi microsecondi, è in grado di reagire solo con molecole target prossime al suo sito di produzione. E' difficile spiegare, quindi, come possa una molecola dalla vita media così breve dare origine ad un segnale che

deve essere trasmesso nel nucleo per regolare l'espressione genica. Recentemente è stato dimostrato che altre ROS, come lo ione superossido e il perossido d'idrogeno, agiscono direttamente come molecole segnale secondarie nella regolazione dell'espressione di geni codificanti per enzimi antiossidanti, quali: glutatione perossidasi, glutatione S-transferasi e ascorbato perossidasi (Vranova *et al.*, 2002). E' stato escluso, a causa della sua vita media molto breve, che l'ossigeno singoletto possa ossidare direttamente un componente della via di segnalazione tra cloroplasto e nucleo. Prodotti derivanti dalla degradazione della proteina D1 (PSII) o della clorofilla, che si formano in seguito alla reattività dell'ossigeno singoletto, potrebbero agire, invece, come potenziali molecole segnale; recentemente, infatti, è stato dimostrato che precursori della clorofilla svolgono questa funzione nella comunicazione tra cloroplasto e nucleo (Strand *et al.*, 2003). I trasportatori ABC potrebbero, quindi, traslocare tali molecole dal cloroplasto al citoplasma, dove direttamente o indirettamente mediano il segnale verso il nucleo per regolare l'espressione genica. E' interessante notare che, come riportato nel già citato lavoro di op den Camp e coll. (2003), uno dei numerosi geni (circa 70) che risultavano essere indotti in seguito ad una sovrapproduzione di ossigeno singoletto codificava proprio per una proteina ABC solubile contenente un solo dominio NBD.

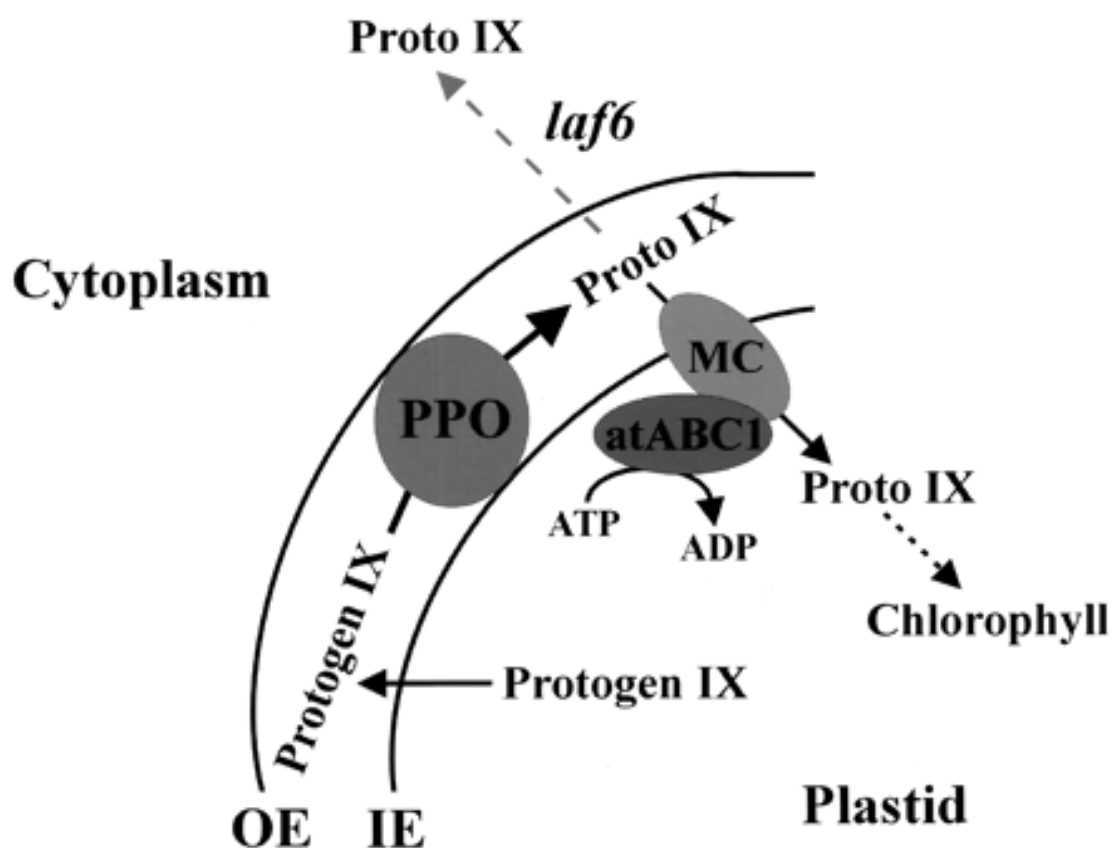


Figure 4.8 - Un modello ipotetico che mostra il possibile coinvolgimento di atABC1 nel trasporto e nella distribuzione della protoporfirina IX. Il Protoporfirinogeno IX (Protogen IX) è trasportato alla membrana plastidiale, in cui è ossidato dalla protoporfirinogeno IX ossidasi (PPO), associata alla membrana, in protoporfirina IX (Proto IX). Proto IX deve essere reimportato nuovamente nello stroma affinché la biosintesi della clorofilla possa continuare. Un modo possibile di azione di atABC1 è di interagire con un componente integrale di membrana (MC) o con un complesso di membrana e di alimentare l'importazione di Proto IX attraverso l'idrolisi dell'ATP. In *laf6*, questo meccanismo di importazione è alterato e conduce all'accumulazione citoplasmica di Proto IX, come indicato dalla freccia punteggiata grigia. La fisiologia del mutante *laf6* suggerisce che l'incremento nei livelli della protoporfirina IX può attenuare le risposte alla luce. OE indica la membrana esterna e IO, la membrana interna.

I danni provocati dagli stress ossidativi, in particolare dall'esposizione all'ozono, possono essere prevenuti o ridotti dall'aumento del livello di antiossidanti o dalla riduzione della concentrazione di sostanze ossidanti particolarmente nocive, come diversi metalli. Quest'ultima strategia potrebbe rivestire un ruolo importante nella risposta allo stress da ozono osservata in frumento duro, in quanto sequenze correlate a geni codificanti per ferritina (OPH-47), ascorbato ossidasi (OPH-40), metallothioneina (OPB-100) e per una proteina che lega ioni metallici (OPB-106), che sono coinvolte nell'accumulo e nel confinamento di ferro, rame e di altri metalli redox-attivi (Briat e Lobreaux, 1997; Sedbrook *et al.*, 2002; Bilecen *et al.*, 2005), sono sovraesprese o indotte in piante esposte ad ozono. Poiché il ferro ed il rame nella loro forma ionica libera, anche a basse concentrazioni, sono potenzialmente pericolosi, in quanto potenti induttori di ROS, la regolazione della loro omeostasi attraverso proteine specializzate nel loro accumulo e confinamento potrebbe essere un aspetto rilevante nella risposta molecolare del frumento duro sottoposto a stress da ozono. In particolare il clone OPH-47 è risultato omologo ad un gene di *T. aestivum* codificante per il precursore della proteina cloroplastica ferritina (Tab. 4.9), che immagazzina ferro in forma solubile, non tossica e prontamente disponibile (Briat e Lobréaux, 1997). Il ferro è un microelemento coinvolto in numerose funzioni cellulari ed è un costituente essenziale dei complessi fotosintetici che regolano il trasporto di elettroni, ma, come precedentemente detto, nella sua forma ionica libera è altamente tossico, in quanto agisce da catalizzatore nella produzione delle ROS attraverso la reazione di Haber-Weiss. Le foglie hanno la capacità di immagazzinare il ferro nei cloroplasti in forma solubile e non tossica grazie proprio alle ferritine, una classe di proteine presenti, oltre che nelle piante, anche in batteri ed animali. Le ferritine delle piante e degli animali hanno una struttura molto simile e comprendono 24 subunità disposte in modo da formare un rivestimento di forma sferica, al cui interno possono essere immagazzinati fino a 4500 atomi di ferro (Harrison e Arosio, 1996). Nelle foglie l'accumulo della ferritina è regolato in funzione dello sviluppo, essendo più elevato nelle foglie in via di accrescimento che in quelle che vanno incontro a senescenza (Briat e Lobréaux, 1997). E' stato osservato, inoltre, che l'accumulo di ferritina, a livello sia di mRNA che di proteina, è indotto da un eccesso di ferro, da stress idrico, dalla somministrazione di ABA e di NO, e dalla fotoinibizione (Briat e Lobréaux, 1997; Murgia *et al.*, 2001; Murgia *et al.*, 2002), tutti fattori che direttamente o indirettamente sono in grado di provocare uno stress ossidativo. D'altronde diversi composti antiossidanti sono in grado di inibire l'accumulo di ferritina indotto dall'eccesso di ferro e le variazioni delle quantità di acido ascorbico nei cloroplasti modulano la capacità della ferritina di immagazzinare o rilasciare ferro (Laulhére e Briat, 1993)

Tabella 4.9 - Omologia di sequenze cDNA differenzialmente espresse in piante ozonate appartenenti alle cv Duilio e Portorico: geni coinvolti nell'organizzazione cellulare

CLONE	bp	Profili di espressione	Omologia (n° Acc.)	Blast score	Specie	Proteina omologa
16) OPH-48	670	B	AY052195	187	<i>A. thaliana</i>	Putative ABC transporter (AtABC1)
17) OPH-57	616	B	AF361573	224	<i>A. thaliana</i>	Putative ABC transporter
18) OPE-2	597	A	AF118223	367	<i>A. thaliana</i>	Putative ABC transporter
19) OPH-40	560	B	AP003411	319	<i>O. sativa</i>	Putative L-ascorbate oxidase
20) OPH-47	577	B	AY864925	258	<i>T. aestivum</i>	Ferritin
21) OPH-80	724	B	AP002817	180	<i>O. sativa</i>	Putative NAM (no apical meristem) plant development protein
22) OPB-100	450	A	AY688469	169	<i>T. durum</i>	Metallothionein
23) OPB-103	660	B	AY461512	354	<i>T. aestivum</i>	Na ⁺ /H ⁺ antiporter
24) OPB-106	472	B	AJ549119	218	<i>H. vulgare</i>	Metal ion binding protein

4.5.3. Gruppo funzionale 3: geni coinvolti nei processi di sintesi, dislocazione e degradazione cellulare.

Otto delle nove sequenze assegnate al terzo gruppo funzionale sono coinvolte nella proteolisi (Tab. 4.10), indicando che la sovraespressione o l'induzione di geni coinvolti nella degradazione proteica potrebbe svolgere un ruolo importante nella regolazione post-traduzionale determinata dallo stress da ozono. Da questo punto di vista è interessante sottolineare che, in uno studio sull'espressione genica in risposta all'O₃ in *Arabidopsis*, il 6% circa dei 203 geni indotti da questo inquinante corrispondeva a sequenze codificanti per proteine coinvolte nella proteolisi (Mahalingam *et al.*, 2003). In particolare quattro sequenze cDNA indotte da O₃ (cloni OPH-56, OPH-49, OPH-60 e OPH-64) sono risultate significativamente correlate a geni coinvolti nella degradazione proteica mediata dalla via metabolica ubiquitina-proteasoma, che rappresenta uno dei meccanismi di regolazione più importanti delle piante, essendo coinvolta in un'ampia gamma di processi biologici come il ciclo cellulare, l'embriogenesi, la fotomorfogenesi, i ritmi circadiani, la trasduzione del segnale mediata da ormoni, la senescenza e la resistenza a stress biotici (Viestra, 2003; Moon *et al.*, 2004). Le proteine destinate alla degradazione sono consegnate al proteasoma dopo essere state modificate covalentemente mediante coniugazione alla piccola proteina ubiquitina (Fig. 4.9 e 4.10). L'ubiquitina è una proteina altamente conservata, con una sequenza identica in tutte le piante. La coniugazione dell'ubiquitina alla proteina bersaglio richiede ATP e coinvolge tre tipi di enzimi: un enzima attivante l'ubiquitina (E1), un enzima coniugante l'ubiquitina (E2) ed un enzima legante l'ubiquitina (E3) costituito molto spesso da un complesso proteico che determina la specificità per il substrato (Viestra, 2003). Questa via multienzimatica catalizza la formazione di un legame peptidico tra un gruppo amminico di una lisina della proteina bersaglio e il gruppo carbossilico di una glicina localizzata nella regione C-terminale dell'ubiquitina (fig. 4.9). Anche altre molecole di ubiquitina possono essere aggiunte, formando una catena multi-ubiquitinica e più di un residuo di lisina può essere coniugato in questo modo (Viestra, 2003). Una volta ubiquitinata, la proteina viene riconosciuta e degradata dal complesso del proteasoma, con il concomitante rilascio delle singole molecole di ubiquitina per il loro eventuale riutilizzo (Fig. 4.10). Il proteasoma è un complesso multiproteico che comprende due parti distinte: il core proteasomico 20S ed il complesso di regolazione 19S (19S regulatory particle). Il core consiste di quattro anelli impilati, ciascuno costituito da sette subunità, che formano un canale contenente i siti attivi per la proteolisi. L'accesso al canale è governato dal complesso di regolazione 19S, che si associa con il core proteasomico per formare la struttura 26S. Il complesso di regolazione

determina la specificità per il substrato ed è costituito da 18 subunità. L'importanza di ciascuna delle tre reazioni catalizzate dagli enzimi E1, E2 e di E3 durante il processo dell'ubiquitinazione, nella gerarchia della selezione delle proteine bersaglio consegnate al proteasoma per la degradazione, è evidenziata dalla complessità genomica dei geni corrispondenti. Il genoma di *Arabidopsis* contiene, infatti, solo due geni codificanti per l'enzima E1, 45 che codificano per proteine E2 o E2-like, mentre sono circa 1200 quelli che codificano i componenti del complesso enzimatico E3 (Viestra, 2003).

Il clone OPH-49 ha evidenziato una significativa omologia con un gene di *Arabidopsis* codificante per un enzima coniugante l'ubiquitina (E2), con un'estensione C-terminale costituita da un dominio transmembrana (Bachmair *et al.*, 2001), mentre il clone OPH-56 è risultato omologo ad un gruppo di geni codificanti per proteine caratterizzate dalla presenza di un dominio di circa 40 residui, ricco in cisteina, denominato "RING Zinc-finger" (Borden e Freemont, 1996). Questo dominio sembra svolgere un ruolo importante nelle interazioni tra diverse proteine coinvolte in numerosi processi biologici (Borden e Freemont, 1996). In particolare è stato dimostrato che molte proteine contenenti il dominio "RING Zinc-finger" agiscono da enzimi E3 (ubiquitina-ligasi), che nel processo di ubiquitinazione riconoscono il substrato e determinano la sua coniugazione con l'ubiquitina, fornendo il sito di attracco al complesso E2-ubiquitina. Le E3 ubiquitina-ligasi comprendono una vasta e complessa famiglia di proteine o di complessi proteici contenenti un dominio denominato HECT o un dominio "RING Zinc-finger" (fig. 4.11). Le E3 ubiquitina-ligasi contenenti il dominio "RING Zinc-finger" possono essere ulteriormente suddivise in "single subunit RING E3s", costituite appunto da una singola subunità come la proteina COP1 di *Arabidopsis*, coinvolta nella regolazione della fotomorfogenesi, e in "multisubunit RING E3s", costituite da complessi proteici nei quali una delle subunità contiene il dominio "RING Zinc-finger" per il legame con il complesso E2-ubiquitina, mentre le altre subunità servono per l'interazione con la proteina bersaglio (Viestra, 2003; Moon *et al.*, 2004). Per questo secondo gruppo nelle piante sono stati individuati i complessi: CUL-3BTP, costituito da tre subunità; SCF, comprendente quattro subunità; APC, con 11 subunità (Viestra, 2003; Moon *et al.*, 2004). Nel genoma di *Arabidopsis* sono stati individuati solo 7 geni codificanti per proteine contenenti il dominio HECT, mentre circa 400 codificano per proteine contenenti il dominio "RING Zinc-finger". Ancora non è chiaro se tutte le proteine RING agiscano da enzimi E3 e se esse possano svolgere altre funzioni interagendo con altre proteine. Infine i cloni OPH-60 ed OPH-64 hanno evidenziato una significativa omologia con geni codificanti per due delle 18 subunità che costituiscono il complesso di regolazione 19S. Come detto in precedenza, la proteolisi di proteine regolatrici rappresenta uno degli aspetti più rilevanti della regolazione di vari

processi biologici e recenti evidenze hanno indicato che nelle piante la via metabolica ubiquitina-proteasoma è coinvolta nelle risposte di difesa attivate in seguito all'attacco di patogeni fungini (Azevedo *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 1992). L'induzione o la sovraespressione di quattro geni codificanti per proteine coinvolte nella pathway ubiquitina-proteasoma, pertanto, potrebbe rappresentare un aspetto molto importante della risposta molecolare allo stress da ozono.

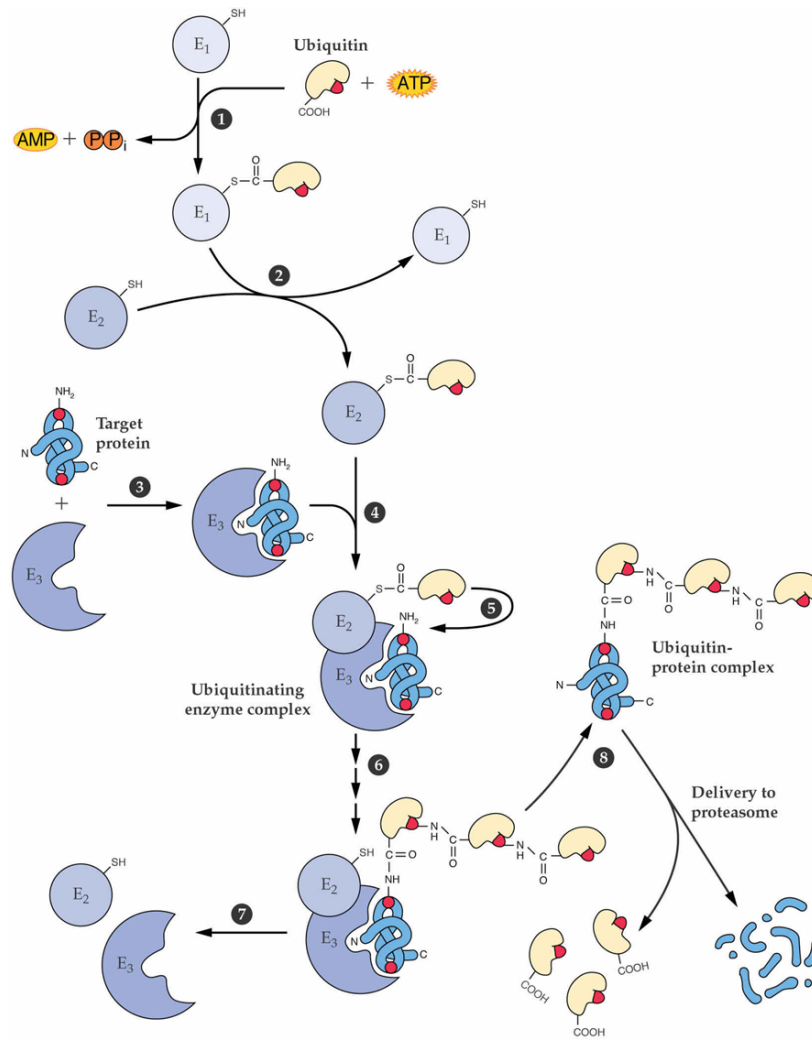


Fig. 4.9 - Una proteina legata all'ubiquitina viene destinata alla degradazione. Il processo è attuato da un complesso enzimatico ubiquitinante. Questo complesso svolge una complessa serie di reazioni, che vengono riportate in forma semplificata in questa figura. Il complesso consiste di un enzima che attiva l'ubiquitina (E1), di un enzima che coniuga l'ubiquitina (E2) e di un enzima che lega l'ubiquitina (E3). (1): Il gruppo carbossilico C-terminale di una catena di ubiquitina è coniugato covalentemente a un residuo solfidrilico di una Cys in E1. (2): L'ubiquitina è trasferita a un residuo solfidrilico di una Cys in E2. (3): La proteina bersaglio che porta il segnale di degradazione è riconosciuto da E3, che la lega in un complesso non covalente. (4): Il complesso (E3: proteina bersaglio) lega E2, formando il complesso enzimatico ubiquitante. (5): L'ubiquitina è trasferita da E2 alla proteina bersaglio attraverso un legame isopeptidico tra il gruppo C-terminale dell'ubiquitina e il gruppo amminico della catena laterale di un residuo di lisina (mostrato come un punto rosso) della proteina bersaglio. (6): Il trasferimento dell'ubiquitina è ripetuto un certo numero di volte, formando una catena multi-ubiquitinica. Il gruppo C-terminale di ogni ubiquitina addizionale è coniugato a un residuo interno di lisina (punto rosso) della precedente catena di ubiquitina. In genere una serie di circa 4 ubiquitine deve essere aggiunta alla proteina bersaglio prima che possa essere effettivamente consegnata al proteasoma per la degradazione. L'ubiquitina è rilasciata dalla proteina bersaglio in questo passaggio così che possa essere riutilizzata.

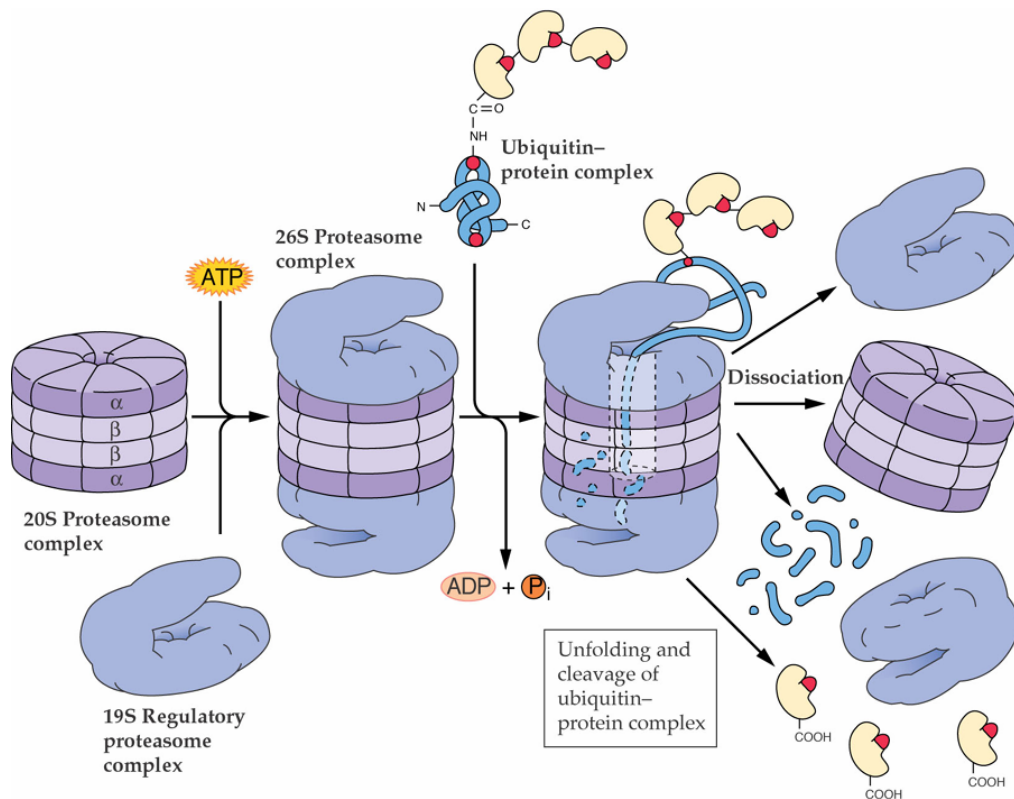


Fig. 4.10 - La struttura di un proteasoma. Il core del proteasoma (proteasoma 20S) ha una caratteristica forma a cilindro cavo, creato dall'assemblaggio di 4 anelli impilati. Ogni anello contiene 7 polipeptidi. Una subunità di regolazione 19S lega ciascun estremo del proteasoma 20S, formando un proteasoma 26S. Le proteine bersaglio ubiquitinate sono consegnate al proteasoma per la degradazione.

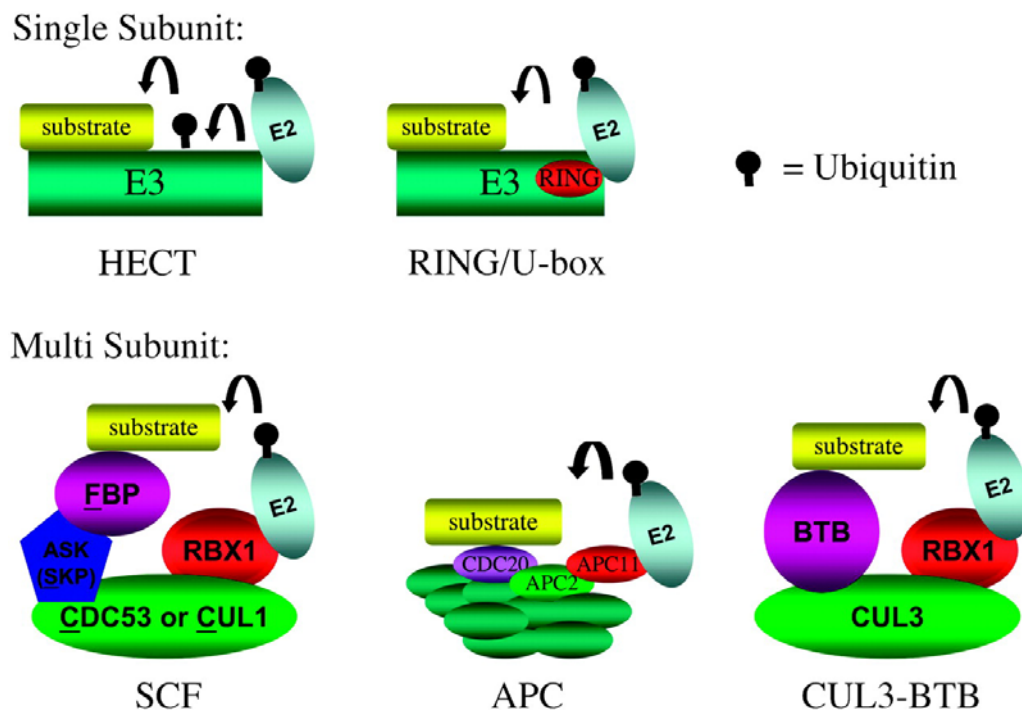


Fig. 4.11 – Classi di ubiquitina ligasi E3 nelle piante. Le proteine “cullin” e “like cullin” sono indicate in verde, le proteine RING in rosso e i fattori per la specificità del substrato in porpora.

Tabella 4.10 - Omologia di sequenze cDNA differenzialmente espresse in piante ozonate appartenenti alle cv Duilio e Portorico: geni coinvolti nella sintesi/destinazione/degradazione cellulare.

CLONE	bp	Profili di espressione	Omologia (n° Acc.)	Blast score	Specie	Proteina omologa
25) OPH-56	656	B	AY3223129	315	<i>O. sativa</i>	Putative RING-H2 zinc finger protein
26) OPH-49	480	B	AF386935	185	<i>A. thaliana</i>	Ubiquitin conjugating enzyme (E2)
27) OPH-60	654	B	AY070466	417	<i>A. thaliana</i>	26S proteasome regul. sub. 3 (RPT3)
28) OPH-64	306	B	AB037150	202	<i>O. sativa</i>	26S proteas. regul. sub. 8 (OsRPN8)
39) OPH-70	625	B	AP005067	324	<i>O. sativa</i>	Put. aspartic proteinase nepenthesin
30) OPH-91	730	B	Y12068	177	<i>H. vulgare</i>	Cystatin, cysteine proteinase inhibit.
31) ODE-17	784	A	BX842607	288	<i>O. sativa</i>	Putative subtilase
32) OPB-122	450	A	AC0990443	317	<i>O. sativa</i>	Putative chloroplast thylakoidal peptidase
33) OPB-105	470	B	250789	223	<i>H. vulgare</i>	a subunit of elongation factor 1

4.5.4. Gruppo funzionale 4: geni coinvolti nel metabolismo cellulare

Degli 11 cloni assegnati al quarto gruppo funzionale (metabolismo) cinque sono risultati correlati a sequenze geniche codificanti per enzimi coinvolti nella sintesi di alcuni ormoni vegetali, l'etilene (ET), il jasmonato (JA) e l'ABA, che, come è stato ampiamente documentato, insieme all'acido salicilico (SA), interagiscono in maniera complessa nella regolazione delle cinetiche di inizio, propagazione e contenimento della PCD indotta da O₃.

