



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

***UNIVERSITÀ degli STUDI di ROMA “LA SAPIENZA”
DOTTORATO in SCIENZE ECOLOGICHE, XXIV CICLO***

**Effetto combinato di stress abiotici in specie della
macchia Mediterranea mediante studi di campo e in
condizioni semi-controllate.**

Candidata:

Dott.ssa Lina Fusaro

Tutors:

Prof. Fausto Manes

Dott. Simone Mereu

INDICE

Premessa: background e scopo della ricerca.

CAPITOLO I

Ecosistemi costieri in area mediterranea: rischi e prospettive di ricerca sulla vegetazione.

1.1 Caratteristiche ecologiche e stress presenti	8
1.2 Risposte delle specie mediterranee agli stress abiotici naturali ed antropici	11
1.2.1 Stress abiotici di origine naturale	11
1.2.2 Stress abiotici di origine antropica: Ozono troposferico	13
1.3 Stress abiotici prevalenti in zone costiere: i gap conoscitivi	16
1.3.1 Spray marino	
1.3.2 Salinità al suolo	17

CAPITOLO II

Approcci metodologici utilizzati per la valutazione della funzionalità fisiologica nei diversi casi di studio.

2.1 Adattamento, tolleranza e resistenza in un'ottica multistress	21
2.1.1 Stress abiotici: concetti generali	21
2.1.2 Interazione tra stress ossidativi	23
2.1.3 Specie mediterranee: resistenza o adattamento	24
2.2 Fluorescenza della clorofilla <i>a</i> (<i>Chl a</i>) come strumento per lo screening di stress ossidativi	25
2.2.1. Struttura del PSII e principi della fluorescenza	26
2.2.2. Misurazione della fluorescenza modulata	30
2.2.3. Misurazione della fluorescenza della <i>Chl a</i> utilizzando il test OJIP	31
2.3 Respirazione fogliare	36
2.3.1 "What is respiration?"	36
2.3.2 Caratterizzazione della risposta della respirazione alla temperatura	38

CAPITOLO III

Effetti dello spray marino, dell'ozono troposferico e della loro interazione sugli scambi gassosi e la funzionalità dei fotosistemi in due specie della macchia mediterranea. 42, Appendice I

CAPITOLO IV

Ozono e salinità al suolo: meccanismi d'interazione, effetti sulla performance fotosintetica e aggiustamenti biochimici in due specie della macchia mediterranea. 44

CAPITOLO V

Variazione stagionale in Q_{10} e nella respirazione basale in ecosistemi costieri: i modelli di respirazione sono utilizzabili per la vegetazione sempreverde mediterranea? 80

CONCLUSIONI GENERALI

Specie di macchia mediterranea in ecosistemi costieri: resistenza e vulnerabilità. 103

GRAZIE a...

106

Bibliografia

107

Appendice I

Mereu S., Gerosa G., Marzuoli R., **Fusaro L.**, Salvatori E., Finco A., Spano D., Manes F., 2011. Gas exchange and JIP-test parameters of two Mediterranean maquis species are affected by sea spray and ozone interaction. *Environmental and Experimental Botany* 73, 80-88.

Appendice II

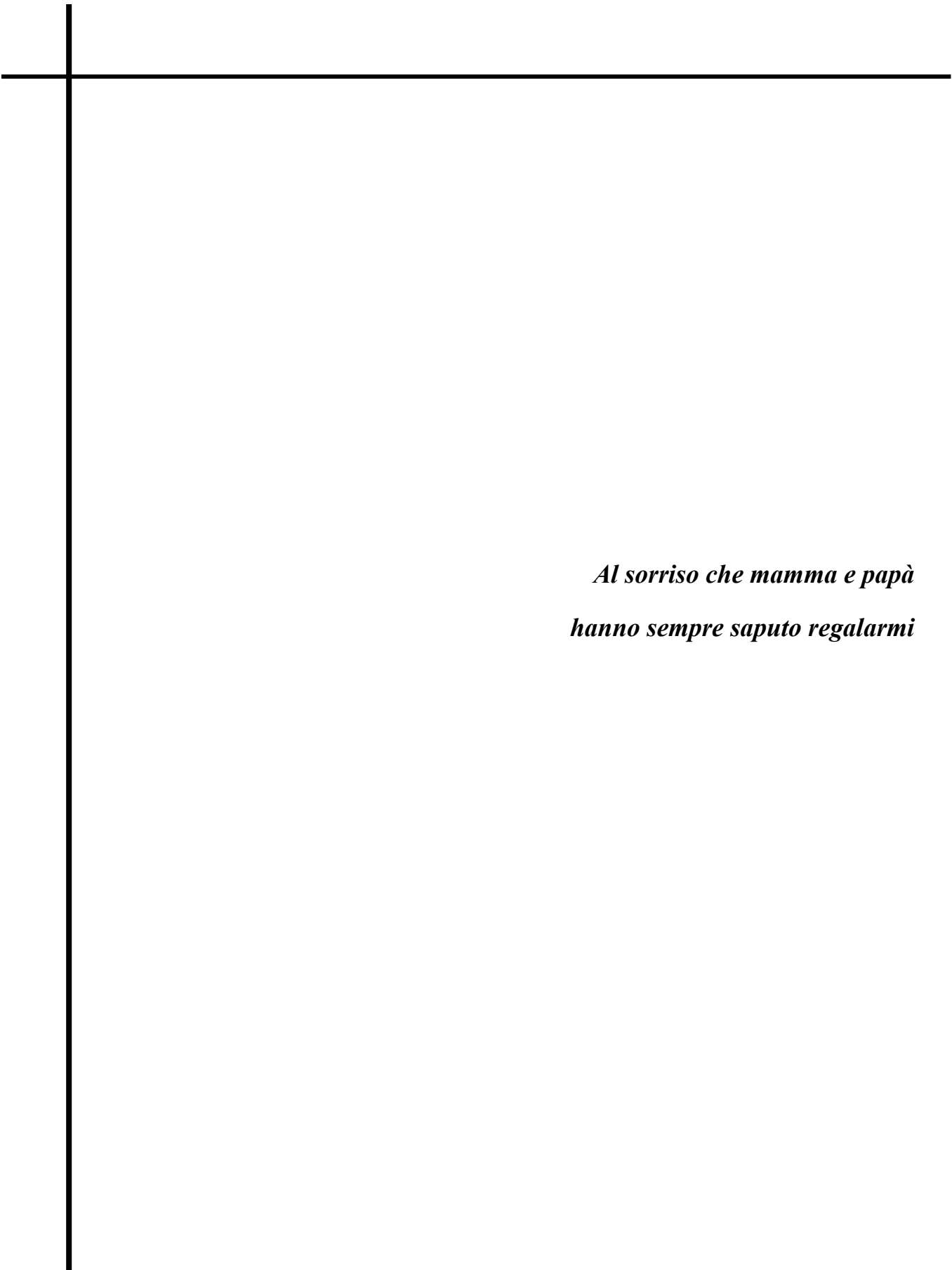
Mereu, S., Salvatori, E., **Fusaro, L.**, Gerosa, G., Muys, B., and Manes, F., 2009. A whole plant approach to evaluate the water use of mediterranean maquis species in a coastal dune ecosystem *Biogeosciences*, 6, 1713–1746.

Appendice III

Bussotti F., Pollastrini M., Cascio C., Desotgiu R., Gerosa G., Marzuoli R., Nali C., Lorenzini G., Pellegrini E., Carucci M. G., Salvatori E., **Fusaro L.**, Piccotto M., Malaspina P., Manfredi A., Roccotello E., Toscano S., Gottardini E., Cristofori A., Fini A., Weber D., Baldassarre V., Barbanti L., Montil A. and Strasser Reto J. 2011. Conclusive remarks. Reliability and comparability of chlorophyll fluorescence data from several field teams. *Environmental and Experimental Botany*, 73, 116-119.

Appendice IV

Mereu S., Gerosa G., Finco A., **Fusaro L.**, Muys B., and Manes F., 2009. Improved sapflow methodology reveals considerable night-time ozone uptake by Mediterranean species. *Biogeosciences*, 6, 3151–3162.



*Al sorriso che mamma e papà
hanno sempre saputo regalarmi*

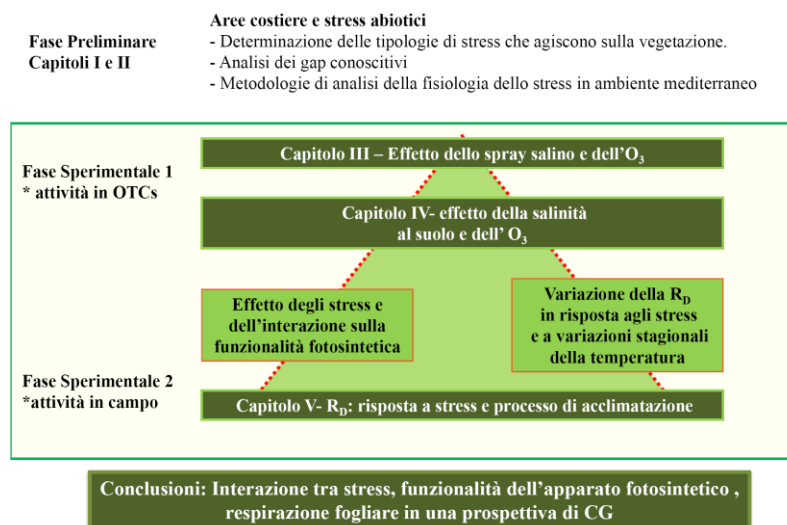
Premessa:background e scopo della ricerca

Gli ecosistemi a macchia nel Bacino del Mediterraneo, costituiscono la vegetazione preferenziale di aree in cui sono presenti condizioni limitanti determinate sia da dinamiche storico-colturali (pascolo, incendi), sia ecologiche (scarse precipitazioni, suoli poveri di nutrienti). Le specie presenti in tali ecosistemi sviluppano adattamenti fisiologici e strutturali tali da resistere a periodi di stress a cui tali ambienti sono soggetti (stress idrico, alte temperature ed irradianze). Si tratta di ecosistemi che sono distribuiti in aree dove si riscontra la maggiore densità di popolazione e che sono sottoposti anche da stress di origine antropica. Nei prossimi decenni soprattutto le aree costiere saranno al centro d'importanti variazioni nella disponibilità e qualità delle risorse: la diminuzione delle precipitazioni, l'incremento del livello medio del mare, l'avanzamento del cuneo salino, l'intensificarsi degli eventi estremi con conseguente aumento delle deposizioni di spray marino sulla vegetazione e sul suolo, sono tra questi. La popolazione nelle aree costiere è destinata ad aumentare e con essa anche il livello di esposizione della vegetazione ad inquinanti. L'azione fitotossica di quest'ultimi, potrebbe destabilizzare o diminuire l'efficienza con cui le specie presenti fanno fronte agli stress naturali a cui sono adattate. La combinazione di questi scenari fa emergere che per salvaguardare la funzionalità, il naturale accrescimento e mantenimento degli ecosistemi mediterranei a macchia nelle fasce costiere, bisogna comprendere l'effetto che i fattori di stress prospettati, interagendo, possano avere. La regolazione del funzionamento dell'apparato fotosintetico, della fase luminosa e del bilancio tra processi anabolici e catabolici è alla base di molti adattamenti fisiologici e, avendo questi inevitabili conseguenze sulla produttività, anche di adattamenti strutturali. Una questione ancora aperta è quella di determinare se i meccanismi che conferiscono tolleranza alle specie mediterranee costituiscono la base per la resistenza in una condizione di multistress, o se la resilienza che i tratti funzionali tipici di questa tipologia di vegetazione conferisce, possa determinare invece un'incapacità di far fronte al mutamento delle condizioni esterne. Tali riflessioni hanno costituito il background di questa tesi di dottorato nella quale un elemento essenziale per sviluppare gli obiettivi sperimentali è stato quello di adottare un approccio integrato che affiancasse esperimenti in condizioni controllate, in cui testare singole ipotesi sperimentali, ad un lavoro in condizioni naturali, in cui approfondire quanto la variabilità ambientale influisce sui processi funzionali.

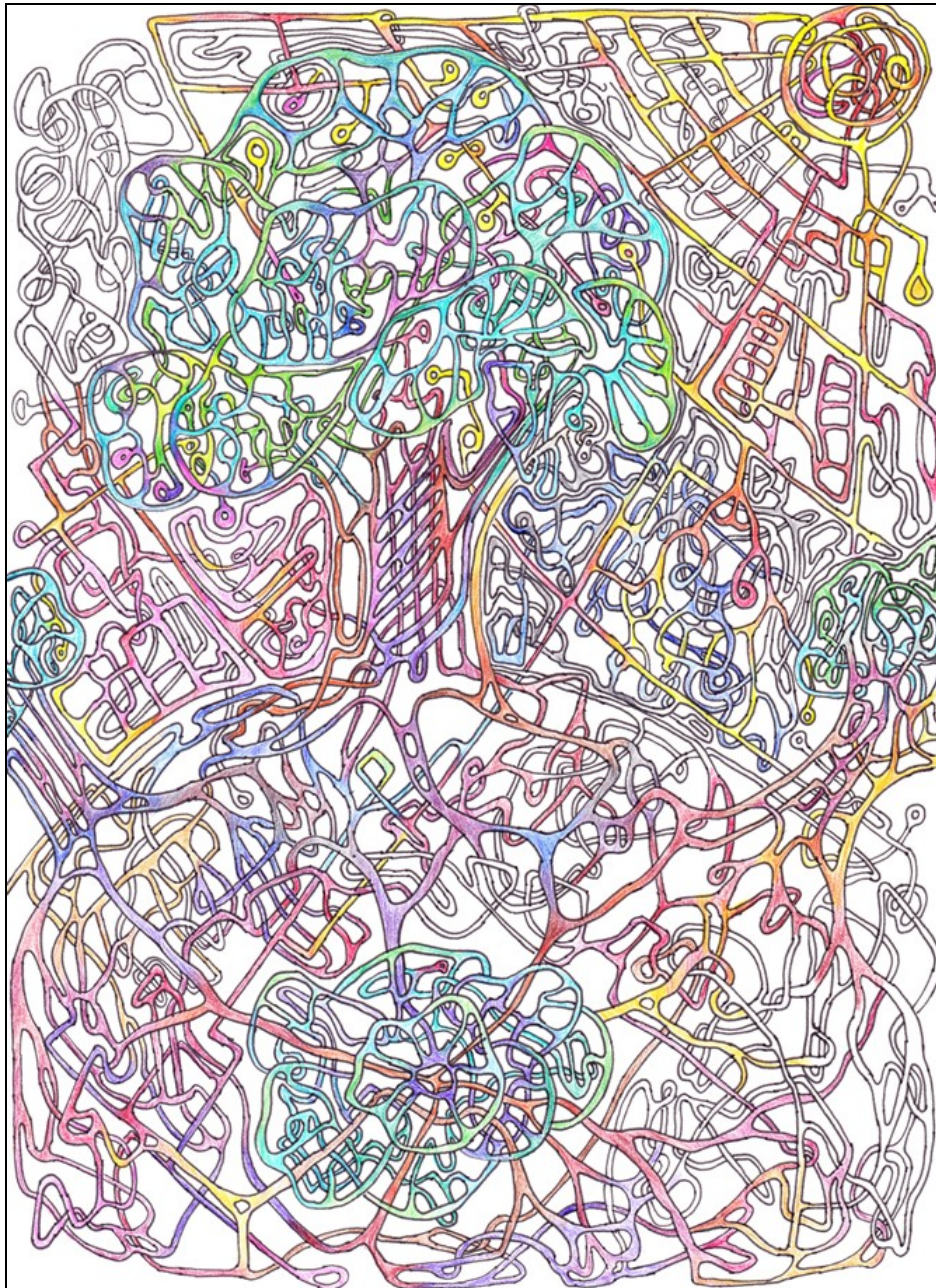
Premessa: background e scopo della ricerca

Gli obiettivi generali di questa tesi di dottorato riguardano lo studio di come le specie sempreverdi mediterranee rispondono all'interazione tra stress di natura ossidativa, ponendo attenzione al ruolo che il funzionamento dell'apparato fotosintetico ha nel modulare i meccanismi di risposta e come il bilancio tra processi anabolici e catabolici cambia in funzione dei diversi stress ossidativi.

Per raggiungere tali obiettivi si è partiti dalla determinazione di quali tipologie di stress agiscono in modo importante sulla vegetazione di costa nelle aree mediterranee (Appendice II). Tra questi si sono considerati i fattori per cui sono presenti i maggiori gap conoscitivi (Capitolo II) ed è stato studiato come questi stress agiscono sulla performance funzionale delle specie sempreverdi attraverso esperimenti in condizioni controllate (Appendice I e Capitolo IV), in cui particolare attenzione è stata data all'effetto che l'interazione tra stress ossidativi naturali (spray marino e salinità al suolo), e di origine antropica (ozono troposferico) hanno sull'apparato fotosintetico. Dalle attività svolte, individuando nella respirazione fogliare uno dei processi chiave nella comprensione delle potenzialità di accrescimento e della funzionalità della vegetazione, si è affrontato lo studio di questo processo in condizioni naturali con l'obiettivo di indagare se gli assunti alla base dei modelli di respirazione, e quindi di produttività, siano validi anche per specie sempreverdi presenti in ambienti soggetti ad un alto carico ossidativo come quelli costieri mediterranei (Capitolo V).



Schema generale della tesi.



CAPITOLO I

Ecosistemi costieri in area mediterranea: rischi e prospettive di ricerca sulla vegetazione.

1.1 Caratteristiche ecologiche e stress presenti

Gli ecosistemi costieri sono multifunzionali (Van der Meulen e Udo de Haes 1996), rivestono cioè notevole importanza sia per gli ecosistemi marini che per quelli terrestri, ed il loro valore in termini di “servizi ecosistemici” forniti all’uomo, è pari al 40% del valore complessivo dei servizi ambientali del nostro pianeta (Costanza et al. 1997). Le zone costiere sono aree ecotonali (Walker et al. 2003) in cui l’interazione tra la componente marina e quella terrestre si presenta sotto forma di complessi sistemi ecologici costituiti da componenti biotiche e abiotiche, in cui comunità animali, vegetali ed umane interagiscono. L’ambiente costiero rappresenta un sistema articolato e complesso nel quale, in una stretta fascia di territorio, s’instaurano forti gradienti ambientali in funzione della distanza dalla linea di costa. Ad un suolo sabbioso povero di nutrienti e con una scarsa capacità di ritenzione idrica, si accompagna il disturbo esercitato dai venti salmastri che hanno un’azione meccanica sulla vegetazione e che determinano un’importante deposizione di sale al suolo. Le variazioni ambientali presenti in aree costiere influenzano la sopravvivenza e la struttura della comunità (Maun, 1994). La struttura tipicamente presente è costituita da comunità pioniere situate vicino alla battigia e, procedendo verso l’interno, altre fitocenosi che caratterizzano le dune e le loro retrovie (Fig. 1.1). In quest’ambiente di transizione, altamente dinamico, sono moltissimi i fattori che contribuiscono alla sua morfologia ed evoluzione, ma anche quelli che possono rendere ancor più limitanti le condizioni in cui si va a trovare la vegetazione durante le estati mediterranee, caratterizzate da alti livelli d’irradianza e temperatura, concomitanti a periodi di aridità. Se in molte aree costiere è presente una falda a cui le specie accedono con poderosi apparati radicali (Goulden, 1996), risorsa che soprattutto negli ultimi anni è stata messa a rischio a causa dell’eccessivo emungimento della falda dovuto all’intensificarsi delle attività agricole e all’aumento della popolazione nelle aree costiere. L’abbassamento della falda sta inoltre determinando un aumento del fenomeno di intrusione dell’acqua marina. Questa problematica potrebbe acuirsi nei prossimi decenni dato che il Bacino del Mediterraneo con i suoi 46.000 km di costa (Vogiatzakis et al., 2005) soffre di una crescente pressione imputabile alla presenza di molte grandi città, e della loro rete di infrastrutture

legate alla viabilità (strade, porti), alla produzione industriale, o al flusso turistico. Si stima che il 50-70% della popolazione nei paesi del Mediterraneo vive entro 60 km dalla costa e questa proporzione è in aumento (Caffyn et al., 2002). La crescita urbana e lo sviluppo turistico sono aumentati in un breve lasso di tempo, sostanzialmente gli ultimi quattro decenni e sono responsabili di un'elevata perdita di biodiversità e di habitat di grande valore ecologico. Questo è avvenuto in molte località del Mediterraneo, dove aree di grande interesse sono state ridotte a "patch" frammentati in una matrice ambientale degradata, che risente negativamente del cambiamento di uso del suolo. L'aumento delle pressioni ambientali determina variazioni dello stato funzionale della vegetazione costiera e della tipologia di specie presenti in alcune aree. Ad esempio le ampie foreste costiere di specie aghiformi sempreverdi hanno subito un lento ed inesorabile degrado anche a causa dell'impatto dell'inquinamento (Gellini et al., 1983).



Fig. 1.1- Schema di una costa bassa sabbiosa in assenza di fattori di disturbo. In alto, presentato l'orientamento dei principali gradienti ambientali e, in basso, la tipica zonazione delle comunità vegetali che si dispongono lungo tali gradienti in ragione dei particolari adattamenti e specializzazioni proprie delle specie di ciascuna fitocenosi (disegno di A. Merante, da Acosta e Izzi 2007).

Nel bacino del Mediterraneo, il declino della vegetazione costiera registrato nei primi anni 80, è stato principalmente attribuito alla presenza di tensioattivi sintetici nell'acqua di mare (Gellini et al., 1985; Guidi et al., 1988; Bussotti et al., 1995, 1997; Grossoni et al., 1998; Paoletti et al., 2001; El Ayeb et al., 2004). Questi, portati in contatto con la

vegetazione tramite l'aerosol, danneggiano sia le strutture protettive (cere e tricomi) che le cellule stomatiche, aumentando l'assorbimento fogliare del sale marino. Come visto da esperimenti successivi svolti ad indagare le cause del deperimento della vegetazione costiera, lo spray marino causa di per sé danni all'apparato fotosintetico (Diamantopoulos et al., 2001; Sanchez - Blanco et al., 2003, 2004; Mereu et al., 2011), ed è stato un possibile corresponsabile della perdita di funzionalità e biomassa delle pinete costiere. In molte di queste aree degradate si sono diffuse conformazioni a macchia mediterranea, soprattutto nella forma di gariga, dove specie sempreverdi maggiormente resistenti a condizioni limitanti, sopravvivono in forma arbustiva. In Italia, le conformazioni a macchia coprono il 2-3% del territorio (INFC, 2003) ed è composta principalmente da arbusti sempreverdi, che hanno un ruolo sostanziale nella protezione delle cenosi interne dai venti salmastri. L'espansione della popolazione ha già avuto un notevole influsso negativo su questa tipologia di vegetazione a causa d'incendi frequenti e della pressione dovuta al pascolo. Altre pressioni si sono intensificate negli ultimi anni con l'introduzione di specie aliene (Vogiatzakis et al., 2005; Di Castri et al 1990), e con l'aumento di inquinanti ad azione fotochimica, la cui concentrazione aumenta nei periodi estivi in cui la vegetazione mediterranea è già, come detto in precedenza, soggetta a numerosi stress. Tra questi inquinanti ad azione fitotossica, l'ozono troposferico (O₃), è un importante agente con azione ossidante i cui livelli costituiscono una minaccia per la vegetazione costiera soprattutto nelle zone limitrofe ai centri urbani anche a causa della dinamica di circolazione delle masse d'aria (i regimi di brezza) presenti in tali aree (Gerosa et al., 2005; Gerosa et al., 2009a), ma anche per l'intenso traffico veicolare che è responsabile dell'emissione di precursori dell'ozono (Keuken et al., 2009). Negli ultimi decenni si è registrato un nuovo aumento delle concentrazioni di ozono nell'emisfero settentrionale, associato con un cambiamento negli andamenti stagionali e nei picchi giornalieri. Mentre dal 1980, come conseguenza di una politica di riduzione delle emissioni dei precursori, nell'Europa occidentale si era verificata una diminuzione dei picchi, negli ultimi anni questi sono ripresi a salire (Jenkin, 2008; Lefohn et al., 2008). Questo fenomeno può essere attribuito all'assenza di una regolamentazione per l'emissione di precursori nei paesi emergenti come Cina e India, che sta contribuendo a far aumentare i livelli di fondo anche in altre zone del mondo come Nord America (Cooper et al., 2010). In questo ambito l'area mediterranea è tra quelle più esposte ad una ripresa dell'aumento delle concentrazioni di ozono dato che presenta condizioni climatiche (alte temperature ed

irradianza, lunghi periodi di alta pressione e conseguente stabilità atmosferica) che, aumentando i precursori, favoriscono la formazione di O₃, portando ad un aumento sia in termini di picchi estivi, sia di livelli medi (Meleux et al., 2007). Anche guardando agli scenari che prendono in considerazione le variazioni delle condizioni ambientali dovute ai cambiamenti climatici, le aree costiere sono tra quelle che maggiormente potranno essere impattate. Ad esempio il ciclo dell'acqua sarà alterato dalla combinazione tra aumento delle temperature nei mesi estivi, alterazione del pattern delle precipitazioni nei mesi primaverili (Giorgi e Lionello, 2008), e dell'innalzamento del livello del mare (Tsimplis et al., 2008). Quest'ultima variazione può comportare una maggiore ingerenza dell'acqua marina nell'idrologia del suolo con inevitabili conseguenze sulla funzionalità della vegetazione costiera (Da Selveira et al., 1987; Williams et al., 1999; Williams et al., 2003; Greaver et al., 2006). In questo quadro, le domande ancora aperte per meglio indagare gli effetti che la complessa situazione ecologica delineata ha sulla vegetazione costiera, riguardano le conseguenze che queste variazioni hanno sulla capacità di adattamento e sulle strategie di risposta ai singoli stress, ma soprattutto la comprensione di come le specie mediterranee rispondono a condizioni di multistress.

1.2 Risposte delle specie mediterranee agli stress abiotici naturali ed antropici

Gli studi effettuati su specie mediterranee si sono focalizzati sulla comprensione dell'effetto di quei fattori come lo stress idrico e l'ampia variabilità annuale nelle temperature (stress termico invernale ed alte temperature estive, Filella et al., 1998; Larcher, 2000, Ogaya e Peñuelas, 2006; Ogaya et al., 2011 e referenze all'interno) che maggiormente influiscono sullo stato complessivo della vegetazione direzionando adattamenti e strategie di risposta. Tra gli stress di origine antropica attenzione è stata data all'ozono (O₃) troposferico.

1.2.1 Stress abiotici di origine naturale

In generale da esperimenti in condizioni controllate su plantule di specie sempreverdi mediterranee è emerso che la combinazione degli aggiustamenti che queste specie mettono in atto è il risultato di complesse interdipendenze tra una strategia conservativa

(Terradas et al., 1992), di un aumento dell'efficienza nell'uso delle risorse (H_2O , nutrienti, radiazione, Mediavilla et al., 2001), e il mantenimento di un tasso di produttività tale da sostenere il costo metabolico dei processi di adattamento e riparazione (Valladares et al., 2000). Gli aggiustamenti funzionali in risposta agli stress abiotici avvengono su più livelli: biochimico, fotochimico e fotosintetico. Tuttavia soprattutto in condizioni di stress idrico le risposte e gli aggiustamenti avvengono anche al livello strutturale. Si possono avere variazioni nella biomassa totale, nel tasso di crescita relativo, nella struttura dell'apparato di conduzione e nei pattern di allocazione, che comportano un cambiamento nei rapporti allometrici (area fogliare/area conduttrice o superficie radicale) (Corcuera et al., 2004). La perdita di biomassa identifica una sensibilità o il superamento della soglia critica per un determinato stress, mentre la variazione dei pattern di allocazione nei diversi comparti, individua lo sviluppo di strategie specifiche per mantenere alto il funzionamento complessivo. Ad esempio in risposta allo stress idrico, le piante tendono ad allocare assimilati nell'accrescimento dell'apparato radicale, per aumentare l'uptake di acqua e nutrienti, diminuire la superficie traspirante, o combinare questi adattamenti per avere a disposizione, per unità di superficie fogliare, una quantità di acqua maggiore (Mencuccini, 2003). Un ruolo cruciale lo riveste anche l'aumento della sclerofillia, o dello spessore delle cere epicuticolari. Anche regolazioni a livello biochimico, come l'aumento di tannini e la modulazione della produzione e dell'accumulo di carboidrati solubili (amido e zuccheri) possono partecipare nella risposta all'aridità (Bussotti et al., 2002a). La possibilità di attuare aggiustamenti strutturali è però diretta conseguenza del bilancio del carbonio che può essere inficiato dal verificarsi di limitazioni stomatiche e non stomatiche della fotosintesi (P_n) (McDowell et al., 2008). La riduzione di CO_2 che diffonde ai siti di carbossilazione, dipende dalla chiusura degli stomi, che a sua volta è legata allo stato idrico percepito al livello radicale e alle condizioni atmosferiche (alti livelli di differenza di vapor acqueo, Domec et al., 2009), e dalla riduzione della conduttanza del mesofillo, elemento che solo recentemente è stato riconosciuto come un fattore decisivo nella riduzione della P_n in condizioni di stress idrico o salinità al suolo (Centritto et al., 2003). La P_n può essere però limitata anche per cause biochimiche. Infatti, la presenza di uno stress può danneggiare direttamente la funzionalità enzimatica, sia come conseguenza di una "down-regulation" dovuta alla diminuzione della CO_2 ai siti di carbossilazione (Chaves et al., 2003; 2009), sia per l'aumento di processi alternativi della Rubisco (fotorespirazione, Fleck et al., 2010). Le strategie adottate dipendono anche dall'equilibrio

tra assimilazione e respirazione (Lambers et al., 2005; Flexas et al., 2002). In particolare la respirazione (R_D) può influenzare la produttività quando la fotosintesi è depressa, come avviene in condizioni di siccità (Lawlor e Cornic, 2002; Atkin e Macherel, 2009). Il ruolo che la R_D gioca nella risposta agli stress non è chiaro a causa della grande variabilità nelle risposte osservate: in generale, il tasso di respirazione diminuisce durante stress idrico, a causa della ridotta assimilazione e della diminuzione del tasso metabolico (Rodríguez-Calcerrada et al., 2009). Tuttavia, questo comportamento può non essere valido in specie che aumentano il loro tasso metabolico per alimentare processi di riparazione, o per stress idrici intensi (Ghashghaie et al., 2001; Flexas et al., 2005). La limitazione stomatica è una delle risposte più frequenti che occorrono nei periodi di aridità. In queste condizioni la radiazione utile a saturare il processo di fotosintesi diminuisce (Demmig-Adams e Adams 1996). Sono così innescati meccanismi di fotoprotezione che servono a dissipare l'energia in eccesso in forma di calore (Muller et al., 2006; Demmig-Adams e Adams, 2006; Peguero-Pina et al., 2009) ed evitare la formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Foyer et al., 1994) tramite l'accumulo delle forme de-epossidate del pool delle xantofille che accettano elettroni direttamente dalla clorofilla (*Chl*) eccitata. Gli studi effettuati in condizioni di campo hanno confermato quanto visto in condizioni controllate sebbene l'entità delle risposte agli stress sia di entità differente, e i pattern di risposta ai singoli stress meno determinabili a causa della co-presenza di stress in tali condizioni.

1.2.2 Stress abiotici di origine antropica: Ozono troposferico

Mentre vi è ampia letteratura sugli effetti dell'ozono sulle specie latifoglie decidue, le informazioni per arbusti sempreverdi a foglia espansa sono ancora scarse (Vitale et al., 2008; Paoletti et al., 2009), aumentando le incertezze nella definizione dei livelli di O_3 critici per queste specie (Ribas et al., 2005b). Il livello critico per un inquinante è definito come la concentrazione, l'esposizione cumulata o il flusso stomatico cumulato di quell'inquinante, sopra cui possono verificarsi, effetti dannosi su specie vegetali sensibili, secondo le conoscenze attuali (UNECE, 2004). Questi livelli critici servono da riferimento nello sviluppo delle politiche per abbattere l'inquinamento atmosferico, e per identificare, attraverso la realizzazione di mappe delle eccedenze dei livelli di O_3 misurati o modellati le aree che possono definirsi a rischio (De Marco, 2009; Mills et al., 2011). I livelli critici basati sulle concentrazioni utilizzano come indice di esposizione il parametro AOTX, un "indice di esposizione" di tipo cumulativo (Fuhrer e Achermann, 1994), corrispondente

alla somma delle concentrazioni orarie di O₃ sopra la soglia di X ppb durante le ore di luce, quando la radiazione solare è maggiore di 50 Wm⁻². In genere viene utilizzata la soglia dei 40 ppb, in base alla quale si definisce l'AOT40, (AOT40 = $\sum ([O_3]_i - 40)$; con $[O_3]_i > 40$ ppb). L'AOT40 viene calcolato su un periodo di tre mesi per le specie agricole e semi-naturali e su un periodo di sei mesi per le foreste. Numerosi studi dimostrano che non esiste un indice di esposizione che in assoluto sia il migliore per tutte le specie vegetali, ma si può sicuramente affermare che i picchi di concentrazione sono più importanti delle medie nel determinare la risposta delle piante all'azione degli inquinanti. Da qui l'utilizzo di un parametro cumulativo come l'AOT40 invece delle medie orarie o giornaliere previste dalla legislazione precedentemente in vigore. Attualmente la soglia critica per le foreste è di 6.000 ppb h, raggiunti nei mesi di attività vegetativa.

Da osservazioni in campo su specie mediterranee non sono stati evidenziati sintomi visibili imputabili all'O₃ (Bussotti e Gerosa, 2002b; Bussotti et al., 2006, Paoletti et al., 2006). Attraverso un lavoro di meta-analisi (Bussotti, 2008) è stato dimostrato come le caratteristiche che definiscono il gruppo funzionale delle sempreverdi mediterranee (sclerofillia, efficienza dell'uso dell'H₂O, elevata densità e spessore fogliare) siano un elemento essenziale che conferisce a queste specie la resistenza all'ozono, che rappresenta così un co-fattore di stress, più che la causa diretta della perdita di funzionalità degli ecosistemi mediterranei. Infatti mentre in Nord America diversi studi hanno riportato casi di gravi danni causati dall'ozono per specie come *Populus tremuloides* Michx. e diverse pinacee (Karnosky et al., 2005, 2007), in Europa i sintomi dello stress da ozono sono stati segnalati su diverse specie legnose ed erbacee in condizioni naturali e semi-controllate (Manes et al., 2005; Bussotti et al., 2005; Karlsson et al., 2006; Manes et al., 2007;) ma non sono stati segnalati casi reali di deperimento forestale attribuibile all'ozono. Nonostante la mancanza di sintomi, dovuta ad efficienti meccanismi di difesa innescati al livello fisiologico (Manes et al., 1998; Manes et al., 2001) e biochimico che queste specie sviluppano in risposta a stress ossidativi (Nali et al., 2004; Elvira et al., 2004), da numerosi studi effettuati in condizioni controllate è stato evidenziato come esposizioni prolungate ad alti livelli di ozono possano aumentare la vulnerabilità della vegetazione ad altri stress abiotici (stress idrico) o biotici (parassiti e infezioni). Dato che tra le centinaia di studi disponibili riguardanti gli effetti dell'O₃ sulla biomassa e sulla fisiologia, solo poche decine sono dedicate a specie mediterranee, la validità delle relazioni trovate per le

specie decidue o sempreverdi dei climi temperati, potrebbero non essere valide per questa tipologia vegetazionale. A confondere la situazione c'è il fatto che le risposte osservate, derivanti da una grande varietà di condizioni sperimentali, sono spesso tra loro contrastanti e rendono difficile una sintesi quantitativa della letteratura (Wittig et al., 2009). Tuttavia dalle evidenze che sono trasversalmente emerse dagli esperimenti svolti, l'effetto dell'ozono sulle piante dipende dalla dose dell'inquinante, in termini di durata dell'esposizione e concentrazione, dal flusso reale di ozono in entrata all'interno della foglia (Musselman et al., 2006; Matyssek et al., 2006), e dal bilancio tra il flusso di inquinante in entrata e il funzionamento dei meccanismi di difesa per far fronte allo stress ossidativo (Castagna e Ranieri, 2009). Pertanto, al fine di comprendere meglio come l'O₃ influisce sulla vegetazione sono stati svolti studi incentrati sulla risposta degli scambi gassosi (conduttanza stomatica e assimilazione), sul funzionamento dei fotosistemi e su aspetti biochimici per comprendere se la resistenza o sensibilità all'ozono dipendesse da differenze nei pools costitutivi dei sistemi antiossidanti, o nella capacità di rigenerazione di questi ultimi.

Effetti dell'O₃ sulla biomassa sono il risultato di vari processi che occorrono a livello cellulare e fisiologico. L'accelerazione della senescenza fogliare è stata ampiamente segnalata come uno dei processi più caratteristici derivati dall'esposizione ad ozono (Ribas et al., 2005b). Questi processi implicano la degradazione della clorofilla e la riduzione del tasso di assimilazione (Elvira et al., 1998; Zheng et al., 2002). Le limitazioni alla fotosintesi in specie mediterranee sono dovute più a limitazioni di natura stomatica che enzimatica (danni a carico della Rubisco). L'effetto che in presenza di O₃ è stato principalmente riscontrato è stato quello dell'aumento della traspirazione, portando ad ipotizzare che il meccanismo principale del danno da O₃ in specie mediterranee, è rappresentato dalla perdita di controllo stomatico con inevitabili effetti sul bilancio idrico di queste specie (Paoletti, 2005). Analizzando in generale gli effetti dell'O₃ sulla fotochimica primaria, è emersa la presenza di "patterns" di risposte generalizzabili (Bussotti et al., 2011). Nelle specie mediterranee studiate emerge la presenza di una risposta attiva all'ozono che comporta un aumento della performance complessiva nelle prime fasi di esposizione (Bussotti et al., 2007). Tra le altre variazioni osservate è presente l'aumento dell'energia dissipata per via non fotochimica, e un effetto sul funzionamento del PSI (Bussotti et al., 2011); questo mette in luce come le risposte all'ozono ricalcano quanto visto per molti stress ossidativi.

1.3 Stress abiotici prevalenti in zone costiere: i gap conoscitivi

Nelle aree costiere oltre agli stress abiotici costitutivi dell'area mediterranea, lo spray marino e la salinità al suolo possono giocare un ruolo importante nella risposta che le specie mediterranee potranno sviluppare all'aumentare delle pressioni ambientali, dovute all'aumento della variabilità climatica, e a pressioni di origine antropica. Ci sono molti gap conoscitivi che riguardano come questi due fattori possono condizionarne la funzionalità di specie sempreverdi della macchia mediterranea presenti in ambienti in cui diverse tipologie di stress interagiscono.

1.3.1 *Spray marino*

Gli effetti dello spray sulla vegetazione hanno una natura sia meccanica che chimica. Quella meccanica è più intensa durante il periodo invernale, ed è prodotta dalla frazione grossolana, in cui prevale la componente di origine minerale (sabbie o particolato), mentre la componente di origine marina (NaCl), produce alterazioni funzionali. L'azione dannosa dello spray marino è stata riscontrata da diversi autori, sia su aspetti strutturali (Griffiths e Orians, 2004; Yura et al., 2006) che fisiologici (Sanchez-Blanco et al., 2003, 2004). Le foglie, gli organi vegetali più soggetti all'azione dello spray (Griffiths e Orians, 2003), presentano danni macroscopici acuti e un danno cellulare. Clorosi e decolorazioni compaiono dapprima all'apice fogliare con linee di demarcazione nette tra le zone necrotiche e quelle verdi (Barnes et al., 2000). Al livello ultrastrutturale le parti della foglia più danneggiate sono le cere cuticolari e le cellule epistomatiche, compromettendo così la funzionalità e il grado di apertura stomatica (Cheplick e Demetri, 1999; Rettori et al., 2005). Lo spray può determinare la distribuzione delle specie, e bloccare il processo successionale a stadi in cui prevalgono specie tolleranti (Griffiths, 2006). Nonostante l'importanza dello spray per la vegetazione costiera, i meccanismi di risposta e resistenza all'esposizione cronica a tale elemento, rimangono ancora poco chiari (Lorenzini e Nali, 2005). Tale lacuna è dovuta principalmente alla complessità del tema che vede vaste interazioni fra azioni sia fisiche che chimiche e risposte fisiologiche e strutturali delle diverse specie. Da un'analisi della letteratura emerge che l'azione dello spray è presa poco in considerazione nella quantificazione dei processi funzionali delle specie legnose della macchia mediterranea, e scarsi sono gli studi che affrontano gli effetti dell'esposizione

cronica allo spray sul bilancio idrico, sui tassi di assimilazione e i flussi di inquinanti. Non è stata studiata l'interazione con altre tipologie di stress, e i lavori che hanno considerato l'effetto dei tensioattivi, ponevano lo spray marino unicamente come veicolo di tale inquinante. Risultano del tutto assenti studi incentrati sulle possibili interazioni fra i danni da spray e altri inquinanti atmosferici come l'ozono. L'esposizione della vegetazione costiera a tale inquinante potrebbe rivelarsi particolarmente importante perché il regime di brezza e i venti comportano un'esposizione della vegetazione costiera sia all'azione dello spray marino sia ad inquinanti provenienti dall'entroterra. Le specie della macchia mediterranea grazie al loro grado di sclerofillia e alla presenza di strutture protettive, potrebbero essere tolleranti anche all'azione meccanica esercitata dai venti salmastri sebbene le conoscenze riguardanti l'effetto che la penetrazione di ioni tossici (Na^+ ; Cl^-) ha sull'apparato fotosintetico di specie sempreverdi a foglia espansa diffuse in aree costiere a macchia come *Phyllirea latifolia* L., *Quercus ilex* L. e *Arbutus unedo* L. sono molto scarse (Guidi et al., 1988). Inoltre l'azione meccanica dei venti ha di per se delle conseguenze sulla fisiologia in quanto genera moti turbolenti sulla lamina fogliare e quindi fa aumentare l'accoppiamento della foglia con l'ambiente circostante, determinando un aumento della richiesta traspirativa. Il computo dell'impatto di questo fattore di stress sulla funzionalità dei fotosistemi, sull'assimilazione e sull'accumulo della biomassa potrebbe giocare un ruolo fondamentale nella comprensione della fisiologia e della risposta a variazioni ambientali repentine e all'interazione di più tipologie di stress.

