

Università degli Studi di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

**ECOLOGIA MICROBICA, RESISTENZA INDOTTA AD AGENTI
FITOPATOGENI E COLTURE ERBACEE.**

PROG. N°3: COLTURE ERBACEE

CICLO XX

Settore scientifico disciplinare di afferenza: AGR02

**INTERAZIONE FRA BIOSINTESI DEI LIPIDI E
FOTOSINTESI IN BRASSICACEAE OLEAGINOSE:
EFFETTO DELL'EPOCA DI RACCOLTA E DELLA
RADIAZIONE LUMINOSA**

Tesi di dottorato di:

Guido Bezzi

Coordinatore Dottorato:

Chiar.mo Prof.

GIOVANNI DINELLI

Relatore:

Chiar. mo Prof.

GIANPIETRO VENTURI

Esame Finale Anno 2008

INDICE

1. PREMESSA	1
2. LA BIOSINTESI DEI LIPIDI	2
2.1. FASI DELLA BIOSINTESI E STRUTTURE CELLULARI COINVOLTE	2
2.2. METABOLISMO DEGLI ACIDI GRASSI SATURI	4
2.2.1. <i>Substrati di partenza per la sintesi degli acidi grassi</i>	4
2.2.2. <i>L'enzima Acetil-CoA Carbossilasi</i>	6
2.2.3. <i>Sintesi de novo degli acidi grassi saturi</i>	9
2.3. INSATURAZIONE ED ELONGAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI	12
2.3.1. <i>Insaturazione delle catene carboniose</i>	13
2.3.2. <i>Elongazione delle catene carboniose</i>	15
2.4. FORMAZIONE DEI TRIGLICERIDI: KENNEDY PATHWAY	19
3. FATTORI INFLUENZANTI LA BIOSINTESI DEI LIPIDI	22
3.1. FATTORI GENETICI	22
3.2. FATTORI AGRONOMICI E STADIO FENOLOGICO	23
3.3. FATTORI BIOCHIMICI E STRUTTURALI	24
3.4. FATTORI CLIMATICI E AMBIENTALI	26
4. FOTOSINTESI, BIOSINTESI DEI LIPIDI E DISCRIMINAZIONE ISOTOPICA DEL CARBONIO	28
4.1. LA FOTOSINTESI CLOROFILLIANA	29
4.1.1. <i>Descrizione generale</i>	29
4.1.2. <i>Fotosintesi in risposta alla luce</i>	33
4.1.3. <i>Fotosintesi in risposta alla CO₂ intercellulare</i>	36
4.1.4. <i>Fotosintesi in foglie, silique e semi</i>	38
4.2. DISCRIMINAZIONE ISOTOPICA DEL CARBONIO	42
4.2.1. <i>Aspetti generali e applicazioni</i>	42
4.2.2. <i>Utilizzo della firma isotopica nello studio della lipogenesi</i>	45
4.3. FLUORESCENZA	46
4.3.1. <i>Aspetti generali e applicazioni</i>	46

5. MATERIALI E METODI	51
5.1. TEST AGRONOMICI A PIENO CAMPO (BIENNIO 2005-06)	51
5.1.1. <i>Aspetti agronomici</i>	51
5.1.2. <i>Andamento meteorologico</i>	53
5.1.3. <i>Rilievi di campo</i>	55
5.1.4. <i>Analisi di laboratorio</i>	56
5.2. TEST IN AMBIENTE CONTROLLATO (ANNO 2007)	59
5.2.1. <i>Aspetti agronomici</i>	59
5.2.2. <i>Celle climatiche</i>	61
5.2.3. <i>Rilievi di campo</i>	62
5.2.4. <i>Misura dei parametri fisiologici</i>	64
5.2.5. <i>Analisi quanti-qualitative sugli oli</i>	67
5.2.6. <i>Quantificazione dei pigmenti clorofilliani ed estrazione degli zuccheri solubili</i>	67
5.2.7. <i>Estrazione e purificazione degli acidi grassi</i>	69
5.2.8. <i>Misure di discriminazione isotopica del carbonio</i>	70
5.2.9. ANALISI STATISTICA	71
6. RISULTATI	73
6.1. ASPETTI AGRONOMICI	73
6.1.1. <i>Ciclo Vegetativo, Investimento e Biometria</i>	73
6.1.2. <i>Produzione</i>	76
6.1.3. <i>Qualità</i>	79
6.2. TEST IN AMBIENTE CONTROLLATO	81
6.2.1. Monitoraggio dei parametri ambientali	81
6.2.2. Aspetti Ecofisiologici	84
6.2.2.1. <i>Sviluppo della pianta caratteri morfologici</i>	84
6.2.2.2. <i>Parametri morfo-fisiologici della foglia (RWC e SLA e SPAD)</i>	88
6.2.2.3. <i>Pigmenti Fotosintetici</i>	89
6.2.2.4. <i>Risposta Fotosintetica</i>	94
6.2.2.4.1. <i>Risposta al variare della CO₂</i>	94
6.2.2.4.2. <i>Risposta al variare della radiazione</i>	96
6.2.2.5. <i>Fluorescenza</i>	99
6.2.2.6. <i>Discriminazione Isotopica del carbonio</i>	101
6.2.2.7. <i>Caratteri Produttivi e Sintesi degli Acidi Grassi</i>	103
7. DISCUSSIONI	105
7.1. TEST AGRONOMICI A PIENO CAMPO	105
7.2. TEST IN AMBIENTE CONTROLLATO	107
8. CONCLUSIONI	113
9. BIBLIOGRAFIA	116

1. PREMESSA

La coltivazione delle oleaginose sta conoscendo una grossa espansione poiché gli oli vegetali sono considerati strategici nella sostituzione dei prodotti petrolchimici sia sottoforma di biocarburanti sia sottoforma di oli industriali.

Le Brassicaceae sono fra le specie più adatte a questi scopi perché si distinguono per buon adattamento a diversi areali, per la discreta produttività e per la produzione di acido erucico.

La convenienza nell'utilizzo degli oli vegetali per scopi industriali aumenta all'aumentare della produzione di olio per ettaro e della stabilità delle caratteristiche dell'olio.

Nel caso delle Brassicaceae la produzione di olio per ettaro è ancora molto limitata dalle perdite di seme alla raccolta, causate dalla spiccata tendenza alla scalarità di maturazione che influisce anche sulla omogeneità del prodotto.

Inoltre, data la complessità del meccanismo di biosintesi dei lipidi nelle Brassicaceae, un aumento produttivo si potrebbe ottenere anche attraverso lo studio dell'ottimizzazione dello sfruttamento di fattori ambientali. Questo approccio oltre a migliorare la conoscenza dell'influenza dei fattori principali sui meccanismi fisiologici, può permettere di individuare possibili obiettivi di miglioramento genetico.

Per questi motivi, lo scopo di questo lavoro è cercare di studiare i metodi per massimizzare la produttività delle Brassicaceae sia a livello agronomico, saggiando l'effetto dell'epoca di raccolta, sia a livello ecofisiologico saggiando l'effetto del livello di luce sulla biosintesi dei lipidi. In entrambi i casi, oltre che le caratteristiche qualitative delle produzioni vengono studiate anche le possibili influenze sulla qualità degli oli.

I due approcci metodologici così presentati hanno in comune solo e soltanto l'obiettivo finale. Questo comporta l'applicabilità contemporanea di entrambi gli studi nel caso questi ultimi diano risultati positivi allo scopo che questa ricerca si è prefissata.

2. BIOSINTESI DEI LIPIDI

I lipidi sono un insieme di composti ternari (costituiti da C,H e O) originati dall'esterificazione di acidi organici carbossilici (acidi grassi) con molecole di diversa natura (generalmente glicerolo o derivati).

Nei vegetali, sono importanti costituenti cellulari con funzione strutturale, protettiva di bioregolazione e di riserva (Harwood, 1998; Slabas *et al.*, 2001). Sono presenti in modesta quantità nei tessuti di foglia, fusti e radici e in elevata quantità in alcuni frutti e nei semi (Salisbury e Ross, 1984). In particolare, ogni cm² di superficie fogliare può contenere fino a 0.2mg di lipidi (pari al 5-10% del peso secco) costituenti quasi esclusivamente le pareti cellulari mentre, il tessuto di riserva dei semi, può contenerne anche oltre il 60% (Ohlrogge e Browse, 1995; Voelker e Kinney, 2001).

La biosintesi dei lipidi, quindi, è una via metabolica primaria dei vegetali, essenziale per la sintesi dei costituenti cellulari e per la funzionalità di diverse altre vie metaboliche.

2.1 FASI DELLA BIOSINTESI E STRUTTURE CELLULARI COINVOLTE

L'importanza dei lipidi nella fisiologia della pianta e lo sfruttamento, da parte dell'uomo, dell'abbondanza di grassi in semi e frutti, sono fra i principali motivi per cui, da decenni, sono stati avviati diversi studi sulla biosintesi degli acidi grassi e sulle dinamiche di riempimento del seme.

Dai primi studi effettuati in materia, si pensava che la biosintesi degli acidi grassi seguisse, in maniera inversa, la via di demolizione degli stessi (β -ossidazione) sfruttandone i medesimi enzimi (Lynen, 1954; Stumpf e Bradbeer, 1959). Successivi studi hanno invece dimostrato come la sintesi degli acidi grassi nei vegetali segua una via metabolica diversa che, a differenza della β -ossidazione, coinvolge prodotti di carbossilazione dell'acetato ed avviene in diversi compartimenti cellulari (Izzo R., 2003).

Mentre in animali, lieviti ed altri eucarioti la sintesi avviene nel citosol, nei vegetali è stata dimostrata la capacità di sintetizzare acidi grassi nei cloroplasti della foglia e protoplasti dei semi (Shmid *et al.*, 2000; Ohlrogge e Jaworski, 1997).

In questi ultimi, tuttavia, avviene solo la porzione iniziale della sintesi delle catene aciliche carboniose (*pathway procariotica*). Gli acidi grassi formati nel cloroplasto, vengono trasportati nel citosol a formare un pool di molecole che, nel reticolo endoplasmatico, possono essere ulteriormente allungate, insaturate o assemblate nei lipidi (trigliceridi, galattolipidi, fosfolipidi etc.) da destinare alle diverse funzioni della pianta (*pathway eucariotica*). (Roughan e Slack, 1982; Somerville e Browse, 1991) (Fig. 2.1).

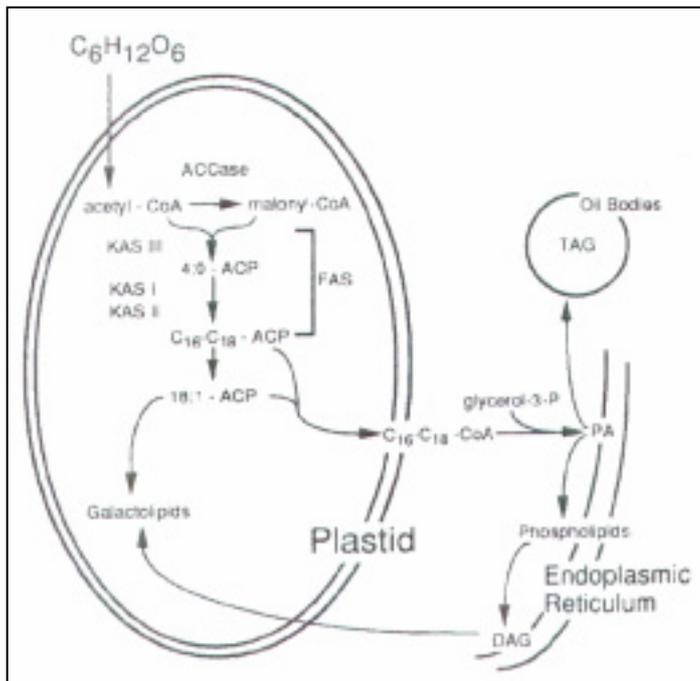


Fig. 2.1: Schema semplificato di formazione degli acidi grassi all'interno di diversi compartimenti cellulari. (Ohlrogge e Jaworski, 1997)

La complessità del metabolismo lipidico deriva dal coinvolgimento di diversi compartimenti cellulari con produzione di diversi pool di molecole intermedie. Tale intreccio di rapporti fra cloroplasti, reticolo endoplasmatico e intermedi di sintesi richiede un sistema di comunicazione, trasporto e controllo delle molecole molto efficiente basato su rapporti source/sink, che regolano la sintesi degli acidi grassi a seconda dell'utilizzazione finale nel

vegetale (Ohlrogge e Jaworski, 1997).

Tuttavia, la natura di tale controllo e le molecole coinvolte non sono ancora del tutto conosciute (Ohlrogge e Jaworski, 1997) e il ritrovamento, anche nei mitocondri, di proteine coinvolte nella sintesi lipidica (Shmid et al., 2000) fanno pensare a ulteriori porzioni della via biosintetica le cui funzioni non sono ancora del tutto chiare.

In generale, ogni cellula vegetale, essendo provvista di plastidi e reticolo endoplasmatico, è in grado di fare la biosintesi dei lipidi che può essere strutturata in tre fasi successive (Ohlrogge e Browse, 1995):

- Metabolismo degli acidi grassi saturi (sintesi *de novo* degli acidi grassi)
- Insaturazione ed Elongazione delle catene carboniose
- Formazione dei gliceridi (*Kennedy pathway*)

2.2 METABOLISMO DEGLI ACIDI GRASSI SATURI

La sintesi degli acidi grassi saturi si svolge partendo da una molecola “primer” su cui vengono condensate ciclicamente molecole a 2 atomi di carbonio fino a formare catene carboniose di lunghezza variabile a seconda della specificità dei complessi enzimatici coinvolti (Lotti, 1985). Gli acidi grassi vegetali più diffusi in natura sono quelli a 16-18 atomi di carbonio che costituiscono circa il 90% dei glicerolipidi strutturali e dei tessuti di riserva (Ohlrogge e Browse, 1995).

2.2.1 Substrati di Partenza per la Sintesi degli Acidi Grassi

Le molecole di partenza per la sintesi degli acidi grassi sono generalmente l'Acetil-CoA con funzione di “primer” avviatore della sintesi e Malonil-CoA derivato dalla carbossilazione dell'Acetil-CoA stesso (Fig. 2.2). L'ipotesi più accreditata è che tutti gli atomi di carbonio costituenti gli acidi grassi derivino dall'Acetil-CoA che si trova nei cloroplasti, ad una concentrazione media di 30-50µM (Post-Beittenmiller et al., 1992). Tale concentrazione, porterebbe l'Acetil-CoA ad esaurirsi in pochi secondi (Ohlrogge e Browse, 1995) mentre è certo che la sua concentrazione nei cloroplasti rimanga costante nel tempo (Post-Beittenmiller et al., 1992), a testimonianza di un'efficiente attività della molecola nel regolare la presenza del composto. Quali siano i processi alla base di tale attività è ancora poco noto.

Studi più o meno recenti hanno dimostrato come plastidi isolati da diversi tessuti abbiano svariati tipi di metabolismo nella sintesi dell'Acetil-CoA e utilizzino substrati diversi a seconda del comparto metabolico (cloroplasto o protoplasti) (Slabas et al., 2001).

La più comune via biosintetica di produzione dell'Acetil-CoA, è risultata quella che porta alla formazione di piruvato dalla glicolisi degli esosi-fosfati per mezzo della piruvato-

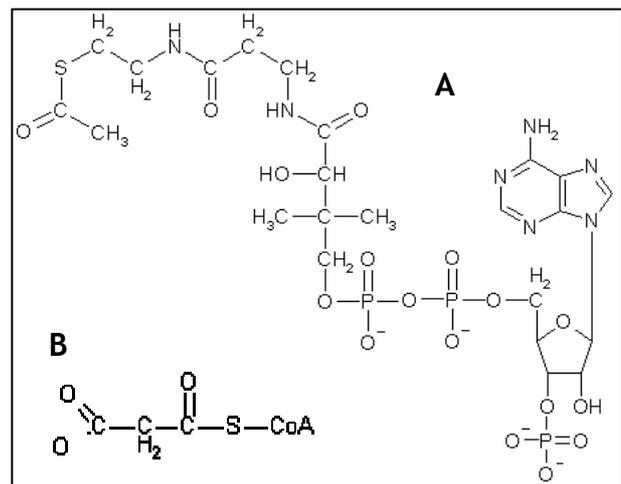


Fig. 2.2: Formula di struttura dell'Acetil-CoA (A) e del Malonil-CoA (B)

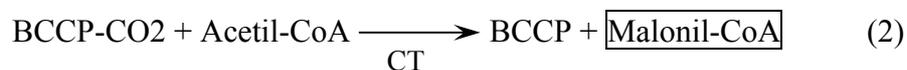
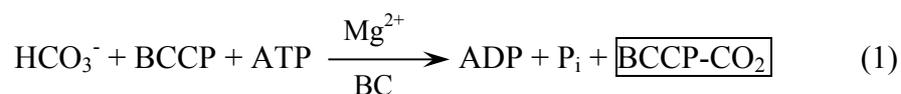
porterebbe a pensare che venga metabolizzato per via interplastidiale ad Acetil-CoA che, successivamente, entra nello stroma per la sintesi degli acidi grassi (Izzo, 2003).

