

**Centro di Ricerca INquinamento atmosferico ed EcoSistemi
C.R.IN.ES**

Risultati dell'attività scientifica condotta nel 2010

Progetto

**VALUTAZIONE DEL RUOLO DEI SOLFATI NELL'AUMENTO
DELLA RESISTENZA DEL FRUMENTO DURO ALL'OZONO**

Autori:

**Dr. Giacomo Gerosa
Dr. Riccardo Marzuoli
Prof. Franco Faoro
Dr. Damiano Patuzzo**

Sommario

Introduzione.....	3
Materiale e metodi	5
Materiale vegetale	5
Disegno sperimentale	6
Calcolo delle esposizioni all’ozono (AOT40).....	9
Misure di fluorescenza.....	10
Misure di conduttanza stomatica	12
Misure di attività biochimica.....	13
Misure di resa agronomica e produttività.....	14
Analisi statistica dei dati.....	14
Risultati.....	15
Andamento climatico durante la stagione sperimentale	15
Fenologia.....	18
Fluorescenza.....	18
Conduttanza stomatica.....	37
Biochimica	39
Resa agronomica e produttività.....	41
Sintomi visibili	43
Conclusioni	47

Introduzione

Il frumento duro rappresenta la principale coltura cerealicola italiana e negli ultimi anni il suo areale di coltivazione ha interessato anche il Nord, grazie all'introduzione di varietà resistenti al freddo e alla ricerca di più alte rese unitarie per ettaro (fonte. ISMEA, dati 2008). Ciò spiega e giustifica l'interesse crescente della comunità scientifica per questa specie, che ha determinato l'attivazione di numerosi programmi di ricerca, e tra questi, studi sulle risposte delle piante di frumento duro agli stress causati dall'ozono. L'esposizione a ozono potrebbe, infatti, causare in una specie sensibile come questa, cali di resa superiori al 20% ma anche alterare il contenuto di carboidrati e di proteine della granella, con conseguenza negative sulla qualità del prodotto finale (Pleijel et al., 2006). L'importanza di questi studi deriva anche dalla considerazione che questo gas raggiunge la massima concentrazione proprio durante la formazione della spiga e la maturazione delle cariossidi, rendendo altamente critico il suo impatto negativo sulla produzione di granella.

Negli ultimi vent'anni, in Pianura Padana, le concentrazioni di ozono troposferico si sono mantenute su livelli pressoché costanti (**Figura 1**), tuttavia a fronte di ciò si è osservato un progressivo aumento della diffusione dei sintomi visibili da ozono sul frumento come rilevato in numerose ricerche condotte negli ultimi anni (Faoro et al., 2009; Picchi et al., 2010). Tale intensificazione non appare dunque correlata alle concentrazioni di ozono, mentre potrebbe trovare una spiegazione nella progressiva diminuzione di apporto di zolfo per via atmosferica. A partire dalla metà degli anni '80, infatti, si è assistito ad un progressivo abbassamento delle deposizioni secche ed umide di SO₂ (**Figura 2**), che si sono oramai quasi azzerate, per effetto dell'adozione di carburanti a basso tenore di zolfo e di desolficatori per l'abbattimento delle emissioni industriali. Una scarsa disponibilità di solfato a livello cellulare potrebbe ridurre il livello di cisteina e, di conseguenza, di glutatione, diminuendo la capacità detossificante della pianta dalle Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS), prodotte dall'ozono, e rendendola più sensibile agli stress ossidativi. Nel pool degli antiossidanti il glutatione riveste, infatti, un ruolo fondamentale e la sua concentrazione cellulare è strettamente dipendente dalla disponibilità di ione solfato. Infatti, una delle principali vie metaboliche di utilizzo del solfato prevede la sua riduzione a solfuro e l'incorporazione nell'aminoacido cisteina che, con glicina e acido glutammico, concorre alla sintesi di glutatione (Hell, 1997). Inoltre, una scarsa disponibilità di cisteina è particolarmente dannosa per il grano perché abbassa il contenuto di proteine solforate della cariosside, riducendo drasticamente la formazione di ponti disolfuro, indispensabili nella lievitazione dell'impasti (Moss et al., 1983).

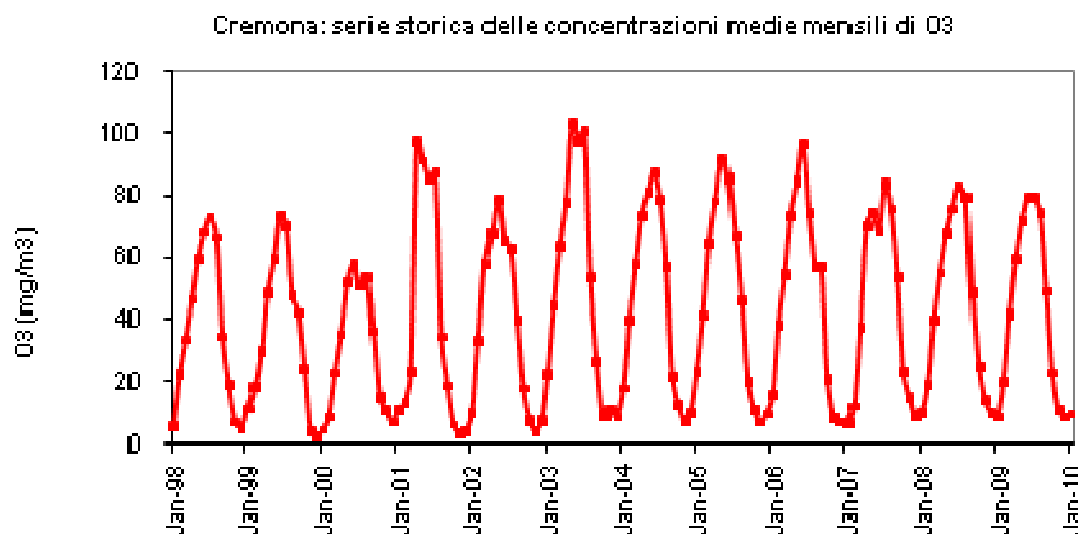


Fig. 1: grafico serie storica delle concentrazioni di ozono

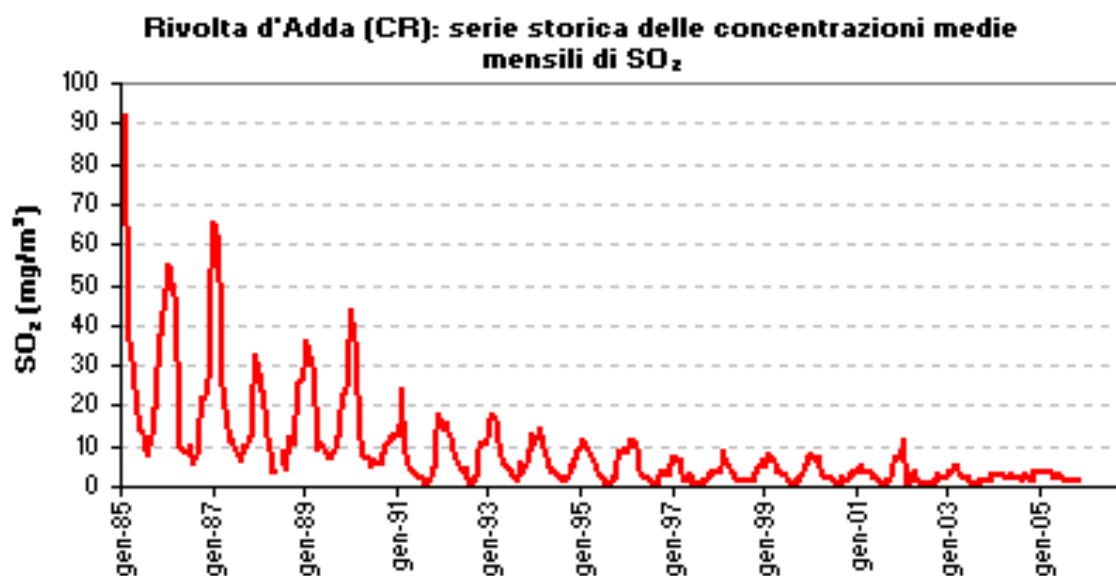


Fig. 2: grafico serie storica delle concentrazioni di anidride solforosa

L'ipotesi che si è cercato perciò di dimostrare con questo esperimento è che esista questa correlazione tra aumento della diffusione dei sintomi visibili da ozono nel frumento e diminuzione di apporto di zolfo per via atmosferica, e che l'apporto di zolfo mediante concimazione durante la fase di crescita delle piante, possa conferire una maggiore resistenza ai possibili danni causati da elevati livelli di ozono.

Materiale e metodi

L'esposizione all'ozono delle piante di due diverse cultivar di frumento duro (*Triticum durum*) è stata effettuata tramite l'utilizzo di 8 Open-Top Chambers (OTC). I sistemi di ventilazione di 4 delle 8 OTC (OTC-Filtrate) sono stati equipaggiati con 12 filtri al carbone attivo ciascuno, che permettono un abbattimento del 50% circa dell'ozono presente nell'aria ambiente del sito sperimentale. Per la rilevazione ed il monitoraggio dei principali parametri meteorologici e presente sul sito un palo meteorologico dotato, a due diverse altezze (3m e 6m), di sensori per rilevazione di Temperatura, Umidità Relativa, Intensità e Direzione del vento, PAR (*photosynthetically active radiation*) e pioggia. Alle due diverse altezze è stata prevista inoltre la possibilità di prelevare aria per monitorare l'ozono troposferico. La concentrazione di ozono nell'aria è stata costantemente monitorata mediante prelievo ciclico di campioni d'aria da parte di un sistema pneumatico di *multiplexing* a valvole solenoidali e il simultaneo invio degli stessi ad un analizzatore automatico di ozono.

L'acquisizione dei valori rilevati da tutti questi sensori avviene grazie al loro collegamento diretto con un *datalogger* (sistema di acquisizione dati) della Campbell Scientific Inc., modello CR10X, opportunamente programmato, e che tramite un apposito software (PC208 Datalogger Support) è interfacciato ad un PC per l'acquisizione e l'archiviazione dei dati e il controllo in tempo reale dei valori rilevati.

Materiale vegetale

Le prove sperimentali sono state condotte su piante di frumento duro (*Triticum durum*), appartenenti a due differenti cultivar di largo utilizzo in Pianura Padana e diversamente sensibili all'ozono: Virgilio e Neodur.

La cultivar Virgilio è caratterizzata da una taglia medio alta a spighe medie e glauche, con reste bianche, e presenta un ciclo vegetativo e riproduttivo medio-precocemente unitamente ad una buona produttività. Questa cultivar è sensibile all'ozono e manifesta la comparsa di sintomi fogliari visibili (clorosi e punteggiature clorotiche).

La cultivar Neodur presenta, invece, spighe a bordi paralleli con reste bianche e una taglia media, ed è caratterizzata da un ciclo medio-tardivo con produttività buona e rese superiori alla media, inoltre ha la caratteristica, a differenza della precedente, di essere resistente allo stress da ozono dal punto di vista della comparsa dei sintomi fogliari visibili.

Le piante di frumento sono state prima seminate in serra e poi (dopo circa 10 giorni, il 4

marzo) trapiantate in vasi da 30 cm, con terriccio a pH neutro e a basso tenore di N, P e S, il HOOCHMOOR® MEDIUM CRISANTEMO, che presenta un vaglio medio di 0 – 20 mm e la seguente composizione: 5% argilla montimorillonitica in scaglie; 10% torba nera tedesca; 30% torba bruna baltica fine; 30% torba irlandese (10-20 mm); 30% torba bionda baltica (0-30 mm).

Durante il ciclo colturale tutti i vasi sono stati irrigati 2 volte a settimana, il 24 maggio è stata anche effettuata un'irrigazione di soccorso a causa di un notevole stress idrico sperimentato dalle piante nei giorni precedenti.

Sono stati, inoltre, effettuati due trattamenti di concimazione (7 aprile e 6 maggio) con urea 46%. La prima fertilizzazione è stata fatta nella fase di accostamento del frumento con un grammo circa per ogni vaso; mentre per la seconda, fatta nei primi giorni in cui era presente la foglia bandiera, si sono usati 0,5 grammi circa per ogni vaso. Il raccolto di tutta la biomassa epigea è stato effettuato l'8 luglio 2010, le analisi sulla resa del raccolto sono state poi compiute separatamente sulla biomassa raccolta da ciascun vaso.

Disegno sperimentale

All'inizio di marzo i vasi, contenenti ciascuno 3 piante, sono stati collocati nelle 8 OTC, 4 filtrate e 4 non filtrate. In queste ultime, inoltre, è stato applicato un trattamento quotidiano di fumigazione con ozono (+30% circa rispetto all'ozono ambientale) attraverso un sistema di tubi che convogliano l'ozono prodotto da un generatore TS-10 (Ozone Solution Inc., Iowa USA) nell'aria di ventilazione delle OTC. Il trattamento di fumigazione controllato con ozono è stato condotto per 3 mesi (7 aprile – 8 luglio). Durante le prime 3 settimane, per evitare un eccessivo stress alle piante in crescita, è stato utilizzato un tempo di fumigazione pari a 6 ore al giorno (10:00 – 16:00), dopo il 28 aprile si è passati ad 8 ore di fumigazione (9:00 – 17:00). In ogni OTC sono stati disposti almeno 28 vasi, 14 contenenti le piante di Virgilio, ed altrettanti contenenti le piante di Neodur. Per ogni cultivar, inoltre, i vasi sono stati divisi in due gruppi di 7 vasi e sottoposti a due differenti trattamenti, infatti uno dei due gruppi subirà la concimazione solfatica, mentre l'altro funzionerà da controllo. Ogni OTC impiegata, dunque, aveva la seguente configurazione interna (**Figura 3**):

- 7 vasi con piante di Virgilio non concimate con zolfo
- 7 vasi con piante di Virgilio concimate con zolfo
- 7 vasi con piante di Neodur non concimate con zolfo
- 7 vasi con piante di Neodur concimate con zolfo

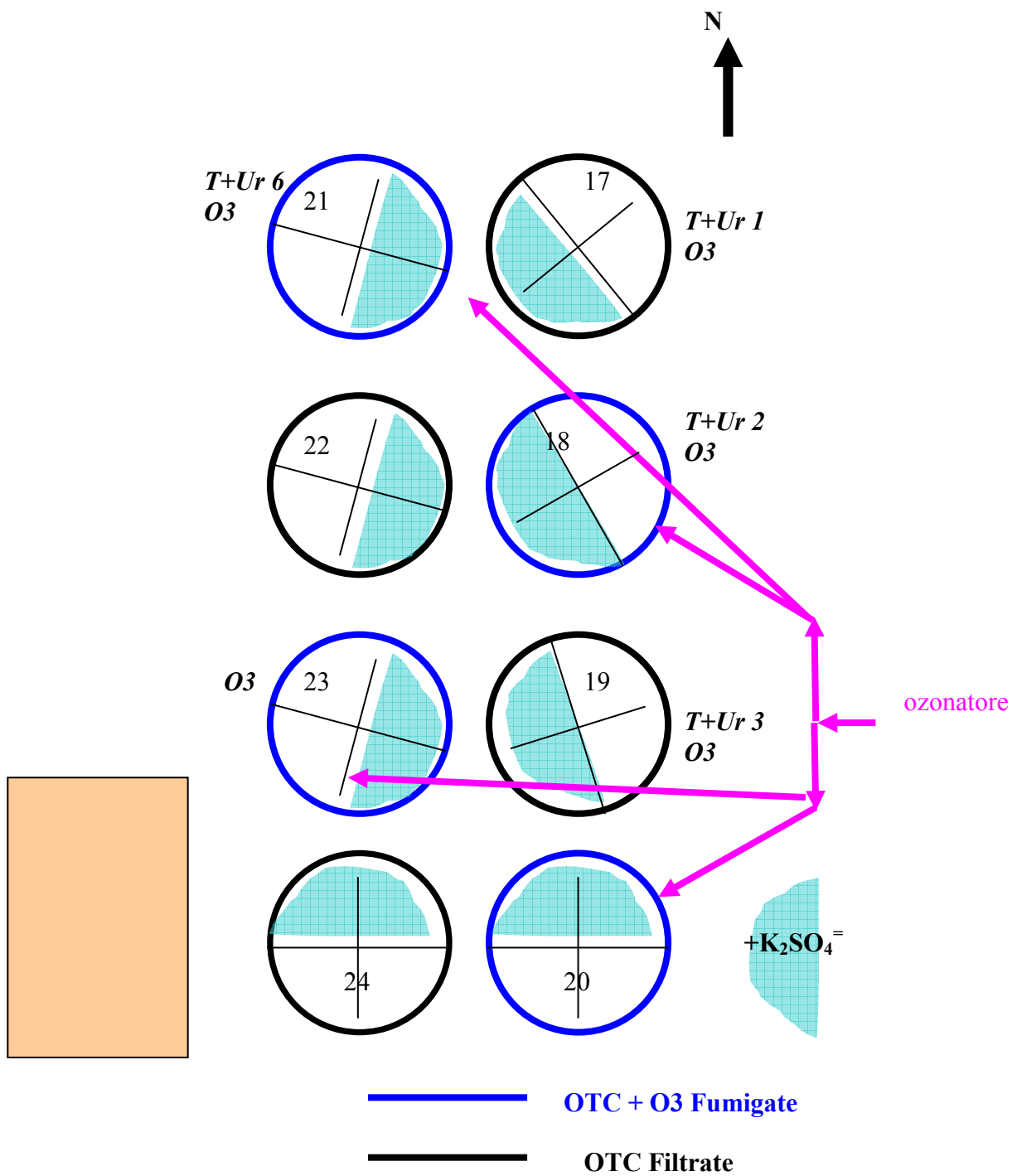


Fig. 3: Schema dell'impianto sperimentale



Fig. 4: Fasi di preparazione del materiale vegetale.

Alcuni vasi in eccesso, per ciascuna cultivar, sono stati alloggiati nelle diverse OTC come materiale vegetale di soccorso.

Le piante, così disposte, sono state lasciate crescere nelle diverse condizioni sperimentali. Per il primo periodo sulle piante sono state operate solo misure di accrescimento controllando le altezze. Dal momento in cui il frumento è entrato nella fase di botticella e si distingueva bene la foglia bandiera sono iniziate le misure di conduttanza stomatica e di fluorescenza fogliare. Entrambe le tipologie di indagine sono state condotte, tenendo presente le condizioni meteorologiche, circa una volta a settimana fino al momento della raccolta o comunque fino a quando il frumento non aveva raggiunto la piena maturazione e le piante erano gialle. Ogni ciclo di misurazioni prevedeva l'analisi di due foglie bandiera, di piante diverse, per settore di ogni camera, con un totale, di conseguenza, di otto misure per ogni OTC e di 64 misure globali.

Durante il ciclo colturale i vasi contenenti le piante che dovevano ricevere l'apporto di zolfo, sono stati sottoposti a tre trattamenti con solfato di potassio (K_2SO_4) somministrato attraverso acqua di irrigazione (200 ml per ciascun vaso contenente 0,8 grammi di K_2SO_4), nei giorni 20 aprile, 17 maggio e 1 giugno 2010.