1.3.2 Salinità al suolo

La quantità di sali che si accumulano nel suolo può aumentare in conseguenza di un'alta domanda traspirativa, una diminuzione del dilavamento degli ioni che segue alla mancanza delle piogge, e da una maggiore deposizione di sali al suolo. Gli effetti negativi dell'eccesso di ioni nella soluzione circolante nel sistema suolo-pianta si articolano, in tre fenomeni:

- **Stress Osmotico:** Aumenta il potenziale osmotico dell'acqua del terreno, con riduzione dell'acqua disponibile per l'assorbimento da parte delle piante. Gli effetti che si producono sono paragonabili a quelli di un deficit idrico (siccità fisiologica) (Parida e Das, 2005). Questo fenomeno può determinare la diminuzione della crescita in specie sensibili, ma può avere un effetto transitorio su quelle più tolleranti (Munns e Tester, 2008).

• **Stress Ionico:** Si verifica per un aumento della concentrazione di alcuni ioni nei tessuti fotosintetici. Questo determina un effetto tossico sui pigmenti ed enzimi del citoplasma, inibendo la sintesi proteica al livello degli acidi nucleici. La struttura delle membrane cellulari e dell'integrità funzionale dei fotosistemi può essere alterata in maniera irreversibile dalla presenza di ioni tossici come Na^+ e Cl^- ; inizialmente lo stress ionico causa una riduzione dell'accrescimento (riduzione dell'area fogliare, internodi accorciati) e successivamente, nei casi più gravi, necrosi diffuse e morte dei tessuti.

• **Selettività ionica:** Un'alterazione nell'assorbimento di ioni da parte della pianta, che può comportare degli squilibri nella capacità di assorbimento di elementi nutritivi all'interno dei tessuti. Tale selettività è dovuta all'antagonismo tra gli ioni, che si sviluppa in particolare tra Na^+ e altri cationi come K^+ e Ca^{2+} (Tattini e Traversi et al., 2008).

Ognuno di questi fenomeni può avere un ruolo determinante nel cambiare il tasso di accrescimento che, come teorizzato da Munns et al., (1995), sembra avere una risposta bifasica alla salinità. Inizialmente la crescita risulta inibita dalla ridotta assunzione di acqua a livello radicale, causata dal basso potenziale idrico del terreno, e da un'alterazione del potenziale osmotico e della pressione di turgore con effetti negativi sull'allungamento dei tessuti. Specie mediterranee, capaci di raggiungere potenziali idrici elevati, possono ben fronteggiare questa prima fase di stress, in cui la tolleranza alla salinità e allo stress idrico possono coincidere. A questa fase ne segue però una di stress ionico, che accelera la senescenza fogliare, e se la perdita delle foglie più vecchie è superiore alla neosintesi, si può verificare un calo nella disponibilità di assimilati con ripercussioni sull'accrescimento.

In risposta a tali effetti le specie tolleranti mettono in atto meccanismi che rientrano in tre categorie:

- Tolleranza allo stress osmotico: una ridotta risposta allo stress osmotico si traduce in un maggiore accrescimento delle foglie e del tasso di traspirazione, ma l'aumento dell'area fogliare risulta vantaggiosa unicamente in piante che hanno una quantità di acqua sufficiente, mentre potrebbe essere uno svantaggio in condizioni idriche limitate.

- L'esclusione degli ioni: le alofite (che costituiscono la flora usualmente presente in suoli salini) l'esclusione può avvenire tramite vere e proprie strutture ghiandolari (Munns, 2002); le glicofite (sensibili o mediamente tolleranti alla salinità) possono mettere in atto

aggiustamenti osmotici al livello radicale per evitare o limitare l'uptake di ioni come Na^+ Cl^- . Qualora tale esclusione non sia sufficiente ad evitare uno stress ionico, il suo effetto tossico è visibile sulle foglie più vecchie già dopo giorni o settimane, a seconda della specie.

- Tolleranza dei tessuti: si manifesta quando ioni Na^+ Cl^- vengono compartimentati al livello cellulare ed intracellulare per evitare che un'elevata concentrazione di ioni tossici nel citoplasma provochi danni strutturali.

Studi approfonditi sulla salinità sono stati eseguiti su piante mediterranee di interesse agrario come *Olea europea* L., (Bongi e Loreto, 1989; Remorini et al., 2009; Cimato et al., 2010;) e tra quelle naturali *P. latifolia*, *Pistacia lentiscus* L. e *Myrtus communis* L. Dagli esperimenti effettuati è emerso che specie resistenti allo stress idrico come *P. latifolia* o *P. lentiscus*, riescono a far fronte alla siccità fisiologica indotta dalla salinità, ma strategie di tolleranza legate alla capacità di compartimentare gli ioni, di riprendere velocemente la normale funzionalità dopo un periodo di esposizione a stress salino (capacità di recupero), e il ricorso a risposte che genericamente contraddistinguono la resistenza delle specie mediterranee agli stress (plasticità strutturale, limitazione stomatica, dissipazione controllata dell'energia in eccesso) sono specie specifiche. Assente una comprensione esaustiva di come gli adattamenti sviluppati nei diversi comparti si coordinano tra loro.

CAPITOLO II

Approcci metodologici utilizzati per la valutazione della funzionalità fisiologica nei diversi casi di studio.

Background e scopo. Le ricerche che, negli ultimi decenni, hanno indagato come gli effetti di singoli fattori di stress influenzano la produttività e la funzionalità complessiva della vegetazione (stress idrico, e stress abiotici di origine antropica), hanno portato ad una buona comprensione dei meccanismi di risposta che determinano la resistenza della vegetazione agli stress abiotici indagati. Negli ultimi anni lo studio della fisiologia dello stress è stato affrontato sviluppando approcci sperimentali che contemporaneamente potessero inquadrare come processi che avvengono a scala spaziale e temporale differente (biochimico, fisiologico, sistemico) si integrano per determinare la funzionalità complessiva. Lungo questo percorso un'importante chiave interpretativa è stata quella di riconoscere che gran parte degli stress determina un danno ossidativo ma la nuova frontiera nello studio degli stress è quella di comprendere come i tratti funzionali vengono modulati in condizioni di multistress. Nell'area mediterranea queste due tematiche sono di grande interesse dato che gli stress ossidativi presenti sono spesso concomitanti, e che il gruppo funzionale prevalente in tale area è quello delle specie sempreverdi. Tali specie presentano un pool di tratti che gli conferiscono un'elevata resistenza agli stress, e l'habitus fogliare gli garantisce una continuità funzionale che consente di sfruttare tutte le finestre temporali in cui le condizioni ambientali sono favorevoli. Per arrivare a fare un bilancio del carbonio in queste aree è essenziale comprendere quale sia la modalità con cui caratteristiche strutturali e fisiologiche vengono modulate per arrivare a mantenere un'adeguata proporzione tra processi di assimilazione e respirazione, e quanto le specie sempreverdi riescono a mantenere inalterata la funzionalità dell'apparato fotosintetico attraverso la grande variabilità ambientale. In questo capitolo dopo aver richiamato alcuni concetti chiave nello studio della risposta agli stress e ai meccanismi di azione che stress di natura ossidativa seguono, sarà data una visione d'insieme sulla fluorescenza della clorofilla *a* come tecnica usata per lo screening dell'azione degli stress sull'efficienza dei fotosistemi (utilizzata nel caso di studio dettagliato al Capitolo III e IV), e delle metodologie usate per la misurazione di un altro processo chiave per la determinazione del bilancio del carbonio come la respirazione fogliare.

2.1 Adattamento, tolleranza e resistenza in un'ottica multistress

2.1.1 Stress abiotici: concetti generali

Il termine stress è usato per indicare un fattore che fluttuando, raggiunge livelli che per eccesso o difetto sono lontani dall'optimum di un determinato processo o dalle condizioni con cui la pianta era in equilibrio, determinando così un danno o una perdita di funzionalità. Mutuando il concetto di stress dalla fisica, nel 1980 Levitt pubblicò un compendio teorico sullo stress che fosse applicabile a tutti gli organismi. Letto in questi termini, lo stress è quel fattore che cambiando rispetto ad uno stato iniziale, esercita una pressione sul sistema biologico causandone una deformazione (strain). La deformazione così determinata può essere *elastica* se, rimuovendo la pressione esterna (stress) si ritorna ad uno stato originario, o *plastica* quando anche rimuovendo la fonte della deformazione, questa rimane. La pressione può anche eccedere la capacità dell'organismo di far fronte alle trasformazioni indotte dallo stress determinando un danno (Fig. 2.1).

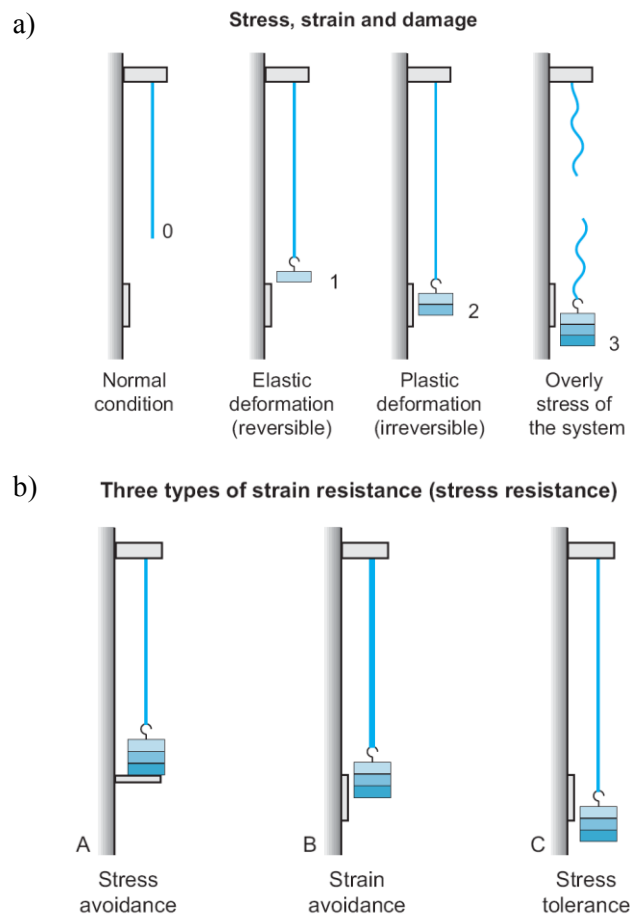


Fig 2.1- a) Modalità di azione dello stress sul sistema biologico; b) differenti tipologie di risposta che caratterizzano la resistenza allo stress.

Soprattutto per studiare gli effetti di inquinati sulla vegetazione, si è introdotto il concetto di dose, che ha in se la dimensione della quantità, e della durata. Queste due dimensioni sono state usate per distinguere gli stress in: *acuti*, quando si presentano con alta intensità e breve durata, oppure *cronici*, se presentano una bassa intensità e lunga durata; la risposta fisiologica cambia al variare delle modalità con cui lo stress e la conseguente pressione che esso esercita sul sistema biologico, si manifesta.

Il concetto di stress ha necessariamente a che fare con l'alterazione dell'omeostasi tra pianta e ambiente; questa essenziale condizione di equilibrio è ristabilita attraverso il raggiungimento di un nuovo stato fisiologico ("state-change concept" Strasser, 1988). La durata e l'intensità con cui si presenta lo stress influenza la risposta degli organismi. L'incorrenza dello stress determina la variazione dell'input energetico in entrata nel sistema biologico che in risposta a tali cambiamenti può far variare parametri strutturali, o il livello del flusso di materia ed energia complessiva nel sistema. La modulazione dei tratti che rientrano in queste due grandi categorie funzionali, può determinare meccanismi di resistenza allo stress. La resistenza può manifestarsi in termini di *tolleranza*, quando il tasso metabolico rimane alto solo per condizioni moderate di stress, ma diminuisce all'aumentare della pressione esterna; e di *evitanza* quando non vi è una modulazione dell'attività metabolica in relazione all'intensità dello stress: all'insorgere di quest'ultimo la funzionalità viene ridotta o cessata completamente (quiescenza) (Fig. 2.1 b). I tratti che vengono modulati possono essere fissati geneticamente (adattamento): negli ambienti soggetti a stress prevalgono i genotipi che avranno sviluppato un'appropriata combinazione di caratteri per far fronte agli stress presenti; quando la modulazione di questi tratti funzionali avviene a scale temporali diverse (giornaliera o stagionale) si parla di acclimatazione. Un equilibrio con le condizioni ambientali, è raggiunto modulando il funzionamento delle diverse vie metaboliche e dei comparti cellulari. Tale coordinamento può tuttavia essere interrotto durante periodi in cui la pianta è soggetta a stress. Quando i singoli processi che sono usualmente orchestrati per raggiungere una funzionalità ottimale si disaccoppiano, l'input energetico in entrata nei fotosistemi, non segue più il normale corso e trattandosi di molecole ad alta energia tendono a ridurre specie con alto potenziale ossidante come l'ossigeno molecolare (O_2) e formare le specie reattive all'ossigeno (ROS: O_2 , H_2O_2 , $O_2^{\cdot -}$ e HO^{\cdot}). Le ROS sono prodotte anche in condizioni di crescita ottimali dalla normale attività svolte al livello di organuli come cloroplasti, mitocondri e perissosomi (Mittler, 2002), ma la loro produzione aumenta drasticamente durante periodi

di stress (Bhattacharjee, 2005). Per questo motivo, poiché tutte le tipologie di stress hanno in comune un'alterazione dei flussi energetici all'interno dei diversi comparti cellulari, si traducono in stress ossidativi.

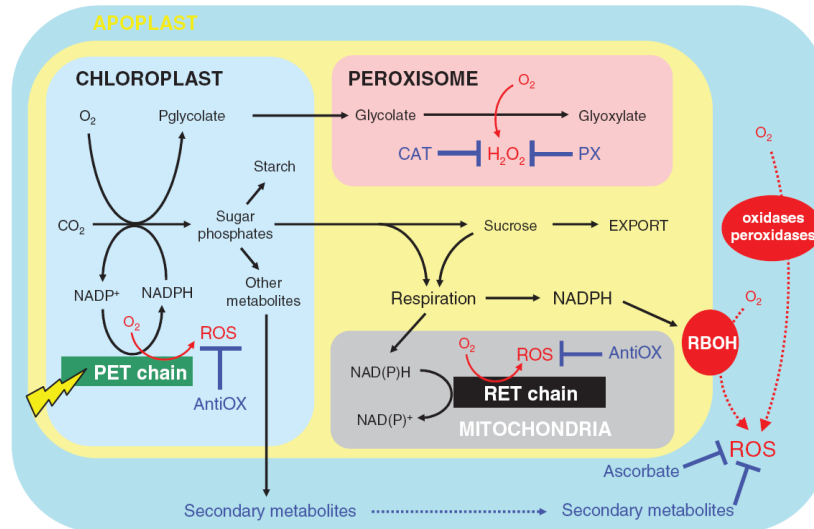


Fig. 2.2 – Principali patterns di produzione dei ROS nei diversi compartimenti della cellula. Lo schema mostra le vie più studiate o quantitativamente più importanti, collocando le reazioni responsabili della formazione di queste molecole all'interno dei diversi processi: fotosintesi, fotorespirazione e respirazione. AntiOX, sistema antiossidante; CAT, catalasi; PET=RET, catena di trasporto fotosintetica e della respirazione; PX, perossidasi; RBOH, produzione di ROS dovute al processo di respirazione.

2.1.2 Interazione tra stress ossidativi

Gli stress ossidativi possono spesso incorrere contemporaneamente: ad esempio alte temperature estive sono concomitanti con elevate irradiazioni, condizioni che favoriscono le formazioni di inquinanti fotochimici come l'ozono, la cui concentrazione aumenta quindi in concomitanza di periodi di aridità. La risposta al livello molecolare a uno stress ossidativo è simile e spesso i meccanismi di difesa che sono stati innescati per un determinato stress, conferiscono un certo grado di resistenza ad un altro stress dando origine al fenomeno della "cross-resistance" (Bowler et al., 1992; Mittler, 2006). Piante soggette a stress idrico diventano più resistenti alle basse temperature: la formazione di ghiaccio è meno frequente nei tessuti che sono stati soggetti a disidratazione (Bridger et al., 1994; Mahajana et al., 2005). Fenomeni di cross-resistance si possono sviluppare sia al livello morfologico (aumento del grado di sclerofillia) che fisiologico (chiusura stomatica dovuta allo stress idrico diminuisce il flusso effettivo d'inquinanti che penetrano nella

foglia). Molto spesso l'azione simultanea di più fattori di stress fa aumentare l'effetto deleterio che si avrebbe se accadesse una sommatoria dei singoli effetti negativi. Tale fenomeno è stato definito "*cross-synergism*". Mentre le variazioni nello stato fisiologico della pianta in risposta ad un singolo fattore di stress sono state sufficientemente dettagliate, ancora molto deve esser fatto per comprendere i meccanismi che determinano lo sviluppo di "*cross-resistance*" o *synergism*. Questo è spiegabile con il fatto che stress di differente natura (naturali, antropogenici; biotici, abiotici), essendo accomunati dalla produzione di ROS, possono in definitiva influenzare in modo molto simile i singoli parametri (accrescimento, assimilazione, respirazione, integrità delle membrane e dei fotosistemi), rendendo molto complesso discernere i meccanismi di azione sottointesi da variazioni nella funzionalità.

2.1.3 Specie mediterranee: resistenza o adattamento

L'ambiente mediterraneo è soggetto a periodi di stress che possono raggiungere livelli di intensità alti, e possono interessare intere stagioni (aridità estiva, basse temperature invernali, lunghe esposizioni ad alte irradianze e temperature). Queste condizioni ambientali possono spiegare la distribuzione di alcune specie sclerofille e più in generale di ecosistemi a macchia mediterranea, in aree che come quelle costiere, presentano condizioni limitanti (Mitrakos, 1980). Gli adattamenti sviluppati dalla vegetazione mediterranea per rispondere a queste variazioni sono determinati sia al livello morfologico sia fisiologico. Infatti, specie con una differente abilità nella risposta allo stress idrico, limitazione ambientale su cui molti studi si sono focalizzati, differiscono per i tratti morfologici e fisiologici e per come questi sono tra loro associati (Ackerly, 2004; Mitchell et al., 2008), ma anche per la modalità con cui riescono a coordinare tali adattamenti nei diversi comparti; modulare l'architettura idraulica e il sistema di resistenze al livello delle radici, del sistema di trasporto xilematico, sono tra questi. Grande attenzione è stata data ai tratti fogliari che conferiscono resistenza allo stress idrico: il controllo del processo di traspirazione è attuato attraverso adattamenti strutturali (grado di sclerofillia, spessore e densità della lamina fogliare, cere epicuticulari, numero e struttura degli stomi) o fisiologici (tipologia di coordinazione tra la chiusura stomatica, la conduttanza idraulica e il potenziale idrico della pianta). La coordinazione tra questi tratti conferisce alle specie mediterranee un uso conservativo delle risorse che sta alla base della resistenza che queste specie presentano anche rispetto ad altri stress. Specie sempreverdi, inquadrare nella teoria

del “leaf wordwilde economic spectrum” (Wright et al., 2004) sono specie che investono molti assimilati nella costituzione dell’organo fogliare la cui emivita va dai 12 ai 48 mesi (Gratani e Bombelli, 2001). Questa struttura, che ha un alto costo metabolico per unità di superficie, è tra quelle che conferiscono un’elevata resistenza alle specie mediterranee dato che mantiene i ridotti tassi di assimilazione per unità di superficie (riguardo a specie decidue) ma continui durante l’anno, anche quando ci sono situazioni di stress cronici o acuti: questo permette di mantenere attive la serie di meccanismi di riparazione e di difesa al livello biochimico. La capacità di resistenza della pianta però dipende sia dalle caratteristiche dello stress (intensità e durata, numero di stress che interagiscono), ma anche dallo stato funzionale in cui la pianta si trova al momento in cui lo stress si presenta. L’uso conservativo delle risorse in un’ottica multistress, in cui anche la frequenza e l’intensità dei periodi sfavorevoli aumentano, potrebbe non essere una strategia vincente perché ci si potrebbe trovare in una condizione in cui bassi tassi di assimilazione mantenuti per lunghi periodi, non sono in grado di sostenere i costi metabolici dei processi di riparazione, non riuscendo così a compensare la produzione di ROS. La comprensione di questi aspetti non può prescindere dallo studio su come queste specie modulano la funzionalità dell’apparato fotosintetico. Per fare ciò, l’analisi della fluorescenza della clorofilla *a* e la determinazione dei tassi di respirazione costituiscono due processi chiave.

2.2 Fluorescenza della clorofilla *a* (*Chl a*) come strumento per lo screening di stress ossidativi.

La cinetica di emissione della fluorescenza della clorofilla fornisce un’indicazione del rendimento del processo di fotosintesi (Kautsky et al., 1960). Numerose evidenze sperimentali hanno mostrato come i parametri riguardanti la fluorescenza della *Chl a* sono direttamente legati all’andamento del tasso di assimilazione (Genty et al., 1989, 1990; Cavender- Bares and Bazzaz, 2004) e sono stati ampiamente utilizzati per studiare le prestazioni dell’apparato fotosintetico (Maxwell and Johnson, 2000). Le perturbazioni a carico di questo processo, possono modificare significativamente la cinetica dell’emissione della fluorescenza; tale relazione insieme con la facilità e la rapidità con cui si eseguono le misure, la rende uno strumento molto utile e versatile per la valutazione non invasiva degli stress (Lichtenthaler e Rinderle, 1988; Barbagallo et al., 2003). Quando

la presenza di stress comporta un danno alla struttura o al funzionamento del PSII, la variazione nell'intensità di emissione della fluorescenza fornisce informazioni anche sui danni strutturali che si verificano al livello del PSII: infatti l'emissione della fluorescenza è intimamente associata allo stato di fluidità, stabilità, e organizzazione delle membrane (Srivastava et al., 1997). Tale tipologia di rilievo ha il vantaggio di evidenziare lesioni e danni dovuti a cause naturali (senescenza) o esterne (stress abiotici) in anticipo rispetto allo sviluppo di sintomi visibili (Clark et al., 2000).

In condizioni di luce saturante l'attività fotosintetica è limitata dal tasso di assimilazione del carbonio (velocità della fase oscura) (Farquhar et al., 1980). Questa condizione determina che ci sia un tasso di produzione di NADP⁺ (H) e ATP superiore a quanto richiesto dall'attività metabolica; la mancata riduzione di NADP⁺, accettore finale degli elettroni che dal complesso evolvente ossigeno sono immessi nella catena di trasporto elettronico, comporta un aumento della formazione di specie reattive all'O₂ (ROS, H₂O₂, O₂^{*}). In presenza di tali molecole, la cui quantità aumenta in concomitanza di eventi di stress, i processi funzionali che correntemente si svolgono nei fotosistemi sono alterati. La fluorescenza emessa dal PSII ci permette di avere informazioni non solo su cambiamenti nella performance dei fotosistemi ma anche sulla localizzazione dei siti in cui si genera un danno o una temporanea perdita di funzionalità (Pellegrini et al., 2010). Da quanto detto appare evidente che l'analisi della fluorescenza può dare un grosso contributo alla determinazione degli effetti che stress ossidativi hanno sulle modalità di funzionamento e regolazione della funzionalità dell'apparato fotosintetico.

2.2.1. Struttura del PSII e principi della fluorescenza

La comprensione della dinamica di emissione della fluorescenza non è scindibile dai passaggi che gli elettroni compiono nella membrana tilacoidale, dalla struttura dei fotosistemi, e dall'equilibrio che si crea tra i processi che competono per la de-eccitazione dei pigmenti fotosintetici (Fig. 2.3 a).

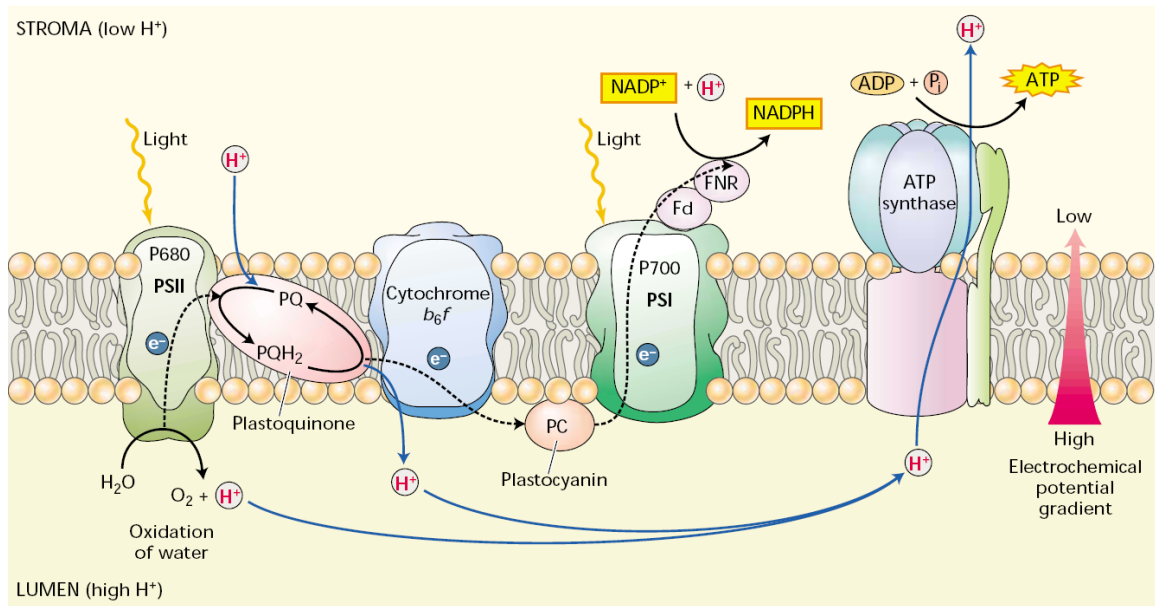


Fig. 2.3 a – Dinamica del trasferimento di elettroni e protoni nella membrana tilacoidale che avviene attraverso quattro complessi proteici (Taiz e Zaiger, 2008).

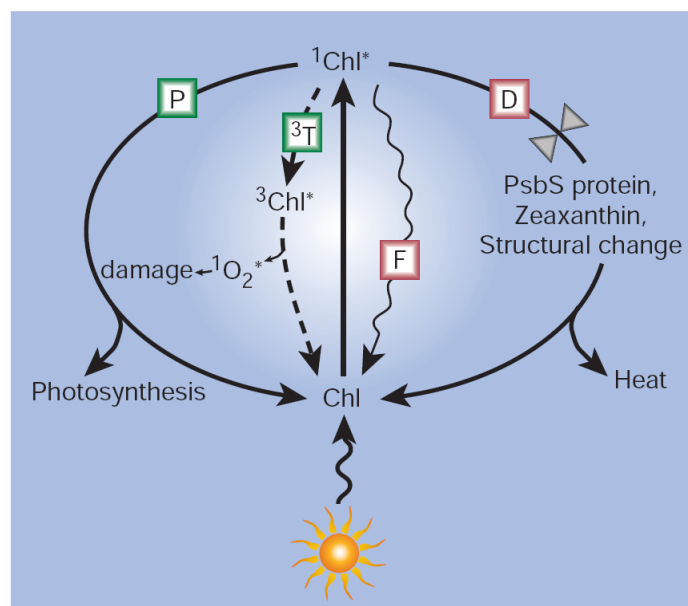


Fig. 2.3 b - Vie di de-eccitazione della clorofilla. Chl, clorofilla; 1Chl*, 3Chl*, stati eccitati della Chl P, via fotochimica (in verde); D, dissipazione dell'energia di eccitazione in eccesso tramite calore (in rosso); F, de-eccitazione tramite emissione di fluorescenza; 3T, via di de-eccitazione che porta alla formazione di specie reattive all'ossigeno (singoletto $^1\text{O}_2^*$) e al danno foto-ossidativo (Demmig-Adams e Adams, 2000).

L'energia luminosa assorbita dai complessi antenna periferici (LHCs, Light Harvesting Complex) e incanalata verso centri di reazione (RC) situati nei complessi antenna associati direttamente al PSII (LHC II “core antenna”) (Hooper, 2004) può seguire tre

percorsi principali: (i) può essere utilizzato per le reazioni fotochimiche, (ii) può essere dissipata in forma di calore, o (iii) può essere riemessa come fluorescenza della Chl *a* (Demmig-Adams e Adams, 2000) (Fig. 2.3 b).

Solo il 0.3-3% della radiazione assorbita dai pigmenti viene riemessa per fluorescenza; infatti la maggior parte dell'energia che dai complessi antenna viene trasferita ai centri di reazione viene principalmente utilizzata per muovere un elettrone all'interno della catena di trasporto (ET).

La cinetica della fluorescenza è legata allo stato di ossidazione/riduzione dei carrier intermedi della catena di trasporto degli elettroni (pools dei plastochinoni: Q_A , Q_B , complesso del Citocromo $b_6 f$, plastocianina) e degli accettori finali (ferredossina e flavoproteina ferredoxina–NADP riduttasi, FNR) e allo stato di attivazione del processo fotochimico che porta all'assimilazione della CO_2 . Escludendo ogni forma di energia per un tempo sufficientemente lungo da disattivare anche le reazioni fotochimiche (adattamento al buio per almeno 40 minuti) i centri di reazione sono in uno stato completamente ossidato, come tutti i componenti a valle (accettori primari e secondari). Se i pigmenti a partire da questo stato basale vengono eccitati da un flash di luce saturante, il tasso di conversione dell'impulso luminoso in fluorescenza è basso (F_0 , fluorescenza basale) dato che la maggior parte dell'energia in entrata nel sistema è convertita in energia fotochimica. Il picco nell'emissione di fluorescenza (F_M) coincide con la riduzione degli accettori primari degli elettroni (Q_A / Q_A^-), che non sono più in grado di accettarne un altro fino a quando non lo trasferiscono ai carriers successivi (Q_B). In questa fase, in cui i RC si dicono chiusi, cioè non sono in grado di accettare un altro elettrone, l'efficienza della fotochimica è al minimo (Fig. 2.4).

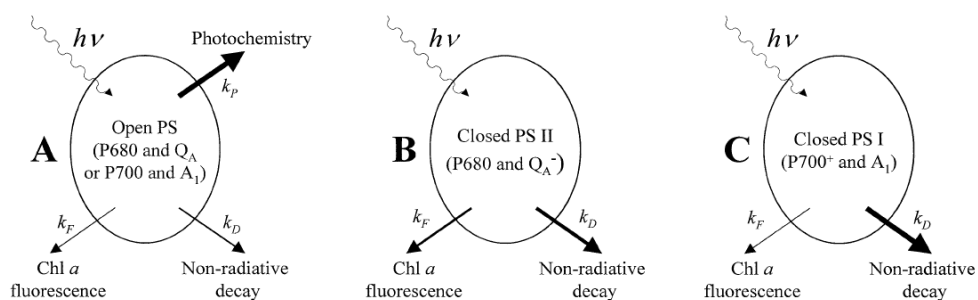


Fig. 2.4 – In ogni diagramma presentato (A, B, C) vengono mostrate le vie di dissipazione che l'energia in entrata nei fotosistemi segue, a partire da un campione adattato al buio. Lo spessore delle frecce indica il peso che il processo riveste nella gestione dell'energia in entrata nel fotosistema (Oxborough et al., 2004). Dai diagrammi emerge che la via fotochimica, la dissipazione per calore e la fluorescenza della Chl *a*, sono processi alternativi che tra loro competono. Di conseguenza, il rendimento di ogni processo è in funzione del tasso della costante che a questo si riferisce, (k_P , via fotochimica; k_D , via dissipazione per calore; k_F via dissipazione per fluorescenza) diviso per la somma delle costanti di velocità di tutti i processi considerati.

Esaminare i livelli minimi e massimi di fluorescenza ci dà quindi informazioni sul numero di RC attivi (in grado di accettare elettroni), e sullo stato di funzionalità degli accettori primari. Una volta che i campioni sono stati esposti alla luce, la progressiva chiusura dei centri di reazione, che causa l'aumento della fluorescenza della clorofilla, inizia a diminuire perché aumenta il livello di estinzione dell'energia per via fotochimica, qP , grazie all'attivazione enzimatica e del processo di organizzazione del carbonio. Allo stesso tempo, continuando l'esposizione alla luce, si ha un aumento dell'efficienza con cui l'energia è dissipata tramite calore (K_H), e per fluorescenza (K_F), le due componenti che costituiscono l'estinzione non fotochimica (NPQ) dell'energia in eccesso. Per distinguere quale delle due vie estingua l'eccedenza di energia con una maggiore efficienza, sono state sviluppate due diverse metodologie di misura: la fluorescenza modulata, e quella diretta. Nella prima la misurazione della fluorescenza è fatta combinando misure su campioni adattati al buio e in condizioni di luce (in cui il meccanismo fotosintetico è attivo), e nella seconda la cinetica della fluorescenza è registrata ad intervalli temporali brevissimi, su campioni adattati al buio che sono esposti ad un impulso di luce saturante. In entrambe le metodologie, anche se con procedure tecniche differenti, si registrano la fluorescenza basale F_0 e quella massima F_M , e la grande differenza tra i due approcci è che la fluorescenza diretta acquisisce dati ad un'alta definizione temporale permettendo di ottenere il transient completo descritto dall'aumento della fluorescenza tra i punti F_0 e F_M .

2.2.2. Misurazione della fluorescenza modulata

La capacità di studiare i cambiamenti nelle prestazioni dell'apparato fotosintetico aumenta con lo sviluppo della fluorescenza modulata che riesce a separare la luce attinica dal segnale di fluorescenza, e permette di risolvere la fluorescenza in elementi legati alla via fotochimica e non fotochimica (Bradbury and Baker, 1984). Con la fluorescenza ad impulso modulato, con cui studiamo la cinetica lenta dell'evoluzione della fluorescenza, si costruiscono le curve di induzione.

Dopo la determinazione dei minimi e dei massimi assoluti di fluorescenza (F_0 , F_M , misurati a partire da un campione adattato al buio "dark adapted") viene attivata la luce attinica e ad intervalli appropriati vengono applicati una serie di impulsi saturanti (tra 900 e 1500 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$) che portano ad un massimo relativo, F_M' che risulta essere inferiore a F_M (Fig. 2.5). La fluorescenza che viene emessa in presenza di luce attinica, prima che venga dato l'impulso saturante, caratterizza un momento in cui c'è un equilibrio tra i processi fotochimici e non fotochimici: per questo motivo spesso viene indicata come fluorescenza stady state (F_t'). Se sono spente tutte le fonti supplementari di luce e viene accesa una fonte che emette nel rosso lontano (riporta i RC allo stato ossidato) si misura la fluorescenza basale (F_0').

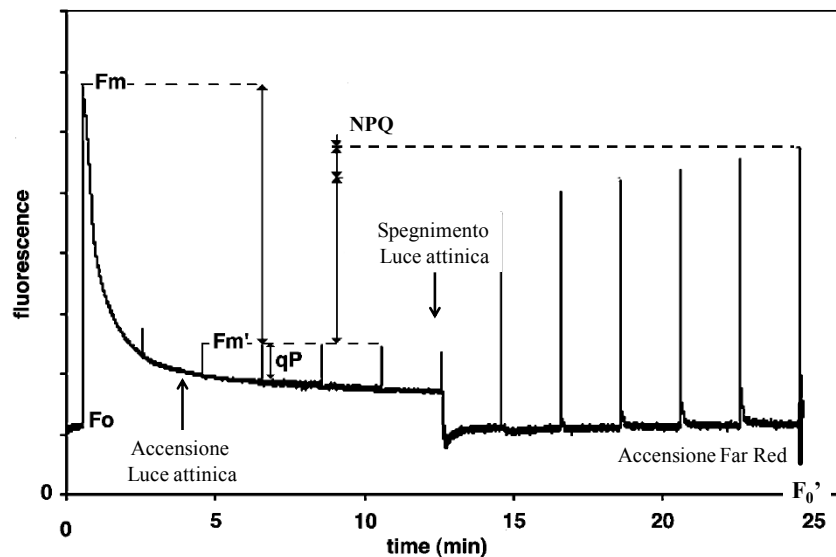


Fig. 2.5 – Curva di induzione della fluorescenza. In presenza di una fonte luminosa debole (processo fotochimico non attivo) viene misurata la fluorescenza basale (F_0). In seguito all'emissione di un impulso saturante, viene raggiunta la fluorescenza massima (F_M). Viene accesa la luce attinica (processo fotosintetico attivo) e dati impulsi saturanti a intervalli regolari permettendo così di misurare il quenching fotochimico e non fotochimico (qP , e NPQ) (Muller et al., 2001).

Una volta acquisiti i parametri fondamentali dalla curva di induzione della fluorescenza, si può procedere al calcolo di indici importanti come il ϕ_{PSII} , la resa quantica effettiva del PSII alla luce, che ci dà un'indicazione su quanta dell'energia assorbita viene usata per la riduzione del Q_A e quindi nelle reazioni fotochimiche:

$$\phi_{PSII} = (F_M' - F_t') / F_M' \quad \text{Eq. 1}$$

A partire da questo indice possiamo calcolare il tasso di trasporto elettronico:

$$ETR = \phi_{PSII} * PPF * a * 0.85 \quad \text{Eq. 2}$$

dove i fattori che vengono considerati sono la radiazione fotosinteticamente attiva assorbita (PPFD, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), il fattore di distribuzione della luce tra i due fotosistemi (a), e l'assorbanza che viene considerata un fattore costante.

Altro parametro che viene spesso usato è il quenching fotochimico qP :

$$qP = (F_M' - F_t') / (F_M' - F_0') \quad \text{Eq. 3}$$

che ci dà una proporzione di quanti centri di reazione sono in uno stato ossidato e capaci di attuare reazioni di fotochimica (Baker, 2008).

Combinando i parametri ottenuti dalla fase dark adapted e quella in condizioni di luce, arriviamo a calcolare il quenching non fotochimico (NPQ, non-photochemical quenching):

$$NPQ = (F_M - F_M') / F_M' \quad \text{Eq. 4}$$

che ci dà una stima del cambiamento nel tasso di energia che viene riemessa in forma di calore nel campione adattato alla luce rispetto a quella che prendeva la via della dissipazione nel campione adattato al buio (Baker, 2008).

Con questo tipo di metodologia è possibile determinare come l'energia viene ripartita quando il processo di assimilazione è attivo.

2.2.3. Misurazione della fluorescenza della Chl a utilizzando il test OJIP

Le misure di fluorescenza diretta vengono effettuate su un campione adattato al buio, partendo quindi da una condizione di rilassamento dei fotosistemi in cui le singole componenti si trovano in uno stato ossidato. L'emissione di fluorescenza è indotta tramite l'esposizione ad un fascio di luce saturante (650 nm, 3000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). L'evoluzione del segnale di fluorescenza nel tempo, anche detto transient, è registrato ad intervalli di tempo differenti, dapprima più veloci poi più lente: in un arco di tempo che va dai 40 μs ai 2 ms acquisisce con una velocità pari a 10 μs ; in seguito dopo 2 ms e dopo 1

secondo, lo strumento passa automaticamente a velocità di acquisizioni più lente (Strasser et al., 1995).