La seconda molecola precursore degli acidi grassi è il Malonil-CoA ottenuto dalla carbossilazione irreversibile dell'Acetil-CoA, catalizzata dall'enzima Acetil-CoA Carbossilasi. Questa reazione è il primo importante passo della biosintesi degli acidi grassi (Nelson e Cox, 2002) ed è fondamentale per la formazione della catena carboniosa. La catena di ogni acido grasso termina infatti con due atomi di C derivanti dall'Acetil-CoA che funge da primer mentre i restanti sono derivati dalla condensazione ciclica di una serie di molecole di Malonil-CoA (Lotti, 1985). In casi particolari, possono essere utilizzati come "primer" anche derivati acilici diversi dall'Acetil-CoA (Harning *et al.*, 1961) per mezzo dei quali vengono ottenuti acidi grassi particolari, talvolta ramificati, quali l'acido ricinoleico in ricino.

2.2.2 L'Enzima Acetil-CoA Carbossilasi

L'Acetil-CoA carbossilasi (ACCase) è un enzima polifunzionale che catalizza la reazione di carbossilazione dell'Acetil-CoA a Malonil-CoA utilizzando la Biotina (vit. H) come trasportatore di carbonio (Alban e Douce, 1998).

La reazione, che rappresenta il primo step della sintesi degli acidi grassi, avviene in due tappe: (1) è la carbossilazione della biotina carrier (BCCP) per mezzo di una biotina-carbossilasi (BC) con dispendio di ATP; (2) è la carbossilazione dell'Acetil-CoA per mezzo di una carbossil-transferasi (CT) (Shmid *et al.*, 2000).



La reazione di carbossilazione è fondamentale nei plastidi perché sono richieste ingenti quantità di Malonil-CoA per sostenere la sintesi degli acidi grassi (un acido grasso a 18 atomi di C richiede 8 molecole di Malonil-CoA). Tuttavia, anche nel citosol è fondamentale la presenza di Malonil-CoA perché rientra in varie reazioni incluso l'allungamento delle catene carboniose degli acidi grassi e la formazione di metaboliti secondari come flavonoidi, e aminoacidi (Harwood, 1988; Ohlrogge e Browse, 1995). Siccome, però, la membrana plastidica non è permeabile al Malonil-CoA, è impossibile

che, nei vegetali, la carbossilazione possa avvenire solo nel plastidio; è quindi probabile che vi sia un secondo enzima ACCase presente nel citoplasma (Harwood, 1991).

Più recenti ricerche hanno infatti dimostrato l'esistenza di due differenti iso-forme di ACCase: una *struttura procariotica*, molto simile a quella dei batteri, costituita da varie

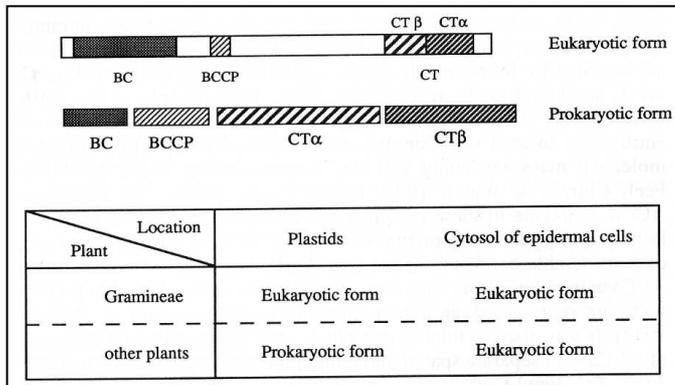


Fig. 2.4: Struttura e compartimentazione delle due forme di ACCase nelle piante. BC: biotina carbossilasi; BCCP: proteina carrier della carbossi- biotina; CT: carbossil transferasi. (Alban e Douce, 1998)

sub-unità indipendenti di piccole dimensioni che insieme costituiscono un complesso di massa maggiore di 600 kDa localizzato nei cloroplasti; una *struttura eucariotica*, simile a quella degli animali, costituita da un solo polipeptide molto grande (>200 kDa) con tre domini funzionali localizzato nel citoplasma (Alban et al., 1994; Konishi e Sasaki, 1994) (Fig 2.4).

La compartimentazione di ACCase sembra dipendere anche dalla specie; infatti, mentre nelle dicotiledoni sono sempre presenti entrambe le strutture, alcune monocotiledoni graminacee presentano solo la forma euca-

riotica sia nei plastidi che nel citoplasma (Egli et al., 1993; Alban et al., 1994; Sasaki et al., 1995; Konishi et al., 1996; Schmid et al., 2000) (Fig. 2.5). La proporzione fra le due iso-forme può dipendere anche dai tessuti; Betty et al. (1992) e Dehaye et al. (1994),

hanno infatti evidenziato come, nel tessuto fogliare di pisello, è più concentrata l'isoforma procariotica rispetto a quella eucariotica mentre il contrario avviene nel seme.

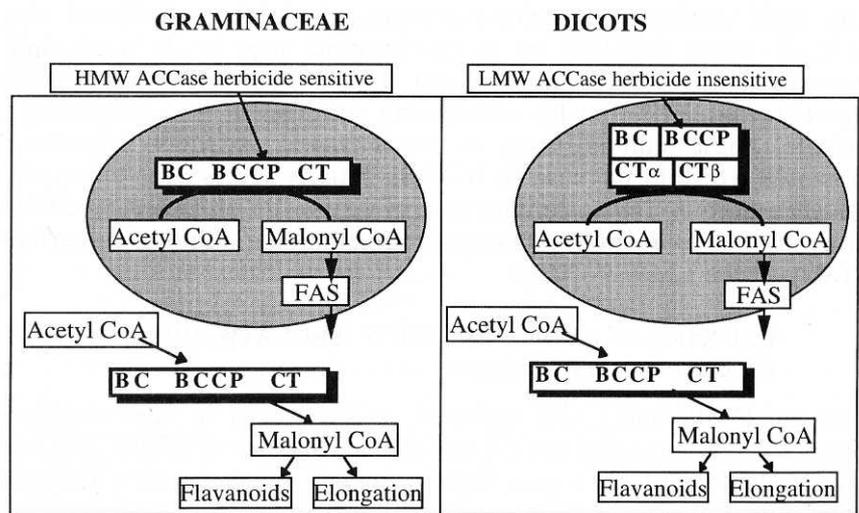


Fig. 2.5: Modello corrente di localizzazione cellulare e possibile funzione delle differenti forme di ACCase. L'area grigia rappresenta il plastidio e l'area bianca il citoplasma. (White et al., 1998)

La presenza di due diverse iso-forme di ACCase in compartimenti cellulari separati sembra avere un'importanza fisiologica notevole nella pianta. Infatti, oltre alla funzione principale di formazione dei precursori della sintesi degli acidi grassi, l'ACCase sembra essere anche impiegata nella regolazione della biosintesi stessa (Harwood, 1997).

Ricerche effettuate su cloroplasti di spinacio e Brassicaceae, hanno dimostrato come l'attività di ACCase sia influenzata dalla presenza di luce (Post-Beittenmiller, 1991; Post-Beittenmiller, 1992; Ohlrogge e Browse, 1995). In particolare, mentre acetato e piruvato vengono trasformati in Acetil-CoA anche al buio, la carbossilazione a Malonil-CoA e di conseguenza la sintesi degli acidi grassi avvengono solo alla luce (Nakamura e Yamada, 1979; Ohlrogge e Jaworski, 1997). Questo sta a significare come l'attività di ACCase sia in qualche modo indotta dalla radiazione luminosa. A conferma di ciò, studi effettuati su cloroplasti di mais, hanno dimostrato che il livello di luminosità modifica il pH e le concentrazioni di Mg, ATP e ADP nello stroma del cloroplasto, che a loro volta si riflettono sull'attività (fino a 6 volte) dell'enzima ACCase (Nikolau e Hawke, 1984; Page et al., 1994).

Oltre alla luce, il funzionamento dell'enzima sembra strettamente legato al livello di presenza dei lipidi. Turnham e Northcote (1983) hanno infatti evidenziato come, in embrioni di brassicaceae, l'attività di ACCase diminuisca proporzionalmente all'aumentare dell'accumulo di lipidi nel seme (Fig. 2.6). Lo stesso effetto è stato confermato in cellule fotosintetiche di tabacco a concentrazioni crescenti di lipidi esogeni (Shintani e Ohlrogge, 1995; Ohlrogge e Browse, 1995).

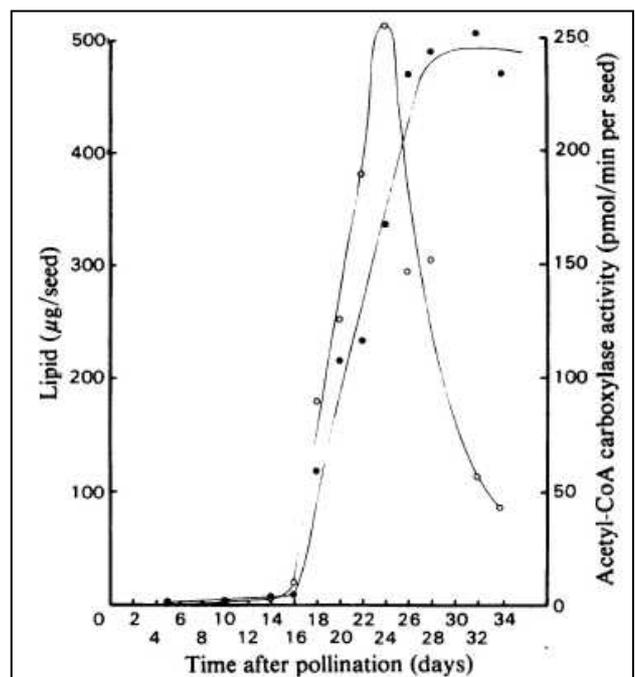


Fig. 2.6: Attività di Acetil-CoA carbossilasi (○) rispetto all'accumulo di lipidi (●) durante la formazione del seme. (Turnham e Northcote, 1983)

In definitiva, l'attività di ACCase sembra essere strettamente controllata dalla radiazione luminosa e da un meccanismo retroattivo (feed-back) che dipende dalla quantità di lipidi accumulati nelle cellule. Il fatto stesso che l'attività di ACCase si svolga prevalentemente nel cloroplasto porta a rafforzare l'ipotesi circa la natura fotobiosintetica del processo di formazione dei lipidi nelle piante (Izzo, 2003).

All'inizio della sintesi *de novo* degli acidi grassi, infatti, i gruppi tiolici devono essere caricati con i gruppi acilici corretti. In questa fase l'Acetil CoA:ACP transcrilasi catalizza la reazione di trasferimento dell'Acetil-CoA al gruppo (-SH) della β -ketoacil ACP sintasi mentre, la Malonil CoA:ACP transcrilasi trasferisce il Malonil-CoA sul gruppo (-SH) dell'ACP (Ohlrogge e Browse, 1995; Nelson e Cox, 2002; Lehninger, 1983; Izzo, 2003).

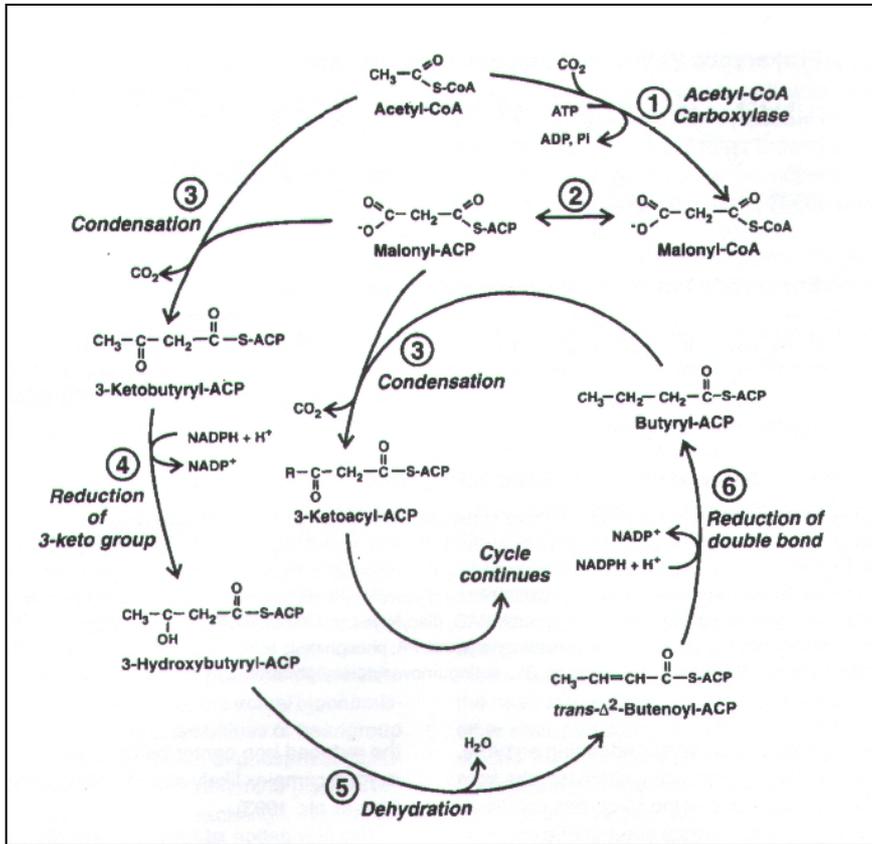


Fig. 2.8: *Biointesi de novo* degli acidi grassi nelle piante. (Taiz e Zieger, 2002; Ohlrogge e Browse, 1995)

In questo modo, l'acetile e il malonile si trovano molto vicini e vengono attivati per iniziare la reazione di allungamento della catena e, in seguito, svolgere un ciclo di reazioni caratterizzato da 4 step principali:

(condensazione, riduzione del gruppo carbossilico, deidratazione e riduzione del doppio legame)

in cui, ad ogni passaggio, le molecole prodotte rimangono sempre legate all'ACP (Taiz e Zieger, 2002; Ohlrogge e Browse, 1995) (Fig. 2.8).

L'ACP, infatti, è una piccola proteina con la funzione di legare, con legame tioestere, il suo gruppo tiolico alle catene aciliche in formazione e fungere da braccio flessibile che mantiene ancorato l'acile e lo veicola in tutti i siti di reazione della FAS (Nelson e Cox, 2002).

Il primo step della sintesi del ciclo termina, quindi, con la fusione di un Acetil-CoA e un Malonil-CoA che vengono fusi a formare Acetoacil-ACP (Fig. 2.8). Tale reazione, catalizzata dalla β -ketoacil ACP sintasi (KAS), libera la molecola di CO₂ precedentemente carbossilata sul Malonil-CoA e dà origine ad una specie chimica molto reattiva

mantenendo il bilancio termodinamico molto favorevole e rigenerando una CO₂ ogni 2 atomi di C aggiunti in catena (Nelson e Cox, 2002; Lehninger, 1983).

L'enzima KAS è responsabile di tutte le reazioni di condensazione. Recentemente ne sono stati scoperti diversi tipi, tutti coinvolti nella formazione delle catene aciliche. In particolare, KAS 1 catalizza le reazioni di formazione della catena fino a 16 atomi di carbonio mentre, KAS 2, è responsabile unicamente dell'allungamento fino a 18 atomi di carbonio (Slabas et al., 2001; Izzo, 2002). In foglie di spinacio e semi di brassica è stato ritrovato un terzo tipo, detto KAS 3, responsabile dell'inizio della catena, poiché catalizza la formazione del primo composto a 4 atomi di C (Jaworski et al., 1989; Ohlrogge e Browse, 1995) (Fig. 2.9). Fra i vari tipi, KAS 3 è quello meno sensibile alle inibizioni esterne tuttavia, la sua funzione è ancora poco chiara soprattutto nei tessuti fogliari (Salbas et al., 2001).

Il secondo step del ciclo è la riduzione del gruppo carbossilico sul C₃ dell'Acetoacil-ACP catalizzata dalla β -ketoacil ACP reductasi. Tale reazione utilizza una NADPH come donatore di elettroni per ottenere D-3-Idrossibutiril-S-ACP (Fig. 2.8).

Nel terzo step, avviene una deidratazione, catalizzata da β -idrossiacil ACP deidratasi in cui la molecola precedentemente sintetizzata viene trasformata in trans- Δ^2 -Butenoil-ACP.