I cloni ODE-6 e ODE-15 sono risultati omologhi a sequenze geniche codificanti per due enzimi chiave della biosintesi dell'etilene, cioè, rispettivamente, la 1-aminociclopropano-1-carbossilato (ACC) sintetasi e la 1-aminociclopropano-1-carbossilato (ACC) ossidasi. L'enzima ACC ossidasi catalizza la produzione di etilene dal suo immediato precursore, l'acido 1-amminociclopropano-1-carbossilico (ACC), che a sua volta deriva dalla S-adenosil-L-metionina (SAM) con una reazione catalizzata dalla ACC sintasi, enzima del ciclo della metionina (ciclo di Yang, figura 4.12). La SAM, oltre ad essere coinvolta nella sintesi dell'etilene, partecipa alla biosintesi delle poliammine ed è il substrato di una vasta serie di reazioni di metilazione. L'etilene è un ormone gassoso, che svolge un ruolo chiave in diversi aspetti della crescita e dello sviluppo delle piante. La produzione di ET è anche associata a diversi fattori di stress, quali: carenza di ossigeno, metalli pesanti, infezioni di patogeni ed esposizione all'ozono (Wang *et al.*, 2002). Questo ormone è coinvolto anche nella regolazione della PCD in diversi processi biologici inducibili o legati allo sviluppo (Overmyer *et al.*, 2003). Studi condotti in numerose specie vegetali hanno indicato l'esistenza di una diretta correlazione tra l'accumulo di ET e l'entità del danno indotto da ozono (Welburn e Welburn, 1996). Nei genotipi suscettibili la comparsa e la propagazione di aree necrotiche fogliari è, infatti, preceduta da un'elevata produzione di ET, che avviene mediante l'attivazione della trascrizione dei geni codificanti per l'ACC sintasi e l'ACC ossidasi, due enzimi chiave nella via biosintetica di questo ormone. Questa iperproduzione di ET è necessaria per indurre l'accumulo di ROS e lo sviluppo e la diffusione delle lesioni fogliari (Tuomainen *et al.*, 1997; Vahala *et al.*, 1998; Moeoder *et al.*, 2002). Tale correlazione è stata confermata da studi condotti in diversi mutanti per la via biosintetica dell'ET in *Arabidopsis*. I mutanti di *Arabidopsis* insensibili all'etilene (*etr1*, *ein2*, *ein3*) sono tolleranti all'O₃, mentre mutanti come *eto* (*ethylene overproducer*)-1 ed *eto-3*, che sintetizzano elevate quantità di ET, risultano particolarmente sensibili all'ozono ed evidenziano un'iperproduzione di ROS, necessaria per l'amplificazione dei meccanismi che regolano la PCD (Rao *et al.*, 2002). Questi risultati dimostrano la risposta all'ozono dei geni che controllano la sintesi dell'ET e

suggeriscono un ruolo importante di questo ormone nella produzione di ROS e nella regolazione della propagazione dei meccanismi che determinano la PCD.

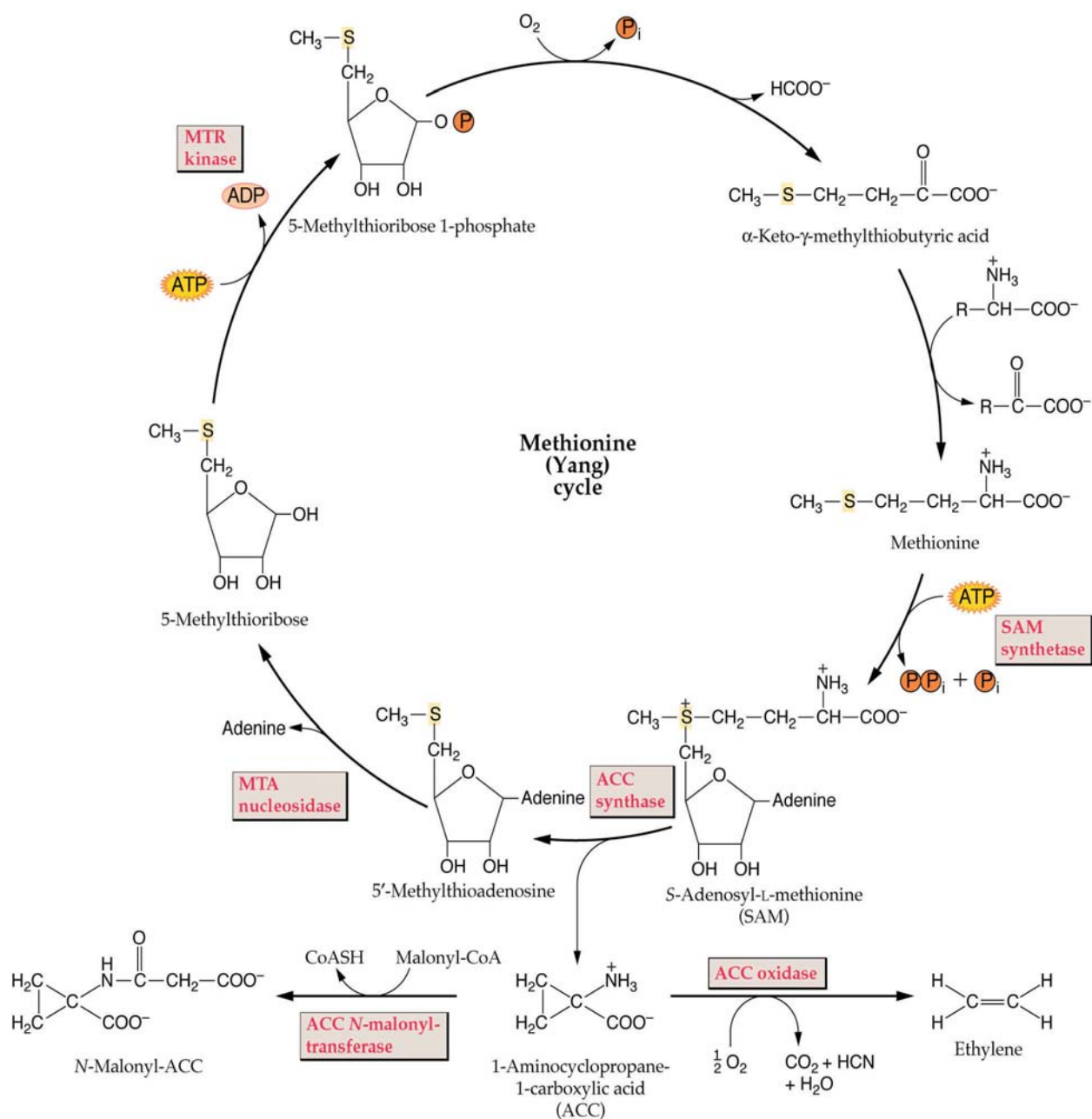


Fig. 4.12 - Sintesi della metionina e biosintesi dell'etilene. L'etilene è sintetizzato a partire dalla metionina attraverso gli intermedi SAM e ACC. Gli enzimi che catalizzano i tre passaggi della conversione sono: l'ATP-metionina S-adenosil-transferasi (SAM sintasi), la S-adenosil-L-metionina metiltioadenosina liasi (ACC sintasi) e l'ACC ossidasi. La molecola di metionina inizialmente impiegata è rigenerata, attraverso le reazioni che costituiscono l'omonimo ciclo, a partire dalla 5'-metiltioadenosina, uno dei due prodotti di reazione della ACC sintasi. Se il metiltio-gruppo della SAM non fosse riciclato, i livelli di metionina e quindi la biosintesi di etilene sarebbero condizionati dalla disponibilità di zolfo. Le piante possono ridimensionare il pool dell'ACC, e quindi la produzione di etilene, convertendo l'ACC in N-malonyl-ACC piuttosto che in etilene.

I cloni ODE-38 e ODE-40 hanno evidenziato una significativa omologia con sequenze geniche codificanti, rispettivamente, per l'allene ossido sintetasi (AOS) e per l'allene ossido ciclastasi (AOC), due enzimi importanti nella biosintesi dell'acido jasmonico (JA). La produzione di JA deriva dall'acido α -linoleico, un acido grasso poliinsaturo a 18 atomi di C. (Fig. 4.13). L'isolamento di numerosi mutanti di *Arabidopsis* difettivi per la produzione di JA ha permesso di definire in maniera abbastanza completa la sua via biosintetica (Weber, 2002). Parecchi enzimi chiave nella sintesi di JA, quali la lipossigenasi, l'allene ossido sintasi e l'allene ossido ciclastasi, sono caratterizzati dalla presenza di peptidi di transito che ne consentono l'importazione specifica nei cloroplasti; nella sintesi dell'acido α -linoleico, il principale precursore di JA, quindi, è probabilmente implicata una lipasi cloroplastica. L'acido α -linoleico viene ossidato dalla lipossigenasi in acido 13(S)-idroperossilinoico, il quale è convertito in acido 12,13(S)-epossilinoico dall'AOS. Il prodotto della reazione subisce una rapida ciclizzazione operata dall'AOC con produzione di un derivato ciclopentatone, l'acido 12-ossi-PDA (Fig. 4.13). Quest'ultimo subisce una riduzione catalizzata dalla 12-ossi-PDA riduttasi con produzione dell'acido 3-ossi-2-(cis-2'-pentenil)ciclopentano-1-ottanoico che infine è convertito ad acido 7-jasmonico attraverso tre cicli di β -ossidazione. Non è ancora chiaro se la successiva isomerizzazione dell'acido 7-isojasmonico in JA avvenga ad opera di una reazione enzimatica o non enzimatica.

L'acido jasmonico (JA) è un composto coinvolto nella regolazione di diversi processi fisiologici della crescita e sviluppo delle piante (Turner *et al.*, 2002). Esso è, inoltre, indotto da diversi stress biotici ed abiotici, incluso l'O₃, ma è stato studiato soprattutto per il suo ruolo nei meccanismi di resistenza ai patogeni (Berger, 2002). Le piante accumulano JA quando subiscono ferite o quando sono trattate con elicitori, generalmente oligosaccaridi prodotti da patogeni, o con il peptide sistemina. Numerosi studi hanno evidenziato che JA modula l'espressione di numerosi geni coinvolti nei meccanismi di difesa delle piante. Il JA attiva l'espressione di proteine antifungine come l'osmotina e la tionina ed induce enzimi relativi alla sintesi delle fitoalessine, quali la calcone sintasi, la fenilalanina ammonioliasi (PAL) e l'idrossimetilglutaril-CoA riduttasi (Creelman e Mullet, 1997). In molte specie è stata osservata anche l'induzione di inibitori delle proteasi che hanno come bersaglio principale alcuni insetti. Il trattamento esterno con JA ha inoltre evidenziato che la sintesi di inibitori delle proteasi avviene anche in foglie diverse da quelle alle quali è stato applicato, analogamente alla risposta sistemica che si realizza nelle piante quando una ferita induce risposte anche in foglie distanti dalla zona danneggiata. Piante di pomodoro trattate con JA mostrano, inoltre, una pronunciata resistenza a *Phytophthora infestans* e mutanti della stessa

specie che non producono JA risultano più suscettibili all'attacco del patogeno. Diversi studi hanno indicato che JA sia uno dei fattori importanti per limitare lo sviluppo e la diffusione delle lesioni necrotiche dipendenti dall'iperproduzione delle ROS. Sulla base di analisi di espressione dei geni attivati dalla via metabolica del jasmonato è stato dimostrato che l'accessione di *Arabidopsis* sensibile all'O₃ Cvi-0 ha una ridotta capacità di percezione di JA, mentre risponde ad elevate dosi del suo derivato volatile Me-JA, il quale è in grado di attenuare il burst ossidativo e l'accumulo di SA indotti da O₃, riducendo sensibilmente le lesioni necrotiche a carico delle foglie (Rao *et al.*, 2000). L'ottenimento di mutanti difettivi nella sintesi di JA [triplo mutante *fad* (*fatty acid desaturase*)-3, *fad-7* e *fad-8*] o nella percezione a questa molecola segnale [mutanti *coronatine insensitive* (*coi*)-1 e *jasmonate resistant* (*jar*)-1] nell'accessione Col-O di *Arabidopsis* hanno permesso di studiare in maniera dettagliata il ruolo di JA nelle risposte indotte da ozono. Col-0 risulta particolarmente tollerante all'ozono e non sviluppa lesioni neanche dopo un'esposizione acuta e prolungata a questo inquinante atmosferico. In entrambi i tipi di mutanti per JA si assiste, tuttavia, ad una rapida formazione e diffusione di lesioni necrotiche in seguito al trattamento con O₃, indicando uno specifico ruolo di JA nella regolazione della PCD O₃-indotta. Analisi dettagliate delle risposte dei mutanti *coi-1* e *jar-1* sottoposti a trattamento con O₃ indicano che la percezione di JA è essenziale per il controllo del burst ossidativo e dei livelli di accumulo di SA e per la regolazione dell'induzione e dell'intensità della risposta ipersensibile. Questi risultati quindi evidenziano che la produzione e la percezione del JA sono essenziali per desensibilizzare il burst ossidativo indotto dall'ozono e inibire l'amplificazione dei segnali di difesa che determinano una sovrapproduzione di ROS e la conseguente reazione ipersensibile HR. Uno dei meccanismi attraverso i quali JA potrebbe controllare il contenimento della diffusione delle lesioni necrotiche è quello della regolazione dei recettori per l'etilene, in quanto è stato dimostrato che questa molecola è in grado di indurre l'espressione dei geni che codificano per questi recettori (Schenk *et al.*, 2000). L'aumentata sintesi di nuovi recettori non occupati da ET potrebbe diminuire la sensibilità a questo ormone gassoso, questo è considerato uno dei meccanismi per desensibilizzare la pianta all'ET quando le risposte attivate da questo ormone devono essere mantenute ad un basso livello (Bleecker e Kende, 2000; Ciardi *et al.*, 2001).

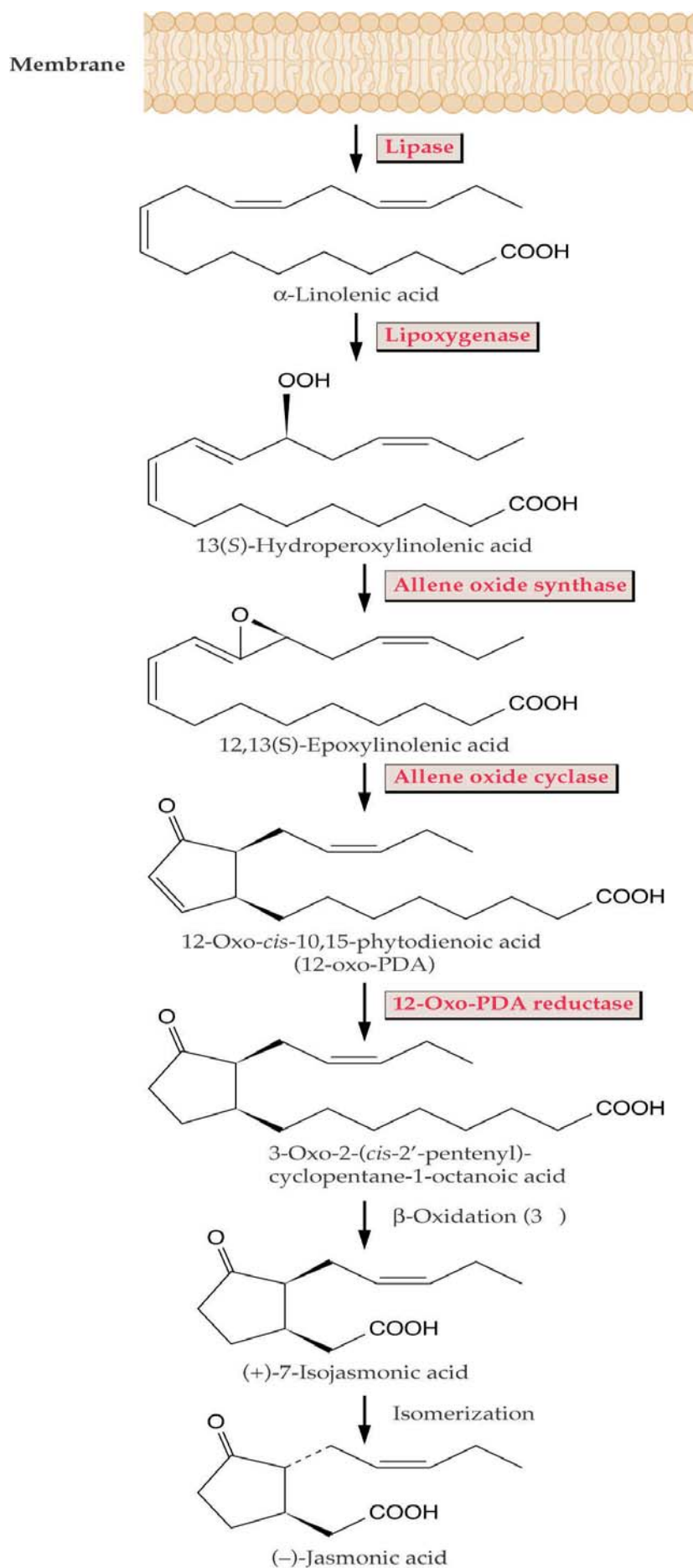


Fig. 4.13 - Biosintesi dell'acido jasmonico.

Per la proteina codificata da ODE-9 è stata rilevata omologia di sequenza con la 9-cis-epossicarotenoide digossigenasi, che è implicata nella biosintesi dell'acido abscissico (ABA). Sono state individuate due vie metaboliche per la sintesi di ABA. La prima, definita via diretta C15, sembra essere attiva in alcuni funghi e prevede la produzione dell'ormone a partire da un precursore a 15 atomi di C, come il farnesil difosfato. La seconda, conosciuta come via indiretta C40, prevede la degradazione ossidativa dei carotenoidi (Fig. 4.14). Il primo passaggio specifico della via di biosintesi indiretta dell'ABA consiste nella degradazione ossidativa di un 9-cis-epossicarotenoide a 40 atomi di carbonio con la produzione di xantossina a 15 atomi di C e di un composto con 25 atomi di C. La reazione a carico della 9-cis-neoxantina e della 9-cis-violaxantina è catalizzata proprio dall'enzima 9-cis-epossicarotenoide digossigenasi, chiamato anche carotenoide ossidasi. Nelle piante questo enzima è risultato sovraespresso durante lo stress da siccità (Qin and Zeevaart, 1999). Yoshida *et al.* (2003) hanno osservato che in *Chlamydomonas reinhardtii* l'ABA esogeno induce la tolleranza allo stress ossidativo mediato sia da paraquat, sia da H₂O₂, i risultati ottenuti durante questa ricerca, quindi, possono essere considerati come una delle prime dimostrazioni nelle piante della risposta all'O₃ di geni correlati all'ABA. Recentemente è stato proposto un coinvolgimento dell'ABA nella regolazione della chiusura degli stomi in seguito a trattamento con ozono. La capacità di escludere fisicamente l'inquinante attraverso la chiusura degli stomi, i siti principali attraverso i quali l'ozono entra nella pianta, rappresenta uno dei meccanismi di difesa maggiormente documentati. E' ancora sostanzialmente ignoto, tuttavia, come l'O₃ influenzi la chiusura degli stomi. I meccanismi suggeriti vanno da modificazioni nella fotosintesi alla segnalazione dell'acido abscissico (ABA), alla generazione di un burst ROS ossidativo direttamente nelle cellule di guardia, all'emissione di etilene, tutti fenomeni che influenzano la chiusura degli stomi. La partecipazione della segnalazione ABA nella chiusura degli stomi O₃-indotta è stata ipotizzata in seguito al confronto tra il tipo selvatico di *Arabidopsis* Col-0 e mutanti insensibili all'ABA; la chiusura stomatica O₃-indotta era significativamente più rapida nel tipo selvatico che nei mutanti (Ahlfors *et al.* 2004a). Alla fine, tuttavia, l'O₃ causava la chiusura degli stomi nei mutanti insensibili all'ABA, indicando che l'O₃ influenza gli stomi anche tramite meccanismi ABA-indipendenti.

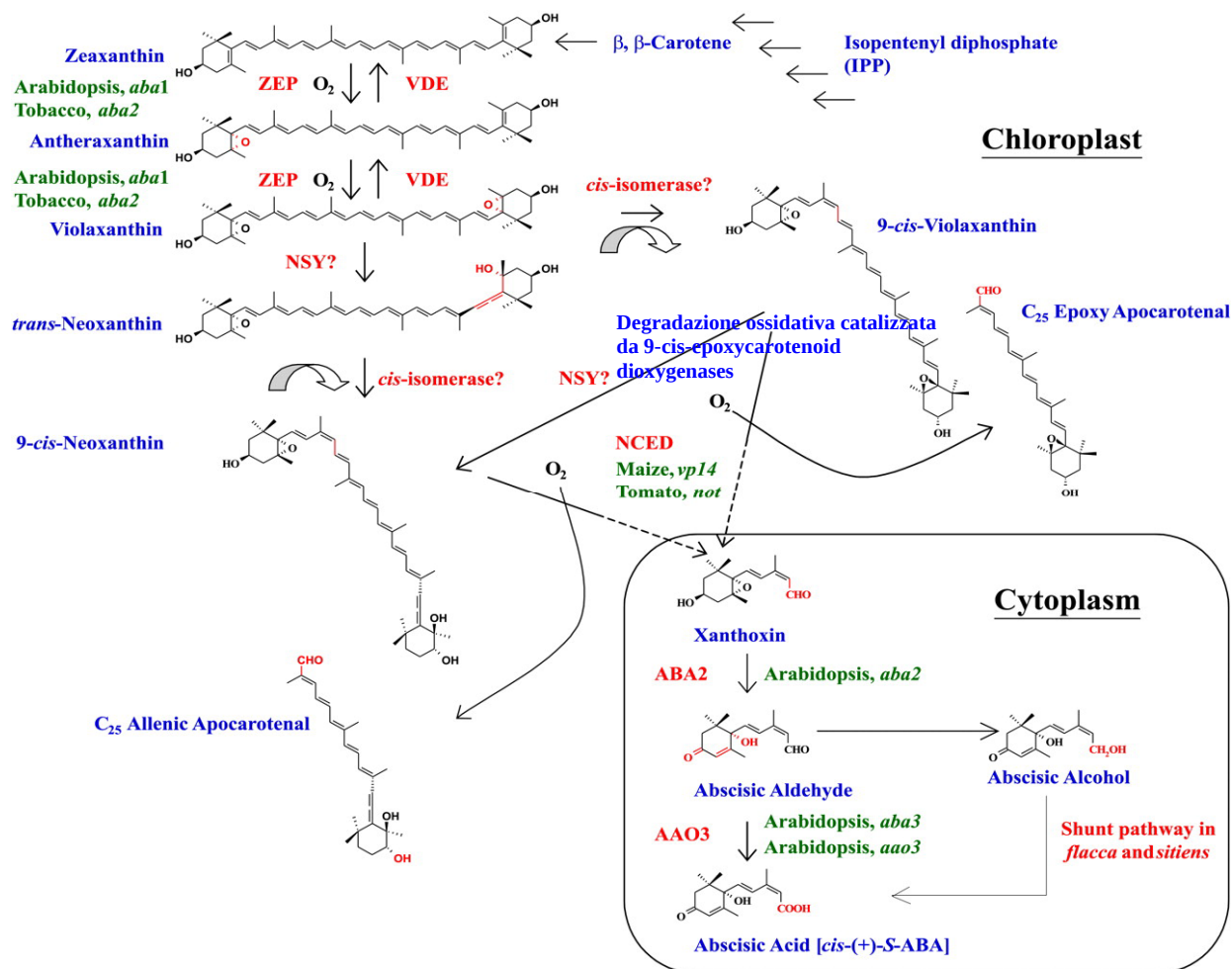


Fig. 4.14 - Via di biosintesi indiretta dell'ABA a partire dai carotenoidi

Il clone OPH-77 ha evidenziato una significativa omologia con un gene di riso che codifica per la 3-idrossi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) sintasi (Tab. 4.11), un enzima chiave nella via metabolica che controlla la sintesi dell'Isopentil difosfato (IPP). Questa via metabolica (Fig. 4.15) implica una condensazione in due fasi di tre molecole di acetil-CoA da parte di una tiolasi ed appunto della HMG-CoA sintasi, che in particolare catalizza l'aggiunta all'acetoacil-CoA, formato in seguito all'azione della tiolasi, dell'acetil-CoA. Il prodotto risultante, il 3-idrossi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), viene successivamente ridotto dall'HMG-CoA riduttasi, in due reazioni accoppiate, a formare l'acido mevalonico. Due successive fosforilazioni ATP-dipendenti dell'acido mevalonico ed una successiva decarbossilazione assistita da una fosforilazione producono l'IPP, un composto a 5 atomi di carbonio. L'IPP viene utilizzato in una sequenza di reazioni di allungamento che producono una serie di omologhi del prenil pirofosfato, derivante dall'isomerizzazione dell'IPP, che è considerato il precursore di diverse famiglie di terpenoidi o isoprenoidi. Tutti i terpenoidi sono, infatti, polimeri derivanti dal legame ripetitivo tra unità a 5 atomi di carbonio ramificate basate sulla struttura dell'isopentano. Questi monomeri sono denominati unità isopreniche, in quanto la decomposizione termica di molte sostanze terpenoidi produce il gas isoprene; condizioni chimiche ottimali possono indurre la polimerizzazione dell'isoprene a formare multipli di cinque atomi di carbonio, generando numerosi scheletri terpenoidi. Per questa ragione i terpenoidi sono spesso detti anche isoprenoidi, anche se è chiaro che l'isoprene non è il precursore biologico di questa famiglia di metaboliti.

È stato notato che stress ambientali abiotici come siccità o alte temperature possono stimolare la sintesi e l'emissione di isoprenoidi (Sharkey e Loreto, 1993). La trascrizione di geni che codificano per l'HMG-CoA riduttasi e sintasi è risultata, inoltre, notevolmente incrementata in diverse specie vegetali sottoposte a stress biotici ed abiotici, incluso l'ozono (Yang *et al.*, 1991; Wegener *et al.*, 1997). Sulla base di studi effettuati in diverse specie forestali esposte ad elevate dosi di O₃ in presenza o assenza di isoprene, è stato proposto che gli isoprenoidi abbiano una generale funzione antiossidante, piuttosto che una specifica azione nei confronti di un determinato stress ambientale (Loreto *et al.*, 2001). I risultati più importanti di questi studi sono riassunti nei seguenti punti: 1) le specie che non emettono isoprenoidi sono generalmente più sensibili ai danni provocati da esposizione a dosi elevate di O₃; 2) il danno da O₃ può essere ridotto dal 30% al 100% con fumigazioni di isoprene in specie che non sono in grado di sintetizzarlo; 3) la protezione degli isoprenoidi non è dovuta ad una riduzione della dose di O₃ assorbita, ma sembra correlata alla sua diffusione all'interno della foglia a seguito di reazioni chimiche; 4) l'inattivazione della sintesi di isoprene nelle piante O₃-tolleranti, effettuata mediante fosmidonica, fa cessare gli effetti protettivi contro l'O₃.

Questi risultati indicano che, al pari di altri terpenoidi come i carotenoidi, gli isoprenoidi volatili possono agire da forti agenti antiossidanti e suggeriscono che la tolleranza ad altri stress abiotici come alte temperature e siccità, osservata in precedenti esperimenti in piante che emettono questi composti, sia da attribuire a questa azione di detossificazione. A conferma di ciò è stato osservato che l'accumulo di prodotti ossidativi, come H_2O_2 e sostanze relative alla denaturazione delle membrane (perossidi dei lipidi), è limitato in piante che emettono isoprene dopo esposizione ad O_3 , ma aumenta significativamente nelle stesse piante quando la sintesi di isoprene viene soppressa (Loreto *et al.*, 2001). L'inibizione della sintesi dell'isoprene provoca, inoltre, un significativo aumento di radicali altamente reattivi anche in assenza di stress da O_3 , indicando che gli isoprenoidi possono svolgere un'importante azione antiossidante anche in condizioni fisiologiche normali ed in assenza di fisiopatie.