Calcolo delle esposizioni all'ozono (AOT40)

L'attuale normativa a livello europeo (Direttiva 2008/50/CE), recepita dal D.Lgs. 155 del 13 agosto 2010, che si occupa del rischio ozono per la protezione della vegetazione si basa sul calcolo dell'indice di esposizione AOT40 (*Accumulated exposure Over a Threshold of 40 ppb*) definito (Kärenlampi & Skärby, 1996) come:

$$AOT40_{ab} = \sum_{\substack{[O_3]_i > 40 \text{ ppb} \\ \forall Glob. Rad \geq 50 W / m^2}} ([O_3]_i - 40) \Delta t$$

dove le concentrazioni orarie di ozono $[O_3]_i$ sono espresse come rapporto di miscelazione (ppbV) e Δt rappresenta l'intervallo di tempo di un'ora.

Per il calcolo generale dell'indice AOT40 sul sito di ricerca sono stati utilizzati i dati provenienti dal campionamento effettuato sul palo meteo a lato del sito, all'altezza di 3m. Tale campionamento forniva un dato medio di concentrazione di ozono ogni mezz'ora. Come si deduce dalla definizione stessa, il calcolo dell'AOT40 giornaliero si effettua dalla somma delle differenze tra le concentrazioni medie orarie di ozono che superano i 40 ppb e lo stesso

valore di soglia di 40 ppb in una determinata fascia oraria della giornata, con un'insolazione superiore a 50Wm^{-2} . Tale fascia oraria è generalmente fissata tra le ore 8.00 e le ore 20.00 (ora legale). Nel nostro caso il dato medio orario è stato ricavato dalla media dei due dati relativi alle mezzore. La sommatoria presente nel calcolo dell'indice AOT40 è realizzata lungo un intero periodo di riferimento [ta,tb].

Dal punto di vista normativo tale periodo di riferimento è il trimestre maggio-giugno-luglio.

Nel nostro caso tuttavia è stato scelto di considerare come tempo di integrazione per il calcolo dell'AOT40 il periodo che va dall'inizio di aprile fino alla data del raccolto, e quindi della fine dell'esperimento.

Nel nostro caso inoltre è stato anche possibile calcolare l'AOT40 specifico per i singoli trattamenti relativi all'ozono (OTC con aria filtrata e OTC con aria arricchita).

Misure di fluorescenza

Le misure di fluorescenza sono state condotte utilizzando il fluorimetro Handy-PEA a fluorescenza diretta (*Hansatech Instruments*, Norfolk U.K.). Le misure, condotte in sette date diverse lungo la stagione (3 maggio, 17 maggio, 24 maggio, 31 maggio, 3 giugno, 8 giugno e 18 giugno), sono state effettuate sempre alle ore 11, in modo da mantenere le medesime condizioni meteorologiche, e in particolare con l'intensità della radiazione solare. Ogni ciclo, come precedentemente specificato, prevedeva 64 misure, due per ogni quadrante delle otto OTC ottenute dalle foglie bandiera delle piante delle diverse cultivar scelte casualmente. Prima di effettuare le misure le foglie sono state adattate al buio per circa 30 minuti utilizzando apposite leaf-clip di plastica, una per foglia, in modo da ottenere l'adattamento al buio dei campioni. Le misure sono state poi eseguite ponendo il sensore dello strumento sulle clip, aprendone l'otturatore e premendo il pulsante che attiva una luce LED ad alta intensità ($3000\ \mu\text{mol fotoni m}^{-2}\text{s}^{-1}$) in grado di saturare i centri di reazione del fotosistema II (PSII), e di ottenere una misura della fluorescenza massima (F_m). Il transiente della fluorescenza viene indotto da una luce rossa (650 nm di picco) di intensità pari a $600\ \text{Wm}^{-2}$ fornita da un set di 6 diodi luminosi; il transiente viene registrato per 3 secondi, a partire da $50\ \mu\text{s}$ dopo l'illuminazione con una risoluzione di 12bit. L'acquisizione del dato avviene ogni $10\ \mu\text{s}$ per i primi 2ms, ogni 1 ms fino ad 1s, e ogni 100 ms da 1 a 3 secondi.

Lo strumento permette anche di memorizzare, e di conseguenza analizzare, i dati delle fasi intermedie da F_0 (fluorescenza basale, quando tutti i centri di reazione del PSII sono aperti, e cioè quando il pool del chinone QA accettore primario degli elettroni è totalmente ossidato) a

F_m (fluorescenza massima, in condizioni di luce saturante, con i centri di reazione totalmente chiusi e ridotti). Sono, infatti, presi in considerazione i valori di fluorescenza a 50 μs (F₁, step O), 100 μs (F₁₀₀), 300 μs (F₃₀₀), 2 ms (step J), 30 ms (step I) oltre al valore massimo (F_m, step P). Questo rende possibile l'analisi OJIP, comunemente nota come JIP-Test, un metodo elaborato sia in termini pratico-applicativi (Strasser et al., 2000) che teorici (Strasser et al., 2004). L'analisi attraverso il JIP-Test è stata effettuata grazie ad un software appositamente sviluppato chiamato Biolyzer. La tabella sottostante riporta i parametri tecnici delle curve di fluorescenza necessari per le elaborazioni, e una selezione di parametri del JIP-Test utilizzati nella ricerca.

Tabella 1: parametri analitici del JIP-Test

Parametri tecnici di fluorescenza	
Area	Area compresa fra il valore massimo di fluorescenza F _m e la curva di fluorescenza stessa
T_{max}	Tempo impiegato per raggiungere la F _m
F₀	Fluorescenza basale
F₁	F _{50μs} , fluorescenza a 50 μs
F₂	Fluorescenza a 100 μs
F₃	Fluorescenza a 300 μs
F₄	Fluorescenza al punto J (2 ms)
F₅	Fluorescenza al punto I (30 ms)
F_m	Fluorescenza massima
F_v/F₀	$(F_m - F_0) / F_0 = K_p / K_n$
(ΔV/Δt)₀	Pendenza all'origine della curva di fluorescenza. E' una misura del tasso di fotochimica primario.
M₀	$M_0 = 4(F_{300} - F_0) / (F_m - F_0)$
V_J	Fluorescenza variabile relativa a 2ms. $V_J = (F_{2ms} - F_0) / (F_m - F_0)$
V_I	Fluorescenza variabile relativa a 30ms. $V_I = (F_{30ms} - F_0) / (F_m - F_0)$
S_M	Area normalizzata. Indica l'energia necessaria per chiudere tutti i centri di reazione. $Area / (F_m - F_0)$
N	Numero di turnover del Q _A . Indica quante volte il Q _A viene ridotto nel tempo compreso fra 0 e T _{max} . $N = S_M \cdot M_0 \cdot (1/V_J)$
Efficienza quantica o rapporti di flusso	
φP₀	Efficienza della resa quantica. E' la probabilità che un fotone assorbito venga intrappolato da un centro di reazione del PSII. $\phi P_0 = (F_m - F_1) / F_m$
TR₀/ABS	E' la probabilità che un fotone intrappolato dal centro di reazione del PSII entri nella catena di trasporto degli elettroni. $\Psi_0 = 1 - V_J$
Ψ₀ o ET₀/TR₀	
Costanti di de-eccitazione	
K_p	Costante di de-eccitazione fotochimica
K_n	Costante di de-eccitazione non-fotochimica, comprende K _H (per la dissipazione termica) e K _F (per l'emissione di fluorescenza)
Flussi e attività specifiche	

ABS/RC	Rappresenta il numero totale di fotoni assorbiti dalla clorofilla di tutti i centri di reazione (RC) in rapporto al numero totale di centri di reazione attivi. $ABS/RC = M_0 (1/V_j) (1/ \phi P_0)$
TR₀/RC	Capacità massima da parte del centro di reazione (RC) di intrappolare l'eccitazione. $TR_0/RC = M_0 (1/V_j)$
ET₀/RC	Trasporto elettronico nei centri di reazione. $ET_0/RC = M_0 (1/V_j) \Psi_0$
DI₀/RC	Dissipazione effettiva in un centro di reazione attivo. $DI_0/RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)$
ABS/CS₀	Numero totale di fotoni assorbiti per cross-section
TR₀/CS₀	Flusso di energia intrappolato per cross-section
ET₀/CS₀	Flusso di trasporto degli elettroni per cross-section
DI₀/CS₀	Flusso di energia dissipata per cross-section
Densità dei centri di reazione	
RC/CS₀	E' il numero di centri di reazione attivi per ciascun centro inattivo su una cross-section del PSII. $RC/CS_0 = \phi P_0 (V_j/M_0) F_0$
Indice di Performance	
PI_{ABS}	Performance index sulla base dell'assorbimento. $PI_{ABS} = (RC/ABS) [\phi P_0/(1- \phi P_0)] [\Psi_0/(1- \phi P_0)]$
PI_{CS₀}	Performance index sulla base della cross-section. $PI_{CS_0} = (RC/ CS_0) [\phi P_0/(1- \phi P_0)] [\Psi_0/(1- \phi P_0)]$

Misure di conduttanza stomatica

La conduttanza stomatica gioca un ruolo cruciale nella determinazione della dose di ozono assorbita. Essa dipende sia da fattori ambientali, quali il potere evaporante dell'atmosfera, la disponibilità idrica nel suolo, la temperatura dell'aria, la radiazione fotosinteticamente attiva, la concentrazione di CO₂ e l'intensità del vento, che da fattori biologici intrinseci, quali la fenologia, la genetica, lo stato fitosanitario, l'età e la posizione della foglia nella chioma.

Le misure fisiologiche di conduttanza stomatica sono state effettuate con un porometro “a diffusione dinamica” modello AP-4 (ΔT Instruments, U.K.) nelle seguenti sette date: 28 aprile, 17 maggio, 24 maggio, 27 maggio, 31 maggio, 8 giugno e 18 giugno. Durante ciascuna giornata il parametro è stato misurato in 3 diverse fasce orarie (*morning* tra le ore 9.00 e le ore 10.00 circa, *midday* tra le 12.00 e le 13.00 circa e *afternoon* dalle 16 alle 17 circa) in modo da permettere la determinazione di un profilo giornaliero. In ciascuna OTC sono state effettuate 4 misure per ogni varietà, due per ciascun trattamento di fertilizzazione con zolfo, sulla pagina superiore (adassiale) della foglia bandiera di piante scelte casualmente. In totale quindi sono state effettuate 64 misure per ciclo di misure, 192 misure in ciascuna giornata di misura. Prima di ogni ciclo di misure il porometro è stato sottoposto a calibrazione in base alle condizioni di temperatura e umidità relativa rilevate dal palo meteorologico utilizzando una specifica piastra di calibrazione. Lo strumento misura la variazione di umidità relativa dell'aria all'interno di una cuvetta che si applica sulla foglia mediante una pinza, in base al

valore di questa velocità e a quella ottenuta usando la piastra di calibrazione è possibile misurare la conduttanza stomatica all'acqua.

Misure di attività biochimica

La analisi biochimiche sono state effettuate in laboratorio su campioni ottenuti dalle foglie bandiera delle piante sottoposte ai diversi trattamenti a raccolto avvenuto. Si sono determinati i valori di acido ascorbico totale e ridotto e dei tioli.

L'acido ascorbico è stato determinato tramite cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) conformemente a Lo Scalzo et al. (2007). Tutte le foglie campionate (ovvero 10 per tesi) sono state liofilizzate e macinate a freddo ottenendo una polvere che è stata mantenuta in vials di plastica chiuse conservate a -20 °C fino al momento dell'analisi. Per la preparazione del campione, 90 mg di polvere liofilizzata sono stati estratti con 3 ml di acido metafosforico 6%, omogeneizzati e centrifugati a $25000 \times g$ per 5 minuti a 4°C, e immediatamente analizzati. La colonna analitica era di 250×6 mm i.d., Intersil ODS-3, mantenuta a 30 °C. La fase mobile era composta da acido orto fosforico 0,02 M a una velocità di flusso di 0,5 ml/min e campioni di 20 µl venivano iniettati e monitorati a 254 nm. La concentrazione di acido ascorbico (AsA) è stata calcolata dall'area sperimentale di picco tramite interpolazione analitica in una curva di calibrazione standard. Per l'analisi dello stato redox del AaA [AsARED/(monodeidro-AsA + deidro-AsA + AsARED)] un'aliquota dell'estratto è stata incubata con un uguale volume di cisteina 200 mM per 15 minuti e immediatamente analizzata.

Per l'analisi del contenuto totale di gruppi -SH non proteici, 90 mg di polvere liofilizzata sono stati estratti con 3 ml di una miscela 1:1 di EtOH 96% e HCl 0,02N. Il contenuto totale di gruppi -SH non proteici è stato determinato conformemente al metodo usato nel lavoro di Hawrylak & Szymanska (2004), con qualche variazione. Un'aliquota di 0,5 ml di campione è stata trattata con 0,5 ml di una miscela contenente acido 5-solfosalicilico 4%, Na₂-EDTA 2mM e ascorbato di sodio 0,3%. Direttamente in cuvetta, prima di leggere l'assorbanza, sono stati aggiunti 1 ml di tampone fosfato di sodio 1M (pH 8,0) e 0,25 ml di acido ditionitrobenzoico (DTNB) 10nM. L'assorbanza è stata letta a 415 nm. Il contenuto di gruppi -SH non proteici è stato calcolato da una curva standard ottenuta con concentrazioni note di L-cisteina.

Misure di resa agronomica e produttività

A raccolto avvenuto, le piante di frumento sono state divise in campioni. Ogni campione, che conteneva il raccolto ottenuto da ogni singolo vaso utilizzato nella sperimentazione (erano presenti 3 piante per ciascun vaso), è stato contrassegnato dal numero del vaso (sono stati considerati 6 vasi per ogni quadrante di ogni OTC), dal numero della camera di provenienza e da una sigla, che ne indicava l'appartenenza alle repliche che avevano ricevuto l'apporto di zolfo durante la crescita o alle repliche utilizzate come controllo. I campioni così catalogati sono stati lasciati a seccare in campo, senza essere trattati in stufa, e in seguito sono stati poi sottoposti a due diversi cicli di pesatura: il primo ha riguardato il peso totale della biomassa epigea raccolta; mentre il secondo ha riguardato il peso delle sole spighe dei diversi campioni. In ultima analisi, le spighe dei vari campioni, dopo essere state private delle reste, sono state sottoposte a trebbiatura al fine di ottenere la granella, che è stata poi pesata per valutare la resa agronomica.

Analisi statistica dei dati

È stata applicata un'ANOVA (ANalysis Of Variance) a disegno *Split-Plot* con blocchi randomizzati, utilizzando il software Statistica, per valutare la significatività delle differenze di risposta osservate sui dati raccolti, ed elaborati durante l'evoluzione della sperimentazione. Questa procedura permette di valutare l'effetto di due o più fattori sperimentali combinati per mettere in evidenza possibili interazioni, cioè verificare se l'effetto di un fattore varia a seconda dei livelli dell'altro fattore. Nell'ANOVA, infatti, le variabili risposta, chiamate variabili dipendenti (che nel presente caso sono i principali parametri del JIP-Test e le misure di conduttanza stomatica), sono valutate sotto le diverse condizioni sperimentali, dettate dalle variabili indipendenti (nel nostro caso ozono, zolfo e blocco. Per blocco è inteso l'accoppiamento di due OTC, una filtrata e una no, che si trovano affiancate nel sito sperimentale. Nel presente caso erano presenti 4 blocchi così composti: blocco 1 = OTC 23 + OTC 24; blocco 2 = OTC 21 + OTC 22; blocco 3 = OTC 17 + OTC 18 e blocco 4 = OTC 19 + OTC 20).

Risultati

Andamento climatico durante la stagione sperimentale

L'andamento climatico della stagione in cui è stata svolta l'attività sperimentale (4 marzo – 8 luglio) è illustrato nella figura 5. I grafici mostrano l'evoluzione giornaliera

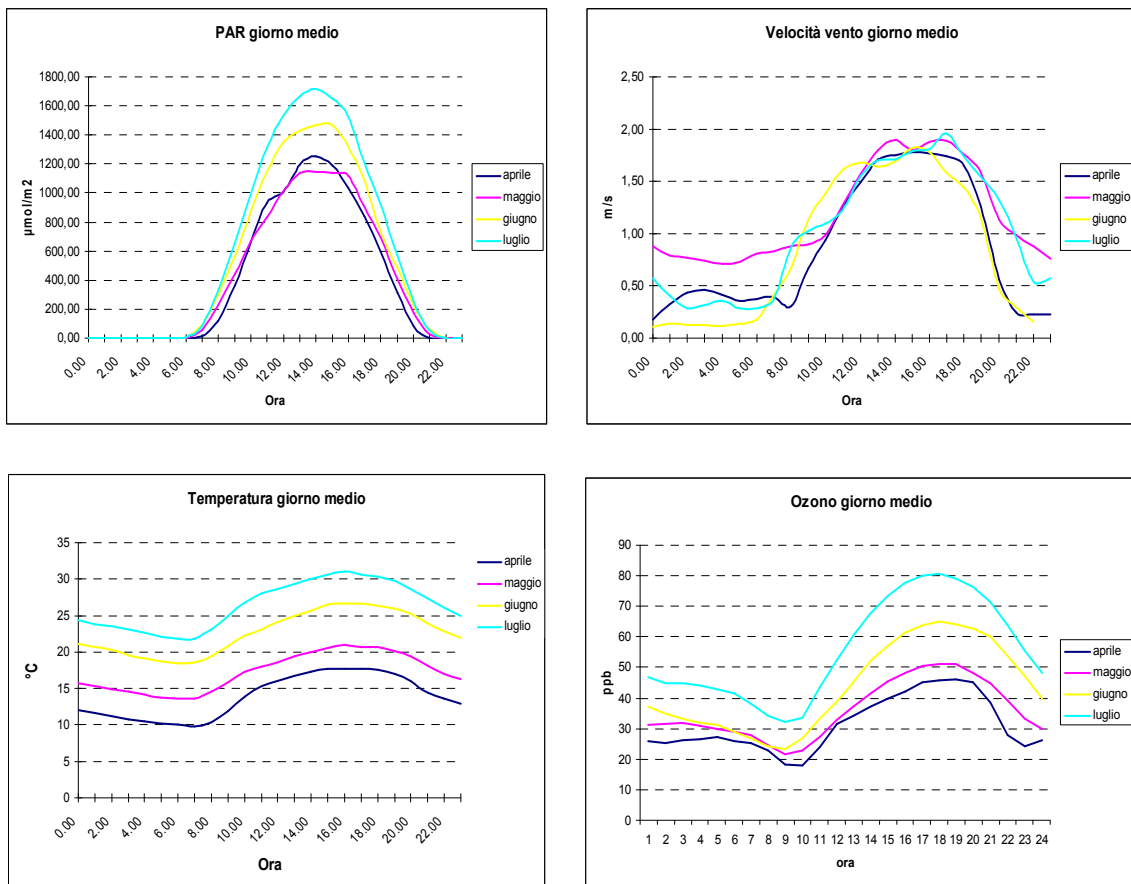


Fig.5: Confronto delle evoluzioni giornaliere medie, nei diversi mesi, per alcuni parametri meteorologici (due grafici sovrastanti e primo grafico in basso a sinistra) e per l'ozono.

media del PAR (*Photosynthetically Active Radiation*), della velocità del vento, della temperatura e dell'ozono calcolate su base mensile per ciascuno dei mesi di sperimentazione a partire dai dati di ciascuna mezz'ora di campionamento.