L'acquisizione rapida permette di osservare il transient caratterizzato da punti di flesso che rappresentano i siti in cui il flusso elettronico incontra resistenza al suo passaggio tra donatori/accettori.

Parametri JIP-test

Tramite l'acquisizione veloce è possibile non solo determinare il livello di F_0 , proporzionale alla quantità di pigmenti e al numero di RC attivi, di F_M e dell'efficienza massima teorica del PSII ($\phi_{P_0} = (F_M - F_0) / F_M$), ma i dati acquisiti processati secondo le adeguate formulazioni, permettono il calcolo dei parametri del JIP-test. I parametri che si possono ricavare danno informazioni sui singoli passaggi che il flusso degli elettroni compie attraverso i fotosistemi a partire dall'efficienza con cui i RC catturano elettroni, al trasporto attraverso i plastochinoni, fino alla riduzione degli accettori finali (RE) del PSI (Tsimilli e Strasser, 2008). Si hanno inoltre indicazioni sui flussi attraverso i fotosistemi per RC attivi (flussi specifici), o per sezione fogliare eccitata dall'impulso luminoso (CS, flussi fenomenologici). Applicando il JIP-test è possibile calcolare le efficienze sulla base dell'energia totale assorbita (ABS) o su quella che realmente è stata trasferita oltre i centri di reazione attivi (TR) (ϕ e Ψ rispettivamente). Strettamente connesse alla fluorescenza basale e massima e alla quantità dei pigmenti presente nei sistemi antenna (Havaux et al., 1991) sono le costanti di de-eccitazione fotochimica e non fotochimica (K_P ; K_N), che descrivono la tendenza a convogliare gli elettroni nella catena di trasporto o nei processi di dissipazione dell'energia (calore, fluorescenza, spill-over). La somma di queste costanti (SumK) descrive l'efficienza con cui i processi fotochimici e non sono bilanciati per evitare danni dovuti alla sovraccitazione dei fotosistemi (Strasser et al., 2004). Altra indicazione sintetica sulla condizione funzionale dei fotosistemi è il Performance Index sulla base dell'energia assorbita (PI_{ABS}), che considera tre fasi distinte che influiscono sul tasso di assimilazione: numero relativo di RC per quantità di clorofilla, la proporzione tra il flusso assorbito e quello realmente convogliato all'interno della catena di trasporto, e quanto di quest'ultimo arriva oltre gli accettori primari. Negli ultimi anni è stato sviluppato M-PEA, un nuovo strumento che contemporaneamente determina la fluorescenza diretta (F), quella riemessa a 820 nm (MR), indicativa dello stato di

riduzione dei centri di reazione del PSI e della Plastocianina (PC), e quella dovuta al trasferimento di ritorno di elettroni tra il PSI e il PSII (DF, Delayed Fluorescence). Questo strumento ha dunque permesso di determinare lo stato di riduzione di entrambi i fotosistemi (Strasser et al., 2010). Da studi effettuati con questo sistema, sono stati riconsiderati gli steps IP e sono stati formulati ulteriori parametri che permettono di calcolare l'ampiezza della fase I-P: $\Delta V_{IP} = (F_M - F_I) / (F_M - F_0)$, l'efficienza con cui gli elettroni convogliati oltre i plastochinoni arrivano al PSI, $\delta_{R0} = RE_0 / ET_0 = (1 - V_I) / (1 - V_J)$, e l'efficienza complessiva per quantità di energia in entrata nel sistema ($\phi_{R0} = RE_0 / ABS$). L'analisi di questa porzione del transient ha portato a proporre anche il Performance Index totale (PI_{TOT}), che indica l'efficienza con cui l'energia assorbita porta alla riduzione degli accettori finali (ferredossina e $NADP^+$) (Strasser et al., 2010). Per un elenco dei parametri si faccia riferimento alla Tab. 1.

Analisi del transient e del flusso di elettroni nei fotosistemi

Il segnale di fluorescenza, se trasformato in scala logaritmica mostra due picchi intermedi nell'emissione di fluorescenza, J-I (Fig. 2.6), che sono legati alle successive riduzioni e ossidazioni cui gli accettori di elettroni vanno incontro lungo la catena di trasporto (Stribet et al., 1998). Il primo picco intermedio che si incontra (J, e 2 ms circa), legato all'aumento del numero di Q_A che si trovano allo stato ridotto, risente del bilancio tra il tasso di riduzione operato dall'attività del PSII e quello di ossidazione dovuto al funzionamento del PSI (Haldimann and Strasser, 1999); questa fase è anche influenzata dallo stato di funzionalità del complesso evolvente ossigeno (Schreiber and Neubauer 1987; Strasser, 1997). Le cause che portano ad un aumento della fluorescenza variabile allo step J ($V_J = (F_{2ms} - F_0) / (F_M - F_0)$), sintomatico di un accumulo di Q_A^- , possono essere individuate grazie alla visione di insieme dei parametri JIP-test che ci danno contemporaneamente informazioni su tutti gli step a monte e a valle di un determinato passaggio del flusso di elettroni all'interno dei fotosistemi. La fase tra gli steps J-I corrisponde alla progressiva riduzione del pool dei plastochinoni (Schansker et al., 2003). Infatti, l'accumulo di PQH_2 che determina l'inizio del trasferimento degli elettroni al $P700^+$ e PC^+ , compensando così l'ulteriore ossidazione operata dal PSI, avviene intorno a 7 ms. Questo supporta l'idea che lo step I riflette il passaggio degli elettroni tra il plastochinone e il citocromo b6/f (Cty) (Schansker et al., 2005). I parametri del JIP test legati a questa porzione del transient sono quelli che ci danno informazioni sull'efficienza con cui gli elettroni entrano nella catena di

trasporto elettronico su base dell'energia totale assorbita (ABS), e quanti di questi saranno trasferiti oltre i centri di reazione attivi (TR) (ϕ_{E0} e Ψ_{E0} rispettivamente).

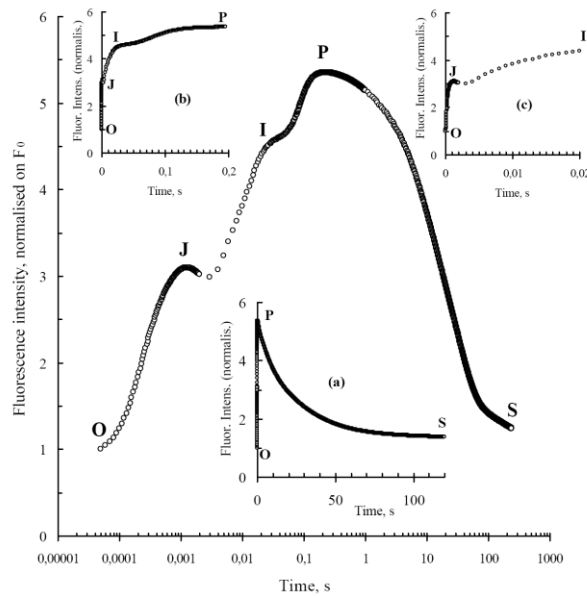


Fig. 2.6 – Tipico transient esibito da un campione adattato al buio illuminato con un impulso di luce saturante, e trasposto in scala logaritmica. Le immagini inserite mostrano lo stesso transient ma a differenti scale temporali senza la trasformazione logaritmica: a) tra 0 e 120 s, b) tra 0 e 200 ms, c) tra 0 e 20 ms. (Strasser et al., 2004).

La fase I-P riflette invece lo stato di ossido-riduzione degli accettori finali (RE): in particolare tale porzione del transient corrisponde all'accumulo di $P700^+$ e PC^+ (allo stato ridotto). I parametri OJIP che corrispondono a questa porzione sono l'efficienza e la probabilità con cui gli elettroni arrivano ai RE (ϕ_{R0} ; δ_{R0}), il ΔV_{IP} , e il PI_{TOT} .

Parametri misurati	Descrizione
$F_{20\mu s} \cong F_0$ F_J F_I F_M	Fluorescenza basale registrata a 20 μs (Handy Pea) i RC del PSII sono allo stato ossidato Fluorescenza registrata a 2 ms Fluorescenza registrata a 30 ms Fluorescenza massima raggiunta quando i RC del PSII sono allo stato ridotto
Efficienze	
$\phi P_0 = TR/ABS$ $\phi E_0 = ET/ABS$ $\Psi E_0 = ET/TR$ $\delta P_0 = RE/ET$ $\phi R_0 = RE/ABS$	Massima resa quantica della fotochimica primaria al $t=0$ Massima resa quantica con cui gli elettroni vengono convogliati nella catena di trasporto elettronico al $t=0$ Probabilità con cui (al $t=0$) gli elettroni in entrata sono convogliati nella catena di trasporto elettronico oltre agli accettori primari (QA-) Efficienza con cui gli elettroni vengono convogliati dagli accettori intermedi al lato degli accettori del PSI Massima resa quantica con cui avviene, per ogni fotone assorbito, la riduzione degli accettori finali del PSI
Costanti di de-eccitazione	
SumK Kn Kp	Somma delle costanti con cui la clorofilla viene de-eccitata = $K_p + K_n$ Costante di dissipazione dell'energia per via non fotochimica Costante di dissipazione dell'energia per via fotochimica
Flussi specifici (per RC attivi)	
TR/RC ET/RC DI/RC RC/CS	Massimo tasso di assorbimento dell'energia in entrata da parte dei RC attivi del PSII ($t=0$); Trasporto elettronico Energia dissipata in forma di calore Numero di RCs attivi per sezione fogliare analizzata (CS)
Performance Complessiva	
PI_{ABS} PI_{TOT}	Performace complessiva che considera l'energia assorbita dal PSII: considera la densità dei RC su base dell'energia assorbita, (RC/ABS) la resa massima della fotochimica primaria, [$\phi P_0 / (1 - \phi P_0)$] la capacità di convogliare gli elettroni dal PSII al PSI, [$\Psi_0 / (1 - \Psi_0)$] Performace complessiva che considera l'energia assorbita dal PSII fino alla riduzione degli accettori finali: $PI_{ABS}(\delta R_0 / (1 - \delta R_0))$

Tab. 1- Descrizione dei parametri tecnici delle curve O-J-I-P e dei parametri JIP-test che sono maggiormente usati nel testo.

2.3 Respirazione fogliare

2.3.1 “*What is respiration?*”

Recentemente questa domanda, semplice solo in apparenza, è stata posta a diversi rappresentanti della comunità scientifica internazionale riunitisi ad Oxford per un simposio dal titolo “Plant respiration and climate change: scaling from mitochondria to the globe”. Nel rispondere a questa domanda, è stato inevitabilmente messo in risalto il ruolo funzionale della respirazione che costituisce un processo catabolico di supporto all’accrescimento, al trasporto attivo di ioni e al mantenimento dei tessuti attraverso la produzione di composti carboniosi intermedi come l’acido piruvico (principale prodotto della fase glicolitica), molecole energetiche e potenziale riducente (ATP, NADP(H) prodotti in proporzioni diverse in ognuna delle tre fasi, ma in modo particolare nel ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) e nella catena di trasporto degli elettroni (Fig. 2.7). Il peso che ognuno di questi passaggi intermedi gioca, e come il rapporto tra questi possa cambiare, è importante per la comprensione del processo in sé, come pure la determinazione di quali composti costituiscono il substrato dalla respirazione (R_D). Evidenze sperimentali che si avvalgono dell’uso degli isotopi per marcare il carbonio (Trumbore et al., 2006) hanno mostrato come ci sia una grande varietà di substrati utilizzati per la respirazione: questi cambiano in termini di tipologia, rispetto al periodo in cui sono stati sintetizzati e agli organi della pianta in cui sono stati allocati. Questo può mettere in discussione il legame diretto tra fotosintesi (P_n) e respirazione (R_D) alla base di molti modelli predittivi.

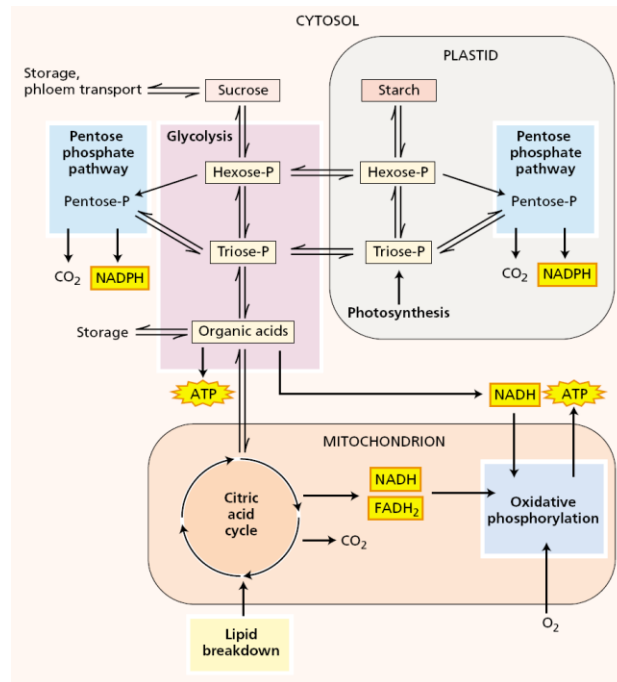


Fig. 2.7 – Il processo di respirazione si compone in tre differenti fasi (Glicolisi, Ciclo degli acidi tricarbossilici, catena di trasporto degli elettroni) che avvengono in altrettanti compartimenti cellulari (Citosol, Plastidi, Mitocondri). Taiz and Zeiger, 2008.

Solo l'integrazione tra gli aspetti molecolari, biochimici, fisiologici ed ecofisiologici che stanno alla base della respirazione può portare ad una comprensione di questo essenziale processo in modo da sviluppare modelli meccanicistici in grado di spiegare le evidenze sperimentali che fino ad ora sono state descritte, con un margine di errore ancora alto, attraverso modelli empirici basati esclusivamente sulla dipendenza della respirazione dalla temperatura (T) o dalla P_n . Nonostante l'efficienza di tutti gli enzimi coinvolti nel processo di respirazione dipenda dalla temperatura, è necessario valutare anche come le variazioni a breve e lungo termine della temperatura influenzano la respirazione, quindi i processi di acclimatazione, l'effetto degli stress o dello stato funzionale complessivo della pianta. Il modello che descrive la dipendenza della R_D dalla T come una funzione esponenziale con un tasso di incremento per il cambiamento in 10°C (Q_{10}) che rimane costante intorno a 2, è un modello troppo semplificato per poter inquadrare le variazioni stagionali di R_D (Bruhn et al., 2008).

2.3.2 Caratterizzazione della risposta della respirazione alla temperatura

È stato dimostrato come la risposta delle R_D alla T , poteva essere descritta dall'equazione proposta da Arrhenius:

$$R = R_{\text{REF}} \times e^{\frac{E_0}{r} \times \left[\frac{T - T_{\text{REF}}}{T \times T_{\text{REF}}} \right]}$$

Eq. 5

dove E_0 costituisce l'energia di attivazione degli enzimi (kJ mol^{-1}) e R_{REF} è la respirazione misurata ad una T di riferimento (convenzionalmente la T più basse tra quelle a cui sono state fatte le misure). L'applicazione di questo modello è stata progressivamente abbandonata dato che alcune sue assunzioni di base ne rendono problematica l'applicazione: l'assenza di limitazioni substrato dipendenti alla respirazione, il valore di E_0 che si assume rimanere costante attraverso tutta la serie di reazioni della catena respiratoria, sono tra queste (Atkin et al., 2005a). Più utilizzato è invece il modello che fa riferimento all'originaria formulazione proposta da van't Hoff e Arrhenius che descrive la R_D come se fosse un singolo processo enzimatico. In questa formulazione il Q_{10} può essere derivato da un'equazione esponenziale ($R = ae^{bT}$) dove a e b sono costanti e T è la temperatura. Il calcolo del Q_{10} richiede quindi un minimo di due T e spesso viene calcolato tramite (Atkin e Tjoelker, 2003):

$$Q_{10} = \left(\frac{R_2}{R_1} \right)^{\left[\frac{10}{(T_2 - T_1)} \right]}$$

Eq. 6

dove R_1 è il tasso di respirazione misurato alla temperatura più bassa (T_1) e R_2 quello alla T più alta (T_2). Nonostante questo modello ignora la diversa sensibilità alla T di ognuno dei passaggi enzimatici che compongono il processo di respirazione, è ampiamente usato per descriverne il cambiamento per aumenti di T di 10°C . Probabilmente questo modello può funzionare in virtù dell'alto grado di coordinazione tra le varie fasi del processo di respirazione (Kruse, 2011), ma le Eq 5 e 6, non riescono comunque a dare informazioni della misura con cui il Q_{10} varia tra differenti intervalli di T (Q_{10} può essere temperatura dipendente e variare a seconda che lo si calcoli per diversi intervalli di T) (Atkin et al., 2005a). Se ponendo in relazione il log della R_D e le temperature di misura, la funzione è lineare, si può affermare che la variazione a breve termine della T non ha effetti sul Q_{10} ; in questo caso il Q_{10} può essere determinato anche come la pendenza della retta risultante (Atkin et al., 2000) e un solo Q_{10} può essere usato per definire la sensibilità della R_D alla T . A partire da quanto detto, la R_D può essere determinata come (Tjoelker et al., 2008; Ow et al., 2010):

$$R = R_{\text{REF}} \times Q_{10}^{\left[\frac{T-T_{\text{REF}}}{10}\right]} \quad \text{Eq. 7}$$

La dipendenza della R_D dalla T è dunque funzione della respirazione basale (R_{REF}) e del Q_{10} , che descrivono rispettivamente l'intercetta e il grado di curvatura della funzione esponenziale che meglio descrive l'andamento della R_D tra la T_{REF} e la T scelta. L'eq. 7 permette di calcolare la R_D a differenti T , in assenza di dati sperimentali.

Una visione d'insieme della letteratura evidenzia come il Q_{10} sia tutt'altro che costante e può variare tra 1.4 e 4.2 (Tjoelker et al., 2001) in risposta a numerosi fattori tra cui la disponibilità di acqua e nutrienti, irradianza, stagionalità e per range di T di misura compresi tra 10 e 30 °C. Dunque assumere che le variazioni di R_D rispetto alla temperatura seguono una funzione esponenziale con un tasso di incremento costante ($Q_{10} \sim 2$) può portare ad una sovrastima o ad una sottostima dei tassi di respirazione su lungo periodo (Tjoelker et al., 2008). Un passaggio chiave è quello di considerare il peso che il processo di acclimatazione ha nella variazione del Q_{10} e della R_{REF} e come questo sia influenzato da altri fattori ambientali (Atkin e Tjoelker, 2003; Wythers et al., 2005; Tjoelker et al., 2007; Bruhn et al., 2008). Il processo di acclimatazione può essere definito come l'aggiustamento del tasso di R_D per compensare il cambiamento di temperatura (Atkin et al., 2000). Processi di acclimatazione possono avvenire nell'arco di 1 o 2 giorni e sono legati al cambiamento nella regolazione degli enzimi respiratori, o mediati da una differente espressione genica. Atkin e Tjoelker (2003) hanno proposto un modello sintetico per schematizzare il processo di acclimatazione proponendo due tipologie di acclimatazione alla temperatura di crescita (Fig. 2.8 a). La tipologia I è associata con il cambiamento della curvatura della funzione R_D vs T (Q_{10}), mentre la tipologia II comporta il cambiamento dell'intercetta (R_{REF}). Anche il raggiungimento dell'omeostasi, presente quando piante che vivono in intervalli di T diversi hanno uno stesso tasso di R_D ad una data T , costituisce un meccanismo di acclimatazione. L'acclimatazione di tipo I si verifica maggiormente in foglie espanse, ha minori effetti sul cambiamento del tasso di R_D , ma comporta rapidi aggiustamenti della respirazione soprattutto quando le variazioni di T nel breve periodo portano ad un aumento di quest'ultima (Atkin et al., 2005b); probabilmente, vista la sensibilità del Q_{10} alla quantità di substrato, i rapidi aggiustamenti possono essere legati all'effetto che la T ha sulla quantità di substrato (Covey-Crump, 2002). La tipologia II di acclimatazione comporta una variazione della R_{REF} sia per aumenti che per

diminuzioni della T di crescita, con il tasso di R_D che aumenta nel caso in cui si passa da T maggiori a T minori, e diminuisce quando da T più basse si va verso T alte (Fig. 2.8 b). Il meccanismo che sovrintende a questa tipologia di acclimatazione non è ben compreso; dall'analisi di alcuni studi condotti indipendentemente (Klikoff, 1996) i due autori ipotizzano che tali variazioni in R_{REF} siano dovute a cambiamenti nell'attività enzimatica o nel numero di mitocondri, associando il tipo II di acclimatazione alla formazione di nuovi tessuti (Atkin e Tjoelker, 2003). Questa ipotesi ha importanti implicazioni ecologiche, sostenendo implicitamente che specie con un'emivita fogliare lunga (es. specie sempreverdi) potrebbero avere minore capacità di acclimatarsi a cambiamenti in T su lungo termine. Si avverte perciò la necessità di approfondire quali fattori ambientali, oltre la T , riescano a spiegare le variazioni di R_{REF} .

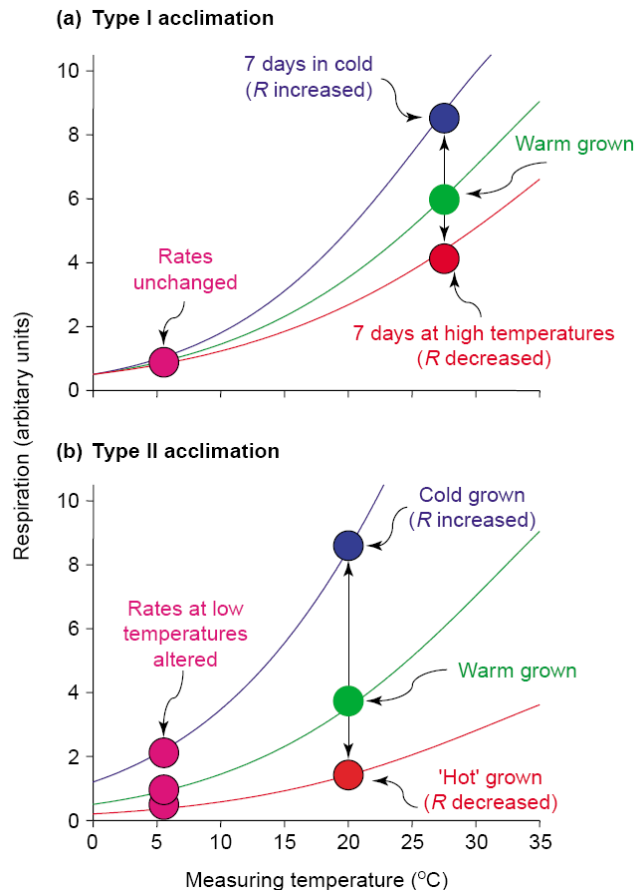


Fig. 8 – Due tipologie di acclimatazione proposte da Atkin e Tjoelker, 2003. a) un cambiamento nella temperatura, comporta un cambiamento in Q_{10} (pendenza della curva) e nessuna variazione per la R_{REF} (intercetta). b) Tipologia di acclimatazione II determina uno spostamento della respirazione basale. La Tipologia II comporta un maggior grado di omeostasi della tipologia I.



CAPITOLO III

*Effetti dello spray marino, dell'ozono troposferico e della loro interazione sugli scambi gassosi e la funzionalità dei fotosistemi in due specie della macchia mediterranea.*¹

Abstract: Gli ecosistemi costieri mediterranei di macchia sono soggetti a molteplici stress di natura ossidativa di origine naturale ed antropica, come lo spray marino (SS) e ozono troposferico (O₃). L'ipotesi sperimentale che si intende verificare è quella che tra i due stress ci sia un'interazione additiva come conseguenza di una maggiore quantità di produzione e accumulo di specie reattive all'ossigeno. Per testare l'ipotesi formulata è stata condotto un esperimento in condizioni semi-controllate in strutture Open Top Chambers su piante di *Quercus ilex* L. e *Arbutus unedo* L. che sono state esposte a due livelli di O₃ (+ 30% e - 50% rispetto alle concentrazioni ambientali) e, per ogni trattamento O₃, sono state effettuate nebulizzazioni con acqua deionizzata (piante controllo) e nebulizzazioni con spray salino. A fine esperimento, la risposta delle specie è stata valutata tramite l'integrazione di misure strutturali (accrescimento in altezza e numero di foglie), e fisiologiche (scambi gassosi al livello fogliare, e misure di fluorescenza di clorofilla *a*). I risultati ottenuti non sono in linea con l'ipotesi formulata in quanto, dove presente, l'interazione è di tipo antagonista. La struttura di entrambe le specie è negativamente influenzata dall'azione dello spray marino, ma in *A. unedo* quando gli stress interagiscono, si verifica un aumento dell'accrescimento. Gli stress imposti e la loro interazione, hanno uno scarso effetto sulla fisiologia di *A. unedo*, mentre in *Q. ilex* lo spray marino determina una riduzione dell'assimilazione e dell'efficienza del PSII. Nell'interazione il rapporto PSII/PSI diminuisce, e da questo sembra dipendere un aumento dell'assimilazione. *A. unedo* si è mostrato più resistente ai singoli stress e alla loro interazione mentre in *Q. ilex* è presente un'interazione antagonista, e il funzionamento del PSI ha un ruolo sostanziale nel non generare un'interazione additiva tra gli stress.

¹ Esposizione del lavoro pubblicato su: *Environmental and Experimental Botany*, 2011. 73, 80-88. (Appendice I)



CAPITOLO IV

Ozono e salinità al suolo: meccanismi d' interazione, effetti sulla performance fotosintetica e aggiustamenti biochimici in due specie della macchia mediterranea.

Abstract: Dando seguito all'indagine sugli effetti degli stress ossidativi di origine naturale ed antropica su specie sempreverdi della macchia nelle aree costiere mediterranee, si è effettuato un ulteriore esperimento in condizioni semi-controllate in strutture Open Top Chambers, studiando l'effetto che la salinità al suolo (S) e l'O₃ hanno su piante di *Quercus ilex* L. e *Arbutus unedo* L. Sono state svolte misure strutturali, ecofisiologiche e biochimiche, per meglio definire i meccanismi di azione e d'interazione tra gli stress considerati. Ci si attende che le due specie presentino una differente resistenza allo stress salino: in particolare si ipotizza che *Q. ilex* sia una specie sensibile, mentre *A. unedo* risponda con strategie tipiche di una specie resistente; l'interazione attesa è di tipo antagonista ipotizzando che in presenza di ozono si verifichi una up-regulation delle difese antiossidanti. Per testare l'ipotesi formulata le due specie sono state esposte a due livelli di O₃ (+ 30% e - 50% rispetto alle concentrazioni ambientali) e, per ogni trattamento O₃, sono state effettuate due tipologie di irrigazione: con acqua (piante controllo) e con una soluzione salina 75 mM. Le misure ecofisiologiche svolte a 25, 45 e 65 giorni dall'inizio dell'esperimento, hanno evidenziato come dopo una risposta attiva agli stress imposti (dopo 25 gg), le specie abbiano differenziato i meccanismi di risposta ai singoli stress e all'interazione, confermando entrambe una spiccata resistenza agli stress ossidativi. Contrariamente a quanto atteso, *Q. ilex* presenta aggiustamenti strutturali e fisiologici tipici di specie resistenti alla salinità, mentre *A. unedo*, sebbene mantenga la propria funzionalità a livello fotochimico e fotosintetico, è una specie moderatamente tollerante. Le due specie si differenziano inoltre per la risposta all'O₃, che pare essere un fattore chiave nel determinare la tipologia dell'interazione. Viene inoltre confermato il ruolo chiave del PSI nel mantenimento della funzionalità dell'apparato fotosintetico in presenza di stress ossidativi.

Introduzione

In ambiente mediterraneo la vegetazione sempreverde è sottoposta a stress di differente origine, naturale ed antropica, che si succedono durante la stagione vegetativa. Meccanismi di acclimatazione e adattamento hanno un ruolo centrale nella capacità delle specie di accrescersi e sopravvivere. Le specie mediterranee sono ben adattate ad un ambiente ad alto carico ossidativo, non solo grazie a meccanismi di evitanza dello stress (*avoidance*: chiusura stomatica, aumento della sclerofillia fogliare) ma anche a meccanismi di tolleranza basati sulla modulazione dell'attività metabolica in funzione dell'intensità e della durata dello stress (Hernández et al., 2010). Fra questi, un ruolo importante viene svolto dalla regolazione dell'efficienza fotosintetica e dalla capacità di dissipare l'energia luminosa in eccesso (Muller et al., 2006; Medrano et al., 2009) soprattutto in presenza di una diminuzione della conduttanza stomatica (gs) quando la quantità di luce necessaria a saturare il processo di fotosintesi si riduce (Corcuera et al., 2005). In presenza di livelli elevati di stress la capacità di dissipare l'energia in eccesso e la rigenerazione del pool degli antiossidanti possono non essere sufficienti, comportando una produzione aggiuntiva di specie reattive dell'ossigeno (ROS) all'interno dei cloroplasti.

Specie sempreverdi, con un'emivita fogliare mediamente superiore ai 12 mesi (Navas et al., 2003), investono molti assimilati nella costruzione dell'apparato fogliare e tendono a massimizzare l'assimilazione di carbonio sul lungo periodo per sostenere il costo energetico del mantenimento della funzionalità e dei processi di riparazione (Niinemets et al., 2007; Niinemets et al., 2010). In generale, le specie sclerofille hanno una maggior resistenza agli stress ossidativi rispetto alle specie decidue. Gli ecosistemi a macchia diffusi nelle aree costiere mediterranee sono soggetti ad un aumento dell'esposizione a stress ossidativi e tra questi la salinità al suolo, dovuta sia a fenomeni di intrusione dell'acqua marina nella falda molto spesso presente nelle aree costiere, sia alla deposizione diretta al suolo di spray marino (Greaver e Sternberg, 2010). Negli ultimi decenni è aumentata anche l'esposizione a inquinanti fotochimici come l'ozono troposferico (O₃) a causa dell'aumento del traffico veicolare e dell'urbanizzazione delle aree costiere (Martinez et al., 2007). La pressione di entrambi gli stress, s'intensifica durante i mesi estivi: ad un avanzamento del cuneo salino causato dall'emungimento della

falda per scopi irrigui, si affianca un aumento delle concentrazioni di ozono dovuto a una maggiore irradianza e temperature più alte.

Tra le specie che abitualmente compongono tali ecosistemi, la risposta alla salinità del suolo non è mai stata valutata per *Q. ilex* mentre per *A. unedo* si hanno informazioni unicamente sulle relazioni idriche, e sui tassi di assimilazione, che diminuiscono per livelli di salinità superiori ai 105 mM, ma per questa specie non si conoscono i meccanismi di risposta a livello bio e fotochimico. (Navarro et al., 2007, Navarro et al., 2008). La risposta di *P. latifolia* e *P. lentiscus*, è stata studiata approfonditamente ed entrambe le specie sono risultate resistenti per alti livelli di salinità (160 mM) e dunque più resistenti rispetto ad *A. unedo* (Tattini et al., 2002; Tattini et al., 2006; Tattini e Traversi, 2008). Nonostante non esistano lavori che indagano la risposta alla salinità del suolo per *Q. ilex*, un esperimento in cui questa specie è stata trattata con spray marino (Capitolo III), ha mostrato la presenza di limitazioni stomatiche e non stomatiche all'assimilazione, probabilmente dovute ad un danno di tipo ionico che fa seguito alla penetrazione di NaCl nelle foglie. Nello stesso esperimento invece, non è stata riscontrata una perdita funzionale a carico dell'apparato fotosintetico di *A. unedo*. In generale la tolleranza alla salinità è legata ad una combinazione tra meccanismi di evitanza, che permettono di mantenere basso il flusso di ioni (principalmente Na⁺ e Cl⁻) all'interno delle foglie (Tattini et al., 2006), e di tolleranza alle alterazioni osmotiche e alla presenza di ioni tossici all'interno delle cellule. L'alterazione del potenziale osmotico che segue all'accumulo di ioni nelle foglie è ben sostenuta da specie come la fillirea e il lentisco, sia perché si tratta di specie resistenti ad un alto grado di disidratazione al livello fogliare, sia perché sono in grado di sintetizzare osmoliti (prevalentemente carboidrati solubili) che bilanciano la diminuzione del potenziale osmotico e permettono di compartimentare una maggiore quantità di ioni nei vacuoli (Rontein et al., 2002), senza che questi comportino effetti tossici sui fotosistemi. A giocare un ruolo nella tolleranza allo stress salino c'è anche il funzionamento e la ridondanza dei sistemi antiossidanti di natura enzimatica (SOD, Superossido dismutasi) e non. Tra questi i carotenoidi rivestono una grande importanza nella dissipazione dell'energia in forma di calore, o de-eccitando direttamente le molecole di clorofilla, agendo quindi da sink alternativo per gli elettroni. Rappresentano inoltre il sistema più veloce (pochi secondi) per dissipare energia quando un elevato flusso di potenziale riducente nei fotosistemi abbassa il pH tilacoidale (Gilmore et al. 1998); nell'ordine temporale di minuti invece è il ciclo delle xantofille con l'eossidazione da

zeaxantina a violaxantina che ottimizza la dissipazione dell'energia in entrata nei fotosistemi, permettendo di mantenere basso il livello di produzione di ROS (Demmig-Adams e Adams 2006). L'insieme di questi meccanismi può essere alla base della resistenza dell'apparato fotosintetico di specie che, come visto da esperimenti in cui viene effettuato un periodo di recupero dalla salinità, non subiscono danni irreversibili anche quando la soluzione salina raggiunge concentrazioni pari a 200mM (Tattini et al., 2002). La resistenza delle specie mediterranee agli stress ossidativi è confermata anche dall'ampia letteratura che riguarda l'effetto dell'O₃. Sia da osservazioni in condizioni di campo che controllate emerge che le specie sempreverdi mediterranee si possono considerare tolleranti (es. Bussotti and Gerosa, 2002b; Ribas et al., 2005b). La resistenza all'ozono è stata dapprima legata al fatto che la concomitanza temporale (periodo estivo) tra alte concentrazioni di ozono e la riduzione della gs dovuta allo stress idrico estivo, riducesse il flusso effettivo di tale inquinante all'interno delle foglie (Gerosa et al., 2009b). Tuttavia diversi studi (Heath, 2008, e referenze all'interno) dimostrano come la resistenza dipende sia dal livello costitutivo del pool degli antiossidanti, che dalla capacità di rigenerarli e mantenerli alti (Heath et al., 2009; Wittig et al., 2009). Infatti specie mediterranee esposte a concentrazioni di ozono entro i 40.000 ppb h mostrano un aumento dell'attività antiossidante (Nali et al., 2004). La resistenza è quindi dovuta a risposte "attive" specie specifiche (Bussotti et al., 2007) e includono: l'aumento della fotosintesi nelle zone della foglia non danneggiate (Bussotti et al., 2005); un ispessimento delle cere epicuticolari (Gravano et al., 2004); e la morte programmata delle cellule maggiormente danneggiate (Kangasjärvi et al., 2005).

L'interazione tra salinità al suolo e ozono è stata studiata per specie di interesse agrario (Maggio et al., 2007; Maggio et al., 2009) e ha portato alla conclusione che la salinità, a livelli non elevati, riducendo la conduttanza stomatica, ha un effetto protettivo rispetto all'O₃ limitandone la diffusione nel mesofillo. Tuttavia Wittig et al. (2007, 2009) attraverso una meta-analisi effettuata selezionando studi in condizioni controllate e naturali, mostrano come il quadro dell'interazione fra ozono e stato di idratazione della pianta sia più complesso: in piante ben idratate l'ozono comporta una riduzione della gs, mentre in condizioni idriche limitanti l'ozono può comportare un aumento della gs. Wilkinson e Davies (2010) hanno ulteriormente esplorato la natura di questa interazione antagonista, dimostrando come l'ozono causa un aumento dell'etilene che ha un ruolo nella regolazione stomatica. L'obiettivo di questo lavoro è di determinare quali

aggiustamenti vengono messi in atto da due specie della macchia mediterranea, *Q. ilex* e *A. unedo*, come risposta alla salinità al suolo e all'interazione tra quest'ultima e l'ozono troposferico. Le ipotesi sperimentali sono a) che le due specie presentano una diversa resistenza allo stress salino: *Q. ilex* è una specie sensibile, mentre ci si attende che *A. unedo* risponda con strategie tipiche di una specie resistente; b) che l'interazione attesa è di tipo antagonista perché alla presenza di ozono si avrà una minore limitazione stomatica alla fotosintesi con un conseguente aumento della fissazione di carbonio e delle difese antiossidanti.

2. Materiali e Metodi

2.1 Disegno sperimentale

L'esperimento è stato condotto all'interno di strutture Open Top Chambers (OTCs) situate all'interno del vivaio Forestale della Lombardia a Curno (BG) (Lat. 45°41'17" N, Long. 9°36'40" E, elev. 242 m s.l.). Piantine di due anni delle specie *Q. ilex* e *A. unedo* provenienti dal vivaio forestale della Tenuta Presidenziale di Castelporziano, sono state poste all'interno di vasi (40 cm di diametro 30 L) utilizzando una miscela di sabbia, torba e terra. I trattamenti sono iniziati dopo 90 giorni dal rinvaso e consistevano in una esposizione a due livelli di ozono (O₃) e due tipologie di irrigazione. Le fumigazioni sono state eseguite per 5 giorni a settimana dalle 9:00 alle 19:00, raggiungendo livelli O₃ del 30% superiori rispetto a quelli ambientali (trattamento NF+); l'abbattimento delle concentrazioni ambientali di O₃ di circa il 50% è stato raggiunto grazie all'uso di filtri al carbone attivo (trattamento F). Dieci piante per specie sono state disposte in modo casuale all'interno delle OTC e irrigate a capacità di campo 2 volte a settimana: 5 piante irrigate con acqua corrente (C), e 5 irrigate con soluzione salina (S). La concentrazione finale di 75 mM, è stata raggiunta in tre steps successivi (25, 50, 75 mM), per evitare uno shock osmotico iniziale (Loreto et al., 2003). Il disegno sperimentale comprende 4 OTC con trattamento NF+ e 4 OTC con trattamento F; in ogni OTC erano presenti due livelli di salinità (C e S). I trattamenti nel testo sono individuati con le seguenti sigle: FC, piante controllo, senza O₃ e senza sale; FS, senza O₃ e irrigazione salina; NF+C, con O₃ e senza sale, NF+S, con O₃ e irrigazione salina. All'interno di ogni OTC le concentrazioni di ozono sono state continuamente monitorate tramite analizzatore (Dasibi, Milano, I) gestito

con un sistema di valvole solenoidi. Inoltre le concentrazioni di O₃ nei trattamenti NF+ sono state monitorate in continuo tramite un analizzatore dedicato (modello 42M, EnvironmentS.A., Paris, F). I dati sono stati utilizzati per calcolare l'indice AOT40 per l'intero periodo sperimentale. Temperatura, umidità relativa (50Y, Campbell Scientific Inc., Logan, Utah) e radiazione fotosinteticamente attiva (PAR); 190SZ, LICOR, Lincoln, Nebraska) sono state misurate all'interno di ogni OTC all'altezza di 1 m dal suolo. Inoltre gli stessi parametri sono stati misurati al di fuori delle OTC a 3 m di altezza. Tutta la strumentazione è stata collegata ad un datalogger CR10X (Campbell Sci., Logan, Utah) e i dati acquisiti ogni minuto sono stati memorizzati come medie semi-orarie. Entrambi i trattamenti iniziati il 17 Maggio (DOY 137), si sono conclusi il 6 Agosto 2010 (DOY 218). Le misure su ogni trattamento sono state effettuate in tre date diverse: a **M1**, dopo 25 giorni (gg) (11/06/2010; DOY 162), a **M2**, dopo 45 gg (2/07/2010; DOY 185), a **M3**, dopo 65 (31/07/2010; DOY 212, **M3**) giorni dall'inizio dei trattamenti.

2.2 Misure strutturali e determinazione degli ioni e dei pigmenti

A fine esperimento sono state eseguite misure distruttive per determinare la biomassa fogliare, legnosa epigea e radicale su quattro piante per ogni specie e trattamento. Dopo la suddivisione nei vari comparti, il materiale è stato posto in stufa a 80 °C per sette giorni per determinarne il peso secco. I dati strutturali sono espressi come rapporto tra la biomassa dei diversi comparti e quella totale (LMR, foglie, SMR, fusti, RMR, radici). 200 mg di materiale proveniente da ogni campione è stato ridotto in polvere per determinarne la composizione ionica. In particolare, il materiale è stato posto in 20 mL acqua ultrapura e tenuto a 95 °C per 2 h, successivamente filtrato con filtro whatman N.1, e portato a volume di 25 mL. I campioni così ottenuti sono stati analizzati in cromatografia ionica tramite Dionex per la determinazione del Cl⁻, e dei cationi (Na⁺, K⁺, Mg⁺⁺, Ca⁺⁺).