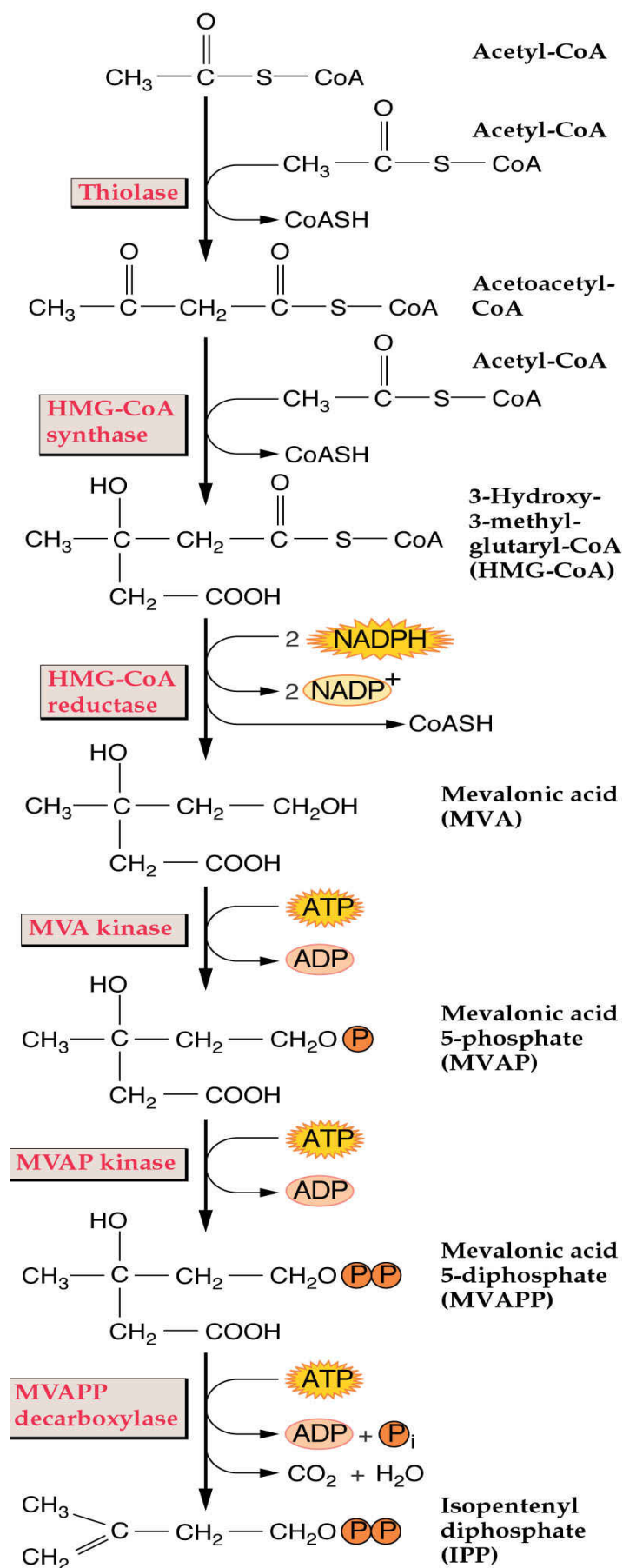


Fig. 4.15 - La via dell'acetato/mevalonato per la formazione di IPP, l'unità base a 5 atomi di carbonio nella biosintesi dei terpenoidi. La sintesi di ogni IPP richiede 3 molecole di acetil-CoA.

Tabella 4.11 - Omologia di sequenze cDNA differenzialmente espresse in piante ozonate appartenenti alle cv Duilio e Portorico: geni coinvolti nel metabolismo cellulare.

CLONE	bp	Profili di espressione	Omologia (n° Acc.)	Blast score	Specie	Proteina omologa
34) OPH-62	772	A	AC134348	434	<i>O. sativa</i>	Glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein
35) OPH-75	442	B	AP005097	240	<i>O. sativa</i>	Putative adenylate kinase
36) OPH-77	283	B	AP004632	161	<i>O. sativa</i>	Putative hydroxymethylglutaryl CoA synthase
37) OPB-102	409	B	AJ278243	129	<i>T. aestivum</i>	Triosephosphate isomerase
38) OPB-112	430	B	AF024589	318	<i>O. sativa</i>	P subunit of glycine dehydrogenase complex
39) ODE-38	453	B	AV196004	265	<i>T. aestivum</i>	Allene oxide synthase (JA)
40) ODE-40	462	B	AJ308488	210	<i>H. vulgare</i>	Allene oxide cyclase (JA)
41) ODE-6	662	B	AP000559	392	<i>O. sativa</i>	ACC synthase (ET)
42) ODE-15	705	B	AP004058	354	<i>O. sativa</i>	ACC oxidase (ET)
43) ODE-9	832	B	AJ322927	418	<i>C. sativus</i>	Carotenoid oxidase, ABA biosynthesis
44) OPIH-89	343	B	AP005190	122	<i>O. sativa</i>	Ferredoxin

4.5.5. Gruppo funzionale 5: geni coinvolti nella protezione/difesa cellulare

Quattro degli 11 cloni assegnati al quinto gruppo funzionale (protezione/difesa cellulare) corrispondono a sequenze codificanti per proteine coinvolte nello stress termico (OPH-42) o salino (OPH-46) o a geni indotti da attacchi di patogeni (OPH-45, proteina PR; OPB-109, proteina indotta da un elicitore fungineo). L'induzione o la sovraespressione di queste sequenze sembra confermare l'ipotesi della convergenza delle risposte molecolari a stress di origine diversa, avvalorando l'ipotesi che l'ozono si comporti da elicitore abiotico di reazioni di difesa.

Il clone OPH-46 è risultato significativamente correlato ad una sequenza genica di riso, codificante per una proteina inducibile da stress salino, che contiene un motivo di 34 aminoacidi definito "tetratricopeptide (TPR) repeat". Tale motivo è stato descritto per la prima volta nel regolatore del ciclo cellulare Cdc23p di lievito e, successivamente, è stato rinvenuto in numerose proteine eucariotiche (Lamb *et al.*, 1995). Una possibile funzione di TPR potrebbe essere quella di mediare l'interazione con altre proteine, ma le caratteristiche comuni dei "pattern" partecipanti all'interazione non sono state ancora definite. E' stato proposto che le proteine TPR interagiscano preferenzialmente con proteine contenenti motivi WD40, sebbene in molti casi proteine TPR tendano ad aggregarsi in complessi multiproteici. Le proteine contenenti motivi WD40, così chiamati perché costituiti da una sequenza altamente conservata di circa 40 aminoacidi che termina con i residui Trp-Asp (WD), regolano diverse funzioni cellulari, come la divisione cellulare, la trascrizione genica e la modificazione dell'mRNA (Smith *et al.*, 1999); esse svolgono la loro attività interagendo con altre proteine mediante una regione contenente più unità ripetute del motivo WD40. E' interessante notare che i cloni OPH-81 e OPH-87, assegnati al primo gruppo funzionale, mostrano significative omologie con geni codificanti per proteine contenenti motivi WD40.

Il clone OPH-42 è risultato omologo a geni codificanti per proteine da shock termico (HSP, heat shock proteins) appartenenti alla famiglia delle HSP70 (Storozhenko *et al.*, 1996). Oltre ad un loro potenziale coinvolgimento nella risposta allo stress termico, le proteine HSP70 sono essenziali nelle normali funzioni cellulari e le più importanti di esse sono conservate in tutti gli organismi viventi, sia procarioti che eucarioti. Alcuni membri di questa famiglia sono espressi costitutivamente, altri sono indotti dal calore. Presenti in molteplici compartimenti cellulari (citoplasma, reticolo endoplasmatico, mitocondri e plastidi), le proteine HSP70 sono chaperoni molecolari dipendenti da ATP, che possono interagire con diversi polipeptidi, dato il loro coinvolgimento nel ripiegamento, denaturazione, assemblaggio e disassemblaggio delle

proteine. La famiglia delle HSP70 può essere suddivisa nella sottofamiglia DnaK, che comprende proteine di peso molecolare di circa 70 KDa, riconducibili alla proteina HSP70 di *E. coli* denominata DnaK, e nella sottofamiglia HSP110/SSE1. Poiché i membri appartenenti a questa seconda sottofamiglia, pur evidenziando significative omologie di sequenza con le classiche proteine HSP70 appartenenti alla sottofamiglia DnaK, posseggono particolari caratteristiche distintive, ad esempio un maggior peso molecolare, è stato proposto che essi costituiscano una ben definito sottogruppo. La sequenza genica di *Arabidopsis* codificante per HSP91, omologa alla sequenza del clone OPH-42, è stato il primo membro della sottofamiglia HSP110/SSE1 ad essere isolato e caratterizzato nelle piante (Storozhenko *et al.*, 1996). HSP91 ha peso molecolare di 91 KDa e contiene, nella regione N-terminale, il dominio altamente conservato di legame all'ATP caratteristico dei membri appartenenti alla famiglia delle HSP70, mentre la regione C-terminale risulta meno conservata, in funzione probabilmente della specificità per il substrato con cui la proteina deve interagire. HSP91 ha evidenziato un'omologia di sequenza nettamente superiore con i membri appartenenti alla sottofamiglia HSP110/SSE1 isolati in lievito (SSE1 e SSE2) e nei mammiferi, piuttosto che con le classiche proteine HSP70 isolate anche dalle piante. Il gene codificante per HSP91 risultava espresso costitutivamente, anche se il suo livello di trascrizione aumentava sensibilmente e immediatamente quando le piante di *Arabidopsis* venivano sottoposte ad uno shock termico di 37° C e si manteneva particolarmente elevato anche dopo un'ora dal trattamento. L'elevato livello di espressione rilevato in condizioni di stress termico ha indicato un potenziale coinvolgimento di HSP91 nell'acquisizione della termo-tolleranza. D'altronde la sua espressione costitutiva e la presenza di un dominio N-terminale di legame all'ATP ha suggerito anche un suo ruolo come chaperone molecolare.

Numerose evidenze dirette ed indirette indicano che l'induzione di geni codificanti per proteine HSP possa rappresentare uno dei meccanismi abbastanza conservati della risposta allo stress da O₃ tra diverse specie vegetali. Le analisi condotte sul trascrittoma di *Arabidopsis* in risposta ad una esposizione acuta all'ozono hanno evidenziato, ad esempio, l'induzione di un gene codificante per una HSP90 (Tamaoki *et al.*, 2003). Allo stesso tempo un'esposizione cronica in campo aperto ha determinato, sempre in *Arabidopsis*, sostanziali incrementi nella quantità di trascritti relativi a diverse HSP (HSP17, HSP70 e HSP101) e ad un fattore di trascrizione che regola l'espressione di queste proteine (Miyazaki *et al.*, 2004). Lo stress termico, al pari dell'O₃, provoca un aumento della produzione di H₂O₂ (Dat *et al.*, 1998) e recentemente è stato proposto un diretto coinvolgimento di alcune HSP a basso peso molecolare (smHSP) nella tolleranza a diversi agenti che provocano lo stress ossidativo in pomodoro (Banzet *et al.*, 1998). Quindi sembra plausibile che l'induzione di geni codificanti

per HSP in condizioni di stress da ozono possa rappresentare uno dei meccanismi attraverso i quali le piante migliorino la tolleranza a questo inquinante.

Il clone OPH-45 è risultato omologo con un gene di *T. aestivum* codificante per l'enzima β -1-3-esoglucanasi, che appartiene all'estesa e complessa famiglia delle O-glicosil idrossilasi, capaci di idrolizzare il legame glicosidico tra due o più carboidrati o tra un carboidrato ed un'altra molecola (Henrissat e Bairoch, 1996). Come indicato da Okushima *et al.* (2000) in tabacco e, in seguito, confermato da Tamaoki *et al.* (2003b), i quali ne hanno anche messo in evidenza l'inducibilità da O_3 in *Arabidopsis*, questo enzima è considerato una proteina correlata alla patogenesi (PR-2, pathogenesis related-2). Diversi studi hanno evidenziato che l' O_3 è in grado di indurre l'espressione di geni codificanti per diverse proteine PR, inclusa la β -1-3-esoglucanasi, (Ernst *et al.*, 1992; Sharma *et al.*, 1996). In tabacco l'accumulo di trascritti relativi alla β -1-3-esoglucanasi è correlato alla produzione di etilene (Ernst *et al.*, 1992) ed è circoscritto alle regioni fogliari in cui è iniziata la sintesi dell'ormone (Ernst *et al.*, 1996). Per questo motivo è stato proposto che l'induzione spaziale della β -1-3-esoglucanasi in tessuti trattati con O_3 o infettati da patogeno è il risultato dell'attivazione della sintesi e dell'azione di una comune molecola segnale, cioè l'etilene (Ernst *et al.*, 1996). Questa idea è stata confermata dal fatto che l'etilene stessa è in grado di indurre l'espressione di geni codificanti per proteine PR, come β -1-3-esoglucanasi e chitinasi (Pell *et al.*, 1997). L'ozono, come precedentemente indicato, agirebbe, quindi, da elicitore abiotico di reazioni di difesa nelle piante. Tali risposte verrebbero attivate, presumibilmente, perchè l'ozono, attraverso la produzione delle ROS, induce le vie di segnalazione dell'etilene e di altri ormoni come SA, condividendo, quindi, una sequenza di reazioni comuni con le risposte HR indotte da patogeno (Sandermann, 1996; Sandermann *et al.*, 1998). Le β -1-3-esoglucanasi e le chitinasi sono enzimi che degradano i polisaccaridi strutturali delle pareti cellulari fungine, quindi nel caso di attacco dei patogeni potrebbero avere una funzione importante nell'impedirne la diffusione nella pianta, limitando la loro crescita. Il ruolo che potrebbero svolgere queste proteine durante la morte cellulare indotta da O_3 , invece, non è stato ancora completamente chiarito (Pell *et al.*, 1997).

Il clone OPB-109 è risultato significativamente correlato ad una sequenza genica indotta in riso dopo trattamento di una sospensione cellulare con un elicitore fungino ottenuto da *Magnaporthe grisea* (Kim *et al.*, 2000) e codificante per una proteina contenente un singolo motivo denominato CaLB o C2, che è normalmente attivato da ioni Ca^{2+} ed ha la capacità di legarsi a fosfolipidi, polifosfati dell'inositolo e a diverse proteine intracellulari. Il dominio C2 è presente in molte proteine coinvolte nella trasduzione di diversi tipi di segnali, come le protein chinasi C (PKC), le fosfolipasi C (PLC), le fosfolipasi A2 (PLA2) e la GTPasi

monomerica Ras e sembra svolgere un ruolo primario nel mediare l'interazione Ca^{2+} -dipendente di queste proteine con i fosfolipidi di membrana (Kopka *et al.*, 1998). La presenza, quindi, di un dominio C2 nella proteina codificata da OPB-109 suggerisce che questa proteina potrebbe avere una funzione regolata da Ca^{2+} e/o da fosfolipidi, ancora da definire in maniera più approfondita, nella trasduzione del segnale indotta dallo stress da ozono.

I rimanenti otto cloni assegnati al quinto gruppo funzionale sono correlati a sequenze geniche codificanti per enzimi o proteine coinvolti in diversi sistemi di difesa antiossidanti.

I cloni ODE-21 e ODE-11 hanno evidenziato una significativa omologia con geni codificanti, rispettivamente, per la γ -glutammil-cisteina sintetasi e per la glutatione sintetasi, i due enzimi che intervengono nella biosintesi del glutatione (Fig. 4.16). La γ -glutammil-cisteina sintetasi catalizza la formazione di un legame peptidico tra il gruppo γ -carbossilico del glutammato e l' α -amminogruppo della cisteina. La glutatione sintetasi, invece, catalizza la formazione di un legame peptidico tra il gruppo carbossilico della cisteina della γ -glutammilcisteina e l' α -ammino gruppo della glicina. Entrambe le reazioni prevedono l'idrolisi di ATP. In *Arabidopsis* entrambi gli enzimi sono codificati da singoli geni denominati, rispettivamente, *gsh1* (γ -glutammil-cisteina sintetasi) e *gsh2* (glutatione sintetasi) (Foyer e Noctor, 2005). La proteina codificata da *gsh1* è localizzata nei cloroplasti, come indicato anche dalla presenza di una sequenza N-terminale corrispondente ad un peptide di transito dei plastidi, mentre il gene *gsh2* codifica per due trascritti di differente lunghezza, che codificano per proteine localizzate sia nei plastidi che nel citoplasma, con l'enzima citosolico tradotto dal trascritto più corto nel quale non è presente la sequenza codificante per il peptide di transito nei plastidi (Foyer e Noctor, 2005). Il glutatione (GSH) è un metabolita multifunzionale, che svolge in particolare una funzione cruciale nei meccanismi di difesa e protezione attivati dalla pianta in seguito a stress ossidativi di origine sia biotica che abiotica. In generale, il GSH è presente in modo predominante nella forma ridotta, poiché il rapporto di concentrazione con la sua controparte ossidata, il glutatione disolfuro (GSSG), è spesso più alto di 10. Esso riduce direttamente molte ROS, inclusi l'ossigeno singoletto e il radicale idrossile, ma reagisce piuttosto lentamente con il perossido di idrogeno, così che la riduzione GSH-dipendente di H_2O_2 non è, probabilmente, la principale via di distruzione del perossido di idrogeno nelle piante. Una delle funzioni principali del glutatione come antiossidante è la riduzione del deidroascorbato (DHA) ad acido ascorbico (AA), che può avvenire sia non-enzimaticamente, a pH alcalino, sia attraverso la via chiamata ciclo dell'ascorbato-glutatione (Fig. 4.17). In quest'ultima, il GSH agisce come un intermedio riciclato nella riduzione del perossido di idrogeno ed usa elettroni derivati dall'acqua. I componenti di questo ciclo esistono sia nel cloroplasto che nel citosol e recentemente sono state fornite prove della loro presenza anche nel mitocondrio, nel

gliossisoma, nei perossisomi e nell'apoplasto (Foyer *et al.*, 1997; del Rio *et al.*, 1998; Vanacker *et al.*, 1998a). Il glutatione è anche coinvolto nella detossificazione enzimatica del perossido di idrogeno e di altri idroperossidi organici, agendo come substrato donatore d'idrogeno della glutatione perossidasi (GPOX). Esso agisce inoltre come agente protettivo contro la denaturazione delle proteine, causata dall'ossidazione dei gruppi tiolici in diverse condizioni di stress. Oltre alle sue funzioni antiossidanti, il glutatione ed i suoi derivati sono implicati nell'immagazzinamento e nel trasporto a lunga distanza dello zolfo ridotto, nella detossificazione di xenobiotici, agendo come substrato per la glutatione-S-tranferasi (GST), nell'attivare e coniugare fenilpropanoidi e nella sintesi delle fitochelatine (Noctor *et al.*, 2002).

Studi condotti con diversi mutanti di *Arabidopsis* hanno indicato che il fattore preponderante che regola l'accumulo del glutatione è la quantità e l'attività della γ -glutammina-cisteina sintetasi, che è a sua volta soggetta a retroinibizione da concentrazioni fisiologiche di glutatione (Noctor *et al.*, 2002, Foyer e Noctor, 2005). La velocità di sintesi del metabolita appare anche dipendere dalla disponibilità di cisteina (Droux, 2004). L'aumento della quantità del GSH nelle piante, dovuta ad una sovraespressione dei due geni che ne regolano la sintesi, è stata frequentemente osservata in diverse condizioni di stress di origine biotica ed abiotica. Viceversa, quando il GSH è ridotto al minimo, ad esempio attraverso l'uso di inibitori biosintetici come la butionina sulfossimmina, o attraverso la tecnologia antisense dei geni coinvolti nella sua sintesi, è stato frequentemente osservato un incremento della sensibilità agli stress ossidativi (Noctor *et al.*, 2002, Foyer e Noctor, 2005). La quantità di trascritti dei geni *gsh1* e *gsh2* risulta notevolmente aumentata in *Brassica juncea* ed *Arabidopsis* in seguito alla presenza di elevate concentrazioni di diversi metalli come cadmio e rame (Schäfer *et al.*, 1998; Xiang e Oliver, 1998), mentre un aumento della trascrizione di *gsh1* è stato osservato in foglie di mais sottoposte a stress da basse temperature (Gomez *et al.*, 2004). L'ozono e una ridotta attività della catalasi determinano un aumento della sintesi di JA che a sua volta provoca un aumento della trascrizione dei due geni *gsh1* e *gsh2*, indicando che una via di segnalazione comune potrebbe essere coinvolta nell'incremento della quantità dell'ormone e nella regolazione della trascrizione dei due geni coinvolti nella sintesi del glutatione (Xiang e Oliver, 1998; Harada *et al.*, 2000). Recenti studi hanno inoltre dimostrato che il glutatione possa svolgere un ruolo importante nella trasduzione del segnale in condizioni di stress. La somministrazione esogena di GSH è in grado infatti di indurre in maniera selettiva la trascrizione di geni coinvolti nei meccanismi di difesa, come la SOD, la glutatione riduttasi, la 2-cys perodossina e diverse proteine PR (Alvarez e Lamb, 1997; Baier e Dietz, 1997; Gomez *et al.*, 2004b) ed indurre il rilascio degli ioni Ca^{2+} all'interno del citoplasma (Gomez *et al.*,

2004a).

I cloni ODE-4 e OPE-21 corrispondono, rispettivamente, ai geni di frumento *TAGSTF3* e *TAGST4*, codificanti per due distinte glutathione-S-transferasi (GST) appartenenti alla classe phi (Cummins *et al.*, 2003). Le GST costituiscono una complessa famiglia di proteine presenti in diversi organismi aerobici, che vanno dai batteri all'uomo, e che svolgono funzioni molto diversificate, alcune delle quali ancora non completamente chiarite (Frova, 2003). Sulla base di omologie di sequenza e dell'organizzazione genomica le GST delle piante sono state suddivise in cinque distinte classi, due di esse, Phi e Tau, prevalenti e specifiche solo nel regno vegetale (Frova, 2003). Il ruolo primario di molte GST è quello di partecipare, attraverso la formazione di coniugati con il glutathione, alla detossificazione o inattivazione degli xenobiotici come diversi erbicidi elettrofilici (triazine, tiocarbammati, cloroacetanilidi e difenileteri) o diversi inquinanti organici. Tuttavia le GST delle piante sono state trovate in tutti i tessuti analizzati ed in diversi stadi di sviluppo, indipendentemente dalla presenza degli xenobiotici. La loro presenza nelle piante è di molto antecedente alla comparsa degli erbicidi e degli inquinanti di origine antropica, indicando che le GST possano svolgere un ruolo importante e più generale nella detossificazione di metaboliti endogeni della pianta (Frova, 2003; Foyer e Noctor, 2005).

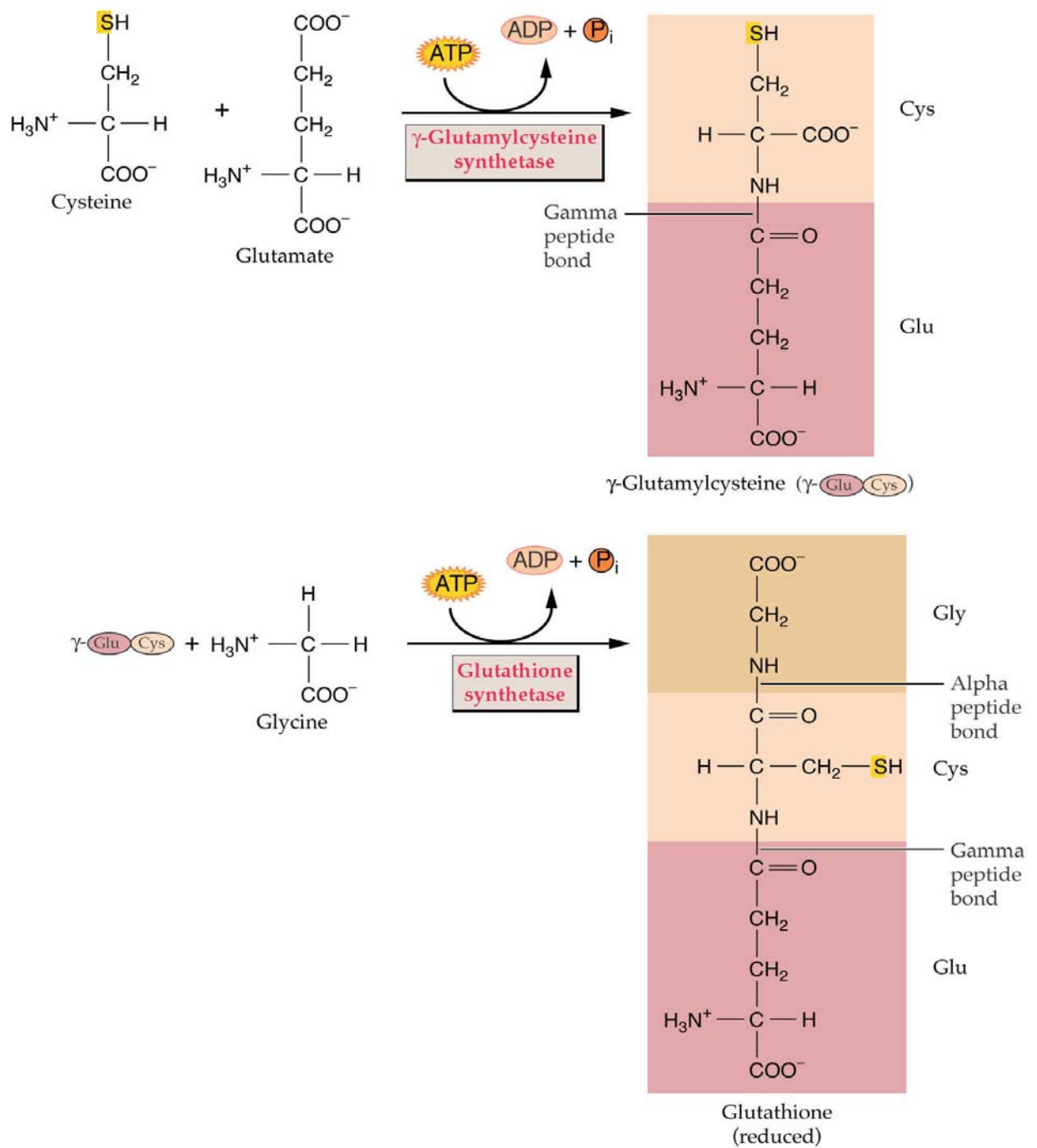


Fig. 4.16 - Reazioni responsabili della sintesi del glutathione

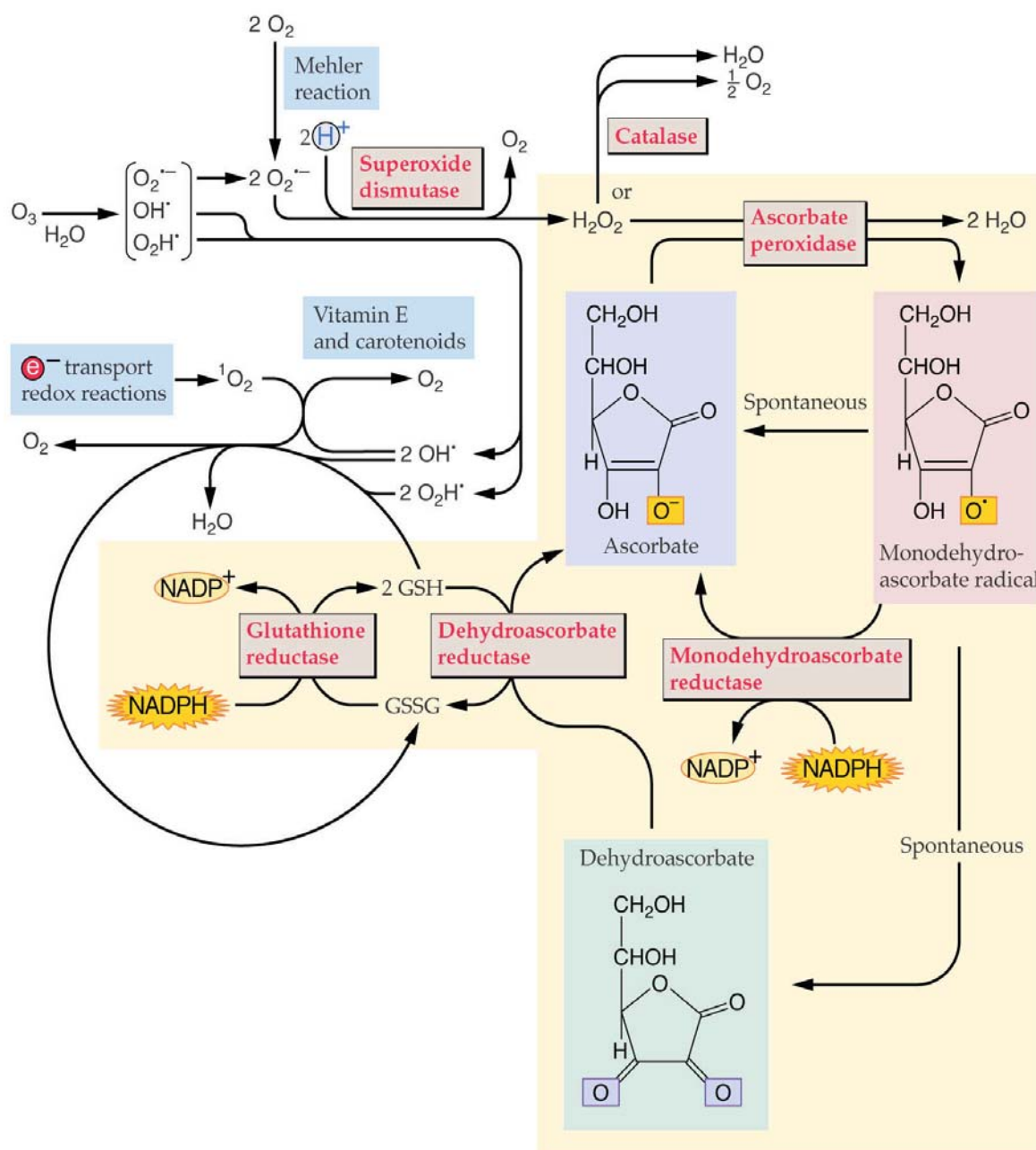


Fig. 4.17 - I sistemi di difesa antiossidanti, con descrizione dettagliata degli antiossidanti enzimatici e non.