Nella seguente tabella (Tab. 2) sono, invece, riportati i valori massimi e minimi di temperatura, i massimi di concentrazione di ozono e il quadro generale delle precipitazioni registrati nei mesi di attività scientifica nel sito sperimentale.

Tabella 2: estremi di temperatura e ozono e valori delle precipitazioni mensili

 mese	 T max °C	 T min °C	 [O₃] max ppb	 [O₃] min ppb	 [O₃] media ppb	 Pioggia (mm)
 Aprile	25,1	3,4	74	2	31	54
 Maggio	29,2	8,5	93	2	36	82
 Giugno	32,3	12,2	101	3	43	30
 Luglio	34,7	14,8	117	8	55	49

Come si può dedurre dalla figura 5 e dalla tabella 2, luglio è stato il mese nel quale si è avuta la più elevata temperatura massima ed il giorno medio con le temperature maggiori. La temperatura minima più bassa si è, invece, registrata ad aprile, mese che presenta anche il giorno medio con temperature minori. Le concentrazioni medie e massime di ozono sono aumentate progressivamente con l'avanzare della stagione estiva, mentre le minime si sono mantenute pressoché costanti nei primi tre mesi per poi aumentare leggermente in luglio. Il mese più piovoso è stato maggio, mentre giugno è stato il mese con meno precipitazioni. Le velocità medie del vento sono state pressoché costanti in tutti i mesi di sperimentazione. Il PAR ha presentato valori medi comparabili nei mesi di aprile e maggio, leggermente superiori a giugno e i valori massimi stagionale a luglio.

In figura 6 è mostrato, per le OTC sottoposte ai due diversi livelli di trattamento di ozono, l'evoluzione stagionale dell'indice di esposizione all'ozono AOT40. La normativa italiana (D.Lgs. 155 del 13 agosto 2010) prevede il rispetto di un livello critico di 9.000 ppb*h. per la protezione della vegetazione dall'ozono, calcolato nel trimestre maggio-giugno-luglio. Nel presente lavoro il periodo di integrazione considerato è stato il trimestre aprile-giugno, visto che l'8 luglio si è effettuata la mietitura e la conclusione dell'esperimento.

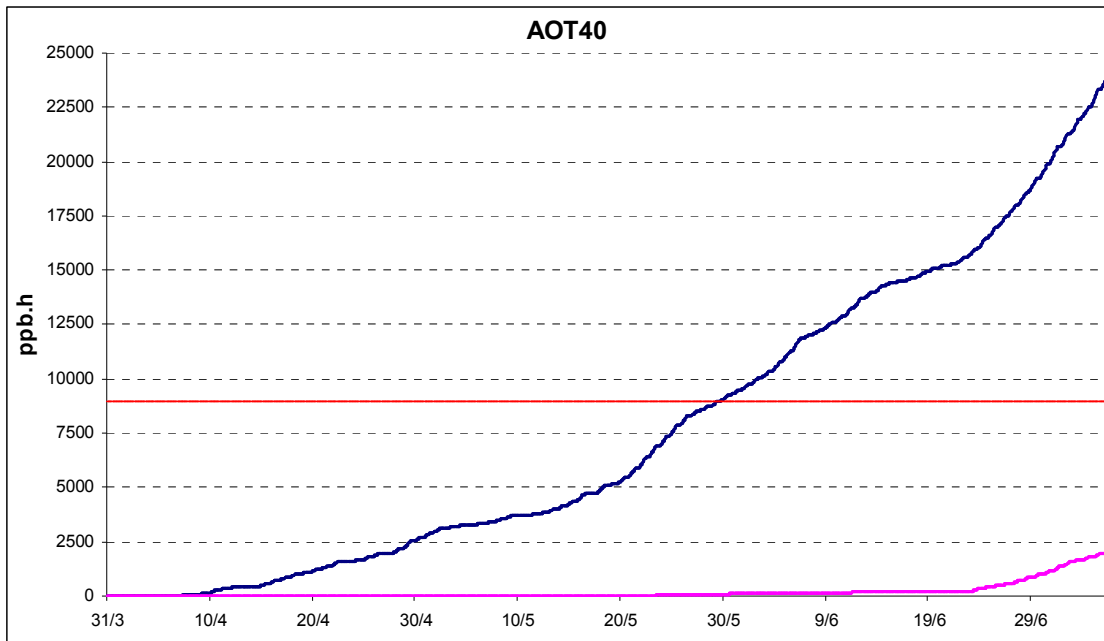


Fig. 6: Esposizione stagionale della vegetazione (espressa come AOT40 nelle ore di luce) nei diversi trattamenti di ozono. La linea blu indica l'esposizione media nelle OTC fumigate, mentre la linea fucsia indica l'esposizione media nelle OTC filtrate. La linea rossa indica il livello critico stabilito dalla normativa europea (9000 ppb.h)

Come si può rilevare, nelle OTC arricchite il livello critico è stato ampiamente superato. Già all'inizio di giugno, infatti, l'indice presenta valori maggiori di 9.000 ppb*h. Nelle OTC filtrate, invece, il livello critico non è stato superato. Dopo il 20 giugno si è osservata, inoltre, un'impennata dell'indice AOT40 dovuta ad un aumento delle concentrazioni atmosferiche di ozono in seguito ad un periodo di temperature molto elevate e cielo soleggiato. Il frumento, però, si trovava già in fase di senescenza e dunque con scambi gassosi molto bassi. In queste condizioni (ozono molto alto e ridotti scambi gassosi) è poco verosimile un impatto negativo di questo gas significativo sulla vegetazione.

Il sistema di abbattimento dell'ozono delle OTC filtrate ha funzionato in modo soddisfacente. Nel periodo in cui i filtri erano operativi (tra le 6.00 e le 22.00) l'abbattimento dell'ozono ambientale è stato in media del 56%. Ciò significa che nelle OTC filtrate l'ozono era in media il 44% di quello ambientale.

Fenologia

L' avvicendamento delle varie fasi fenologiche del frumento, così com'è stato rilevato durante la stagione di crescita, è riportato nella tabella sottostante.

Tabella 3: fasi fenologiche del frumento

DATA	STADIO DI SVILUPPO FENOLOGICO
22 Febbraio	Semina
4 Marzo	Trapianto in vasi
22 Marzo	Inizio Accestimento
12 Aprile	Inizio Levata
20 Aprile	2 Nodi
1 Maggio	Foglia a Bandiera
6 Maggio	Botticella
14 Maggio	Spigatura
20 Maggio	Antesi
8 Luglio	Raccolto

Fluorescenza

L'analisi della varianza (ANOVA) dei parametri del JIP-Test ricavati dalle misure di fluorescenza ha prodotto per le due cultivar i risultati riportati nelle tabelle 4 e 5. Sono mostrate le analisi condotte sui 7 rilievi indicati con numero crescente sotto la colonna "data". La significatività delle differenze rispetto al controllo è rappresentata dalle stelline: una stellina indica un livello di significatività medio ($0,01 < p \leq 0,05$); mentre tre stelline indicano un livello di significatività superiore, con $p \leq 0,01$. Alcuni livelli di significatività presentano un asterisco (*), il quale indica una differenza significativa tra blocchi sottoposti allo stesso trattamento, ovvero la presenza di un fattore sconosciuto che potrebbe avere alterato la risposta delle piante. In questo caso il risultato deve essere considerato con cautela.

Tabella 4: livello di significatività dei parametri del JIP-Test per la cultivar Neodur.

Parametri JIP-Test	Neodur				
	data	Controllo (-S -O ₃) Media	Controllo + Ozono	Controllo + Zolfo	Controllo +Ozono+Zolfo
Fo	1	650	722 *	689	696
	2	686	737	687	697
	3	626	768	756	684 (*)
	4	630	631	662 *	702
	5	639	652	642	693
	6	635	609	571	608
	7	677	707	626	749
Fm	1	3257	3286	3302	3225
	2	3219	3223	3302	3042
	3	3304	3104	3178	3091
	4	3119	3140	3394	3312
	5	3282	3224	3380	3076
	6	3511	3445	3156	3363
	7	2361	2289	2853 ***	2819
ABS/RC	1	1,98	2,16	1,98	2,12
	2	2,20	2,23	2,12	2,23
	3	2,13	2,37	2,69 *	2,50
	4	1,91	2,01	1,89	2,07
	5	1,86	2,07	2,07	2,11
	6	1,86	1,84	1,88	1,85
	7	2,99	3,16	2,37 (*)	2,75
Tro/RC	1	1,54	1,63	1,53	1,61
	2	1,67	1,65	1,63	1,54
	3	1,68	1,71	1,93 ***	1,85
	4	1,47	1,55	1,48	1,58
	5	1,46	1,60	1,62	1,58
	6	1,48	1,47	1,49	1,47
	7	1,95	1,90	1,71	1,88
Eto/RC	1	1,01	1,06	1,02	1,04
	2	1,10	1,09	1,07	1,00
	3	1,18	1,21	1,23	1,23
	4	0,98	1,06	1,02	1,07
	5	1,04	1,10	1,11	1,09
	6	0,95	0,93 *	0,98	0,95
	7	1,02	1,00	0,95	1,10 *
Dio/RC	1	0,44	0,53	0,46	0,51
	2	0,53	0,57	0,50	0,69
	3	0,46	0,66	0,75	0,65 *
	4	0,44	0,46	0,41	0,49
	5	0,40	0,47	0,44	0,53
	6	0,38	0,37	0,39	0,37
	7	1,05	1,25	0,66 (*)	0,87

ABS/Cso	1	721	800 *	758	796
	2	764	813	769	762
	3	697	834	861	766(*)
	4	696	697	730*	774
	5	698	718	720	753
	6	714	688	639	679
	7	759	788	710	840
Tro/Cso	1	559	602	581	583
	2	580	603	588	555
	3	549	593	619	570
	4	535	538	572 *	589
	5	548	556	564	565
	6	568	550	509	542
	7	501	495	524 (***)	578
Eto/Cso	1	367	391	387	379
	2	382	397	385	365
	3	386	426	395	378
	4	356	367	393 ***	401
	5	388	382	387	389
	6	363	346	335	350
	7	264	261	305 (***)	294
Dio/Cso	1	161	197 *	176	186
	2	183	210	180	207
	3	148	241	241	196 *
	4	160	158	158	185
	5	150	162	155	187
	6	146	138	129	137
	7	257	292	185	261
PI(abs)	1	36,02	27,38	34,33	28,68
	2	29,22	28,23	30,18	28,90
	3	42,34	58,85	27,38	37,76
	4	37,62	38,80	42,66	35,95
	5	50,15	37,68	39,69 *	33,67
	6	39,14	39,10	41,40	39,50
	7	9,26	8,13	24,30 (***)	15,41
PI(Cso)	1	25338	21589	25609	22189
	2	21859	22161	23089	22370
	3	29548	63730	17667	20222
	4	25823	26778	30957	27085
	5	34317	26987	28408 *	28637
	6	27685	26499	26995	26714
	7	6719	6211	16703 (***)	12001

* La parentesi indica una influenza significativa dell'interazione fra il trattamento di ozono e il blocco

(I valori di F0 e Fm indicano l'intensità della fluorescenza in mV, così come i valori dei parametri con Cs₀ al denominatore. Gli altri sono espressi in unità relative adimensionali)

Per la coltivar Neodur, come si osserva nella tabella precedente, l'elaborazione dei principale parametri del JIP-Test ne ha evidenziati 6 con differenze molto significative ($p \leq 0,01$) e 9 con

differenze significative ($0,01 < p \leq 0,05$), in almeno una data e almeno un trattamento rispetto al controllo, che è rappresentato dalla condizione di crescita in aria filtrata e senza l'apporto di zolfo tramite concimazione. I parametri con $p \leq 0,01$ interessano tutti il trattamento che presenta la concimazione con zolfo (Controllo + Zolfo), generalmente alla data 7 (18 giugno), ma 4 di questi potrebbero presentare questo risultato sotto l'influenza della posizione delle OTC nel sito sperimentale. I parametri con $0,01 < p \leq 0,05$ presentano, invece, una maggiore variabilità, in quanto interessano tutti e tre i diversi trattamenti ed in diverse date, sono infatti 16 i "casi" con questa significatività, di cui solo 4 potrebbero essere influenzati dalla posizione delle OTC.

Di seguito sono invece riportati i risultati per la cultivar Virgilio.

Tabella 5: livello di significatività dei parametri del JIP-Test per la cultivar Virgilio.

Parametri JIP-Test	Virgilio				
	data	Controllo (-S -O ₃) Media	Controllo + Ozono	Controllo + Zolfo	Controllo +Ozono+Zolfo
Fo	1	638	662	692	672
	2	726	701	691	729
	3	709	769	766	736
	4	683	753	714	738
	5	665	637	663	631
	6	609	632	620	643
	7	587	663	720 ***	673 ***
Fm	1	3259	3356	3599	3370
	2	3635	3445	3342	3317
	3	3186	3312	3104	3024
	4	3377	3103	3140	3513
	5	3246	3208	3310	3192
	6	3427	3541	3308	3645
	7	2956	2807	28230	2857
ABS/RC	1	2,00	2,06	2,12 *	2,27
	2	2,12	2,21	2,04	2,27
	3	2,57	2,61	2,75	2,91
	4	2,19	2,25	2,40	2,05
	5	2,22	2,12	2,08	2,07
	6	1,78	1,87	1,83	1,86
	7	1,97	2,18	2,32 *	2,20 *

Regione Lombardia – E.R.S.A.F. – F.L.A. - Accordo sottoscritto dalle Parti il 4 maggio 2009

Tro/RC	1	1,56	1,60	1,66 ***	1,75
	2	1,64	1,70	1,57	1,70
	3	1,90	1,90	1,90	2,02
	4	1,68	1,64	1,75	1,57
	5	1,70	1,64	1,61	1,61
	6	1,42	1,49	1,45	1,49
	7	1,53	1,60	1,66	1,61
Eto/RC	1	1,02	1,06	1,10 (***)	1,14
	2	1,06	1,07	1,01	1,05
	3	1,18	1,18	1,15	1,23
	4	1,08	1,07	1,13	1,04
	5	1,13	1,14	1,09	1,10
	6	0,93	0,94	0,93	0,93
	7	1,00	0,99	1,06	1,02
Dio/RC	1	0,44	0,46	0,46	0,52
	2	0,48	0,51	0,47	0,57
	3	0,67	0,71	0,84	0,88
	4	0,50	0,61	0,65	0,49
	5	0,52	0,47	0,47	0,46
	6	0,35	0,38	0,38	0,37
	7	0,44	0,58	0,66 (***)	0,59 (***)
ABS/Cso	1	711	738	777	759
	2	817	794	768	821
	3	805	871	857	832
	4	768	824	796	813
	5	743	707	737	699
	6	678	712	691,	727
	7	653	733	789 ***	742 ***
Tro/Cso	1	553	573	607	586
	2	630	609	588	614
	3	596	634	601	586
	4	591	598	585	621
	5	570	550	569	544
	6	543	568	547	581
	7	507	538	566*	545
Eto/Cso	1	361	379	403	382
	2	407	383	377	376
	3	374	392	372	361
	4	378	393	375	414
	5	378	381	385	372
	6	353	359	349	362
	7	330	333	361	348
Dio/Cso	1	158	165	169	172
	2	186	184	179	206
	3	208	237	256	245
	4	176	225	211	192
	5	172	156	167	155
	6	134	143	144	145
	7	146	194	222 (***)	196 (***)

PI(abs)	1	34,14	34,09	34,38	29,29
	2	31,01	26,14	30,57	23,70
	3	22,07	20,00	23,22	20,13
	4	29,39	24,90	25,34	33,84
	5	30,63	38,10	36,77	38,70
	6	43,46	37,09	36,87	36,26
	7	35,78	22,32	19,89 *	24,23 ***
PI(Cso)	1	24001	25012	26394	22175
	2	24840	20569	22921	18744
	3	17320	16485	18259	15496
	4	22026	20065	19123	27203
	5	22817	26966	26443	226891
	6	29428	26365	25435	26270
	7	22853	16037	15691	17984 *

* La parentesi indica una influenza significativa dell'interazione fra il trattamento ozono e il blocco

(I valori di F0 e Fm indicano l'intensità della fluorescenza in mV, così come i valori dei parametri con Cs₀ al denominatore. Gli altri sono espressi in unità relative adimensionali)

Per questa varietà, diversamente dalla Neodur, sono 7 i parametri che presentano differenze molto significative, e 4 quelli che presentano differenze significative. I primi, in questa cultivar, rappresentano non solo il trattamento con concimazione solfatica ma anche il trattamento con gli effetti incrociati, cioè quello che presenta le condizioni di crescita in aria arricchita con ozono e con la presenza di fertilizzazione con zolfo (Controllo +Ozono+Zolfo). La stessa situazione si presenta per i parametri che mostrano $0,01 < p \leq 0,05$. La data alla quale si riscontrano principalmente questi risultati è la settimana, e se per i parametri molto significativi 5 casi su 11 potrebbero essere influenzati da errore, questo non accade mai per i parametri significativi.

Per i parametri più rilevanti è stata analizzata la variazione percentuale relativa dei diversi trattamenti rispetto al controllo durante lo sviluppo stagionale. Il riferimento è dunque il trattamento privo di ozono (-O₃) e senza zolfo (-S), che è rappresentato dalla linea blu nei grafici delle **Figure 7-15**. Il trattamento con il solo effetto dell'ozono è rappresentato dalla linea verde, quello con l'effetto del solo zolfo dalla linea fucsia e quello con entrambi gli effetti dalla linea rossa.