Nel quarto e ultimo step, Enoil ACP reductasi, riduce a Butiril-S-ACP utilizzando nuovamente un NADPH come donatore di elettroni (Lehninger, 1983; Nelson e Cox, 2002; Ohlrogge e Browse, 1995) (Fig. 2.8).

Alla fine il gruppo acilico a 4 atomi di C così formato, viene trasferito dal gruppo (-SH) dell'ACP a quello della KAS dove originariamente era stato caricato l'Acetil-CoA, e il sistema procede con nuovi cicli di reazione fino alla formazione completa della catena acilica.

La lunghezza delle catene prodotte con la sintesi *de novo*, dipende dalla specificità della Enoil-ACP reductasi. Infatti, tale enzima ha anche il compito di distaccare dalla FAS gli acili-ACP completi. In genere, l'enzima dei vegetali è specifico verso il palmitato (C16:0-ACP) ma, esistono anche Enoil-ACP reductasi specifiche verso lo stearato (C18:0-ACP) che, come nel caso delle Brassicaceae, sono molto attive durante tutta la fase di

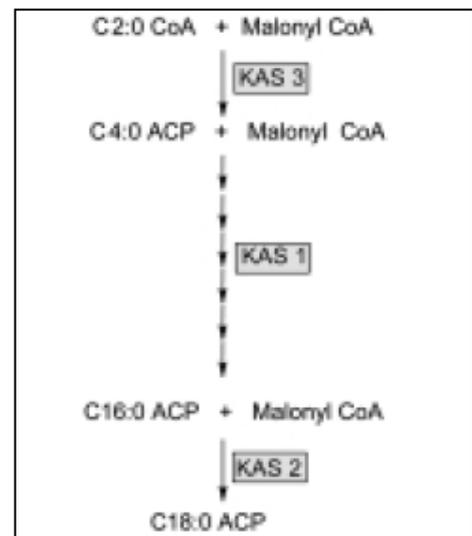


Fig. 2.9: Ruolo dei differenti enzimi KAS nell'ambito della biosintesi degli acidi grassi. (Slabas et al, 2001)

riempimento del seme ed inducono la FAS alla formazione di acidi grassi saturi a 18 atomi di C (Slabas *et al.*, 1987).

Riassumendo, quindi, la sintesi *de novo* di un acido grasso saturo a 16/18 atomi di carbonio, richiede elevate quantità di energia sottoforma di ATP e molecole a forte potere riducente (NADPH) che la pianta può produrre solo nel cloroplasto secondo i seguenti rapporti stechiometrici (Lotti, 1985):



2.3 INSATURAZIONE ED ELONGAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI

Insaturazione ed elongazione, appartengono alla seconda fase di sintesi degli acidi grassi che viene svolta quasi interamente nel reticolo endoplasmatico. Entrambe le reazioni seguono la sintesi *de novo* ed hanno la funzione di modificare le catene aciliche così da ottenere un pool di acidi grassi da destinare alla successiva formazione delle diverse strutture lipidiche.

Una volta che le catene carboniose sature sono state formate, possono seguire due strade: possono essere staccate dall'ACP da una tioesterasi che le rilascia sottoforma di acidi grassi liberi oppure possono essere trasferite dall'ACP al glicerolo 3-fosfato andando a formare i precursori dei lipidi. In entrambi i casi, le molecole possono successivamente uscire per diffusione, dalla membrana del plastidio, ed essere ulteriormente modificate nel reticolo endoplasmatico secondo una serie di reazioni che, partendo da acido oleico, possono insaturare o elongare la catena acilica (Ohlrogge e Browse, 1995; Slabas *et al.*, 2001) (Fig. 2.10).

⁽¹⁾ A-CoA = Acetil CoA; M-CoA = Malonil CoA

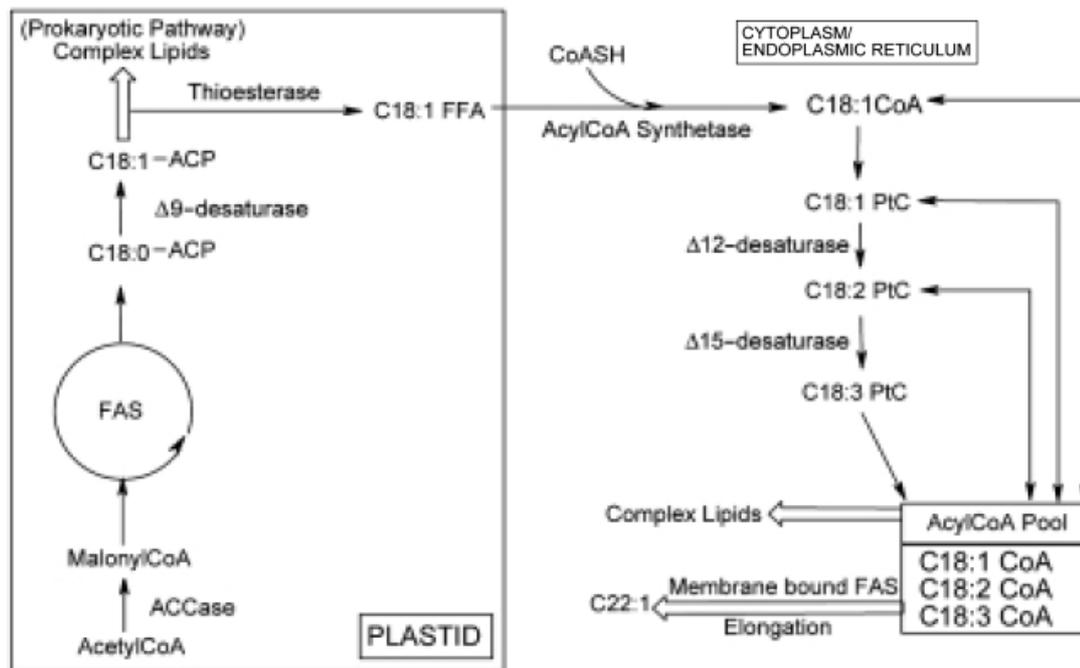


Fig. 2.10: Schema di formazione degli acidi grassi polinsaturi e monoinsaturi a lunga catena. (Slabas et al, 2001)

2.3.1 Insaturazione delle Catene Carboniose

L'insaturazione degli acidi grassi consiste nell'inserimento di uno o più doppi legami, in conformazione *cis*, lungo le catene carboniose. Generalmente gli enzimi responsabili di tale reazione sono delle desaturasi universalmente riconosciute su piante, animali e procarioti (Murphy e Piffanelli, 1998; Voelker e Kinney, 2001). Tali desaturasi sono quasi tutti enzimi di membrana con un ruolo fondamentale nella fisiologia della cellula poiché regolano la fluidità delle pareti e, di conseguenza, l'interscambio fra cellule ed ambiente esterno (Lightner et al., 1994).

In generale le desaturasi sono molto specifiche sia sul substrato d'azione che sulla posizione di inserimento del doppio legame. Agiscono in diverse posizioni delle catene aciliche da C_{12} a C_{24} e, nei vegetali, si possono classificare secondo due tipologie: i) desaturasi di membrana, legate al reticolo endoplasmatico o ai cloroplasti; ii) desaturasi solubili, presenti nello stroma o nel citosol (Murphy e Piffanelli, 1998).

A livello strutturale, entrambi i tipi di desaturasi, sono accoppiati a un donatore di elettroni (rispettivamente ferridossina nei cloroplasti e citocromo b₅ nel reticolo endoplasmatico) il quale, dopo essere stato ridotto da NADPH/NADH ossidoriduttasi, coadiuva la reazione di ossidoriduzione con cui viene creato il doppio legame (Jaworski e Stumpf, 1974; Lindqvist *et al.*, 1996).

Più in generale, per formare il doppio legame, il donatore di elettroni, dopo essere stato ridotto da una reduttasi con l'utilizzo di NADH/NADPH, si ossida nuovamente cedendo due elettroni alla desaturasi. L'enzima, così attivato, induce una nuova ossidoriduzione con cui si crea il doppio legame sulla catena carboniosa dell'acido grasso. In particolare, l'enzima, ossidandosi nuovamente, distacca 2 atomi di idrogeno, nella posizione in cui si forma il doppio legame, e li utilizza per ridurre una molecola di O₂ ad H₂O unitamente ai due elettroni precedentemente acquistati (Fox *et al.*, 1994; Paulsen *et al.*, 1994; Ai *et al.*, 1997; Slabas *et al.*, 2001). (Fig. 2.11).

Le tre desaturasi maggiormente attive nelle piante, agiscono su catene a 18 atomi di carbonio, inserendo doppi legami nelle posizioni

Δ_9 , Δ_{12} e Δ_{15} della catena acilica, per produrre rispettivamente acido oleico (C18:1), acido linoleico (C18:2) e acido linolenico (C18:3) (Izzo, 2003).

Andando in ordine cronologico, la prima delle tre desaturasi coinvolte nella biosintesi degli acidi grassi è la stearoil-ACP Δ_9 desaturasi che è responsabile della formazione dell'Oleil-ACP (C18:1) nel cloroplasto. Tale enzima, a differenza degli altri due, è di tipo solubile, si trova esclusivamente nello stroma ed utilizza direttamente, in maniera molto efficace, lo stearato-ACP, prodotto dalla sintesi *de novo* (Lindqvist *et al.*, 1996).

L'oleil-ACP è un ottimo substrato sia per le aciltransferasi, che possono legarlo al glicerolo 3-fosfato, sia per la oleil tioesterasi dello stroma che distacca l'ACP e libera acido oleico. Nel primo caso, l'acido oleico viene utilizzato direttamente per formare i glicerolipidi precursori dei lipidi di membrana mentre, nel secondo caso, viene trasferito per diffusione

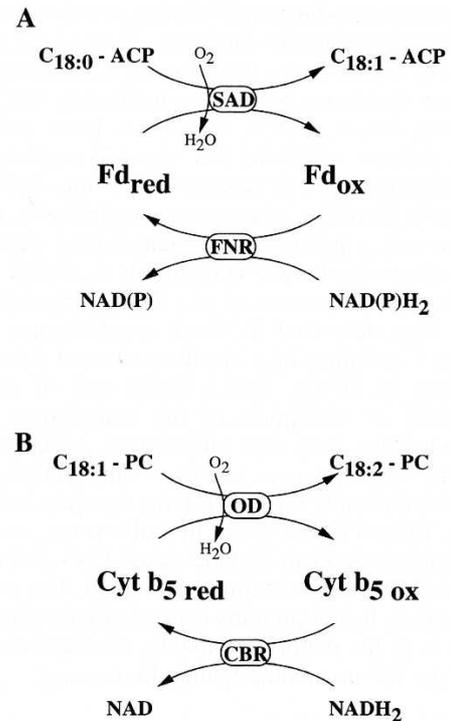


Fig. 2.11: Meccanismo di desaturazione degli acidi grassi. A: Complesso ferridossina (Fd)- Stearoil-ACP Δ_9 desaturasi (SAD). B: Complesso citocromo B5(CytB5)- Δ_{12} Oleato desaturasi (OD). (Murphy e Piffanelli, 1998).

al citosol dove viene esterificato nuovamente, così come tutti gli acidi grassi liberi che fuoriescono dal cloroplasto, da una acil-CoA sintetasi citosolica (Harwood, 1997).

L'oleil-CoA, può essere ulteriormente desaturato, a livello del reticolo endoplasmatico, prima da Δ_{12} desaturasi, a formare linoleil-ACP (C18:2), poi da Δ_{15} desaturasi a formare linolenil-ACP (C18:3) (Aronel *et al.*, 1992). Queste due desaturasi vegetali, pur essendo relativamente aspecifiche per quanto riguarda la lunghezza della catena carboniosa (infatti sono attive anche su altri acili oltre che sull'oleil-CoA), richiedono, come substrato la fosfatidilcolina (PA), un glicolipide complesso derivato da glicerolo 3-fosfato (G3P), costituente principale sia delle membrane che dei corpi lipidici (Harwood, 1997). Per questo motivo l'oleil-CoA, prima di essere desaturato, deve essere trasferito al reticolo endoplasmatico dove viene incorporato prima nel G3P da una acyltransferasi ed in seguito nella fosfatidilcolina (Izzo, 2003).

In generale, nei vegetali, i doppi legami vengono formati lungo la catena sempre nelle stesse posizioni specifiche delle desaturasi coinvolte, indipendentemente dalla lunghezza della catena stessa. I doppi legami degli acidi grassi vegetali polinsaturi, quindi, non sono mai coniugati a parte rare eccezioni tipiche di alcune specie (Izzo, 2003).

Infine, il grado di insaturazione è regolato sia dalla quantità di molecole di ossigeno disciolte nel citosol sia, per quanto riguarda gli acidi grassi polinsaturi, dalla disponibilità di fosfatidilcolina che, in questo senso, acquisisce anche una funzione di regolazione della via biosintetica (Slabas *et al.*, 2001).

2.3.2 Elongazione delle Catene Carboniose

L'elongazione degli acidi grassi è un importante processo biosintetico dei vegetali che porta alla formazione di catene aciliche a 20 atomi di carbonio o superiori. Tali composti, sono sintetizzati sia nelle foglie che nei semi; nel primo caso, vengono utilizzati come precursori di cere, cuticole e membrane e, nel secondo caso, come precursori di sostanze di riserva (Downey e Craig, 1964; Kolattukudy *et al.*, 1976; Lessire *et al.*, 1982; Moreau *et al.*, 1988; Post-Beittenmiller, 1996). In particolare, mentre gli acidi grassi prodotti dai tessuti fogliari sono quasi esclusivamente saturi, quelli sintetizzati nei tessuti di riserva sono esclusivamente monoinsaturi. Tra questi ultimi il più importante è sicuramente l'acido erucico (C22:1), presente in elevate concentrazioni (anche 60%) negli oli di alcune Brassicaceae coltivate per scopi industriali (Harwood, 1997).

Tutti gli acidi grassi a lunga catena sono sintetizzati nel citoplasma da specifici gruppi enzimatici. Tali enzimi utilizzano, come substrati di partenza, i pool di Stearil-CoA (per le cere) o Oleil-CoA (per il C22:1) precedentemente sintetizzati (Cassagne et al., 1994; Weselake et al., 1999).

Analogamente a quanto succede nella sintesi *de novo*, gli enzimi agiscono aggiungendo 2 atomi di carbonio per volta con condensazioni successive di Malonil-CoA prodotto dalla carbossilazione di ACCase eucariotica (von Wettstein-Knowles, 1995; Imai et al., 1995; Bao et al., 1998) (Fig. 2.12).

Tale meccanismo di reazione sembra quello maggiormente utilizzato dalle piante soprattutto per la sintesi dei lipidi nei tessuti di riserva.

Tuttavia, alcuni studi hanno dimostrato la presenza, anche nei semi di Brassicaceae, di due tipi diversi di elongasi (tipo I ATP dipendente e tipo II acil-CoA elongasi) e, sulla base di questo, è stato ipotizzato che il meccanismo di allungamento, in alcuni casi, non sia univoco. In particolare secondo Stymme e Stobbart (1984) e successivamente Hlousek-Rodojic et al., (1995), l'oleil-CoA, prodotto nel cloroplasto, potrebbe venire rapidamente equilibrato con il pool di oleil-CoA del citoplasma per mezzo di un meccanismo di scambio che lo fisserebbe sulla fosfatidilcolina. Si verrebbe così a creare un complesso lipidico che, in presenza di ATP, funge da substrato per l'elongasi tipo I ed in contemporanea verrebbe mantenuta costante la concentrazione del pool citoplasmatico così da permettere una continua produzione di nuovi oleil-CoA (Bao et al., 1998).

Secondo questa ipotesi, quindi, l'oleil-CoA verrebbe suddiviso in due pool e l'elongazione avverrebbe, per azione contemporanea delle elongasi di tipo I e II, sia direttamente sugli acili sia sui complessi lipidici.

Più in generale, le elongasi, effettuano l'allungamento degli acidi grassi seguendo una serie di step successivi ognuno sintetizzato da un enzimi del complesso (Domergue et al., 1998) (Fig. 2.12).