Tra i diversi substrati naturali delle GST sono da annoverare diversi metaboliti secondari che, pur svolgendo una funzione protettiva da patogeni ed erbivori, potrebbero risultare a certe concentrazioni tossici per le piante. Ad esempio, coniugati tra il GSH e la medicarpina, una fitoalessina isoflavonoide, si formano mediante una reazione catalizzata da una specifica GST e vengono trasportati nei vacuoli (Li *et al.*, 1997). In mais e petunia la deposizione delle antocianine nei vacuoli richiede la presenza di specifiche GST. Mutazioni nei geni corrispondenti (*Bz2* in mais e *An9* in petunia) impediscono che il processo di deposizione avvenga e determinano un accumulo dei pigmenti nel citoplasma, con effetti fitotossici notevoli (Marrs *et al.*, 1995; Alfenito *et al.*, 1998). Nonostante inizialmente sia stato proposto che le antocianine formassero coniugati con il GSH in reazioni catalizzate dai prodotti di *Bz2* e *An9*, successivamente è stato dimostrato che queste GST agiscono come specifiche proteine che legano direttamente questi composti flavonoidi per il loro trasporto nei vacuoli (Mueller *et al.*, 2000). L'identificazione di GST che interagiscono con l'auxina (Marrs, 1996) e le citochinine (Gonneau *et al.*, 1998) hanno ulteriormente supportato l'ipotesi che le GST possano agire come proteine trasportatrici (carrier proteins), un ruolo dimostrato precedentemente per le GST di origine animale.

Un'altra importante funzione delle GST delle piante, non correlata alla formazione di coniugati con il GSH, è quella della protezione cellulare dai danni provocati da stress ossidativi. Una correlazione tra le GST e la tolleranza allo stress ossidativo nelle piante è stata inizialmente ipotizzata grazie all'osservazione che i geni codificanti per diverse GST erano indotti da diversi fattori che promuovevano la formazione di ROS, come l'attacco di patogeni, stress da ferita, trattamenti con ozono e perossido d'idrogeno e somministrazione di etilene e acido salicilico (Frova, 2003). La produzione delle ROS determina la perossidazione dei lipidi di membrana e la formazione di prodotti altamente citotossici derivati dall'ossidazione degli acidi nucleici. L'ipotesi che le ROS aumentino il livello di trascrizione di geni codificanti per GST e che queste proteine, a loro volta, interagiscano con i prodotti derivanti dalla perossidazione dei lipidi di membrana e dall'ossidazione degli acidi nucleici per proteggere la pianta dai loro effetti tossici è stata supportata dalla scoperta che molte GST, nelle piante, posseggono anche un'attività glutatione perossidasi (GPOX). GST con attività perossidasi sono ampiamente distribuite nel regno vegetale ed è stato dimostrato che esse svolgono un ruolo preminente nel prevenire i danni provocati dallo stress ossidativo (Roxas *et al.*, 1997; Cummins *et al.*, 1999; Kampranis *et al.*, 2000).

I cloni OPE-14 e OPE-20 sono risultati significativamente correlati a sequenze geniche codificanti, rispettivamente, per ascorbato perossidasi (APX) citosoliche e cloroplastiche (Tab. 4.12). Isoforme dell'ascorbato perossidasi che differiscono nelle proprietà molecolari e

catalitiche, sono presenti nel cloroplasto, nello stroma (sAPX) ed associate alle membrane tilacoidali (tAPX), nel citosol (cAPX) e legate alle membrane gliossosomali e perossisomali (Conklin e Barth, 2004). Entro il cloroplasto, la sAPX è preposta a funzionare sia per rimuovere l'ossigeno singoletto prodotto attraverso la riduzione dell'ossigeno molecolare dalla catena fotosintetica di trasporto degli elettroni, sia nel partecipare alla rigenerazione degli antiossidanti legati alle membrane, come le xantofille e l' α -tocoferolo. Insieme alla glutatione riduttasi ed alla deidroascorbato riduttasi, l'APX rimuove H_2O_2 , formatosi direttamente in seguito a fattori che inducono stress ossidativo o prodotto dalla SOD, che agisce a monte, attraverso la via ascorbato-glutatione precedentemente descritta (Fig. 4.17). In particolare APX promuove la dismutazione del perossido di idrogeno in acqua, con la simultanea ossidazione dell'acido ascorbico in monodeidroascorbato (Shigeoka *et al.*, 2002). E' stato osservato che il perossido di idrogeno è il fattore principale che regola l'espressione dei geni codificanti per le ascorbato perossidasi citoplasmatiche (Shigeoka *et al.*, 2002). In seguito ad esposizioni acute all'ozono i livelli di mRNA per l'ascorbato citosolica risultano notevolmente elevati (Coklin *et al.*, 1995; Orvar *et al.*, 1997), indicando che l'incremento della quantità di questa forma isoenzimatica possa giocare un ruolo fondamentale nella detossificazione delle ROS prodotte dallo stress da ozono. Inoltre è stato osservato che la soppressione antisense di una APX citoplasmatica in piante transgeniche di tabacco incrementava i livelli intracellulari di H_2O_2 , determinando una maggiore sensibilità all'ozono. Sulla base di queste osservazioni è stato ipotizzato che l'incremento dell'attività dell'APX mediante la sovraespressione dei corrispondenti geni in piante transgeniche potesse aumentare la tolleranza all'ozono. Tuttavia la sovraespressione di APX citosoliche e cloroplastiche in cultivar ozono-sensibili di tabacco non era in grado di fornire nessuna protezione contro esposizioni acute o croniche di ozono, non migliorando minimamente la tolleranza all'inquinante (Orvar e Ellis, 1997; Torsethaugen *et al.*, 1997). Questi risultati stanno ad indicare che l'attività delle APX possa essere una componente importante della tolleranza all'ozono, ma incrementare il loro accumulo non è sufficiente per limitare i danni provocati dalle ROS prodotte dall'inquinante. Questo potrebbe essere dovuto in parte a limitazioni nel citoplasma della disponibilità di ascorbato ridotto, che è utilizzato come substrato dall'APX. Il clone OPB-125 è risultato omologo ad un gene di riso codificante per la monodeidroascorbato riduttasi (MDAR) (Tab. 4.12), che riduce il monodeidroascorbato ad ascorbato utilizzando come donatore di elettroni NAD(P)H (Fig. 4.17), un importante passaggio nell'eliminazione del perossido d'idrogeno, in quanto, come precedentemente detto, l'enzima deputato, l'APX, utilizza come substrato il prodotto della reazione catalizzata dalla MDAR e cioè l'ascorbato. Le MDAR sono state riscontrate in diversi compartimenti

cellulari come citoplasma, plastidi e mitocondri ed almeno 5 geni codificanti per MDAR sono stati individuati nel genoma di *Arabidopsis* (Conklin e Barth, 2004). Pochi studi sono stati effettuati sulla regolazione dei geni codificanti per MDAR in condizioni di stress, nonostante il ruolo fondamentale che svolge nel ciclo ascorbato-glutatione. In particolare è stato osservato che il livello di mRNA codificante per una MDAR citosolica in pomodoro risultava inversamente proporzionale alla quantità totale di ascorbato e che la sua espressione era notevolmente elevata in seguito a stress da ferita (Grantz *et al.*, 1995). Più recentemente uno studio relativo alla caratterizzazione molecolare di un gene codificante per una MDAR citosolica in *Brassica campestris* ha evidenziato che il suo livello di trascrizione risultava notevolmente elevato come risposta a diversi fattori che inducono lo stress ossidativi, come H₂O₂, SA, paraquat ed ozono (Yoon *et al.*, 2004).

Infine il clone OPE-30 è risultato omologo con geni codificanti per l'anidrasi carbonica (CA) del cloroplasto, che, oltre a convertire in maniera reversibile CO₂ in carbonato, nelle piante ha anche un'attività antiossidante e gioca un ruolo nella risposta ipersensibile. Recentemente è stato dimostrato, infatti, che il silenziamento del gene CA in *N. benthamiana* sopprimeva la risposta ipersensibile indotta dalla coespressione di *Pto* e *avrPto* (Slaymaker *et al.*, 2002).

Tabella 4.12 - Omologia di sequenze cDNA differenzialmente espresse in piante ozonate appartenenti alle cv Duilio e Portorico: geni coinvolti nella protezione/difesa cellulare.

CLONE	bp	Profili di espressione	Omologia (n° Acc.)	Blast score	Specie	Proteina omologa
45) OPH-42	720	B	AP003118	422	<i>O. sativa</i>	Putative heat shock protein (HSP110/SSE1 subfamily)
46) OPH-45	634	A	AY091513	434	<i>T. aestivum</i>	β -1,3-exoglucanase
47) OPH-46	719	A	AE016959	402	<i>O. sativa</i>	Putative membrane associated salt-inducible protein
48) OPB-109	660	B	AF090698	277	<i>O. sativa</i>	Elicitor-responsive protein
49) ODE-4	722	B	AJ440792	477	<i>T. aestivum</i>	Glutathione S-transferase
50) OPE-21	679	B	AJ440796	456	<i>T. aestivum</i>	Glutathione S-transferase
51) ODE-11	437	B	AJ579381	203	<i>T. aestivum</i>	Glutathione synthetase
52) ODE-21	717	B	AJ508916	467	<i>O. sativa</i>	γ -glutamyl-cysteine synthetase
53) OPE-14	404	B	AF532973	272	<i>T. aestivum</i>	Chloroplastic ascorbate peroxidase
54) OPE-20	392	B	AJ0066358	241	<i>H. vulgare</i>	Cytosolic ascorbate peroxidase
55) OPB-125	640	B	AP005558	280	<i>O. sativa</i>	Putative monodehydro ascorbate reductase
56) OPE-30	567	B	P40880	282	<i>H. vulgare</i>	Carbonic anhydrase

4.5.6. Gruppo funzionale 6: geni coinvolti nella regolazione della trascrizione

Dei sette cloni assegnati al sesto gruppo funzionale due (OPE-15 e OPH-92 in Tab. 4.13) hanno mostrato una significativa omologia con geni codificanti per fattori di trascrizione caratterizzati dalla presenza di un dominio altamente conservato, importante per il legame al DNA, denominato MYB. Il primo gene con dominio MYB ad essere isolato è stato l'oncogene *v-Myb*, derivato dal virus della mieloblastosi aviaria per mutazioni del gene *c-Myb*. Le analisi ed il confronto di sequenze geniche codificanti per fattori MYB indicano che *v-Myb* possa essere derivato da un gene dei vertebrati che, una volta divenuto parte del virus, ha subito diverse mutazioni. Nei vertebrati sono stati individuati tre distinti geni correlati a *v-Myb*: *c-Myb*, *A-Myb* e *B-Myb*, che svolgono un ruolo importantissimo nella proliferazione e differenziazione di diversi tipi cellulari (Weston, 1999). Nei vertebrati il dominio MYB è costituito da tre regioni ripetute di 51-53 aminoacidi (denominate R1, R2 e R3) con tre residui di triptofano altamente conservati e disposti regolarmente a distanza di 18-19 aminoacidi (Weston, 1999). Nelle piante le proteine MYB possono essere distinte in tre sottofamiglie, sulla base del numero di regioni ripetute contenute nel dominio MYB: MYB3R con tre regioni, R2R3 MYB con due regioni e MYB1R con una (Stracke *et al.*, 2001). Nel genoma di *Arabidopsis* sono stati individuati 5 geni MYB3R, che sembrano essere coinvolti in maniera particolare nel controllo del ciclo cellulare, in quanto intervengono nella regolazione della trascrizione di geni codificanti per ciclone, riconoscendo e legandosi a particolari sequenze presenti nei loro promotori (Ito *et al.*, 2001). Nelle piante il gruppo predominante di proteine MYB è quello contenente due regioni ripetute. In *Arabidopsis* sono stati identificati 125 geni R2R3 MYB e per alcuni è stato dimostrato il coinvolgimento nel controllo di numerosi processi biologici, come la morfogenesi, il ciclo cellulare e lo sviluppo, e nella regolazione del metabolismo secondario (biosintesi di antocianine) e della trasduzione del segnale mediata da diversi ormoni vegetali (Hailing & Martin, 1999; Stracke *et al.*, 2001). Le proteine R2R3 MYB sembrano essere anche coinvolte nelle risposte della pianta a stress biotici ed abiotici. Ad esempio l'espressione di un gene di *Arabidopsis* *AtMYB30* è strettamente correlata con la morte cellulare durante la risposta di ipersensibilità in seguito all'attacco di *Xanthomonas campestris* (Daniel *et al.*, 1999). Alcuni geni R2R3 MYB sono indotti, inoltre, da elicitatori di diversa natura in tabacco e riso (Sugimoto *et al.*, 2000; Lee, Qi e Yang, 2001). In riso *Osmyb4* sembra svolgere un ruolo importante nella regolazione della trascrizione in condizioni di stress da basse temperature e piante di *Arabidopsis* che sovraesprimono questo gene evidenziano un notevole incremento nella tolleranza al freddo (Vannini *et al.*, 2004). E' stato

inoltre dimostrato che diversi fattori che provocano stress ossidativi, come raggi ultravioletti, perossido di idrogeno ed ozono, inducono l'espressione di alcuni di fattori di trascrizione R2R3 MYB (Desikan *et al.*, 2001; Mahalingam *et al.*, 2003). Le proteine MYB1R, di cui fanno parte le proteina codificate dai cloni OPE-15 e OPH-92, sono attualmente il gruppo di fattori MYB che è stato studiato in maniera meno approfondita. Alcuni dei membri riconoscono ed interagiscono con le sequenze telomeriche di consenso nelle piante (TTTAGGG), mentre altri sembrano essere coinvolti nella regolazione dell'orologio circadiano e nella differenziazione cellulare (Stracke *et al.*, 2001). Più recentemente in riso sono stati isolati tre geni codificanti per proteine MYB1R, *OsMYBS1*, *OsMYBS2* e *OsMYBS3*, quest'ultimo presenta una significativa omologia con il clone OPH-92; queste proteine, insieme ad un altro fattore di trascrizione regolato dalle gibberelline e codificato da *HvMYBGa*, sono responsabili della regolazione dell'espressione dei geni codificanti per l' α -amilasi (Lu *et al.*, 2002). L'aumentata espressione di un gene codificante per un fattore di trascrizione MYB potenzialmente coinvolto nell'attivazione dell'espressione di geni codificanti per l' α -amilasi in frumento duro potrebbe essere inquadrata come una risposta di tipo compensativo all'O₃, al fine di operare una diversione del carbonio assimilato dalla sintesi di sostanze di riserva a quella di carboidrati solubili e scheletri carboniosi utilizzabili per la riparazione delle strutture.

Il clone OPI-72 è risultato omologo ad alcuni geni di riso e di *Arabidopsis* codificanti per proteine con funzione sconosciuta appartenenti alla famiglia delle proteine PPR (pentatricopeptide repeats). Questa famiglia proteica è caratterizzata dalla presenza di motivi a tandem di 35 aminoacidi, che costituiscono la maggior parte della loro sequenza (Small e Peeters, 2000). Tale motivo è presente in alcune proteine animali e fungine, ma la famiglia PPR è particolarmente estesa nelle piante superiori. I genomi di *Arabidopsis* e di riso contengono almeno 450 membri PPR (Stern *et al.*, 2004), corrispondenti a 1-2% di tutte le proteine di *Arabidopsis* (Aubourg *et al.*, 2000). La funzione di queste proteine è poco conosciuta ed esse costituiscono una porzione significativa (circa 10%) delle proteine di *Arabidopsis* per le quali non è stato possibile dedurre una funzione ovvia sulla base dell'omologia della sequenza. Si ritiene che la maggior parte delle proteine PPR siano indirizzate a mitocondri e cloroplasti (Small e Peeters, 2000). Il motivo PPR è correlato chiaramente al motivo TPR (tetatricopeptide repeat) protein binding, le loro strutture secondarie presentano, infatti, notevoli analogie, con una struttura elicoidale appaiata simile (Small e Peeters, 2000). Sulla base di tale similitudine è presumibile che anche PPR, come TPR, sia un motivo di legame a macromolecole. È stato dimostrato che numerose proteine

PPR sono RNA- o DNA-binding proteins sequenze-specifiche. Nelle piante proteine PPR sono coinvolte nella trascrizione nei mitocondri di frumento (proteina P63: Ikeda e Gray, 1999), nel processing dell'RNA nei cloroplasti di *Arabidopsis* (proteina P67: Lahmy *et al.*, 2000; proteina HCF152: Meierhoff *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2004). È stato possibile dedurre la funzione delle proteine PPR studiando alcuni mutanti per geni che le codificano in lievito, *Neurospora* e mais. Nel mais, in particolare, la caratterizzazione molecolare del gene nucleare *crp1* ha permesso di dimostrare che il suo prodotto genico CRP1 è richiesto per la traduzione degli mRNA *petA* e *petD* dei cloroplasti e per il corretto processing dell'mRNA *petD* a partire da un precursore policistronico (Fisk *et al.*, 1999). Le proteine PPR potrebbero essere coinvolte nell'editing dell'mRNA e nella soppressione della maschiosterilità citoplasmatica, agendo come geni ristoratori della fertilità (Bentolila *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2003; Desloire *et al.*, 2003; Kazama e Toriyama, 2003; Koizuka *et al.*, 2003; Akagi *et al.*, 2004).

Il clone OPD-96 presenta un'elevata omologia con sequenze di fattori di trascrizione basic region/leucine zipper (bZIP) di riso, *Arabidopsis*, pomodoro e frumento. I fattori di trascrizione bZIP possiedono una regione basica, che si lega al DNA, e un motivo di dimerizzazione leucine zipper. Proteine con domini bZIP sono state rinvenute in tutti gli eucarioti analizzati; alcune di esse, quali Jun/Fos e CREB, sono state studiate estesamente negli animali e servono come modello per comprendere le interazioni tra fattori di trascrizione e DNA, la formazione dei complessi ternari e le modificazioni post-traduzionali dei fattori di trascrizione. Riechmann *et al.* (2000) hanno identificato 81 geni *bZIP* nelle banche dati di *Arabidopsis*, corrispondenti a quattro volte quelli presenti in lievito, *C. elegans* e uomo, mentre secondo Jakoby *et al.* (2002) in *Arabidopsis* sarebbero presenti 75 geni *bZIP*. Studi genetici e molecolari di alcuni di questi geni in *Arabidopsis* hanno dimostrato il loro coinvolgimento nella regolazione di numerosi processi biologici quali: difesa dai patogeni, trasduzione dei segnali luminosi e di stress, maturazione del seme e sviluppo del fiore. È verosimile che la comparsa dei geni codificanti per proteine con domini bZIP sia avvenuta in una fase molto precoce dell'evoluzione delle piante, ciò potrebbe spiegarne la grande diversificazione strutturale e funzionale, a differenza delle funzioni più circoscritte di altri fattori di trascrizione specifici delle piante, quali R2R3-MYB e WRKY (Jakoby *et al.*, 2002). In base alle similarità di sequenza della regione basica e di altri motivi conservati le proteine bZIP di *Arabidopsis* sono state suddivise in 10 gruppi (Jakoby *et al.*, 2002). Le proteine appartenenti allo stesso gruppo hanno in comune anche altre caratteristiche, come la dimensione del leucine zipper. I gruppi più interessanti dal punto di vista funzionale, in relazione alla presente ricerca, sono: il gruppo A, il quale comprende sette membri

potenzialmente coinvolti nella trasduzione del segnale mediata dall'acido abscissico (ABA) e nella risposta a stress abiotici quali le basse temperature, la siccità e la salinità; i dieci membri del gruppo D, potenzialmente implicati nella risposta all'attacco di patogeni e nello sviluppo con il ruolo di integrare vari segnali sistemici (acido salicilico ed etilene). Il possibile ruolo funzionale dei geni bZIP appartenenti ai diversi gruppi è stato dedotto, tuttavia, prevalentemente sulla base dell'omologia di sequenza, mentre è molto limitato il numero di mutanti per questi geni, che permettono l'analisi funzionale diretta (quattro fino al 2002). L'induzione di geni codificanti per proteine bZIP è stata osservata in uno studio del trascrittoma di riso sottoposto ad una serie di stress abiotici quali: basse temperature, siccità, salinità e applicazione di ABA (Rabbani *et al.*, 2003).

La sequenza OPE-15 era affine ad un gene di riso codificante per un inibitore della ribonucleasi L (RLI), che è sovraespresso in condizioni di bassa temperatura e da trattamenti con NaCl (Du *et al.*, 2003). La funzione principale di RLI, quale inibitore della RNasi L, è il mantenimento della stabilità degli mRNA, che porterebbe ad una minore degradazione degli mRNA in condizioni di stress da O₃, rafforzando la tolleranza allo stress.

Tabella 4.13 - Omologia di sequenze c-DNA differenzialmente espresse in piante ozonate appartenenti alle cv Duilio e Portorico: geni coinvolti nella trascrizione.

CLONE	bp	Profili di espressione	Omologia (n° Acc.)	Blast (score)	Specie	Proteina omologa
57) OPH-92	574	B	AY151044	218	<i>O. sativa</i>	MYB-transcription factor (MYBS3)
58) OPE-27	443	A	AC002062	174	<i>A. thaliana</i>	MYB protein
59) OPH-72	509	B	AP004683	203	<i>O. sativa</i>	Putative pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein
60) OPH-65	701	A	AP003707	375	<i>O. sativa</i>	Putative leucin zipper protein
61) OPB-94	333	A	AY224454	176	<i>O. sativa</i>	Putative RNA-binding protein
62) OPB-96	660	A	AC104427	255	<i>O. sativa</i>	Putative bZIP transcription factor (VSF-1-like)
63) OPE-15	725	B	AY093583	422	<i>O. sativa</i>	Rnase L inhibitor-like protein

4.6. Analisi dell'espressione di alcune delle sequenze isolate in genotipi tolleranti e suscettibili

Per le 63 sequenze indotte da ozono che hanno mostrato omologie significative con geni con funzione nota sono state condotte analisi di espressione, mediante RT-PCR, in sei varietà di frumento duro selezionate per la risposta contrastante allo stress da ozono: le varietà tolleranti Iride, Claudio e Portorico; le varietà suscettibili Mongibello, Appio e Duilio. Sulla base delle analisi RT-PCR le 63 sequenze sono state classificate in quattro gruppi: al primo gruppo sono state assegnate 26 sequenze che hanno evidenziato un profilo di espressione identico sia nelle cultivar tolleranti che in quelle suscettibili; il secondo gruppo comprendeva 12 sequenze i cui trascritti sono risultati indotti o sovraespressi solo nelle varietà tolleranti; il terzo gruppo è costituito da 6 sequenze che sono risultate indotte o sovraesprese solo nelle cv suscettibili; al quarto gruppo, infine, sono state assegnate le rimanenti 19 sequenze, per le quali è stato riscontrato un profilo di espressione complesso nei sei genotipi analizzati. Nei paragrafi successivi verranno prese in considerazione alcune delle sequenze analizzate e si discuterà il loro potenziale coinvolgimento nella risposta allo stress da ozono sulla base della loro espressione nei sei genotipi selezionati per la risposta differenziata all'inquinante.

Due dei 15 cloni assegnati al primo gruppo funzionale (trasduzione del segnale), OPH-44 e OPH-54, hanno evidenziato significative omologie con due geni di *Arabidopsis* codificanti, rispettivamente per AtMPK3 e AtMPK6, due MAP-chinasi che sono attivate da diversi stress biotici ed abiotici e sembrano costituire gli elementi centrali della trasduzione del segnale per tutti quei fattori che determinano condizioni di stress ossidativo (Baier *et al.*, 2005). Le analisi RT-PCR condotte sui sei genotipi selezionati per la risposta differenziata allo stress da ozono hanno evidenziato differenze nell'espressione delle due sequenze (Fig. 4.18). Infatti OPH-44 risultava sovraespresso in condizioni di stress da ozono in tutte le varietà analizzate, ad eccezione della cultivar più suscettibile Mongibello, mentre la quantità di trascritti della sequenza OPH-54 risultava superiore nei trattati rispetto ai controlli solo per le varietà Portorico, Appio e Duilio.

Tolleranza all'ozono

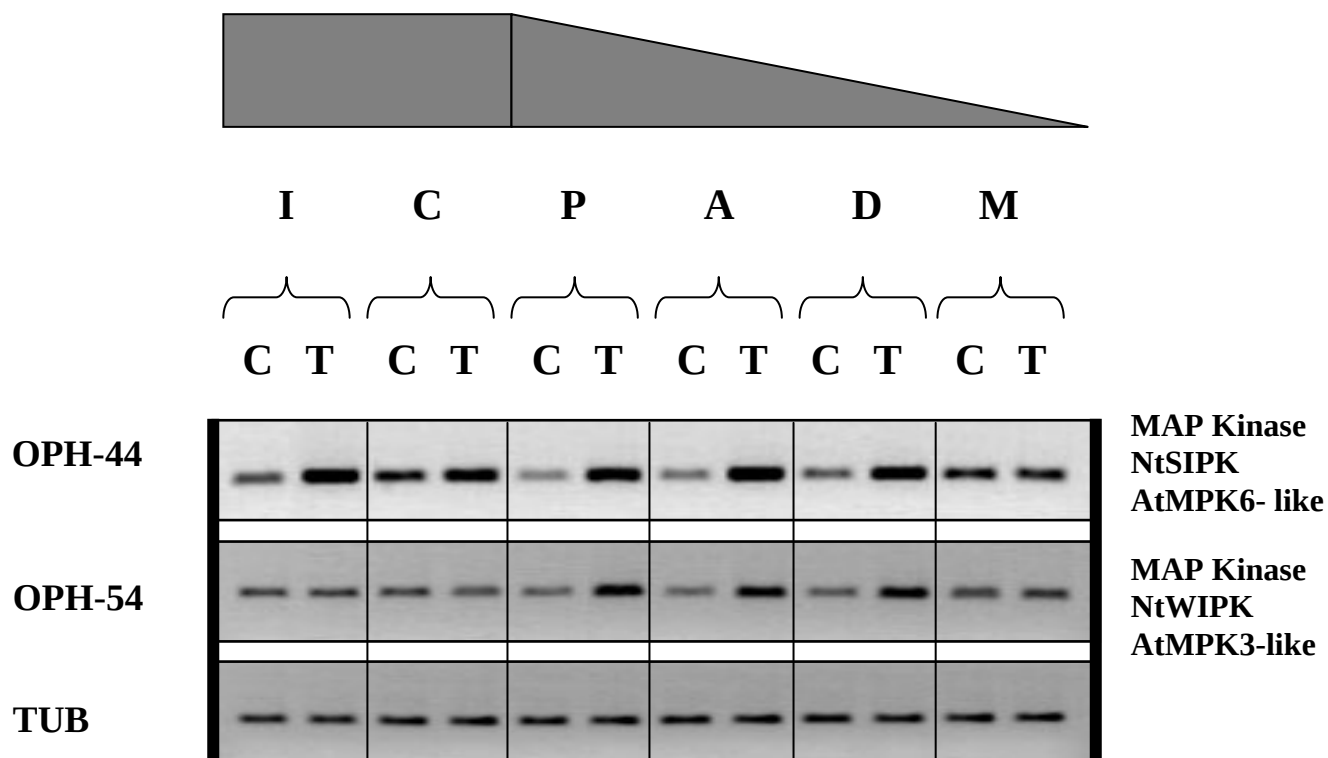


Fig. 4.18 - Analisi di espressione delle sequenze OPH-44 e OPH-54 mediante RT-PCR di RNA totale estratto da piante di controllo (C) ed ozonate (T) delle sei varietà di frumento duro selezionate per la risposta differenziale all'ozono: I= Iride; C= Claudio; P= Portorico; A=Appio; D= Duilio; M= Mongibello. TUB: gene costitutivo della β -tubulina utilizzato come controllo nelle reazioni RT-PCR.