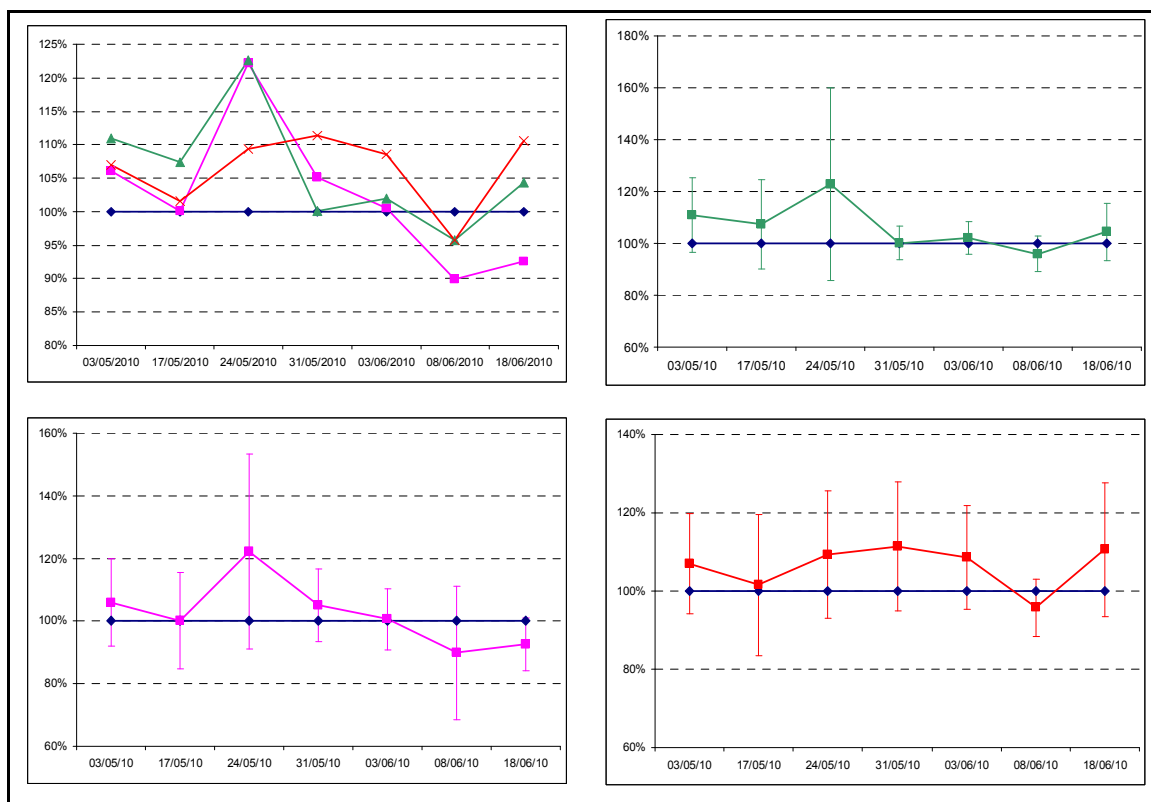


Fig. 7: Andamento stagionale di F_0 nei tre trattamenti per la cultivar Neodur rispetto al controllo (grafico in alto a sinistra). In ordinata sono riportate le unità relative (adimensionali). In ascissa le date di campionamento.. La linea verde rappresenta il trattamento controllo+ozono, la linea fucsia il trattamento controllo+zolfo e la linea rossa il trattamento controllo+ozono+zolfo.). I tre grafici seguenti riportano i confronti delle singole tesi con il controllo riportando anche le barre verticali della deviazione standard.

Osservando l'andamento stagionale della fluorescenza basale (F_0) negli individui della cultivar Neodur, si nota che nel trattamento con aria arricchita di ozono il parametro, come ci si aspettava, è maggiore rispetto al controllo ma in maniera significativa solo alla prima data, inoltre nelle ultime date le differenze in confronto al controllo sono minime; nel trattamento con la sola concimazione solfatica i valori presentano una maggiore variabilità, infatti, sono maggiori rispetto a quelli del controllo nelle prime date, mentre risultano minori, ma non in modo significativo, nelle ultime due date; nel trattamento con l'effetto incrociato di ozono e zolfo (Controllo +Ozono+Zolfo) si riscontrano valori maggiori rispetto a quelli del controllo ma mai significativamente.

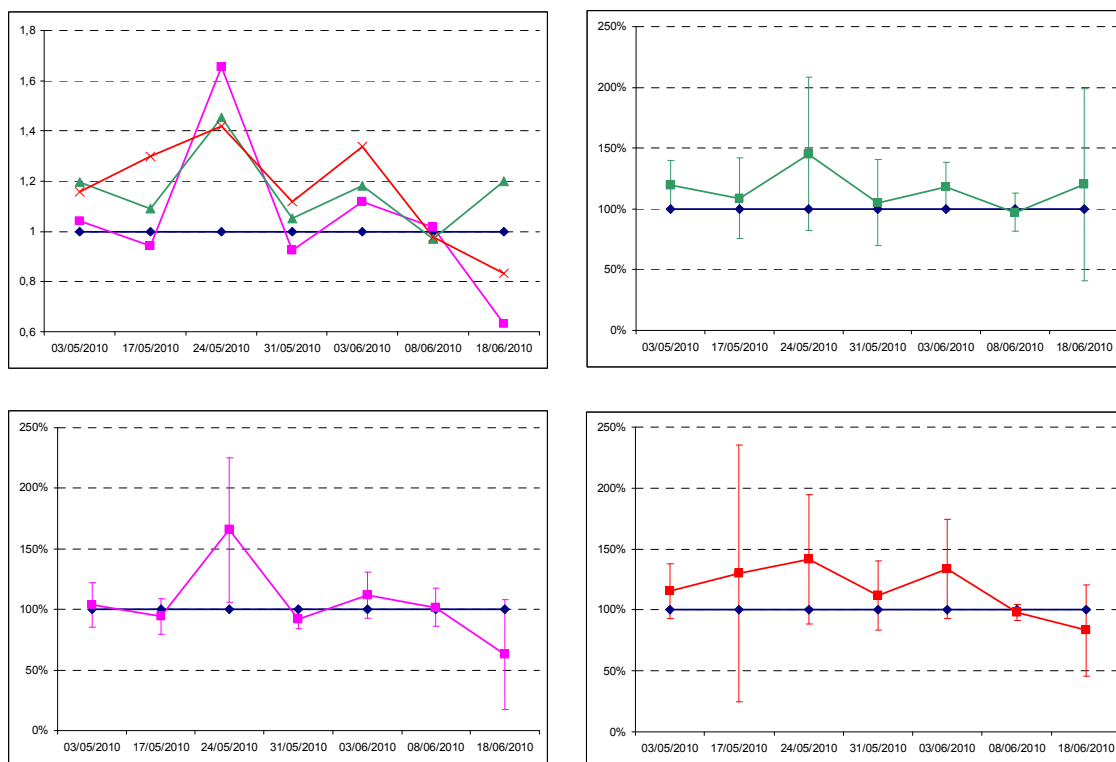


Fig. 8: Andamento stagionale di DI_0/RC nei tre trattamenti per la cultivar Neodur rispetto al controllo (grafico in alto a sinistra). In ordinata sono riportate le unità relative (adimensionali). In ascissa le date di campionamento. La linea verde rappresenta il trattamento controllo+ozono, la linea fucsia il trattamento controllo+zolfo e la linea rossa il trattamento controllo+ozono+zolfo. I tre grafici seguenti riportano i confronti delle singole tesi con il controllo riportando anche le barre verticali della deviazione standard.

Analizzando, invece, il parametro DI_0/RC , che rappresenta la dissipazione effettiva in un centro di reazione attivo, si osserva che per le piante della cultivar Neodur (**Figura 8**) che hanno subito, durante la crescita, la fumigazione con ozono i valori sono costantemente maggiori rispetto a quelli delle piante di controllo, anche se mai significativamente. Per quanto riguarda gli individui che hanno ricevuto la fertilizzazione con zolfo, i valori del parametro sono simili a quelli che presentano gli individui del controllo, eccetto per la terza data (24 maggio), dove è maggiore anche se non in maniera significativa, e per l'ultima data (18 giugno) dove risulta minore. Le repliche sottoposte all'effetto incrociato, invece, presentano valori di DI_0/RC maggiori, rispetto alle repliche di controllo, fino alla quinta data (significativamente per la terza data, il 24 maggio), valore simile alla sesta data e valore leggermente minore all'ultima data.

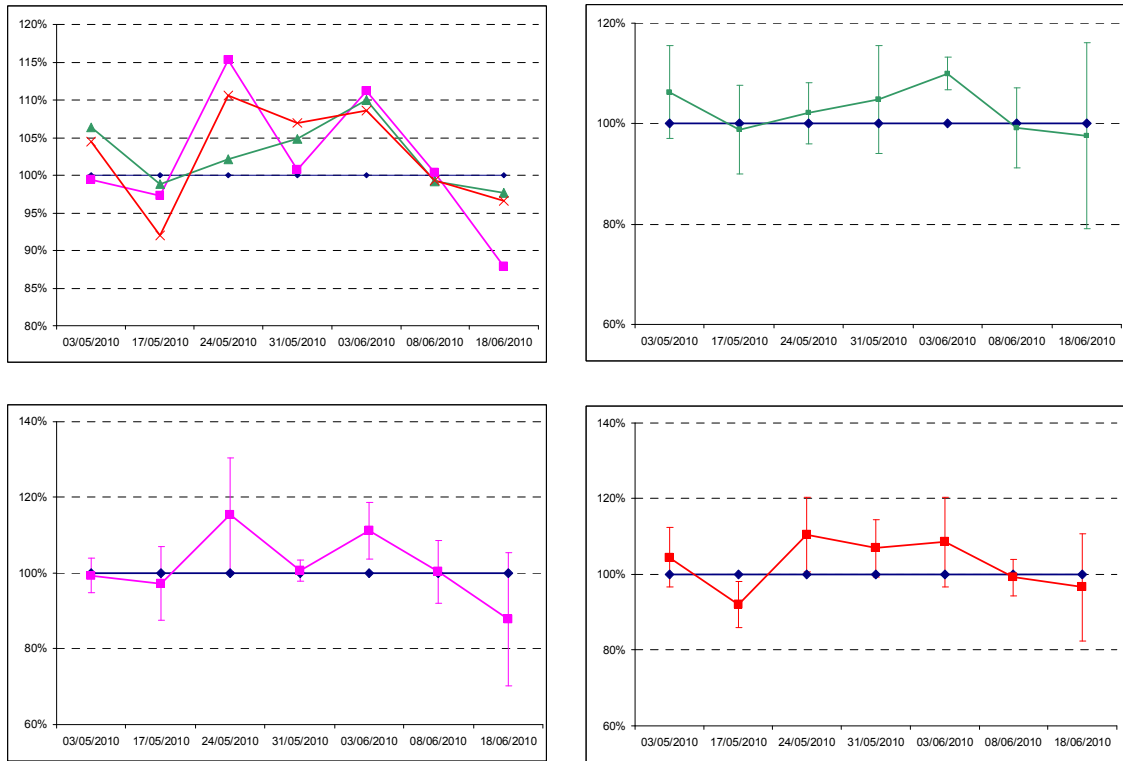


Fig. 9: Andamento stagionale di TR₀/RC nei tre trattamenti per la cultivar Neodur rispetto al controllo (grafico in alto a sinistra). In ordinata sono riportate le unità relative (adimensionali). In ascissa le date di campionamento.. La linea verde rappresenta il trattamento controllo+ozono, la linea fucsia il trattamento controllo+zolfo e la linea rossa il trattamento controllo+ozono+zolfo.). I tre grafici seguenti riportano i confronti delle singole tesi con il controllo riportando anche le barre verticali della deviazione standard.

Il parametro TR₀/RC rappresenta la capacità massima di un centro di reazione di intrappolare l'eccitazione. Il suo andamento stagionale, nelle piante della cultivar Neodur (**Figura 9**) mostra, nei tre diversi trattamenti, valori simili o leggermente maggiori rispetto a quelli osservati nel controllo per tutte le date eccezion fatta per l'ultima che presenta valori leggermente minori del controllo. Le differenze rispetto al controllo non sono comunque significative se non per il trattamento "Controllo + Zolfo" che presenta alla terza data una significatività elevata.

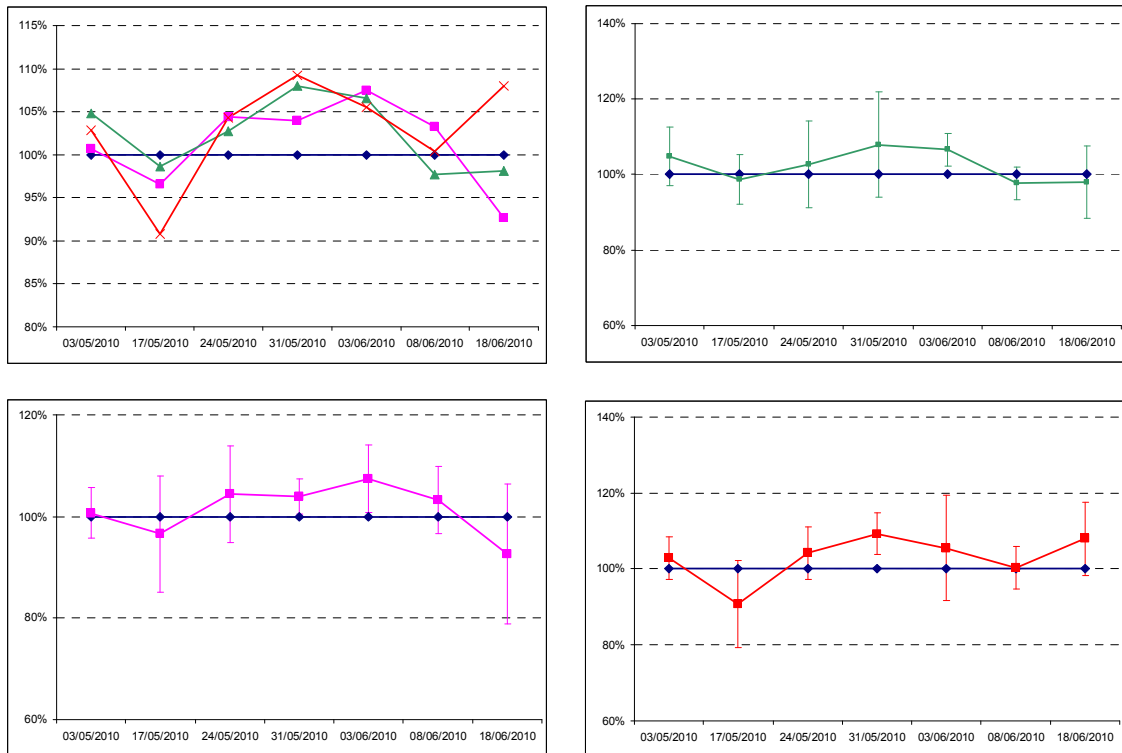


Fig. 10: Andamento stagionale di ET_0/RC nei tre trattamenti per la cultivar Neodur rispetto al controllo (grafico in alto a sinistra). In ordinata sono riportate le unità relative (adimensionali). In ascissa le date di campionamento.. La linea verde rappresenta il trattamento controllo+ozono, la linea fucsia il trattamento controllo+zolfo e la linea rossa il trattamento controllo+ozono+zolfo.). I tre grafici seguenti riportano i confronti delle singole tesi con il controllo riportando anche le barre verticali della deviazione standard.

Osservando i risultati ottenuti per il trasporto elettronico nei centri di reazione (ET_0/RC), le repliche della cultivar Neodur (Figura 10) cresciute in aria arricchita di ozono presentano valori simili o leggermente maggiori a quelli delle repliche di controllo fino alla quinta data, mentre per le ultime due i valori sono minori ed in maniera significativa nella sesta data (8 giugno). Lo stesso andamento si riscontra nei valori del trattamento con concimazione solfatica, anche se valori minori rispetto al controllo si riscontrano solo all'ultima data, ma non vi è mai una differenza significativa. Diversamente, per quanto riguarda il trattamento con aria arricchita di ozono in presenza anche della concimazione con zolfo, anche la settima data presenta valori maggiori rispetto al controllo e per di più in modo significativo.

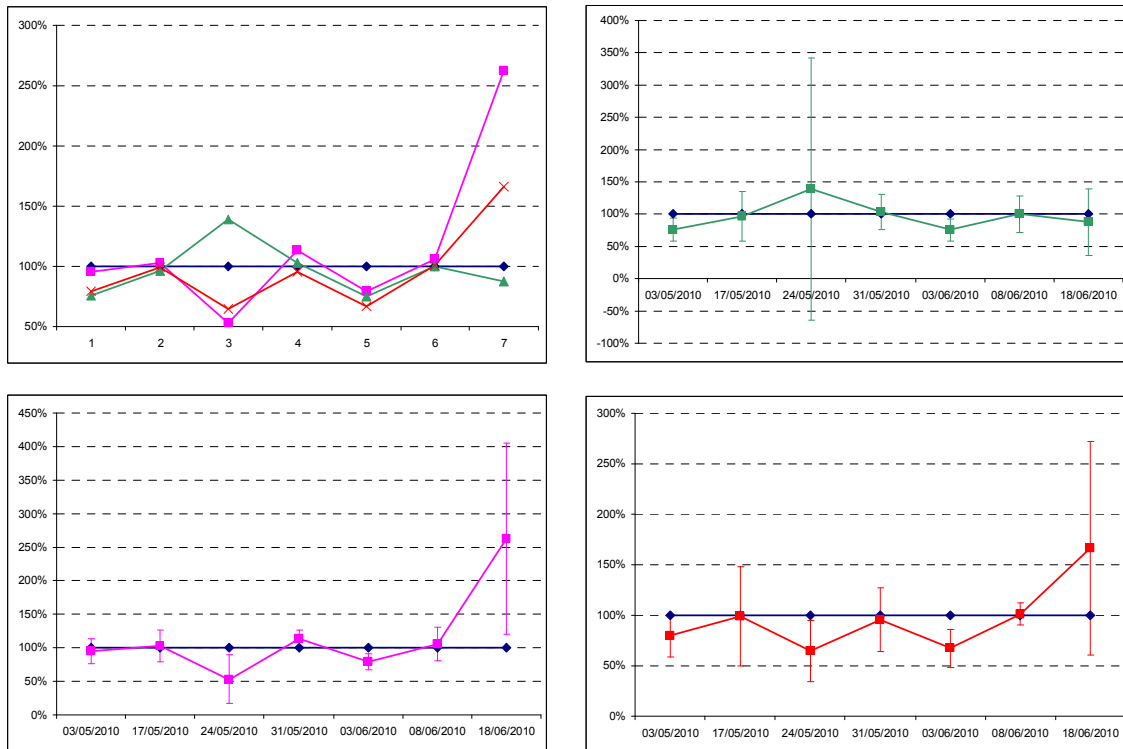


Fig. 11: Andamento stagionale di Pi (abs) nei tre trattamenti per la cultivar Neodur rispetto al controllo (grafico in alto a sinistra). In ordinata sono riportate le unità relative (adimensionali). In ascissa le date di campionamento.. La linea verde rappresenta il trattamento controllo+ozono, la linea fucsia il trattamento controllo+zolfo e la linea rossa il trattamento controllo+ozono+zolfo.). I tre grafici seguenti riportano i confronti delle singole tesi con il controllo riportando anche le barre verticali della deviazione standard.

La **Figura 11** riporta l’andamento stagionale del Performance Index per la cultivar Neodur; le piante cresciute nel trattamento “Controllo +Ozono” mostrano valori del parametro simili o leggermente inferiori a quelli delle piante di controllo lungo tutta la stagione, eccetto per la terza data dove è leggermente superiore, ma mai in maniera significativa. Il comportamento delle repliche “solfate” è inizialmente simile al caso precedente, sebbene alla terza data il Performance Index sia significativamente minore rispetto al controllo, ed inoltre all’ultima data si riscontrino valori maggiori del controllo. Anche per le piante sottoposte al trattamento con l’effetto incrociato di ozono e zolfo si riscontra un andamento stagionale, rispetto alle piante di controllo, simile a quello appena descritto, con la differenza che le differenze non sono mai significative.