Nella terza giornata di misure M3 (DOY 212), tra le 9 e le 10 (a.m.) per ogni OTC sono stati raccolti anche campioni fogliari usati per la determinazione dei pigmenti. Le foglie, immediatamente poste in azoto liquido, sono state utilizzate per la determinazione dei pigmenti fatta usando 30-40 mg di campione estratti in 1.0 ml di N0-N0-dimetilformamide e di seguito tenuti per 8 h al buio. Una parte di questo estratto è stato iniettato in un cromatografo HP1100 per la determinazione dei carotenoidi, e parte è stata

usata per la determinazione della concentrazione di clorofilla, effettuata seguendo il metodo spettrofotometrico seguito da Lichtenthaler (1987).

2.3 Misure ecofisiologiche

Lo studio dell'effetto dei trattamenti sulla performance delle specie studiate è stato determinato tramite misure ecofisiologiche effettuate in M1, M2 e M3. Le misure di scambio gassoso e di fluorescenza della chl *a* sono state effettuate nelle OTCs, mentre per svolgere le curve di induzione della fluorescenza della Chl *a*, le curve di risposta della fotosintesi alla variazione di CO₂ sottostomatica (Pn/Ci) e le curve di risposta della respirazione al buio alla temperatura fogliare (R_D/T), le piante sono state portate in laboratorio. Il dettaglio delle giornate e delle tipologie di misure svolte, sono riportate nella Tab. 1.

Data	DOY	Giorni dall'inizio dell'esperimento	Tipologie di misure	N
11/06	162	25	Ψ _{PD} , RWC Scambi gassosi, Chl <i>a</i> JIP-test, Curve d'induzione	4 4 5 1
04/07	185	45	Ψ _{PD} , RWC Scambi gassosi, Chl <i>a</i> JIP-test, Curve d'induzione	4 4 5 1
31/07	212	65	Ψ _{PD} , RWC Scambi gassosi, Chl <i>a</i> JIP-test, Curve d'induzione, Misure distruttive Pigmenti	4 4 5 1 2 5
1/08-4/08			Curve A/Ci Curve R _D /T	1 1

Tab. 1- Giornate e tipologie di misure ecofisiologiche effettuate. N indica il numero di piante per OTC su cui sono state effettuate misure.

2.3.1 Stato idrico

Lo stato idrico delle piante è stato determinato tramite misure di potenziale idrico fogliare di predawn (Ψ_{PD}) con la camera a pressione di Scholander (PMS Instruments, Oregon, USA). Il contenuto idrico fogliare relativo (RWC, %) è stato calcolato secondo:

$$RWC = \frac{FW - DW}{TW - DW}$$

Dove, FW è il peso fresco, TW è il peso a turgore e DW è il peso secco della foglia dopo permanenza in stufa a 80 °C per tre giorni.

2.3.2 Scambi gassosi e misure di fluorescenza della clorofilla a

Gli scambi gassosi e la fluorescenza diretta della clorofilla a sono state misurate durante le ore centrali del giorno (11:00–15:00 GMT+1) su 4 piante per ogni trattamento, specie e OTC. Assimilazione netta (P_n , $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), traspirazione (E , $\text{mmolH}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), conduttanza stomatica (g_s , $\text{mmolH}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e concentrazione sottostomatica di CO_2 (C_i , ppm) sono state misurate con l'analizzatore all'infrarosso CIRAS 2 (PP Systems, Hitchin, UK) che simultaneamente registra anche parametri ambientali come irradianza (PAR, $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), umidità relativa (RH, %), temperatura ambientale e fogliare (T_a , T_l , °C). Dai valori misurati è stato calcolato il rapporto tra concentrazione sottostomatica e ambientale di CO_2 (C_i/C_a , adimensionale) e l'efficienza dell'uso dell'acqua (WUE) come rapporto tra l'assimilazione e la conduttanza stomatica. Le misure di fluorescenza diretta sono state effettuate utilizzando il fluorimetro Plant Efficiency Analyser (PEA, Hansatech Ltd, UK) su foglie preventivamente adattate al buio per 40 minuti grazie a speciali pinze fogliari. L'impulso saturante era di $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ad una lunghezza d'onda di 650 nm. L'emissione di fluorescenza che ne deriva, è acquisita ad alta velocità (Strasser et al., 1995). Il dettaglio dei parametri considerati è mostrato in Tab. 2, mentre per maggiori informazioni riguardanti la tecnica utilizzata e il JIP-test si rimanda al Capitolo II. I parametri riguardanti gli scambi gassosi e la fluorescenza diretta sono presentati come variazione percentuale rispetto al trattamento controllo (FC) della stessa giornata di misura (sc.gassosi) o come rapporto tra il trattato e il controllo (parametri JIP-test).

2.3.3 Curve di risposta: P_n/C_i , R_D/T

Nei quattro giorni successivi a M3 sono state svolte anche curve di risposta della fotosintesi alla variazione di CO_2 sottostomatica (P_n/C_i), fra le 8:00 e le 14:00, e curve di risposta della respirazione alla temperatura, fra le 18:00 e le 21:00, su quattro piante per ogni trattamento, una per ogni OTC. Durante la misurazione di P_n/C_i i parametri ambientali della cuvetta sono stati controllati per mantenere costanti RH (60%), T_1 (25° C) e PAR (Radiazione fotosinteticamente attiva, 1200 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$). I dati ottenuti sono stati elaborati seguendo il metodo di risoluzione grafica proposto da Long e Bernacchi (2003) escludendo dall'elaborazione i dati a basse concentrazioni di CO_2 , condizione in cui la RuBisco può disattivarsi (Sharkey et al., 2007). Le curve di risposta della respirazione alla temperatura sono state compiute sulle stesse piante usate per le curve P_n/C_i . Le foglie sono state adattate al buio per 30 minuti per evitare picchi di rilascio di CO_2 post-oscuramento (Atkin et al. 1998). La temperatura fogliare è stata variata in 4 steps, da 18, 24, 30 e 36 °C. Per ogni specie e trattamento sono state eseguite 4 curve (1 per ogni OTC replica) e per ogni curva è stata considerata la respirazione misurata alla temperatura di riferimento (R_{REF} , 18 °C), ed è stato calcolato il Q_{10} (Eq. 1):

$$Q_{10} = \left(\frac{R_2}{R_1} \right)^{\left[\frac{10}{(T_2 - T_1)} \right]} \quad \text{Eq. 1}$$

Parametri misurati	Descrizione
$F_{20\mu s} \cong F_0$	Fluorescenza basale registrata a 20 μs (Handy Pea) i RC del PSII sono allo stato ossidato
F_M	Fluorescenza massima raggiunta quando i RC del PSII sono allo stato ridotto
Efficienze	
$\phi P_0 = TR/ABS$	Massima resa quantica della fotochimica primaria al $t=0$
$\phi E_0 = ET/ABS$	Massima resa quantica con cui gli elettroni vengono convogliati nella catena di trasporto elettronico al $t=0$
$\Psi E_0 = ET/TR$	Probabilità con cui (al $t=0$) gli elettroni in entrata sono convogliati nella catena di trasporto elettronico oltre agli accettori primari (QA-)
$\delta P_0 = RE/ET$	Efficienza con cui gli elettroni vengono convogliati dagli accettori intermedi al lato degli accettori del PSI
$\phi R_0 = RE/ABS$	Massima resa quantica con cui avviene, per ogni fotone assorbito, la riduzione degli accettori finali del PSI
Costanti di de-eccitazione	
SumK	Somma delle costanti con cui la clorofilla viene de-eccitata = $K_p + K_n$
K_n	Costante di dissipazione dell'energia per via non fotochimica
K_p	Costante di dissipazione dell'energia per via fotochimica
Flussi specifici (per RC attivi)	
TR/RC	Massimo tasso di assorbimento dell'energia in entrata da parte dei RC attivi del PSII ($t=0$);
ET/RC	Trasporto elettronico
DI/RC	Energia dissipata in forma di calore
RC/CS	Numero di RCs attivi per sezione fogliare analizzata (CS)
Performance Complessiva	
PI_{ABS}	Performace complessiva che considera l'energia assorbita dal PSII: considera la densità dei RC su base dell'energia assorbita, (RC/ABS) la resa massima della fotochimica primaria, [$\phi P_0 / (1 - \phi P_0)$] la capacità di convogliare gli elettroni dal PSII al PSI, [$\Psi_0 / (1 - \Psi_0)$]
PI_{TOT}	Performace complessiva che considera l'energia assorbita dal PSII fino alla riduzione degli accettori finali: $PI_{ABS}(\delta R_0 / (1 - \delta R_0))$

Tab. 2- Descrizione dei parametri tecnici delle curve O-J-I-P e dei parametri JIP-test che sono usati nel testo.

2.3.4 Fluorescenza modulata

Nelle tre giornate di misure (DOY 162, 185, 212), su quattro piante per ogni trattamento, una per ogni OTC replica, sono state fatte curve di induzione della fluorescenza con un fluorimetro modulato PAM-2000 (Walz, Effeltrich, Germany), che variando la qualità e l'intensità della luce a cui il campione è esposto, permettono di misurare il tasso di emissione della fluorescenza legata ai processi fotochimici (che portano alla organizzazione della CO_2) e non fotochimici (dissipazione di energia per calore o fluorescenza). In breve l'efficienza massima del PSII è calcolata come $(F_M - F_0) / F_M$, dove F_M è la fluorescenza massima calcolata da foglie adattate al buio per 40 minuti e F_0 la fluorescenza basale, misurata con un impulso modulato di intensità pari a $1 \mu mol m^{-2} s^{-1}$. La fluorescenza massima alla luce (F_M') è stata determinata con un impulso saturante di 0.8 secondi con una luce LED di intensità pari a $8000 \mu mol m^{-2} s^{-1}$. La curva di

induzione è stata ottenuta esponendo il campione a impulsi saturanti ad intervalli di 20 secondi per una durata complessiva di 5 minuti. Dalle curve di induzione è stato calcolato il Non Photochemical Quenching (NPQ) come $((F_M/F_{M'}) - 1)$, unico dato che viene mostrato in questa esposizione.

2.4 Trattamento statistico dei dati

Tutti i dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza usando un disegno sperimentale a split-plot, con i trattamenti ozono (2 livelli: F e NF+) come fattore principale e la salinità (2 livelli: C e S) come sub-fattore. Per l'analisi è stato utilizzato il software Statistica 7 (StatSoft, Inc., 2007, Tulsa OK, USA).

3 Risultati

3.1 Condizioni ambientali ed esposizione all'ozono

Le condizioni climatiche durante il periodo sperimentale (dalla messa in sito alla conclusione dell'esperimento) sono riportate nella figura 1a e mostrano le medie giornaliere di temperatura, umidità relativa e precipitazioni. L'umidità relativa è rimasta spesso sotto al 60% nei mesi di maggio giugno e luglio, in cui si sono registrati anche i massimi di temperatura (29.6 ± 3.95). I 34 giorni di pioggia si concentrano soprattutto nei mesi di aprile/maggio e la seconda metà di agosto. I valori di RH e T all'interno delle OTC sono rispettivamente maggiori di 2 unità percentuali e di 4 °C rispetto a quelli ambientali ma omogenei fra le OTC. Nelle OTC Filtrate (F) l'AOT40 cumulato ha raggiunto 2.761 ppb h a fronte dei 26.535,78 ppb h ambientali. Nel trattamento NF+, invece i valori di AOT40 cumulato raggiunti sono di 10.870, 21.084 e 34.004 ppb h rispettivamente in M1, M2 e M3 (Fig. 1b).

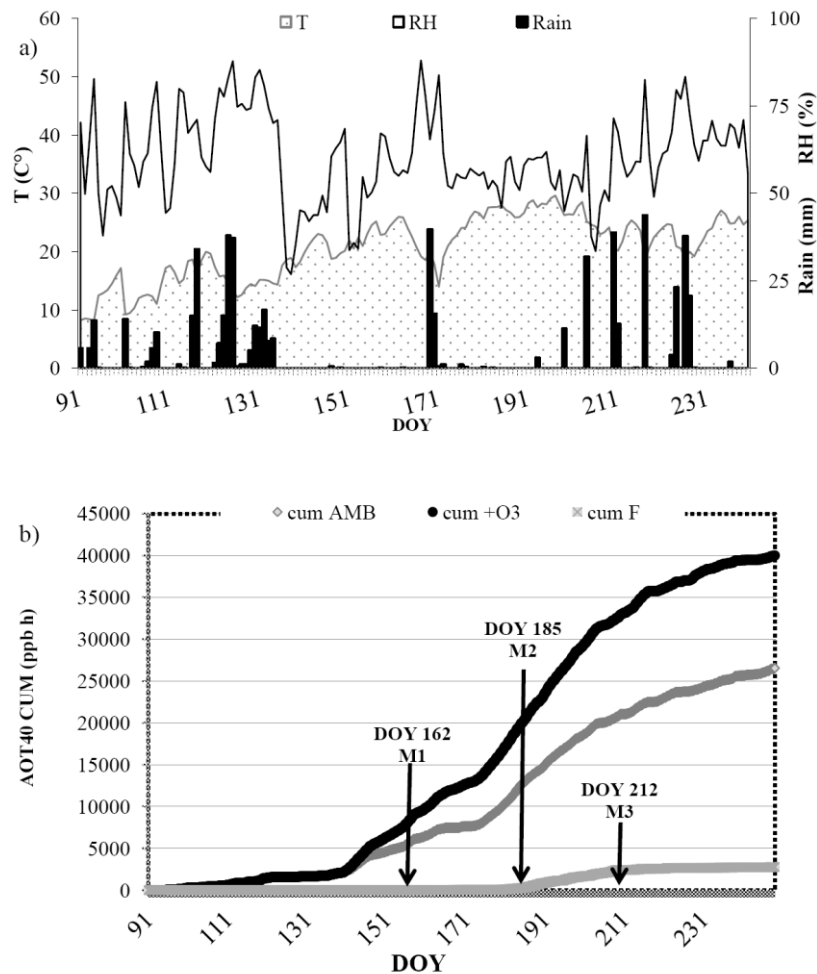


Fig. 1 – Informazioni generali sulle condizioni ambientali in cui è stato svolto l’esperimento. a) Andamento della temperatura, dell’umidità relativa e delle precipitazioni durante il periodo sperimentale. b) Livelli di ozono raggiunti durante il periodo sperimentale mostrati come AOT40 (ottenuto cumulando i valori delle concentrazioni di O₃ superiori ai 40 ppb, tra le 8:00 a.m. e le 19:00 p.m.).

3.2 Misure strutturali e contenuto ionico

La concentrazione di ioni è significativamente influenzata dai trattamenti con sale portando ad un aumento di [Cl⁻] e [Na⁺] rispetto al controllo. Tuttavia, in *Q. ilex* gli ioni vengono compartimentati preferenzialmente nelle radici e nel fusto: nel trattamento FS (- O₃ +S) e NF+S (+ O₃ +S) nelle foglie la [Cl⁻] è più bassa che nelle radici dell’80.76 e del 91.23 % rispettivamente (Fig. 2a).

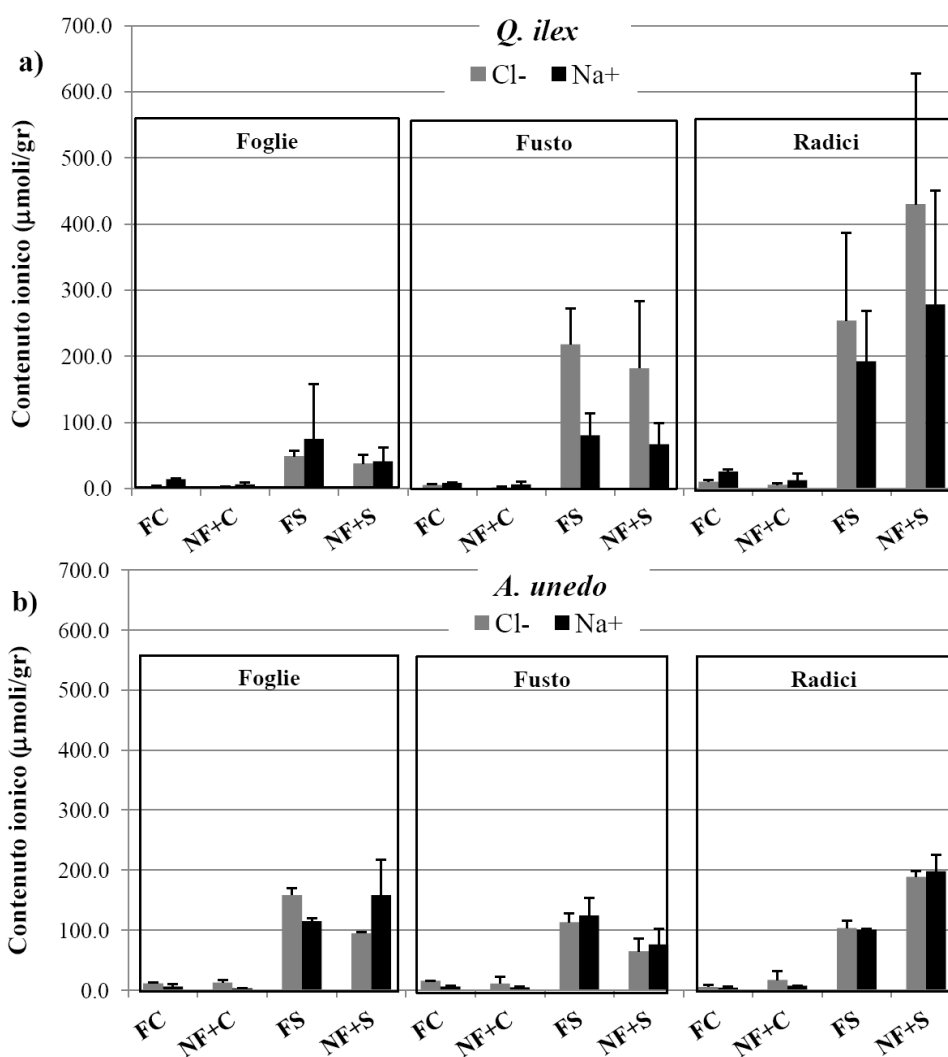


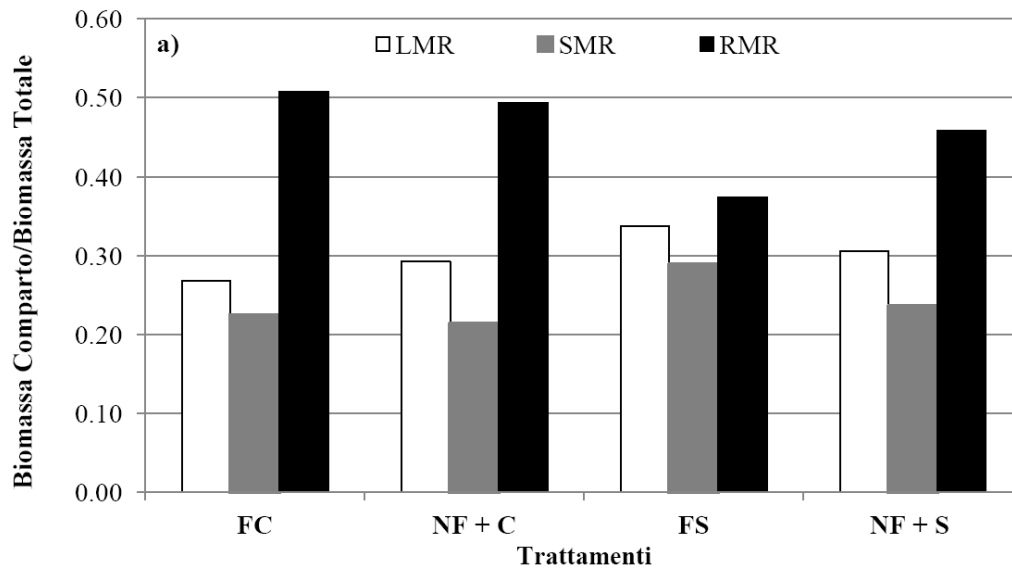
Fig. 2 – Quantità di Cl⁻ e Na⁺ (μmoli/gr) nei diversi comparti della pianta (T) per *Q. ilex* (a) e *A. unedo* (b), per i trattamenti effettuati: FS (- 50% dell' O₃ ambientale + irrigazione salina), NF⁺C (+30% dell' O₃ ambientale, irrigazione normale), NF⁺S (+30% dell' O₃ ambientale, irrigazione salina).

<i>Q. ilex</i>	O ₃	S	T	S*T	O ₃ *S*T
[Cl ⁻]	0.571	0.000	0.007	0.009	0.399
[Na ⁺]	0.922	0.001	0.020	0.041	0.602
<i>A. unedo</i>					
[Cl ⁻]	0.503	0.000	0.001	0.009	0.000
[Na ⁺]	0.112	0.000	0.105	0.106	0.021

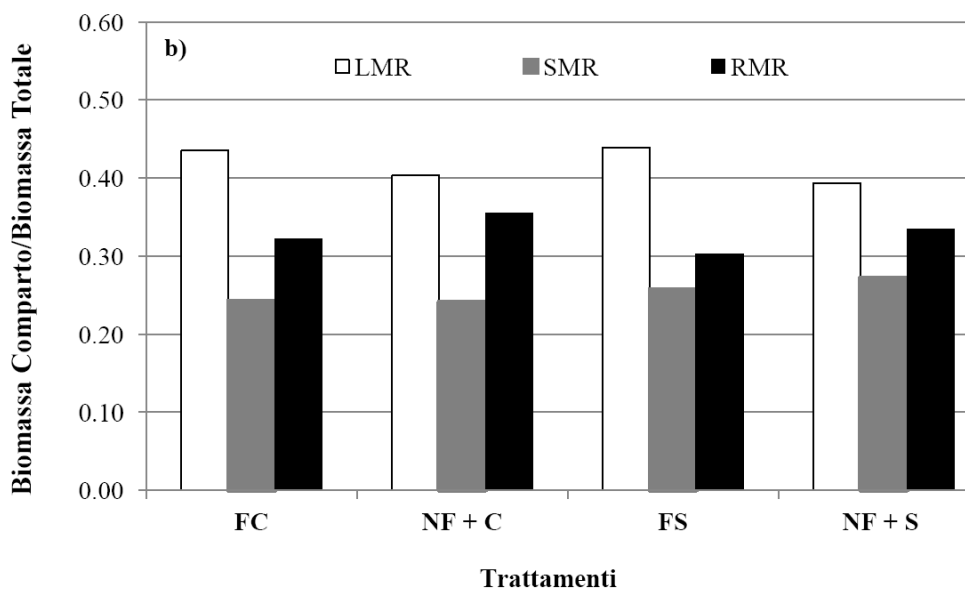
Tab. 3 - Livelli di significatività riferiti alla quantità di ioni all'interno dei comparti della pianta. O₃, effetto dell'ozono; S, effetto della salinità; T, effetto del comparto; O₃*S*T, interazione tra i fattori considerati.

In *A. unedo* invece, non è presente una compartimentazione degli ioni (Fig. 2b) e solo la quantità di Cl^- si distribuisce in modo diverso nei comparti e tra i trattamenti (Tab. 3) con irrigazione salina ($p < 0.001$). Infatti mentre in FS la quantità di Cl^- nelle foglie rispetto alle radici è di + 53.05%, in NF+S è pari a -49.05%.

In *Q. ilex* la variazione della biomassa fogliare e quella radicale rispetto alla totale cambia significativamente solo nel trattamento FS (Fig. 3a): LMR aumenta da 0.26 del FC a 0.34 in FS, mentre RMR diminuisce da 0.51 a 0.38 ($p=0.041$ e 0.013 rispettivamente). Nel trattamento NF+S (+ O_3 +S), LMR e RMR si attestano su valori intermedi fra quelli di FC (- O_3 -S) e FS (- O_3 +S), ma non sono significativamente diversi. In *A. unedo* è l'ozono ad avere un effetto sul LMR, portando a una diminuzione del 7.94 % ($p=0.008$) rispetto al controllo (Fig. 3b).



<i>Q. ilex</i>	Parametri	O ₃	S	O ₃ * S
	LMR	0.860	0.041	0.149
	SMR	0.136	0.052	0.319
	RMR	0.261	0.013	0.125



<i>A. unedo</i>	Parametri	O ₃	S	O ₃ * S
	LMR	0.008	0.832	0.583
	SMR	0.723	0.258	0.681
	RMR	0.201	0.418	0.971

Fig. 3 – Rapporto tra la biomassa dei vari comparti (L, foglie; S, fusto; R, radici) e quella totale con il livello di significatività (p) per i fattori di stress imposti: ozono (O₃) e sale (S) e per la loro interazione (O₃ * S) in *Q. ilex* (a) e *A. unedo* (b), per i trattamenti effettuati: FS (- 50% dell'O₃ ambientale + irrigazione salina), NF⁺C (+30% dell'O₃ ambientale, irrigazione normale), NF⁺S (+30% dell'O₃ ambientale, irrigazione salina).

3.3 Misure ecofisiologiche

3.3.1 Stato idrico

Il potenziale idrico di predawn nel trattamento FS in entrambe le specie diminuisce significativamente già da M1(dopo 25 giorni dall'inizio dell'esperimento), anche se in M3 (65 dopo) la differenza con il controllo si riduce. Tuttavia in M3 l'interazione tra i due fattori di stress, trattamento NF+S, comporta un potenziale idrico significativamente minore sia rispetto a FC che del FS (Tab. 4). Lo stato di idratazione fogliare di *Q. ilex* non è però influenzato dai trattamenti con sale, mentre in *A. unedo* l'RWC diminuisce significativamente nel trattamento FS in M1 e nell'interazione in M2 e M3 (Tab. 4).

a)	Tempo	Specie	Parametri	FC	FS	NF+C	NF+S	<i>p</i>	O ₃	S	O ₃ *S
	M1	<i>Q. ilex</i>	Ψ _{pd}	-0.57 ± 0.01	-0.928 ± 0.04	-0.55 ± 0.012	-0.9 ± 0.12	<i>p</i>	0.137	0.000	1.000
	M2		Ψ _{pd}	-0.57 ± 0.02	-0.91 ± 0.05	-0.54 ± 0.011	-0.93 ± 0.09	<i>p</i>	0.823	0.000	0.688
	M3		Ψ _{pd}	-0.583 ± 0.03	-0.85 ± 0.03	-0.4 ± 0.011	-1.05 ± 0.07	<i>p</i>	0.877	0.000	0.031
	M1	<i>Q. ilex</i>	RWC	84.38 ± 4.68	82.45 ± 4.68	85.02 ± 3.10	83.47 ± 4.02	<i>p</i>	0.322	0.205	0.890
	M2		RWC	79.51 ± 6.36	75.80 ± 6.88	81.5 ± 9.28	80.18 ± 9.11	<i>p</i>	0.337	0.223	0.565
	M3		RWC	86.60 ± 7.01	85.80 ± 3.70	87.49 ± 6.83	86.9 ± 4.31	<i>p</i>	0.357	0.692	0.932
b)	Tempo	Specie	Parametri	FC	FS	NF+C	NF+S	<i>p</i>	O ₃	S	O ₃ *S
	M1	<i>A. unedo</i>	Ψ _{pd}	-0.50 ± 0.02	-0.96 ± 0.03	-0.48 ± 0.015	-0.90 ± 0.04	<i>p</i>	0.324	0.000	0.209
	M2		Ψ _{pd}	-0.53 ± 0.01	-0.98 ± 0.02	-0.46 ± 0.024	-0.91 ± 0.05	<i>p</i>	0.121	0.000	0.875
	M3		Ψ _{pd}	-0.4 ± 0.02	-0.73 ± 0.03	-0.33 ± 0.04	-0.92 ± 0.02	<i>p</i>	0.452	0.000	0.058
	M1	<i>A. unedo</i>	RWC	78.81 ± 7.25	76.11 ± 8.60	85.74 ± 12.77	73.32 ± 11.24	<i>p</i>	0.772	0.014	0.130
	M2		RWC	89.3 ± 5.15	82.62 ± 6.95	81.31 ± 6.05	81.20 ± 6.17	<i>p</i>	0.101	0.222	0.022
	M3		RWC	92.2 ± 3.30	87.23 ± 3.23	87.08 ± 3.96	86.11 ± 3.86	<i>p</i>	0.007	0.008	0.002

Tab. 4 – Valori medi di potenziale idrico di predawn (Ψ_{PD} , MPa) e di contenuto relativo di acqua (RWC, %) per specie e trattamento, nelle tre giornate di misura (M1, dopo 25 gg; M2, dopo 45 gg; M3, dopo 65 gg dall'inizio dell'esperimento), con i rispettivi livelli di significatività per i diversi trattamenti: FS (- 50% dell'O₃ ambientale + irrigazione salina), NF+C (+30% dell'O₃ ambientale, irrigazione normale), NF+S (+30% dell'O₃ ambientale, irrigazione salina), per ognuno fattori di stress imposti: ozono (O₃) e sale (S) e per la loro interazione (O₃ * S).

3.3.2 Scambi gassosi

Entrambe le specie hanno risposto al trattamento O₃ in M1, comportando una diminuzione del 22.3% della gs in *Q. ilex*, mentre in *A. unedo* la gs aumenta del 52% (Fig. 4a e 5a). L'effetto dell'ozono è comunque transitorio e perde di significatività nei restanti giorni di misura (Fig. 4 e 5, Tab. 8, 9).

In *Q. ilex* nel trattamento FS si registra una diminuzione della gs e della Pn in tutte e tre le giornate di misura, ma la riduzione di Pn è attribuibile unicamente ad una limitazione

stomatica. Il rapporto tra C_i/C_a non varia (Fig. 4a e b). Questo è confermato anche nell'ultima giornata (Fig. 4c) dove nel trattamento FS c'è un aumento significativo di WUE e una diminuzione del rapporto C_i/C_a , quest'ultimo determinato dal fatto che ad un ulteriore diminuzione della g_s (da -46.41 in M2 a -65.21 % in M3), non si accompagna un proporzionale calo della P_n (-36.38 in M2, -44.45 % in M3). Anche in *A. unedo* la diminuzione della P_n dovuta all'effetto del sale (FS), è imputabile ad una limitazione stomatica (Fig. 5). Infatti il rapporto C_i/C_a non varia e, nei trattamenti con irrigazione salina, l'efficienza dell'uso dell'acqua (WUE) aumenta significativamente.

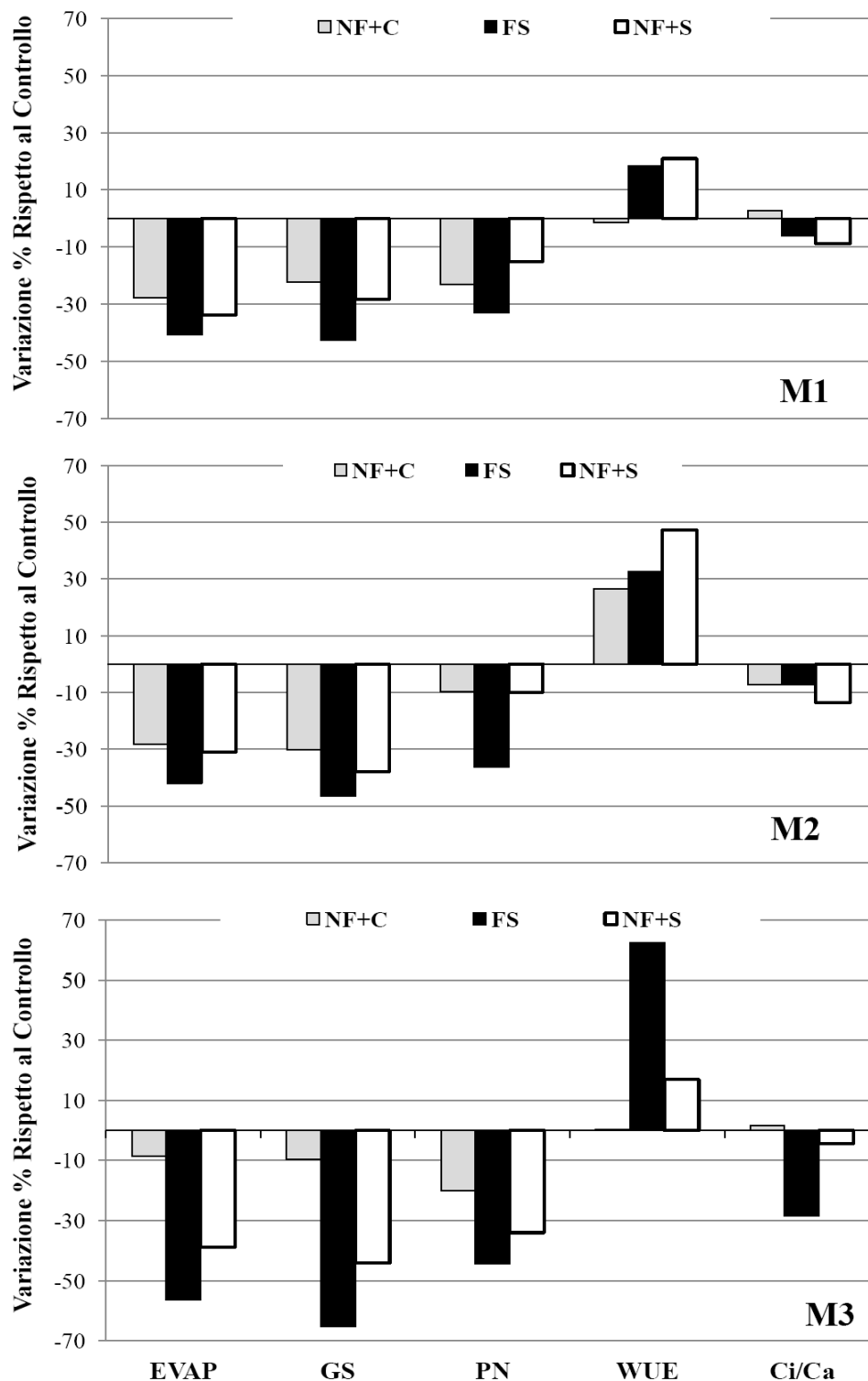


Fig. 4 – *Q. ilex*. Variazione percentuale di tutti i trattamenti rispetto al controllo (FC), per i parametri analizzati: **EVAP**= traspirazione; **gs** = conduttanza stomatica; **Pn**= assimilazione netta; **WUE**= efficienza di uso dell'acqua; **Ci/Ca** = rapporto tra la concentrazione di CO₂ interna e quella ambientale: il valore di questo rapporto aumenta quando sono presenti limitazioni non stomatiche alla fotosintesi. Trattamenti: **FS** (- 50% dell'O₃ ambientale + irrigazione salina), **NF⁺C** (+30% dell'O₃ ambientale, irrigazione normale), **NF⁺S** (+30% dell'O₃ ambientale, irrigazione salina). La significatività delle variazioni è riportata in Tabella 8.

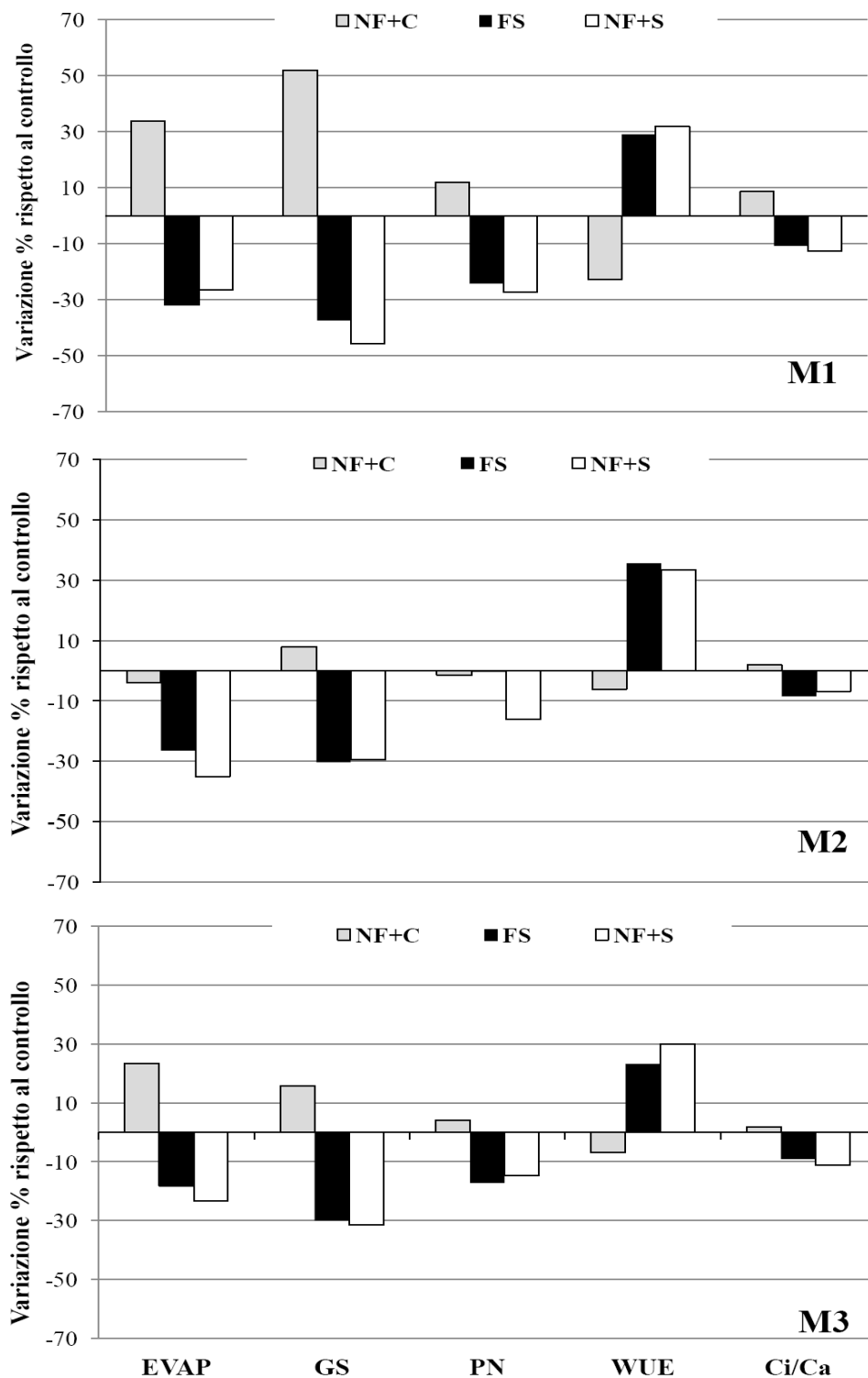


Fig. 5 - A. unedo. Variazione percentuale di tutti i trattamenti rispetto al controllo (FC), per i parametri analizzati: **EVAP**= traspirazione; **gs** = conduttanza stomatica; **Pn**= assimilazione netta; **WUE**= efficienza di uso dell'acqua; **Ci/Ca** = rapporto tra la concentrazione di CO₂ interna e quella ambientale: il valore di questo rapporto aumenta quando sono presenti limitazioni non stomatiche alla fotosintesi. Trattamenti: **FS** (- 50% dell'O₃ ambientale + irrigazione salina), **NF⁺C** (+30% dell'O₃ ambientale, irrigazione normale), **NF⁺S** (+30% dell'O₃ ambientale, irrigazione salina). La significatività delle variazioni è riportata in Tabella 9.

In questa specie la diminuzione rispetto al controllo di g_s e P_n rimane costantemente intorno al -30%. In *Q. ilex* l'interazione è di tipo antagonista e influenza significativamente tutti i parametri a 25, 45 e 65 giorni dall'inizio dei trattamenti (M1, M2 ed M3 rispettivamente; Fig. 4; Tab. 8). In *A. unedo* l'interazione, quando presente, è di tipo sinergico: in M1 è significativa su E ed g_s (Tab. 9), mentre in M3 a variare significativamente ($p=0.045$) è il tasso di traspirazione (Fig. 5 a e c). Alla fine dell'esperimento, l'efficienza di carbossilazione (V_c) e il punto di compensazione (Γ) di entrambe le specie non è significativamente alterato da nessuno dei trattamenti. Nessuno dei trattamenti ha avuto un effetto sulla respirazione di riferimento né sulla sensibilità della respirazione alla T (Tab. 5).