Come esposto nel paragrafo 4.5.4., cinque dei 10 cloni assegnati al quarto gruppo funzionale (metabolismo) erano correlati a sequenze geniche codificanti per enzimi coinvolti nella sintesi di diversi ormoni vegetali come l'etilene, il jasmonato e l'ABA. Tra questi i cloni ODE-15 e ODE-6, omologhi a geni codificanti rispettivamente per l'ACC-ossidasi e l'ACC-sintasi, due enzimi chiave nella sintesi dell'ET, hanno evidenziato un profilo di espressione differenziale nelle sei cultivar analizzate, che potrebbe essere correlato alla loro diversa risposta all'ozono, soprattutto a livello sintomatologico (Fig. 4.19). Infatti le due sequenze risultavano sovraesprese in condizioni di stress da ozono nelle tre varietà suscettibili, mentre il loro livello di trascrizione risultava inferiore nei trattati rispetto ai controlli nelle tre varietà tolleranti. ODE-38 e ODE-40, invece, codificanti rispettivamente per l'allene ossido sintetasi e per l'allene ossido ciclasi, due enzimi importanti nella biosintesi dell'acido jasmonico, erano sovraespressi sia nelle varietà tolleranti, sia in quelle suscettibili (Fig. 4.19). Diversi studi hanno dimostrato che l'attivazione dei geni coinvolti nella sintesi di ET e la conseguente produzione in eccesso dell'ormone in seguito ad esposizione a O₃ sono direttamente correlate alla formazione, sviluppo e diffusione delle lesioni necrotiche fogliari, simili a quelle che si sviluppano durante la reazione di ipersensibilità nell'interazione pianta-patogeno. Come precedentemente detto, i mutanti di *Arabidopsis* insensibili all'etilene *etr1*, *ein2*, e *ein3* sono tolleranti all'O₃, mentre diversi mutanti che sintetizzano elevate quantità di ET, *eto* (*ethylene overproducer*)-1 ed *eto-3*, risultano particolarmente sensibili all'ozono ed evidenziano un'iperproduzione di ROS, necessaria per l'amplificazione dei meccanismi che regolano la PCD (Rao *et al.*, 2002). Un altro dei mutanti sensibili all'O₃ individuato in *Arabidopsis*, *rcd1* (*radical-induced cell death 1*), produce elevate quantità di etilene in relazione probabilmente alla sovraespressione del gene *AtACS6*, che codifica per una ACC sintasi, dopo trattamento con O₃. Il gene *RCD1* potrebbe essere coinvolto, quindi, nella regolazione negativa della sintesi di etilene. Così Tamaoky *et al.* (2003b) hanno dimostrato che la regolazione di lesioni fogliari indotte da ozono nell'accessione suscettibile Wassilewskija (Ws) di *Arabidopsis*, ma non nella tollerante Columbia (Col), dipendeva da una maggiore produzione di ET nella prima. Anche l'espressione di *AtACS6*, codificanti una ACC sintetasi indotta specificamente da O₃, era più elevata in Ws che in Col, suggerendo che la sovrapproduzione di ET in Ws derivasse da un incremento nella sintesi di ET in risposta ad O₃. E' ormai opinione comune che l'interazione ed un corretto equilibrio delle vie di segnalazione mediate da etilene, acido jasmonico e salicilico modulino la formazione e la diffusione delle lesioni fogliari in presenza di ozono. In particolare i segnali mediati da ET e da SA cooperano nello sviluppo e nella diffusione dei sintomi fogliari, mentre JA svolge un ruolo antagonistico (Overmyer *et al.*, 2003; Baier *et al.*, 2005; Kangasjarvi *et al.*, 2005). Quindi la sovraespressione delle sequenze codificanti per i due enzimi chiave della biosintesi dell'ET nelle varietà sensibili

Appio, Mongibello e Duilio, ma non in quelle tolleranti, Iride, Claudio e Portorico, potrebbe aver contribuito alla diversa manifestazione dei sintomi indotti da ozono nei due gruppi di varietà.

Tolleranza all'ozono

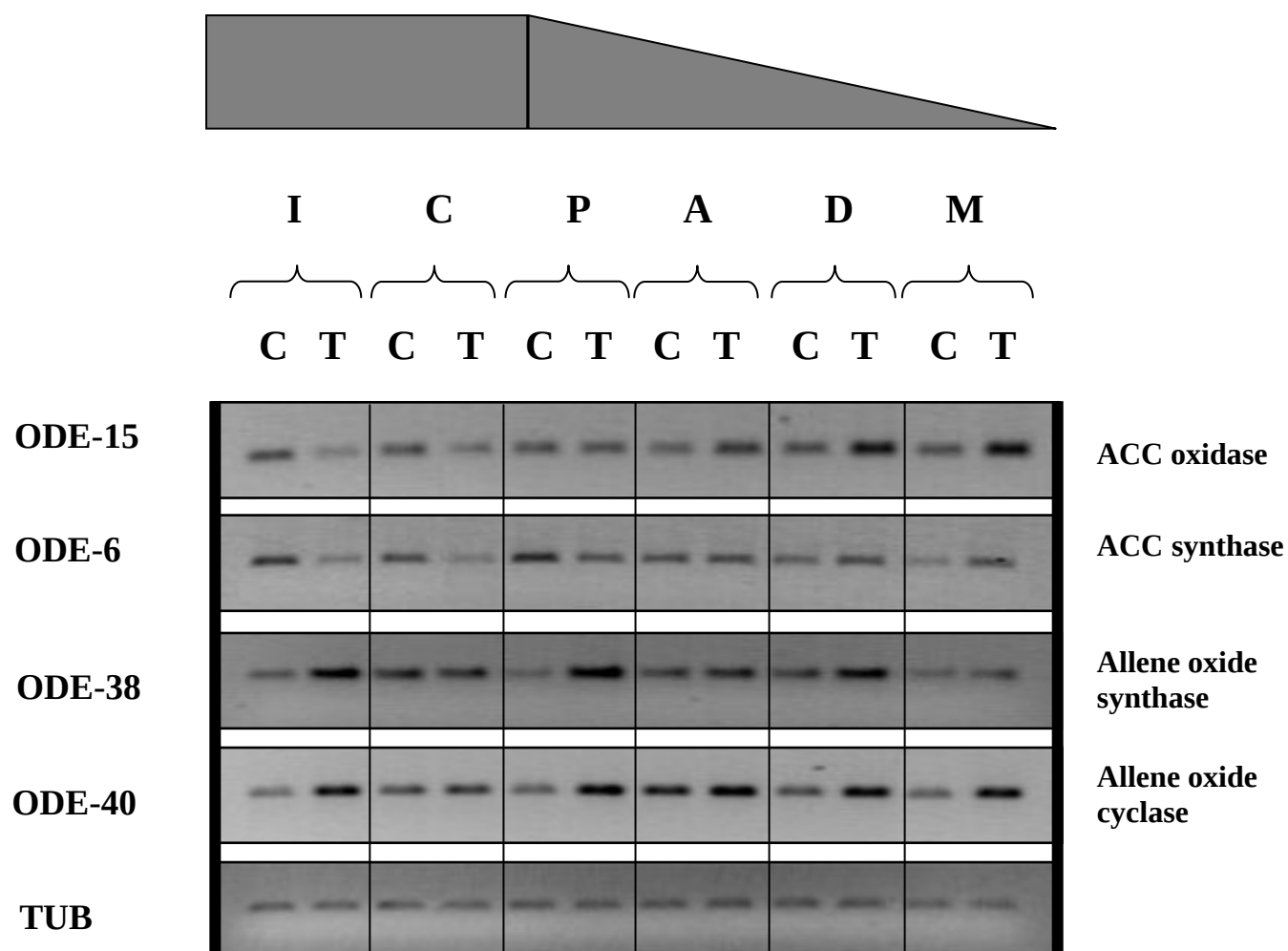


Fig. 4.19 - Analisi di espressione delle sequenze ODE-15, ODE-6, ODE-38 e ODE-40 mediante RT-PCR di RNA totale estratto da piante di controllo (C) ed ozonate (T) delle sei varietà di frumento duro selezionate per la risposta differenziale all'ozono: I= Iride; C= Claudio; P= Portorico; A=Appio; D= Duilio; M= Mongibello. TUB: gene costitutivo della β -tubulina utilizzato come controllo nelle reazioni RT-PCR.

Quattro degli 11 cloni assegnati al quinto gruppo funzionale (protezione/difesa cellulare) corrispondono a sequenze codificanti per proteine coinvolte nello stress termico (OPH-42) e salino (OPH-46) o a geni indotti da attacchi di patogeni (OPH-45, proteina PR; OPB-109, proteina indotta da un elicitore fungino), confermando l'ipotesi della convergenza delle risposte molecolari a stress di origine diversa. Le analisi RT-PCR hanno evidenziato profili di espressione dei quattro cloni nettamente differenziati nelle sei varietà selezionate per la risposta contrastante allo stress da ozono. Le due sequenze codificanti per proteine coinvolte nello stress termico (OPH-42) e salino (OPH-46) risultavano, infatti, sovraesprese in condizioni di stress da ozono in tutte le varietà analizzate, mentre quelle relative a geni indotti da attacchi di patogeni (OPH-45 e OPB-109) hanno evidenziato profili molto complessi nelle sei varietà analizzate (Fig. 4.20). La sequenza OPH-45, in seguito al trattamento con ozono, risultava indotta nella cultivar tollerante Portorico e sovraespressa nelle tre cultivar suscettibili Appio, Duilio e Mongibello, mentre il suo livello di trascrizione era inferiore nelle piante trattate rispetto a quelle di controllo delle cultivar tolleranti Iride e Claudio (Fig. 4.20). Il clone OPB-109, infine, correlato ad una sequenza di riso codificante per una proteina indotta da un elicitore fungino, ha evidenziato un profilo di espressione differenziale nelle sei cultivar analizzate, che in qualche modo potrebbe essere correlato alla loro diversa risposta all'inquinante. Infatti OPB-109, in condizioni di stress da ozono, risultava indotto nella cultivar Portorico e sovraespresso negli altri due genotipi tolleranti Iride e Claudio, mentre il suo livello di trascrizione non differiva (Appio e Duilio) o addirittura era inferiore (Mongibello), nelle piante trattate rispetto a quelle di controllo delle tre varietà suscettibili (Fig. 4.20).

I rimanenti 8 cloni assegnati al quinto gruppo funzionale sono correlati a sequenze geniche codificanti per proteine coinvolte in diversi sistemi di difesa antiossidanti. Tra questi i due cloni che hanno evidenziato omologie significative con geni codificanti per le ascorbato perossidasi (APX) citosoliche (OPE-20) e cloroplastiche (OPE-14) hanno mostrato un profilo di espressione nettamente differenziato nei due gruppi di varietà. In condizioni di stress da ozono, infatti, le sequenze erano entrambe sovraesprese nelle tre varietà tolleranti, mentre il livello dei loro trascritti non differiva o addirittura era leggermente inferiore nelle piante trattate rispetto a quelle di controllo delle tre varietà suscettibili. Poiché si tratta di enzimi fondamentali per la rimozione del perossido di idrogeno in numerosi compartimenti cellulari delle piante (Shigeoka *et al.*, 2002), la mancata attivazione, o addirittura l'inibizione, delle APX potrebbe facilitare la morte cellulare dipendente da H₂O₂ e indotta da diversi tipi di stress. E' stato osservato, ad esempio, che, in seguito ad esposizione ad ozono, il livello di mRNA delle APX citosoliche aumenta sensibilmente in diverse specie vegetali (Conklin *et al.*, 1995; Orvar *et al.*, 1997), indicando che questo enzima possa svolgere un ruolo fondamentale nella detossificazione delle ROS prodotte dall'inquinante. Inoltre è stato

evidenziato che la soppressione antisense di APX in piante transgeniche di tabacco incrementava i livelli intracellulari di H_2O_2 , determinando un aumento della morte cellulare come risposta ad O_3 e ad attacchi di patogeni (Orvar e Ellis, 1997). La mancata attivazione o, presumibilmente, l'inibizione dell'espressione di APX nelle tre varietà suscettibili Appio, Duilio e Mongibello potrebbe aver contribuito, quindi, allo sviluppo di lesioni necrotiche fogliari indotte da O_3 in queste varietà, rispetto a quelle tolleranti, Iride, Claudio e Portorico.

Al contrario di quanto osservato per le due sequenze codificanti per APX, OPB-125, correlato a geni codificanti per MDAR, un enzima che catalizza un passaggio chiave nel ciclo ascorbato-glutatione soprattutto per la detossificazione del perossido d'idrogeno (vedi capitolo 4.5.5), è risultato sovraespresso nelle piante trattate rispetto a quelle di controllo in tutte le varietà analizzate (Fig. 4.21), indicando che, in condizioni di stress da ozono, i meccanismi che intervengono nella regolazione dell'espressione dei geni relativi alle due sequenze correlate ad APX sono nettamente distinti da quelli della sequenza OPB-125 codificante per MDAR. Anche le due sequenze correlate alle GST (glutatione-S-transferasi) manifestavano un profilo di espressione differenziale nelle sei varietà sottoposte a stress da ozono (Fig. 4.22). ODE-4 risultava, infatti, sovraespresso solo nelle tre varietà suscettibili (Appio, Duilio e Mongibello), mentre il livello di trascrizione di OPE-21 era nettamente superiore nelle piante trattate rispetto a quelle di controllo in tutte le sei varietà analizzate (Fig. 4.22). ODE-4 e OPE-21 corrispondono, rispettivamente, ai geni di frumento *TaGSTF3* e *TaGST4*, codificanti per GST che possiedono un'elevata attività glutatione perossidasi (GPOX) (Cummins *et al.*, 2003). GST e GPOX rappresentano entrambe attività protettive ampiamente distribuite, coinvolte nei processi di detossificazione e nella difesa attraverso la coniugazione di xenobiotici e l'eliminazione, rispettivamente, di perossidi inorganici e organici (Foyer *et al.*, 1997). I risultati ottenuti suggeriscono la partecipazione di isoforme multiple di GST nella risposta all'ozono, ma anche una regolazione intraspecifica differenziale della loro espressione.

Tolleranza all'ozono

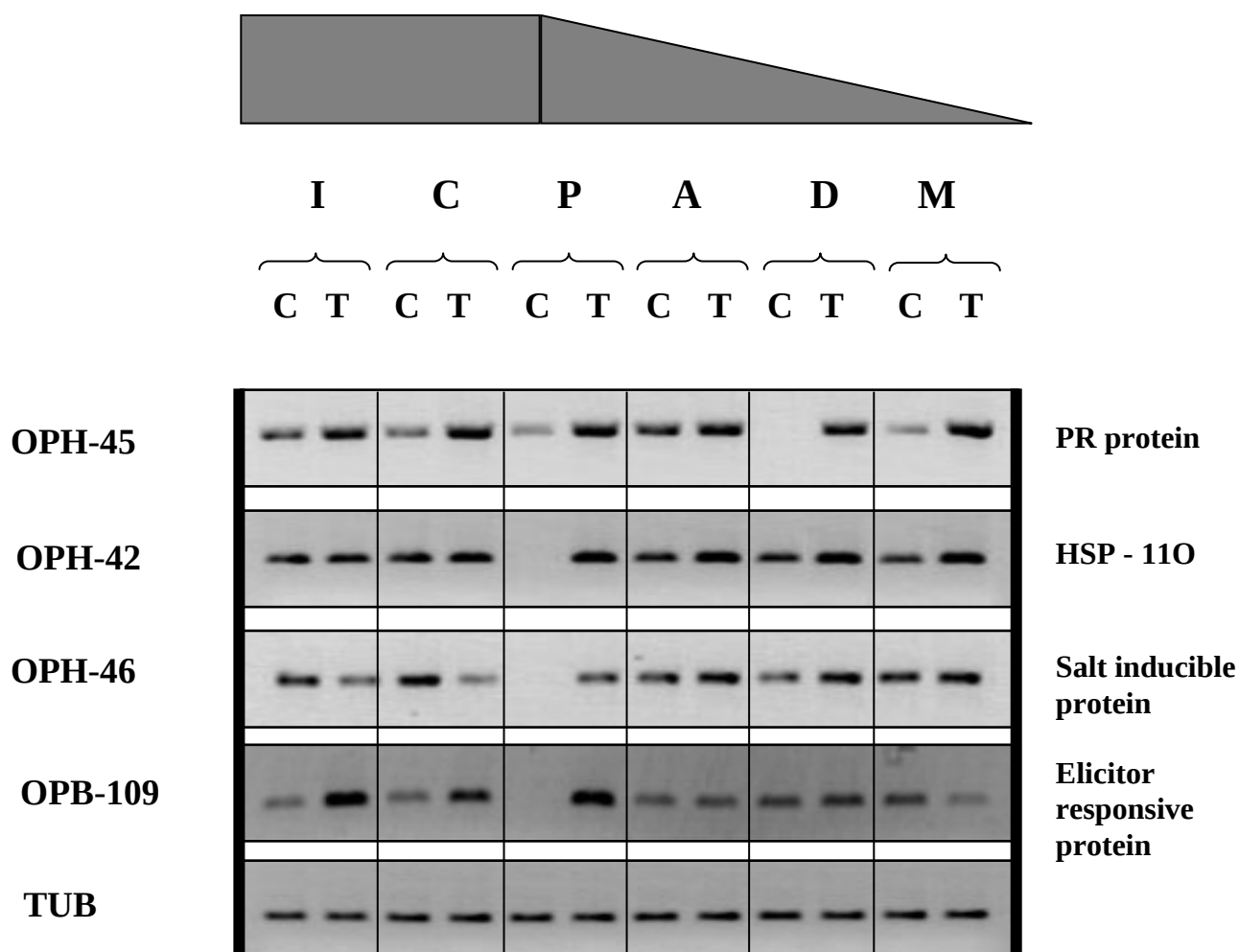


Fig. 4.20 - Analisi di espressione delle sequenze OPH-42, OPH-46, OPH-45 e OPB-109 mediante RT-PCR di RNA totale estratto da piante di controllo (C) ed ozonate (T) delle sei varietà di frumento duro selezionate per la risposta differenziale all'ozono: I= Iride; C= Claudio; P= Portorico; A=Appio; D= Duilio; M= Mongibello. TUB: gene costitutivo della β -tubulina utilizzato come controllo nelle reazioni RT-PCR.

Tolleranza all'ozono

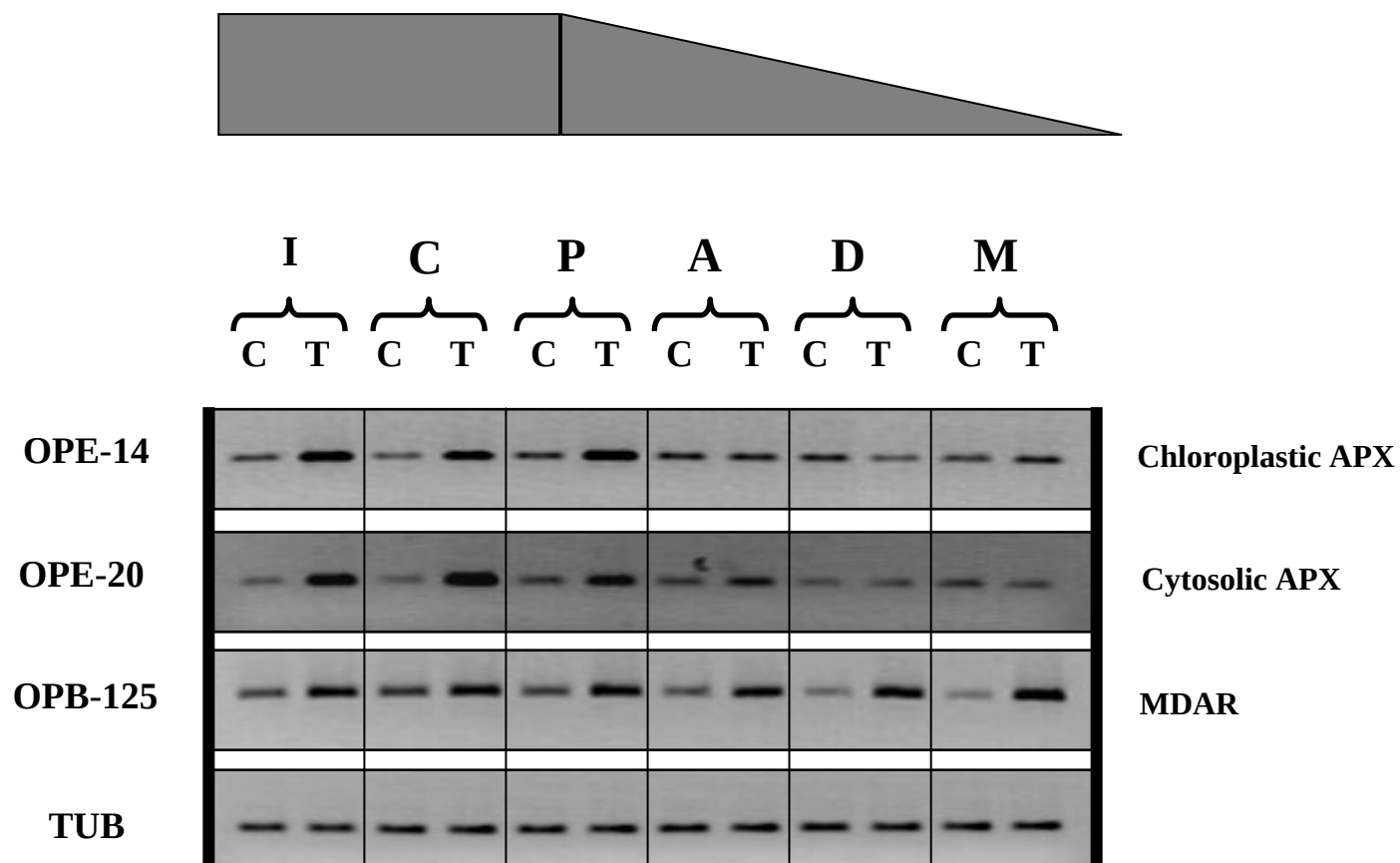


Fig. 4.21 - Analisi di espressione delle sequenze OPE-14, OPE-20 e OPB-125 mediante RT-PCR di RNA totale estratto da piante di controllo (C) ed ozonate (T) delle sei varietà di frumento duro selezionate per la risposta differenziale all'ozono: I= Iride; C= Claudio; P= Portorico; A=Appio; D= Duilio; M= Mongibello. TUB: gene costitutivo della β -tubulina utilizzato come controllo nelle reazioni RT-PCR.

Tolleranza all'ozono

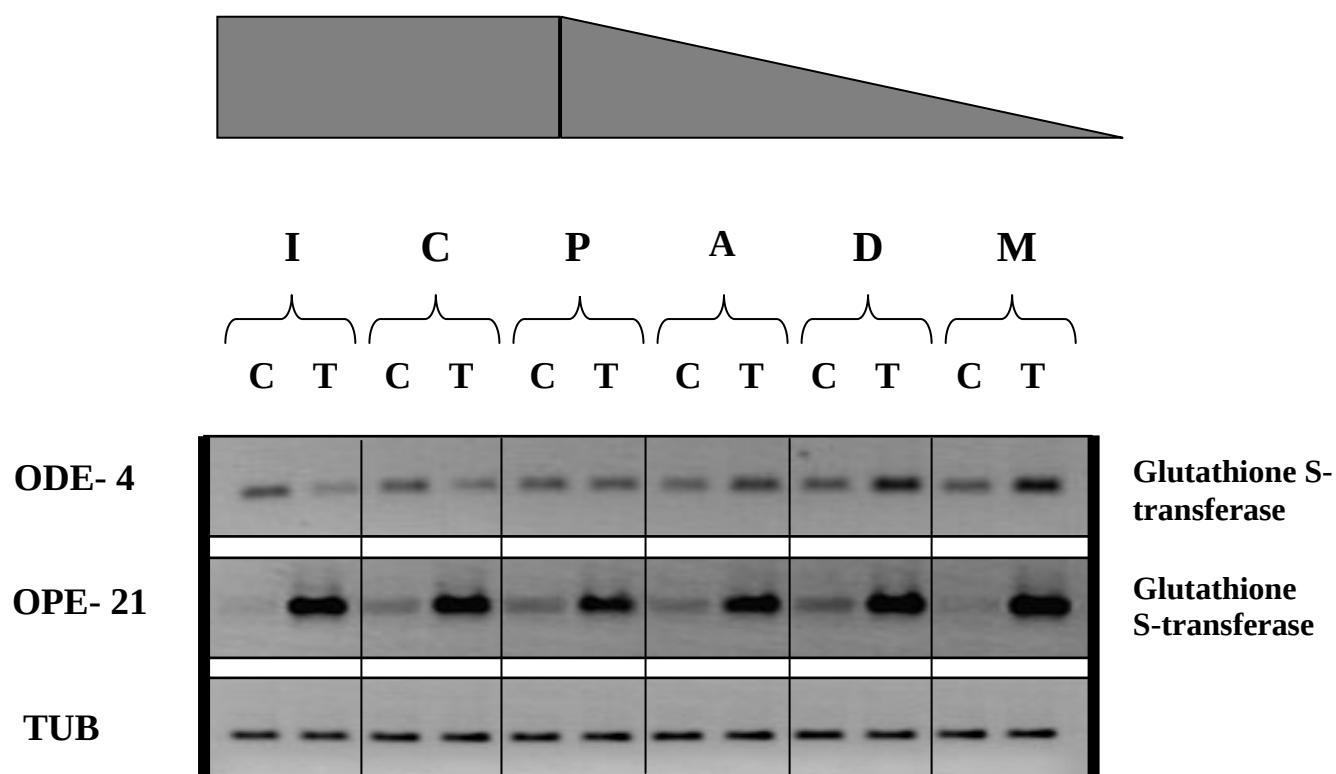


Fig. 4.22 - Analisi di espressione delle sequenze ODE-4 e OPE-21 mediante RT-PCR di RNA totale estratto da piante di controllo (C) ed ozonate (T) delle sei varietà di frumento duro selezionate per la risposta differenziale all'ozono: I= Iride; C= Claudio; P= Portorico; A=Appio; D= Duilio; M= Mongibello. TUB: gene costitutivo della β -tubulina utilizzato come controllo nelle reazioni RT-PCR.

5. CONCLUSIONI

Il progressivo incremento della concentrazione di ozono troposferico durante gli ultimi decenni, determinato dalle attività antropiche, lo ha reso uno dei principali inquinanti atmosferici, con un impatto ambientale significativo. L'inquinamento da ozono, particolarmente rilevante nelle aree più industrializzate e densamente popolate, provoca effetti nocivi su piante spontanee e coltivate, uomo, animali, ma anche su manufatti per la sua intensa azione ossidante. Insieme ad altri inquinanti, quali le piogge acide, contribuisce significativamente al declino delle foreste e riduce la produttività delle colture agrarie e la qualità dei prodotti alimentari. La risposta delle piante all'ozono è influenzata da fattori genetici, ontogenetici e ambientali. L'aspetto genetico è particolarmente rilevante, infatti sono state rilevate risposte ampiamente differenziate all'esposizione ad ozono non solo tra specie, ma anche tra genotipi appartenenti alla stessa specie. Valutazioni preliminari, basate su modelli matematici, dei danni provocati dall'ozono alle colture agrarie hanno evidenziato un possibile impatto economico molto rilevante. E' stato stimato che concentrazioni di ozono attualmente verosimili possano determinare riduzioni da 10 a 50% di colture quali: mais, riso, soia e frumento. La maggior parte degli studi sugli aspetti molecolari della risposta delle piante allo stress da ozono sono stati effettuati in specie modello, in particolare in *Arabidopsis*. Molto più limitate sono le conoscenze dei suoi effetti sulle monocotiledoni e, in particolare, sul frumento. Il frumento è, apparentemente, una specie resistente, perchè l'esposizione all'ozono produce sintomi fogliari meno rilevanti rispetto ad altre specie. In realtà è stato dimostrato che, anche in assenza di sintomi evidenti, le conseguenze sulla capacità produttiva della pianta sono cospicue. La rilevanza economica assunta dalla coltivazione del frumento duro nell'agricoltura italiana rende particolarmente interessante lo studio dei possibili effetti dell'ozono su questa specie. L'interesse e l'importanza di questo studio derivano anche dalle elevate concentrazioni di questo inquinante fotochimico che si raggiungono, per motivi climatici, nel principale areale di coltivazione del frumento duro, cioè nell'Italia centro-meridionale. I livelli massimi di concentrazione in queste aree si verificano, inoltre, nel periodo di formazione della spiga e di maturazione delle cariossidi, quando è massimo l'impatto negativo sulla produzione di granella.