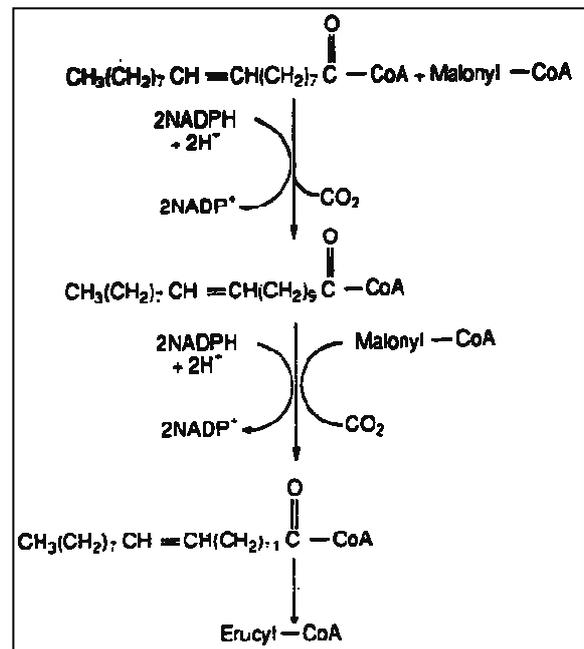


Fig. 2.12: Meccanismo di elongazione di Oleoil-CoA per la formazione di acido erucico. (Harwood, 1997).

Per poter formare una molecola di acido erucico vengono utilizzati 1 Oleoil-CoA, 2 Malonil-CoA e 4 NADPH, nel seguente ordine (Harwood, 1997):

- 1) Condensazione del Malonil-CoA sul C18:1-CoA ad opera della 3-ketoacil-CoA sintasi (KCS) e formazione del 3-ketoacil-CoA.
- 2) Riduzione del 3-ketoacil-CoA ad opera della 3-ketoacil-CoA riduttasi (KCR) che utilizzando NADPH forma l'Idrossiacil-CoA
- 3) Deidratazione dell'Idrossiacil-CoA ad opera dell'Idrossiacil-CoA deidratasi (HCD) e formazione del 2,3 Enoil-CoA.
- 4) Riduzione del 2,3 Enoil-CoA ad opera della 2,3 Enoil-CoA riduttasi che utilizzando NADPH forma il C20:1-CoA ad opera

Infine, ogni volta che si ha un allungamento, il nuovo carbonio viene inserito nel fondo della catena acilica per questo, negli acidi grassi a lunga catena, i doppi legami sono spostati più in alto rispetto agli omologhi a più corta catena (Domergue et al., 1998).

Inoltre, la velocità di elongazione è influenzata dall'attività della ACCase eucariotica che, come nel caso della *sintesi de novo*, è modulata dall'alternanza buio-luce. Tuttavia, mentre nella *sintesi de novo* le catene aciliche venivano formate solo alla luce, gli acidi grassi a lunga catena, seppur con minore intensità, possono essere prodotti anche al buio sfruttando il pool di acido Oleil-CoA sintetizzato in precedenza (Bao *et. al.*, 1998).

Riassumendo, la pianta segue diversi percorsi biosintetici in funzione del tipo di acido grasso (satturo, monoinsatturo e polinsatturo) e della lunghezza della catena carboniosa. Ad esempio, se un acido grasso satturo deriva dalla sola *sintesi de novo*, per un insatturo dovranno intervenire, successivamente, anche una o più desaturasi mentre, per l'allungamento di un acido grasso a lunga catena, dovranno agire le elongasi.

Successivamente alla *sintesi de novo* degli acidi grassi saturi, è stato dimostrato come siano possibili almeno 8 diverse strade metaboliche che portino alla formazione di acidi grassi mono e polinsaturi dei vegetali (Barker et al., 2007) (Fig. 2.13).

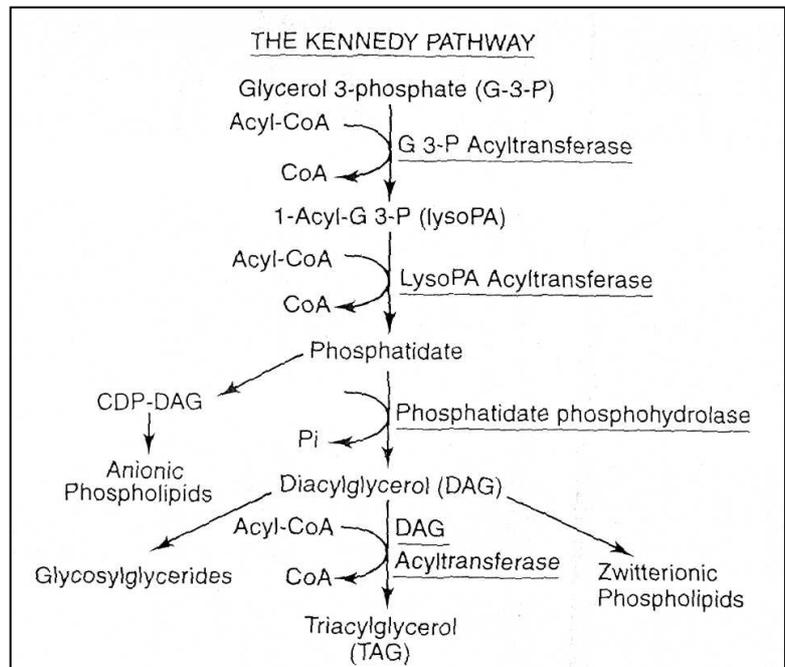
2.4 FORMAZIONE DEI TRIGLICERIDI: KENNEDY PATHWAY

La maggioranza dei lipidi sintetizzati dalle piante, vengono accumulati nell'endosperma del seme, quasi sempre sottoforma di trigliceridi originati dall'esterificazione di una molecola di glicerina con 3 acidi grassi.

Come dimostrato nel 1961 dal biochimico americano Kennedy, i trigliceridi vengono formati, sfruttando gli zuccheri presenti nell'organo che li contiene, per mezzo di una via biosintetica (Kennedy Pathway) formata da una serie di 4 reazioni sequenziali sintetizzate da 4 enzimi presenti sulle membrane del reticolo endoplasmatico (Harwood, 1997). La cosiddetta Kennedy pathway, utilizza come accettore iniziale il Glicerolo 3-Fosfato (G3P) derivato dalla glicolisi e come donatore il pool di acil-CoA formati con la sintesi degli acidi grassi (Slabas *et al.*, 2001).

La formazione dei trigliceridi inizia con l'inserimento di un radicale acilico nella posizione *sn*-1 del G3P a formare acido lisofosfatidico (LPA). Tale reazione è catalizzata da G3P aciltransferasi (GPAT), la prima delle tre aciltransferasi coinvolte. Successivamente, LPA aciltransferasi (LPAT) inserisce un secondo radicale acilico in posizione *sn*-2 e forma acido fosfatidico (PA). A questo punto, per poter permettere la terza acilazione, viene rimosso il gruppo fosfatico dal PA per mezzo di una fosfatasi (PAP) ottenendo così il diacilglicerolo (DAG). Il

DAG è una molecola fondamentale nella Kennedy Pathway poiché può fungere da precursore sia per i fosfolipidi di membrana che per i trigliceridi. In particolare, nel secondo caso, una diacilglicerolo aciltransferasi (DAGAT), inserisce, nella posizione *sn*-3 del DAG, l'ultimo radicale acilico completando il



o trigliceride (Harwood, 1997; Slabas *et al.*, 2001). (Fig. 2.15).

Fig. 2.15: Sintesi dei triacilgliceroli o trigliceridi (TAG): Kennedy pathway. (Harwood, 1997).

Sebbene il procedimento di inserzione dei radicali acilici sul G3P sia sequenziale, spesso non è completamente randomizzato infatti, in certe piante, alcuni acidi grassi possono essere esclusi dalle posizioni *sn*-1 e *sn*-2 a causa della diversa selettività delle aciltransferasi verso gli acidi grassi del pool di Acil-CoA (Bernmerth e Frentzen, 1990; Izzo, 2003). In particolare, mentre GPAT e DAGAT possono acilare sia acidi grassi saturi che insaturi, LPAT, di norma, non utilizza C12:0, C16:0 e C22:1 che quindi non possono essere inseriti in posizione *sn*-2. In alcune specie (es: *Limnanthes*), però, è stata scoperta un'isoforma dell'enzima LPAT capace di inserire C12:0 e C22:1 anche in posizione *sn*-2 (Cao *et al.*, 1990; Knutzon *et al.*, 1995). Non tutte le specie capaci di sintetizzare C22:1, come ad esempio le Brassicaceae, sono provviste di questa LPAT e, per questo motivo, sembrano meno efficienti nell'incorporare tale acido grasso nei trigliceridi.

Per quanto riguarda gli acidi grassi polinsaturi inseriti nei trigliceridi, è ormai assodato che essi derivino dalla fosfatidilcolina (PC) che, oltre ad essere il substrato su cui vengono attivate le desaturasi, funge anche da donatore di acidi grassi polinsaturi nella Kennedy Pathway (Ohlrogge e Browse, 1995; Izzo, 2003).

I trigliceridi sintetizzati, vengono accumulati in centinaia di piccoli corpuscoli specializzati, denominati Sferosomi o Oleosomi, che via via riempiono il lume cellulare senza mai fondersi insieme (Yatsu *et al.*, 1971). La mancanza di processi di fusione ha fatto ipotizzare che gli oleosomi siano circondati da una membrana che, secondo alcuni studi, sarebbe formata da un solo strato fosfolipidico con la superficie apolare rivolta verso l'interno (Salisbury *et al.*, 1984). A conferma di ciò, studi di Napier *et al.* (1996), hanno dimostrato come l'accumulo dei trigliceridi prodotti dalla Kennedy Patway avvenga all'interno dei due monostrati della membrana fosfolipidica del reticolo endoplasmatico creando dapprima una separazione degli strati poi, il distacco completo dell'oleosoma con modalità simili alla gemmazione.

La formazione dei trigliceridi richiede un importante dispendio di ATP (ad esempio nella sola Kennedy Pathway ne sono richieste ulteriori 4 molecole oltre a quelle indispensabili per la formazione degli acidi grassi) ed è stato stimato che impieghi oltre il 50% del flusso di carbonio presente a livello dei semi in una specie oleaginosa (Schwender *et al.* 2004). Con tale dispendio di risorse, però, la pianta riesce ad immagazzinare maggiori quantitativi di energia, carbonio e idrogeno in un minor volume rispetto a glucidi e protidi. Inoltre, essendo fortemente apolari, i trigliceridi vengono stoccati alla massima riduzione e

sottoforma pressoché anidra, per questo, sono facilmente ossidabili ed utilizzabili dalla pianta stessa.

Infine, la Kennedy Patway si può considerare come l'ultimo step della biosintesi dei lipidi nelle piante. Pertanto, l'intero processo di sintesi lipidica si potrebbe complessivamente schematizzare come in figura 2.16.

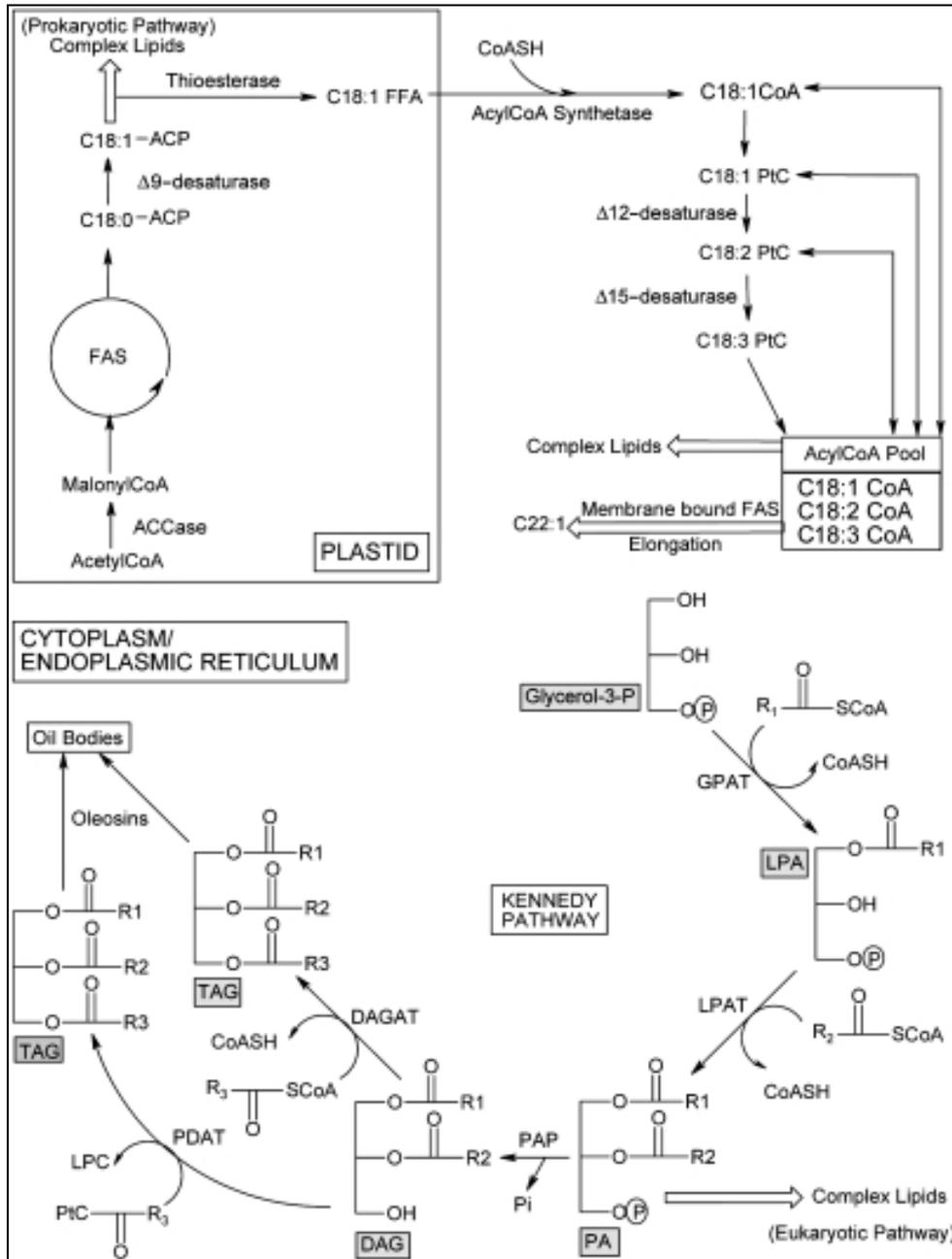


Fig. 2.16: Rappresentazione schematica dell'intero processo di formazione degli acidi grassi. (Slabas et al, 2001).

3. FATTORI INFLUENZANTI LA BIOSINTESI DEI LIPIDI

Le piante superiori, sviluppano meccanismi di adattamento a lungo termine in relazione alle condizioni ambientali medie in cui vivono. Per questo, i cambiamenti repentini di alcuni fattori ambientali possono provocare condizioni di stress e alterazioni nel metabolismo della pianta.

Considerando la complessità della biosintesi dei lipidi, i rapporti enzimatici richiesti e gli organi cellulari coinvolti, risulta chiaro come i fattori ambientali ma anche di natura genetica, agronomica, fisiologica e biochimica possano influire drasticamente sul metabolismo dei lipidi causando effetti sostanziali sulla dinamica delle vie metaboliche.

3.1 FATTORI GENETICI

La famiglia botanica e la specie influiscono fortemente sulla composizione acidica degli oli prodotti. In particolare, ogni specie ha una composizione acidica tipica e, all'interno di essa anche le varietà possono presentare alcune differenze specialmente a carico dell'acido oleico, linoleico ed erucico (Izzo, 2003).

E' chiaro, quindi, come i fattori genetici influiscano sui rapporti enzimatici di elongasi e insaturasi favorendo o meno la formazione dei diversi acidi grassi (Bao *et al.*, 1998). Inoltre, come dimostrato (Cao *et al.*, 1990; Knutzon *et al.*, 1995), anche nella Kennedy Pathway vi è un controllo genetico che influisce sull'efficienza dell'enzima LPAT nella distribuzione degli acidi grassi nei trigliceridi. Ugualmente sono stati identificati alcuni geni responsabili della sintesi e dei rapporti fra gli acidi grassi. Ad esempio, il contenuto di acido oleico ed il contenuto dei suoi derivati monoinsaturi (acido erucico) e polinsaturi (linoleico e linolenico) mantiene tipicamente rapporti più o meno costanti e, agendo su tali geni, è stato possibile cambiare la composizione acidica degli oli di alcune varietà con indubbi vantaggi sul loro impiego (Izzo, 2003). A tale riguardo, due esempi significativi provengono da girasole, in cui è stato possibile inibire le desaturasi aumentando il contenuto di acido oleico fino all'80-90%, e da colza in cui sono state ottenute varietà

cosiddette a “0 erucico”, meno tossiche per l’uomo. Analogamente, sono stati studiati i controlli genetici sulle Δ_{15} desaturasi, ed è emerso che quanto più un acido grasso è insaturo tanto più è difficile ridurne la quantità.