Specie	Parametri		FC	NF+C	FS	NF+S	
<i>Q. ilex</i>	Γ	Media	70.78	78.31	74.90	69.78	<i>n.s.</i>
		Dev. St	12.65	22.72	12.51	17.03	
	V_c	Media	0.081	0.072	0.062	0.078	<i>n.s.</i>
		Dev. St	0.01	0.02	0.01	0.04	
	R_{18}	Media	0.41	0.42	0.46	0.71	<i>n.s.</i>
		Dev. St	0.04	0.07	0.10	0.13	
	Q_{10}	Media	2.29	1.78	1.93	1.91	<i>n.s.</i>
		Dev. St	0.14	0.09	0.28	0.20	

Specie	Parametri		FC	NF+C	FS	NF+S	
<i>A. unedo</i>	Γ	Media	76.54	74.70	78.97	79.93	<i>n.s.</i>
		Dev. St	9.46	10.33	11.10	12.12	
	V_c	Media	0.055	0.047	0.050	0.059	<i>n.s.</i>
		Dev. St	0.01	0.02	0.01	0.02	
	R_{18}	Media	0.55	0.52	0.54	0.64	<i>n.s.</i>
		Dev. St	0.09	0.13	0.11	0.25	
	Q_{10}	Media	1.86	1.91	1.84	1.92	<i>n.s.</i>
		Dev. St	0.20	0.25	0.31	0.13	

Tab. 5 – Parametri ricavati dalle curve di risposta della P_n ed R_D alla C_i e alla temperatura rispettivamente. In tabella vengono riportati: punto di compensazione della CO_2 (Γ , ppm), ed efficienza di carbossilazione (V_c , $mol\ m^{-2}s^{-1}$); R_{18} ($\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$) respirazione alla T di riferimento 18 °C, Q_{10} sensibilità della R_D alla temperatura.

3.3.3 Parametri JIP-test

Ozono

L'ozono influisce significativamente sui parametri ricavati dalla fluorescenza diretta. In *Q. ilex* l'effetto dell'O₃ è presente solo in M1 mentre in *A. unedo* un effetto significativo si ha anche in M2 e M3. In *Q. ilex* (Fig. 6) c'è un aumento nei parametri conformazionali (SumK, K_p, K_n) che ci informano sull'efficienza con cui avvengono i processi di de-eccitazione del PSII per via fotochimica e non, e dell'efficienza massima (ϕP_o). Si registra inoltre una maggiore capacità di trapping e di dissipazione per RC attivo (Fig. 6). In *A. unedo* (Fig. 7) i primi effetti dell'ozono sono sovrapponibili a quelli registrati in *Q. ilex*. L'energia in entrata viene de-eccitata in modo controllato: SumK, K_n e K_p aumentano significativamente (Tab. 8). In M2, i flussi specifici diminuiscono (TR/RC, ET/RC), come pure le costanti di de-eccitazione (SumK e K_p). A fine esperimento (M3) si registra un aumento del potere riducente che arriva agli accettori finali (RE/ABS).

Salinità al suolo

Il trattamento salino ha avuto un diverso effetto sui fotosistemi delle due specie. In *Q. ilex* a 25 giorni (M1) dall'inizio dei trattamenti non ci sono effetti dovuti alla salinità, che in M2 determina una limitazione dell'energia in entrata nel PSII (diminuisce il TR/RC), e in M3 porta ad un aumento sia nell'efficienza con cui gli elettroni vengono convogliati dal complesso antenna ai centri di reazione (Ψ_0), sia del pool di accettori finali disponibili (ΔV_{IP}). In *A. unedo* si possono evidenziare due fasi distinte: in M1 si ha un aumento delle efficienze di utilizzo dell'energia in entrata e dei performance index (ABS e totale), come anche dell'attività del PSI (aumento RE/ABS, RE/ET). La seconda fase (M3, dopo 65 giorni dall'inizio del trattamento) è caratterizzata invece da una diminuzione sia nel flusso di elettroni in entrata per RC attivo, sia dell'efficienza con cui vengono ridotti gli accettori finali (RE/ABS).

Interazione tra fattori di stress: Ozono e salinità al suolo

L'interazione tra ozono e salinità al suolo in *Q. ilex* è significativa (Tab. 8) su 2 dei 17 parametri considerati in M1 e M3, e su 6 dei 17 parametri in M2 (4/07/2010), giorno più caldo tra quelli in cui sono state effettuate le misure ecofisiologiche (media giornaliera 27.93 ± 4.60 , T_{max} 33.19). In M1 il trasporto elettronico e la dissipazione dell'energia per

RC aumenta; in M2 l'interazione antagonista comporta un aumento del K_n , dell'efficienza massima riferita al funzionamento degli RE (RE/ABS) e del PI_{TOT} . In M3 aumenta l'efficienza con cui gli elettroni vengono convogliati agli accettori primari (Ψ_0) cresce come pure si registra un aumento del turn-over dal lato degli accettori del PSI (ΔV_{I-P}). In *A. unedo* l'interazione è significativa unicamente in M2 (Tab. 9) comportando una variazione dei flussi specifici per centro di reazione: diminuisce il trapping e contemporaneamente l'energia dissipata per RCs.

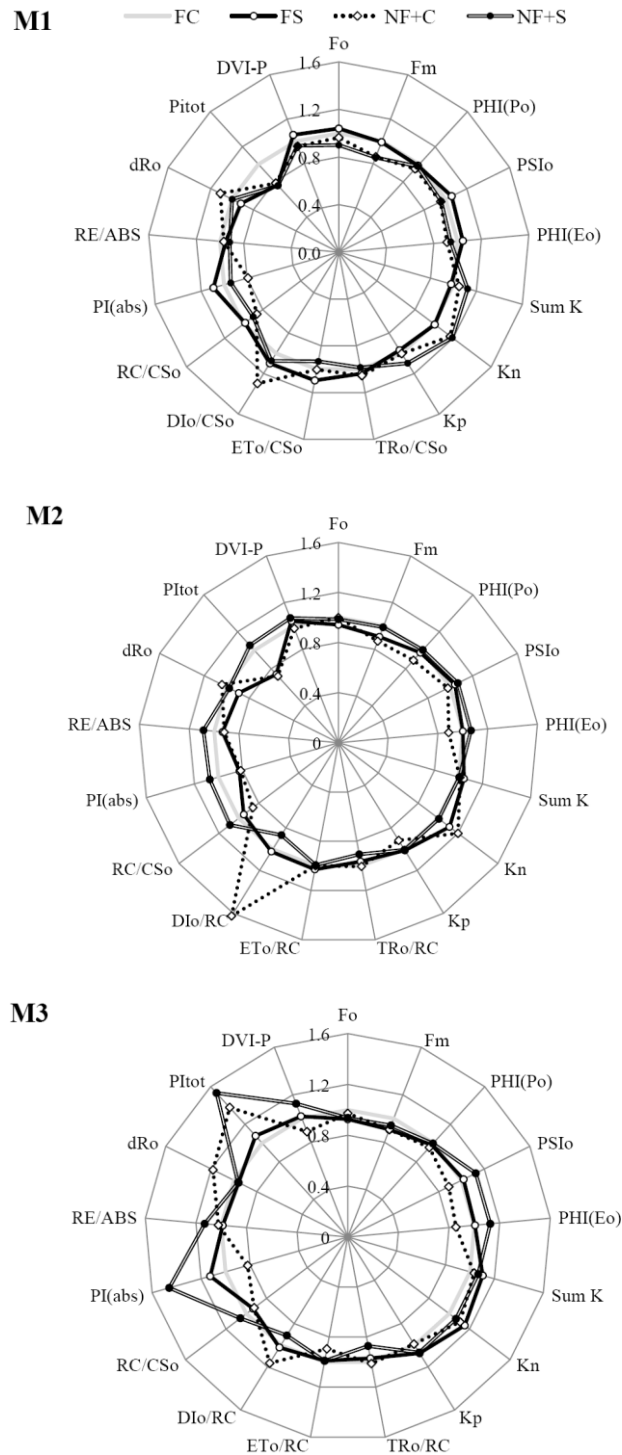


Fig. 6 – Radar plot raffiguranti i cambiamenti nei parametri JIP-test per *Q. ilex*. I parametri sono riportati come variazione rispetto al trattamento di controllo (FC - 50% dell'O₃ ambientale, irrigazione normale), nelle diverse giornate di misura (M1- 25 gg, M2-45 gg, M3- 65 gg dall'inizio dell'esperimento). Trattamenti: FS (- 50% dell'O₃ ambientale + irrigazione salina), NF⁺C (+30% dell'O₃ ambientale, irrigazione normale), NF⁺S (+30% dell'O₃ ambientale, irrigazione salina). La significatività delle variazioni è riportata in Tab. 8.

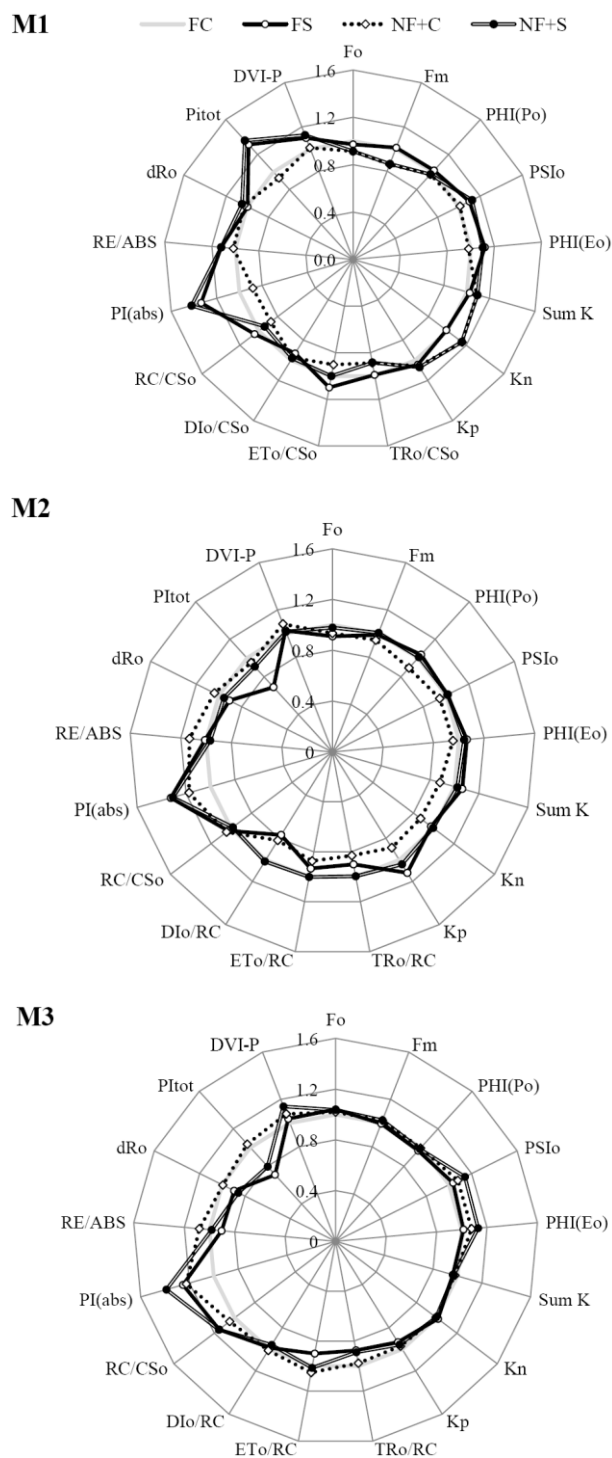


Fig. 7 – Radar plot raffiguranti i cambiamenti nei parametri JIP-test per *A. unedo*. I parametri sono riportati come variazione rispetto al trattamento di controllo (FC - 50% dell'O₃ ambientale, irrigazione normale), nelle diverse giornate di misura (**M1**- 25 gg, **M2** -45 gg, **M3**- 65 gg dall'inizio dell'esperimento). Trattamenti: FS (- 50% dell'O₃ ambientale + irrigazione salina), NF⁺C (+30% dell'O₃ ambientale, irrigazione normale), NF⁺S (+30% dell'O₃ ambientale, irrigazione salina). La significatività delle variazioni è riportata in Tab. 9.

3.3.4 Fluorescenza modulata e quantità di pigmenti

In *Q. ilex* il Non Photochemical Quenching (NPQ) aumenta significativamente ($p= 0.043$) nel trattamento FS soltanto a fine esperimento, M3 (Fig. 8a, Tab. 8). Mentre nessun effetto è presente su *A. unedo*.

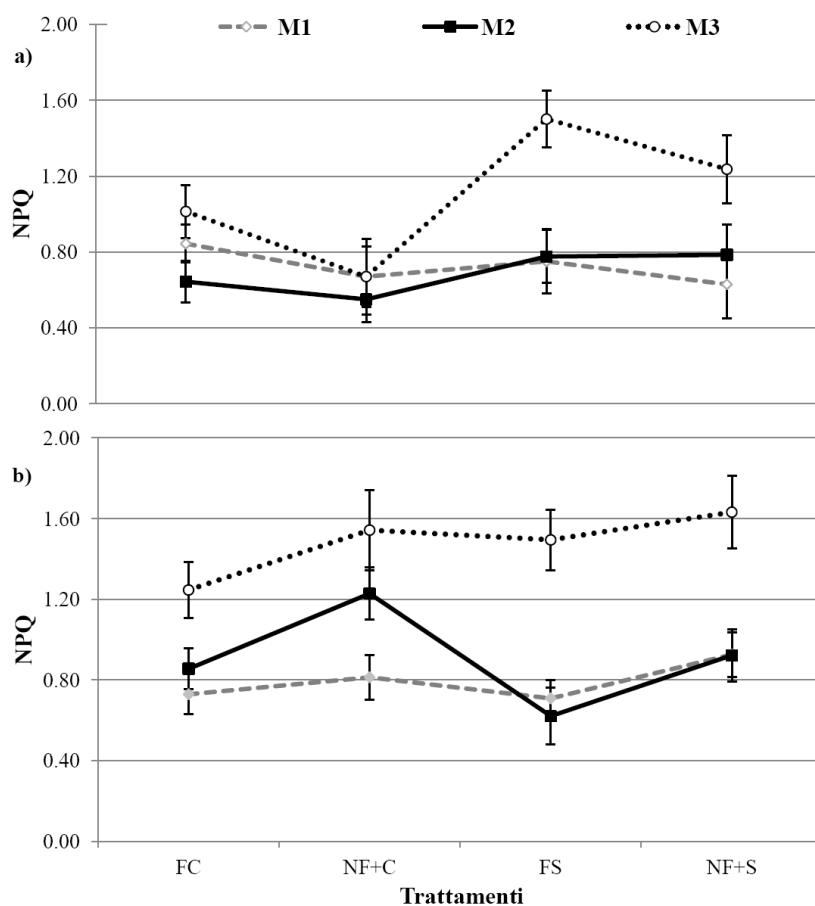


Fig. 8 – Valori di NPQ (Non Photochemical Quenching) per *Q. ilex* (a) e *A. unedo* (b) nelle tre giornate di misure (M1- 25 gg, M2-45 gg, M3- 65 gg dall'inizio dell'esperimento), per i diversi trattamenti: FS (- 50% dell'O₃ ambientale + irrigazione salina), NF⁺C (+30% dell'O₃ ambientale, irrigazione normale), NF⁺S (+30% dell'O₃ ambientale, irrigazione salina). La significatività delle variazioni è riportata in Tab. 8 per *Q. ilex*, Tab. 9 per *A. unedo*.

Analizzando i valori relativi all'analisi dei pigmenti effettuata in M3 (Tab. 6 e 7), emerge come in *Q. ilex* gli aggiustamenti biochimici sono presenti unicamente nel trattamento NF+S, comportando un aumento del tasso di epossidazione (DES, A+Z/(V+A+Z)) della violaxantina in zeaxantina la cui concentrazione aumenta. Il pool costitutivo di

violaxantina che nei trattamenti NF+C e FS diminuisce seppur non significativamente rispetto al controllo, nell'interazione ritorna a valori confrontabili a FC. L'interazione tra stress ha determinato un tendenziale aumento dei carotenoidi seppur non significativo ($p=0.242$). In *A. unedo* (Tab. 7) è il trattamento sale che determina un maggior aggiustamento al livello biochimico: infatti, aumenta la Zeaxantina (+ 41.91 % in più rispetto al controllo) e seppur in modo non significativo ($p= 0.059$), viene aumentato il pool costitutivo di Violaxantina (+ 59.37 % rispetto al controllo). Aumenta significativamente la quantità di carotenoidi ($p=0.004$) mentre le clorofille (a e b) diminuiscono, ma in proporzione diversa: infatti l'effetto della salinità comporta l'aumento del rapporto Chl a/Chl b, imputabile alla cospicua diminuzione di Chl b. Anche l'ozono determina un aumento della quantità di zeaxantina, che nel caso dell'interazione arriva a valori doppi rispetto al trattamento NF+C.

<i>Q. ilex</i>	Parametri	C	NF+C	FS	NF+S	O ₃	S	O ₃ *S
	VIOLAX	0.114±0.04	0.064±0.02	0.067±0.02	0.101±0.01	0.526	0.691	0.005
	ANTER	0.054±0.01	0.067±0.01	0.047±0.02	0.069±0.03	0.112	0.803	0.680
	ZEAX	0.099±0.03	0.145±0.03	0.196±0.11	0.113±0.02	0.537	0.289	0.047
	A+Z/(V+A+Z)	0.961±0.2	1.264±0.08	1.29±0.16	1.043±0.11	0.702	0.465	0.002
	Carotenoidi	0.336±0.02	0.316±0.05	0.357±0.07	0.401±0.06	0.649	0.061	0.242
	Chl a	0.963±0.06	0.863±0.19	1±0.23	1.136±0.25	0.853	0.140	0.252
	Chl b	0.288±0.03	0.258±0.06	0.326±0.1	0.367±0.08	0.886	0.066	0.348
	Chl a / Chl b	5.581±0.29	5.472±0.22	5.313±0.45	5.076±0.32	0.314	0.067	0.705

Tab. 6 – Concentrazione di pigmenti in *Q. ilex* e livelli di significatività risultanti dall'analisi della varianza per valutare l'effetto dell'ozono (O₃) della salinità (S) e della loro interazione (O₃*S) sulla concentrazione di pigmenti: VIOLAX, Violaxantina; ANTERAX, Anteraxantina; ZEAX, Zeaxantina; A+Z/(V+A+Z), Tasso di de-epossidazione; Carotenoidi; Chl a, Clorofilla a; Chl b, Clorofilla b; Chl a / Chl b. L'analisi è stata effettuata su foglie prelevate tra le 9:00 e le 10:00 a.m., per ognuna delle OTC replica.

<i>A. unedo</i>	Parametri	C	NF+C	FS	NF+S	O ₃	S	O ₃ *S
	VIOLAX	0.032±0.01	0.034±0.01	0.051±0.02	0.039±0	0.450	0.059	0.246
	ANTER	0.049±0.01	0.048±0.01	0.074±0.03	0.07±0.01	0.778	0.020	0.804
	ZEAX	0.136±0.03	0.177±0.06	0.193±0.05	0.354±0.05	0.001	0.000	0.026
	A+Z/(V+A+Z)	1.677±0.21	1.715±0.23	1.633±0.28	1.988±0.13	0.101	0.319	0.175
	Carotenoidi	0.2±0.02	0.224±0.03	0.257±0.05	0.294±0.03	0.107	0.004	0.723
	Chl a	1.095±0.1	1.047±0.18	0.805±0.14	0.91±0.09	0.672	0.007	0.269
	Chl b	0.962±0.25	0.889±0.24	0.315±0.09	0.36±0.05	0.878	0.000	0.530
	Chl a / Chl b	2.314±0.34	2.389±0.43	5.281±1.76	5.615±1.22	0.718	0.000	0.818

Tab. 7 – Concentrazione di pigmenti in *A. unedo* e livelli di significatività risultanti dall'analisi della varianza per valutare l'effetto dell'ozono (O₃) della salinità (S) e della loro interazione (O₃*S) sulla concentrazione di pigmenti: VIOLAX, Violaxantina; ANTERAX, Anteraxantina;

ZEAX, Zeaxantina; A+Z/(V+A+Z), Tasso di de-epossidazione; Carotenoidi; Chl *a*, Clorofilla a; Chl *b*, Clorofilla b; Chl *a*/ Chl *b*. L'analisi è stata effettuata su foglie prelevate tra le 9:00 e le 10:00 a.m., per ognuna delle OTC replica.

a)

<i>M1</i>	<i>Sc. Gas</i>	E	g_s	P_N	WUE	C_i/C_{ex}
O ₃		-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
S		-	-	-	+	-
O ₃ *S		-	-	-	n.s.	n.s.

<i>M2</i>	<i>Sc. Gas</i>	E	g_s	P_N	WUE	C_i/C_{ex}
O ₃		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
S		-	-	-	+	n.s.
O ₃ *S		-	-	-	n.s.	n.s.

<i>M3</i>	<i>Sc. Gas</i>	E	g_s	P_N	WUE	C_i/C_{ex}
O ₃		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
S		-	-	-	+	-
O ₃ *S		-	-	-	+	-

b)

<i>M1</i>	<i>Fluorescenza</i>	F_0	F_m	SumK	Kn	Kp	$\varphi_{(Po)}$	Ψ_o	$\varphi_{(Eo)}$	RE/ABS	δ_{Ro}
O ₃		n.s.	-	+	+	+	+	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
S		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
O ₃ *S		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

<i>M2</i>	<i>Fluorescenza</i>	F_0	F_m	SumK	Kn	Kp	$\varphi_{(Po)}$	Ψ_o	$\varphi_{(Eo)}$	RE/ABS	δ_{Ro}
O ₃		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
S		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
O ₃ *S		n.s.	-	n.s.	+	n.s.	+	n.s.	n.s.	+	n.s.

<i>M3</i>	<i>Fluorescenza</i>	F_0	F_m	SumK	Kn	Kp	$\varphi_{(Po)}$	Ψ_o	$\varphi_{(Eo)}$	RE/ABS	δ_{Ro}
O ₃		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
S		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+	n.s.	n.s.	n.s.
O ₃ *S		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+	n.s.	n.s.	n.s.

c)

M1	<i>Fluorescenza</i>	TR_o/RC	ET_o/RC	DI_o/RC	RC/CS_o	PI_{ABS}	ΔV_{IP}	PI_{tot}	NPQ
O₃		+	n.s.	+	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
S		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
O₃*S		n.s.	+	+	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

M2	<i>Fluorescenza</i>	TR_o/RC	ET_o/RC	DI_o/RC	RC/CS_o	PI_{ABS}	ΔV_{IP}	PI_{tot}	NPQ
O₃		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
S		-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
O₃*S		n.s.	n.s.	n.s.	+	n.s.	n.s.	+	n.s.

M3	<i>Fluorescenza</i>	TR_o/RC	ET_o/RC	DI_o/RC	RC/CS_o	PI_{ABS}	ΔV_{IP}	PI_{tot}	NPQ
O₃		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
S		+	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+	n.s.	n.s.
O₃*S		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+	n.s.	+

Tab. 8 – *Q. ilex*- Livelli di significatività per gli stress imposti: **O₃**, Ozono; **S**, Salinità; **O₃*S**, interazione tra ozono e salinità, nelle diverse giornate di misura. **M1**, a 25 giorni dall'inizio dell'esperimento; **M2** a 45 giorni dall'inizio dell'esperimento; **M3** a 65 giorni dall'inizio dell'esperimento, per i parametri relativi agli scambi gassosi (a), e alla fluorescenza della clorofilla *a* eseguita applicando il JIP-test e la fluorescenza modulata (b, c). Con il simbolo + si indicano tutti i parametri che aumentano significativamente, con il simbolo -, i parametri che diminuiscono.

a)

<i>M1</i>	<i>Sc.Gas</i>	E	g_s	P_N	WUE	C_i/C_{ex}
O₃		+	+	n.s.	n.s.	n.s.
S		-	-	-	+	-
O₃*S		-	-	n.s.	n.s.	n.s.

<i>M2</i>	<i>Sc.Gas</i>	E	g_s	P_N	WUE	C_i/C_{ex}
O₃		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
S		-	-	n.s.	+	-
O₃*S		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

<i>M3</i>	<i>Sc.Gas</i>	E	g_s	P_N	WUE	C_i/C_{ex}
O₃		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
S		-	-	-	+	-
O₃*S		-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

b)

<i>M1</i>	<i>Fluorescenza</i>	F_0	F_m	SumK	Kn	Kp	$\varphi_{(Po)}$	Ψ_o	$\varphi_{(Eo)}$	RE/ABS	δ_{Ro}
O₃		-	n.s.	+	+	+	+	+	+	n.s.	n.s.
S		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+	+	+	n.s.
O₃*S		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

<i>M2</i>	<i>Fluorescenza</i>	F_0	F_m	SumK	Kn	Kp	$\varphi_{(Po)}$	Ψ_o	$\varphi_{(Eo)}$	RE/ABS	δ_{Ro}
O₃		n.s.	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
S		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
O₃*S		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

<i>M3</i>	<i>Fluorescenza</i>	F_0	F_m	SumK	Kn	Kp	$\varphi_{(Po)}$	Ψ_o	$\varphi_{(Eo)}$	RE/ABS	δ_{Ro}
O₃		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	+	n.s.
S		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.
O₃*S		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

c)

<i>M1</i>	<i>Fluorescenza</i>	TR _o /RC	ET _o /RC	DI _o /RC	RC/CS _o	PI _{ABS}	ΔV _{IP}	PI _{tot}	NPQ
O₃		+	+	+	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
S		+	n.s.	n.s.	n.s.	+	+	+	n.s.
O₃*S		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>M2</i>	<i>Fluorescenza</i>	TR _o /RC	ET _o /RC	DI _o /RC	RC/CS _o	PI _{ABS}	ΔV _{IP}	PI _{tot}	NPQ
O₃		-	-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
S		-	+	+	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
O₃*S		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>M3</i>	<i>Fluorescenza</i>	TR _o /RC	ET _o /RC	DI _o /RC	RC/CS _o	PI _{ABS}	ΔV _{IP}	PI _{tot}	NPQ
O₃		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
S		-	n.s.	n.s.	+	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
O₃*S		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. 9- A. unedo - Livelli di significatività per gli stress imposti: **O₃**, Ozono; **S**, Salinità; **O₃*S**, interazione tra ozono e salinità, nelle diverse giornate di misura. **M1**, a 25 giorni dall'inizio dell'esperimento; **M2** a 45 giorni dall'inizio dell'esperimento; **M3** a 65 giorni dall'inizio dell'esperimento, per i parametri relativi agli scambi gassosi (a), e alla fluorescenza della clorofilla *a* eseguita applicando il JIP-test e la fluorescenza modulata (b, c). Con il simbolo + si indicano tutti i parametri che aumentano significativamente, con il simbolo -, i parametri che diminuiscono.

Discussione

L'esperimento supporta la comprovata resistenza delle specie sempreverdi mediterranee agli stress ossidativi, ma gli aggiustamenti funzionali e strutturali messi in atto in risposta ai singoli trattamenti differiscono fra le due specie con implicazioni anche per la modalità di risposta ai due fattori combinati.

A. unedo non presenta nessun effetto strutturale dovuto al sale. Dato che effetti sulla biomassa sono stati riscontrati per concentrazioni più alte (105 mM) (Navarro et al. 2008), seguendo la teoria per cui la produttività della pianta non è affetta da uno stress fino a che non viene superata la soglia critica (Mass and Hoffman 1977), possiamo dunque dire che il livello di salinità pari a 75 mM è vicino al massimo che questa specie può tollerare. In *Q. ilex* in risposta alla salinità, l'aumento della superficie fogliare a discapito di quella radicale, può essere considerata un risposta attiva. La riallocazione osservata ha il vantaggio di ridurre il flusso di acqua, e quindi di ioni, per unità di superficie fogliare

diminuendo così i costi della detossificazione e i potenziali danni all'apparato fotosintetico. Questa strategia di "evitanza" dello stress ionico conferma la sensibilità di *Q. ilex* alla presenza di ioni nelle foglie che può determinare una alterazione della fotochimica primaria, come osservato in esperimenti con trattamenti di spray marino (Mereu et al., 2011). *Q. ilex* rientra tra le specie resistenti alla salinità del suolo (sensu Munns, 2008), mentre il *A. unedo* può essere classificato come specie moderatamente tollerante (Navarro et al., 2008), perché non presenta strategie che prevengono l'arrivo degli ioni alle foglie (compartimentazione, esclusione, controllo dell'uptake). In entrambe le specie la risposta preponderante avviene tramite aggiustamenti biochimici, fotochimici e di regolazione degli scambi gassosi. Tale risultato è in accordo con le considerazioni riportate in Poorter et al., (2011) che attraverso una robusta meta-analisi, conclude che per marcate variazioni al livello fisiologico (scambi gassosi), sia presente una relativa invarianza nella ripartizione della biomassa. Per spiegare le diverse risposte delle due specie alla salinità al suolo la differente modalità di compartimentazione degli ioni è determinante. In risposta al sale l'effetto osmotico è presente in entrambe le specie ma, benché in *Q. ilex* la riduzione di gs rispetto al controllo sia progressiva (dal -42.78 % in M1a1 - 65% in M3), mentre rimane costante per tutto il periodo in *A. unedo* (circa del -30 %), in entrambe le specie questa limitazione non determina danni strutturali all'apparato fotochimico (PSII e PSI) né compromette la capacità fotosintetica a lungo termine (diminuzione di Pn a 65 gg non aumenta rispetto a 25gg). Che la limitazione alla Pn sia esclusivamente di natura stomatica, è confermato dai valori di Ci/Ca che rimangono inalterati o si riducono in concomitanza di una riduzione di gs, a testimoniare che non vi sono danni alla funzionalità enzimatica. Il mantenimento della capacità fotosintetica delle due specie è imputabile però a meccanismi di difesa diversi: scarsa presenza di ioni nelle foglie in *Q. ilex*, alta capacità di modulare le concentrazioni dei pigmenti in *A. unedo*, specie in cui la risposta dei fotosistemi alla salinità si compone di due fasi distinte: nella prima c'è un aumento dell'efficienza con cui avvengono i processi fotochimici (M1), al fine di sostenere meccanismi di riparazione e detossificazione per la prima risposta attiva allo stress; nella seconda fase si passa ad una diminuzione dei flussi di energia in entrata, accompagnata da un aumento dei pigmenti accessori (pools delle xantofille) che rivestono un ruolo protettivo importante sia perché sovrintendono alla dissipazione diretta dell'energia in eccesso, sia perché possono funzionare da veri e propri sistemi scavenger di ROS (Melgar et al., 2009; Foyer and Shigeoka, 2011). Tuttavia l'aumento di ioni

dannosi nelle foglie (Cl^- e Na^+), determina un danno ai pigmenti antenna del fotosistema I (la clorofilla b diminuisce). Nel leccio l'apparato fotosintetico deve rispondere essenzialmente a una forte limitazione stomatica e mostra una marcata resistenza, dato che gli unici aggiustamenti presenti al livello dei fotosistemi sono volti ad aumentare l'efficienza di utilizzo e dissipazione dell'energia in entrata, ma nessun danno da foto-ossidazione è stato osservato. Un tratto fondamentale di tale resistenza potrebbe essere giocato dal funzionamento del PSI la cui efficienza e proporzione rispetto al PSII, in presenza del sale, è maggiore.

Anche la risposta all'ozono interessa maggiormente la fisiologia delle due specie piuttosto che la loro struttura. *Q. ilex* non ha infatti presentato nessun aggiustamento strutturale mentre nel *A. unedo* abbiamo una lieve riduzione della biomassa fogliare che potrebbe essere imputata a processi di senescenza accelerati dall'ozono (Ribas et al., 2005a; Calatayud et al., 2010). Entrambe le specie hanno mostrato una *early-responce* all' O_3 in M1 (AOT40 cumulato $\cong 10.000$ ppb h) che ha determinato risposte opposte sulla gs: una riduzione nel leccio e un aumento nel corbezzolo. Come trovato da altri autori, la risposta della gs all'ozono su piante ben irrigate, è assai variabile (Witting et al., 2007; Calatayud et al., 2011), ma l'effetto sui processi della fotochimica primaria segue dei patterns simili (Bussotti et al., 2007; Bussotti et al., 2011). Infatti per entrambe le specie, in M1, la variazione nella costellazione dei parametri del JIP-test è la stessa ed evidenzia come la risposta a stress ossidativi possa portare ad un aumento dell'efficienza dell'apparato fotosintetico permettendo così di rispondere in modo immediato alla necessità di metaboliti per mantenere alte le difese antiossidanti, alimentare processi di acclimatazione e riparazione (Liska et al., 2004; Retuerto et al., 2004; Bussotti et al., 2007). Anche se nelle successive giornate di misura la gs torna ai livelli del controllo, l' O_3 causa una risposta (presente anche in M3, dopo 65 gg di trattamento) che coinvolge sia aggiustamenti a livello biochimico che funzionale: come trovato da altri autori aumenta la quantità di Zeaxantina che è associata con una maggiore dissipazione di energia in forma di calore, e il numero di elettroni che arriva agli accettori finali (RE/ABS) (D'Haese et al., 2004; Pellegrini et al., 2011). Quest'ultimo risultato può essere legato all'aumento del trasporto pseudociclico degli elettroni intorno al PSI che permette di consumare potere riducente in eccesso e rigenerare il complesso degli enzimi antiossidanti (Superossido Dismutasi e ciclo dell'Ascorbato).

Infatti dai risultati ottenuti in altre specie sottoposte a stress idrico (Oukarroum et al., 2009), è emerso che la variazione della proporzione tra PSII e PSI a favore di quest'ultimo, può essere legata ad una maggiore resistenza dell'apparato fotosintetico in conseguenza di una maggiore funzionalità dei sistemi scavenger (Asada, 1999; Asada, 2006). Inoltre Stepien and Johnson, 2009, trovano che in piante di *Thellungiella halophila*, specie tollerante alla salinità, l'ossidasi terminale dissipa potere riducente, fino al 30% del flusso totale di elettroni in entrata nel PSII. I processi alternativi alla riduzione del NADPH hanno anche un ruolo fondamentale nel trasformare molto velocemente il superossido O_2^{**} in H_2O_2 , che diventa un substrato più facilmente convertibile per i sistemi di scavenger (Miller et al., 2009). L'attivazione del trasporto pseudo-ciclico in presenza di stress ossidativi determina una diminuzione del pH del lume tilacoidale e quindi automaticamente una down-regulation nell'efficienza del PSII (Biehler and Fock, 1996; Kato et al., 2003; Asada 2006) limitando danni da foto-ossidazione. La funzionalità del PSI sembra giocare un ruolo sostanziale anche nell'interazione tra stress. Infatti in *Q. ilex*, specie che modula la funzionalità del PSI, l'interazione è di tipo antagonista, mentre, quando presente, è sinergica in *A. unedo*. Al livello dei fotosistemi, nonostante le differenze evidenziate, le due specie presentano nell'interazione alcune strategie comuni che fanno pensare che esistano pattern di risposta comuni non solo per una stessa tipologia di stress (Golding e Johnson, 2003), ma anche per differenti stress ossidativi e per la loro interazione: i) diminuzione dell'energia in entrata quando la quantità di luce necessaria a saturare il processo di fotosintesi diminuisce (FM ↓, TR/RC ↓); ii) aumento dell'energia che viene dissipata in processi non fotochimici (Kn ↑, DI/RC ↑); iii) aumento della quantità di elettroni che viene trasferita a processi alternativi a quello dell'assimilazione (ciclo di Mehler); iiiii) aumento della funzionalità del PSI (RE/ABS ↑, PI_{TOT} ↑, ΔV_{I-P} ↑). La presenza di un'interazione antagonista, può essere imputata all'effetto che l'ozono ha sulla gs. Infatti come riportato da Wilkinson e Davies (2010) in presenza di ozono, grazie alla produzione di etilene, diminuisce la sensibilità della gs all'acido abscissico (ABA) determinando una minore chiusura degli stomi. Questa minore limitazione all'assimilazione può aver favorito, deprimendo in minor misura gli scambi gassosi, la formazione e rigenerazione delle molecole antiossidanti. Non sorprende quindi che sia presente un'interazione antagonista solo nella specie (*Q. ilex*) in cui lo stress salino ha avuto prevalentemente un effetto di natura osmotica, assimilabile quindi ad uno stress idrico. In *Q. ilex* l'interazione tra stress ha verosimilmente portato a un aumento delle

ROS: il più alto tasso di traspirazione determina un maggiore stress osmotico e un aumento dei flussi di O_3 . In tali condizioni *Q. ilex* riesce comunque ad evitare danni ai fotosistemi aumentando il pool delle xantofille, il tasso di depossidazione, l'attivazione del ciclo di Mehler. Inoltre va messo in evidenza come l'aumento di gs nell'interazione ha comportato un ulteriore abbassamento del Ψ_{PD} , suggerendo una ridotta capacità di regolare il proprio equilibrio idrico. La natura sinergica dell'interazione in *A. unedo* potrebbe essere spiegata dal fatto che in questa specie in cui potenzialmente c'è anche un effetto ionico del sale, una conduttanza maggiore avrebbe determinato un maggiore flusso di ozono e quindi un carico ossidativo superiore alle capacità di detossificazione della specie. Notare come il pool della zeaxantina, già aumentato in risposta ai singoli stress, raggiunga valori 2.6 volte più alti rispetto al controllo nel caso dell'interazione. Inoltre una maggiore conduttanza avrebbe determinato un maggiore apporto di ioni alle foglie aumentando ulteriormente i costi di detossificazione e riparazione.

Conclusioni

Entrambe le specie si sono rivelate resistenti allo stress salino, tuttavia la resistenza di *Q. ilex* è dovuta alla sua capacità di compartimentare gli ioni nelle radici mentre quella di *A. unedo* ad una risposta biochimica. Solo in *Q. ilex* lo stress salino ha comportato un'alterazione nel pattern di allocazione della biomassa a favore di una maggiore superficie fogliare. Questa risposta potrebbe determinare una diminuzione della competitività di questa specie nell'ambiente costiero mediterraneo dove le condizioni climatiche prevalenti determinano alte richieste traspirative nei periodi in cui la salinità al suolo e l'aridità possono coincidere o essere consecutivi. La salinità al suolo e l'ozono troposferico interagiscono in modo antagonista su *Q. ilex* e sebbene debolmente presente, in *A. unedo* si ha un'interazione sinergica sulla gs e la traspirazione. La natura diversa dell'interazione potrebbe essere dovuta alla diversa concentrazione di ioni all'interno delle foglie, combinata con un differente flusso di ozono. All'interazione tra gli stress le due specie hanno risposto essenzialmente modulando la propria fisiologia più che l'allocazione del carbonio. L'analisi della fluorescenza ha evidenziato che il PSI ha un ruolo attivo nella protezione dell'apparato fotosintetico dall'eccessiva produzione di ROS. Sebbene per intensità e durata, gli stress imposti non hanno superato la soglia critica per le specie studiate, il costo metabolico degli aggiustamenti messi in atto potrebbe avere delle

implicazioni importanti modificando la competitività e l'accrescimento di queste specie in ambiente costiero.



CAPITOLO V

Variazione stagionale in Q_{10} e nella respirazione basale in ecosistemi costieri: i modelli di respirazione sono utilizzabili per la vegetazione sempreverde mediterranea?

Abstract: Comprendere quali fattori influenzano la variazione stagionale della respirazione fogliare (R_D), parametro di fondamentale importanza nella fisiologia complessiva della pianta, è essenziale per aumentare l'accuratezza dei modelli empirici di produttività e di quelli usati per stimare come le specie vegetali risponderanno all'aumento di temperatura previsto in conseguenza dei cambiamenti climatici. Solo in pochi studi, dai risultati contraddittori, è stato analizzato l'effetto che stress ossidativi hanno sulle variazioni stagionali della R_D e sulla tipologia di acclimatazione messa in atto dalle specie mediterranee. In questo contesto si inserisce il presente lavoro, in cui la risposta della R_D alla temperatura (variazioni short-term) è stata studiata stagionalmente su tre specie sempreverdi della macchia mediterranea (*Arbutus unedo* L., *Phyllirea latifolia* L., *Quercus ilex* L.), in due siti costieri che si differenziano per durata e intensità degli stress ossidativi: la Tenuta Presidenziale di Castelporziano (RM), e Piscinas (CI). I risultati ottenuti evidenziano che le relazioni teoriche attese tra R_D basale, Q_{10} e T ambientale non sono presenti, e altri fattori devono essere presi in considerazione per spiegare gli andamenti stagionali e i meccanismi che sono alla base dell'acclimatazione. Tra questi, l'influenza delle fasi fenologiche sulla mobilitazione degli assimilati tra foglie nuove e vecchie, e la diversa intensità e durata degli stress ossidativi, possono giocare un ruolo fondamentale. Le maggiori variazioni riscontrate al variare delle condizioni ambientali sono a carico della R_D basale, ma il processo di acclimatazione nelle specie studiate non segue quanto ci si aspetterebbe in base alla temperatura media annua dei siti sperimentali considerati.