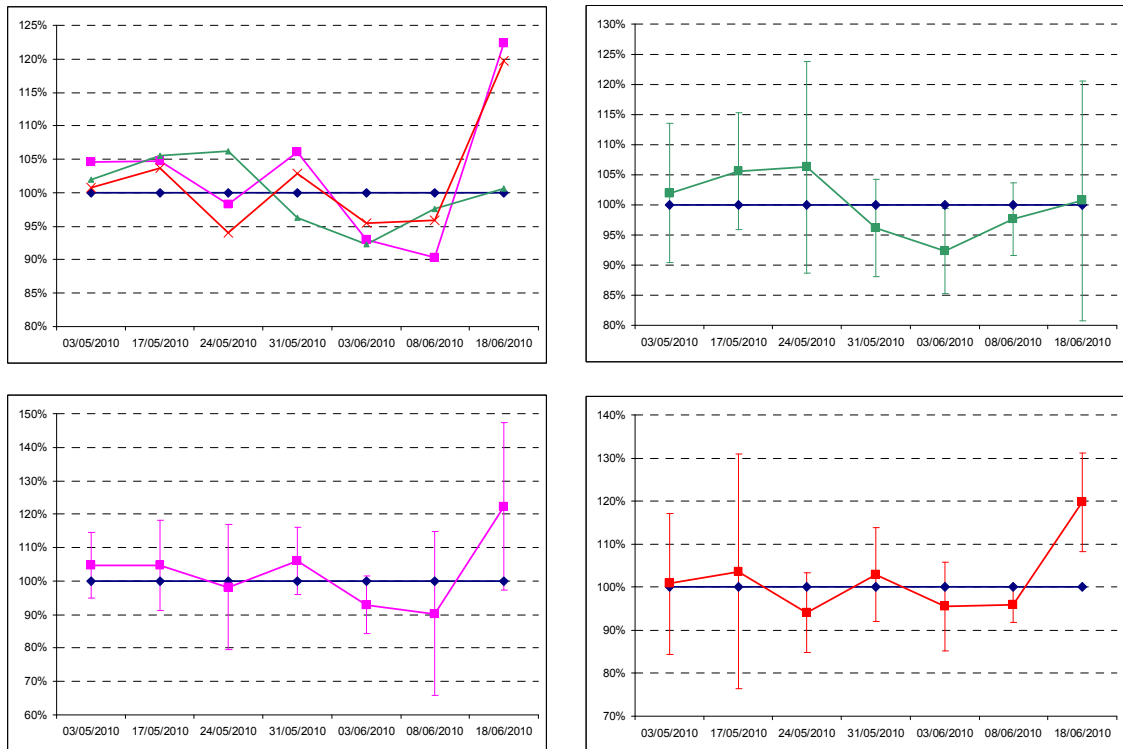
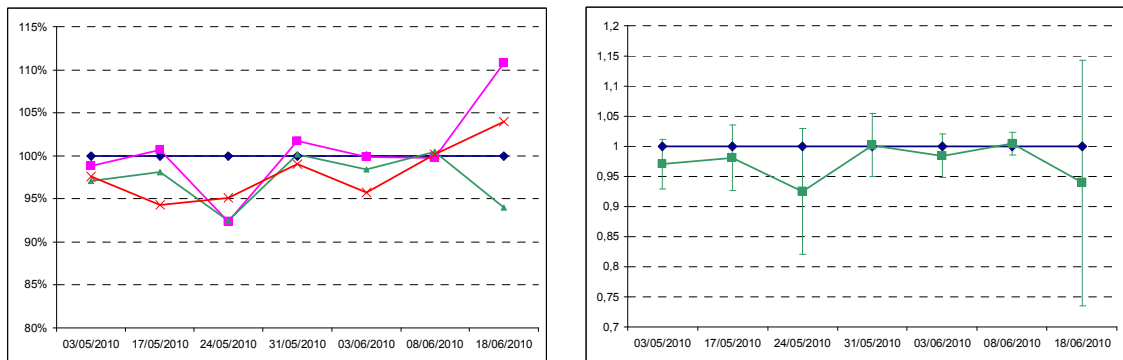


Fig. 12: Andamento stagionale di RC/CS₀ nei tre trattamenti per la cultivar Neodur rispetto al controllo (grafico in alto a sinistra). In ordinata sono riportate le unità relative (adimensionali). In ascissa le date di campionamento.. La linea verde rappresenta il trattamento controllo+ozono, la linea fucsia il trattamento controllo+zolfo e la linea rossa il trattamento controllo+ozono+zolfo.). I tre grafici seguenti riportano i confronti delle singole tesi con il controllo riportando anche le barre verticali della deviazione standard.

Il parametro RC/CS₀ rappresenta il numero di centri di reazione attivi per ciascun centro inattivo su una cross-section del PSII. Il suo andamento stagionale nelle piante della cultivar Neodur (**Figura 13**) mostra, per il trattamento con aria fumigata, valori maggiori fino alla terza data e poi minori rispetto al controllo. Per il trattamento con concimazione solfatica valori generalmente maggiori eccetto che per la quinta e sesta data. Mentre per il trattamento “Controllo +Ozono+Zolfo” i valori sono maggiori per le prime due date, per la quarta e per l’ultima, mentre sono inferiori nelle altre.



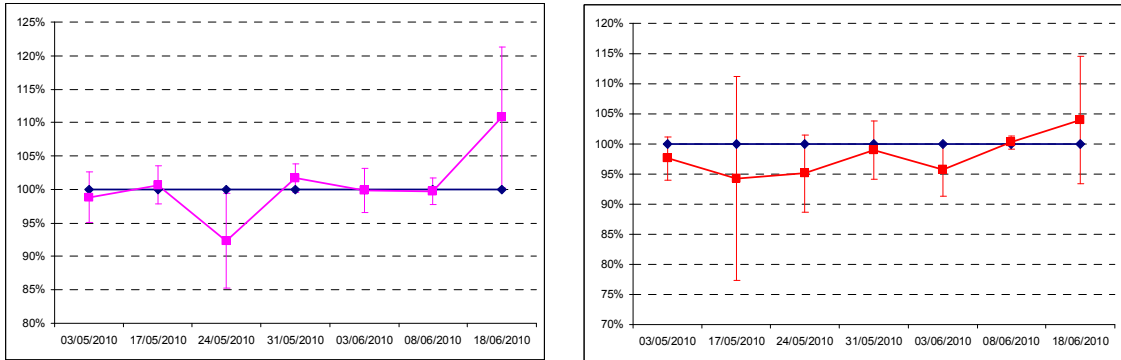
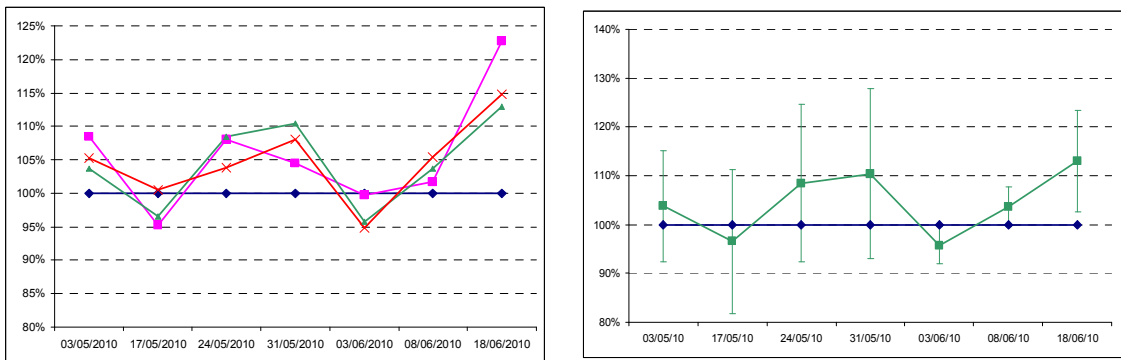


Fig. 13: Andamento stagionale di Fv/Fm nei tre trattamenti per la cultivar Neodur rispetto al controllo (grafico in alto a sinistra). In ordinata sono riportate le unità relative (adimensionali). In ascissa le date di campionamento.. La linea verde rappresenta il trattamento controllo+ozono, la linea fucsia il trattamento controllo+zolfo e la linea rossa il trattamento controllo+ozono+zolfo.). I tre grafici seguenti riportano i confronti delle singole tesi con il controllo riportando anche le barre verticali della deviazione standard.

Osservando i risultati ottenuti per l'efficienza della resa quantica ($F_v/F_M = \phi P_0$), che rappresenta anche la probabilità che un fotone assorbito venga intrappolato da un centro di reazione del PSII, le repliche della cultivar Neodur (**Figura 13**) cresciute in aria arricchita di ozono presentano valori generalmente minori a quelli delle repliche di controllo. Diversamente, per quanto riguarda il trattamento con concimazione solfatica, i valori sono simili a quelli del controllo, eccetto che per la terza data dove risultano minori e per l'ultima dove, invece, sono maggiori. Nel trattamento a effetti incrociati si riscontra andamento simile a quello osservato nelle piante del trattamento "Controllo +Ozono", tranne che per l'ultima data che risulta avere valori maggiori del controllo.



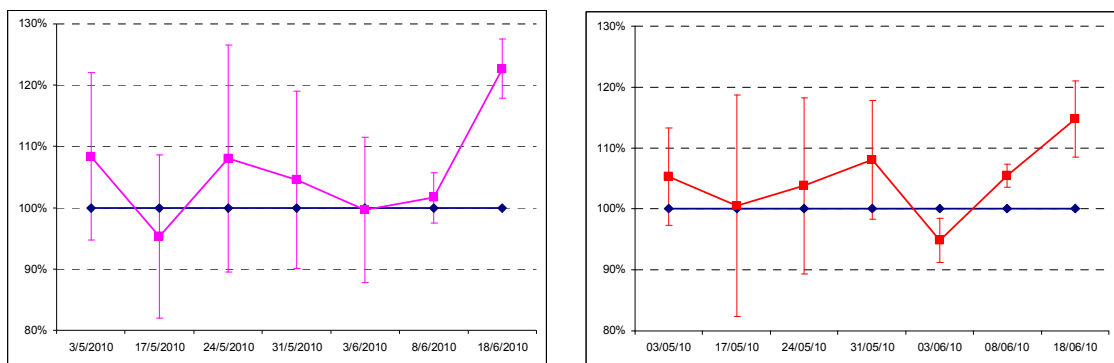


Fig. 14: Andamento stagionale di F_0 nei tre trattamenti per la cultivar Virgilio rispetto al controllo (grafico in alto a sinistra). In ordinata sono riportate le unità relative (adimensionali). In ascissa le date di campionamento.. La linea verde rappresenta il trattamento controllo+ozono, la linea fucsia il trattamento controllo+zolfo e la linea rossa il trattamento controllo+ozono+zolfo.). I tre grafici seguenti riportano i confronti delle singole tesi con il controllo riportando anche le barre verticali della deviazione standard.

Per gli individui della cultivar Virgilio i valori di F_0 nei tre diversi trattamenti risultano generalmente maggiori di quelli nelle repliche di controllo, tranne che alla seconda (17 maggio) e quinta data (3 giugno), e per di più significativamente ($p \leq 0,01$) maggiori alla settima data nei trattamenti “Controllo + Zolfo” e “Controllo +Ozono+Zolfo”.

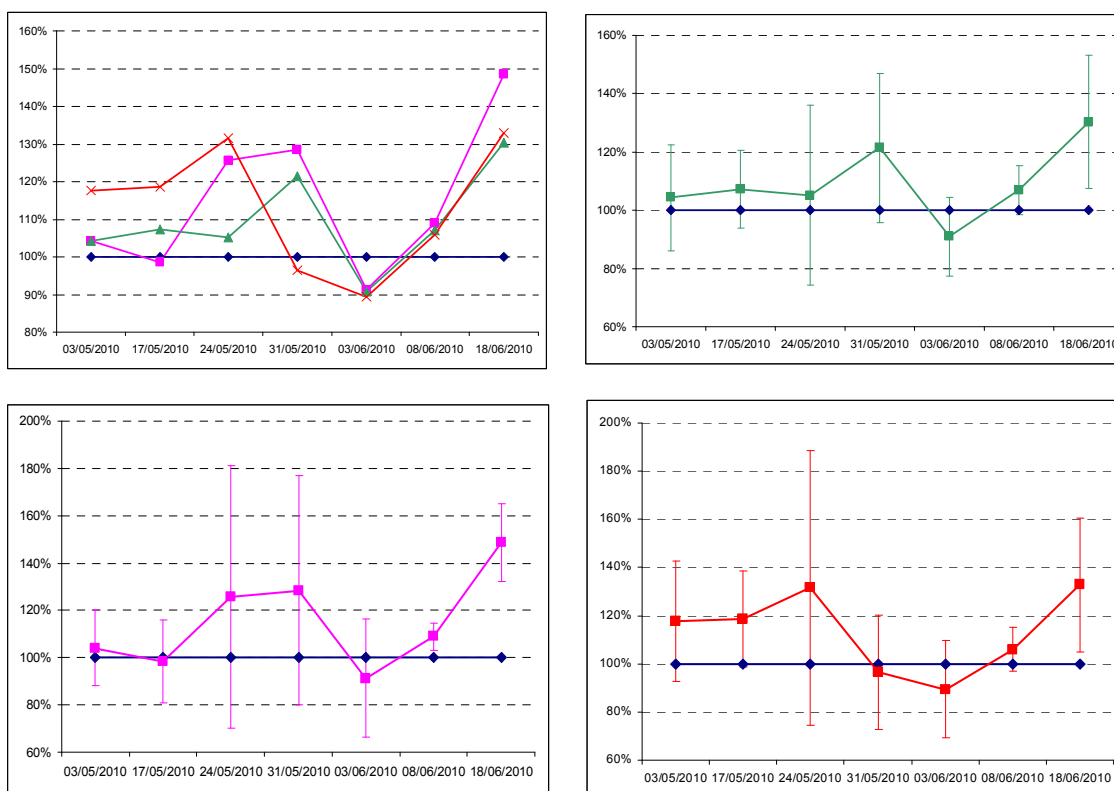


Fig. 15: Andamento stagionale di DI_0/RC nei tre trattamenti per la cultivar Virgilio rispetto al controllo (grafico in alto a sinistra). In ordinata sono riportate le unità relative (adimensionali). In ascissa le date di campionamento.. La linea verde rappresenta il trattamento controllo+ozono, la linea fucsia il trattamento controllo+zolfo e la linea rossa il trattamento controllo+ozono+zolfo.). I tre grafici seguenti riportano i confronti delle singole tesi con il controllo riportando anche le barre verticali della deviazione standard.

I valori della dissipazione effettiva, negli individui della cultivar Virgilio (**Figura 15**), risultano generalmente maggiori, in tutti e tre i diversi trattamenti, rispetto a quelli assunti dagli individui di controllo, tranne che per la quinta data (3 giugno) dove risultano inferiori. Alla settima data, per di più, la differenza nei trattamenti con concimazione solfatica e con l'effetto incrociato di ozono e zolfo è significativamente maggiore, con $p \leq 0,01$, anche se potrebbe essere dovuta all'influenza della diversa posizione delle OTC nel sito sperimentale (effetto blocco). Confrontando i valori del parametro nelle due cultivar si osserva che, durante la stagione sperimentale, sono generalmente simili, ad eccezione dell'ultima data nella quale la varietà Neodur presenta valori maggiori in tutti i trattamenti rispetto alla cultivar Virgilio.

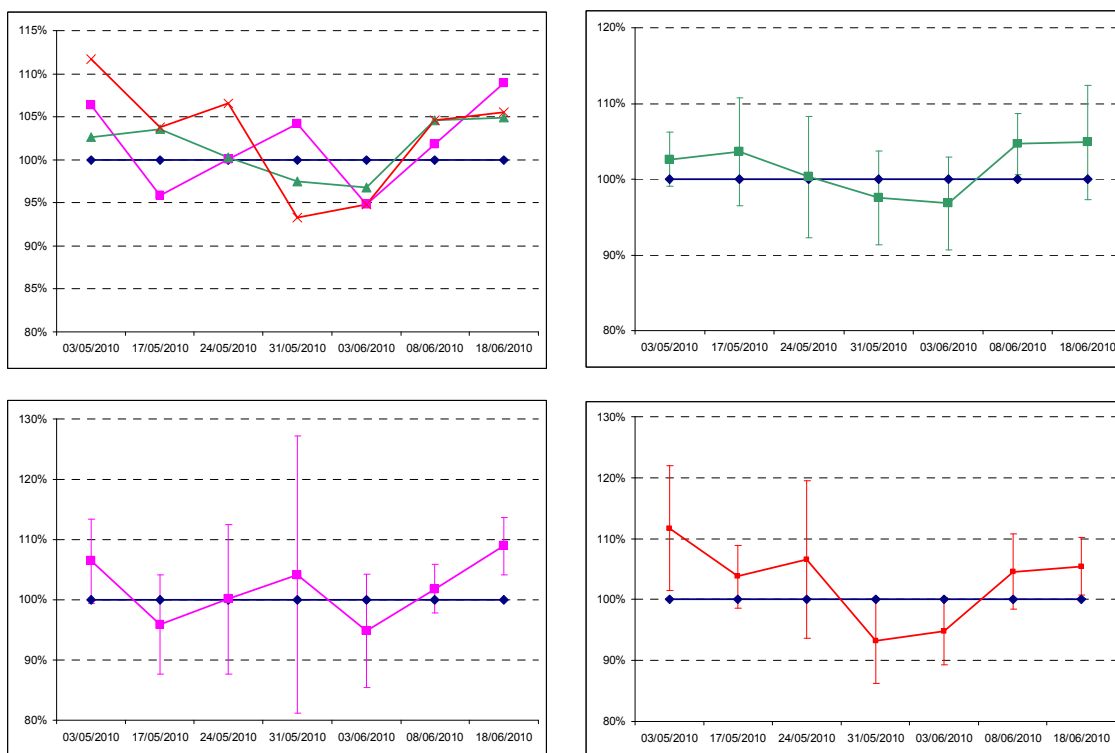


Fig. 16: Andamento stagionale di TR₀/RC nei tre trattamenti per la cultivar Virgilio rispetto al controllo (grafico in alto a sinistra). In ordinata sono riportate le unità relative (adimensionali). In ascissa le date di campionamento.. La linea verde rappresenta il trattamento controllo+ozono, la linea fucsia il trattamento controllo+zolfo e la linea rossa il trattamento controllo+ozono+zolfo.). I tre grafici seguenti riportano i confronti delle singole tesi con il controllo riportando anche le barre verticali della deviazione standard.

Nella varietà Virgilio, per quanto riguarda il parametro TR₀/RC (**Figura 16**), si osserva una maggiore oscillazione, rispetto a quella osservata nelle repliche della cultivar Neodur, dei valori registrati nei tre trattamenti intorno ai valori assunti dal controllo durante la stagione, ma in questo caso alle ultime date i valori, contrariamente a quanto avviene nell'altra varietà, risultano maggiori rispetto al controllo, anche se non in modo significativo.