Il programma di ricerca comprendeva l'attuazione delle seguenti fasi sperimentali:

- 1) trattamento con O₃, in ambiente controllato, di 16 varietà di frumento duro allo scopo di determinare una scala di tolleranza/suscettibilità;

- 2) identificazione ed isolamento mediante cDNA-AFLP di trascritti espressi differenzialmente in seguito a stress da O₃;
- 3) caratterizzazione delle sequenze isolate ed analisi della loro espressione in genotipi tolleranti e suscettibili.

Piantine di 15 giorni sono state sottoposte ad un trattamento acuto con una dose di 200 ppb di ozono per la durata di 5h. La comparsa dei sintomi è stata rilevata al termine del trattamento e nelle successive 5, 24 e 48h e la loro incidenza è stata valutata mediante l'indice di Mackinney, che si basa sull'utilizzo di una scala patometrica. Agli stessi tempi sopra indicati, sulle piante fumigate e, parallelamente, sulle piante di controllo sono stati valutati alcuni indicatori fisiologici degli effetti del trattamento sulla capacità di ritenzione di elettroliti a livello di membrana, sul bilancio idrico e sull'integrità funzionale dell'apparato fotosintetico. Sulla base dei rilievi fisiologici e sintomatologici la varietà tollerante Portorico e, solo nella prima fase di attività, la varietà Duilio sono state utilizzate per l'analisi differenziale dei trascritti estratti da piante trattate e di controllo con una tecnica cDNA-AFLP modificata. Il confronto di circa 2500 prodotti di amplificazione dei trascritti di piante trattate e di controllo ha permesso l'identificazione di 165 prodotti differenziali indotti da ozono. Le sequenze nucleotidiche ed aminoacidiche dedotte di 122 dei 165 cloni indotti da O₃, la cui espressione differenziale o preferenziale in piante ozonate è stata verificata mediante analisi RT-PCR, sono state confrontate con quelle depositate in diverse banche dati nucleotidiche e proteiche. Per 34 delle 122 sequenze non è stata rilevata alcuna omologia significativa nei database utilizzati. Per 79 cloni, invece, sono state evidenziate significative omologie con sequenze genomiche, cDNA o proteiche isolate nelle piante. È interessante notare, che tra i 79 cloni che hanno rilevato omologie in tutti i database analizzati, solo 13 corrispondono a sequenze di frumento precedentemente riportate in banche dati proteiche e nucleotidiche, mentre per 44 di essi sono state individuate sequenze EST di frumento identiche o molto simili. Infine le rimanenti 9 sequenze sono risultate omologhe solo a EST di frumento, indicando probabilmente una loro elevata specificità per questa specie vegetale.

I 79 cloni che presentano omologie significative con sequenze precedentemente caratterizzate di specie vegetali sono stati classificati, in base alle loro funzioni presunte, in otto gruppi: 1) trasduzione del segnale (15 cloni); 2) organizzazione cellulare (9 cloni); 3) sintesi, dislocazione e degradazione delle proteine (9 cloni); 4) metabolismo (10 cloni); 5) protezione/difesa cellulare (12 cloni); 6) regolazione della trascrizione (7 cloni); 7) produzione di energia metabolica (1 clone); 8) funzione sconosciuta (16 cloni). Per le 63 sequenze indotte da ozono che hanno mostrato significative omologie con geni con funzione nota sono state condotte analisi di espressione

mediante RT-PCR e RT-PCR real-time, nelle 6 varietà di frumento duro selezionate per la risposta contrastante allo stress da ozono: Iride, Claudio e Portorico (varietà tolleranti); Mongibello, Appio e Duilio (varietà suscettibili). In relazione all'analisi di espressione le 63 sequenze sono state classificate in quattro gruppi: al primo sono state assegnate 26 sequenze che hanno evidenziato un profilo di espressione identico sia nelle cultivar tolleranti che in quelle suscettibili (indotte o sovraesprese in condizioni di stress da O₃); il secondo gruppo comprende 12 sequenze i cui trascritti sono risultati indotti o sovraespressi solo nelle varietà tolleranti; al terzo gruppo appartengono 6 sequenze che sono risultate indotte o sovraesprese solo nelle cv suscettibili; al quarto gruppo sono assegnate le restanti 19 sequenze per le quali è stato riscontrato un profilo di espressione complesso nei 6 genotipi analizzati.

Le analisi condotte sull'espressione genica differenziale indotte da ozono in frumento duro, hanno permesso di formulare alcune ipotesi sui meccanismi molecolari coinvolti nella risposta a questo stress. In primo luogo l'espressione genica differenziale rilevata suggerisce un'elevata affinità e stretta correlazione con l'insieme delle risposte molecolari note determinate dallo stress da ozono in altre specie vegetali (Overmyer *et al.*, 2003; Kangäsjarvi *et al.*, 2005; Baier *et al.*, 2005). Tra i 63 cloni relativi a geni precedentemente caratterizzati 43 corrispondevano, infatti, a sequenze geniche il cui ruolo nella risposta all'ozono era già stato documentato nelle analisi accurate ed estese condotte sul trascrittoma di *Arabidopsis* (Tamaoki *et al.*, 2003; Mahalingam *et al.*, 2003). Questa osservazione suggerisce che il procedimento adottato (tecnica cDNA-AFLP modificata) sia risultato efficace per individuare i geni coinvolti nella risposta allo stress da ozono in frumento duro. L'assenza di alcune delle 63 sequenze isolate in questo studio nel trascrittoma di *Arabidopsis*, tuttavia, potrebbe essere spiegato dalle evidenti differenze tra specie filogeneticamente distanti, o dalle differenti condizioni di esposizione all'ozono adottate nei lavori precedentemente effettuati per l'analisi del trascrittoma di *Arabidopsis*. I risultati ottenuti avvalorano, inoltre, l'idea, ormai condivisa da diversi autori, che l'ozono si comporti da elicitore abiotico di risposte di difesa. Il fatto che in frumento duro l'ozono induca l'espressione di trascritti relativi a geni codificanti per particolari MAP chinasi, che sembrano giocare un ruolo importante nella trasduzione del segnale per tutti quei fattori che determinano condizioni di stress ossidativo, per proteine coinvolte nella risposta a stress termico (OPH42) e salino (OPH46), o per proteine indotte dall'attacco di patogeni (proteina PR, proteina indotta da elicitori di diversa natura), sembra, infatti, confermare l'ipotesi della convergenza dei meccanismi di risposta molecolare a stress di origine diversa. Ciò implica che le interazioni pianta-ozono abbiano molti aspetti in comune, in termini di percezione e trasduzione del segnale, espressione genica e difesa, con le cascade di reazioni evocate da diversi agenti di stress di origine biotica ed abiotica (Pell *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 2000; Overmyer *et al.*, 2003). Le analisi

da noi condotte hanno comunque permesso di identificare nuovi geni potenzialmente coinvolti nella risposta delle piante all'ozono. Il fatto che 21 delle 63 sequenze relative a geni con funzioni note non fossero state precedentemente caratterizzate come ozono-indotte nel trascrittoma di *Arabidopsis* potrebbe essere spiegato dall'attivazione di meccanismi di risposta diversificati nelle due specie.

Di particolare interesse sarebbe lo studio approfondito delle funzioni dei nove cloni che hanno rilevato elevate omologie solo con sequenze EST di frumento ottenute da librerie cDNA di diversi tessuti sottoposti a particolari condizioni di stress, in quanto queste sequenze potrebbero svolgere un ruolo specifico in questa specie vegetale nella risposta a diversi tipi di stress sia biotici che abiotici, compreso lo stress ossidativo indotto dall'ozono. Infine le analisi di espressione delle 63 sequenze relative a geni con funzione nota condotte sulle sei varietà con diversa suscettibilità all'ozono hanno indicato chiaramente una regolazione intraspecifica differenziale della trascrizione di alcune di esse in condizioni di stress da ozono. E' interessante notare che i profili di espressione rilevati per alcune sequenze sono direttamente correlati alla diversa risposta all'ozono mostrata sia a livello sintomatologico che fisiologico dalle sei varietà. Queste sequenze potrebbero quindi rappresentare un punto di partenza importante per lo studio delle basi molecolari della tolleranza/suscettibilità a questo inquinante in frumento duro.

6. BIBLIOGRAFIA

- **Agrawal G. K., Rakwal R., Iwahashi H.** (2002a) Isolation of novel rice (*Oryza sativa* L.) multiple stress responsive MAP kinase gene, OsMSRMK2, whose mRNA accumulates rapidly in response to environmental cues. *Biochemical Biophysical Research Communication* 294, 1009–1016.
- **Agrawal G. K., Rakwal R., Yonekura M., Kubo A., Saji H.** (2002c) Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for investigating ozone stress in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Proteomics* 2: 947–959.
- **Agrawal G. K., Rakwal R., Yonekura M., Saji H.** (2002b) Rapid induction of defense/stress-related proteins in leaves of rice (*Oryza sativa*) seedlings exposed to ozone is preceded by newly phosphorylated proteins and changes in a 66-kDa ERK-type MAPK. *Journal of Plant Physiology* 159: 361–369.
- **Ahlfors R., Macioszek V., Rudd J., Brioschè M., Schlichting R., Scheel D., Kangasjarvi J.** (2004b) Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* plants during ozone exposure. *Plant Journal* 40, 512–522.
- **Ahlfors R., Lång S., Overmyer K., et al.** (2004a) *Arabidopsis thaliana* RADICAL-INDUCED CELL DEATH 1 belongs to the WVE protein–protein interaction-domain protein family and modulates abscisic acid, ethylene, and methyl jasmonate responses. *Plant Cell* 16: 1925–1937.
- **Akagi H., Nakamura A., Yokozeki-Misono Y., Inakagi A., Takahashi H., Mori K., Fujimura T.** (2004) Positional cloning of the rice Rf-1 gene, restorer of BT-type cytoplasmic male sterility that encodes a mitochondria-targeting PPR protein. *Theor. Appl. Genet.*, febr. 14.
- **Alfenito M. R., Souer E., Goodman C. D., Buell R., Mol J., Koes R., Walbot V.** (1998) Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferase. *Plant Cell*, 10: 1135–1149.
- **Allen R. D., Webb R. P., Schake S. A.** (1997) Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. *Free Radical Biol. Med.*, 23: 473–479.
- **Alsher R. G., Hess J. L.** (1993) Antioxidant in higher plants. *Boca Raton*: CRC Press.
- **Alsher R. G., Donahue J. L., Cramer C. L.** (1997) Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiol. Plant.*, 100: 224–233.
- **Alscher R. G., Erturk N., Heath L. S.** (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 53, No. 372: 1331–1341.
- **Alvarez M. E., Lamb C.** (1997) Oxidative burst-mediated defense responses in plant disease resistance. In: Scandalios J. G. (eds): *Oxidative stress and molecular biology of antioxidant defense*. Cold Spring Harbor, CSHL Press. 815–839.
- **Alvarez M. E., Pennel R. I., Meijer P.-J., Ishikawa A., Dixon R. A., Lamb C.** (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92, 773–784.
- **Arrigoni O., De Tullio M. C.** (2002) Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1569: 1–9.

- **Asada K.** (1997) The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants. In: Scandalios J. G. (eds): Oxidative stress and molecular biology of antioxidant defense. Cold Spring Harbor, CSHL Press. 715-735.
- **Aubourg S., Boudet N., Kreis M., Lecharny A.** (2000) In *Arabidopsis thaliana*, 1% of the genome codes for a novel protein family unique to plants. *Plant Mol. Biol.*, 42 (2): 603-613.
- **Azevedo C., Sadanandon A., Kitagawa K., Freialdenhoven A., Shirasu K., Schulze-Lefert P.** (2002) The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science* 295: 2073–2076.
- **Bachmair A., Novatchkova M., Potuschak T., Eisenhaber F.** (2001) Ubiquitylation in plants: a post-genomic look at a post-translational modification. *Trends in Plant Science*, 6: 463-470.
- **Badiani M., Fuhrer J., Paolacci A. R., Giovannozzi Sermanni G.** (1996a) Derivino critical levels of ozone effects on peach trees (*Prunus persica* L. Batsch) grown in the open-top chambers in Central Italy. *Fresenius Environmental Bulletin*, 5: 592-597.
- **Badiani M., Paolacci A. R., Rossini F., et al.** (1996b) Critical levels for the effects of ozone on durum wheat and peach tress grown in a Mediterranean environment. In: Kärenlampi L., Skärby L. (eds) Critical levels for ozone in Europe: testing and finalizing the concepts. *UN-ECE Workshop Report* University of Kuopio, Kuopio: pp. 199-204.
- **Badiani M., D'Annibale A., Paolacci A. R., Fusari A.** (1994d) Modifying the expression of antioxidant systems in transgenic plants. *Agro-Food Industry Hi-Tech* 3/4, 21-26.
- **Baier M., Dietz K.-J.** (1997) The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: its expressional regulation, phylogenetic origin and implication for its specific physiological function in plants. *The Plant Journal*, 12: 179-190.
- **Baier M., Kandlbinder A., Gollack D., Dietz K.-J.** (2005). Oxidative stress and ozone: perception, signalling and response. *Plant, Cell and Environment* 28: 1012-1020.
- **Baird C.** (1995) Environmental Chemistry. New York, Freeman and Co, 484 pp.
- **Bannister W. H., Bannister J. V., Barra D., Bond J., Bossa F.** (1991) Evolutionary aspects of superoxide dismutase: the copper zinc enzyme. *Free Radicals Research Communications*, 12-13: 349-361.
- **Banzet N., Richaud C., Deveaux Y., Kazmier M., Gagnon J., Triantaphylidès C.** (1998) Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cell. *Plant j.* 13: 519-527.
- **Barnes J. D., Valissariou D., Davison A. W., Holevas C. D.** (1990) Comparative ozone sensitivity of old and modern greek cultivars of spring wheat. *New Phytologist*, 116: 707-714.
- **Barnes J. D., Balaguer L., Manrique E., Davison A. W.** (1999) Resistance to air pollutants: from cell to community. In: Handbook of Functional Plant Ecology (Pugnaire FI, Valladres F eds), Marcel Dekker, New York, pp 735–770.
- **Bartley G. E., Scolnik P. A.,** (1995) Plant caratenoids: pigments for photoprotection, visual attraction and human health. *Plant Cell*, 7: 1027-1038.
- **Beckerson D. W., Hofstra G.** (1980) Effects of sulphur dioxide and ozone, singly or in combination, on membrane permeability. *Canadian Journal of Botany*, 58: 451-457.

- **Bent A. F.** (2001) Plant mitogen-activated protein kinase cascades: negative regulatory roles turnout positive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 784-786.
- **Bentolila S., Alfonso A. A., Hanson M. R.** (2002) A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertilità to cytoplasmic male-sterile plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 (16): 10887-10892.
- **Berczi A., Moller I. M.** (1998) NADH-monodehydroascorbate oxidoreductase is one of the redox enzymes in spinaci leaf plasma membranes. *Plant Physiology*, 116: 1029-1036.
- **Berger S.** (2002) Jasmonate-related mutants of *Arabidopsis* astools for studying stress signals. *Planta* 214: 497-504.
- **Bilecen K., Ozturk U. H., Duru A. D., Sutlu T., Petoukhov M. V., Svergun D. I., Koch M. H. J., Sezerman U. O., Cakmak I., Sayers Z.** (2005) Isolation of the gene and structural characterization of the protein using solution scattering and molecular modelling. *J. Biol. Chem.*, Vol. 280, Issue 14, 13701-13711.
- **Bleecker A. B., Kende H.** (2001) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual Rev. Dev. Biol.*, 16: 1-18.
- **Bolwell G.P.** (1996) The origin of oxidative burst in plants. *Biochem. Soc. Trans.*, 34: 438-442.
- **Bolwell G.P.** (1999) Role of active oxygen species and nitricoxide in plant defense responses. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 287-294.
- **Bolwell G.P., Bindschedler L.V., Blee K.A., Butt V.S., Davies D.R., Gardner S.L., Gerrish C., Minibayeva F.** (2002) Theapoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants:a three-component system. *Journal of Experimental Botany* 53: 1367-1376.
- **Booker F. L., Burkey K. O., Overmyer K., Jones A. M.** (2004) Differential responses of G-protein *Arabidopsis thaliana* mutants to ozone. *New Phytologist* 162: 633-641.
- **Borden K. L. B., Freemont P. S.** (1996) The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 6: 395-401.
- **Bors W., Langerbatels C., Michel C., Sandermann H.** (1989) Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage. *Phytochemistry*, 28: 1589-1595.
- **Bray E. A., Bailey-Serres J., Weretilnik E.** (2000) Responses to abiotic stress. In: *Biochemistry & molecular biology of plants*: Buchacan B., Gruissen W., Jones R., (eds), cap. 22
- **Briat J., Lobréaux S.** (1997) Iron transport and storage in plants. *Trend in Plant Science*, 2: 187-193.
- **Brown G. G., Formanova N., Jin H., Wargachuk R., Dendy C., Patil P., Laforest M., Zhang J., Cheung W. Y., Landry B. S.** (2003) The radish Rfo restorer gene of *Ogura* cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *Plant Journal*, 35 (2): 262-272.
- **Burkey K. O., Eason G., Fiscus E. L.** (2003) Factors that affect leaf extracellular ascorbic acid content redox status. *Physiologia Plantarum*, 117: 51-57.
- **Butler W. L., Kitajima M.** (1975) Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplasts. *Biochimica Biophysica Acta*, 376: 116-125.
- **Bussotti F., Ferretti M.** (1998) Air pollution, forest condition and forest decline in southern Europe. An overview. *Environmental Pollution*, 101: 49-65.

- **Byvoet P., Balis J. U., Shelley S. A., Montgomery M. R., Barber M. J.** (1995) Detention of hydroxyl radicals upon interaction of ozone with aqueous media or extracellular surfactant: the role of trace iron. *Arch. Biochem. Biophys.*, 319: 464-469.
- **Caldwell K. A., Kasarda D. D.** (1978) Assessment of genomic and species relationships in *Triticum* and *Aegilops* by PAGE and by differential staining of seed albumins and globulins. *Theor. Appl. Genet.*, 52: 273-280.
- **Castagna A., Nali C., Ciompi S., Lorenzini G., Soldatini G. F., Ranieri A.** (2001) Ozone exposure affects photosynthesis of pumpkin. *New Phytologist*, 152: 223-229.
- **Castillo F. J., Greppin H.** (1988) Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum album* L. leaves after ozone exposure. *Environmental and Experimental Botany*, 28: 231-238.
- **Castillo F. J., Heath R. L.** (1990) Ca^{2+} transport in membrane vesicles from Pinto leaves and its alteration after ozone exposure. *Plant. Physiol.*, 94 (2): 788-795.
- **Chang C. C., Ball L., Fryer M. J., Baker N. R., Karpinski S., Mullineaux P. M.** (2004) Induction of Ascorbate peroxidase 2 expression in wounded *Arabidopsis* leaves does not involve known wound-signalling pathways but is associated with changes in photosynthesis. *Plant Journal* 38: 499–511.
- **Chappelka, A.H., Samuelson L. J.** (1998) Ambient ozone effects on forest trees of the eastern United States: A review. *New Phytol.* 139: 91-108.
- **Chennaveeraiah M. S.** (1960) Karyomorphologic and cytotaxonomic studies in *Aegilops*. *Acta Horti Gotoburgensis*, 23: 85-178.
- **Chiu J. C., Brenner E. D., DeSalle R., Nitabach M. N., Holmes T. C., Coruzzi G. M.** (2002) Phylogenetic and expression analysis of the glutamate-receptor-like gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Biol. Evol.*, 19: 1066-1082.
- **Ciaffi M., Dominici L., Lafiandra D.** (1997) Gliadin polymorphism in wild and cultivated einkorn wheats. *Theor. Appl. Genetic*, 94: 68-74.
- **Ciaffi M., Dominici L., Lafiandra D.** (1998) High molecular weight glutenin subunit variation in wild and cultivated einkorn wheats (*Triticum ssp.*, *Poaceae*). *Pl. Syst. E vol.*, 209: 123-127.
- **Ciardi J. A., Tieman D. M., Jones J. B., Klee H. J.** (2001) Reduced expression of the tomato ethylene receptor gene *Leetr4* enhances the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 14: 487–495.
- **Clayton H., Knight M.R., Knight H., McAinsh M.R., Hetherington A.M.** (1999). Dissection of the ozone-induced calcium signature. *Plant Journal* 17: 575–579.
- **Colbeck I., MacKenzie A. R.** (1994) Air pollution by photochemical oxidants. Elsevier, London, 376 pp.
- **Colot V., Bartels D., Thompson R., Flavell R.** (1989) Molecular characterization of an active LMW glutenin gene and its relation to wheat and barley prolamin genes. *Mol. Gen. Genet.*, 216: 81-90.
- **Conklin P. L., Last R.** (1995) Differential accumulation of antioxidant mRNAs- in *Arabidopsis t.* exposed to ozone. *Plant Physiology*, 109: 203-212.
- **Cooke J. E., Heasman J., Wylie C. C.** (1996) The role of interleukin-4 in the regulation of mouse primordial germ cell numbers. *Dev. Biol.* 25: 174(1): 14-21.

- **Coursol S., Fan L.-M., Le Stunff H., Spiegel S., Gilroy S., Assmann S. M.** (2003) Sphingolipid signalling in *Arabidopsis* guardcells involves heterotrimeric G proteins. *Nature* 423: 651–654.
- **Creelman R. A., Mullet J. E.** (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biol.*, 48: 355-381.
- **Criqui M. C., Jamet E., Parmentier Y., Marbach J., Durr A., Fleck J.** (1992) Isolation and characterization of a plant cDNA showing homology to animal glutathione peroxidase. *Plant Molecular Biology*, 18: 623-627.
- **Croteau R., Kutchan T., Lewis N.** (2000) Natural products (secondary metabolites). In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, eds. Buchanan B., Gruissem W. & Jones R. L. (American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD), pp. 1250–1318.
- **Crozier A., Kamiya Y., Bishop G., Yokota T.** (2000) Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*: Buchacan B., Gruissen W., Jones R. (eds), cap 17.
- **Cummins I., Cole D. J., Edwards R.** (1999) A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *Plant Journal*, 18: 285-292.
- **Cummins I., O'Hagan D., Jablonkai I., Cole D. J., Hehn A., Werck-Reichhart D., Edwards R.** (2003) Cloning, characterization and regulation of a family of phi class glutathione transferases from wheat. *Plant Molecular Biology*, 52: 591-603.
- **Dangl J. L., Dietrich R. A., Richeberg M. H.** (1996) Death dont'have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell*, 8: 1793-1803.
- **Daniel X., Lacomme C., Morel J-B., Roby D.** (1999) A novel myb oncogene homologue in *Arabidopsis thaliana* related to hypersensitive cell death. *The Plant Journal* 20 (1): 57-66.
- **Dat J. F., Lopez-Delgado H., Foyer C. H., Scott I. M.** (1998) Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedling. *Plant physiol.*, 116: 1351-1357.
- **Decker E. A.** (1997) Phenolics: prooxidans or antioxidant. *Nutr. Rev.*, 55: 396-398.
- **De Leeuw F. A. A. M., Zantvoort E. D. G.** (1997) Mapping of exceedances of ozone critical levels for crops and forest trees in the Netherlands : preliminary results. *Environmental Pollution*, 96: 89-98.
- **Depège N., Drevet J., Boyer N.** (1998) Molecular cloning and characterization of tomato cDNAs encoding glutathione peroxidase-like proteins. *Eur. J. Biochem.*, 253: 445-451.
- **Desikan R., Mackerness A. H. S., Hancock J. T., Neill S. J.** (2001) Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology* 127, 159–172.
- **Desloire S., Gherbi H., Laloui W., Marhadour S., Clouet V., Cattolico L., Falentin C., et al.,** (2003) Identification of the fertility restoration locus, Rfo, in radish, as a member of the pentatricopeptide-repeat protein family. *EMBO Rep.*, 4 (6): 588-594.
- **De Silva D. L. R., Mansfield T. A., McAinsh M. R.** (2001) Change in stomatal behaviour in the calcicole *Leontodon hispidus* due to the disruption by ozone of the regulation of apoplastic Ca²⁺ by trichomes. *Planta*.
- **Dixon D. P., Davis B. G., Edwards R.** (2002) Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative function in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 30859-30869.

- **Drolet G., Dumbroff E. B., Legge R. L., Thompson J. E.** (1986) Radical scavenging: properties of polyamines. *Phytochemistry*, 25: 367-371.
- **Droux M.** (2004) Sulfur assimilation and the role of sulfurin plant metabolism: a survey. *Photosynthetic Research*, 79: 331-348.
- **Du XI-L., Wang D., Qian X. Y., Jiang L. Z., Wie C., Li K. G., Shen G. A., Lin C. F., Yang J. S.** (2003) cDNA cloning and expression analysis of the rice (*Oryza sativa* L.) Rnase L Inhibitor. *DNA Sequence*, 14: 295-301.
- **Durner J., Shah J., Klessing D. F.** (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* 2, 266-274.
- **Dvorak J., McGuire P. E., Cassidy B.** (1988) Apparent sources of the A genomes of wheats inferred from polymorphism in abundance and restriction fragment length of repeated nucleotide sequences. *Genome*, 30: 680-689.
- **Dvorak J., Terlizzi P. O., Zhang H. B., Resta P.** (1993) The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome*, 36: 21-31.
- **Edwards R.** (1996) Characterization of a glutathione transferase and glutathione peroxidase in pea (*Pisum sativum*). *Physiologia Plantarum*, 98: 594-604.
- **Eig A.** (1929) Monographisch-kritische Übersicht der Gattung *Aegilops*. *Beih Repert Spec. Nov. Regni Veg.*, 55: 1-228.
- **Elstner E. F.** (1991) Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. In: Pell E. J., Steffen K. L., eds. *Active oxygen oxidative stress and plant metabolism*. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, 13-25.
- **Ernst D., Schraudner M., Langebartels C., Sandermann H.** (1992) Ozone-induced changes of mRNA level of β -1-3-glucanase, chitinase and pathogenesis related protein 1b in tobacco plant. *Plant molecular biology*, 20: 673-682.
- **Ernst D., Bodemann A., Schmelzer E., Langebartels C., Sandermann H.** (1996) β -1-3-glucanase mRNA is locally, but not systemically induced in *Nicotiana tabacum* l. cv. *Bel W-3* after ozone fumigation. *Journal of plant physiology*, 148: 215-221.
- **Faccioli P., Pecchioni N., Cattivelli L., Stanca A.M., Terzi V.** (2001) Expressed sequence tags from cold-acclimated barley can identify novel plant genes. *Plant Breeding* 120: 497-502.
- **Farage P. K., Long S. P., Lechner E. G., Baker N. G.** (1991) The sequence of changes within the photosynthetic apparatus of wheat following short term exposure to ozone. *Plant Physiology*, 95: 529-535.
- **Farmer E. E., Weber H., Vollenweider S.** (1998) Fatty acid signaling in *Arabidopsis*. *Planta*, 206: 167-174.
- **Fernandez de Caley R., Hernandez-Luca C., Carbonero P., Garcia-Olmedo F.** (1976) Gene expression in allopolyploids: genetic control of lipopurothionins in wheat. *Genetics*, 83: 687- 699.
- **Ferretti M., Gavilli G., Grossoni P., Lorenzini G., Pellegrini M.** (1998) Biomonitoraggio di ozono, metalli in traccia, zolfo e cloro a Firenze nel 1996. vegetali come bioindicatori di inquinamento atmosferico in città italiane. Risultati, problemi e prospettive. 21-33.