3.2 FATTORI AGRONOMICI E STADIO FENOLOGICO

I fattori produttivi utilizzati durante la pratica agronomica possono influenzare direttamente la crescita della pianta ed indirettamente la sintesi degli oli e la loro composizione. In particolare, il fattore che maggiormente influisce sulla sintesi dei lipidi è la concimazione infatti, la carenza o l’eccesso di alcuni elementi, provoca squilibri nutrizionali inducendo degli stress e, di conseguenza, alterazioni del metabolismo.

Concimazione Azotata, Fosfatica e Potassica e Solfatica

La concimazione azotata, favorendo lo sviluppo vegetativo delle piante, deprime la produzione di semi e quindi quella di olio. Diversi studi effettuati su colza, infatti, hanno dimostrato come all’aumentare della dose azotata diminuisca il contenuto in olio senza modificare apprezzabilmente la composizione acidica (Sedgwick, 1973; Stocker e Carter, 1984; Cheema et al., 2001; Ozer, 2003).

Diversamente da quella azotata, la concimazione fosfatica e potassica, aumentano quasi sempre la produzione di seme e influiscono positivamente sulla resa in olio. (Cheema et al., 2001).

Concimazione Solfatica

La concimazione solfatica assume particolare importanza per le Brassicaceae poiché lo zolfo è un elemento fondamentale per il metabolismo degli oli. Tale elemento può influenzare l’attività di Acetil-CoA carbossilasi ed anche la traslocazione di zuccheri al seme. Mailer (1989) e Ahmad et al.(2000), hanno dimostrato come carenze di S possano ridurre il contenuto di olio nel seme fino al 13% a causa di una sensibile riduzione della concentrazione di Acetil CoA e dell’attività di Acetil-CoA carbossilasi. Contrariamente alla quantità di olio, la composizione acidica viene influenzata solo marginalmente dal livello di concimazione solfatica (Lotti, 1985).

Stadio di Maturazione

Fra tutte le fasi del ciclo fenologico, lo stadio di maturazione è quello che ha i maggiori effetti sugli aspetti quanti-qualitativi della produzione di olio. E' noto, infatti, che la produzione di acidi grassi e trigliceridi avviene nel seme e procede di pari passo alla maturazione. In particolare, man mano che il seme matura, la concentrazione di lipidi aumenta e diminuiscono glucosio, saccarosio e amido (Lotti, 1984) (Fig. 3.1). Va da sé che una raccolta anticipata o uno stress in maturazione potrebbe interrompere la sintesi dell'olio penalizzando resa e qualità di prodotto utile.

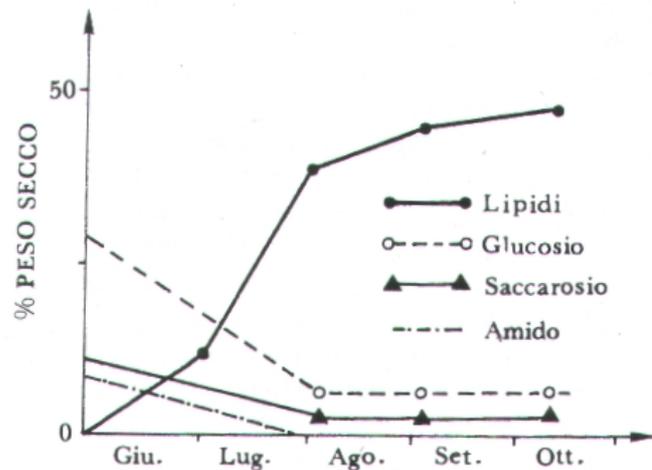


Fig. 3.1: Andamento delle concentrazioni di lipidi e glucidi durante la maturazione di semi di mandorle. (Lotti, 1985)

Inoltre, durante la maturazione non tutti gli acidi grassi, avendo tempi di sintesi diversi, vengono accumulati contemporaneamente. A tale proposito Iori et al. (1990) e Bhardwaj e Hamama (2003) studiando le dinamiche di riempimento del seme hanno dimostrato come in alcune Brassicaceae, l'accumulo di olio avvenga dal 26° al 52° giorno dopo la fioritura mentre quello di acido erucico raggiunga il livello massimo già a 40 giorni dopo la fioritura. Ciò significa che, a seconda del momento di maturazione, vi possano essere differenze significative non solo sulla quantità ma anche sulla qualità degli oli, a causa delle differenze fra le attività degli enzimi coinvolti.

3.3 FATTORI BIOCHIMICI E STRUTTURALI

La sintesi dei lipidi avviene in tutte le cellule dei vegetali coinvolgendo meccanismi di controllo diversi e complessi a seconda del tessuto, degli enzimi e dei compartimenti cellulari coinvolti. Tali meccanismi sono influenzati da una serie di fattori biochimici e strutturali che hanno effetto diretto sulla regolazione delle varie fasi della biosintesi.

Dislocazione nella pianta

In una pianta la sintesi lipidica decorre in modo quantitativamente e qualitativamente differente nei diversi organi e nelle diverse parti di uno stesso frutto o seme. E' noto, infatti, come siano diversi i meccanismi di sintesi fra gli organi ipogei e quelli epigei di una stessa pianta e come, fra quelli epigei, vi siano sostanziali differenze qualitative fra i lipidi sintetizzati dalle foglie e dai semi (Lotti, 1985).

Anche nelle diverse porzioni di uno stesso frutto possono esserci significative differenze qualitative fra i lipidi prodotti. Prendendo in esame il germe e l'endosperma di uno stesso seme, infatti, quasi sempre i lipidi del primo risultano più ricchi di acidi insaturi rispetto a quelli del secondo (Lotti e Galoppini, 1965). Infine, notevoli differenze possono essere osservate anche fra le diverse parti di una stessa infruttescenza (es: calatide o spiga) (Izzo *et al.*, 1974).

Compartimentazione cellulare

Durante la sintesi dei lipidi i compartimenti cellulari maggiormente coinvolti sono cloroplasti o plastidi, citosol e reticolo endoplasmatico. Le varie fasi biosintetiche richiedono un continuo scambio di molecole da un compartimento all'altro poiché non tutti gli organelli sono provvisti di tutti gli enzimi necessari e non tutte le reazioni sono possibili in un unico compartimento (Izzo, 2003). Ne consegue che, la formazione di un lipide è regolata da meccanismi che guidano gli spostamenti dei vari pool molecolari da un compartimento all'altro. Tale regolazione, probabilmente basata su rapporti source/sink diversi tra specie e specie e tra i vari tessuti, di fatto, influisce direttamente sia sulla quantità che sulla qualità dei lipidi sintetizzati (Ohlrogge e Jaworski, 1997).

Concentrazione degli enzimi

La velocità di sintesi di un acido grasso, dipende quasi interamente dalla quantità di enzima attivo e dalla quantità di agenti inibitori o stimolanti presenti nel tessuto (Lotti, 1985). Come si è già visto, in diverse fasi della sintesi lipidica, vi sono alcuni enzimi chiave (es: Acetil-CoA Carbossilasi, desaturasi, elongasi), regolati da una serie di fattori biochimici e ambientali, che vengono attivati in momenti differenti della biosintesi. Per questo motivo, durante il riempimento del seme, si possono verificare repentini cambiamenti della composizione acidica.

L'attività di tali enzimi, quindi, svolge un'azione di regolazione molto importante. Ne è riprova il fatto che diversi erbicidi, inibendo gli stessi enzimi, bloccano la sintesi lipidica e, di conseguenza, creano forti squilibri fisiologici nella pianta.

Concentrazione dei lipidi

Nei tessuti di riserva, la concentrazione dei lipidi in accumulo è stato dimostrato essere un fattore di controllo sull'enzima Acetil-CoA carbossilasi e quindi sull'intera biosintesi. L'enzima, infatti, sembra essere correlato strettamente alla concentrazione dei lipidi per la presenza di un controllo retroattivo a feed-back (Shintani e Ohlrogge, 1995). Tale sistema influisce direttamente sulla potenzialità di accumulo di lipidi delle varie specie determinando la quantità massima di grasso accumulato.

L'accumulo dei lipidi, avvenendo all'interno delle cellule dei tessuti di riserva, è influenzato anche dal volume cellulare in quanto, la sintesi lipidica non potrebbe continuare oltre al suo riempimento.

3.4 FATTORI CLIMATICI E AMBIENTALI

L'influenza del clima sulla composizione acidica delle oleaginose è conosciuta da tempo (Lotti, 1985). Fermo restando l'importanza dei vari fattori ambientali sul metabolismo dei lipidi, peraltro ben documentata (Richards e Thurling, 1978a,b; Champolivier e Merrien, 1996; Harwood *et al.*, 1994 e 1998; Horvath *et al.*, 1991; Boyer e Bowan, 1970; Mohanty e Boyer, 1976; Bray, 1997; Robertson *et al.*, 1995; Williams e Harwood, 1997; Wellburn, 1988; Wolfenden e Wellburn, 1991), verrà di seguito riportato solo l'effetto della luce essendo oggetto di specifiche ricerche nell'ambito del presente dottorato.

Effetto della Luce sul Metabolismo degli Acidi Grassi

Il fatto che la biosintesi *de novo* avvenga nei cloroplasti, indica come sia i meccanismi fotosintetici che la luce siano indispensabili nella formazione degli acidi grassi.

A tale riguardo Smirnov (1960) diede vita ad un'attività pionieristica su cloroplasti isolati di foglie di spinacio che poi fu approfondita da diversi altri studi. Nel complesso tali studi hanno mostrato chiaramente come la luce, in presenza di cofattori (forniti in parte dall'attività fotosintetica), favorisca la rapida formazione degli acidi grassi a lunga catena

e, successivamente, è stato messo anche in evidenza come i lipidi formati al buio differiscano da quelli formati alla luce (Lotti, 1985).

I primi esperimenti mostrarono un effetto stimolante della radiazione con un aumento di oltre 20 volte della quantità di acidi grassi prodotti direttamente collegato ad un incremento dell'attività di Acetil-CoA carbossilasi (Hitchcock e Nichols, 1971). Tale incremento, fu attribuito principalmente alla maggiore disponibilità di NADPH e ATP (Stumpf, 1984) e alle più favorevoli condizioni nello stroma del cloroplasto (pH e concentrazione di Mg) durante la fase luminosa della fotosintesi (Nicolau e Hawke, 1984; Ohlrogge e Browse, 1995). Altre ricerche hanno poi riscontrato un incremento della concentrazione di Malonil-CoA ed una parallela diminuzione di Acetil-CoA a seguito di una stimolazione luminosa del tessuto (Post-Beittenmiller et al., 1991; Post-Beittenmiller et al., 1992), che rafforza l'ipotesi di un effetto diretto e significativo della luce nella regolazione dell'enzima preposto alla carbossilazione dei principali costituenti gli acidi grassi. Pur tuttavia, i meccanismi molecolari alla base di questo fenomeno sono ancora poco conosciuti.

Prendendo ad esempio le Brassicaceae, il sistema siliqua-seme è strutturato in modo che vi sia un'elevata efficienza di sfruttamento della luce a livello dei semi per formare i precursori dei lipidi secondo i meccanismi sopraccitati (Ruuska et al., 2004).

La conformazione delle silique, infatti, permette a una quota di luce di attraversare le sue pareti ed investire il seme (Goffman et al., 2005; Ruuska et al., 2004; Schwender et al., 2004). Il sistema fotosintetico del seme quindi, dovendo captare, attraverso la siliqua, una quantità di luce inferiore a quella totale disponibile, ha un'elevata sensibilità nella captazione come dimostrato da Li et al., 2006. La variazione dell'intensità luminosa ambientale, perciò, ha un'influenza diretta sulla quantità di olio prodotto.

4. FOTOSINTESI, BIOSINTESI DEI LIPIDI E DISCRIMINAZIONE ISOTOPICA DEL CARBONIO

La conversione dei fotosintetati nei tessuti di riserva del seme, sta alla base dei processi di produzione della pianta. La crescita e la sopravvivenza di un vegetale, infatti, dipendono direttamente dalla sua capacità fotosintetica tanto che, secondo stime effettuate, circa il 40% della biomassa di un vegetale è costituita da carbonio fissato durante la fotosintesi (Lambers *et al.*, 2000). Il mantenimento di un'elevata efficienza fotosintetica, anche in condizioni ambientali meno favorevoli è quindi determinante ai fini produttivi, poiché esso sta alla base di ogni processo produttivo della pianta, compresa la biosintesi dei lipidi, possa influenzarne il rendimento.

Nel caso delle oleaginose, inoltre, esistono differenze sostanziali nei meccanismi di sintesi dell'olio a seconda che gli organi di riserva contengano o meno cloroplasti (es.: Brassicaceae o girasole rispettivamente). Infatti, sebbene si sia visto come una parte fondamentale della sintesi dei lipidi avvenga nei plastidi, è chiaro che a seconda della natura di questi ultimi, vi sono relazioni diverse con l'attività fotosintetica.

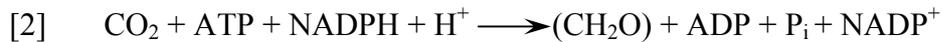
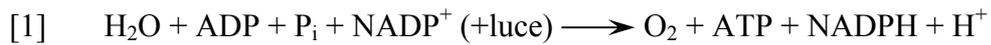
Nel caso di oleaginose con semi sprovvisti di cloroplasti, la sintesi dei lipidi dipende principalmente dalla quantità di fotosintetati che vengono traslocati dalle foglie al seme mentre, molto più interessante è l'interazione fra i due processi in tessuti provvisti di cloroplasti (foglie e semi verdi). In questo caso, diversi studi effettuati su Brassicaceae hanno dimostrato come la sintesi dei lipidi nel seme, oltre ad essere influenzata positivamente dalla luce, proceda in stretta interazione con la fotosintesi creando un sistema di conversione molto efficiente (Singal *et al.*, 1995; King *et al.*, 1997; Ruuska *et al.* 2004; Schwender *et al.*, 2004; Goffman *et al.*, 2005).

Vista la stretta relazione fra fotosintesi e biosintesi dei lipidi si ritiene opportuna una sintetica descrizione del processo fotosintetico mettendo in luce gli aspetti che maggiormente incidono sulla regolazione del metabolismo dei lipidi.

4.1 LA FOTOSINTESI CLOROFILLIANA

4.1.1 Aspetti Generali

La fotosintesi è un processo endoergonico in grado di utilizzare energia luminosa, CO₂ e acqua per produrre composti organici (generalmente carboidrati). Tale processo può essere descritto attraverso due reazioni principali:



Nella prima reazione [1], a seguito della fotolisi dell'H₂O, si ottengono O₂ e protoni che vengono utilizzati nella sintesi chemiosmotica di ATP e NADPH. Tale reazione è luce dipendente ed è per questo che è riconosciuta anche come *Fase Luminosa*. Successivamente ATP e NADPH, prodotti dalla fase luminosa, vengono utilizzati nella seconda reazione, detta *Fase Oscura* [2], per ridurre la CO₂ atmosferica e sintetizzare i carboidrati (CH₂O), prodotto finale della fotosintesi.

Va precisato che la distinzione delle due fasi è una convenzione adottata per semplificare la descrizione del processo fotosintetico che, in realtà, procede simultaneamente all'interno del cloroplasto.

Quest'ultimo è formato da una matrice acquosa (stroma) entro cui sono sospese delle membrane o lamelle fittamente ripiegate (tilacoidi) o impilate (grana) a creare delle porzioni di stroma denominate lume (Fig 4.1). Ogni porzione ha una funzione precisa nella fotosintesi infatti, nello stroma avviene la fase oscura, sulle membrane dei tilacoidi, avviene la fase luminosa ed infine, nel lume avviene la sintesi di ATP.

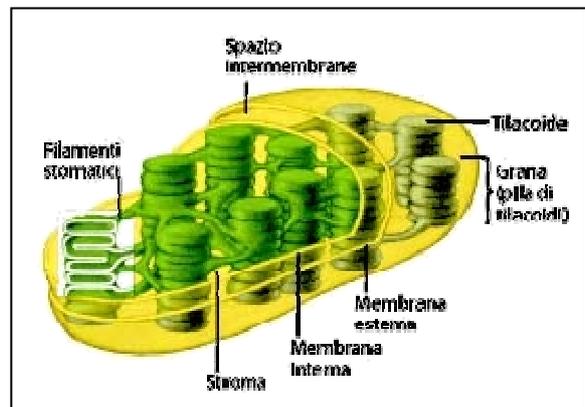


Fig. 4.1: Schema cloroplasto.

Fase Luminosa

Le membrane dei tilacoidi sono caratterizzate dal contenere una serie di pigmenti tra cui il principale e il più abbondante è generalmente la clorofilla.

La clorofilla, nelle piante superiori, è presente in due tipologie, clorofilla *a* (più abbondante) e clorofilla *b*, simili per struttura e caratterizzate da due bande d'assorbimento principali nel rosso e nel violetto. A completare lo spettro di assorbimento della clorofilla, inoltre, vi sono i carotenoidi che, oltre a captare l'energia luminosa a lunghezza d'onda diversa rispetto alle clorofille, hanno anche la funzione di preservarle proteggendole da possibili fotossidazioni distruttive in caso di elevato flusso energetico.