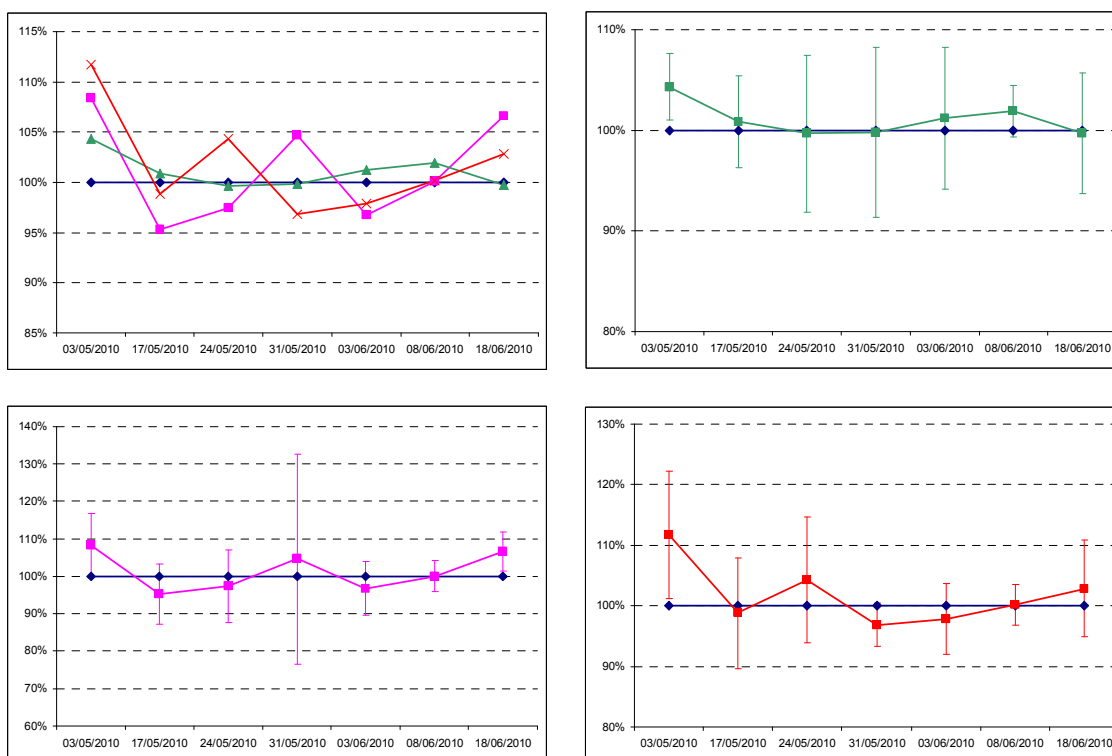


Fig. 17: Andamento stagionale di ET0/RC nei tre trattamenti per la cultivar Virgilio rispetto al controllo (grafico in alto a sinistra). In ordinata sono riportate le unità relative (adimensionali). In ascissa le date di campionamento.. La linea verde rappresenta il trattamento controllo+ozono, la linea fucsia il trattamento controllo+zolfo e la linea rossa il trattamento controllo+ozono+zolfo.). I tre grafici seguenti riportano i confronti delle singole tesi con il controllo riportando anche le barre verticali della deviazione standard.

Le piante della varietà Virgilio (**Figura 17**) cresciute in aria fumigata presentano valori del trasporto elettronico nei centri di reazione maggiori o simili a quelli delle piante di controllo durante tutta la stagione, ma mai con significatività. Negli altri due trattamenti, invece, i valori presentano un'oscillazione intorno ai valori assunti dal parametro nelle repliche di controllo nello sviluppo della stagione, ed entrambi concludono con valori maggiori ma comunque mai significativamente differenti.

Il comportamento rispetto al Performance Index delle piante della cultivar Virgilio (**Figura 18**), mostra per il trattamento con aria arricchita di ozono valori minori di quelli assunti nel controllo fino alla quarta data, alla quinta il trend si inverte per poi tornare minore nelle ultime due date, ma, in questo caso, non si assiste mai a differenze significative. Il trattamento con concimazione solfatica presenta valori più simili a quelli del controllo, rispetto al caso precedente, ma conferma lo stesso andamento soprattutto nelle ultime date con valori maggiori alla quinta data e minori nelle ultime due, con una differenza significativa per la settima data. Infine, il trattamento "Controllo +Ozono+Zolfo" parte con valori minori rispetto al controllo nelle prime tre date, per poi mostrarne di maggiori alla quarta e quinta data e

ritornare a valori minori nelle ultime due date, tra le quali la settimana presenta differenze significative dal controllo.

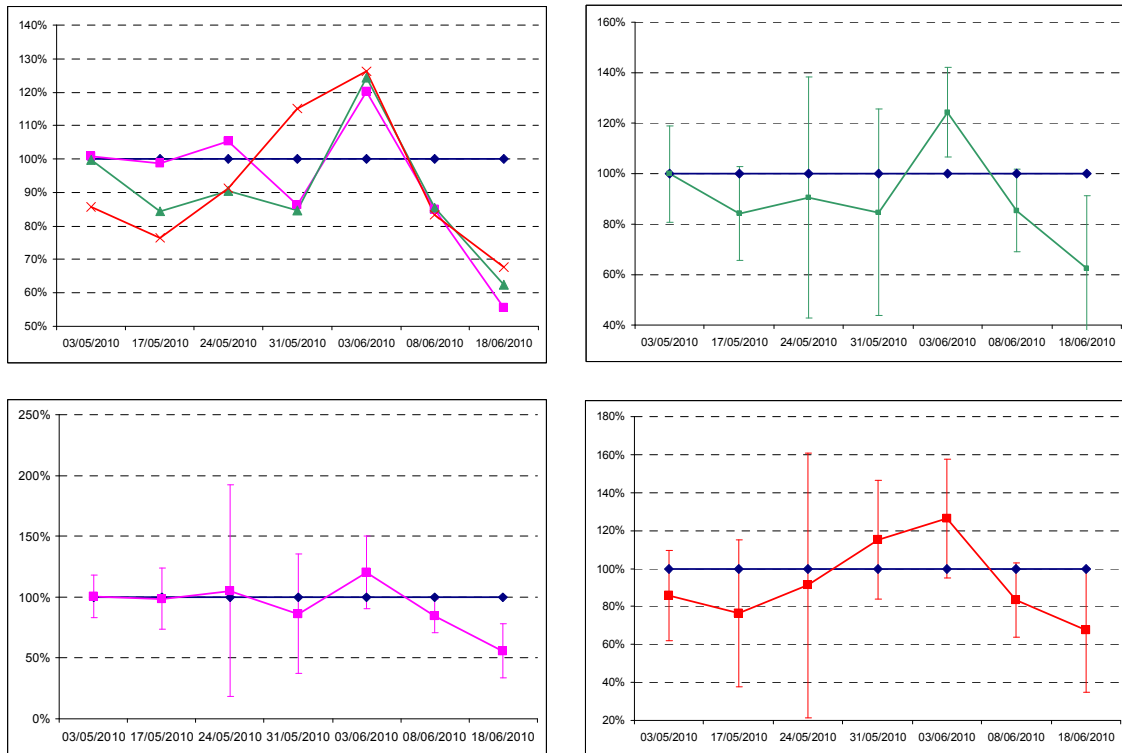


Fig. 18: Andamento stagionale di Pi (abs) nei tre trattamenti per la cultivar Virgilio rispetto al controllo (grafico in alto a sinistra). In ordinata sono riportate le unità relative (adimensionali). In ascissa le date di campionamento.. La linea verde rappresenta il trattamento controllo+ozono, la linea fucsia il trattamento controllo+zolfo e la linea rossa il trattamento controllo+ozono+zolfo.). I tre grafici seguenti riportano i confronti delle singole tesi con il controllo riportando anche le barre verticali della deviazione standard.

I valori di RC/CS_0 , negli individui della cultivar Virgilio (**Figura 19**), risultano generalmente simili, nelle piante del trattamento con aria arricchita di zolfo, rispetto a quelli assunti dagli individui di controllo, tranne che per la seconda data dove risultano inferiori, e alla terza e quarta data dove sono maggiori. Nel trattamento che prevedeva la concimazione solfatica si riscontra una oscillazione dei valori del parametro attorno a quelli assunti dal controllo. Nel trattamento a effetti incrociati i valori sono inferiori nelle prime tre date, e poi diventano superiori a quelli del controllo.

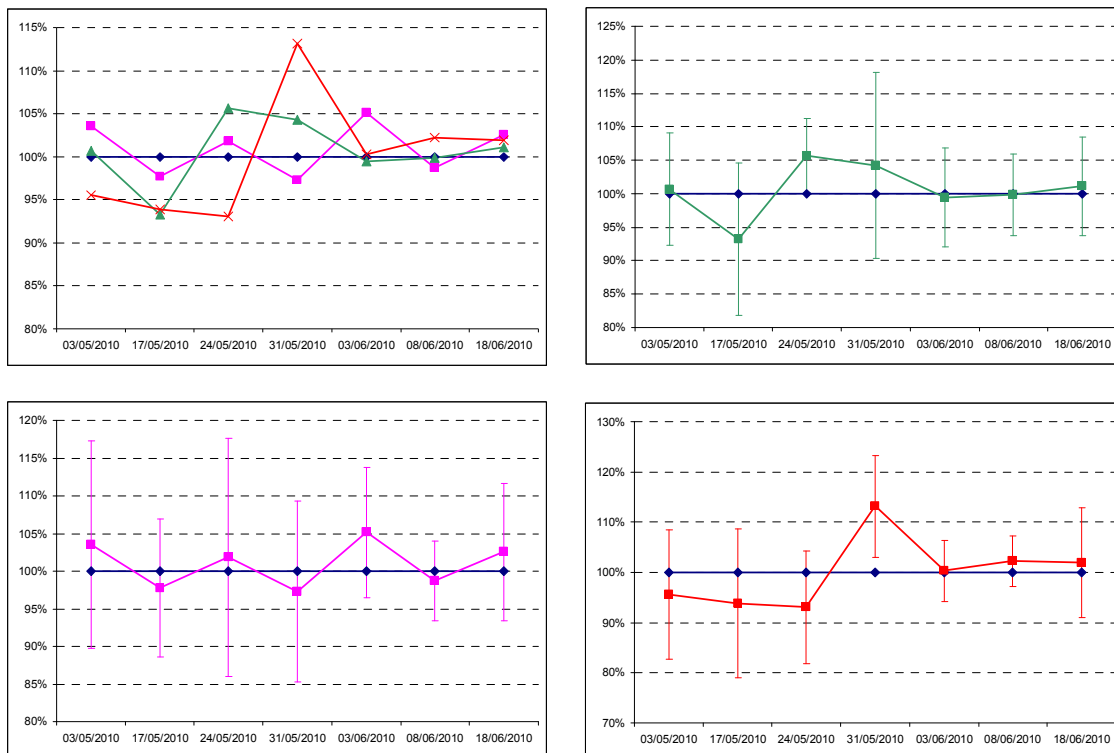


Fig. 19: Andamento stagionale di RC/CS0 nei tre trattamenti per la cultivar Virgilio rispetto al controllo (grafico in alto a sinistra). In ordinata sono riportate le unità relative (adimensionali). In ascissa le date di campionamento.. La linea verde rappresenta il trattamento controllo+ozono, la linea fucsia il trattamento controllo+zolfo e la linea rossa il trattamento controllo+ozono+zolfo.). I tre grafici seguenti riportano i confronti delle singole tesi con il controllo riportando anche le barre verticali della deviazione standard.

Infine, le piante della varietà Virgilio (**Figura 20**) cresciute nei tre diversi trattamenti presentano valori di probabilità che un fotone assorbito venga intrappolato da un centro di reazione del PSII minori o simili a quelli delle piante di controllo durante tutta la stagione.

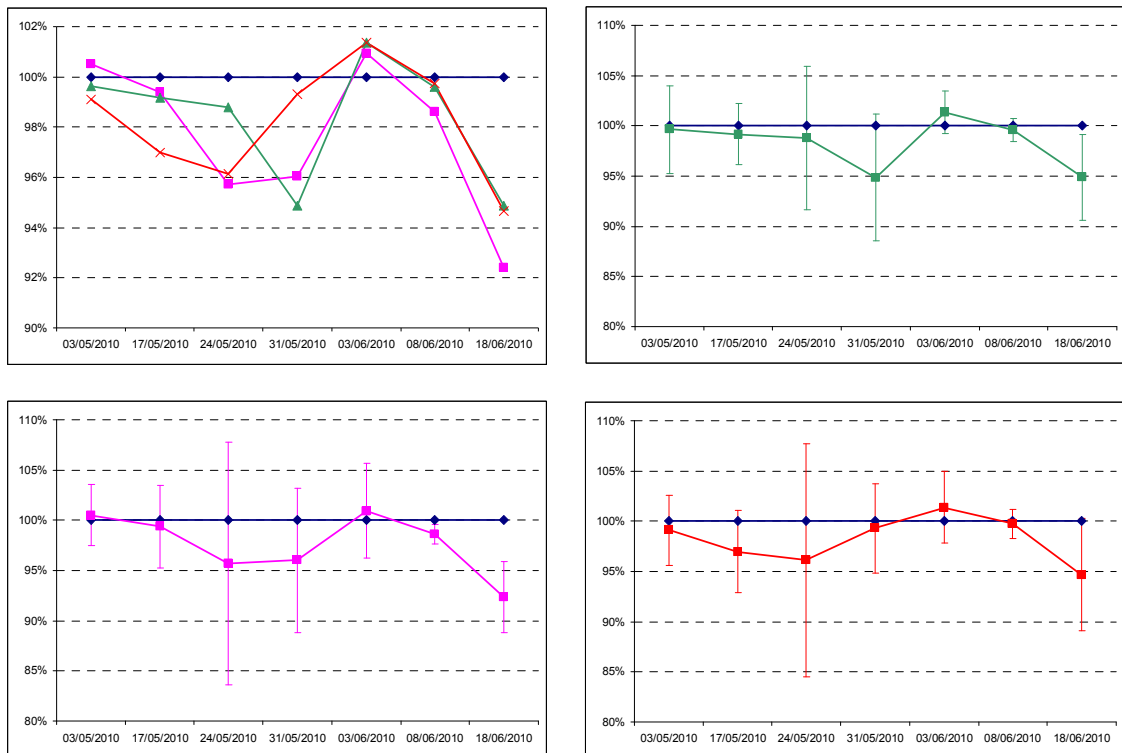


Fig. 20: Andamento stagionale di Fv/Fm nei tre trattamenti per la cultivar Virgilio rispetto al controllo (grafico in alto a sinistra). In ordinata sono riportate le unità relative (adimensionali). In ascissa le date di campionamento.. La linea verde rappresenta il trattamento controllo+ozono, la linea fucsia il trattamento controllo+zolfo e la linea rossa il trattamento controllo+ozono+zolfo.). I tre grafici seguenti riportano i confronti delle singole tesi con il controllo riportando anche le barre verticali della deviazione standard.

Conduttanza stomatica

Per quanto riguarda la conduttanza, in **Tabella 6 e 7**, sono riportati i valori medi, in $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, rilevati alle diverse date e fasce orarie per ogni trattamento. Come di consueto il controllo è il trattamento di crescita in condizioni di aria filtrata dall'ozono e in assenza di concimazione con zolfo.

Tabella 6: valori medi di conduttanza per ogni trattamento nella cultivar Neodur (in $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)

Neodur					
Data	Fascia oraria	Controllo (-S -O₃) Media	Controllo + Ozono	Controllo + Zolfo	Controllo +Ozono+Zolfo
28/04/10	AFT	741	695	625	525
17/05/10	MID	696	333	545	541
	AFT	230	262	576	336
24/05/10	MOR	240	179	137	202
	MID	135	134	138	117
	AFT	158	138	118	171
27/05/10	MOR	556	619	426	383
31/05/10	MOR	215	239	340	259
	MID	254	184	218	234
08/06/10	MOR	270	336	272	230
	MID	207	196	149	240
	AFT	150	87	100	185
18/06/10	MID	285	167*	251	180
	AFT	215	156	156	163

Tabella 7: valori medi di conduttanza per ogni trattamento nella cultivar Virgilio (in $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)

Virgilio					
Data	Fascia oraria	Controllo (-S -O₃) Media	Controllo + Ozono	Controllo + Zolfo	Controllo +Ozono+Zolfo
28/04/10	AFT	835	604	662,	800
17/05/10	MID	638	677	611	535
	AFT	472	593	274	356
24/05/10	MOR	155	206	192	95
	MID	127	101	83	143
	AFT	166	155	130	137
27/05/10	MOR	350	337	283	380
31/05/10	MOR	224	273	241	292
	MID	152	208	190	282
08/06/10	MOR	383	240	285	250
	MID	217	173	170	169
	AFT	172	134	191	116
18/06/10	MID	276	214	230	193
	AFT	210	208	223	251

(MOR indica la fascia oraria della mattina compresa tra le 9:00 e le 11:00. MID indica la fascia oraria del primo pomeriggio compresa tra le 12:30 e le 14:30. AFT indica la fascia

oraria del pomeriggio compresa tra le 15:00 e le 17:00)

Osservando i risultati nelle tre diverse fasce orarie (**Tabella 6** e **Tabella 7**) si può affermare che la conduttanza stomatica tende, generalmente, a diminuire nell'arco della giornata. Per quanto riguarda le differenze dovute ai tre diversi trattamenti, rispetto al controllo, si rileva che la concimazione solfatica tende a far diminuire la conduttanza stomatica, soprattutto nella cultivar Neodur, mentre la presenza di ozono nell'aria non sembra influenzare questo aspetto nelle piante delle due cultivar. Le differenze, comunque, non sono mai statisticamente significative, se non per quanto riguarda la fascia oraria MIDday nella settima data per il trattamento "Controllo +Ozono". Comparando, in fine, le medie giornaliere, delle due varietà, durante l'arco della stagione delle si può osservare che la cultivar Virgilio parte inizialmente con valori di conduttanza stomatica maggiori rispetto a quelli della cultivar Neodur, ma nel proseguo della stagione mostra una diminuzione più rapida, dovuta probabilmente alla maggior estensione delle lesioni fogliari.

Nelle **Figure 21** e **22** vengono riportati gli andamenti stagionali della conduttanza stomatica di ciascuna cultivar, distinguendo fra piante cresciute nei diversi trattamenti: in assenza di ozono e di concimazione (CTRL); in aria fumigata con ozono ma assenza di concimazione (CTRL +O₃); in aria filtrata dall'ozono e presenza di concimazione solfatica (CTRL +S); e in trattamento incrociato per la contemporanea presenza di ozono e concimazione (CTRL +S +O₃).