- **Ferretti M., Brusasca G., Buffoni A., Bussotti F., Cozzi A., Petriccione B., Pompei E., Silibello C.** (2003) Ozone risk in the permanent plots of the Italian intensive monitorino of forest ecosystems. An introduction. *Ann. Ist. Sper. Selv.*, 30 (1): 3-28.
- **Fink S.** (1988) Histological and cytological changes caused by air pollutants and other abiotic factors. In: *Air Pollution and Plant Metabolism*, Schulte-Hoestede S., Darrall N. M., Blank L. W., Wellburn A. R., a cura di Elsevier Applied Science, London and New York, pp. 36-54.
- **Fink S.** (1991) Unusual patterns in the distribution of calcium oxalate in spruce needles and their possible relationship to the impact of pollutants. *New Phytol.* 119: 41-51.
- **Fisk D. G., Walker M. B., Barkan A.** (1999) Molecular cloning of the maize gene *crp1* reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression. *EMBO J.*, 18 (9): 2621-2630.
- **Foyer C. H., Lopez-Delgado H., Dat J. F., Scott I. M.** (1997) Hydrogen peroxide and glutathione – associated mechanism of acclamatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum*, 100: 241-254.
- **Foyer C. H., Noctor G.** (2005) Oxidant and signalling in plants : a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*. 1-16.
- **Foyer C. H., Trebst A., Noctor G.** (2005) Signaling and integration of defense function of tocopherol, ascorbate and glutathione. In: *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation and Environment* (eds B. Demming-Adam & W. W. Adams), pp. 00-00. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, in press.
- **Frank H. A., Cogdell R. J.** (1996) Carotenoids in photosynthesis. *Photoche. Photobiol.*, 63: 257-264.
- **Freebairn H. T.** (1960) The prevention of air pollution damage to plant by use of Vitamin C sprays. *Journal of air Pollution Control Association*. 10: 314-317.
- **Frova C.** (2003) The glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. *Physiologia Plantarum*, 119: 469-479.
- **Fryer M.J., Ball L., Oxborough K., Karpinski S., Mullineaux P.M., Baker N.R.** (2003) Control of ascorbate peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organization of *Arabidopsis* leaves. *Plant Journal*, 33: 691–705.
- **Fuhrer J.** (1996) The critical level for effects of ozone on crops, and the transfer to mapping. In: L. Kärenlampi L., Skärby L. (Eds), *Critical levels for ozone in Europe: testing and finalizing the concepts*. University of Kuopio, Kuopio, pp. 27-43.
- **Fuhrer J., Skarby L., Ashmore M. R.** (1997) Critical level for ozone effects on vegetation in Europe. *Environmental Pollution*, 1997: 91-106.
- **Fuhrer J., Achermann B.** (1999) Critical level of ozone. Level II. Environmental Document no. 115. Swiss Agency for Environment, Forest and Landscape. Bern, Switzerland, 333 pp.
- **Gill B. S., Chen P. D.** (1987) Role of Cytoplasm-Specific Introgression in the Evolution of the Polyploid Wheats. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 84: 6800-6804.
- **Gill B. S., Kimber G.** (1974) Giemsa C-banding and the Evolution of Wheat *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71: 4086-4090.

- **Gleason J. F., Bhartia P. K., Herman J. R., McPeters R., Neuman P., Stolarski R. S., Flynn L., Labow G., Larko D., Seftor C., Wellemeyer C et al.** (1993) Record low global ozone in 1992. *Science*, 260 (5107): 523-526.
- **Gomez L. D., Noctor G., Knight M. R., Foyer C. H.** (2004a) Regulation of calcium signalling and gene expression by glutathione. *Journal of Experimental Botany* 55: 1851–1859.
- **Gomez L. D., Vanacker H., Buchner P., Noctor G., Foyer C. H.** (2004b) The intercellular distribution of glutathione synthesis and its response to chilling in maize. *Plant Physiology*, 134: 1662-1671.
- **Gonneau M., Mornet R., Laloue M.** (1998) A *Nicotiana plumbaginifolia* protein labelled with an azido cytokinin agonist is a glutathione S-transferase. *Physiology Plantarum*, 103: 114-124.
- **Grantz A., Brummell D. A., Bennett A. B.** (1995) Ascorbate free-radical reductase messenger-RNA levels are induced by wounding. *Plant Physiology*, 108: 411-418.
- **Gunderson C.A., Taylor G.E.** (1991) Ethylene directly inhibits foliar gas exchange in *Glycine max*. *Plant Physiology* 95: 1016–1020.
- **Gupta A. S., Alscher R. G., McCune D.** (1991) Response of photosynthesis and cellular antioxidants to ozone in *Populus* leaves. *Plant Physiology* 96:650-655.
- **Hailing J., Martin C.** (1999) Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol. Biol.*, 41(5): 577-85.
- **Halliwell B., Gutteridge J. M. C.** (1989) Free radicals. M. Biology and Medicine. Oxford: Clarendon press. pp. 215.
- **Harada E., Kusano T., Sano H.** (2000) Differential expression of genes encoding enzymes involved in sulfur assimilation pathway in response to wounding and jasmonate in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, 156: 272-276.
- **Harborne J. B.** (1982) Introduction to ecological biochemistry, 2nd. Ed. London: Academic Press XVI + 278 pp.
- **Harrison P. M., Arosio P.** (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta*. 1275: 161-203.
- **Hauptman N., Cadenas E.** (1997) The oxygen paradox: biochemistry of active oxygen. in: scandalios j. g. (ed.): oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. *Cold Spring Harbor*, cshl press. 1-20.
- **Heath R.L.** (1994) Alterations of plant metabolism by ozone exposure. In: *Plant responses to gaseous environment: molecular, metabolic and physiological aspects* (Alscher R.G., Wellburn A.R., Eds). Chapman & Hall, London, pp. 121-145.
- **Heath R.L., Taylor G.E. Jr** (1997) Physiological processes and plant responses to ozone exposure. In *Forest Decline and Ozone* (eds Sandermann H., Wellburn A.R., Heath R.L.), pp. 317–368. Springer Verlag.
- **Henrissat B., Bairoch A.** (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochemistry*, 316: 695-696.
- **Hérouart D., Bowler C., Willekens H., Van Camp W., Slooten L., Van Montagu M., Inzé D.** (1993) Genetic engineering of oxidative stress resistance in higher plants. *Philos. Trans. R. Soc. Londra*, 342: 235-240.

- **Hill A. C., Littlefield N.** (1969) Ozone. Effect on apparent photosynthesis rate of transpiration and stomatal closure in plants. *Environmental Science and Technology* 3: 52–56.
- **Hoeberichts F. A., Woltering E. J.** (2002) Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanism and plant-specific regulators. *Bioessay* 25, 47-57.
- **Horemans N., Asard H., Caubergs R. J.** (1996) Further characterisation of a vitamin C carrier in the plasma membrane of beans (*Phaseolus vulgaris*). *Archives of Physiology and Biochemistry*, 104: 790-790.
- **Horemans N., Asard H., Van Gestelen P., Caubergs R. J.** (1998) Facilitated diffusion drives transport of oxidised ascorbate molecules into purified membrane vesicles of *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, 104: 783-789.
- **Horemans N., Foyer C. H., Asard H.** (2000) Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends in Plant Science*, 5: 263-267.
- **Horemans N., Potters G., De Wilde L., Caubergs R. J.** (2003) Dehydroascorbate uptake activity correlates with cell growth and cell division of tobacco bright yellow-2 cell cultures. *Plant Physiology*, 133: 361-367.
- **Ikeda T. M., Gray M. W.** (1999) Characterization of a DNA-binding protein implicated in transcription in wheat mitochondria. *Mol. Cell Biol.*, 19 (12): 113-122.
- **Ito M., Araki S., Matsunaga S., Itoh T., Nishihama R., Machida Y., Doonan J. H., Watanabe A.** (2001) G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *Plant Cell*, 13: 1891-1905.
- **Jaaska V.** (1987) Isoenzyme contribution to the systematics and phylogeny of the *Triticinae* crops and grasses. In: The Plant Cover of the Estonian SSR. *Flora, Vegetation and Ecology*, Valgus, Tallinn. pp. 133–159.
- **Jabs T., Dietrich R. A., Dangel J. L.** (1996) Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* 273, 1853-1856.
- **Jakoby M., Weisshaar B., Dröge-Laser W., Vicente-Carbajosa J., Tiedemann J., Kroj T., Parcy F.** (2002) bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.*, 7: 106-111.
- **Jiang J., Gill B. S.** (1994) Different species-specific chromosome translocations in *Triticum timopheevii* and *T. turgidum* support the diphyletic origin of polyploid wheats. *Chromosome Research*, 2: 59-64.
- **de Jong A., Yakimova E. T., Kapchina V. M., Woltering E. J.** (2002) A critical role for ethylene in hydrogen peroxide release during programmed cell death in tomato suspension cells. *Planta* 214, 537-545.
- **Johnson B. L., Dhaliwal H. S.** (1976) Reproductive isolation of *Triticum boeoticum* and *Triticum urartu* and the origin of the tetraploid wheats. *Am. Journal Botany*, 63: 1088-1094.
- **Jonak C., Ökresz L., Bögre L., Hirt H.** (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 415–424.
- **Jones B. L., Lookhart G. L., Mak A. Cooper D. B.** (1982) Sequences of purothionins and their inheritance in diploid, tetraploid, and hexaploid wheats. *J. Hered.*, 73: 143-144.
- **Joo J. H., Wang S., Chen J. G., Jones A. M., Fedoroff N.** (2005) Different signaling and cell death

roles of heterotrimeric Protein G and β subunits in the *Arabidopsis* oxidative stress response to ozone. *The Plant Cell*, 17, in press.

- **Kampranis S. C., Damianova R., Atallah M., Toby G., Kondi G., Tsiachlis P. N., Makris A. M.** (2000) A novel plant glutathione S-transferase/peroxidase suppresses Bax lethality in yeast. *Journal Biol. Chem.*, 275: 29207-29216.
- **Kandaswami C., Middleton E. Jr.** (1994) Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 366: 351-376.
- **Kanematsu S., Asada K.** (1990) Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-superoxide dismutase in spinach, rice and horsetail. *Plant Cell Physiology*, 31: 99-112.
- **Kangasjärvi J., Talvinen J., Ultriainen M., Karjalainen R.** (1994) Plant defense systems induced by ozone. *Plant, Cell and Environment*, 17: 783-794.
- **Kangasjärvi J., Jaspers P., Kollist H.** (2005) Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant, Cell and Environment*; 1-16
- **Kanna M., Tamaoki M., Kubo A., Nakajima N., Rakwal R., Agrawal G. K., Tamogami S., Ioki M., Ogawa D., Saji H., Aono M.** (2003) Isolation of an ozone-sensitive and jasmonate semi-insensitive *Arabidopsis* mutant (*oji1*). *Plant Cell Physiology* 44, 1301-1310.
- **Kärelampi L., Shärby L., Eds** (1996) Critical level for ozone in Europe: Critical levels for ozone in Europe: testing and finalizing the concepts. University of Kuopio, Kuopio: 366 pp.
- **Karpinski S., Reynolds H., Karpinska B., Wingsle G., Creissen G., Mullineaux P.** (1999) Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* 284: 654–657.
- **Kawasaki T., Henmi K., Ono E., Hatekeyama S., Iwano M., Satoh H., Shimamoto K.** (1999) The small GTP-binding protein Rac1 a regulator of cell death in plants. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 96: 10922–10926.
- **Kazama T., Toriyama K.** (2003) A pentatricopeptide repeat-containing gene that promotes the processing of aberrant *atp6* RNA of cytoplasmic male-sterile rice. *FEBS Lett.*, 544 (1-3): 99-102.
- **Kerby K.** (1986) Ph. D Thesis, University of Alberta Edmonton.
- **Kerby K., Kuspira J.** (1987) The phylogeny of the polyploidy wheats *Triticum aestivum* (bread wheat) and *Triticum turgidum* (macaroni wheat). *Genome*, 29: 722-737.
- **Kerstiens G., Lenzian K.J.** (1989). Interactions between ozone and plant cuticles. 1. Ozone deposition and permeability. *New Phytologist* 112: 13–19.
- **Kihara H.** (1919) Über cytologische Studien bei einigen Getreidearten. I. Spezies-Bastarde des Weizens und Weizenmengen-Bastarde. *Bot. Mag.*, 33: 17-38.
- **Kihara H.** (1924) Cytologische und genetische Studien bei wichtigen Getreidearten mit besonderer Rücksicht auf das Verhalten der Chromosomen und die Sterilität in den Bastarden. *Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ. Kyoto*, 1: 1-200.
- **Kihara H.** (1937) Genomanalyse bei *Triticum* und *Aegilops*. VII. Kurze Übersicht über die Ergebnisse des Jahre 1934-46. *Mem. Coll. Agric., Kyoto Imp. Univ. Kyoto*, 41: 1-61.

- **Kihlara H.** (1954) Consideration on the evolution and the distribution of *Aegilops* based on the analyser method. *Cytologia*, 19: 336-357.
- **Kim C. Y., Liu Y., Thorne E. T., Yang H., Fukushige H., Gassmann W., Hildebrand D., Sharp R. E., Zhang S.** (2003) Activation of a stress-responsive mitogen-activated protein kinase cascade induces the biosynthesis of ethylene in plants. *Plant Cell* 15, 2707-2718.
- **Kliebenstein D. J., Monde R. A., Last S. M.** (1998) Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology*. 118: 637–650.
- **Koch J. R., Creelman R. A., Eshita S. M., Seskar M., Mullet J. E., Davis K. R.** (2000) Ozone sensitivity in hybrid poplar correlates with insensitivity to both salicylic acid and jasmonic acid. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiology* 123: 487–496.
- **Koizuka N., Imai R., Fujimoto H., Hayakawa T., Rimura Y., Kohno-Murase J., Sakai T., Kawasaki S., Imamura J.** (2003) Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein gene, *orf687*, that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile Kosen radish. *Plant Journal*, 34 (4): 407-415.
- **Kollist H., Moldau H., Mortensen L., Rasmussen SK., Jorgensen L. B.** (2000) Ozone flux to plasmalemma in barley and wheat is controlled by stomata rather than by direct reaction of ozone with cell wall ascorbate. *Journal of Plant Physiology* 156: 645-651.
- **Kollist H., Moldau H., Oksanen E., Vapaavuori E.** (2001) Ascorbate transport from the apoplast to the symplast in intact leaves. *Physiologia Plantarum*, 113: 377-383.
- **Konarev V. G., Gavrilijuk P. J., Peneva T. I.** (1976) About nature and origin of wheat genomes on the data of biochemistry and immunochemistry of grain proteins. *Agric. Biol. (Moscow)* 11: 656–665 (in Russian).
- **Kopka J., Pical C., Hetherington A. M., Muller-Rober B.** (1998) Ca²⁺/phospholipids – binding (C₂) domain in multiple plant proteins: novel components of the calcium- sensing apparatus. *Plant Molecular Biology*, 36: 627-637.
- **Kovtun Y., Chiu W. L., Tena G., Sheen J.** (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97: 2940–2945.
- **Kubo A., Saji H., Tanaka K., Kondo N.** (1995) Expression of *Arabidopsis* cytosolic ascorbate peroxidase in response to ozone or sulfur dioxide. *Plant Molecular Biology* 29: 479–489.
- **Lafiandra D., Masci S., D'Ovidio R., Tanzarella O. A., Porceddu E., Margiotta B.** (1992) Relationship between the D genome of hexaploid wheats (AABBDD) and *Ae. squarrosa* as deduced by seed storage proteins and molecular marker analyses. *Hereditas*, 116: 233-238.
- **Lahmy S., Barneche F., Derancourt J., Filipowicz W., Delseny M., Echeverria M.** (2000) A chloroplastic RNA-binding protein is a new member of the PPR family. *FEBS Lett.*, 480 (2-3): 255-260.
- **Laisk A., Kull O., Moldau H.** (1989) Ozone concentration in leaf intercellular air spaces is close to zero. *Plant Physiology* 90: 1163-1167.
- **Lamb C., Dixon R.A.** (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 251–275.
- **Lamb J. R., Tugendreich S., Hieter, P.** (1995) Tetratricopeptide repeat interaction: to TPR or not TPR? *Trends Biochemistry Science*, 20: 257-259.

- **Langebartels C., Kerner K., Leonardi S., Schraudner M., Trost M., Heller W., Sandermann H. Jr** (1991). Biochemical plant responses to ozone I. Differential induction of polyamine and ethylene biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology* 95: 882–889.
- **Langebartels C., Schraudner M., Heller W., Ernst D., Sandermann H. Jr** (2002a). Oxidative stress and defense reactions in plants exposed to air pollutants and UV-B radiation. In *Oxidative Stress in Plants* (eds D. Inzé & M. Van Montagu), pp. 105–135. Taylor & Francis, London, UK.
- **Langebartels C., Wohlgemuth H., Kschieschan S., Grün S., Sandermann H.** (2002b). Oxidative burst and cell death in ozone exposed plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 567–575.
- **Langebartels C., Kangasjärvi J.** (2004) Ethylene and jasmonate as regulators of cell death in disease resistance. In *Molecular Ecotoxicology of Plants* (ed. H. Sandermann), pp. 75–109. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- **Laudert D., Schaller F., Weiler E. W.** (2000) Transgenic *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants over expressing allene oxide synthase. *Planta* 211: 163–165.
- **Laulhére J. P., Briat J. F.** (1993) Iron release and uptake by plant ferritin: effects of pH, reduction and chelation. *Biochemistry Journal*, 290: 693–699.
- **Lee E. H., Tingey D. T., Hogsett W. E.** (1988) Evaluation of ozone exposure indices in exposure-response modelling. *Environmental Pollution*, 53: 56–62.
- **Lee M. W., Qi M., Yang Y.** (2001) A novel jasmonic acid-inducible rice myb gene associates with fungal infection and host cell death. *Molecular Plant Microbe Interactions* 14: 527–535.
- **Le Thiec D., Dixon M., Garrec J.-P.** (1994) The effect of slightly elevated ozone concentrations and mild drought stress on the physiology and growth of Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst and beech, *Fagus sylvatica* (L.) in open-top chambers. *New Phytologist*, 128: 671–678.
- **Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C.** (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*. 79: 583–593.
- **Li Z.-S., Alfenito M., Rea P. A., Walbot V., Dixon R. A.** (1997) Vacuolar uptake of the phytoalexin medicarpin by the glutathione conjugate pump. *Phytochemistry*, 45: 689–693.
- **Lim P. O., Woo H. R., Nam H. G.** (2003) Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Trends Plant Science* 8: 272–278.
- **Liu Z. et al.** (1992) c-DNA cloning of a novel human ubiquitin carrier protein. *J. Biol. Chem.* 267: 15829–15835.
- **Liu Y., Zhang S.** (2004) Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 3386–3399.
- **Lorenzini G., Medeghini Bonatti, P., Nali, C., Baroni Fornasiero, R.** (1994) The protective effect of rust infection against ozone, sulphur dioxide and paraquat toxicity symptoms in broad bean. – *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45: 263–279.
- **Lorenzini G., Nali C., Panicucci A.** (1994) Surface ozone in Pisa (Italy): a six-year study. *Atmospheric Environment*, 38B: 51–59.
- **Lorenzini G.** (1999) Le piante e l'inquinamento dell'aria. Edagricole, Bologna.

- **Lorenzo O., Chico J. M., Sanchez-Sarrano J. J., Solano R.** (2004) *JASMONATE-INSENSITIVE1* encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 1938-1950.
- **Loreto F., Mannozi M., Maris C., Nascetti P., Ferranti F., Pasqualini S.** (2001) Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in leaves. *Plant Physiology* 126: 993–1000.
- **Loreto F., Velikova V.** (2001) 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.
- **Lu C., Han M. H., Guevara-Garcia A., Fedoroff N. V.** (2002) Mitogen -activated protein kinase signaling in post germination arrest of development by abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99: 15812–15817.
- **Ludwikow A., Gallois P., Sadowski J.** (2004) Ozone-induced oxidative stress response in *Arabidopsis*: transcription profiling by microarray approach. *Cell Mol Biol Lett* 9: 829-842.
- **Luwe M. W. F., Takahama U., Heber U.** (1993) Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant Physiology* 101: 969–976.
- **Maccarrone M., Veldink G. A., Vliegenhardt J. F. G.** (1992) Thermal injury and ozone stress affect soybean lipoxygenase expression. *FEBS Letters* 309: 225–230.
- **Maccarrone M., Veldink G. A., Vliegenthart J. F. G., Finazzi-Agrò A.** (1997) Ozone stress modulates amine oxidase and lipoxygenase expression in lentil (*Lens culinaris*) seedlings. *FEBS Lett.* 408: 241-244.
- **MacKey J.** (1963) Species relationship in *Triticum*. Proc. 2nd Int. Wheat Gen. Symp. Lund, 1963. *Hereditas* 2, 237–276.
- **Mahalingam R., Gomez-Buitrago A., Eckardt N., Shah N., Guevara-Garcia A., Day P., Raina R., Fedoroff N.V.** (2003) Characterizing the stress/defense transcriptome of *Arabidopsis*. *Genome Biology* 4, R20.
- **Mahalingam R., Fedoroff N.** (2003) Stress response, cell death and signalling: the many faces of reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum* 119: 56–68.
- **Mahalingam R., Shah N., Scrymgeour A., Fedoroff N.** (2005) Temporal evolution of the *Arabidopsis* oxidative stress response. *Plant Molecular Biology* in press. MAPK Group (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* 7: 301–308.
- **Marrs K. A., Alfenito M. R., Lloyd A. M., Walbot V.** (1995) A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature*, 375: 397-400.
- **Marrs K. A.** (1996) Function and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiology Plant Mol. Biology*, 47: 127-158.
- **Martin M.J., Farage P.K., Humphries S.W., Long S.P.** (2000). Can the stomatal changes caused by acute ozone exposure be predicted by changes occurring in the mesophyll? A simplification for models of vegetation response to the global increase in tropospheric elevated ozone episodes. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 211–219.
- **May M. J., Vernoux T., Leaver C., van Montagu M., Inzé D.** (1998) Glutathione homeostasis in plants: implication for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany*, 49: 649-667.

- **Mazel A., Levine A.** (2001) Induction of cell death in *Arabidopsis* by superoxide in combination with salicylic acid or with protein synthesis inhibitors. *Free Radical Biology and Medicine* 30, 98-106.
- **McAinsh M. R., Clayton H., Mansfield T. A., Hetherington A. M.** (1996) Changes in stomatal behaviour and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress. *Plant Physiology*, 11: 1031-1042.
- **McAinsh M.R., Evans N.H., Montgomery L.H., North K.A.** (2002) Calcium signalling in stomatal responses to pollutants. *New Phytologist* 153: 441–447.
- **McFadden E. S., Sears E. R.** (1944) The artificial synthesis of *Triticum spelta*. *Rec. Genetic Soc. Am.* 13: 26-27.
- **McFadden E. S., Sears E. R.** (1946) The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *J. Hered*, 37: 81-89; 107-116.
- **Medhy M. C.** (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology*, 105: 467-472.
- **Mehlhorn H., Wellburn A. R.** (1987) Stress ethylene formation determines plant sensitivity to ozone. *Nature* 327, 417-418.
- **Meierhoff K., Felder S., Nakamura T., Bechtold N., Schuster G.** (2003) HCF152, an *Arabidopsis* RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast psbB-psbT-psbH-petB-petD RNAs. *Plant Cell*, 15 (6): 1480-1495.
- **Meinhard M., Grill E.** (2001) Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 508: 443–446.
- **Meinhard M., Rodriguez P. L., Grill E.** (2002) The sensitivity of ABI2 to hydrogen peroxide links the abscisic acid-response regulator to redox signalling. *Planta* 214: 775–782.
- **Miles G. P., Samuel M. A., Ellis B. E.** (2002) Suramin inhibit oxidant signalling in tobacco suspension-cultured cells. *Plant*.
- **Miles G. P., Samuel M. A., Jones A. M. & Ellis B. E.** (2004) Mastoparan rapidly activates plant MAP kinase signaling independent of heterotrimeric G proteins. *Plant Physiology* 134: 1332–1336.
- **Miller T. E.** (1987) In: Lupton F. G. H. (ed) Wheat breeding: its scientific basis. Chapman & Hall, London, UK, pp. 1-30.
- **Miller J. D., Arteca R. N., Pell E. J.** (1999) Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 120: 1015–1024.
- **Mikami K., Katagiri T., Iuchi S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** (1998) *Plant Journal*, 15: 563-568.
- **Mittova V., Kiddle G., Theodoulou F. L., Gomez L., Volokita M., Tal M., Foyer C. H., Guy M.** (2003) Co-ordinate induction of glutathione biosynthesis and glutathione-metabolising enzymes is correlated with salt tolerance in tomato. *FEBS Letters*, 554: 417-421.
- **Miyashita N. T., Mori N., Tsunewaki K.** (1994) Molecular variation in chloroplast DNA regions in ancestral species of wheat. *Genetics*, 137: 883-889.

- **Miyazaki S., Fredricksen M., Hollis K. C., Poroyko V., Shepley D., Galbraith D. W., Long S. P., Bohnert H. J.** (2004) Transcript expression profiles of *Arabidopsis thaliana* grown under controlled conditions and open-air elevated concentrations of CO₂ and of O₃. *Field Crops Research* 90: 47-59.
- **Moeder W., Barry C. S., Tauriainen A. A., Betz C., Tuomainen J., Utriainen M., Grierson D., Sandermann H., Langerbatels C., Kangasjarvi J.** (2002) Ethylene synthesis regulated by bi-phasic induction of ACC synthase and ACC oxidase genes is required for H₂O₂ accumulation and cell death in ozone-exposed tomato. *Plant Physiology* 130, 1918-1926.
- **Moldau H., Sober J., Sober A.** (1990) Differential sensitivity of stomata and mesophyll to sudden exposure of bean shoots to ozone. *Photosynthetica* 24: 446-458.
- **Møller S. G., Kunkel T., Chua N.** (2001) A plastidic ABC protein involved in intercompartmental communication of light signalling. *Genes & development*, 15: 90-103.
- **Moon H., Lee B., Choi G., et al.** (2003) NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 100: 358-363.
- **Moon J., Parry G., Estelle M.** (2004) The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *The plant cell*, 16: 3181-3195.
- **Mozafar A., Oertli J. J.** (1993) Vitamin C (ascorbic-acid) uptake and metabolism by soybean. *Journal of Plant Physiology*, 141: 316-321.
- **Mueller L. A., Goodman C. D., Silady R. A., Walbot V.** (2000) AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiology*, 123: 1561-1570.
- **Mullineaux P. M., Creissen G. P.** (1997) Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress. In: Scandalios J. G. (eds): *Oxidative stress and molecular biology of antioxidant defense*. Cold Spring Harbor, CSHL Press. 667-713.
- **Mullineaux P. M., Karpinski S., Jimenèz A., Cleary S. P., Robinson C., Creissen G. P.** (1998) Identification of cDNAs encoding plastid-targeted glutathione peroxidase. *Plant Journal*, 13: 375-379.
- **Mullineaux P. M., Karpinski S.** (2002) Signal transduction in response to excess light getting out of the chloroplast. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5: 43-48.
- **Murata Y., Pei Z. M., Mori I. C., Schroeder J. I.** (2001) Absciscic acid activation of plasma membrane Ca²⁺ channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *Plant Cell*, 13: 2513-2523.
- **Murgia I., Briat J. F., Tarantino D., Soave C.** (2001) Plant ferritin accumulates in response to photoinhibition but its ectopic overexpression does not protect against photoinhibition. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 797-805.
- **Murgia I., Delledonne M., Soave C.** (2002) Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in arabidopsis. *Plant Journal*, 30: 521-528.
- **Nakajima N., Matsuyama T., Tamaoki M., Saji H., Aono M., Kubo A., Kondo N.** (2001) Effects of ozone exposure on the gene expression of ethylene biosynthetic enzymes in tomato leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 39, 993-998.