Nelle piante, l'apparato fotosintetico è organizzato in due diversi complessi proteici detti centri di reazione o fotosistemi I e II (PSI e PSII), localizzati nei tilacoidi. Ciascuno è costituito da una serie di pigmenti multimolecolari (complesso antenna o LHC) che captano l'energia luminosa e la convogliano verso il centro di reazione in cui è presente una coppia di molecole di clorofilla (Fig 4.2). La distinzione fra i due tipi di fotosistema è basata sui picchi di assorbimento dei centri di reazione, infatti, nel PSI (P700) l'assorbimento massimo è a 700nm mentre nel PSII (P680) è 680nm. I due fotosistemi operano in contemporanea nello svolgere le reazioni della fase luminosa, sono localizzati in punti diversi delle membrane (nei tilacoidi il P700 mentre nei grana il P680) e sono collegati da specifici trasportatori di elettroni.

La fase luminosa della fotosintesi è caratterizzata, da un trasporto elettronico innescato dall'assorbimento di energia luminosa ad iniziare dal PSII. In particolare, i pigmenti del complesso antenna del P680, assorbendo l'energia luminosa (1 fotone) vengono portati ad uno stato altamente energetico che viene gradatamente trasferito al centro di reazione. A sua volta, il P680 passa ad uno stato energetico superiore, diviene forte riducente ed induce la scissione di due molecole d'H₂O da cui viene liberato O₂ e 4 elettroni che vengono trasferiti sequenzialmente nella catena di trasporto elettronico (Fig. 4.3).

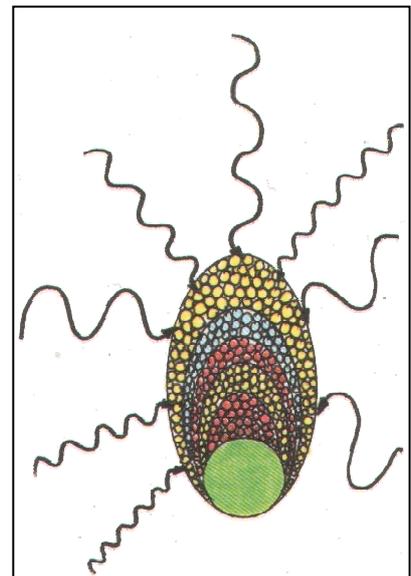


Fig. 4.2: *Rappresentazione schematica della organizzazione di un fotosistema. Le frecce indicano le diverse lunghezze d'onda dell'energia luminosa. In giallo i carotenoidi e le xantofille, in rosso e azzurro le ficobiline, in verde la molecola della clorofilla e centro di reazione. (Forgiarini et al, 1993)*

La catena di trasporto elettronico è costituita da una serie di molecole accettori di protoni che, attraverso una serie di ossidoriduzioni, trasportano gli elettroni immessi dal P680 verso il P700. Il P700, analogamente a quanto succede per il P680, grazie all'assorbimento di un secondo fotone viene portato ad una forma eccitata durante la quale cede gli elettroni

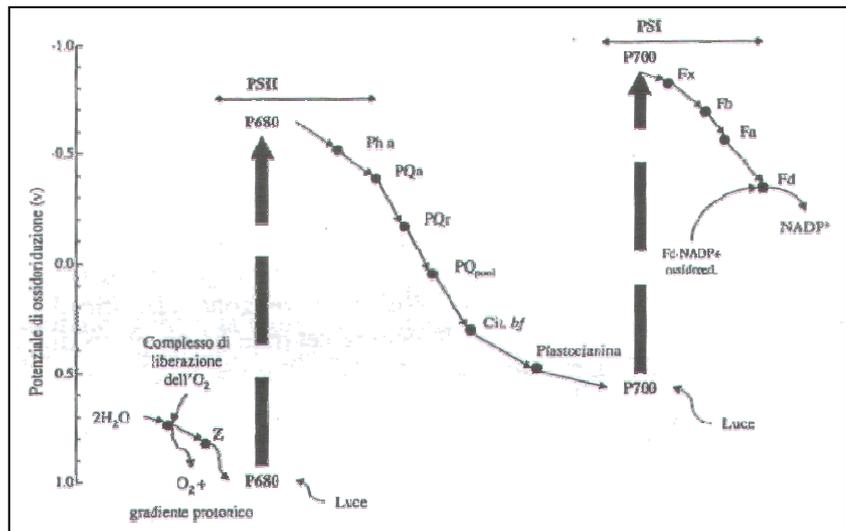


Fig. 4.3: Trasporto elettronico rappresentato classico schema Z. Potenziali di ossidoriduzione dei trasportatori sono approssimativi essendo variabili in base alle differenti condizioni sperimentali.

precedentemente

acquistati ad una seconda serie di accettori che, grazie al loro basso potenziale, sono in grado di ridurre il NADP formando una molecola di NADPH (Fig. 4.3).

Durante il trasporto elettronico, inoltre, cambia la distribuzione dei protoni fra stroma e lume per effetto della scissione dell'H₂O e della formazione del NADPH. Si crea, un gradiente protonico, dallo stroma al lume, controbilanciato da magnesio che, migrando nella direzione opposta, stimola l'attività di ATP sintetasi delle lamelle stromatiche e catalizza la formazione di ATP.

Fase Oscura

Durante la fase oscura della fotosintesi, L'ATP e il NADPH derivanti dalla fase luminosa, vengono utilizzati nel Ciclo di Calvin (o ciclo dei pentosi fosfati) (Fig. 4.4) per sintetizzare i carboidrati.

Il ciclo di Calvin consiste in una serie di reazioni che, partendo dalla organizzazione della CO₂ atmosferica su una molecola di Ribulosio 1,5 bifosfato (RuBP), portano da una parte alla formazione del glucosio e, dall'altra alla rigenerazione del RuBP stesso. Più in generale tutte le reazioni del ciclo di Calvin sono riassumibili con la seguente espressione:



Come si può notare dalla formula, per ottenere una molecola di glucosio, la pianta deve necessariamente organizzare 6 molecole di CO_2 e quindi, completare 6 cicli di Calvin.

La reazione di organizzazione della CO_2 è sintetizzata dalla 1,5 bifosfato carbossilasi/ossigenasi (Rubisco) che, per ogni ciclo di reazione, con la carbossilazione del RuBP forma 2 molecole di

fosfoglicerato (PGA). Ogni 6 molecole di CO_2 organizzate, quindi, vengono prodotti 12 PGA dei quali 1/6 sono destinati alla produzione di una molecola di glucosio mentre i 5/6 sono destinati al completamento del Ciclo di Calvin da cui, con l'utilizzo di ATP e NADPH, si ottiene la rigenerazione di 2 molecole di

L'attività degli enzimi del ciclo di Calvin è regolata da diversi fattori quali la luce, le concentrazioni stromatiche di Mg e il pH. In particolare, l'attività della Rubisco (considerato l'enzima chiave della fase oscura), è trascurabile in assenza di luce, ma aumenta rapidamente dopo pochi minuti di illuminazione (Buchanan, 1980; 1991).

Si considera che la Rubisco sia la proteina più abbondante sulla terra (Ellis, 1979) infatti, le piante ne producono ingenti quantità (normalmente costituisce il 50% delle proteine solubili della foglia) per poter mantenere livelli accettabili di fotosintesi. La Rubisco, è un enzima bifunzionale in grado di catalizzare sia la carbossilazione che l'ossigenazione della RuBP (Lorimer, 1981). Nel primo caso, come si è già visto, si formano 2 molecole di PGA che poi rientrano nel ciclo di Calvin. Dall'ossigenazione, invece, si formano 1 molecola di PGA ed 1 di fosfoglicolato da cui si origina la fotorespirazione (Bowes et al., 1971), un processo parallelo alla fotosintesi svolto in tre differenti compartimenti cellulari: cloroplasti, mitocondri e perossisomi. In sintesi, la fotorespirazione è un processo di tipo respiratorio, dipendente dalla luce che, con vari passaggi, partendo da 2 molecole di fosfoglicolato

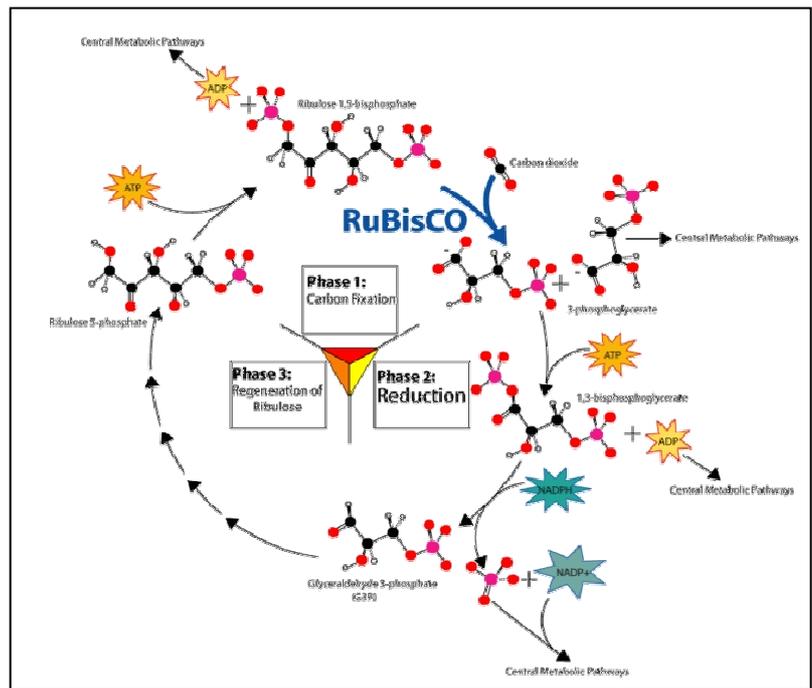


Fig. 4.4 Ciclo di Calvin.
(Fonte http://it.wikipedia.org/wiki/Ciclo_di_Calvin)

forma glicerato e CO₂ con dispendio di ATP. Il glicerato, quindi, può ritornare al cloroplasto, dove viene riconvertito in PGA, oppure può essere utilizzato direttamente, nei tessuti di riserva, per la formazione dei trigliceridi.

La Rubisco, sia che funga da carbossilasi che da ossigenasi, deve essere prima attivata ed è probabile che tale processo sia modulato da un meccanismo a feedback dipendente dalla disponibilità di RuBP (Mate *et al.*, 1996). Altri fattori ambientali come luminosità, concentrazione di CO₂ e disponibilità azotata, sono in grado di influenzare fortemente la quantità e lo stato di attivazione della Rubisco. La luminosità, ad esempio, ne determina l'aumento mentre, la bassa concentrazione intercellulare di CO₂, la inibisce (Von Caemmerer *et al.*, 2000). La ridotta disponibilità azotata, invece, determina una marcata riduzione di Rubisco fogliare e un decremento della clorofilla (Björkman, 1981; Von Caemmerer *et al.*, 1981; Evans, 1983; Makino *et al.*, 1994).

La Rubisco ha un'affinità più elevata per la CO₂ rispetto all'O₂, per questo motivo, la concentrazione intracellulare di CO₂ è di primaria importanza nella modulazione del grado di attivazione dell'enzima. Per effetto della maggiore concentrazione atmosferica di O₂, rispetto a CO₂ il rapporto di carbossilazione/ossigenazione, nella fase oscura, è in genere variabile da 3:1 a 4:1 cioè circa il 25% dell'attività della Rubisco è dedicata alla fotorespirazione (Lorimer, 1981; Dry *et al.*, 1987). Rapporti più svantaggiosi vengono raggiunti in presenza di elevate temperature poiché, in quelle condizioni, l'ossigenazione aumenta più rapidamente della carbossilazione e l'assimilazione diminuisce per effetto della rallentata rigenerazione della RuBP (Björkman, 1981).

4.1.2 Fotosintesi in Risposta alla Luce

Il livello di irradianza è un fattore fondamentale nel determinare l'entità di assimilazione fotosintetica. La bassa intensità luminosa, infatti, limita la fotosintesi creando ripercussioni e squilibri nella crescita della pianta. D'altro canto, anche l'alta intensità luminosa, causa stress all'apparato fotosintetico stesso fino a danneggiarne gravemente il funzionamento.

Più in generale, l'effetto dell'illuminazione crea due tipi di risposta: un risposta statica data dall'acclimatamento verso l'esposizione ad intensità luminose costanti per molto tempo, e una risposta dinamica risultante dall'adattamento istantaneo dell'efficienza di assimilazione a cambiamenti repentini di intensità luminosa. La capacità di adattamento a tali cambiamenti è molto variabile da pianta a pianta e da situazione a situazione. Più in

generale, la capacità di risposta fotosintetica delle diverse specie alle mutevoli condizioni ambientali è spesso un carattere fortemente conservativo (Jones, 1998).

Analizzando il profilo di una stessa pianta, inoltre, possono esserci organi fotosintetizzanti (foglie o silique nel caso delle Brassicaceae) acclimatati a intensità luminose diverse poiché lungo il profilo della pianta l'irradianza decresce in maniera esponenzialmente proporzionale al coefficiente di estinzione (K)² (Monsi e Saeki, 1953). Il coefficiente di estinzione è un indice di efficienza di distribuzione della luce nella pianta ed è correlato alla disposizione degli organi fotosintetizzanti. Per le Brassicaceae oleaginose, in particolare, la distribuzione della luce fra i vari organi fotosintetizzanti è risultata correlata alla produzione finale (Diepenbrock, 2000). Infatti una buona efficienza fogliare è fondamentale, nella fase vegetativa, per sostenere la formazione del maggior numero di silique possibile e, successivamente, una buona efficienza delle silique è fondamentale per sostenere la sintesi dei lipidi (Diepenbrock, 2000).

In ogni caso, la relazione fra assimilazione di CO₂ e illuminazione, in qualunque organo fotosintetico della pianta, si può descrivere attraverso un modello di risposta asintotico riconosciuto come curva luce (Fig. 4.5) (Björkman, 1981). Dallo studio della funzione è possibile ricavare una serie di indicatori dello stato di efficienza fotosintetica (Fig. 4.5).

Il punto d'intersezione della curva con l'asse delle ascisse rappresenta il punto di compensazione (LCP), vale a dire il livello di irradianza per cui la CO₂ emessa e organicata si equivalgono. Il punto di intersezione con l'asse delle ordinate rappresenta invece la respirazione diurna (R_d), ossia il livello di CO₂ emessa in assenza di fotosintesi (irradianza nulla).

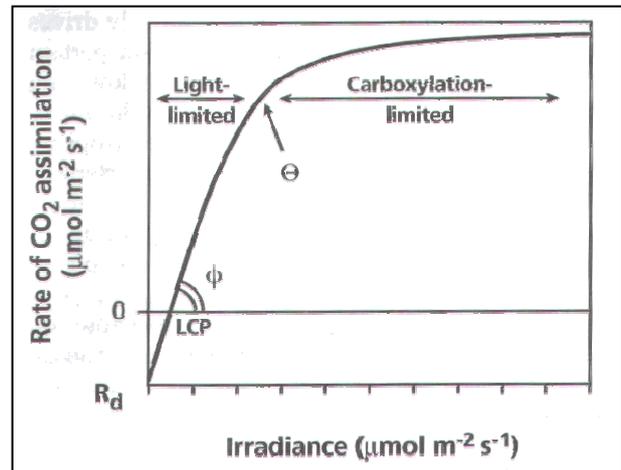


Fig. 4.5 Tipica curva di risposta della fotosintesi rispetto a diversi livelli di irradianza (Lambers et al, 2000)

² La funzione che descrive l'irradianza nella canopia è la seguente: $I = I_0 e^{-KI}$ dove I_0 = irradianza all'apice, K = coefficiente di estinzione ed I = LAI.

Al di sopra di LCP, la risposta fotosintetica ha un andamento inizialmente lineare. In tale tratto (*Light limited*) la luce è il principale fattore limitante la fotosintesi poiché la quantità di trasporto elettronico non riesce a supplire completamente alle richieste del processo fotosintetico. La pendenza di questo primo tratto è nota come efficienza quantica apparente (Φ) e indica l'efficienza di utilizzazione di un fotone di luce. Tipicamente Φ è dell'ordine di 0,06 moli di CO_2 per quanto di luce (Lambers et al., 2000).