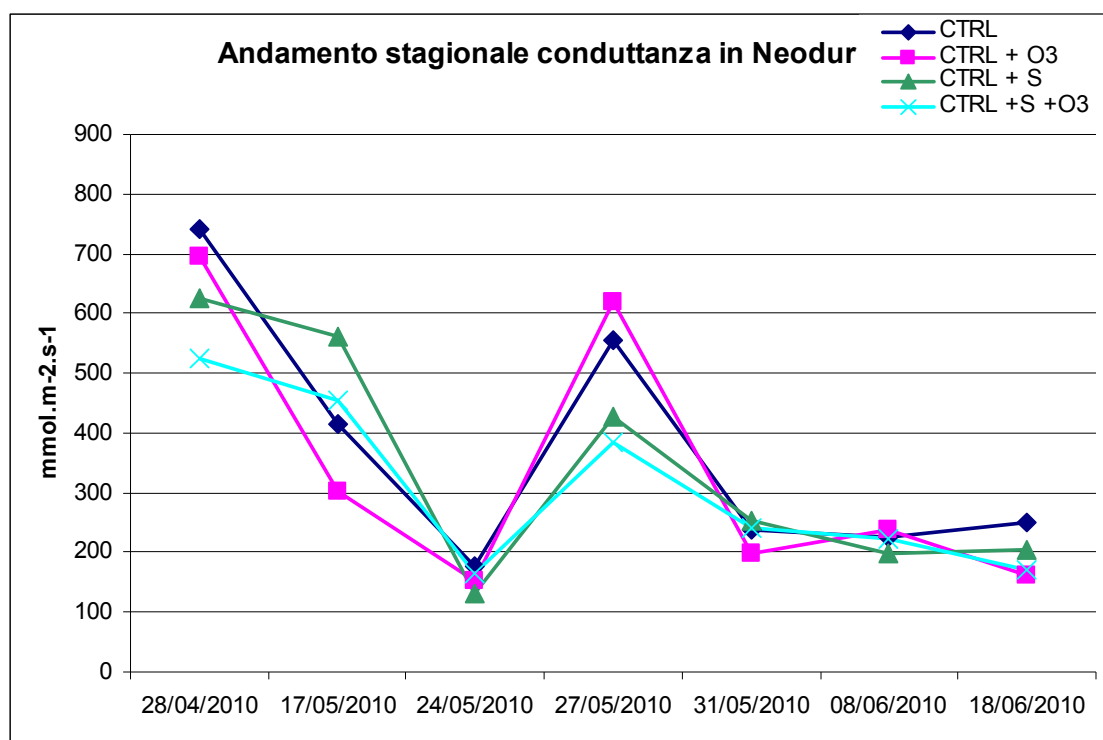


Fig. 21: Andamento stagionale della conduttanza stomatica nella cultivar Neodur

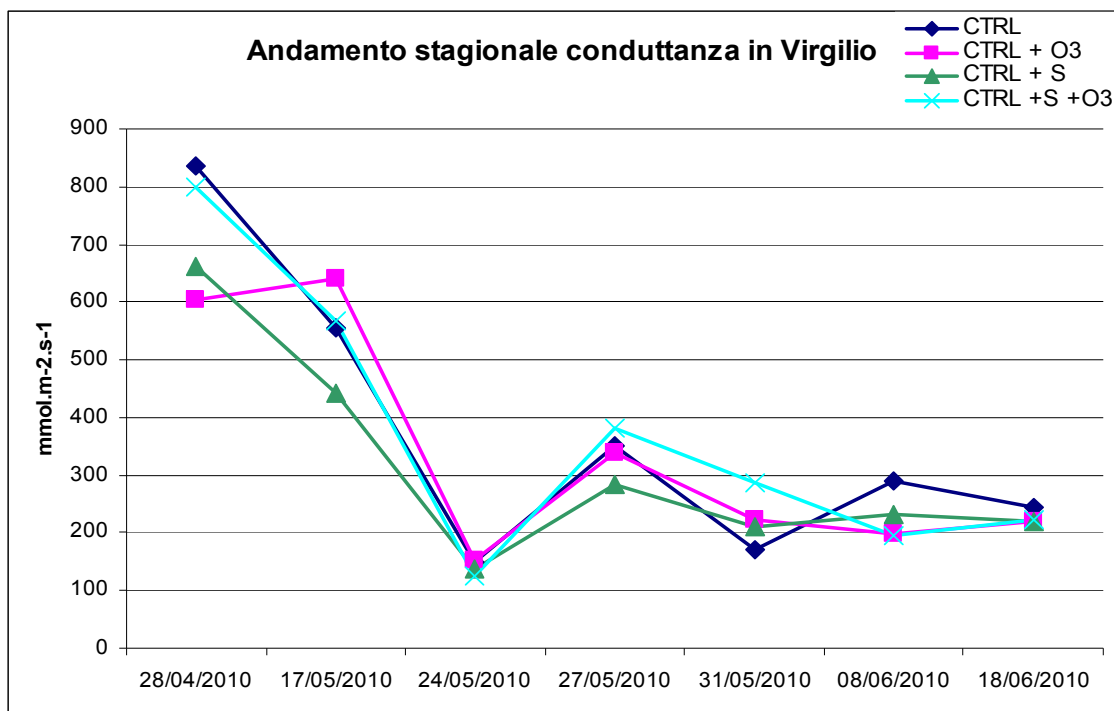


Fig. 22: Andamento stagionale della conduttanza stomatica nella cultivar Virgilio

Le precedenti immagini mostrano un trend in diminuzione durante la stagione per entrambe le cultivar, alla terza data, il 24 maggio, si riscontrano i valori più bassi causati da uno stress idrico avvenuto nei giorni precedenti. Risolto il problema ritroviamo dei valori più alti che poi ricominciano a seguire il loro andamento generale.

Biochimica

Le analisi biochimiche hanno riguardato la determinazione dei livelli di acido ascorbico totale e ridotto nel pool apoplastico, nonché i tioli nel protoplasma delle diverse cultivar. In tabella 8 e 9 sono riportati i valori medi di acido ascorbico totale e ridotto, espressi in $\mu\text{g/g}$ per ogni trattamento delle due cultivar, al fine di poter valutare l'influenza che i fattori ozono e zolfo inducono nella produzione di questi antiossidanti. Il controllo è, come sempre, rappresentato dal trattamento di crescita con aria filtrata da ozono e assenza di concimazione solfatica.

Tabella 8: valori medi di acido ascorbico nei diversi trattamenti per la cultivar Neodur

Neodur				
	Controllo (-S - O₃) Media	Controllo + Ozono	Controllo + Zolfo	Controllo +Ozono+Zolfo
Acido ascorbico tot	152	187	158	173
Acido ascorbico ridotto	147	173	154	166

Tabella 9: valori medi di acido ascorbico nei diversi trattamenti per la cultivar Virgilio

Virgilio				
	Controllo (-S - O₃) Media	Controllo + Ozono	Controllo + Zolfo	Controllo +Ozono+Zolfo
Acido ascorbico tot	168	219	163	206
Acido ascorbico ridotto	159	180	162	190

Dai risultati si deduce che per la cultivar Neodur (Tabella 8) l'AsA totale è maggiore nelle piante trattate con aria arricchita di ozono rispetto alle piante di controllo. Questo avviene anche per le piante sottoposte agli altri due trattamenti ma in misura minore, infatti per il trattamento con la sola concimazione solfatica l'incremento, rispetto al controllo, è minimo e per il trattamento con l'effetto incrociato di ozono e zolfo l'incremento è più significativo ma comunque minore rispetto a quello osservato nel trattamento con l'effetto del solo ozono. Il medesimo andamento si riscontra, sempre parlando delle piante della cultivar Neodur, per l'acido ascorbico ridotto. All'analisi statistica, tuttavia, queste differenze non sono risultate significative per nessuno dei due parametri. Nella cultivar Virgilio (Tabella 9) si riscontrano risultati leggermente diversi, anche in questo caso l'AsA totale aumenta, rispetto alle piante di controllo, nelle repliche che hanno subito il trattamento con fumigazione di ozono, e anche, in misura leggermente inferiore, nel trattamento "Controllo +Ozono+Zolfo", mentre diminuisce leggermente nelle repliche sottoposte a concimazione. Per quanto riguarda, invece, l'acido ascorbico ridotto riscontrato in questa cultivar si ha un aumento nel trattamento con aria arricchita di ozono, un lieve aumento anche nel trattamento con concimazione e solfatica ed un aumento nel trattamento a effetti incrociati, che in questo caso risulta il maggiore, rispetto al controllo, dei tre trattamenti. Anche per questa cultivar, tuttavia, le differenze dei trattamenti dal controllo non sono risultate statisticamente significative.

Comparando le due cultivar si riscontra che la varietà Virgilio presenta sempre, sia nelle repliche di controllo che in quelle dei diversi trattamenti, livelli di pool di acido ascorbico (totale o ridotto) maggiori rispetto alla cultivar Neodur.

Lo stesso criterio è stato utilizzato in tabella 10 e 11 per riportare i valori dei tioli, che sono rappresentativi del pool di zolfo proteico, (espressi in $\mu\text{g/g}$) delle due diverse cultivar.

Tabella 10: valori medi dei tioli per la cultivar Neodur

Neodur				
	Controllo (-S - O₃) Media	Controllo + Ozono	Controllo + Zolfo	Controllo +Ozono+Zolfo
Tioli	235	241	242	225

Tabella 11: valori medi dei tioli per la cultivar Virgilio

Virgilio				
	Controllo (-S - O₃) Media	Controllo + Ozono	Controllo + Zolfo	Controllo +Ozono+Zolfo
Tioli	281	280	278	282

Le analisi mostrano, per quanto riguarda le piante della cultivar Neodur (Tabella 10), incrementi lievi (+2% circa) dei livelli presenti nelle repliche sottoposte ai trattamenti “Controllo +Ozono” e “Controllo +Zolfo” rispetto alle repliche di controllo, ed una diminuzione nel trattamento con effetto incrociato di ozono e zolfo. Le piante della cultivar Virgilio mostrano (Tabella 11), al contrario, leggerissime diminuzioni dei tioli (minori dell’1%) per quanto riguarda i trattamenti con sola crescita in aria ozonata o con sola concimazione solfatica, mentre mostrano un incremento, sebbene lieve, nel trattamento “Controllo +Ozono+Zolfo”. Le differenze riscontrate nei vari trattamenti rispetto al controllo, tuttavia, non sono risultate statisticamente significative in entrambe le cultivar.

Confrontando le due varietà si osserva che, come avveniva anche per l’acido ascorbico, le piante di Virgilio presentano sempre valori di tioli maggiori rispetto a quelle della varietà Neodur.

Resa agronomica e produttività

Al momento del raccolto le piante provenienti dai diversi trattamenti sono state separate in modo da valutare le differenze di produttività in relazione ai fattori ozono e zolfo

È stato determinato, in prima analisi, il peso secco totale (DW TOT), comprendente cioè le piante nella loro interezza; si sono poi misurati i pesi secchi delle sole spighe (DW SPIGHE) ed infine, da queste, si è ottenuta la sola granella sulla quale sono stati determinati i pesi delle cariossidi (PESO CARIOSSIDI). I risultati, in grammi, sono riportati nelle tabelle 13 e 14.

Tabella 13: pesi nei diversi trattamenti per la cultivar Neodur

Neodur				
	Controllo (-S -O ₃) grammi	Controllo + Ozono	Controllo + Zolfo	Controllo +Ozono+Zolfo
PESO CARIOSSIDI	28,58	23,30 *	18,61	14,44
DW TOT	116,06	99,77 ***	98,27	88,79
DW SPIGHE	45,52	39,02 *	34,00	28,31

Dai risultati si deduce che, per la cultivar Neodur, la produttività nel trattamento con aria ozonata è minore e rispetto a quella del controllo, e che questa differenza è significativa in tutti e tre i diversi pesi utilizzati per valutarla. Nel trattamento “Controllo +Zolfo”, come riscontrato anche nel precedente trattamento, i pesi sono minori di quelli ottenuti dalle repliche di controllo, ma in questo caso mai significativamente. Infine, le piante cresciute nel trattamento con l’effetto incrociato di ozono e zolfo presentano i pesi minori rispetto a tutti gli altri trattamenti e al controllo, ma, comunque, mai con differenza significativa.

Tabella 14: pesi nei diversi trattamenti per la cultivar Virgilio

Virgilio				
	Controllo (-S - O ₃) grammi	Controllo + Ozono	Controllo + Zolfo	Controllo +Ozono+Zolfo
PESO CARIOSSIDI	25,08	32,60	26,40	35,51
DW TOT	94,67	110,08	105,71	114,83
DW SPIGHE	40,73	51,08	43,52	55,17

Per le piante della cultivar Virgilio, contrariamente a quanto riscontrato nella varietà Neodur, i tre diversi trattamenti mostrano pesi, e di conseguenza resa agronomica, maggiori rispetto al controllo ma, in ogni caso, in maniera significativa. I pesi maggiori si riscontrano per le repliche del trattamento “Controllo +Ozono+Zolfo”, leggermente minori di questi sono quelli misurati nelle piante cresciute in aria fumigata, mentre la resa del trattamento con la sola concimazione solfatica è paragonabile a quella del controllo, di fatti è solo leggermente maggiore.

Sintomi visibili

Durante la stagione sperimentale si sono analizzate le foglie bandiera, a cui sono state poi scattate fotografie, delle piante delle due cultivar, per osservare se vi fossero differenze nella manifestazione dei sintomi visibili tra i vari trattamenti.

Vengono riportate, di seguito, le immagini relative all'11 maggio e al 19 maggio, date alle quali si iniziavano già a manifestare i sintomi.



Fig. 23 Fotografia delle foglie a bandiera di piante della cultivar Virgilio in data 11 maggio 2010

La **Figura 23** mostra le foglie bandiera della cultivar Virgilio relative all'11 maggio, rispettivamente di piante, partendo dalla foglia a sinistra, appartenenti al controllo, al trattamento con concimazione solfatica, al trattamento con fumigazione e al trattamento con effetti incrociati. Si osserva, a questo punto della stagione, qualche leggero spot clorotico nella terza foglia, quella che respirava aria ozonata, e, in misura minore, anche nella foglia della pianta sottoposta all'effetto incrociato di ozono e zolfo. Le foglie relative agli altri trattamenti non presentano sintomi visibili, così come tutte le foglie appartenenti alla cultivar Neodur, di cui perciò non è riportata l'immagine.

La **Figura 24** mostra i dati di analisi dell'immagine per i diversi trattamenti, che rispecchiano le osservazioni ricavate dalla **Figura 23**.

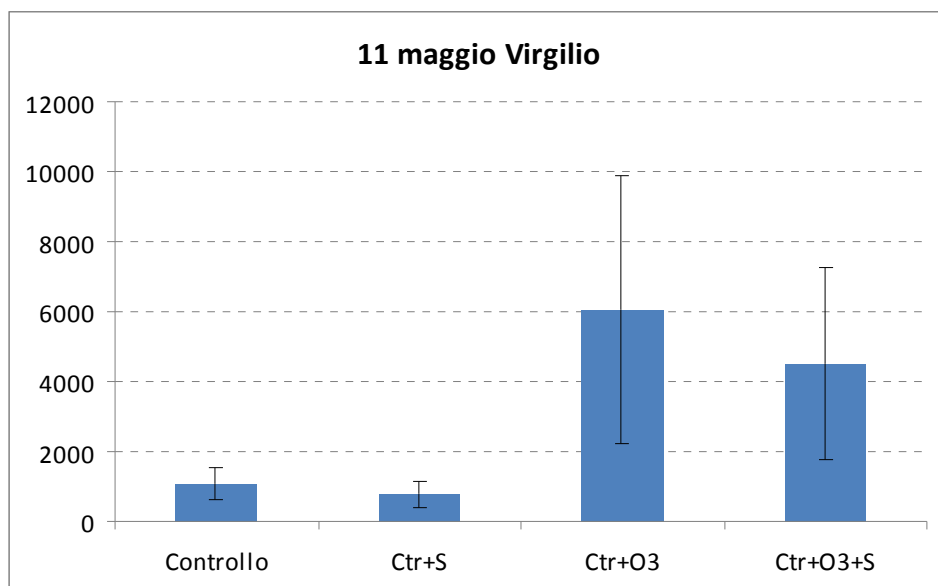


Fig.24 Grafico dell'insorgenza dei sintomi visibili nella cultivar Virgilio alla data dell'11 maggio. I dati sono espressi come numero di pixel gialli-ocra per 5 cm quadrati di foglia = 128.000 pixels

Al 19 maggio la situazione delle foglie nelle due cultivar si presentava come mostrato nell'immagine sottostante (**Figura 25**).

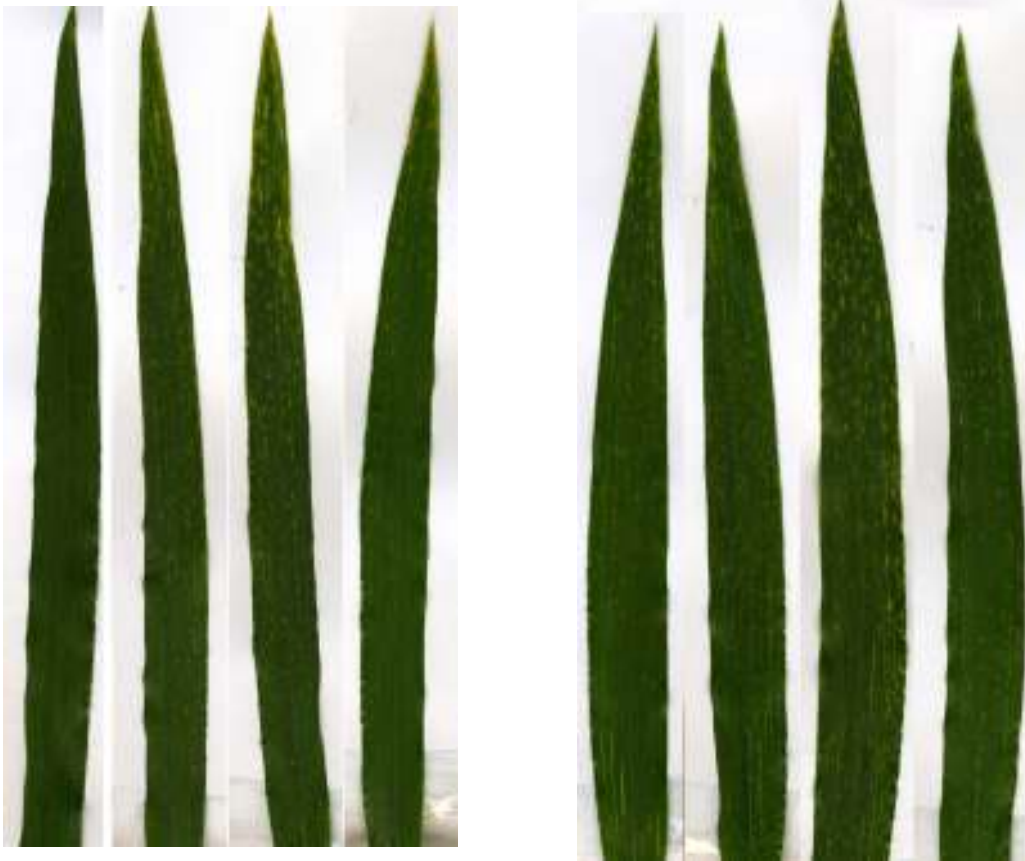


Fig. 25: fotografie delle foglie bandiera in data 19 maggio. Nell'immagine di sinistra sono riportate le repliche della cultivar Neodur, mentre nell'immagine di destra quelle della cultivar Virgilio

A questo punto della stagione la varietà Neodur presenta sintomi leggeri sulle foglie del controllo e su quelle del trattamento “Controllo +Ozono+Zolfo” (rispettivamente prima e quarta foglia nell'immagine di sinistra), e sintomi significativamente più intensi sulle foglie del trattamento con la sola concimazione solfatica e sulle repliche di quello “Controllo +Ozono” (rispettivamente seconda e terza foglia nell'immagine di sinistra). Alla stessa data la cultivar Virgilio presenta già spot necrotici nelle piante sottoposte a fumigazione con ozono (terza foglia nell'immagine di destra), che sono significativamente più sintomatiche delle repliche degli altri tre trattamenti, tra i quali non sembrano esserci significanti differenze.