Introduzione

Gli ecosistemi costieri rappresentano una zona di grande importanza ecologica ed economica, caratterizzati da un'elevata biodiversità, e come riportato nell'ultimo report dell'IPCC (2007), sono tra quelli che più risentiranno degli effetti dei cambiamenti climatici, che potrebbero inasprire le condizioni ambientali già limitanti. Ad un suolo poco evoluto con una pronunciata variabilità nella distribuzione e disponibilità delle risorse idriche, si aggiunge l'azione costante degli aerosol marini che influenzano caratteri strutturali (Griffiths et al., 2004), funzionali (Sanchez-Blanco et al., 2003; 2004; Rettori et al., 2005; Mereu et al., 2011) come anche la zonazione della vegetazione in tali aree (Acosta et al., 2007). Ai fattori di stress di origine naturale, vanno ad aggiungersi pressioni di origine antropica quali l'inquinamento atmosferico. Infatti le zone costiere sono tra le più densamente popolate in Italia come nel resto del Mediterraneo (Cori, 1999), e crescente attenzione è posta sull'aumento del tasso delle emissioni dovute soprattutto al traffico veicolare che costituiscono la fonte principale di precursori di inquinanti secondari come l'ozono troposferico (O_3) (Keuken et al., 2009). Tale inquinante raggiunge le maggiori concentrazioni in estate, stagione durante la quale la vegetazione in area mediterranea, è soggetta a periodi di siccità che potrebbero intensificarsi a causa del cambiamento del pattern stagionale delle precipitazioni e dell'aumento delle temperature estive (Giorgi e Lionello 2008). Per comprendere lo stato di funzionalità della vegetazione presente in tali aree, lo studio della respirazione fogliare (R_D , $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), processo chiave nella regolazione del metabolismo della pianta, è di cruciale importanza. Infatti da essa dipende l'energia per l'accrescimento, il mantenimento dei gradienti ionici intercellulari e del loro trasporto; inoltre l'aumento del flusso elettronico attraverso la via di ossidazione alternativa (AOX) a quella del citocromo, consente di evitare un alto carico ossidativo all'interno dei cloroplasti (Dat et al., 2000; Møller, 2001) sia contribuendo all'ossidazione del potenziale riducente in eccesso, sia producendo l'ATP necessario alla rigenerazione dei sistemi antiossidanti (ascorbato, glutatione, ciclo delle xantofille) (Atkin et al., 2005). La dipendenza della respirazione dalla temperatura, evidenziata già a partire dal XIX secolo, è stata teorizzata attraverso modelli empirici in cui l'assunzione di base è che la R_D varia in modo esponenziale con la temperatura (T) e il tasso di incremento, per l'aumento di $10\text{ }^\circ\text{C}$ (Q_{10}), rimane pressoché costante e uguale a 2, mentre la respirazione basale (R_{REF} , respirazione ad una data temperatura, per convenzione la più bassa tra quelle

misurate) viene assunta costante nel tempo (Gifford, 2003; Wythers et al., 2005). Tali assunzioni, attualmente alla base dei modelli per il bilancio del carbonio, è stata messa in discussione a causa delle crescenti evidenze sperimentali che mostrano come la R_{REF} non è costante nel tempo, e il Q_{10} può assumere valori compresi fra 1.4 e 4.2 (Tjoelker et al., 2001). La comprensione delle basi metaboliche dei processi di acclimatazione è fondamentale per includere l'effetto che la temperatura ha sui flussi di carbonio (Atkin et al., 2008; Zaragoza-Castells et al., 2008), e di conseguenza nei modelli che simulano la risposta della vegetazione ai cambiamenti climatici (Wythers et al., 2005). Atkin e Tjoelker hanno proposto un modello sintetico che propone due tipologie di acclimatazione alla temperatura di crescita e alle variazioni di T a breve termine. La tipologia I è associata con il cambiamento della curvatura della funzione R_D vs T (Q_{10}), mentre la tipologia II comporta il cambiamento dell'intercetta (R_{REF}). Tuttavia, è stato osservato che il cambiamento del Q_{10} non dipende unicamente dalla temperatura, ma anche dalla quantità di substrato disponibile (Xu et al., 2006), che può variare quando si verificano condizioni limitanti (es. stress idrico) (Atkin et al., 2000; Slot et al., 2008; Zaragoza-Castells et al., 2008). Queste variazioni evidenziate, non sono state però spiegate in modo esaustivo. Un altro fattore da tenere in considerazione è l'habitus fogliare: il tasso di R_D può essere influenzato dalle differenti strategie che specie decidue e sempreverdi mostrano in presenza di stress abiotici e in diverse fasi dell'accrescimento (Baldocchi et al., 2010). Nonostante la respirazione sia un fattore essenziale per modellizzare i flussi di carbonio, l'effetto che stress ossidativi, naturali o antropici, hanno sulla R_D rimane elusivo. A riguardo sono stati effettuati pochi studi e i risultati ottenuti sono ancora contraddittori (Ribas-Carbo et al., 2005; Rodríguez-Calcerrada et al., 2011b). Una possibile interpretazione della variabilità riscontrata nella risposta della R_D allo stress idrico è stata data da Flexas et al., (2005), il quale suggerisce che per stress idrici moderati i tassi di R_D si riducono a causa di una down-regulation dell'attività metabolica, ma che per stress di intensità maggiori, la R_D aumenta per soddisfare la richiesta di metaboliti ed energia necessaria ad attivare processi di riparazione e/o tolleranza. Studiare è di notevole interesse per comprendere come cambieranno i processi dinamici degli ecosistemi che ci si attende si verifichino in risposta ai cambiamenti climatici (McDowell et al., 2008; Rodríguez-Calcerrada et al., 2011a). Per studiare la funzionalità della vegetazione in ecosistemi costieri è necessario prendere in considerazione l'effetto che gli stress ossidativi hanno sulla R_D e sulla sua sensibilità alla temperatura, e come stress di diversa

natura ed intensità influenzano la risposta della R_D al cambiamento della temperatura. In questo lavoro sperimentale, la risposta della respirazione alla temperatura è stata studiata, nell'arco di diverse stagioni, in tre specie sempreverdi della macchia mediterranea (*A. unedo*, Au; *P. latifolia*, Pl; *Q. ilex*, Qi), in due siti costieri che differiscono per intensità e tipologia di stress ossidativi: la Tenuta Presidenziale di Castelporziano, area di notevole valore naturalistico inserita nell'area metropolitana Romana, sottoposta all'impatto di inquinanti gassosi altamente fitotossici derivanti dalla vicina area urbana (Gerosa et al., 2009; Manes et al., 1997; Manes et al., 2007), e Piscinas, situata all'interno del parco geominerario sulla costa sud-ovest della Sardegna (Provincia di Carbonia – Iglesias), impattata prevalentemente da stress di origine naturale (azione dei venti prevalenti, aridità estiva). Gli obiettivi di questo lavoro sono: i) verificare se le relazioni teorizzate a partire da modelli di respirazione basati sulla temperatura sono validi anche per le specie sempreverdi mediterranee in aree costiere in cui l'aumento della temperatura coincide con l'acuirsi di stress ossidativi naturali e antropici; ii) considerare quanto lo stato fisiologico complessivo della pianta influenza la respirazione fogliare, con particolare attenzione a come parametri chiave come il Q_{10} e la R_D basale vengono modulati in risposta a stress ossidativi in siti con differenti caratteristiche climatiche.

2 Materiali e Metodi

2.1 Descrizione dei siti di studio

L'attività sperimentale, iniziata ad Aprile 2010, è stata effettuata in due siti scelti all'interno di ecosistemi costieri in cui la vegetazione prevalente è quella di macchia mediterranea. Una delle aree sperimentali è situata all'interno della Tenuta Presidenziale di Castelporziano (CP) 41° 41'54.56'' N, 12° 21'09.50'' E, a 200 m dalla linea di costa, nel primo retroduna, e ricade all'interno della regione fitoclimatica Termo-Mediterranea, in cui la vegetazione è soggetta ad estati calde e siccitose e a inverni freddi (Blasi et al., 1983). La vegetazione è composta da macchia alta riconducibile all'associazione *Quercetum ilicis*, dove le specie co-dominanti con *Quercus ilex* L. sono *Phillyrea latifolia* L., *Arbutus unedo* L. e *Erica arborea* L., con un'altezza media della chioma che non supera i 2.5 metri, e da patches di macchia bassa alternati a gariga in cui sono presenti

formazioni a *Erico-Rosmarinetum*, caratterizzato da cespugli di *Rosmarinus officinalis* L., *Erica multiflora* L., *Cistus incanus* L.

È presente un suolo alcalino (pH 8.3) sabbioso, con una scarsa capacità di ritenzione idrica (Fares et al., 2009). Tuttavia la presenza della falda, affiorante in inverno, costituisce una fonte di approvvigionamento idrico anche nei mesi estivi, quando non scende sotto i due metri di profondità (Mereu et al., 2009b). Tale area è inoltre soggetta a fenomeni di intrusione di acqua marina nella falda (Alessio et al., 2004). Le concentrazioni di O₃ nel periodo primaverile-estivo raggiungono picchi di 90 ppb ora e in anni diversi (2008, 2009, 2010) sono state misurate concentrazioni superiori al valore soglia dei 40 ppb, dove il flusso notturno di O₃ contribuisce al flusso giornaliero totale tra il 10 e il 18% (Mereu et al., 2009a).

L'altra area di studio è situata sulla costa sud-ovest della Sardegna presso la località di Piscinas (PSN), all'interno del parco geominerario della Sardegna (39° 34'9.37" N, 8° 27'41.48" E). L'inquadramento bioclimatico dell'area di studio, fatta seguendo la classificazione proposta da Rivas Martínez et al., 2002, e le elaborazioni più recenti (Bacchetta et al., 2007) rientra nel bioclima Mediterraneo pluvistagionale oceanico con termotipi compresi tra il termo mediterraneo superiore e il mesomediterraneo inferiore e ombrotipi che variano tra il secco superiore e il subumido inferiore. La vegetazione presente è inquadrabile in uno stato di transizione tra la macchia alta con individui che non superano i 3 m di altezza, e la gariga che diventa dominante nelle aree più prossime alla costa dove prevalgono specie eliofile e resistenti come *P. latifolia* e *Pistacia lentiscus* L. in forma di arbusti prostrati e fortemente modellati dal vento. Il sito si trova a valle del territorio di Montevecchio, a 100 m circa dalla linea di costa, al limitare tra gli ampi complessi dunali costieri e gli scisti argillosi e arenacei impermeabili che si incontrano andando verso l'interno. La circolazione idrica sotterranea nell'area risulta pertanto molto limitata, le falde e le sorgenti sono conseguentemente piuttosto povere. Al contrario, lo scorrimento superficiale delle acque meteoriche è favorito proprio dall'impermeabilità delle rocce affioranti. Rispetto al sito di CP, l'esposizione dell'area di studio la rende fortemente soggetta ai venti prevalenti che provenendo dal mare (maestrale), sono spiccatamente salmastri. I parametri ambientali relativi al sito di studio di CP, sono stati raccolti da una centralina meteo posta a 6 Km circa dal sito sperimentale, che registra in continuo dati di temperatura, umidità relativa, radiazione, direzione ed intensità del vento e precipitazioni. Il territorio della Sardegna non presenta un sistema di centraline meteo

molto capillare. Questo ha portato ad utilizzare i dati, forniti come medie giornaliere, di una stazione meteo presente in località Capo Frasca (39° 40'42.85'' N, 8° 26'49.48'' E) che per esposizione e posizione rispetto alla linea di costa è paragonabile al sito studiato. I dati delle centraline meteo sono stati alla base sia delle elaborazioni per l'inquadrimento climatico, sia per le relazioni con i parametri fisiologici misurati.

Le campagne sperimentali nei due siti sono state effettuate ad Aprile ed Agosto 2010, e a Febbraio, Aprile e Luglio 2011; nel sito di CP è stata effettuata l'attività sperimentale anche nel mese di Luglio 2010.

2.2 *Stato idrico e caratteristiche fogliari*

La disponibilità idrica è stata valutata tramite misure di potenziale idrico di predawn (Ψ_{pd} , MPa) con la camera a pressione (Scholander, PMS Instruments, Oregon, USA).

Su un campione di 20 foglie per ogni specie e sito è stata determinata l'area fogliare tramite software (Image Tool Software Roswell, GA). Le foglie sono state poste in stufa a 80°C, fino al raggiungimento del peso secco, e dai dati così raccolti è stato possibile ricavare lo SLA (Specific Leaf Area), cioè il rapporto tra area fogliare e peso secco ($\text{cm}^2\text{gr}^{-1}$). A Febbraio 2011 in entrambi i siti, su 5 foglie per individuo sono state effettuate misure per la determinazione del contenuto relativo di clorofilla con lo strumento SPAD (Minolta).

2.3 *Scambi gassosi e Respirazione al buio*

Tramite analizzatore all'infrarosso CIRAS 2 (PP Systems, Hitchin, UK) misure di scambi gassosi sono state effettuate tra le 09:00 e le 11:00 GMT+1, per determinare i tassi massimi di assimilazione (P_n , $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Lo strumento, che misura anche la traspirazione (E , $\text{mmolH}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), la conduttanza stomatica (g_s , $\text{mmolH}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e la concentrazione sottostomatica di CO_2 (C_i , ppm), registra simultaneamente anche parametri ambientali come irradianza (PAR, $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), umidità relativa (RH,%), temperatura ambientale e fogliare (T_a e T_l , °C). Tutte le misure effettuate sono state condotte su 3 foglie di sole, completamente espanse, per ognuno dei 4 o 5 individui monitorati.

Lo stesso strumento è stato utilizzato per effettuare, a partire dalle 17:00, le misure di respirazione al buio (R_D , $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Sono state effettuate curve di risposta della

respirazione alla temperatura facendo variare, tramite sistema di termocoppie, la temperatura fogliare di 6 gradi a partire da 18°C fino a 36 °C; 18°C è la temperatura di riferimento (T_{REF}). Le foglie usate per la misura della R_D , pre-oscurate per 30 minuti per evitare il rilascio di CO_2 (Atkin et al., 1998), sono le stesse su cui sono state effettuate le misure di scambio gassoso. Per ogni step di temperatura, le misure di R_D sono state registrate solo quando il valore si era stabilizzato (approssimativamente dopo 10 min).

2.4 Funzionalità dei fotosistemi

Lo stato funzionale dei fotosistemi è stato valutato tramite misure di fluorescenza della clorofilla *a* (Chl *a*) effettuate con lo strumento Handy PEA (Hansatech Ltd, UK) ed è stato poi applicato il JIP-test. Tali misure, sono effettuate su foglie in cui i centri di reazione (RC) sono portati allo stato di completa ossidazione con un adattamento al buio di 40 minuti. Per ogni data, sono stati campionati quattro o cinque individui per specie (3 foglie). I parametri riportati sin questo lavoro sono: F_0 , fluorescenza basale; ϕE_0 , efficienza con cui l'energia in entrata nel PSII (ABS) viene usata per il trasporto elettronico (ET); RE/ABS, efficienza con cui vengono ridotti gli accettori finali degli elettroni (Ferredossina, $NADPH^+$); PI_{TOT} , Performance Index totale, indice sintetico per valutare la performance complessiva della fotochimica primaria (Strasser et al., 2010). Per il calcolo del PI_{TOT} vengono considerati: i) lo stato funzionale delle strutture atte alla captazione dell'energia luminosa (RC/ABS: densità dei centri di reazione); ii) la resa quantica della fotochimica primaria (ϕP_0 : quantità di energia catturata per centro di reazione attivo); iii) l'efficienza con cui gli elettroni vengono convogliati nella catena di trasporto elettronico oltre gli accettori primari Q_A^- (Ψ_0); iv) l'efficienza con cui gli elettroni vanno a ridurre gli accettori finali dal lato accettore del PSI (RE/ET).

2.5 Trattamento dei dati e analisi statistica

Il valore numerico del Q_{10} è stato calcolato seguendo il metodo presentato da Armstrong et al., 2006: per ogni curva di risposta, è stata fatta una retta di regressione tra il logaritmo in base 10 della R_D e la temperatura fogliare. La pendenza di questa retta è stata usata per il calcolo del Q_{10} applicando la formula:

$$Q_{10} = 10^{(10 \cdot \text{pendenza della retta di regressione})} \quad \text{Eq 1}$$

Per le relazioni generali con R_{REF} (respirazione alla T_{REF}) e Q_{10} è stata usata la Temperatura ambientale media dei due giorni precedenti a quello di misura (T_{2m}).

Per ogni individuo il rapporto R_D/P_{Nmax} è stato ottenuto accoppiando i valori di P_{Nmax} a quelli di R_D stimata alla temperatura a cui è stata misurata la fotosintesi. Tale valore è stato ottenuto applicando la formula:

$$R = R_{REF} \times Q_{10}^{\left[\frac{T-T_{REF}}{10}\right]} \quad \text{Eq 2}$$

proposta da Kruse et al., 2010, dove il Q_{10} è quello calcolato per ogni individuo, per ognuna delle giornate di misure effettuate, e la T rappresenta la temperatura a cui è stata misurata la P_{Nmax} .

I dati, analizzati con il software Statistica 7 (StatSoft, Inc. – Tulsa, OK – USA), sono stati sottoposti ad analisi della varianza in cui i fattori considerati sono stati la specie, il sito, il tempo. Per i valori di SPAD è stata valutata, per ogni specie, la differenza tra siti. Per lo SLA è stata verificata anche la differenza interspecifica. Le differenze messe in evidenza dall'analisi della varianza sono state analizzate con il test post-hoc di Newman-Keuls con livello di significatività al $p < 0.05$.

3 Risultati

3.1 Caratteristiche climatiche dei siti studiati

Tra i siti di studio considerati, Castelporziano (CP) e Piscinas (PSN), sono presenti notevoli differenze in termini di temperature medie annue (MAT), temperature massime e minime e per la distribuzione e la quantità delle precipitazioni. Come emerge dalla lettura della Tabella 1, per gli anni in cui è stata effettuata l'attività di campo, 2010-2011, il sito di Piscinas risulta avere una T media annua più alta rispetto a Castelporziano di 3.1 °C sia nel 2010 che nel 2011.

		2010		2011	
CP	MAT		14.5±5.47		14.7±5.62
	<i>T min MF</i>	<i>Gen</i>	3.49±1.97	<i>Feb</i>	1.48±1.85
	<i>T max MC</i>	<i>Lug</i>	29.6±1.37	<i>Ago</i>	28.34±1.82
PSN	MAT		17.6±5.2		17.83±5.48
	<i>T min MF</i>	<i>Feb</i>	8.54±1.62	<i>Feb</i>	7.71±2.47
	<i>T max MC</i>	<i>Lug</i>	29.33±3.26	<i>Ago</i>	29.7±3.92

Tab. 1 – Dati climatici per i due siti considerati Castelporziano (CP) e Piscinas (PSN), negli anni 2010 e 2011. Vengono riportate le Temperature medie annue (MAT, °C), i valori della media delle minime del mese più freddo (T_{min} , MF), e la media delle massime del mese più caldo (T_{max} MC); vengono inoltre presentati i mesi in cui tali condizioni sono state raggiunte.

In entrambi gli anni la media delle temperature minime del mese più freddo (T_{min} MF) a PSN è più alta rispetto al sito di CP (Tab. 1); inoltre da Dicembre a Febbraio a CP la T_{min} giornaliera scende sotto lo zero per 27 volte (dati non mostrati), condizione che non si verifica mai nel sito di PSN. Come emerge dalla lettura dei diagrammi di Bagnouls Gaussien (Fig. 1) per gli anni 2009-2011, le precipitazioni nel sito di PSN sono inferiori e il periodo di aridità più prolungato, con una totale assenza di precipitazioni nei mesi di Luglio ed Agosto; situazione che non si verifica a Castelporziano, dove non abbiamo mai una completa assenza di piogge nei mesi estivi. In entrambi i siti le precipitazioni si concentrano nel periodo tardo autunnale.

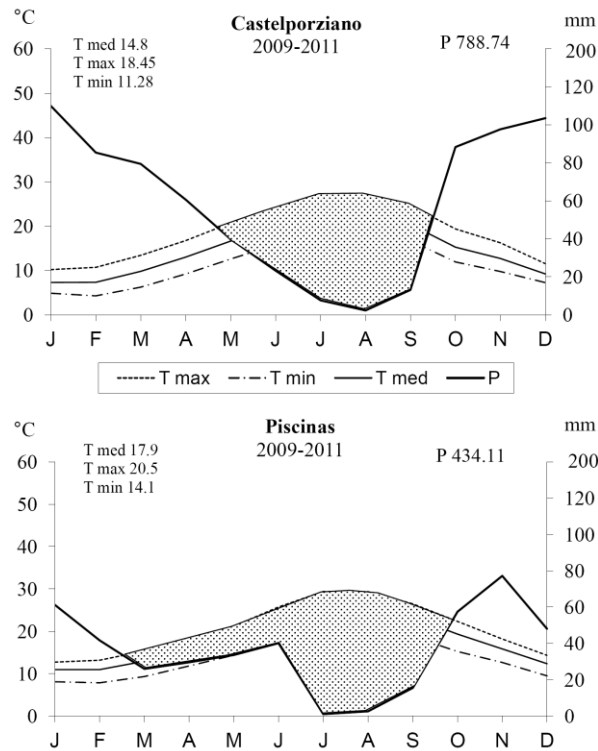


Fig. 1 – Inquadramento climatico dei due siti di studio tramite diagrammi climatici di Bagnouls Gaussens, per gli anni 2009-2011.

3.2 Stato idrico e caratteristiche fogliari

A CP il Ψ_{PD} si abbassa già a partire da Luglio 2010, per raggiungere i minimi valori misurati ad Agosto 2010, data in cui in *Q. ilex* il potenziale si abbassa più che nelle altre due specie ($-0.1 \text{ MPa} \pm 0.16$ in Au; $-1.03 \text{ MPa} \pm 0.15$ per la PI; $-1.33 \text{ MPa} \pm 0.40$ in Qi) (Fig. 2, a). Anche a PSN (Fig. 2, b) la riduzione significativa del Ψ_{PD} (Tab. 3, a) è presente nell'Agosto del 2010 quando si raggiungono potenziali inferiori ai -3 MPa .

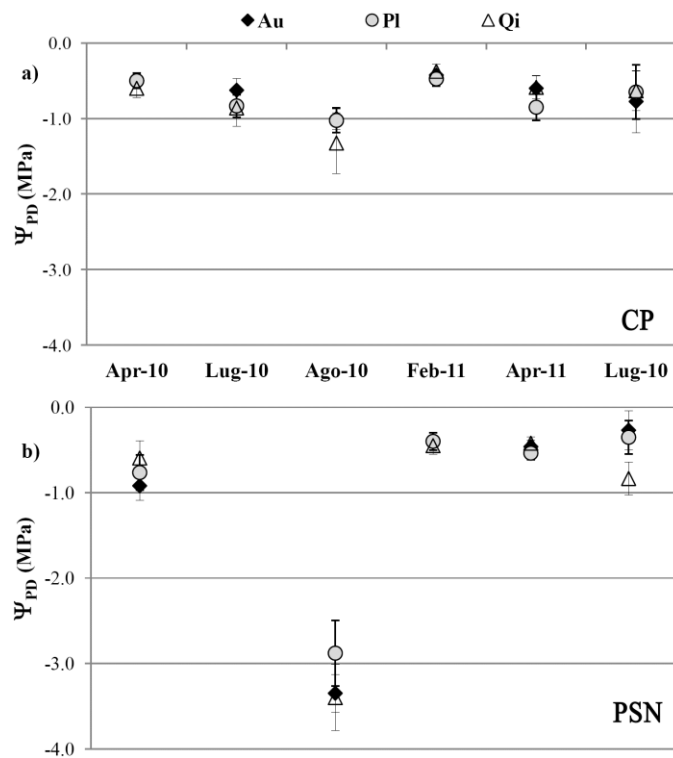


Fig. 2 – Valori di potenziale idrico di predawn (Ψ_{PD} , MPa) per le specie indagate: *A. unedo* (Au), *P. latifolia* (PI), *Q. ilex* (Qi) nei siti sperimentali: a) CP, Castelporziano; b) PSN, Piscinas.

Il contenuto relativo di clorofilla risulta maggiore a PSN per *A. unedo* e *P. latifolia*, ma più basso nel caso di *Q. ilex*. Per *A. unedo* c'è differenza tra i siti nel grado di sclerofillia (SLA), che è più alto a CP mentre per *P. latifolia* e *Q. ilex* il valore di SLA è più alto a PSN (Tabella 2).

SPAD	<i>A. unedo</i>	<i>P. latifolia</i>	<i>Q. ilex</i>
CP	64.7 ± 7.3 a	59.43 ± 11.8 a	52.91 ± 2.6 b
PSN	59.43 ± 7.8 b	66.03 ± 13.5 b	47.73 ± 6.4 a

SLA	<i>A. unedo</i>	<i>P. latifolia</i>	<i>Q. ilex</i>
CP	62.7 ± 5.19 c	34.74 ± 4.39 a	52.65 ± 4.71 b
PSN	47.41 ± 4.04 b	44.23 ± 5.57 a	58.42 ± 7.63 c

Tab. 2 – Valori della quantità relativa di clorofilla espressa in unità SPAD, e dello SLA (cm²/gr) nei due siti sperimentali. Le lettere indicano valori significativamente differenti ($p < 0.05$) tra i siti per ogni specie (SPAD); tra i siti e le specie (SLA).

3.3 Q_{10} e respirazione di riferimento

3.3.1 Andamenti stagionali

Nel sito di Castelporziano (CP) il valore massimo e minimo della R_{18} per *A. unedo* (Au) si verifica rispettivamente ad Aprile 2011 e Febbraio 2010, mentre il Q_{10} aumenta significativamente nel Febbraio 2011 (3.27 ± 0.61 , Tab. 3, a), per poi rimanere costantemente intorno a 2 nelle altre giornate di misure (Fig. 3, d). Nello stesso sito per *P.latifolia* il valore massimo della R_{18} è stato raggiunto a primavera (Fig. 3, b) ed il minimo ad Agosto 2010: 0.238 ± 0.15 (T_{2m} , 19.3), mentre le variazioni stagionali di Q_{10} oscillano tra 3.10 ± 0.68 , valore raggiunto in concomitanza con la riduzione del Ψ_{PD} (Agosto 2010) e 1.66 ± 0.10 (Luglio 2010).

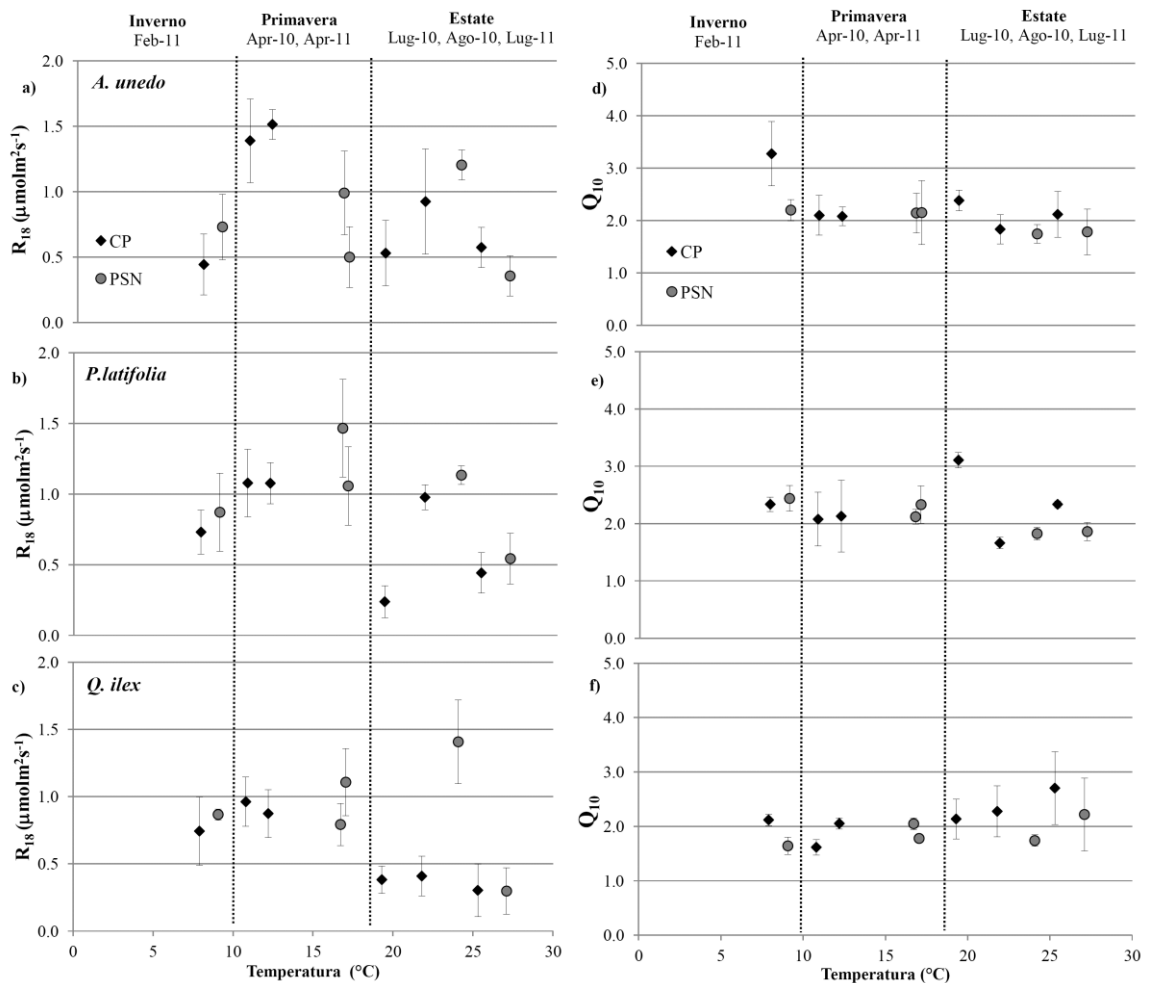


Fig. 3 – Andamento di R_{18} e Q_{10} in relazione alla temperatura media dei due giorni precedenti a quelli di misura nei diversi siti (CP, Castelporziano; PSN, Piscinas) per le specie studiate.

Il valore di R_{REF} più alto in *Q. ilex* è stato misurato a primavera (0.961 ± 0.18) e il valore minimo in concomitanza con le più alte temperature misurate a CP ($25.3 \text{ }^\circ\text{C}$; Luglio 2010) e con il potenziale idrico più basso. Nel sito di Piscinas (PSN) *A. unedo* mostra il valore massimo di R_{REF} quando si misurano alti valori di VPD, e quello minimo (0.35 ± 0.07) in coincidenza di un abbassamento del Ψ_{PD} ($< -3 \text{ MPa}$). Come avvenuto a CP, anche a PSN i valori massimi di R_{REF} sono stati misurati a primavera: 0.99 ± 0.12 in 2010 con T_{2m} di 16.7 e 0.49 ± 0.18 nel 2011 con T_{2m} di $17.03 \text{ }^\circ\text{C}$. Il Q_{10} rimane intorno al valore di 2 per tutte le date di campionamento. *P. latifolia* a PSN mostra alti valori di R_{REF} ad Aprile 2010, quando la media delle temperature dei due giorni precedenti è stata di $17 \text{ }^\circ\text{C}$; il valore minimo, in analogia con quanto accade a CP, si registra quando il Ψ_{PD} si abbassa ($-0.54 \pm 0.18 \text{ MPa}$; $27.1 \text{ }^\circ\text{C}$). Il Q_{10} oscilla tra 2.43 ± 0.22 e 1.85 ± 0.42 e più in generale mostra una riduzione all'aumentare della T (Fig. 3, e). *Q. ilex* a PSN ha mostrato un trend simile a quello osservato a Castelporziano (tendenziale diminuzione della R_{REF} all'aumentare della T, eccezion fatta per un picco di R_{REF} che si verifica a Luglio 2011 (1.4 ± 0.31). Escludendo questo ultimo dato, in generale il tasso di R_{REF} è compreso tra un massimo di 1.1 ± 0.25 , in primavera, e un valore minimo raggiunto nel periodo estivo (Agosto 2011). Il Q_{10} invece, non varia in modo significativo.

3.3.2 Variazioni stagionali tra i siti di studio

Se per ogni specie confrontiamo le variazioni stagionali (Inverno, Primavera, Estate) di R_{REF} (indicata anche con R_{18}) e Q_{10} tra i due siti, emerge che solo in *A. unedo* c'è un effetto significativo dovuto al sito (Tab. 3, b). In particolare nel sito più freddo e con maggior precipitazioni (CP), abbiamo la R_{18} primaverile (1.44 ± 0.24) e il Q_{10} invernale (3.27 ± 0.71) più alti. In *P. latifolia* e in *Q. ilex* le variazioni significative di R_{18} sono spiegabili unicamente in base alla stagionalità ($p = 0.001$) e non in base ai siti di studio e ai differenti regimi di temperatura in essi presenti.

3.4 Assimilazione e funzionalità dei fotosistemi

3.4.1 Fotosintesi massima

A CP l'andamento del tasso di assimilazione massima (P_{Nmax}) in tutte e tre le specie risponde alla diminuzione della quantità di acqua nel suolo più che all'aumento del VPD.

Infatti la $P_{N_{max}}$ diminuisce significativamente ad Agosto 2010 (Fig. 4, a; Tab. 3, a). Il massimo di assimilazione è raggiunto nei mesi primaverili. Presso il sito di Piscinas (Fig. 4, b), per tutte le specie studiate, si registrano riduzioni significative dei valori di $P_{N_{max}}$ in concomitanza di valori di VPD > 3 mbar, o potenziali idrici molto bassi ($\Psi_{PD} < -3$ MPa). Il leccio risulta essere la specie più sensibile non solo a condizioni limitanti quali bassa disponibilità idrica o alta richiesta traspirativa, ma anche alle condizioni presenti nel periodo invernale (basse temperature, alta irradianza): infatti nel Febbraio 2011 a PSN il leccio presenta una diminuzione della $P_{N_{max}}$ del 45.4 % rispetto ai picchi primaverili.

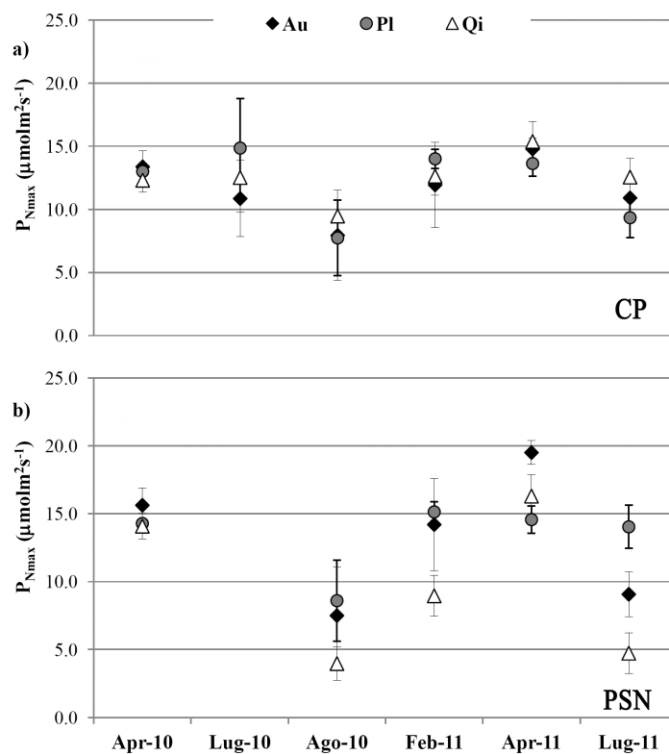


Fig. 4 – Tassi di assimilazione massima misurati a Castelporziano (a), e a Piscinas (b) in condizioni di luce saturante tra le 9:00 e le 11:00 a.m.

3.4.2 Parametri JIP-test

Dall'analisi dei parametri del JIP-test emerge che i fotosistemi rispondono a condizioni ambientali limitanti o mettendo in atto processi di down-regulation o con un transitorio aumento della funzionalità in risposta (Fig. 5, Tab. 3, c). A CP, il valore di F_0 , legato alla quantità di pigmenti contenuti nei complessi antenna e alla stabilità funzionale di quest'ultimi, rimane costante per *A. unedo* e *P. latifolia*, mentre in *Q. ilex* aumenta significativamente in concomitanza dell'abbassamento del Ψ_{PD} (Fig. 5, a) ad Agosto 2010. In questa stessa data le efficienze di utilizzo dell'energia in entrata (ϕE_0 , RE/ABS), diminuiscono in tutte e tre le specie (Fig. 5, b, c). Il PI_{TOT} presenta una risposta specie-specifica alle variazioni stagionali: nel corbezzolo, PI_{TOT} si abbassa significativamente nelle date in cui a causa degli alti valori di VPD, c'è una limitazione stomatica dell'assimilazione (Luglio 2011),

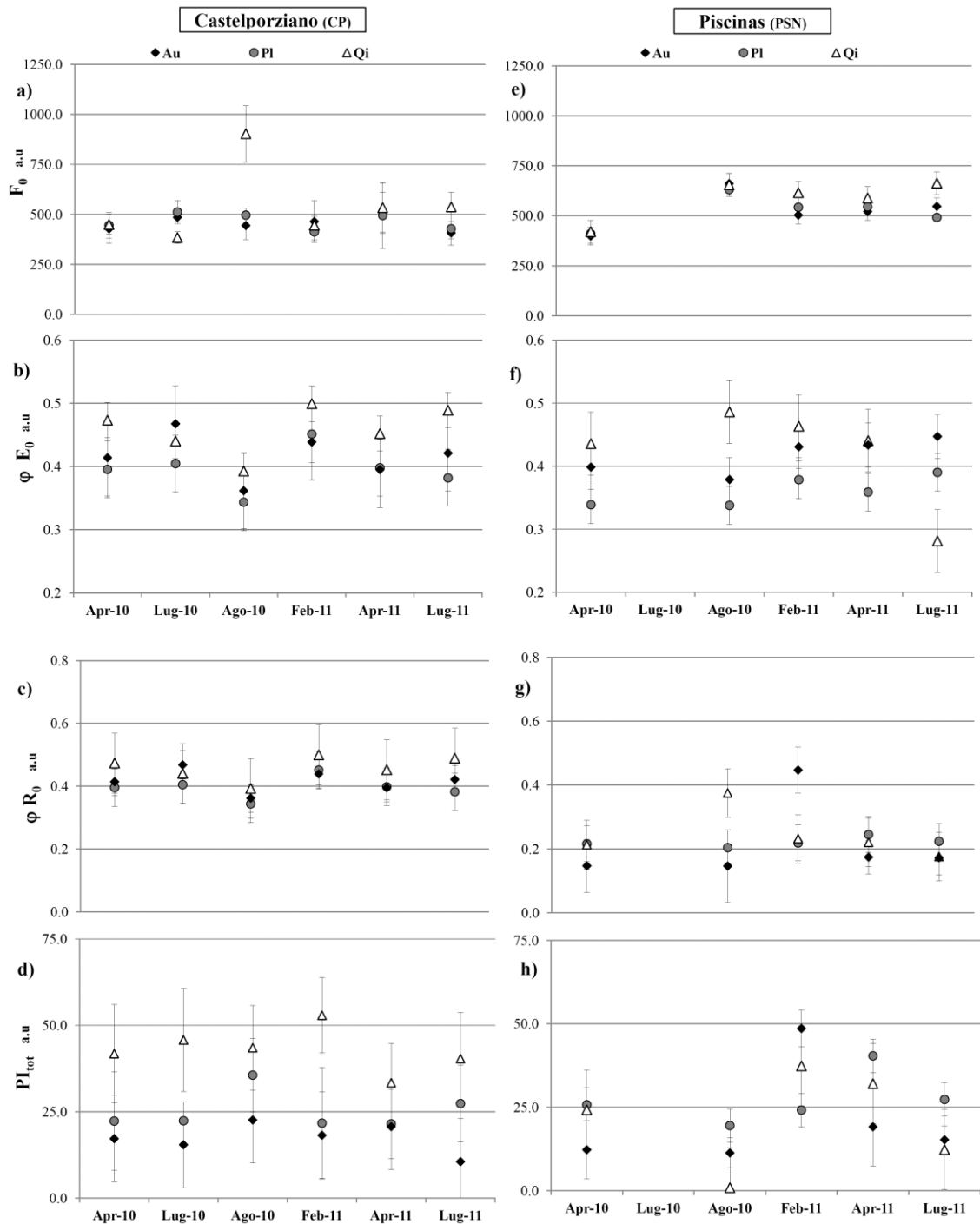


Fig. 5 – Misure di fluorescenza della Chl *a*: parametri JIP- test, per le diverse date di campionamento per le specie studiate: *A. unedo* (**Au**), *P. latifolia* (**PI**), *Q. ilex* (**Qi**), nei due siti sperimentali. F_0 , fluorescenza basale; ϕE_0 , efficienza con cui l'energia in entrata nel PSII (ABS) viene usata per il trasporto elettronico; ϕR_0 , efficienza con cui vengono ridotti gli accettori finali degli elettroni; PI_{TOT} , Performance index totale.

mentre nel leccio aumenta nel periodo più freddo. Nella fillirea, al contrario, il PI_{TOT} non varia. Nel sito di PSN, in concomitanza con il periodo di stress idrico (Agosto 2010) abbiamo un aumento di F_0 , per tutte e tre le specie. In questo sito i parametri che ci danno indicazioni sulla funzionalità del PSI (RE/ABS , PI_{TOT}) non sembrano risentire dei periodi di stress in *A. unedo* e nella *P. latifolia*; in quest'ultima specie, a PSN, aumentano nel periodo primaverile in concomitanza con i massimi di assimilazione misurati. In *Q. ilex* i due parametri hanno variazioni diverse a seconda della tipologia di stress: RE/ABS aumenta in presenza di stress idrico (Agosto 2010), mentre diminuisce nel Luglio 2011 (alto VPD); in entrambe le date invece i valori di PI_{TOT} sono significativamente inferiori a quelli riscontrate in altre giornate (Fig. 5, d).