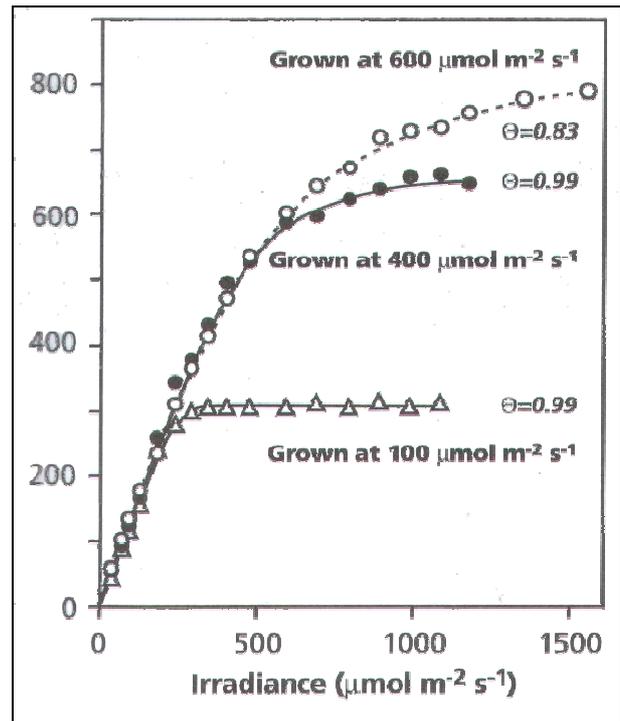


Fig. 4.6 Risposta fotosintetica alla luce: adattamento a diversi livelli di irradianza 100, 400 e 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Lambers et al, 2000)

Aumentando ulteriormente l'irradianza, l'incremento di assimilazione si riduce

via via fino a non aumentare più (fotosintesi a luce saturante). In questa seconda porzione di curva (*carboxylation-limited*) la fotosintesi non è più limitata dal livello di radiazione luminosa ma dall'efficienza di carbossilazione che a sua volta è influenzata dalla combinazione della diffusione della CO_2 nei tessuti fotosintetici e dalla capacità di carbossilazione.

Più in generale la forma della curva, utilizzata correntemente come modello fotosintetico di risposta alla luce, è ben descritta secondo la seguente equazione:

$$A = \frac{\phi \cdot I + A_{\max} - \sqrt{\{(\phi \cdot I + A_{\max})^2 - 4\theta \cdot \phi \cdot I \cdot A_{\max}\}}}{2\phi} - R_d$$

dove A_{\max} è la quota di assimilazione a luce saturante, Φ l'efficienza di conversione del C per quanto di luce, θ il fattore di curvatura (variabile da 0 a 1) e R_d la quota di respirazione. Utilizzando questo modello, per lo studio delle differenze di risposta alla luce fra foglie di una stessa pianta, si può notare come quelle esposte al sole abbiano un A_{\max} superiore e un θ inferiore rispetto a quelle in ombra mentre il Φ rimane pressoché analogo per entrambe (Fig. 4.6).

Alla stessa maniera è possibile studiare le differenze fra specie diversamente adattate alla luce. In particolare, piante adattate a basse intensità luminose, avranno tipicamente A_{\max}

inferiore e un tasso di fotorespirazione minore rispetto a quelle adattate ad alte intensità (Long, 1998) (Fig. 4.7).

Anche la struttura anatomica dell'apparato fotosintetico cambia in relazione all'intensità luminosa, infatti, per aumentare l' A_{max} con elevata disponibilità di luce, le piante sono stimolate a produrre organi fotosintetici con tessuti più ispessiti sebbene non aumenti la concentrazione di clorofilla (Hanson, 1917).

A livello biochimico, infine, l'apparato fotosintetico acclimatato a basse intensità luminose, ha una grande capacità di catturare luce e un basso rapporto clorofilla a/clorofilla b (Evans, 1988). Risulta perciò, aumentata la capacità fotosintetica a bassi livelli di intensità luminosa e si diminuisce la quantità di fotorespirazione abbassando il LCP.

L'apparato fotosintetico acclimatato ad alte intensità luminose, invece, è caratterizzato da una grande concentrazione di enzimi del ciclo di Calvin e un maggior numero di cloroplasti e quindi, complessivamente, una maggiore capacità fotosintetica.

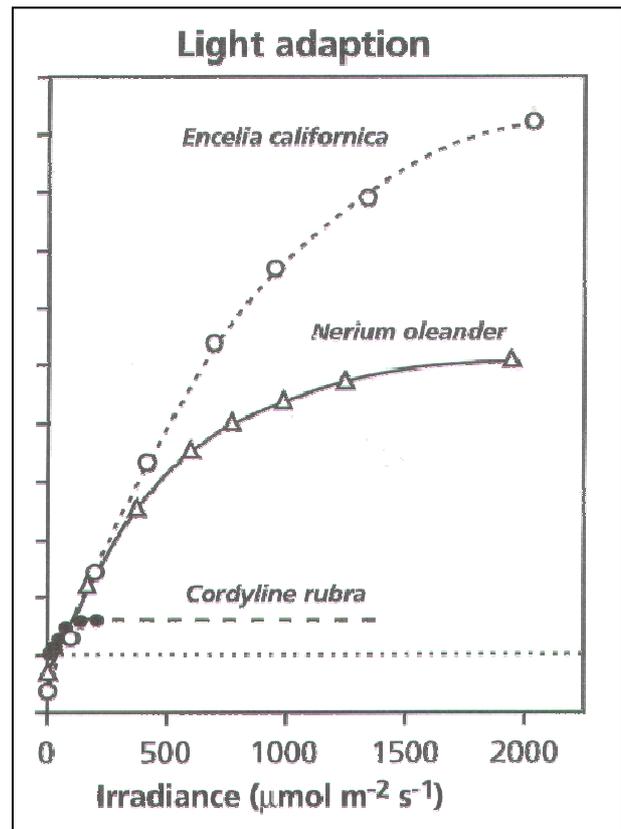


Fig. 4.7 Risposta fotosintetica in funzione dell'irradianza: adattamento alla luce di diverse specie (Lambers et al, 2000)

4.1.3 Fotosintesi in Risposta alla CO_2 Intercellulare

Il livello di assimilazione di C della fotosintesi, è determinato dal bilancio fra l'apporto di CO_2 nella camera sottostomatica e la quantità di CO_2 domandata dal processo fotosintetico. Tale bilancio corrisponde all'attività della Rubisco ed è influenzato principalmente dalla capacità di diffusione dei gas nello stroma.

Prima di essere organicata dalla Rubisco la CO_2 atmosferica deve, infatti, attraversare gli stomi, gli spazi intercellulari, le pareti cellulari, il plasmalemma e lo stroma del cloroplasto. Ad ogni passaggio, vengono incontrate una serie di resistenze (principalmente resistenza stomatica e resistenza del mesofillo), che riducono via via la concentrazione di

CO₂ e vengono superate grazie ad un gradiente di concentrazione che è in rapporto al consumo di CO₂ da parte della fotosintesi (Nobel *et al.*, 1985) (Fig 4.8).

Il modello più diffuso nel descrivere l'andamento della fotosintesi al variare del contenuto intracellulare di CO₂ è quello di Farquhar *et al.* (1980) e successivamente modificato da Farquhar e Von Caemmerer (1982). Tale modello prevede che l'assimilazione venga modificata in relazione al contenuto

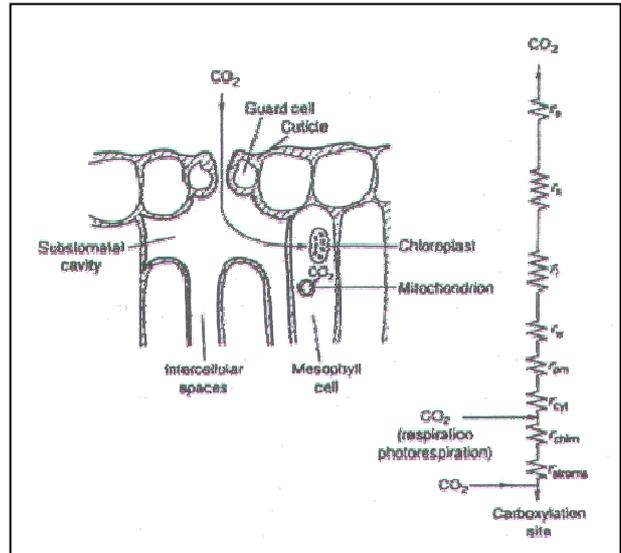


Fig. 4.8 Resistenze durante il percorso di anidride carbonica dall'atmosfera al sito di carbossilazione (Nobel *et al.*, 1985)

intercellulare di CO₂ secondo l'andamento schematizzato in figura 4.9.

Il modello è composto da due funzioni di minimo, in relazione fra loro, che si incrociano nel punto di massima attività della Rubisco in cui l'enzima non risente di limitazioni.

La prima reazione, conosciuta come *Supply Function*, è

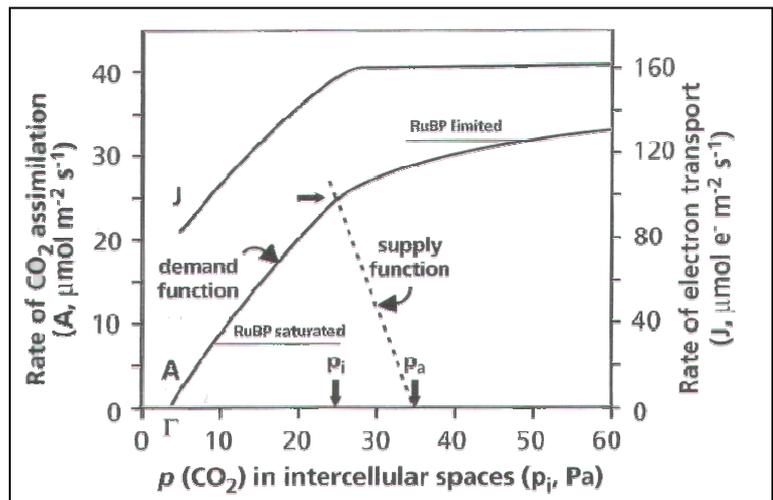


Fig. 4.9 Curva di risposta della fotosintesi in funzione della concentrazione di CO₂. A = curva di risposta alla CO₂; J = flusso di trasporto elettronico; Γ = punto di compensazione; p_i = pressione di CO₂ intracellulare; p_a = pressione di CO₂ atmosferica (Lambers *et al.*, 2000)

originata dal differenziale fra la concentrazione di CO₂ atmosferica (Pa) e la concentrazione di CO₂ intracellulare (P_i) ed è caratterizzata da una pendenza direttamente proporzionale all'entità della resistenza alla diffusione della CO₂ all'interno dei tessuti. La seconda, *Demand Function* è originata dalla quantità di assimilazione di CO₂, in funzione della concentrazione di CO₂ intracellulare.

Più in particolare, a partire dal punto di compensazione "T", in cui la CO₂ prodotta dalla respirazione è compensata da quella fissata dalla fotosintesi, la *Demand Function* può essere divisa in due regioni distinte dal punto di massima attività della Rubisco.

Nella prima regione, denominata *RuBP saturated region*, i bassi valori di Pi limitano l'attività della Rubisco che risulta saturata dal RuBP sintetizzato dal Ciclo di Calvin. In questa fase, gli incrementi relativi di assimilazione sono elevati e, come già visto in precedenza, anche la quantità di trasporto elettronico (J) incrementa perché via via aumenta l'attività del ciclo di Calvin e quindi, vengono richieste sempre maggiori quantità di ATP e NADPH dalla reazione luminosa.

Nella seconda regione, *RuBP limited region*, ad elevati valori di Pi, l'attività della Rubisco è limitata dal Ciclo di Calvin che non riesce più a supplire alle richieste di RuBP poiché essendo stato raggiunto il massimo l'efficienza di trasporto elettronico anche la produzione di RuBP non può incrementare. In questa situazione, sebbene non vi sia aumento di trasporto elettronico, si ha ugualmente un piccolo incremento relativo di CO₂ assimilata siccome Rubisco sopprime la reazione di ossigenazione a favore della carbossilazione.

In sintesi, l'efficienza di assimilazione fotosintetica, a basse concentrazioni di CO₂ dipende dalla quantità di Rubisco attiva, viceversa, ad alte concentrazioni di CO₂, dipende sia dall'efficienza del ciclo di Calvin nel rigenerare l'accettore primario di CO₂ (RuBP) che dalla quantità di trasporto elettronico.

4.1.4 Fotosintesi in Foglie, Silique e Semi

Le Brassicaceae, così come tutte le specie oleaginose a seme verde, sono provviste di un apparato fotosintetico abbastanza complesso. Infatti, oltre alle foglie anche silique e semi sono fotosinteticamente attivi e il loro apporto fotosintetico contribuisce in maniera diversificata e specifica alla sintesi dei lipidi. E' chiaro comunque come, durante la vita della pianta, la sequenza di sviluppo dell'attività fotosintetica proceda dalle foglie (periodo vegetativo) alle silique e, infine, al seme (periodo riproduttivo) (Medham e Salisbury, 1995).

Contributo della fotosintesi fogliare alla formazione dei lipidi

L'apparato fogliare delle Brassicaceae provvede principalmente alla sintesi degli assimilati per la crescita della pianta approssimativamente fino all'inizio del periodo riproduttivo. Dall'emergenza fino alla formazione dei fiori, pressoché la totalità della funzione fotosintetica è sostenuta dalle foglie. I massimi incrementi di crescita della pianta, infatti, corrispondono al periodo compreso fra la ripresa vegetativa post-invernale e la fioritura (140 e 170 giorni dall'emergenza) proprio quando l'apparato fogliare raggiunge il suo

massimo sviluppo ed è massima l'intercettazione luminosa della pianta (Diepenbrock, 2000).

Diversamente, durante la fioritura, il rapido sviluppo dei fiori e la ramificazione dell'apice vegetativo, limitano di circa il 40% la fotosintesi fogliare (Robelin e Triboi, 1983) poiché, una volta che si ha completa copertura florale, la radiazione incidente viene riflessa o assorbita in gran parte dai fiori (Bilsborrow e Norton, 1984; Yates e Steven, 1987; Leach et al., 1989). In questa situazione, le foglie riducono la loro capacità fotosintetica e, in contemporanea, accelerano il processo di senescenza con perdita della quasi totalità della loro funzione dopo circa 30-40 giorni dalla fioritura (Gabrielle et al., 1998; Gabrielle 1998b; King et al., 1997) (Fig. 4.10).

Il periodo immediatamente successivo alla fioritura è il più limitante la potenzialità produttiva della pianta poiché, con la riduzione sempre maggiore della fotosintesi fogliare e il contemporaneo incremento della richiesta di fotosintetati dai semi in formazione, si crea una forte competizione per gli assimilati fra gli organi della pianta, responsabile della perdita di fiori, silique e semi (Keiller e Morgan, 1988; Diepenbrock e Grosse, 1995).

A conferma di ciò, in studi successivi di Habekotté (1997), è stato dimostrato come l'allungamento della durata della funzionalità delle foglie fosse importante per l'ottenimento di maggiori produzioni

di seme. Tale risultato conferma l'importanza della quantità di fotosintesi fogliare nel passaggio alla fase riproduttiva.

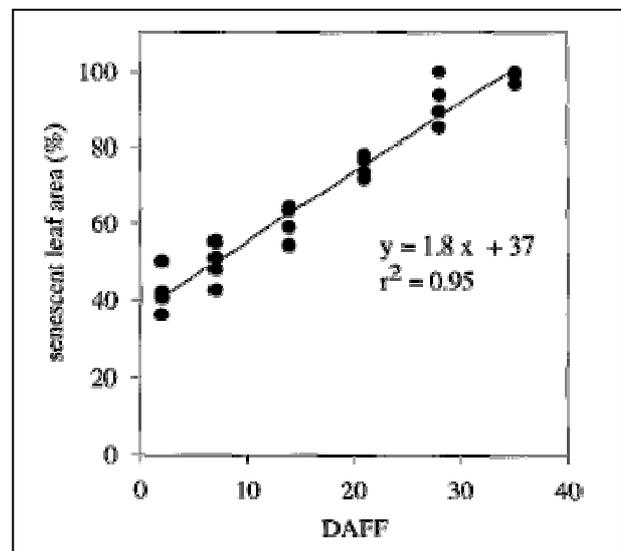


Fig. 4.10 Andamento della senescenza fogliare in funzione dei giorni trascorsi dalla fioritura (King et al., 1998)

Contributo della fotosintesi della silique alla formazione dei lipidi

La funzione principale dell'attività fotosintetica della siliqua è quella di provvedere al rifornimento di assimilati ai semi in riempimento. La crescita dei semi, infatti, induce l'espansione delle silique con conseguente aumento della superficie utile fotosintetizzante che, a completo sviluppo, si stima essere simile o superiore a quello delle foglie (Singal et al., 1995; King et al., 1997; Diepenbrock, 2000) (Fig. 4.11).