La **Figura 26** mostra i dati di analisi dell'immagine per i diversi trattamenti, che rispecchiano le osservazioni ricavate dalla **Figura 25**.

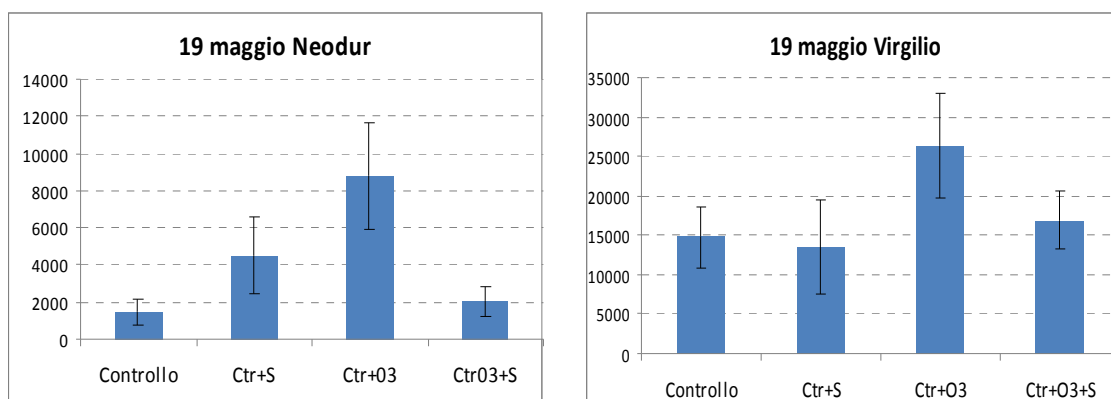


Fig.26 Grafico dell'insorgenza dei sintomi visibili nelle due cultivar alla data del 19 maggio. I dati sono espressi come numero di pixel gialli-ocra per 5 cm quadrati di foglia = 128.000 pixels

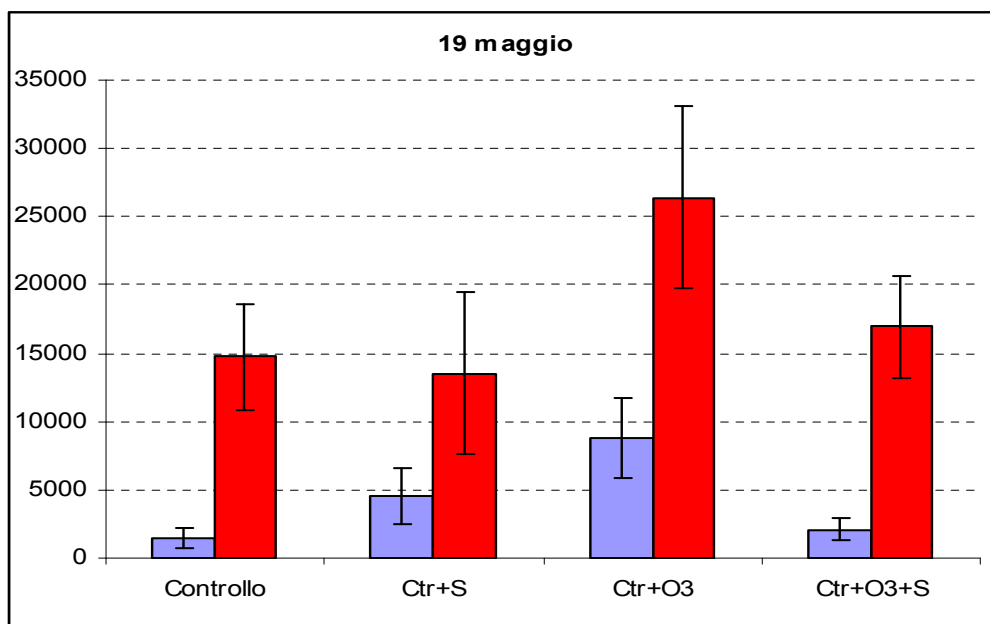


Fig. 27: Grafico dell'insorgenza dei sintomi visibili nelle due cultivar alla data del 19 maggio. La serie viola indica i dati della cultivar Neodur, mentre quella rossa i dati della cultivar Virgilio. I dati sono espressi come numero di pixel gialli-ocra per 5 cm quadrati di foglia = 128.000 pixels

I dati delle due cultivar, rappresentati nella **Figura 27**, non possono essere rigorosamente confrontati tra loro a causa del verde delle foglie, che è leggermente diverso. (In definitiva ad esempio il dato 9000 pixel gialli nel Neodur rispetto ai 27000 del Virgilio non significa rigorosamente che i sintomi sul Virgilio siano ben tre volte quelli del Neodur.)

Conclusioni

L'effettiva presenza di uno stress nelle piante di frumento duro causato dall'ozono, cioè una riduzione dell'efficienza fotosintetica da parte di questo inquinante, è indicata da una maggiore fluorescenza basale del fotosistema II delle piante di entrambe le cultivar, cresciute nelle OTC con aria arricchita di ozono rispetto a quelle di controllo durante tutta la stagione sperimentale (in modo significativo alla prima data per la cultivar Neodur). A sostegno di questa affermazione si osserva anche una maggiore dissipazione effettiva per centro di reazione attivo ($DI0/RC$), una minore Performance (PI_{ABS}) ed una minore efficienza della resa quantica ($Fv/FM=\phi P0$), che ricordiamo rappresenta anche la probabilità che un fotone assorbito venga intrappolato da un centro di reazione del PSII, nelle piante delle due cultivar sottoposte al trattamento con aria arricchita con ozono rispetto alle piante di controllo, nell'arco della stagione. Le piante delle due cultivar sottoposte a questo trattamento (Controllo +Ozono) mostrano inoltre: una maggiore capacità dei centri di reazione di intrappolare l'eccitazione rispetto al controllo in quasi tutta la stagione, questo parametro risulta infatti minore rispetto a quello riscontrato nel controllo nell'ultima data (18 giugno) per quanto riguarda la cultivar Neodur, e nella quarta e quinta data (31 maggio e 3 giugno) per quanto riguarda la varietà Virgilio; ed un maggiore trasporto elettronico nei centri di reazione, sempre a confronto delle piante di controllo, per tutta la stagione nella cultivar Virgilio e tranne che nelle ultime due date (8 giugno in cui la differenza è statisticamente significativa e 18 giugno) per la cultivar Neodur. L'aumento di questi due parametri in seguito all'esposizione all'ozono potrebbe essere legato a due aspetti. Da un lato nella pianta potrebbero instaurarsi meccanismi di difesa o di compensazione (dissipativi dal punto di vista energetico) nei confronti dello stress, ma una volta raggiunti i centri di reazione il flusso è costretto a bloccarsi perché questi si trovano nello stato "chiuso" e cioè impossibilitati a ricevere l'eccitazione della luce. Di conseguenza si riscontra un aumento sia della dissipazione che della fluorescenza basale ($F0$), confermando una riduzione dell'efficienza fotosintetica nelle piante di frumento duro di entrambe le cultivar. D'altro canto l'aumento della capacità di trapping ($TR0/RC$) e del trasporto elettronico ($ET0/RC$) potrebbe essere spiegato come un effetto solo "apparente" dovuto alla presenza di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in grado di accettare l'eccitazione/elettrone al posto del centro di reazione, facendo figurare "funzionale" il centro quando invece non lo è. Questa ipotesi sembra confermata dalla diminuzione della probabilità che un fotone assorbito venga intrappolato da un centro di reazione del PSII ($\phi P0$). Difatti l'ozono che è un forte ossidante, attraverso la

formazione di ROS puo causare una possibile "distruzione" dei centri di reazione che, diventando minori in numero assoluto, causano l'aumento della fluorescenza e della dissipazione termica e di conseguenza la riduzione del Performance Index.

Questi aspetti ancora poco chiari dovrebbero pero essere oggetto di studi piu approfonditi a livello della funzionalita dei fotosistemi e dell'intero processo fotosintetico (PSII, PSI, Ciclo di Calvin).

Le piante sottoposte al trattamento con la sola concimazione solfatica, condizione che generalmente non ha luogo in ambiente naturale, presentano valori di fluorescenza basale maggiori rispetto a quelli assunti dalle piante di controllo, con media significativita alla quarta data per la cultivar Neodur ed elevata significativita all'ultima data per la varieta Virgilio. Anche la dissipazione (DI0/RC), il trapping (TR0/RC) (con differenze molto significative al 24 maggio per la cultivar Neodur, e al 3 maggio per la cultivar Virgilio) e il trasporto elettronico (ET0/RC) nei centri di reazione delle piante sottoposte a questo trattamento presentano lo stesso andamento di F0 in relazione alle piante di controllo. Contemporaneamente il Performance Index delle piante che hanno subito la concimazione solfatica risulta piu basso di quello delle piante controllo (con media significativita al 3 giugno per la cultivar Neodur, e al 18 giugno per la cultivar Virgilio), come minore risulta anche l'efficienza della resa quantica ($F_v/F_M = \phi P_0$).

Sembrerebbe percio che la sola concimazione solfatica, considerando un ambiente con basse concentrazioni di ozono, non sia d'aiuto all'efficienza fotosintetica delle piante di frumento duro, anche se per la cultivar Neodur sembrerebbe esserci un effetto positivo riscontrato pero nell'ultima data di campionamento, 18 giugno, e dunque in uno stadio molto avanzato della crescita.

L'effetto incrociato di ozono e zolfo determina generalmente nelle piante delle due cultivar una maggiore fluorescenza basale, dissipazione, *trapping* e trasporto elettronico, ed una minore Performance ed efficienza della resa quantica rispetto alle piante di controllo durante la stagione. Una situazione che rispecchia quella osservata nelle piante sottoposte al trattamento con la sola aria arricchita di ozono, lasciando intendere che la concimazione non porta ad effetti protettivi per le piante nei confronti dello stress da ozono. Comparando i due trattamenti ("Controllo +Ozono+Zolfo" e "Controllo +Ozono") si osserva che i diversi parametri presentano generalmente valori simili o leggermente diversi in alcune date, che pero non indicano un particolare andamento stagionale tale da rappresentare differenze significative nelle piante dei due trattamenti. A fronte di queste osservazioni e del fatto che la cultivar Virgilio presenta valori di PI_{ABS} maggiori rispetto alla Neodur si può dire che la

concimazione solfatica di piante di frumento duro che crescono in ambiente con alte concentrazioni di ozono non sembra avvantaggiarle rispetto allo stress provocato dal gas, in quanto non sembra migliorarne significativamente l'efficienza fotosintetica.

Un'ultima considerazione che si può dedurre dai risultati riguardanti i parametri della fluorescenza e che, per quanto riguarda le piante della cultivar Neodur, sembrerebbe che la concimazione con zolfo ne ritardi la completa maturazione. Infatti, all'ultima data, la dissipazione e la fluorescenza basale sono minori, mentre il numero di centri attivi (RC/CS_o) è maggiore così come PI_{ABS} e F_v/F_m per queste piante, risultati indicanti che a questo punto della stagione i fotosistemi di queste piante erano più attivi rispetto a quelli delle piante di controllo.

L'analisi della conduttanza stomatica, come si è visto nei risultati, non sembra evidenziare informazioni interessanti per il presente studio, in quanto l'ozono non sembra influenzarne l'andamento stagionale. Per quanto riguarda l'aggiunta di solfato, questo trattamento pare diminuire leggermente la conduttanza (principalmente nella cultivar Neodur), ma sono necessari ulteriori studi e approfondimenti per provarne l'effetto e verificarne l'effettiva significatività. La principale informazione che si ricava è quella che riguarda la più rapida riduzione della conduttanza stomatica durante la stagione nella cultivar Virgilio rispetto alla Neodur. Questo risultato potrebbe dipendere dalla maggior estensione delle lesioni fogliari che effettivamente sono state riscontrate nella cultivar Virgilio rispetto alla cultivar Neodur.

Per quanto riguarda le analisi biochimiche, queste ci mostrano che per entrambe le cultivar, come ci si aspettava, il pool di acido ascorbico aumenta in presenza di ozono.

In presenza di ozono e zolfo si nota che l'aumento è maggiore per le piante della cultivar Virgilio (+23% per AsA totale e +19% per AsA ridotto confronto al controllo) rispetto alle piante della cultivar Neodur (+14% per AsA totale e +12% per AsA ridotto confronto al controllo), quasi ci fosse un apparente effetto depressivo per questa cultivar, effetto che viene osservato anche analizzando i risultati ottenuti sui tioli. Difatti, in presenza di ozono la fertilizzazione con zolfo, per la cultivar Neodur, anziché incrementare il quantitativo di tioli, come per altro avviene nella varietà Virgilio, lo fa diminuire. Questo potrebbe sembrare un dato sospetto, ma appare correlato, oltre che con i risultati sull'acido ascorbico, con quelli della fluorescenza.

L'analisi dei gruppi tiolici non proteici rappresenta, infatti, un indicatore della concentrazione di glutatione ridotto GSH, il quale quando esplica la sua azione antiossidante reagisce ossidandosi e prendendo la forma GSSG (2 molecole di GSH ossidate). Di conseguenza un quantitativo minore di GSH potrebbe rispecchiare la maggiore presenza di glutatione ossidato,

e perciò indicare una situazione di stress ossidativo maggiore. Situazione che, come si è detto, viene osservata per la cultivar Neodur. Bisogna comunque ricordare che le differenze nei livelli cellulari di queste molecole, riscontrate tra i trattamenti e il controllo, non sono statisticamente significative.

Le analisi sulla produttività mostrano che, diversamente da quanto ci si aspettava, la cultivar più sensibile all'ozono è la Neodur. Difatti essa presenta una maggiore produttività della cultivar Virgilio in assenza di stress (piante controllo), ma in presenza di aria fumigata con ozono manifesta un calo significativo nella resa agronomica, in contrasto con quanto avviene per la cultivar Virgilio che aumenta leggermente la sua produttività, anche se non in modo significativo. L'aggiunta di zolfo tramite concimazione non sembra migliorare la resa agronomica soprattutto per la cultivar Neodur, osservazione confermata dalle prove in pieno campo condotte dal Prof. Franco Faoro (Università degli Studi di Milano) presso alcuni campi varietali di Voghera, che non rilevano differenze di produttività tra piante che abbiano subito o meno concimazione solfatica.

Parlando, infine, dei sintomi visibili si rileva per entrambe le cultivar un effetto protettivo dello zolfo, soprattutto nel caso di elevati livelli di ozono. Difatti, le piante sottoposte a concimazione manifestano in maniera minore i sintomi fogliari visibili rispetto alle altre. Tuttavia questo effetto protettivo è in contrasto con quanto rilevato nelle risposte degli altri parametri analizzati (resa agronomica e fluorescenza dei fotosistemi). Anche il fatto che la cultivar Virgilio manifesti maggiore suscettibilità alla comparsa di sintomi visibili per effetto della presenza di ozono non appare correlato alle altre risposte indagate, lasciando ipotizzare che gli aggettivi "sensibile" e "resistente" spesso vengano attribuiti solo sulla base di questo aspetto. Risulta inoltre poco chiaro il fatto che lo zolfo abbia contribuito a rendere più danneggiate le foglie di Neodur in assenza di ozono, aspetto per il quale sembrano necessari ulteriori studi sperimentali.

Bibliografia

- Faoro F., Iriti M., Saracchi M., Quaroni S., 2009 - *Indagini istologiche ed istochimiche mediante tecniche di microscopia ottica ed elettronica per il riconoscimento e la caratterizzazione dei danni da ozono*. Quaderni della Ricerca, Regione Lombardia, 96, p. 65-71.
- Gerosa G., Marzuoli R., Bussotti F., Pancrazi M. and Ballarin-Denti A., 2003. *Ozone sensitivity of Fagus sylvatica and Fraxinus excelsior young trees in relation to leaf structure and foliar ozone uptake*. Environmental Pollution 125, p. 91-98.
- Gerosa G., Spinazzi F., Ballarin-Denti A., 2000 - *Critical levels for vegetation exposure to ozone in Lombardy (Northern Italy)*. Atti XVII Convegno Nazionale della Società Italiana di Chimica Agraria, Portoferraio, Italy, 29 September-1 October 1999, p. 481-489.
- Hell R., 1997 - *Molecular physiology of plant sulfur metabolism*. Planta 202, p. 138–148
- Kärenlampi L. and Skärby L. (Eds) 1996. *Critical levels for ozone in Europe: testing and finalizing the concepts*. UN-ECE Workshop Report. – University of Kuopio, Dept. of Ecol. and Environ. Sci.
- Lorenzini G., Nali C., 2005 - *Le piante e l'inquinamento dell'aria*. Cap. 4. Springer.
- Monteith, J.L., Campbell G. S., Potter E. A., 1988 - *Theory and performance of a dynamic diffusion porometer*. Agric. For. Meteorol. 44:27-38.
- Picchi V., Iriti M., Quaroni S., Saracchi M., Viola P., Faoro F., 2010 - *Climate variations and phenological stages modulate ozone damages in field-grown wheat. A three-year study with eight modern cultivars in Po Valley (Northern Italy)*. Agriculture, Ecosystems & Environment 135, p. 310-317.
- Pleijel H., Berglen Eriksen A., Danielsson H., Bondesson N., Selldén G., 2006 - *Differential ozone sensitivity in an old and a modern Swedish wheat cultivar—grain yield and quality, leaf chlorophyll and stomatal conductance*. Environ. Exp. Bot. 56, p. 63–71.
- Strasser, A., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M., 2000. *The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples*. In: M., Yunus, U., Pathre, P., Mohanty (Eds) Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation. Taylor & Francis, London, UK. p. 445-483.
- Strasser, A., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A., 2004 - *Analysis of the fluorescence transient*. In: G.C., Papageorgiou, Govindjee (Eds). Chlorophyll fluorescence: A Signature of Photosynthesis. Springer, Dordrecht, NL, p. 321-362.