3.5 Rapporto tra respirazione e fotosintesi

Nella Fig. 6 si può osservare l'andamento del rapporto R_D/P_{Nmax} nel sito di CP (Fig. 6, a) e PSN (Fig. 6, b).

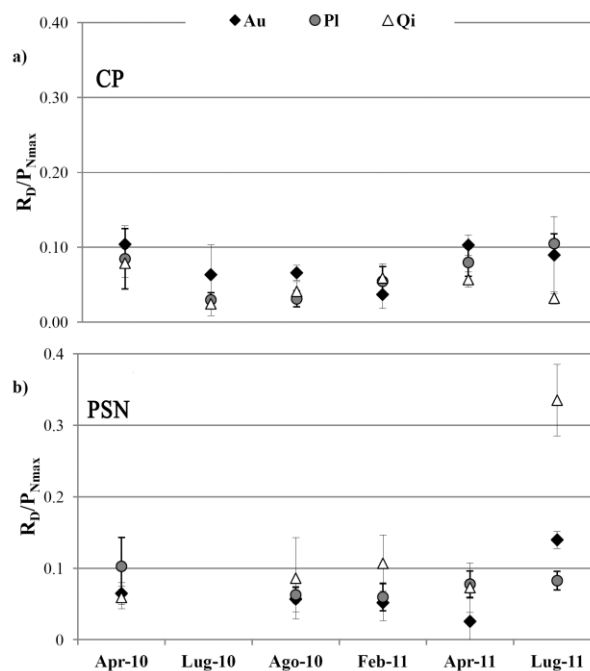


Fig. 6 – Andamento del rapporto tra R_D e fotosintesi massima per le specie considerate: **Au**, *A. unedo*; **PI**, *P. latifolia*; **Qi**, *Q. ilex* nei siti di studio: a) Castelporziano; b) Piscinas.

Nel sito di CP *A. unedo* e *Q. ilex* raggiungono il valore massimo nel periodo primaverile (0.104 ± 0.015 , 0.079 ± 0.012 rispettivamente). Nell'Agosto del 2010, data in cui si

registrano i valori più bassi di potenziale idrico misurati (Fig. 6, a) il rapporto diminuisce per il leccio, ma rimane stabile per le altre due specie. In *P. latifolia* il massimo si misura nel Luglio 2011, data in cui ad un aumento di R_{18} corrisponde una diminuzione di P_{Nmax} . Nel sito di Piscinas il rapporto rimane costante, aumentando in modo significativo solo in *A. unedo* e *Q. ilex* quando c'è un aumento del VPD (> 3 mbar, Luglio 2011, dati non mostrati), ma una buona disponibilità idrica al suolo.

a) Parametri		CP	PSN
Ψ_{PD}	Tempo	0.000	0.000
	Specie	0.028	0.504
	Tempo*Specie	0.001	0.509
Q_{10}	Tempo	0.589	0.061
	Specie	0.007	0.042
	Tempo*Specie	0.022	0.015
R_{18}	Tempo	0.003	0.009
	Specie	0.000	0.000
	Tempo*Specie	0.044	0.010
P_{Nmax}	Tempo	0.459	0.000
	Specie	0.000	0.000
	Tempo*Specie	0.319	0.023
R_D/P_{Nmax}	Tempo	0.002	0.000
	Specie	0.000	0.000
	Tempo*Specie	0.064	0.000

b) Specie		R_{18}	Q_{10}
Au	Sito	0.372	0.001
	Stagione	0.001	0.000
	Sito*Stagione	0.005	0.008
Pl	Sito	0.110	0.538
	Stagione	0.001	0.495
	Sito*Stagione	0.921	0.150
Qi	Sito	0.051	0.091
	Stagione	0.027	0.134
	Sito*Stagione	0.128	0.265

c) Parametri		CP	PSN
F_0	Tempo	0.000	0.000
	Specie	0.000	0.000
	Tempo*Specie	0.000	0.000
φE_0	Tempo	0.000	0.033
	Specie	0.000	0.000
	Tempo*Specie	0.001	0.000
φR_0	Tempo	0.000	0.000
	Specie	0.000	0.013
	Tempo*Specie	0.001	0.000
PI_{TOT}	Tempo	0.000	0.000
	Specie	0.000	0.003
	Tempo*Specie	0.001	0.000

Tab. 3 - Tabelle in cui vengono riportati gli output dell'analisi della varianza. a) per valutare in ogni sito la differenza tra specie che è presente nei trend temporali relativi alle misure ecofisiologiche effettuate; b) per valutare, per ogni specie, la differenza stagionale tra siti in R_{18} e

Q_{10} ; c) per valutare in ogni sito, la differenza presente tra le specie nei trend temporali relativi alle misure di fluorescenza della Chl *a*.

Discussione

In questo studio è stato indagato il meccanismo con cui, specie sempreverdi mediterranee di ecosistemi a macchia in aree costiere, modulano la R_D basale e il Q_{10} . In particolare, date le peculiarità ecologiche degli ecosistemi mediterranei, si è cercato di comprendere se i modelli predittivi della respirazione siano applicabili anche in tali situazioni. Effettuare tali misure in condizioni di campo in siti che hanno un' esposizione a stress di diversa natura ed intensità, ha consentito di indagare le relazioni fra lo stato fisiologico complessivo della vegetazione, stress ossidativi e processi di acclimatazione. Dalla relazione generale tra il Q_{10} o la R_{18} e la temperatura dei giorni precedenti, emerge che, diversamente da quanto trovato da altri autori, il modello di acclimatazione basato sulla T nel caso di specie sempreverdi mediterranee è soggetto a forti errori. Appare evidente come altri fattori debbano essere chiamati in causa per spiegarne gli andamenti temporali. Le variazioni osservate deviano da quanto trovato per altre specie sempreverdi (Slot et al., 2008; Tjoelker et al., 2001), ma Dillaway e Kruger (Dillaway e Kruger 2011) osservano simili deviazioni dal modello teorico per specie decidue di climi temperati. In particolare, gli alti valori di respirazione osservati nei mesi primaverili potrebbero servire ad alimentare processi che si intensificano durante ripresa vegetativa e l'accrescimento (Amthor, 2000; Gordo e Sanz, 2010; Trumore, 2006): l'aumento della richiesta metabolica di energia e composti intermedi, e i complessi meccanismi di rimobilitazione degli assimilati tra foglie vecchie e foglie nuove (Fife, 2008; Manes et al., 1997a), sono tra questi. I picchi di R_{18} non sono spiegabili neanche se consideriamo il tasso di assimilazione delle specie, che come noto, presentano massimi di fotosintesi nei periodi primaverili (Manes et al., 1997b). Infatti, in entrambi i siti, per *P. latifolia* e *A. unedo* gli abbassamenti significativi dell'assimilazione non coincidono con i minimi di R_{18} misurati (non è presente una omeostasi tra assimilazione e respirazione). Per *Q. ilex* è necessario fare un discorso più articolato: in questa specie, in accordo con i modelli teorici noti, la R_{18} diminuisce all'aumentare della temperatura (Muller et al., 2006). Se i valori di respirazione misurati in primavera supportano l'ipotesi che la fenologia e il tasso metabolico della pianta possano influenzare le risposte della R_{18} alla temperatura ambientale, il picco di respirazione in questa specie si registra nel Luglio 2011 nel sito di PSN. Questo risultato chiama in causa un ulteriore fattore che può influenzare la R_{18} : la

presenza di uno stress. Più in dettaglio, dai risultati ottenuti da questo studio emerge che stress di differente natura ed intensità, possono influenzare i processi catabolici in modo diverso. Mentre in risposta ad un periodo di stress idrico (Agosto 2010) la R_{18} diminuisce in entrambi i siti, quando lo stress è transitorio come nel Luglio 2011 dove sono presenti elevati valori di VPD, ma c'è una buona disponibilità idrica al suolo, la risposta della R_{18} cambia a seconda delle specie, mostrando un tendenziale aumento. Sebbene sia presente un'autocorrelazione tra temperatura e potenziale idrico (aumentano entrambi durante il periodo estivo), e la distinzione tra l'effetto dei due fattori sia complesso (Slot et al., 2008), che lo stress idrico determini un abbassamento della R_{18} è supportato dal fatto che quando diminuisce la disponibilità idrica al suolo misurata, in entrambi i siti, la R_{18} si abbassa anche se le T medie dei 2 giorni precedenti sono molto diverse tra loro (19.3 °C a CP e 27.1 °C PSN). Questo meccanismo di risposta della R_{18} all'aridità, è stato osservato nei due siti sperimentali e in tutte e tre le specie studiate: potrebbe dunque essere generalizzato per le specie sempreverdi mediterranee. I nostri dati sembrano quindi non essere in accordo con il meccanismo proposto da Flexas et al., 2005, dato che nel nostro caso nelle specie studiate, per stress di breve durata (limitazione stomatica dovuta ad elevato VPD) il tasso di respirazione aumenta, probabilmente per mantenere basso il potere riducente all'interno dei cloroplasti o per aumentare la produzione di ATP, utile a sostenere il turnover delle molecole proteiche del PSII (proteina D1) che sono maggiormente soggette a danni in caso di limitazioni stomatiche della P_N ; per stress più intensi (bassa disponibilità idrica al suolo, $\Psi_{PD} < -3$ Mpa) la R_D diminuisce; ipotizziamo che questa diminuzione sia una conseguenza di una strategia di down-regulation funzionale a cui le specie mediterranee vanno incontro per evitare una perdita di funzionalità diffusa dell'apparato fotosintetico e di conduzione (Manes et al., 1997a; Manes et al., 2003) Dai dati raccolti nei due siti per le specie studiate appare evidente come, in accordo con quanto osservato per altre specie sempreverdi e decidue (Xu et al., 2006; Zaragoza-Castells et al., 2008), al variare della temperatura viene modulata la respirazione basale, mentre la sensibilità alla temperatura (Q_{10}) rimane pressoché invariata. Per quanto riguarda il processo di acclimatazione, è interessante evidenziare come dai dati raccolti emerge che le variazioni misurate in R_{18} non siano influenzate dal sito, e quindi dai differenti regimi di temperatura (Tab.1, Fig.1). Solo in *A. unedo*, in accordo con quanto riscontrato in letteratura per specie sempreverdi in differenti biomi (Sitch et al., 2008; Slot et al., 2008; Stockfors e Linder, 2008), si registra un significativo

aumento del Q_{10} alle temperature più basse a cui si sono effettuate le misure (7.9°C, Febbraio 2011), ma unicamente nel sito di CP. Questo risultato può essere ricondotto alle basse temperature raggiunte a CP che sono inferiori a quelle misurate a PSN (Tab.1). È stato suggerito che l'aumento del Q_{10} a basse temperature può essere dovuto ad una limitazione dell'attività catalitica degli enzimi coinvolti nel processo di respirazione (Tjoelker et al., 2001; Atkin et al., 2003) più che alla disponibilità di substrato, dipendente a sua volta dal tasso di assimilazione. Nel nostro caso, non è presente un legame tra Q_{10} e P_{Nmax} : i tassi di assimilazione misurati a Febbraio mostrano valori simili ai massimi primaverili (Fig. 4, a). Siamo portati dunque ad ipotizzare che questo aumento del Q_{10} potrebbe essere legato ad una molteplicità di meccanismi utili ad evitare fenomeni di fotoinibizione che danneggiano il PSII (Busch et al., 2007; Demmig-Adams, 2006; Noguchi et al., 2008), e che tipicamente si verificano nel periodo invernale (Silva-Cancino et al., 2012). Tale interpretazione può essere supportata dall'analisi dei dati di fluorescenza che mettono in evidenza come non siano presenti né danni, né down-regulation del PSII nel periodo invernale. Inoltre il perché tale sensibilità aumenti solo in *A. unedo* e non nelle altre due specie, si può spiegare con un minore grado di sclerofillia per questa specie (Tab. 2). Tale caratteristica strutturale è spesso legata anche ad una minore quantità di azoto totale (Mediavilla 2011; Poorter e Bongers 2006; Reich et al., 1999) e quindi una minore quantità di proteine disponibili (Møller, 2001; Wiskich et al., 1985). Possiamo dunque ipotizzare che l'aumento del Q_{10} avvenga per compensare una minore quantità di enzimi funzionali in questa specie. I meccanismi che spiegano le variazioni di R_{18} sono meno noti di quelli alla base delle variazioni di Q_{10} ; tendenzialmente le variazioni di R_{18} sono interpretate come conseguenza di un cambiamento nelle capacità respiratorie dei tessuti, legate essenzialmente ad un cambiamento nel numero di mitocondri, o di enzimi della catena respiratoria (Atkin et al., 2009; Atkin e Tjoelker 2003). Tuttavia questa spiegazione meccanicistica non soddisfa le evidenze sperimentali fino ad ora accumulate: infatti se le variazioni in R_{18} fossero imputabili solo a questi fattori, l'acclimatazione nelle specie sempreverdi, con un'emivita fogliare lunga e alti costi energetici per la produzione e il mantenimento, avverrebbe preferibilmente attraverso un cambiamento nella sensibilità della R_D alla temperatura (Q_{10}), piuttosto che della R_{18} (Bruhn et al., 2007)

Conclusioni

Nel nostro caso di studio i trend stagionali di R_{18} e Q_{10} in specie sempreverdi mediterranee non seguono gli andamenti attesi dai modelli di respirazione, temperatura o fotosintesi dipendenti; entrambi i parametri sono fortemente influenzati dallo stato funzionale complessivo della pianta (fenologia, condizione metabolica, modalità di risposta a stress ossidativi) e non sembrano essere predicibili a partire da rapporti meccanicistici con le temperature medie, minime e massime dei siti, né con i tassi di assimilazione. Tale risultato si aggiunge alle crescenti evidenze sperimentali che considerando l'azione degli stress sull'acclimatazione della R_D , sottolineano come usare modelli di produttività in cui il modulo della respirazione non tiene conto della variabilità possibile, determina valutazioni erranee riguardo alla risposta che specie sempreverdi mediterranee avranno all'aumentare della temperatura. Tali errori possono aumentare quando si studiano ecosistemi costieri, vista la molteplicità di fattori di stress a cui sono sottoposti. Il monitoraggio e lo studio di come processi anabolici e catabolici vengono modulati in risposta ai fattori ambientali è essenziale per prevedere come possono variare i processi dinamici della vegetazione e per formulare piani di sviluppo delle aree costiere che rendano possibile la conservazione della vegetazione che in queste aree garantisce alcuni servizi ecosistemici chiave (protezione delle cenosi interne dai venti salmastri). L'attività sperimentale svolta in siti esposti a stress di diversa origine e intensità ha permesso di ipotizzare alcuni pattern di risposta della R_D e di individuare quali siano i fattori che maggiormente possono far deviare dalla norma il processo di acclimatazione. Tuttavia, la grande variabilità riscontrata tra le specie studiate e nei diversi siti, pone l'attenzione sul fatto che, per poter generalizzare il più possibile i risultati, e arrivare ad un modello di stampo meccanicistico per la respirazione fogliare, deve essere considerata la grande capacità di specie mediterranee di attuare aggiustamenti e strategie di tolleranza agli stress. È dunque auspicabile che, per meglio indagare e comprendere come i cambiamenti climatici in atto possano influire sul bilancio tra processi anabolici e catabolici in ecosistemi costieri, vengano effettuati esperimenti di lunga durata condizioni di multistress.

Specie di macchia mediterranea in ecosistemi costieri: resistenza e vulnerabilità.

I cambiamenti globali comporteranno un aumento dell'intensità e della frequenza di stress ossidativi sulla vegetazione costiera. Dal lavoro svolto emerge che lo scenario più catastrofico in cui gli effetti combinati di questi stress si sommano o interagiscono sinergicamente fra loro, è altamente improbabile. Più probabile che le specie rispondano allo stress prevalente. Infatti, a partire dalla letteratura a disposizione e dagli esperimenti svolti in condizioni controllate e di campo, emerge che gli stress ossidativi tendono a non interagire o spesso ad avere un effetto antagonista. Tutti gli esperimenti confermano la generale resistenza delle specie della macchia mediterranea agli stress ossidativi avvalorando l'ipotesi secondo cui specie adattate a uno stress risultano resistenti anche ad altri stress di natura simile (Alexieva, 2003; Bussotti, 2008). Tuttavia, sebbene bisogna essere cauti nell'estendere i risultati ottenuti in condizioni controllate agli ecosistemi naturali, dove complesse interazioni tra fattori abiotici e non concorrono alla funzionalità delle specie vegetali presenti, i meccanismi di resistenza messi in atto in risposta agli stress studiati possono inficiare la capacità delle specie di tollerare cicli consecutivi di stress abiotici quali aumento delle temperature, spray marino, salinità al suolo, ozono troposferico e aridità. Arriviamo a tale considerazione a partire dalle osservazioni riguardanti le variazioni in allocazione della biomassa o il tasso di accrescimento in risposta allo stress salino oppure all'azione dello spray marino. In particolare, l'aumento del rapporto fra la superficie fogliare e la biomassa radicale riscontrata in *Q. ilex* nei trattamenti con irrigazione salina, è efficace per ridurre l'apporto di ioni alle foglie, ma può rivelarsi problematico in caso di uno stress idrico improvviso, dove una maggiore superficie traspirante rispetto a quella assorbente può aumentare il rischio di embolia nel sistema di conduzione. Per quanto riguarda *A. unedo* è stato visto come, nonostante sia confermata la sua capacità di attivare poderose difese antiossidanti (Munné-Bosch e Penuelas, 2004), le foglie giovani sono estremamente sensibili allo spray marino come anche verificabile in campo dove spesso, dopo intense mareggiate, si possono incontrare i nuovi getti completamente necrotizzati. Inoltre, il forte controllo stomatico degli scambi gassosi, espressione di un meccanismo di evitanza, a lungo andare può avere conseguenze negative: il tasso di rigenerazione delle difese antiossidanti, che svolgono un ruolo chiave nella resistenza delle specie mediterranee agli stress ossidativi, dipende

infatti dal tasso di assimilazione. Se la fotosintesi diminuisce come conseguenza di una limitazione stomatica, calerebbe drasticamente anche la capacità delle specie mediterranee di resistere a stress ossidativi. Il controllo stomatico è un elemento chiave delle strategie di risposta e resistenza agli stress e risponde ad una grande varietà di stimoli e come confermato dagli esperimenti svolti, gli effetti che la combinazione degli stress ha sulle “pathway” di regolazione della g_s , non sono facilmente prevedibili. Se come precedentemente sottolineato, le specie risultano resistenti anche all’interazione tra stress, da entrambi gli esperimenti in Open Top Chamber, emerge che l’ O_3 può essere un co-fattore di stress importante a causa del suo elevato potere ossidativo (aumento della produzione di ROS), per gli effetti specie-specifici che ha sul ciclo dell’acido abscissico e dell’etilene, e quindi sul controllo dell’apertura stomatica. Oltre al controllo stomatico e ad una strategia conservativa, la vitalità delle specie studiate è prevalentemente mantenuta e regolata attraverso la modulazione della funzionalità della fotochimica primaria, dove la spiegazione teleologica degli aggiustamenti osservati, è quella di evitare la produzione di ROS, seguendo pattern di risposta generali quali: aumento dell’efficienza con cui l’energia in entrata nei fotosistemi viene dissipata sotto forma di calore; down-regulation del PSII attuata attraverso il controllo del pH tilacoidale (ciclo delle xantofille), un cambiamento della proporzionalità fra il PSI e il PSII, e un maggior funzionamento del trasporto pseudociclico degli elettroni (ciclo H_2O-H_2O). Anche il bilancio tra processi anabolici e catabolici cambia in funzione dei diversi stress ossidativi, ed è necessario approfondire i meccanismi sottostanti alla regolazione della respirazione che sono ancora largamente incompresi, aggiungendo così una grande incertezza nei modelli di risposta della vegetazione ai cambiamenti globali.

Dagli studi effettuati in condizioni di campo, è emerso che anche per specie sempreverdi mediterranee i due modelli utilizzati per la stima della respirazione più utilizzati, che si basano su una relazione esponenziale tra temperatura e respirazione, o su una omeostasi tra respirazione e fotosintesi, diminuiscono la loro affidabilità in presenza di fattori di stress. Possono essere quindi inadeguati quando applicati alla vegetazione costiera, o anche per la vegetazione più interna in ambito mediterraneo, qualora i cambiamenti globali comportassero un aumento dell’intensità e della frequenza degli stress.

Il livello di stress oltre il quale le relazioni empiriche osservate perdono validità, possono dipendere dalla resistenza specie-specifica. Dal nostro caso di studio è emerso che anche la *P. latifolia*, specie spiccatamente resistente a stress ossidativi, non presenta dei trend di respirazione più vicini all'andamento teorico. Piuttosto appare che in specie sempreverdi mediterranee, in periodi in cui all'aumento della temperatura è associato un aumento degli stress ossidativi, la modulazione di R_{REF} e Q_{10} vada nella direzione di arrivare ad un'omeostasi più che ad un'acclimatazione. Benché l'attività svolta per studiare l'effetto combinato di stress abiotici sia stata affrontata in diverse condizioni sperimentali al fine di poter generalizzare il più possibile i risultati ottenuti, la grande capacità di specie mediterranee di attuare aggiustamenti e strategie di tolleranza agli stress, mette in risalto la necessità di condurre studi sull'effetto di multistress in siti che differiscano per intensità e durata delle condizioni limitanti.

Le persone, i rapporti, le opportunità. Ringraziamenti

Il lavoro che avete letto è stato realizzato grazie alla irrinunciabile presenza di persone che in modi diversi e complementari, mi hanno accompagnato nel percorso di studio e di formazione personale che è stato il dottorato. Devo iniziare, e non per una questione di formalità, da Fausto (si si proprio lui, il Prof. Manes). I suoi consigli sono stati sempre doni mai imposizioni, i suoi stimoli una componente essenziale alla ricerca come pure il suo trovare un riferimento nel passato per lanciare un'idea nel futuro. Ringrazio il Prof. Manes per la sua vivida curiosità scientifica.

Ringrazio Elisabetta, occhio lucido e attento, in cui ho trovato un tecnico di laboratorio super efficiente, una ricercatrice preparata, una collaboratrice disponibile, un'amica.

A Simone dico grazie per la generosità con cui mi ha coinvolto nelle sue ricerche e nelle sue modalità di fare ricerca. La sua presenza, le nostre chiacchierate sulle foglie artificiali e non, sono state per me fonte di dubbio e poi di slancio nella direzione della curiosità nel cercare nuove strade, e dell'uso virtuoso delle intuizioni nel tentativo di interpretare i percorsi che i fenomeni osservati mostrano. A Simone devo il sorriso e l'energia con cui nonostante la tensione, la stanchezza, gli interrogativi che sembravano arcani, ho affrontato questi anni. A Simone dico grazie per aver avuto la pazienza e l'abilità di costruire il percorso con cui ha fatto crescere la mia coscienza scientifica, più adatto alle mie caratteristiche professionali ed umane.

Ringrazio Riccardo Marzuoli e Giacomo Gerosa per aver collaborato e scambiato conoscenze e competenze con me, per aver accolto i miei errori con un sorriso e avermi dato la possibilità di crescere apportando al mio percorso piccoli ma essenziali tasselli.

Ringrazio la Dott.ssa Cinzia Perrino per la collaborazione e il sostegno che ha dato alle mie idee e alla mia ricerca.

Ringrazio Massimiliano Tattini per avermi accolto nel suo laboratorio e per avermi fatto domande a cui non sapevo rispondere.

Ringrazio Filippo Bussotti per la disponibilità scientifica e umana con cui mi ha fatto partecipe delle sue profonde conoscenze.

Ringrazio L'Accademia delle Scienze per il supporto finanziario al mio progetto di dottorato, e tutti coloro che lavorando all'interno della Tenuta Presidenziale di Castelporziano, hanno agevolato lo svolgimento del mio lavoro.

Un ringraziamento speciale ad Adriano e Raffaella per aver allietato le permanenze a Curno.

Mamma, Papà, la Sister Isa, nonnò Pasqualino e nonna Italia, nonnò Pasquale e nonna Donatella, Misa, il dolce felino di famiglia, per essere quello che sono, speciali presenze che mi hanno ascoltato, supportato, sopportato...amato!

Bibliografia

- Ackerly D., 2004. Functional strategies of chaparral shrubs in relation to seasonal water deficit and disturbance. *Ecological Monographs* 74, 25-44.
- Acosta A., Ercole S., Stanisci A., De Patta Pillar V., and Blasi C. 2007. Coastal Vegetation Zonation and Dune Morphology in Some Mediterranean Ecosystems. *Journal of Coastal Research*, 23, 1518–1524.
- Alessio G. A., De Lillis M., Brugnoli E., Lauteri M., 2004. Water sources and water-use efficiency in Mediterranean coastal dune vegetation. *Plant Biology*. 6, 350–357.
- Alexieva V., Ivanov S., Sergiev I., and Karanov E., 2003. Interaction between stresses. *Bulgarian Journal of Plant Physiol. Special Issue: Proceedings of the European Workshop ESSA*: 1–17.
- Amthor J.S., 2000. The McCree–de Wit–Penning de Vries–Thornley respiration paradigms: 30 years later. *Annals of Botany* 86, 1–20.
- Armstrong A.F., Logan D., Tobin A.K., O’Toole P., e Atkin O.K., 2006. Heterogeneity of plant mitochondrial responses underpinning respiratory acclimation to the cold in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant, Cell and Environment* 29, 940–949.
- Asada K., 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141, 391–396.
- Asada K., 1999. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 601–639.
- Atkin O.K., e Macherel D., 2009. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Annals of Botany* 103, 581–597.
- Atkin O.K., Tjoelker M.G., 2003. Thermal acclimation and the dynamic response of plant respiration to temperature. *Trends in Plant Science* 8, 343–351.
- Atkin O.K., Bruhn D., Tjoelker M.G., 2005a. Response of plant respiration to changes in temperature: mechanisms and consequences of variations in Q₁₀ values and acclimation. In: Lambers H, Ribas-Carbó M, eds. *Plant Respiration: from Cell to Ecosystem*. Berlin, Germany: Springer, 95–135.
- Atkin O.K., Bruhn D., Hurry V.M., Tjoelker M.G., 2005b. The hot and the cold: unravelling the variable response of plant respiration to temperature. *Functional Plant Biology* 32, 87-105.
- Atkin O.K., Zhang Q., e Wiskich J.T., 2002. Effect of temperature on rates of alternative and cytochrome pathway respiration and their relationship with the redox poise of the quinone pool. *Plant Physiology* 128, 212–222.
- Atkin O.K., Holly C., Ball M.C., 2000. Acclimation of snow gum (*Eucalyptus pauciflora*) leaf respiration to seasonal and diurnal variations in temperature: the importance of changes in the capacity and temperature sensitivity of respiration. *Plant, Cell & Environment* 23, 15–26.

- Atkin O.K., Evans, J.R., Ball, M.C., Siebke, K., 1998. Relationship between the inhibition of leaf respiration by light and enhancement of leaf dark respiration following light treatment. *Australian Journal Plant Physiology* 25, 437-443.
- Atkin O.K., Atkinson L.J., Fisher R., Campbell C.D., Zaragoza-Castells J., Woodward F.I., Pitchford J., Hurry V., 2008. Using temperature-dependent changes in leaf scaling relationships to quantitatively account for thermal acclimation of respiration in a coupled global climate-vegetation model. *Global Change Biology* 14, 2709–2726.
- Atkin O.K., Scheurwater I., Pons T.L., 2006. High thermal acclimation potential of both photosynthesis and respiration in two lowland *Plantago* species in contrast to an alpine congeneric. *Global Change Biology* 12, 500–515.
- Bacchetta G., Casti M., Zavattono L., 2007. Analisi della vegetazione del distretto minerario di Montevecchio (Sardegna sud-occidentale). *Fitosociologia* 44, 83-108.
- Baker N.R., 2008. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. *Annual Reviews Plant Biology* 59, 89-113.
- Baldocchi D.D., Ma S., Rambal S., Misson L., Ourcival J., Limousin J., Pereira J., e Papale D., 2010. On the differential advantages of evergreenness and deciduousness in mediterranean oak woodlands: a flux perspective. *Ecological Applications* 20, 1583–1597.
- Barbagallo R.P., Oxborough K., Pallett K.E., Baker N.R., 2003. Rapid noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology* 132, 485–9.
- Barnes J.D., Gimeno B.S., Davison A.W., Dizengremel P., Gerant D., Bussotti F., Velissariou D., 2000. Air pollution impacts on pine forests in the Mediterranean basin. In *Ecology, Biogeography and Management of Pinus halepensis and P. brutia Forest Ecosystems in the Mediterranean Basin* (eds G.NeEman e L.Traband), pp. 391–404. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Bhattacharjee S., 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science* 89, 1113-1121.
- Biehler K., Fock H., 1996. Evidence for the Contribution of the Mehler-Peroxidase Reaction in Dissipating Excess Electrons in Drought-Stressed Wheat. *Plant Physiology* 11, 265-272.
- Bongi F., Loreto F., 1989. Gas-exchange properties of salt-stressed olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant Physiology* 90, 1408–1416.
- Bowler C., Montagu M.V., Inze D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43, 83– 116.
- Bradbury M., Baker N.R., 1984. A quantitative determination of photochemical and non-photochemical quenching during the slow phase of the chlorophyll fluorescence induction curve of bean leaves. *Biochimica et Biophysica Acta* 765, 275–281.
- Bridger G., Yang W., Falk D., McKerstie B., 1994. Cold acclimation increased tolerance of activated oxygen in winter cereals. *Journal of Plant Physiology* 144, 235–240.

- Bruhn D., Schortemeyer M., Edwards E.J., Egerton J.G., Hocart C.H., Evans J.R. and Ball M.C., 2008. The apparent temperature response of leaf respiration depends on the timescale of measurements: a study of two cold climate species. *Plant Biology* 10, 185–193.
- Bruhn D., Egerton J.J.G., Loveys B.R., Ball M.C., 2007. Evergreen leaf respiration acclimates to long-term nocturnal warming under field conditions. *Global Change Biology* 13, 1216-1223.
- Busch F., Huner N.P.A., Ensminger I., 2007. Increased air temperature during simulated autumn conditions does not increase photosynthetic carbon gain but affects the dissipation of excess energy in seedlings of the evergreen conifer jack pine. *Plant Physiology* 143, 1242–1251.
- Bussotti F., Agati G., Desotgiu R., Matteini P., Tani C., 2005. Ozone foliar symptoms in woody plants assessed with ultrastructural and fluorescence analysis. *New Phytologist* 166, 941–955.
- Bussotti F., Bettini D., Grossoni P., Mansuino S., Nibbi R., Soda C., Tani C. 2002a. Structural and functional traits of *Quercus ilex* in response to water availability. *Environmental and Experimental Botany* 47, 11–23.
- Bussotti F., and Gerosa G., 2002b. Are the Mediterranean forests in Southern Europe threatened from ozone? *Journal Mediterranean Ecology* 3, 23–34.
- Bussotti F., Bottacci A., Grossoni P., Mori B. and Tani C., 1997. Cytological and structural changes in *Pinus pinea* L. needles following the application of an anionic surfactant. *Plant Cell & Environment* 20, 513-520.
- Bussotti F., Grossoni P., Pantani F., 1995. The role of marine salt and surfactants in the decline of Tyrrhenian coastal vegetation in Italy. *Annals of Forest Science* 52 251-261.
- Bussotti F., 2008. Functional leaf traits, plant communities and acclimation processes in relation to oxidative stress in trees: a critical overview. *Global Change Biology* 14, 2727–2739.
- Bussotti F., Cozzi, A., Ferretti, M., 2006. Field Surveys of Ozone Symptoms on Spontaneous Vegetation. Limitations and Potentialities of the European programme, *Environmental Monitoring Assessment* 115, 335–348.
- Bussotti F., Desotgiu, R., Cascio, C., Pollastrini, M., Gravano E., Gerosa G., Marzuoli R., Nali C., Lorenzini G., Salvatori E., Manes F., Schaub M., Strasser R.J., 2011. Ozone stress in woody plants assessed with chlorophyll a fluorescence. A critical reassessment of existing data. *Environmental and Experimental Botany* 73, 19–30.
- Bussotti F., Strasser R.J., Schaub M., 2007. Photosynthetic behavior of woody species under high ozone exposure probed with the JIP-Test-a review. *Environmental Pollution* 147,430–437.
- Caffyn A., Prosser B., Jobbins G., 2002. Socio-economic Framework. A framework for the analysis of socio-economic impacts on beach environments. In Scapini, F. (ed.) *Baseline Research for the integrated sustainable management of Mediterranean Sensitive coastal ecosystems*. IAO, Florence.

- Calatayud V., Marco F., Cerveró J., Sánchez-Peña G., José Sanz M., 2010. Contrasting ozone sensitivity in related evergreen and deciduous shrubs. *Environmental Pollution* 158, 3580-3587.
- Calatayud V., Cerveró J., Calvo E., a, García-Breijo F.J., Reig-Armiñana J., Sanz M. J., 2011. Responses of evergreen and deciduous *Quercus* species to enhanced ozone levels. *Environmental Pollution* 159, 55-63.
- Campbell C., Atkinson L., Zaragosa-Castells J., Lundmark M., Atkin O. e Hurry V. 2007. Acclimation of photosynthesis and respiration is asynchronous in response to changes in temperature regardless of plant functional group. *New Phytologist* 176, 375–389.
- Cannell M.G.R., Thornley J.H.M., 2000. Modelling the components of plant respiration: some guiding principles. *Annals of Botany* 85, 45–54.
- Castagna A., Ranieri A., 2009. Detoxification and repair process of ozone injury: From O₃ uptake to gene expression adjustment. *Environmental Pollution* 157, 1461-1469.
- Cavender-Bares J., Bazzaz F.A., 2004. From leaves to ecosystems: Assessing photosynthesis and plant function in ecological studies. In G. C. Papageorgiou and Govindjee [eds.], *Chlorophyll fluorescence: A signature of photosynthesis*, 737 – 755. Kluwer, Dordrecht, Netherlands.
- Centritto M., Loreto F., Chartzoulakis K., 2003. The use of low [CO₂] to estimate diffusional and non-diffusional limitations of photosynthetic capacity of salt-stressed olive saplings. *Plant, Cell and Environment* 26, 585-594.
- Chaves M.M., Flexas J., Pinheiro C., 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103, 551–560.
- Chaves M.M., Maroco J.P., Pereira J.S., 2003. Understanding plant response to drought: from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30, 239–264.
- Cheplick P.G., Demetri H., 1999. Impact of saltwater spray and sand deposition on the coastal annual *Triplasis purpurea* (Poaceae). *American Journal of Botany* 86, 703-710.
- Cimato A., Castelli S., Tattini M., Traversi ML. 2010. An ecophysiological analysis of salinity tolerance in olive. *Environmental and Experimental Botany* 68, 214-221.
- Clark A.J., Landolt W., Bucher J.B., Strasser R.J., 2000. Beech (*Fagus sylvatica*) response to ozone exposure assessed with a chlorophyll a fluorescence performance index. *Environmental Pollution* 109, 501-507.
- Cooper O. R., Parrish, D. D., Stohl A., Trainer M., Nedelec P., Thouret V., Cammas, J. P., Oltmans S. J., Johnson B. J., Tarasick D., Leblanc T., McDermid I. S., Jaffe D., Gao R., Stith, J., Ryerson T., Aikin K., Campos T., Weinheimer A., and Avery M. A., 2010. Increasing springtime ozone mixing ratios in the free troposphere over western North America, *Nature* 463, 344–348.
- Corcuera L., Camarero J.J., Gil-Pelegrín E., 2004. Effects of a severe drought on *Quercus ilex* radial growth and xylem anatomy. *Trees – Structure and Function* 18, 83–92.

- Corcuera L., Morales F., Abadia A., Gil-Pelegrín E., 2005. Seasonal changes in photosynthesis and photoprotection in a *Quercus ilex* ssp *ballota* woodland located in its upper altitudinal extreme in the Iberian Peninsula. *Tree Physiology* 25, 599–608.
- Costanza R., Arge D., De Groot R., Farber S., Grasso M., et al. 1997. The value of the world ecosystem services and natural capital. *Nature* 387, 253-260.
- Covey-Crump E.M., 2002. Regulation of root respiration in two species of *Plantago* that differ in relative growth rate: the effect of short- and long-term changes in temperature. *Plant Cell Environment* 25, 1501–1513.
- Cruz de Carvalho M.H., 2008. Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signalling. *Plant Signaling and Behavior* 3, 156-165.
- D’Haese D., Vandermeiren K., Caubergs R.J., Guisez Y., De Temmerman L., Horemans N., 2004. Non-photochemical quenching kinetics during the dark to light transition in relation to the formation of antheraxanthin and zeaxanthin. *Journal of Theoretical Biology* 227, 175–186.
- Da Selveira L., Sternberg L., Swart P.K., 1987. Utilization of freshwater and ocean water by coastal plants of southern Florida. *Ecology* 68, 1898–1905.
- Dat J., Vandenabeele S., Vranová E., Van Montagu M., Inzé, D., Van Breusegem F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57, 779-795.
- Davidson E., Janssens I., Luo Y., 2006. On the variability of respiration in terrestrial ecosystems: moving beyond Q10. *Global Change Biology* 12, 154-164.
- Demmig-Adams B., Adams W.W. III, 2006. Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation: Tansley review. *New Phytologist* 172, 11–21.
- Demmig-Adams B., Adams W.W. III, Barker D.H., Logan BA., Bowling DR., Verhoeven AS., 1996. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess. *Physiologia Plantarum* 98, 253–264.
- Demmig-Adams B., Adams W.W., 2000. Photosynthesis-harvesting sunlight safely. *Nature* 403, 373-374.
- De Marco A., 2008. Assessment of present and future risk to Italian forests and human health: modelling and mapping. *Environmental Pollution* 157, 1407–1412.
- Di Castri F., Hansen A.J., and Debussche M., 1990. Biological Invasions in Europe and the Mediterranean Basin.
- Diamantopoulos J., Biel C., Savé R., 2001. Meccanismi di resistenza /sensibilità nei confronti dell’ spray marino inquinato nella vegetazione costiera della zona di Barcellona. *Linea Ecologica* N. 1, Gennaio-Febbraio, AnnoXXXIII:55-61.
- Dillaway D.N., Kruger E.L., 2011. Leaf respiratory acclimation to climate: comparisons among boreal and temperate tree species along a latitudinal transect. *Tree Physiology* 31, 1114–1127.