- **Nakajima N., Matsuyama T., Tamaoki M., Saji H., Aono M., Kubo A., Kondo N.** (2001) Effects of ozone exposure on the gene expression of ethylene biosynthetic enzymes in tomato leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 993–998.
- **Nakajima N., Itoh T., Takikawa S., Asai N., Tamaoki M., Aono M., Kubo A., Azumi Y., Kamada H., Saji H.** (2002) Improvement in ozone tolerance of tobacco planta with an antisense DNA for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. *Plant, Cell and Environmet*, 25: 727-736.
- **Nakamura T., Schuster G., Sugiura M., Sugita M.** (2004) Chloroplast RNA-binding and pentatricopeptide repeat proteins. *Biochem. Soc. Trans.*, 32: 571-574.
- **Nali C., Pucciariello C., Lorenzini G.** (2002) – Ozone distribution in central Italy and its effect on crop productivity. *Agriculture, Ecosystem and Environment*, 90: 277-289.
- **Navakoudis E., Lütz C., Langerbartels C., Lütz-Meindl U., Kotrabasis K.** (2003) Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines. *Bioc. Boph. Act.* 160-169.
- **Neilsen D., Hougue E. J., Neilsen G. H., Parchomchuk P.** (1995) Using SPAD-502 values to asses the nitrogen status of apple trees. *Horticultural Science*, 30: 508-512.
- **Newman T., de Bruijn F.J., Green P., Keegstra K., Kende H., McIntosh L., Ohlrogge J., Raikkhel N., Sommerville S., Tomashaw M., Retzel E., Somerville C.** (1994) Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiology*, 117: 787-795.
- **Nickstadt A., Thomma B. P. H. J., Feussner I., Kangasjärvi J., Zeier J., Loeffler C., Scheel D., Berger S.** (2004) The jasmonate-insensitive mutant *jin1* show increased resistance to biotrophic as well as necrotrophic pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 5: 425-434.
- **Nishikawa K.** (1983) Species relationship of wheat and its putative ancestors as viewed from isozyme variation. *Proc. 6th Int. Wheat Gen. Symp* Kyoto, pp. 59-63.
- **Noctor G., Foyer C.H.** (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 249–279.
- **Noctor G., Arisi A. C. M., Jouanin L., Kunert K. J., Rennenberg H., Foyer C. H.** (1998) Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal Experimental Botany*, 49: 623-647.
- **Noctor G., Veljovic-Jovanovic S., Driscoll S., Novitskaya L., Foyer C. H.** (2002a) Drought and oxidative load in wheat leaves: a predominant role for photorespiration? *Annal of Botany*, 89: 841-850.
- **Noctor G., Gomez L., Vanacker H., Foyer C. H.** (2002b) Glutathione homeostatis and signalling: the influence of biosynthesis, compartmentation and transport. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1283-1304.
- **Nolle M., Ellul R., Heinrich G., Gusten H.** (2002) A long-term study of background ozone concentrations in the central Mediterranean-diurnal and seasonal variations on the island of Gozo. *Atmospheric environment*, 36 (8): 1391-1402.
- **Odlum K. D., Blake T. J.** (1996) A comparison of analytical approaches for assessing freezing damage in black spruce using electrolyte leakage methods. *Canadian Journal of Botany*, 74: 952-958.
- **Oeller P. W., Miin-Wong L., Taylor L. P., Pike D. A., Theologis A.** (1991) Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254, 437-439.

- **Oksanen E., Häikiö E., Sober J., Karnosky D. F.** (2003) Ozone induced H₂O₂ accumulation in field-grown aspen and birch is linked to foliar ultrastructure and peroxisomal activity. *New Phytologist* 161: 791–799.
- **Okushima Y., Koizumi N., Kusano T., Sano H.** (2000) Secreted proteins of tobacco cultured by 2 cell: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*, 42: 479–488.
- **Op den Camp R. G., Przybyla D., Ochsenbein C. et al.** (2003) Rapid induction of distinct stress responses after release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15: 90–103.
- **Ormrod D. P., Beckerson D. W.** (1986) Polyamines as antioxidants for tomato. *Hort Science* 21: 1070–1071.
- **Orth R. A., Shellenberg J. A.** (1988) Origin, production and utilization of wheat. In: Wheat: chemistry and technology, vol. I, Y. Pomeranz (ed) *Am. Ass. Of Cereal Chem.*, St. Paul, pp. 1–14.
- **Örvar B. L., McPherson J., Ellis B. E.** (1997) Pre-activating wounding response in tobacco prior to high-level ozone exposure prevents necrotic injury. *Plant Journal* 11, 203–212.
- **Örvar B.L., Ellis B.E.** (1997) Transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for cytosolic ascorbate peroxidase show increased susceptibility to ozone injury. *Plant Journal*, 11(6): 1297–1305.
- **Örvar B.L., McPherson J., Ellis B.E.** (1997) Pre-activating wounding response in tobacco prior to high-level ozone exposure prevents necrotic injury. *Plant Journal* 11: 203–212.
- **Ouaked F., Rozhon W., Lecourieux D., Hirt H.** (2003) A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *EMBO Journal* 22: 1282–1288.
- **Overmyer K., Tuominen H., Kettunen R., Betz C., Langerbatels C., Sandermann H. Jr, Kangasjarvi J.** (2000) The ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathway in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell* 12, 1849–1862.
- **Overmyer K., Brosché M., Kangasjärvi J.** (2003) Reactive oxygen species and hormonal control of death cell. *Trends in Plant Science* 8, 335–342.
- **Overmyer K., Brosché M., Pellinen R., Kuittinen T., Tuominen H., Ahlfors R., Keinänen M., Saarma M., Scheel D., Kangasjarvi J.** (2005) Ozone-induced programmed cell death in the *Arabidopsis radical-induced cell death 1* mutant. *Plant Physiology*. In stampa.
- **Pandey S., Assmann S. M.** (2004) The *Arabidopsis* putative G-protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein α subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *Plant Cell* 16: 1616–1632.
- **Pasqualini S., Della Torre G., Ferranti F., Ederli L., Piccioni C., Reale L., Antonielli M.** (2002) Salicylic acid modulates ozone-induced hypersensitive cell death in tobacco plants. *Physiologia Plantarum* 115: 204–212.
- **Pasqualini S., Piccioni C., Reale L., Ederli L., Della Torre G., Ferranti F.** (2003) Ozone-induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiology* 133: 1122–1134.
- **Pathak G. N.** (1940) Studies in the cytology of cereal. *J. Genet.*, 39: 437–467.
- **Paul K. J., Thompson J. E.** (1981) Effects of in vitro treatment with ozone on the physical and chemical properties of membrane. *Physiol. Plant.*, 53 (3): 255–262.

- **Pei Z.-M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klüsener B., Allen G. J., Grill E., Schroeder J. I.** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406: 731–734.
- **Pell E. J., Schlagnhauser C. D., Arteca R. N.** (1997) Ozone-induced oxidative stress: mechanisms of action and reaction. *Physiologia Plantarum* 100, 264–273.
- **Pellinen R., Palva T., Kangasjärvi J.** (1999) Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *Plant Journal* 20: 349–356.
- **Pellinen R., Korhonen M., Palva T., Kangasjärvi J.** (2002) H₂O₂ activates cell death and defense gene expression in birch (*Betula pendula*). *Plant Physiology* 130: 549–560.
- **Podila G. K., Paolacci A. R., Badiani, M.** (2001) Antioxidants and foliar defense compounds. In *The Impact of Carbon Dioxide and Other Greenhouse Gases on Forest Ecosystems*, Vol. In press. (Eds, Karnosky, D. F., Scarascia-Mugnozza, G., Ceulemans, R. and Innes, J.). CABI Press.
- **Polle A., Wieser G., Hyranek W. M.** (1995) Quantification of ozone influx and apoplastic ascorbate content in needles of Norway spruce trees (*Picea abies* L., Karst) at high altitudes. *Plant Cell and Environment*, 18: 681–688.
- **Prasad T. K.** (1996) Mechanisms of chilling-induced stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids and protease activities. *Plant Journal*, 10: 1017–1026.
- **Preston E. M., Tingey D. T.,** (1998) The NCLAN program for crop loss assessment. In: W. W. Heck (ed); *Assessment of crop loss from air pollution*, Elsevier Applied Science Publishers, London. pp. 45–62.
- **Qin X., Zeevaart J. A.** (1999). The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 15354–15361.
- **Rabbani M A., Maruyama K., Abe H., Khan M.A., Katsura K., Ito Y., Yoshiwara K., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** (2003) Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiology*, 133: 1755–1767.
- **Rao M. V., Davis K. R.** (1999) Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *Plant Journal* 17, 603–617.
- **Rao M. V., Koch J. R., Davis K. R.** (2000a) Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants. *Plant Molecular Biology* 44, 345–358.
- **Rao M. V., Lee H. I., Creelman R. A., Mullet J. A., Davis K. R.** (2000b) Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *Plant Cell* 12, 1633–1646.
- **Rao M.V., Davis K. R.** (2001) The physiology of ozone-induced cell death. *Planta* 213; 682–690.
- **Rao M. V., Lee H. J., Davis K. R.** (2002) Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *Plant Journal* 32, 447–456.
- **Raskin I.** (1995) Salicylic acid. In *Plant Hormones Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd edn. (ed. P. J. Davies). pp. 188–205. Kluwer, Dordrecht, the Netherlands.

- **Reich P. B., Amundson R. G.** (1985) Ambient levels of ozone reduce net photosynthesis in tree and crop species. *Science*, 230: 566-570.
- **Reichenauer TG., Bolhàr-Nordenkamp HR., Ehrlich U., Soja G., Postl W., Halbwachs G.** (1997) The influence of ambient and elevated ozone concentrations on photosynthesis of *Populus nigra*. *Plant Cell and Environment* 20:1061-1069.
- **Reichenauer TG., Goodman BA., Kostecki P., Soja G.** (1998) Ozone sensitivity in *Triticum durum* and *T. aestivum* with respect to leaf injury, photosynthetic activity and free radical content. *Physiologia Plantarum* 104: 681-686.
- **Reichenauer TG., Goodman BA.** (2000) Stable free radicals in ozone-damaged wheat leaves. *Free Radical Research* 35: 93-101.
- **Ren D., Yang H., Zhang S.** (2002) Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 277; 559-565.
- **Rennenberg H., Polle A.** (1994b) Metabolic consequences of atmospheric sulphur influx into plants. In: Alscher R.G., Wellburn A. R. (eds): *Plant Responses to the Gaseous Environment*. Londra, Chapman & Hall. 165-180.
- **Rice-Evans C.** (1995) Plant polyphenols: freeradical scavengers or chain-breaking antioxidant? *Biochem. Soc. Symp.*, 61: 103-116.
- **Rice-Evans C., Sampson J., Bramley P. M., Holloway D. E.** (1997) Why do we expect carotenoids to be antioxidant in vivo. *Free Radical Res.*, 26: 381-398.
- **Richards B. L., Middleton J. T., Hewitt W. B.** (1958) Air pollution with relation to agronomic crops. V. Oxidant stipple of grape. *Agronomic Journal*, 50: 559-561.
- **Riechmann J. L., Heard J., Martin G., Reuber L., Jiang C. Z., Keddie J., Adam L., Pineda O., Ratcliffe J., Samaha R. R., Creelman R., Pilgrim M., et al.,** (2000) *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290: 2105-2110.
- **Riley R., Chapman V.** (1960) The D genome of hexaploid wheat. *Wheat Inform. Serv.* **11**: 18-19.
- **Roeckel-Drevet P., Gagne G., De Labrouhe D. T., Dufaure J. P., Nicolas P., Drevet J. R.** (1998) Molecular characterization, organ distribution and stress-mediated induction of two glutathione peroxidase encoding mRNAs in sunflower (*Helianthus annuus*). *Physiologia Plantarum*, 103: 385-394.
- **Roxas V. P., Smith R. K., Allen E. R., Allen R. D.** (1997) Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nature Biotechnol.*, 15: 988-991.
- **Runeckles V. C., Krupa S. V.** (1994) The impact of uv-b radiation and ozone on terrestrial vegetation. *Environmental Pollution*, 83: 191-213.
- **Ryerson T. B., Trainer M., Holloway J. S., Parrish D. D., Huey L. G., Sueper D. T., Frost G. J., Donnelly S. G., Schauffler S., Atlas L., et al.** (2001) Observation of ozone formation in power plant plumes and implications of ozone control strategies. *Nature*, 292 (5517): 719-723.
- **Sabeh F., Wright T., Norton S. J.** (1993) Purification and characterization of a glutathione peroxidase from *Aloe vera* plant. *Enz. Prot.*, 47: 92-98.
- **SAEFL (Swiss Agency for the Environment, Forest and Landscape)**, (1999) Critical levels for ozone- Level II. Environmental Documentation n. 115.

- **Sakamura T.** (1918) Kurze Mitteilung über die Chromosomenzahlen und die Verwandtschaftsverhältnisse der Triticum-Arten. *Bot. Mag. Tokyo*, 32: 151-154.
- **Samuel M.A., Miles G.P., Ellis B.E.** (2000) Ozone treatment rapidly activates MAP kinase signalling in plants. *Plant Journal* 22: 367–376.
- **Samuel M.A., Ellis B.E.** (2002) Double jeopardy: both overexpression and suppression of a redox-activated plant mitogen activated protein kinase render tobacco plants ozone sensitive. *Plant Cell* 14: 2059–2069.
- **Sandermann H.-Jr.** (1996) Ozone and plant health. *Annual Review of Phytopathology* 34: 347-366.
- **Sandermann H. Jr, Ernst D., Heller W., Langebartels C.** (1998) Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends in Plant Science* 3: 47–50.
- **Sandermann H., Matyssek R.** (2004). Scaling up from molecular to ecological processes. In *Molecular Ecotoxicology of Plants* (ed. Sandermann H.), pp. 207–226.
- **Sanmartin M., Drogoudi P.D., Lyons T., Pateraki I., Barnes J., Kanellis A.K.** (2003) Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta* 216: 918–928.
- **Sanz M. J., Catalyud V., Calvo E.** (1999) Spatial pattern of ozone injury in Aleppo pine related to air pollution dynamics in a coastal-mountain region of eastern Spain. *Environmental Pollution*, 108: 1-9.
- **Sanz M. J., Millán M. M.** (2000) Ozone in the Mediterranean region: evidence of injury to vegetation. Forest dynamics in heavily polluted region, 165-192.
- **Sax K., Sax J.** (1924) Chromosome behavior in a genus cross. *Genetics*, 9: 454-464.
- **Scandalios J. G.** (1997) Molecular genetics of superoxide dismutase in plants. In: Scandalios J. G. (eds): *Oxidative stress and molecular biology of antioxidant defense*. Cold Spring Harbor, CSHL Press. 527-568.
- **Scandalios J. G., Guan L., Polidoros A. N.** (1997) Catalase in plants: gene structure, properties, regulation and expression. In: Scandalios J. G. (ed): *Oxidative stress and molecular biology of antioxidant defense*. Cold Spring Harbor, CSHL Press. 343-406.
- **Schäfer H.J., Haag-Kerwer A., Rausch T.** (1998) cDNA cloning and expression analysis of genes encoding GSH synthesis in roots of the heavy metal accumulator *Brassica juncea* L: evidence for Cd induction of a putative mitochondrial-glutamylcysteine synthetase isoform. *Plant Mol Biol* 37: 87–97 (1998).
- **Scheel D.** (2002) Oxidative burst and the role of reactive oxygen species in plant-pathogen interactions. In: *Oxidative Stress in Plants*. (Inzé D., VanMontagu M. eds), Taylor and Francis, London, pp. 137-153.
- **Schenk P. M., Kazan K., Wilson I., Anderson J. P., Richmond T., Somerville S. C., Manners J. M.** (2000) Coordinated plant defense in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 97, 11655-11660.
- **Schinkel H., Streller S., Wingsle G.** (1998) Multiple forms of extracellular superoxide dismutase in needles, stem tissues and seedlings of Scots pine. *Journal of Experimental Botany*, 49: 931-936.
- **Schraudner M., Moeder W., Wiese C., van Camp W., Inzé D., Langerbatels C., Sandermann H. Jr** (1998) Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. *Plant Journal* 16, 235-245.

- **Schultz A.** (1913) Die geschichte der Kultivierten Getreide L. Neberts Verlag, Halle AD Salle.
- **Sedbrook J. C., Carroll, Hung K. F., Masson P. H., Somerville C. R.** (2002) The *Arabidopsis* SKU5 gene encodes an extracellular glycosyl phosphatidylinositol-anchored glycoprotein involved in directional root growth. *The Plant Cell*, 14: 1635-1648.
- **Sen Gupta A., Alscher R. G., Mc Cune D.** (1991) Response of photosynthetic and cellular antioxidant to ozone in *Populus* leaves. *Plant Physiology*, 96: 650-655.
- **Sharkey T. D., Loreto F.** (1993) Water stress, temperature, and light effects on the capacity for isoprene emission and photosynthesis of kudzu leaves. [*Biomedical and Life Sciences*](#) and [*Earth and Environmental Science*](#); volume 3, no. 95: 328-333.
- **Sharma Y.K., León J., Raskin I., Davis K.R.** (1996) Ozone induced responses in *Arabidopsis thaliana*: the role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 93: 5099–5104.
- **Shen B., Jensen R. G., Bohnert H. J.** (1997) Mannitol and function of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 229-235.
- **Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K.** (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal Experimental Botany*, 53: 1305-1319.
- **Slaymaker D. H., Navarre D. A., Clark D., del Pozo O., Martin G. B., Klessig D.F.** (2002) *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 99: 11640-11645.
- **Small I. D., Peeters N.** (2000) The PPR motif a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 25 (2): 46-47.
- **Smith I. K., Kendall A. C., Keys A. J., Turner J. C., Lea P. J.** (1984) Increased levels of glutathione in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science Letters*, 37: 29-33.
- **Smith W. H.** (1985) Polyamines. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 36: 117-143.
- **Smith M. W., Doolittle R. F.** (1992) A comparison of evolutionary rates of the two major kinds of superoxide dismutases. *Journal of Molecular Evolution*, 34: 175-184.
- **Smith T. F., Gaitatzes C., Saxena K., Neer E. J.** (1999) The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem. Sci.*, 24: 181-185.
- **Soja G., Soja A. M.** (1995) Ozone effects on dry matter partitioning and chlorophyll fluorescence during plant development of wheat. *Water, Air and Soil Pollution* 85: 1461-1466.
- **Spanu P., Grosskopf D. G., Felix G., Boller T.** (1994) The apparent turnover of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato cells is regulated by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Plant Physiology* 106, 529-535.
- **Stebbins G. L.** (1956) Taxonomy and the evolution of genera, with special reference to the family gramineae. *Evolution*, 10: 235-245.
- **Stern D. B., Hanson M. R., Barkan A.** (2004) Genetics and genomics of chloroplast biogenesis: maize as a model system. *Trends Plant Sci.*, 9: 293-301.

- **Storozhenko S., De Pauw P., Kushnir S., Van Montagu M., Inzé D.** (1996) Identification of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a HSP70-related protein belonging to the HSP110/SSE1 subfamily. *FEBS Letters*, 390: 113-118.
- **Stracke R., Weber M., Weisshaar B.** (2001) The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. P. Biol.* 4: 447-456.
- **Strand A., Asami T., Alonso J., Ecker J. R., Chory J.** (2003) Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX. *Nature*, 421: 79-83.
- **Sugimoto M., Furui S., Suzuki Y.** (1997) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from spinach. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61: 1379-1381.
- **Sugimoto K., Takeda S., Hirochika H.** (2000) MYB-related transcription factor NtMYB2 induced by wounding and elicitors is a regulator of the tobacco retrotransposon Tto1 and defense-related genes. *Plant Cell* 12: 2511-2527.
- **Suharsono U., Fujisawa Y., Kawasaki T., Iwasaki Y., Satoh H., Shimamoto K.** (2002) The heterotrimeric G protein α subunit acts upstream of the small GTPase Rac in disease resistance in rice. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 99: 13307-13312.
- **Takahashi M. A., Asada K.** (1983) Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 226: 558-566.
- **Tamaoki M., Matsuyama T., Kanna M., Nakajima N., Kubo A., Aono M., Saji H.** (2003a) Differential ozone sensitivity among *Arabidopsis* accessions and its relevance to ethylene synthesis. *Planta* 216, 552-560.
- **Tamaoki M., Nakajima N., Kubo A., Matsuyama T., Saji H.** (2003b) Transcriptome analysis of O₃-exposed *Arabidopsis* reveals that multiple signal pathways act mutually antagonistically to induce gene expression. *Plant Molecular Biology* 53, 443-456.
- **Tamaoki M., Matsuyama T., Nakajima N., Aono M., Kubo A., Saji H.** (2004) A method for diagnosis of plant environmental stresses by gene expression profiling using cDNA microarray. *Environmental Pollution* 131, 13-145.
- **Tatsuki M., Mori H.** (2001) Phosphorylation of tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylase synthase, *LE-ACS2*, at the C-terminal region. *Journal of Biological Chemistry* 276, 28051-28057.
- **Tingey D. T., Standley C., Field R. W.** (1976) Stress ethylene evolution: a measure of ozone effects on plants. *Atmospheric Environment* 10, 969-974.
- **Torsethaugen G., Pitcher L. H., Zilinskas B. A., Pell E. J.** (1997) Overproduction of ascorbate peroxidase in the tobacco chloroplast does not provide protection against ozone. *Plant Physiology*, 114: 529-537.
- **Torsethaugen G., Pell E. J., Assmann S. M.** (1999) Ozone inhibits guard cell K⁺ channels implicated in stomatal opening. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 96: 13577-13582.
- **Trewavas A. J.** (2000) Signal perception and transduction. In: Buchanan BBB, Gruissem W, Jones RL, eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Maryland: American Society of Plant Physiologists, 930-988.

- **Tuomainen J., Pellinen R., Roy S., Kiiskinen M., Eloranta T., Karjalainen R., Kangasjärvi J.** (1996) Ozone affects birch (*Betula pendula* Roth) phenylpropanoid, polyamine and active oxygen detoxifying pathways at biochemical and gene expression level. *J. Plant Physiol.* 148: 179-188.
- **Tuomainen J., Betz C., Kangasjärvi J., Ernst D., Yin Z. H., Langerbatels C., Sandermann H. Jr** (1997) Ozone induction of ethylene emission in tomato plants: regulation by differential transcript accumulation for the biosynthetic enzymes. *Plant Journal* 12, 1151-1162.
- **Tuominen H., Overmyer K., Keinänen M., Kollist H., Kangasjärvi J.** (2004) Mutual antagonism of ethylene and jasmonic acid regulates ozone-induced spreading cell death in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 39, 59-69.
- **Turner J. G., Ellis C., Devoto A.** (2002) The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*, 14: S153-S164.
- **UN-ECE Workshop Summary** (1996) In: Kärenlampi L., Skärby L. (eds) Critical levels for ozone in Europe: testing and finalizing the concepts. UN-ECE Workshop Report. University of Kuopio: 7-8.
- **UN/ECE** (1999) Trends in impacts of long-range transboundary air pollution. Technical Report prepared by the International Cooperative Programmes of the Working Group on Effects. NERC, UK, p. 81.
- **Velissariou D., Gimeno B., Badiani M., Fumagalli I., Davison A W.** (1996) Records of visible injury in the ECE Mediterranean region. In: Kärenlampi L., Skärby L. (Eds), Critical levels for ozone in Europe: testing and finalizing concepts. University of Kuopio, Kuopio, pp. 343-350.
- **Vichger K., Dardschbal B., Roos W.** (2002) Elicitor-activated phospholipase A2 generates lysophosphatidylcholines that mobilize the vacuolar H⁺ pool for pH signalling via activation of Na⁺-dependent proton fluxes. *Plant cell*, 14:1509-1525
- **Vahala J., Schlagnhauer C. D., Pell E. J.** (1998) H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance. *Trends in Plant Science* 3, 330-334.
- **Vahala J., Ruonala R., Keinänen M., Tuominen H., Kangasjärvi J.** (2003) Ethylene insensitivity modulates ozone-induced cell death in birch (*Betula pendula*). *Plant Physiology* 132, 185-195.
- **Vanacker H., Carver T. L. W., Foyer C. H.** (1998a) Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiology*, 117: 1103-1114.
- **Van Camp W., Van Montagu M., Inzé D.** (1998) H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance. *Trends in Plant Science* 3: 330-334.
- **Van Gestelen P., Asard H., Caubergs R. J.** (1997) Solubilisation and separation of a PM NAD(P)H O₂⁻ synthase from other NAD(P)H oxidoreductases. *Plant Physiology*, 115: 543-550.
- **Vannini C., Locatelli F., Bracale M., Magnani E., Marsoni M., Osnato M., Mattana M., Baldoni E., Coraggio I.** (2004) Over expression of the rice *Osmyb4* gene increases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants. *The Plant Journal*, 37: 115-127.
- **Vavilov N.** (1914) Immunity to fungous diseases as a physiological test in genetics and systematics, exemplified in cereals. *Jour. Genetics*, 4 : 49-65.
- **Vera-Estrella R., Higgins V. J., Blumwald E.** (1994) Plant defense response to fungal pathogens. II. G-protein-mediated changes in host PM redox reactions. *Plant Physiology*, 106: 97-102.
- **Viestra D.R.** (2003) The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trend in plant science*, vol. 8 No. 3.

- **Violini G., Maffi D., Conti G. G., Faoro F., Tornaghi R.** (1992) Damage by ambiente zone to bean leaves. Histological, histochemical and ultrastructural observation. *Rivista di Patologia Vegetale*, S.V., 2: 91-110.
- **Vitale E., Denecke J.** (1999). The endoplasmatic reticulum – gateway of the secretory pathway. *Plant Cell*, 11: 615–628.
- **Von Caemmerer S., Farquhar G. D.** (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta*, 153: 376-387.
- **Vranova E., Atichartpongkul S., Villarroel R., Van Montagu M., Inze D., Van Camp W.** (2002). Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99: 10870–18075.
- **Vranovà E., Inzé D., van Breusegem F.** (2002) Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1227-1236.
- **Wang X. Q., Ullah H., Jones A. M., Assmann S. M.** (2001) G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* 292: 2070–2072.
- **Wang K. L.-C., Li H., Ecker J. R.** (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks mediating responses to stress. *Plant Cell* 14, S131-S151.
- **Wang K., L.-C., Yoshida H., Lurin C., Ecker J. R.** (2004) Regulation to ethylene gas biosynthesis by the *Arabidopsis* *ETO1* protein. *Nature* 428, 945-950.
- **Weber H.** (2002) Fatty acid derived signals in plants. *Trend Plant Sci.*, 7: 217-224.
- **Wegener A., Gimbel W., Werner T., Hani J., Ernst D., Sandermann H.** (1997) Cloning of ozone-inducible protein from *Pinus sylvestris* with high sequence similarity to vertebrate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA -synthetase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1350: 247-52.
- **Weiss J.** (1935) Investigation on the radical HO₂ in solutions. *Trans Farad. Soc.*, 31: 247-252.
- **Wellburn A. R., Wellburn F. A. M.** (1997) Air pollution and free radical protection responses in plants. In 'Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses'. (Ed. JG Scandalios) pp. 861-876. (Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY).
- **Weston K.** (1999) Myb proteins in life, death and differentiation. *Curr Opin Genet Dev*, 8: 76–81.
- **Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C., van Montagu M., Inzé D., van Camp W.** (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defense in C₃ plants. *EMBO Journal*, 16: 4806-4816.
- **Wise R. R.** (1995) Chilling-enhanced photooxidation: the production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light. *Photosynth. Res.*, 45: 79-97.
- **Wohlgemuth H., Mittelstrass K., Kschieschan S., Bender J., Weigel H. J., Overmyer K., Kangasjarvi J., Langerbatels C., Sandermann H.** (2002) Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant, Cell and Environment* 25, 717-726.
- **Wojtaszek P.** (1997) Oxidative burst: and early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal*, 332: 861-892.

- **Wotawa A., Kromp-Kolb H.** (2000) The research project VOTALP-general objectives and main results. *Atmospheric Environment*, 34 (9): 1319-1322.
- **Xiang, C., Oliver D. J.** (1998) Glutathione metabolic Genes Coordinately Respond to Heavy Metals and Jasmonic Acid in Arabidopsis. *The Plant Cell* 10:1539-1550.
- **Xiong L., Yang Y.** (2003) Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 15: 745–759.
- **Yamasaki H., Sakihama Y., Ikehara N.** (1997) Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiology*, 115: 1405-1412.
- **Yang Z., Park H., Lacy G. H., Cramer C. L.** (1991) Differential activation of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes by wounding and pathogen challenge. *Plant Cell*. 3 (4): 397–405.
- **Yang K. Y., Liu Y., Zhang S.** (2001) Activation of a mitogen activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98: 741–746.
- **Yoon H. S., Lee H., Lee I. A., Kim K. Y., Jo J.** (2004) Molecular cloning of the monodehydroascorbate reductase gene from *Brassica campestris* and analysis of its mRNA level in response to oxidative stress. *Biochim. Biophys Acta*, **1658**: 181–186.
- **Yoshida K., Igarashi E., Mukai M., Hirata K., Miyamoto K.** (2003) Induction of tolerance to oxidative stress in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, by abscisic acid *Plant Cell Environ.* 26: 451-457.
- **Zhang S., Klessig D. F.** (1997) Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* 9: 809–824.
- **Zhang X., Zhang L., Dong F., Gao J., Galbraith D.W., Song C.-P.** (2001). Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiology* 126: 1438–1448.
- **Zhao J., Davies L. C., Verpoorte R.** (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23: 283-333.
- **Zhukovsky P. M.** (1928) A critical systematic survey of the species of the genus *Aegilops* L. *Bull. Appl. Bot. Genet. Plant Breed*, 18: 417- 609.
- **Ziegler J., Keinänen M., Baldwin I. T.** (2001) Herbivore-induced allene oxide synthase transcripts and jasmonic acid in *Nicotiana attenuata*. *Phytochemistry* 58: 729–738.