- Domec J.C., Noormets A., King J.S., Sun G., McNulty S.G., Gavazzi M.J., Boggs J.L., Treasure E.A., 2009. Decoupling the influence of leaf and root hydraulic conductances on stomatal conductance and its sensitivity to vapor pressure deficit as soil dries in a drained loblolly pine plantation. *Plant, Cell & Environment* 32, 980–991.
- El Ayeb N., Henchi B., Garrec J.P., Rejeb M.N., 2004. Effets des embruns marins pollués sur les feuilles d'*Acacia cyanophylla* Lindl. et d'*Eucalyptus gomphocephala* DC. du littoral tunisien. *Annales des Sciences Forestières* 61, 283-291.
- Elvira S., Alonso R., Castillo F., Gimeno B.S., 1998. On the response of pigments and antioxidants of *Pinus halepensis* seedlings to Mediterranean climatic factors and long-term ozone exposure. *New Phytologist* 138, 419–432.
- Elvira S., Bermejo V., Manrique E., and Gimeno B. S., 2004. On the response of two populations of *Quercus coccifera* to ozone and its relationship with ozone uptake, *Atmospheric Environment* 38, 2305-2311.
- Fares S., Mereu S., Scarascia Mugnozza G., Vitale M., Manes F., Frattoni M., Ciccioli P., Gerosa G., Loreto F., 2009. The ACCENT-VOCBAS field campaign on biosphere-atmosphere interactions in a Mediterranean ecosystem of Castelporziano (Rome): site characteristics, climatic and meteorological conditions, and eco-physiology of vegetation. *Biogeosciences* 6, 1043–1058.
- Farquhar G.D., von Caemmerer S., Berry J.A., 1980. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* 149, 78–90.
- Fife D.N., Nambiar E.K.S., Saur E., 2008. Retranslocation of foliar nutrients in evergreen tree species planted in a Mediterranean environment. *Tree Physiology* 28, 187–196.
- Filella I., Llusà J., Piñol J., Peñuelas J., 1998. Leaf gas exchange and fluorescence of *Phillyrea latifolia*, *Pistacia lentiscus* and *Quercus ilex* saplings in severe drought and high temperature conditions. *Environmental and Experimental Botany* 39, 213-220.
- Fleck I., Peña-Rojas K., Aranda X., 2010. Mesophyll conductance to CO₂ and leaf morphological characteristics under drought stress during *Quercus ilex* L. resprouting. *Annals of Forest Science* 67, 308-314.
- Flexas J., Galmés J., Ribas-Carbo M., Medrano H., 2005. The effects of drought in plant respiration. In: Lambers H, Ribas-Carbo M. (eds) *Advances in Photosynthesis and Respiration* 18. *Plant Respiration: from Cell to Ecosystem*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 85–94.
- Flexas J., Medrano H., 2002. Drought-inhibition of photosynthesis in C₃ plants: stomatal and non-stomatal limitation revisited. *Annals of Botany* 89, 183–189.
- Flexas J., Bota J., Loreto F., Cornic G., Sharkey T.D., 2004. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C₃ Plants. *Plant Biology*. 6, 269-279.
- Foyer C. H., Shigeoka S., 2011. Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis. *Plant Physiology* 155, 93–100.

- Foyer C.H., Lelandais M., Kunert K.J., 1994. Photooxidative stress in plants. *Plant Physiology* 9, 696–717.
- Fuhrer J., Achermann B., 1994. Critical Levels for Ozone: a UN/ECE Workshop Report. Swiss Federal Research Station for Agricultural Chemistry and Environmental Hygiene CH-3097 Liebefeld-Bern, Switzerland, No. 16, p. 328.
- Gellini R., Pantani F., Grossoni P., Bussotti F., Barbolani E., Rinallo C., 1985. Further investigation on the causes of disorder of coastal vegetation in the park of San Rossore (central Italy). *European Journal of Forest Pathology* 15, 145 – 157.
- Gellini R., Pantani F., Grossoni P., Bussotti F., Barbolani E., Rinallo C. 1983. Survey of the deterioration of the coastal vegetation in the park of San Rossore in central Italy. *European Journal of Forest Pathology* 13, 296–304.
- Genty B., Briantais J.M., Baker N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimical Biophysical Acta* 990, 87–92.
- Genty B., Harbinson J., Baker N.R., 1990. Relative quantum efficiencies of the two photosystems of leaves in photorespiratory and nonphotorespiratory conditions. *Plant Physiology Biochemical* 28, 1–10.
- Gerosa G., Vitale M., Finco A., Manes F., Ballarin Denti A., Cieslik S., 2005. Ozone uptake by an evergreen Mediterranean forest (*Quercus ilex*) in Italy. Part I: micrometeorological flux measurements and flux partitioning. *Atmospheric Environment* 39, 3255-3266.
- Gerosa G., Finco A., Mereu S., Vitale M., Manes F., Ballarin-Denti A., 2009a. Comparison of seasonal variations of ozone exposure and fluxes in a Mediterranean Holm oak forest between the exceptionally dry 2003 and the following year. *Environmental Pollution* 157, 1737-1744.
- Gerosa G., Marzuoli, R., Rossini, M., Panigada, C., Meroni, M., Colombo, R., Faoro, F., Iriti, M., 2009b. A flux-based assessment of the effects of ozone on foliar injury, photosynthesis, and yield of bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Borlotto Nano Lingua di Fuoco) in open-top chambers. *Environmental Pollution* 157, 1727-1736.
- Ghashghaie J., Duranceau M., Badeck FW., Cornic G., Adeline M-T, Deleens E., 2001. $\delta^{13}\text{C}$ of CO_2 respired in the dark in relation to $\delta^{13}\text{C}$ of leaf metabolites: comparison between *Nicotiana sylvestris* and *Helianthus annuus* under drought. *Plant Cell & Environment* 24, 505–515.
- Gifford RM., 2003. Plant respiration in productivity models: conceptualization, representation and issues for global terrestrial carbon cycle research. *Functional Plant Biology* 30, 171-186.
- Gilmore A.M., Shinkarev V.P., Hazlett T.L., Govindjee, 1998. Quantitative analysis of the effects of intrathylakoid pH and xanthophyll cycle pigments on chlorophyll a fluorescence lifetime distributions and intensity in thylakoids. *Biochemistry* 37, 582-593.

- Giorgi F., Lionello P., 2008. Climate change projections for the Mediterranean region. *Global and Planetary Change* 63, 90-104.
- Golding A.J., Johnson G.N., 2003. Down-regulation of linear and activation of cyclic electron transport during drought. *Planta* 218, 107-114.
- Gordo O., Sanz J. J., 2010. Impact of climate change on plant phenology in Mediterranean ecosystems. *Global Change Biology* 16, 1082–1106.
- Goulden M., 1996. Carbon assimilation and water-use efficiency by neighboring mediterranean-climate oaks that differ in water access. *Tree Physiology* 16, 417–424.
- Gratani L., Bombelli A., 2001. Differences in leaf traits among Mediterranean broad-leaved evergreen shrubs. *Annales Botanici Fennici* 38, 15–24.
- Gravano E., Bussotti F., Strasser R.J., Schaub M., Novak K., Skelly J.M., Tani C., 2004. Ozone symptoms in leaves of woody plants in open-top chambers: ultrastructural and physiological characteristics. *Physiologia Plantarum* 121, 620-633.
- Greaver T.L., Sternberg L.S., 2010. Decreased precipitation exacerbates the effects of sea level on coastal dune ecosystems in open ocean islands. *Global Change Biology* 16, 1860–1869.
- Greaver T.L., Leonel L., Sternberg S., 2006. Linking marine resources to ecotonal shifts of water uptake by terrestrial dune vegetation. *Ecology* 87, 2389–2396.
- Grenon M., Batisse M., 1989. *Futures for the Mediterranean: The Blue Plan*. Oxford University Press, UK.
- Griffiths M. E., Orians C. M., 2003. Salt spray differentially affects water status, necrosis, and growth in coastal sandplain heathland species. *American Journal of Botany* 8, 1188–1196.
- Griffiths M.E., Orians C.M., 2004. Salt spray effects on forest succession in rare coastal sandplain heathlands: evidence from field surveys and *Pinus rigida* transplant experiments. *Journal Torrey Botany Society* 131, 23 –31.
- Griffiths M.E., 2006. Salt spray and edaphic factors maintain dwarf stature and community composition in coastal sandplain heathlands. *Plant Ecology* 86, 186-69.
- Grossoni P., Bussotti F., Mori B., Magalotti M., Mansuino S., 1998. Morpho-anatomical effects of pollutants on *Pinus pinea* L. needles. *Chemosphere* 36, 913 – 917.
- Guidi L., Lorenzini G., Soldatini G.F., 1988. Phytotoxicity of sea-water sprays on forest plants with special reference to the role of surfactants. *Environmental and Experimental Botany* 28, 85-94.
- Haldimann P., Strasser R.J., 1999. Effects of an aerobiosis as probed by the polyphasic chlorophyll a fluorescence rise kinetic in pea (*Pisum sativum* L.). *Photosynthesis Research* 62,67–83.

- Havaux M., Strasser R.J., Greppin G., 1991. A theoretical and experimental analysis of the qP and qN coefficients of chlorophyll fluorescence quenching and their relation to photochemical and nonphotochemical events. *Photosynth Research* 27, 41-55.
- Heath R.L., 2008. Modification of the biochemical pathways of plants induced by ozone: What are the varied routes to change? *Environmental Pollution* 155, 453-463.
- Heath R.L., Lefohn A.S., Musselman R.C., 2009. Temporal processes that contribute to nonlinearity in vegetation responses to ozone exposure and dose. *Atmospheric Environment* 43, 2919–2928.
- Hernández E.I., Vilagrosa A., Pausas J.G., Bellot J., 2010. Morphological traits and water use strategies in seedlings of Mediterranean coexisting species. *Plant Ecology* 207, 233–244.
- Hooper J.K., Argyroudi-Akoyunoglou J.H., 2004. Assembly of light harvesting complexes of Photosystem II and the role of chlorophyll b. In: Papageorgiou GC, Govindjee (eds) *Advances in photosynthesis and respiration. Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis*, vol. 19. Springer, Dordrecht, pp 679–712.
- INFC: Guida alla classificazione della vegetazione forestale. Inventario Nazionale delle Foreste e dei Serbatoi Forestali di Carbonio. MiPAF – Direzione Generale Risorse Forestali Montane Idriche Corpo Forestale dello Stato, CRA-ISAFSA, Trento, 2003.
- IPCC: *Climate change 2007: contribution of the three Working Groups to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate change*, Cambridge University Press.
- Jenkin M.E., 2008. Trends in ozone concentration distributions in the UK since 1990: local, regional and global influences. *Atmospheric Environment* 42, 5434–5445.
- Kangasjärvi J., Jaspers P., Kollist H., 2005. Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant, Cell and Environment* 28, 1021–1036.
- Karlsson P.E., Orlander G., Langvall O., 2006. Negative impact of ozone on the stem basal area increment of mature Norway spruce in south Sweden. *Forest Ecology and Management* 232, 146–151.
- Karnosky D.F., Pregitzer K.S., Zak D.R., 2005. Scaling ozone responses of forest trees to the ecosystem level in a changing climate. *Plant, Cell & Environment* 28, 965–981.
- Karnosky D.F., Skelly J.M., Percy K.E., Chappelka A.H., 2007. Perspectives regarding 50 years of research on effects of tropospheric ozone air pollution on US forests. *Environmental Pollution* 147, 489–506.
- Kato M.C., Hikosaka K., Hirotsu N., Makino A., Hirose T., 2003. The excess light energy that is neither utilized in photosynthesis nor dissipated by photoprotective mechanisms determines the rate of photoinactivation in photosystem II. *Plant & Cell Physiology* 44, 318–325.
- Kautsky H., Apel W., Amann H., 1960. Chlorophyll fluoreszenz und Kohlensäureassimilation. XIII. Die Fluoreszenzkurve und die Photochemie der Pflanze. *Biochem. Zeit.* 322, 277-292.

- Keuken M., Roemera M., Van den Elshoutb S., 2009. Trend analysis of urban NO₂ concentrations and the importance of direct NO₂ emissions versus ozone/NO_x equilibrium. *Atmospheric Environment* 43, 4780-4783.
- Klikoff L.G., 1996. Temperature dependence of the oxidative rates of mitochondria in *Danthonia intermedia*, *Penstemon davidsonii* and *Sitanion hystrix*. *Nature* 212, 529–530.
- Kruse J., Rennenberg H., Adams M. A. 2010. Steps towards a mechanistic understanding of respiratory temperature responses. *New Phytologist* 189, 659–677.
- Lambers H., Robinson SA., Ribas-Carbo M., 2005. Regulation of respiration in vivo. The effects of drought in plant respiration. In: Lambers H, Ribas-Carbo M (eds) *Advances in Photosynthesis and Respiration 18. Plant Respiration: From Cell to Ecosystem*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 1–15.
- Larcher W., 2000. Temperature stress and survival ability of Mediterranean sclerophyllous plants. *Plant Biosystems* 134, 279-295.
- Lawlor D.W., Cornic G., 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell & Environment* 25, 275–294.
- Lefohn A.S., Shadwick D., Oltmans S.J., 2008. Characterizing long-term changes in surface ozone levels in the United States (1980–2005). *Atmospheric Environment* 42, 8252–8262.
- Levitt J., 1980. *Response of plants to environmental stresses*, vol 1, 2nd edn. Academic Press, New York.
- Lichtenthaler H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymology* 148, 350–382.
- Lichtenthaler H.K., Rinderle U., 1988. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry* 19, 529–585.
- Liska A.J., Shevchenko A., Pick U., Katz A., 2004. Enhanced photosynthesis and redox energy production contribute to salinity tolerance in *Dunaliella* as revealed by homology-based proteomics. *Plant Physiology* 136, 2806-2817.
- Long S.P., Bernacchi C.J., 2003. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany* 54, 2393-2401.
- Lorenzini G., Nali C., 2005. *Le piante e l'inquinamento dell'aria*. Edition: 3, Springer.
- Loreto F., Centritto M., Chartzoulakis K., 2003. Photosynthetic limitations in olive cultivars with different sensitivity to salt stress. *Plant, Cell & Environment* 26, 595–601.
- Maggio A., De Pascale S., Fagnano M., Barbieri G., 2007. Can salt stress-induced physiological responses protect tomato crops from ozone damages in Mediterranean environments? *European Journal of Agronomy* 26, 454–461.

- Maggio A., Quaglietta Chiaranda F., Cefariello R., Fagnano M., 2009. Responses to ozone pollution of alfalfa exposed to increasing salinity levels. *Environmental Pollution* 157, 1445–1452.
- Mahajana S., Tuteja N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 444, 139-158.
- Manes F., Donato E., Vitale M., 2001. Physiological response of *Pinus halepensis* needles under ozone and water stress conditions. *Physiologia Plantarum* 113, 249–257.
- Manes F., Vitale M., Di Traglia M., 2005. Monitoring tropospheric ozone impact on plants in natural and urban areas with a Mediterranean climate. *Plant Biosystems* 139, 265–278.
- Manes F., Vitale M., Donato E., Paoletti E., 1998. O₃ and O₃ + CO₂ effects on a Mediterranean evergreen broadleaf tree, Holm oak (*Quercus ilex* L.). *Chemosphere* 36, 801–806.
- Manes F., Vitale M., Fabi M.A., De Santis F., Zona D., 2007. Estimates of potential ozone stomatal uptake in mature trees of *Quercus ilex* in a Mediterranean climate. *Environmental and Experimental Botany* 59, 235-241.
- Mao H., Iwanaga F., Yamanaka N., Yamamoto F., 2008. Growth, photosynthesis, and ion distribution in hydroponically cultured *Populus alba* L. cuttings grown under various salinity concentrations. *Landscape Ecology Engineering* 4, 75–82.
- Martinez Vilalta J., Mangiron M., Ogaya R., Sauret M., Serrano L., Peñuelas J., Piñol J., 2003. Sap flow of three co-occurring Mediterranean woody species under varying atmospheric and soil water conditions. *Tree Physiology* 23, 747–758.
- Martinez M.L., Intralawan A., Vázquez G., Pérez-Maqueo O., Sutton P., Landgrave R., 2007. The coasts of our world: ecological, economic and social importance. *Ecological Economics* 63, 254–272.
- Maun M.A., 1994. Adaptations enhancing survival and establishment of seedlings on coastal sand dunes. *Plant ecology* 111, 1573- 5052.
- Matyssek R., Le Thiec D., Löw M., Dizengremel P., Nunn A.J., Häberle K.H., 2006. Interactions between drought and O₃ stress in forest trees. *Plant Biology* 8, 11-17.
- Maun M.A., 1994. Adaptations enhancing survival and establishment of seedlings on coastal sand dunes. *Plant ecology* 111, 1573- 5052.
- Mass E.V., Hoffman G.J., 1977. Crop salt tolerance-current assessment. *Journal Irrigation Drainage Division* 103,115-134.
- Maxwell K., Johnson N., 2000. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51, 659–668.
- McDowell N., Pockman W.T., Allen C.D., Breshears D.D., Cobb N., Kolb T., Sperry J., West A., Williams D., Yepez E.A., 2008. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? Tansley review. *New Phytologist* 178, 719–739.

- Mediavilla S., Escudero A., Heilmeyer H., 2001. Internal leaf anatomy and photosynthetic resource-use efficiency: interspecific and intraspecific comparisons. *Tree Physiology* 21, 251–259.
- Mediavilla S., Gallardo-López V., González-Zurdo P., Escudero A., 2011. Patterns of leaf morphology and leaf N content in relation to winter temperatures in three evergreen tree species. *International Journal of Biometeorology* DOI: 10.1007/s00484-011-0498-2.
- Medrano H., Flexas J., Galmés J., 2009. Variability in water use efficiency at the leaf level among Mediterranean plants with different growth forms. *Plant Soil* 317, 17–29.
- Melgar J.C., Guidi L., Remorini D., Agati G., Degl'innocenti E., Castelli S., Baratto M.C., Faraloni C., Tattini M., 2009. Antioxidant defences and oxidative damage in salt-treated olive plants under contrasting sunlight irradiance. *Tree Physiology* 29, 1187–1198.
- Meleux F., Solmon F., Giorgi F., 2007. Increase in European summer ozone amounts due to climate change. *Atmospheric Environment* 41, 577–587.
- Mencuccini M., 2003. The ecological significance of long-distance water transport: short-term regulation, long-term acclimation and the hydraulic costs of stature across plant life forms. *Plant, Cell e Environment* 26, 163–182.
- Mereu S., Gerosa G., Marzuoli R., Fusaro L., Salvatori E., Finco A., Spano D., Manes F., 2011. Gas exchange and JIP-test parameters of two Mediterranean maquis species are affected by sea spray and ozone interaction. *Environmental and Experimental Botany* 73, 80-88.
- Mereu S., Salvatori, E., Fusaro, L., Gerosa, G., Muys, B., and Manes, F., 2009. A whole plant approach to evaluate the water use of mediterranean maquis species in a coastal dune ecosystem. *Biogeosciences* 6, 1713–1746.
- Miller G., Suzuki N., Cifti-Yilmaz S., Mittler R., 2009. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell & Environment* 33, 453–467.
- Mills G., Hayes F., Simpson D., Emberson L., Norris D., Harmens H., Büker P., 2011. Evidence of widespread effects of ozone on crops and (semi-) natural vegetation in Europe (1990–2006) in relation to AOT40- and flux-based risk maps. *Global Change Biology* 17, 592–613.
- Mitchell P.J., Veneklass E.J., Lambers H., Burgess S.S.O., 2008. Leaf water relations during summer water deficit: differential responses in turgor maintenance and variation in leaf structure among different plant communities in southwestern Australia. *Plant Cell & Environment* 31, 1791–1802.
- Mitrakos K., 1980. A theory for Mediterranean plant life. *Acta Oecologica* 15, 245–252.
- Mittler R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7, 405–410.
- Mittler R., 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* 11, 15-19.

- Møller I.M., 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52, 561-591.
- Muller M., Hernandez I., Alegre L., Munné-Bosch S., 2006. Enhanced a-tocopherol quinone levels and xanthophyll cycle de-epoxidation in rosemary plants exposed to water deficit during a Mediterranean winter. *Journal of Plant Physiology* 163, 601-606.
- Muller O., Hirose T., Werger M.J.A., Hikosaka K., 2011. Optimal use of leaf nitrogen explains seasonal changes in leaf nitrogen content of an understorey evergreen shrub. *Annales of Botany* 108, 529-536.
- Muller P., Li X.P., Niyogi K.K., 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy, *Plant Physiology* 125, 1558-1566.
- Munné-Bosch S., Peñuelas J., 2004. Drought-induced oxidative stress in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) growing in Mediterranean field conditions. *Plant Science* 166, 1105-1110.
- Munns R., Schachtman D.P., Condon A.G., 1995. The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. *Australian Journal of Plant Physiology* 22, 561-569.
- Munns R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment* 25, 239-250.
- Munns R., Tester M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59, 651-681.
- Musselman R.C., Lefohn A.S., Massman W.J., Heath R.L., 2006. A critical review and analysis of the use of exposure- and flux-based ozone indices for predicting vegetation effects. *Atmospheric Environment* 40, 1869-1888.
- Nali C., Paoletti, E., Marabottini R., Della Rocca G., Lorenzini G., Paolacci A.R., Ciaffi M., Badiani M., 2004. Ecophysiological and biochemical strategies of response to ozone in Mediterranean evergreen broadleaf species. *Atmospheric Environment* 38, 2247-2257.
- Navarro A., Bañon S., Conejero W., Sanchez-Blanco M.J., 2008. Ornamental characters, ion accumulation and water status in *Arbutus unedo* seedlings irrigated with saline water and subsequent relief and transplanting. *Environmental and Experimental Botany* 62, 364-370.
- Navarro A., Bañon, S., Olmos E., Sánchez-Blanco M.J., 2007. Effects of sodium chloride on water potential components, hydraulic conductivity, gas exchange and leaf ultrastructure of *Arbutus unedo* plants. *Plant Science* 172, 473-480.
- Navas M., Ducout B., Roumet C., Richarte J., Garnier J., Garnier E., 2003. Leaf life span, dynamics and construction cost of species from Mediterranean old-fields differing in successional status. *New Phytologist* 159, 213-228.
- Niinemets Ü., Portsmouth A., Tena D., Tobias M., Matesanz S., Valladares F., 2007. Do we underestimate the importance of leaf size in plant economics? disproportional scaling

- of support costs within the spectrum of leaf physiognomy. *Annals of Botany* 100, 283–303.
- Niinemets Ü., 2010. Responses of forest trees to single and multiple environmental stresses from seedlings to mature plants: Past stress history, stress interactions, tolerance and acclimation. *Forest Ecology and Management* 260 1623-1639.
- Noguchi K., Yoshida K., 2008. Interaction between photosynthesis and respiration in illuminated leaves. *Mitochondrion* 8, 87-99.
- Ogaya R., Peñuelas J., 2006. Contrasting foliar responses to drought in *Quercus ilex* and *Phillyrea latifolia*. *Biologia Plantarum* 50, 373-382.
- Ogaya R., Peñuelas J., Asensio D., Llusà J., 2011. Chlorophyll fluorescence responses to temperature and water availability in two co-dominant Mediterranean shrub and tree species in a long-term field experiment simulating climate change. *Environmental and Experimental Botany* 73, 89–93.
- Oukarroum A., Schansker G., Strasser R.J., 2009. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl a fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. *Physiologia Plantarum* 137, 188–199.
- Ow L.F., Whitehead D., Walcroft A.S., Turnbull M.H., 2010. Seasonal variation in foliar carbon exchange in *Pinus radiata* and *Populus deltoides*: respiration acclimates fully to changes in temperature but photosynthesis does not. *Global Change Biology* 16, 288–302.
- Oxborough K., 2004. Imaging of chlorophyll a fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. *Journal of Experimental Botany* 55, 400- 412.
- Paoletti E., Nicolotti G., Bussotti F., 2001. L'inquinamento da tensioattivi ed effetti sulla vegetazione. *Linea Ecologica* N. 1, Gennaio-Febbraio, Anno XXXIII 21-27.
- Paoletti E., 2006. Impact of ozone on Mediterranean forests: A review, *Environmental Pollution* 144, 463–474.
- Paoletti E., 2005. Ozone slows stomatal response to light and leaf wounding in a Mediterranean evergreen broadleaf, *Arbutus unedo*. *Environmental Pollution* 134, 439-445.
- Paoletti E., Contran N., Manning W., Ferrara A.M., 2009. Ozone and Mediterranean ecology: Plants, people, problems. *Environmental Pollution* 157, 1397–1398.
- Parida A.K., Das A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60, 324–349.
- Peguero-Pina J.J., Sancho-Knapik D., Flexas J., Gil-Pelegrín E., 2009. Differential photosynthetic performance and photoprotection mechanisms of three Mediterranean evergreen oaks under severe drought stress. *Functional Plant Biology* 36, 453–462.
- Pellegrini E., Carucci G. M., Campanella A., Lorenzini G., Nali C., 2011. Ozone stress in *Melissa officinalis* plants assessed by photosynthetic function. *Environmental and Experimental Botany* 73, 94–101.

- Poorter H., Niklas K.J., Reich P.B., Oleksyn J., Poot P., Mommer L., 2011. Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control. *New Phytologist* 193, 30-50.
- Poorter L., Bongers F., 2006. Leaf traits are good predictors of plant performance across 53 rain forest species. *Ecology* 87, 1733–1743.
- Reich P.B., Ellsworth D.S., Walters M.B., Vose J.M., Gresham C., Volin J.C., Bowman W.D., 1999. Generality of leaf trait relationships: a test across six biomes. *Ecology* 80, 1955-1969.
- Remorini D., Melgar J.C., Guidi L., Degl’Innocenti E., Castelli S., Traversi M.L., Massai R., Tattini M., 2009. Interaction of root zone salinity and solar irradiance on the physiology and biochemistry of *Olea europaea*. *Environmental and Experimental Botany* 65, 210–219.
- Rennenberg H., Loreto F., Polle A., Brillì F., Fares S., Beniwal R.S., Gessler A., 2006. Physiological responses of forest trees to heat and drought. *Plant Biology* 8, 556–571.
- Rettori A., Paoletti, E., Nicolotti, G., Gullino, M.L., 2005. Ecophysiological responses of Mediterranean pines to simulated sea aerosol polluted with an anionic surfactant: prospects for biomonitoring. *Annals Forest Science* 62, 351–360.
- Retuerto R., Fernandez-Lema, B., Roiloa, R., Obeso, J.R., 2004. Increased photosynthetic performance in holly trees infested by scale insects. *Functional Ecology* 18, 664-669.
- Rewald B., Rachmilevitch S., McCue M.D, Ephrath J.E., 2011. Influence of saline drip-irrigation on fine root and sap-flow densities of two mature olive varieties. *Environmental and Experimental Botany*. In press
- Ribas À., Peñuelas J., Elvira S., Gimeno B.S., 2005a. Ozone exposure induces the activation of leaf senescence-related processes and morphological and growth changes in seedlings of Mediterranean tree species. *Environmental Pollution* 134, 291-300.
- Ribas A., Peñuelas J., Elvira S., Gimeno B.S., 2005b. Contrasting effects of ozone under different water supplies in two Mediterranean tree species. *Atmospheric Environment* 39, 685-693.
- Ribas-Carbo M., Taylor N.L., Giles L., Busquets S., Finnegan P.M., Day D., Lambers H., Medrano H., Berry J.A., Flexas J., 2005. Effects of water stress on respiration in soybean (*Glycine max.* L.) leaves. *Plant Physiology* 139, 466–473.
- Richardson A.D., Braswell B.H., Hollinger D.Y., Burman P., Davidson E.A., Evans R.S., Flanagan L.B., Munger J.W., Savage K., Urbanski S.P., Wofsy St.C., 2006. Comparing simple respiration models for eddy flux and dynamic chamber data. *Agricultural and Forest Meteorology* 141, 219–234.
- Rodríguez-Calcerrada J., Atkin O. K., Robson T. M., Zaragoza-Castells J., Gil L., Aranda I., 2009. Thermal acclimation of leaf dark respiration of beech seedlings experiencing summer drought in high and low light environments. *Tree Physiology* 30, 214–224.

- Rodríguez-Calcerrada J., Shahin O., del Carmen del Rey M., Rambal S., 2011. Opposite changes in leaf dark respiration and soluble sugars with drought in two Mediterranean oaks. *Functional Plant Biology* 38, 1004-1015.
- Rontein D., Basset G., Hanson A., 2002. Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metabolic Engineering* 4, 49–56.
- Rustad L.E., Campbell J.L., Marion G.M., Norby R.J., Mitchell M.J., Hartley A.E., Cornelissen J.H.C., Gurevitch J., 2001. A meta-analysis of the response of soil respiration, net nitrogen mineralization, and aboveground plant growth to experimental ecosystem warming. *Oecologia* 126, 542-562.
- Ryan M.G., Linder S., Vose J.M., 1994. Dark respiration of pines. *Ecological Bulletins*, 43, 50–63.
- Sanchez-Blanco M.J., Rodrigues P., Morales M.A. and Torrecillas A., 2003. Contrasting physiological responses of dwarf sea-lavender and Marguerite to simulated sea spray deposition. *Journal of Environmental Quality* 32, 1931-1938.
- Sanchez-Blanco M.J., Rodrigues P., Olmos E., Morales M.A. and Torrecillas A., 2004. Differences in the effects of simulated sea spray on water relations, salt content and leaf ultrastructure of rock-rose plants. *Journal of Environmental Quality* 33,1369-1375.
- Schansker G., Srivastava A., Govindjee, Strasser R.J., 2003. Characterization of 820 nm transmission induction curves in pea leaves: kinetic separation between plastocyanin and P700 contributions, *Functional Plant Biology* 30, 1–10.
- Schansker G., Tóth S.Z., Strasser R.J., 2005. Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP. *Biochimica et Biophysica Acta* 1706, 250–261.
- Schreiber V., Neubauer C., 1987. The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: II. Partial control by the photosystem II donor side and possible ways of interpretation. -*Z. Naturforsch.* 1255-1264.
- Shao H.B., Chu L.Y., Shao M.A., Jaleel C.A., Mi H.M., 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *C.R. Biologies* 331, 433–441.
- Sharkey T.D., Bernacchi C.J., Farquhar G.D., Singsaas E.L., 2007. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. *Plant Cell & Environment* 30, 1035–1040.
- Slot M., Zaragoza-Castells J., Atkin OK., 2008. Transient shade and drought have divergent impacts on the temperature sensitivity of dark respiration in leaves of *Geum urbanum*. *Functional Plant Biology* 35, 1135–1146.
- Srivastava A., Guisse B., Greppin H., Strasser J. R., 1997. Regulation of antenna structure and electron transport in Photosystem II of *Pisum sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll a fluorescence transient: OKJIP. *Biochimica et Biophysica Acta* 1320, 95–106.
- Stepien P., Johnson G.N., 2009. Contrasting responses of photosynthesis to salt stress in the glycophyte arabidopsis and the halophyte thellungiella: role of the plastid terminal oxidase as an alternative electron sink. *Plant Physiology* 149, 1154-1165.

- Stirbet A., Govindjee, Strasser and Strasser R.J., 1998. Chlorophyll a fluorescence induction in higher plants: Modelling and numerical simulation. *Journal of Theoretic Biology* 193, 131–151.
- Stockfors J., Linder S., 1998. The effect of nutrition on the seasonal course of needle respiration in Norway spruce stands. *Trees* 12, 130–138.
- Strasser R.J., 1988. A concept for stress and its application in remote sensing. In: Lichtenthaler H.K. (ed.), *Applications of Chlorophyll Fluorescence*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 333–337.
- Strasser B., 1997. Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients. *Photosynthetic Research* 52, 147–155.
- Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A., 2004. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient, in: G.C. Papageorgiou, Govindjee (Eds.), *Advances in Photosynthesis and Respiration Series (Govindjee – Series Editor), Chlorophyll a Fluorescence: a Signature of Photosynthesis* 19, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 321–362.
- Strasser R.J., Srivastava A. and Govindjee. 1995. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem. Photobiologica* 61, 32–42.
- Strasser R.J., Srivastava A., Tsimilli-Michael M., 2000. The fluorescent transient as a tool to characterise and screen photosynthetic samples. In: Yunus, M., Pathre, U., Mohanty, P. (Eds.), *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation*.
- Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Qiang S., Goltsev V., 2010. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797, 1313–1326.
- Taiz L., and Zeiger E., 2008. *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Redwood City, California.
- Tattini M., Traversi M.L., 2008. Responses to changes in Ca²⁺ supply in two Mediterranean evergreens, *Phillyrea latifolia* and *Pistacia lentiscus*, during salinity stress and subsequent relief. *Annals of Botany* 102, 609–622.
- Tattini M., Montagni G., Traversi M.L., 2002. Gas exchange, water relations and osmotic adjustment in *Phillyrea latifolia* grown at various salinity concentrations. *Tree Physiology* 22, 87–93.
- Tattini M., Remorini D., Pinelli P., Agati A., Saracini E., Traversi M.L., e Massai R., 2006. Morpho-anatomical, physiological and biochemical adjustments in response to root zone salinity stress and high solar radiation in two Mediterranean evergreen shrubs, *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus*. *New Phytologist* 170, 779–794.
- Terradas J., Save R., 1992. The influence of summer and winters stress and water relationships on the distribution of *Quercus ilex* L. *Vegetatio* 99, 137–145.

- Tezara W., Martiane, D., Rengifo, E., Herrera, A., 2003. Photosynthetic Responses of the Tropical Spiny Shrub *Lycium nodosum* (Solanaceae) to Drought, Soil Salinity and Saline Spray. *Annals Botany of London* 92, 757-765.
- Tjoelker M.G., Oleksyn J., Reich P.B., e Zytkowskiak R., 2008. Coupling of respiration, nitrogen, and sugars underlies convergent temperature acclimation in *Pinus banksiana* across wide-ranging sites and populations. *Global Change Biology* 14, 782–797.
- Tjoelker M.G., Oleksyn J., Lorenc-Plucinska G., e Reich P.B., 2007. Acclimation of respiratory temperature responses in northern and southern populations of *Pinus banksiana*. *New Phytologist* 181, 218–229.
- Tjoelker M.G., Oleksyn J., Lorenc-Plucinska G., Reich P.B., 2009. Acclimation of respiratory temperature responses in northern and southern populations of *Pinus banksiana*. *New Phytologist*, 181, 218–229.
- Tjoelker M.G., Oleksyn J., Reich P.B., 2001. Modelling respiration of vegetation: evidence for a general temperature-dependent Q_{10} . *Global Change Biology* 7, 223–230.
- Tsimilli-Michael M., Strasser R.J., 2008. In vivo assessment of plant's vitality: applications in detecting and evaluating the impact of Mycorrhization on host plant's, in: A. Varma (Ed.), *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics*, 3rd edition, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 679–703.
- Trumbore S., 2006. Carbon respired by terrestrial ecosystems – recent progress and challenges. *Global Change Biology* 12, 141–153.
- Tsimplis M. N., Marcos M., Somot S., 2008. 21st century Mediterranean sea level rise: Steric and atmospheric pressure contributions from a regional model. *Global and Planetary Change* 63, 105–111.
- Turnbull M.H., Whitehead D., Tissue D.T., Schuster W.S.F., Brown K.J. e Griffin K.L., 2001. Responses of leaf respiration to temperature and leaf characteristics in three deciduous tree species vary with site water availability. *Tree Physiology* 21, 571-578.
- UNECE, 2004. The scientific basis for the new flux-based critical levels for ozone. Executive Body for the Convention on Long-range Transboundary Air Pollution 7. UNECE, EB.AIR/WG.1/2004/8.
- Valladares F., Martinez-Ferri E., Balaguer L., Perez-Corona E., Manrique E., 2000. Low leaf-level response to light and nutrients in Mediterranean evergreen oaks: a conservative resource-use strategy? *New Phytologist* 148, 79–91.
- Van der Meulen F., Udo de Haes H.A., 1996. Nature conservation and integrated coastal zone management in Europe: present and future. *Landscape Urban Planning* 34, 401-410.
- Vitale M., Salvatori E., Loreto F., Fares S., Manes F., 2008. Physiological responses of *Quercus ilex* leaves to water stress and acute ozone exposure under controlled conditions. *Water Air Soil Pollution* 189,113–125.

- Vogiatzakis I.N., Griffiths G.H., Cassar L.F., Morse S., 2005. Mediterranean Coastal Landscapes. Management Practices, Typology and Sustainability. University of Reading, Reading, UK.
- Walker S., Wilson J.B., Steel J.B., Rapson G.L., Smith B., King W.McG. Cottam Y.H. 2003. Properties of ecotones: Evidence from five ecotones objectively determined from a coastal vegetation gradient. *Journal of Vegetation Science* 14, 579-590.
- Whitehead D., Griffin K., L., Turnbull M., H., Tissue D., T., Engel V.C., Brown K.J., Schuster F.W.S., Walcrof A.S., 2004. Response of total night-time respiration to differences in total daily photosynthesis for leaves in a *Quercus rubra* L. canopy: implications for modelling canopy CO₂ exchange. *Global Change Biology* 10, 925–938.
- Wilkinson S., Davies W. J., 2010. Ozone suppresses soil drying- and abscisic acid (ABA)-induced stomatal closure via an ethylene-dependent mechanism. *Plant, Cell & Environment* 32, 949–959.
- Williams K., Ewel K.C., Stumpf R.P., Putz F.E., and Workman T.W., 1999. Sea-level rise and coastal forest retreat on the west coast of Florida, USA. *Ecology* 80, 2045–2063.
- Williams K., MacDonald M., e Sternberg L., da Silveira L., 2003. Interactions of storm, drought, and sea-level rise on coastal forest: a case study. *Journal of Coastal Research* 19, 1116–1121.
- Wiskich J.T. and Dry, I.B., 1985. The tricarboxylic acid cycle in plant mitochondria: its operation and regulation. In *Encyclopaedia of Plant Physiology. Higher Plant Cell Respiration* (Douce, R. and Day, D.A., eds) pp. 281–313, Springer Verlag
- Wittig V.E., Ainsworth E. A., Naidu S. L., Karnosky D.F., e Long S.P., 2009. Quantifying the impact of current and future tropospheric ozone on tree biomass, growth, physiology and biochemistry: a quantitative meta-analysis. *Global Change Biology* 15, 396–424.
- Wittig V.E., Ainsworth E.A., Long S.P., 2007. To what extent do current and projected increases in surface ozone affect photosynthesis and stomatal conductance of trees? A meta-analytic review of the last 3 decades of experiments. *Plant Cell & Environment* 30, 1150–1162.
- Wright I.J., Reich P.B., Westoby M., Ackerly D.D., Baruch Z., Bongers F., Cavender-Bares J., Chapin F.S., Cornelissen J.H.C., Diemer M., Flexas J., Garnier E., Groom P.K., Gulias J., Hikosaka K., Lamont B.B., Lee T., Lee W., Lusk C., Midgley J.J., Navas M-L, Niinemets Ü., Oleksyn J., Osada N., Poorter H., Poot P., Prior L., Pyankov V.I., Roumet C., Thomas S.C., Tjoelker M.G., Veneklaas E.J., Villar R., 2004. The world-wide leaf economics spectrum. *Nature* 428, 821–827.
- Wythers K. R., Rei Ch P. B., Tjoelker M. G. and Bol Stad P.B., 2005. Foliar respiration acclimation to temperature and temperature variable Q₁₀ alter ecosystem carbon balance. *Global Change Biology* 11, 435–449.
- Xu C.Y., and Griffin K. L., 2006. Seasonal variation in the temperature response of leaf respiration in *Quercus rubra*: foliage respiration and leaf properties. *Functional Ecology* 20, 778–789.

Yura H., Ogura A., 2006. Sandblasting as a possible factor controlling the distribution of plants on a coastal dune system. *Plant Ecology* 185, 199–208.

Zaragoza-Castells J., Sánchez-Gómez D., Hartley I. P., Matesanz S., Valladares F., Lloyd J., Atkin O.K., 2008. Climate-dependent variations in leaf respiration in a dry-land, low productivity Mediterranean forest: the importance of acclimation in both high-light and shaded habitats. *Functional Ecology* 22, 172–184.

Zaragoza-Castells J., Sánchez-Gómez D., Valladares F., Hurry V., Atkin O.K., 2007. Does growth irradiance affect temperature dependence and thermal acclimation of leaf respiration? Insights from a Mediterranean tree with long-lived leaves. *Plant, Cell & Environment* 30, 820–833.

Zheng Y., Shimizu H., Barnes J.D., 2002. Limitations to CO₂ assimilation in ozone-exposed leaves of *Plantago major*. *New Phytologist* 155, 67–78.

APPENDICI

Appendice I

Mereu S., Gerosa G., Marzuoli R., Fusaro L., Salvatori E., Finco A., Spano D., Manes F., 2011. Gas exchange and JIP-test parameters of two Mediterranean maquis species are affected by sea spray and ozone interaction. *Environmental and Experimental Botany* 73, 80-88.

Appendice II

Mereu, S., Salvatori, E., Fusaro, L., Gerosa, G., Muys, B., and Manes, F., 2009. A whole plant approach to evaluate the water use of mediterranean maquis species in a coastal dune ecosystem *Biogeosciences*, 6, 1713–1746.

Appendice III

Bussotti F., Pollastrini M., Cascio C., Desotgiu R., Gerosa G., Marzuoli R., Nali C., Lorenzini G., Pellegrini E., Carucci M. G., Salvatori E., Fusaro L., Piccotto M., Malaspina P., Manfredi A., Roccotello E., Toscano S., Gottardini E., Cristofori A., Fini A., Weber D., Baldassarre V., Barbanti L., Montil A. and Strasser Reto J. 2011. Conclusive remarks. Reliability and comparability of chlorophyll fluorescence data from several field teams. *Environmental and Experimental Botany*, 73, 116-119.

Appendice IV

Mereu S., Gerosa G., Finco A., Fusaro L., Muys B., and Manes F., 2009. Improved sapflow methodology reveals considerable night-time ozone uptake by Mediterranean species. *Biogeosciences*, 6, 3151–3162.