L'attività fotosintetica delle silique è molto importante anche perchè supplisce gradualmente alla progressiva perdita della funzionalità della foglia fino a sostituirla totalmente (Allen *et al.*, 1971; Sheoran *et al.*, 1991).

Nonostante la siliqua riesca a raggiungere un'efficienza fotosintetica pari o superiore a quella della foglia (King *et al.*, 1998) sussistono differenze sostanziali nella

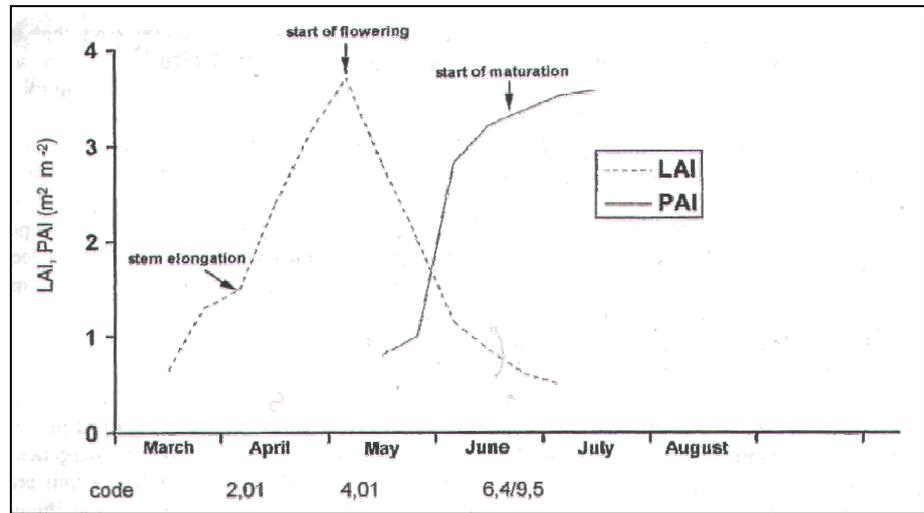


Fig. 4.11 Andamento dell'indice di area fogliare (LAI) e dell'indice di area delle silique (PAI) durante il ciclo vegetativo delle Brassicaceae (Diepenbrock, 2000)

La siliqua, infatti, contiene una quantità di pigmenti clorofilliani inferiore del 75-80% per unità di superficie rispetto alla foglia pur avendo quantità di Rubisco attiva di uguale livello (King *et al.*, 1998). Queste differenze sono interessanti poiché, la bassa concentrazione di pigmenti nella siliqua è indice di un minore tasso di fotosintesi per unità di superficie rispetto alla foglia e, l'elevata quantità di Rubisco, sembra correlata, al pari di quanto succede nel pisello, ad un'attività di rifissazione della CO₂ prodotta dalla respirazione dei semi, probabilmente del tutto analoga a quella dei semi stessi (King *et al.*, 1998; Goffman *et al.*, 2005). Questo spiega il motivo per cui l'efficienza fotosintetica della siliqua possa essere pari o superiore a quello della foglia pur avendo un tasso fotosintetico generalmente inferiore.

Nelle Brassicaceae l'attività fotosintetica della siliqua può essere suddivisa in 3 fasi principali: una prima fase a fotosintesi crescente (fino a 20 giorni dalla fioritura); una seconda fase, da 20 a 40 giorni dalla fioritura, a fotosintesi costante; una terza fase a fotosintesi decrescente fino a maturazione fisiologica (Singal *et al.*, 1995). In particolare, fra le tre fasi, quella compresa tra 14 e 35 giorni dopo la fioritura è considerato il più importante siccome, in questo periodo, tutti i fotosintetati prodotti dalle silique vengono rapidamente traslocati al seme e si raggiunge il massimo tasso di accumulo di olio (Singal *et al.*, 1995; King *et al.*, 1997).

Contributo della fotosintesi dei semi alla formazione dei lipidi

I semi delle Brassicaceae non sono semplici organi di stoccaggio che si riempiono passivamente di fotosintetati provenienti da altri organi, ma sintetizzano autonomamente i lipidi sfruttando la loro capacità fotosintetica per aumentare l'efficienza del processo (Egli, 1998). La fotosintesi del seme può interagire con la sintesi dei lipidi in tre diverse maniere: sintetizzando, con le reazioni alla luce, NADPH e ATP utilizzati per sostenere le reazioni della FAS; producendo O₂ con la fotolisi dell'H₂O per prevenire l'anossia all'interno del seme (Rolletschek et al., 2002); rifissando la CO₂ prodotta dai processi di respirazione, fotorespirazione e biosintesi dei lipidi (Ruuska et al., 2004).

Nei semi verdi, infatti, il substrato iniziale da cui vengono formati i precursori della sintesi degli oli sono gli zuccheri traslocati da silique e foglie che, attraverso la glicolisi, vengono trasformati prima in piruvato poi in Acetil-CoA (Kang e Rawsthorne, 1996). Tale reazione produce una quota di CO₂ pari al 33% di quella che la pianta aveva organizzato in precedenza che risulterebbe presto limitante l'efficienza di formazione di nuovo Acetil-CoA se non venisse rifissata da Rubisco e PEP nel processo di fotosintesi (King et al., 1998; Singal et al., 1995; Ruuska et al., 2004; Schwender et al., 2004; Goffman et al., 2005). A dimostrazione che la sintesi degli oli e il meccanismo di rifissazione della CO₂ sono direttamente correlati, Goffman et al. (2005), hanno dimostrato come, aumentando costantemente l'intensità luminosa (0 - 50 - 150 μmol m⁻² s⁻¹), aumenti l'accumulo di olio e diminuisca la concentrazione di CO₂. Per contro, è stato stimato che nella cavità del seme la quantità di luce filtrata attraverso la siliqua è pari al 20% di quella incidente (Ruuska, 2004) e, nonostante che il fotosistema dei semi sia adattato a utilizzare basse intensità luminose, la quantità di trasporto elettronico possibile in queste condizioni, non è tale da poter sostenere l'elevata attività di rifissazione della Rubisco solamente con il ciclo di Calvin. A proposito di ciò, Schwender et al. (2004), hanno dimostrato che esiste una via metabolica alternativa la quale, sfruttando la conversione non ossidativa degli esosi fosfati, produce ulteriore RuBP che poi la Rubisco carbossila a fosfoglicerato, utile alla sintesi dei lipidi (Rubisco Bypass). Tale via metabolica si avvantaggia dell'elevata concentrazione di CO₂ nell'ambiente che porta la Rubisco ad agire solamente come carbossilasi (Goffman et al., 2004).

E' stato stimato che, grazie alla Rubisco Bypass, dalla conversione dei carboidrati si ottiene circa il 20% in più di Acetil-CoA, in aggiunta a quella derivata da glicolisi, con una diminuzione della perdita di CO₂ di circa 40% (Schwender et al., 2004) anche in condizioni di scarsa illuminazione. Inoltre, già ad un'intensità luminosa di 150 μmol m⁻² s⁻¹

all'interno della cavità del seme, l'efficienza di conversione del C aumenti ulteriormente a causa di una sostanziale fissazione di CO₂ esterna tipica del Ciclo di Calvin (Goffman, 2005). Questo significa che, aumentando l'illuminazione, la produzione di cofattori da parte dei fotosistemi è sufficiente per attivare anche il Ciclo di Calvin che, fissando CO₂ esterna, contribuisce ad incrementare l'efficienza di conversione del carbonio fino a livelli prossimi al 100% (Goffman, 2005).

4.2 DISCRIMINAZIONE ISOTOPICA DEL CARBONIO

4.2.1 Aspetti Generali e Applicazioni

Il carbonio è presente in natura in due forme isotopiche stabili, ¹²C e ¹³C, tra le quali la prima è nettamente più abbondante (circa 98,9% vs 1,1%). Entrambi gli isotopi sono irregolarmente distribuiti fra e all'interno dei composti naturali e la loro concentrazione (abbondanza) può rivelare informazioni sui processi chimici, fisici e metabolici coinvolti nell'organizzazione e trasformazione del carbonio.

In biologia vegetale si fa riferimento all' "abbondanza isotopica" intesa come rapporto fra le concentrazioni di ¹³C e ¹²C. Nei tessuti delle piante tale rapporto è inferiore a quello della CO₂ atmosferica ed indica un processo di discriminazione isotopica durante l'assimilazione del carbonio.

La composizione isotopica delle piante ($\delta^{13}\text{C}$), intesa come deviazione dall'unità del rapporto fra l'abbondanza isotopica del campione (R_p) e quella dello standard (R_s) Vienna PDB, assume valori generalmente negativi poiché le reazioni di assimilazione creano un impoverimento di ¹³C.

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{R_p}{R_s} - 1$$

Tale impoverimento è causato dalla variazione delle abbondanze isotopiche dei reagenti e dei prodotti di reazione coinvolti nelle reazioni di assimilazione che discriminano nei confronti dell'isotopo pesante.

Il rapporto fra queste variazioni è definito come effetto isotopico (α) e, per i vegetali, può essere inteso come rapporto fra le abbondanze isotopiche di aria (R_a) e pianta (R_p).

$$\alpha = \frac{R_a}{R_p}$$

Per convenzione numerica, Farquhar e Richards (1984) anziché l'effetto isotopico introdussero il concetto di discriminazione isotopica del carbonio (Δ) intesa come deviazione dall'unità dell'effetto isotopico.

$$\Delta = \alpha - 1 = \frac{R_a}{R_p} - 1$$

Il vantaggio di utilizzare Δ rispetto a δ è che il primo risulta indipendente dallo standard usato per le misure di R_p ed R_a . Questo risulta molto importante quando si interpretano i valori a livello di canopy poiché lungo il profilo della pianta vi è un gradiente suolo/atmosfera di composizione isotopica dovuto all'attività fotosintetica, alla respirazione e alla decomposizione del materiale organico del suolo (Medina *et al.* 1986). La discriminazione isotopica è un valore adimensionale positivo e viene convenzionalmente espresso in "per mille". Se calcolato in funzione di δ_p e δ_a (p = pianta e a = aria rispettivamente), può essere rappresentato come:

$$\Delta(\text{‰}) = \frac{\delta_a - \delta_p}{1 + \delta_p} \cdot 1000$$

Tale equazione rappresenta la forma generalmente adottata per il calcolo della discriminazione isotopica in biologia vegetale (Farquhar e Richards, 1984) assumendo, come descritto da Hubick *et al.* (1986), un valore di δ_a pari a -0,008.

La discriminazione isotopica nelle piante C_3 , come le Brassicacee, viene determinata da diversi processi di frazionamento che vanno dalla semplice diffusione della CO_2 gassosa dell'atmosfera al sito di carbossilazione, agli effetti enzimatici, alla dissoluzione e diffusione in fase liquida della CO_2 (O'Leary, 1993).

Al fine di correlare la discriminazione isotopica con la concentrazione di CO_2 al sito di carbossilazione, sono stati proposti alcuni modelli tra cui il più utilizzato è quello di Farquhar *et al.* (1982). Nella forma più completa il modello tiene conto di tutti i possibili effetti isotopici suddetti durante il processo di assimilazione. Molto spesso, però, si tende a semplificarlo assumendo che la diminuzione di CO_2 dagli stomi al sito di carbossilazione

(conduttanza del mesofillo) sia nulla e che l'incidenza di respirazione e fotorespirazione siano trascurabili. Pertanto Δ si può rappresentare in forma semplificata come:

$$\Delta = a + (b - a) \frac{p_i}{p_a}$$

dove a e b sono i frazionamenti dovuti rispettivamente a diffusione e carbossilazione mentre, p_a e p_i le pressioni parziali di CO_2 in aria e nel sito di carbossilazione.

Questo significa come Δ sia fortemente influenzato dalla diffusione quando il rapporto p_i/p_a è piccolo mentre, al crescere della concentrazione di CO_2 intercellulare, è l'effetto discriminante dell'enzima carbossilante ad assumere maggiore importanza. Va sottolineato come p_i/p_a dipenda dall'efficienza fotosintetica ma anche dalla conduttanza stomatica per questo, un basso valore di p_i/p_a può essere determinato da uno o da entrambi i fattori.

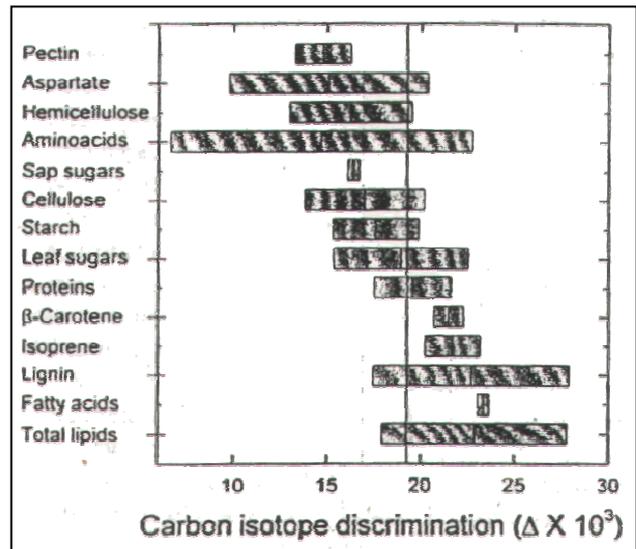


Fig. 4.12 Range di variazione di discriminazione isotopica riportata in bibliografia per i principali metabolici di specie C-3 (Brugnoli e Farquhar, 2000)

La discriminazione isotopica varia anche in funzione degli organi e dei composti.

E' stato dimostrato, infatti, come alcuni composti secondari (es.: lipidi,

aminoacidi, carotene etc.) abbiano una maggiore discriminazione rispetto ad altri come ad esempio gli zuccheri semplici (Park ed Epstein, 1961; De Niro et al., 1977; Melzer e Schmidt, 1987; Gleixner et al., 1993) (Fig. 4.12).

Tali differenze possono essere imputate a processi enzimatici di formazione delle varie sostanze oppure da processi di trasporto all'interno della pianta (Brugnoli et al. 1988; Brugnoli e Farquhar, 2000).

Anche tra i diversi organi vi possono essere differenze di Δ infatti, numerose esperienze, indicano come vi sia una tendenza di semi e radici ad essere arricchite in ^{13}C rispetto alle foglie (Gleixner et al., 1993; Farquhar et al., 1984; Scartazza et al., 1998; Brugnoli et al., 1991; Monti et al., 2006). Questo potrebbe essere dovuto sia al trasporto floematico che alla composizione chimica di alcuni organi, come ad esempio semi oleosi, in cui l'alta percentuale di olio giustifica i più alti valori di Δ . La fluttuazione dei rapporti di Δ fra

organi e composti, inoltre, può essere correlata anche al momento di formazione e alle condizioni ambientali più o meno favorevoli del momento (Condon *et al.*, 1992; Brugnoli *et al.*, 1997; Brugnoli e Farquhar, 2000; Monti *et al.*, 2006).

Tutti i fattori considerati possono agire simultaneamente su Δ favorendola o sfavorendola. Ad esempio, differenze minime in Δ fra foglie e semi di girasole furono spiegate proprio dalla simultanea azione di due effetti opposti di discriminazione: da un lato la bassa conduttanza stomatica in post fioritura, che limitando la diffusione di CO₂, diminuisce Δ ; dall'altro, l'alto contenuto lipidico dei semi che aumenta i valori di Δ (Brugnoli e Lautieri, 1991).

La discriminazione isotopica del carbonio, essendo correlata alle condizioni ambientali e fisiologiche della pianta può essere uno strumento efficace nella comprensione dei meccanismi di risposta allo stress. Il caso più emblematico riguarda la selezione genetica per la resistenza allo stress idrico essendo ampiamente dimostrata la correlazione negativa fra Δ ed efficienza d'uso dell' H₂O (Richards *et al.*, 1993; Brugnoli *et al.*, 1998; Scartazza *et al.*, 1998; Craufurd *et al.*, 1999). Ugualmente, la discriminazione isotopica può essere utilizzata in studi sui cambiamenti ambientali di lungo periodo (Osmond *et al.*, 1982; Rundel *et al.*, 1989) oppure per lo studio di modelli di dinamica degli ecosistemi utilizzando gli isotopi come markers (Griffits, 1991). Non ultimo può essere uno strumento efficace nello studio di catene biosintetiche correlate alla fotosintesi come ad esempio la biosintesi dei lipidi.

4.2.2 Utilizzo della Firma Isotopica nello Studio della Lipogenesi

Come già notato in precedenza, i lipidi prodotti dai vegetali hanno un basso valore di Δ derivato dal forte effetto discriminante effettuato dalla PEP (Fosfo-enoil piruvato carbossilasi) durante la sintesi di Acetil-CoA (De Niro e Epstein, 1977).

Anche le dinamiche isotopiche di formazione dei lipidi sono correlate all'effetto ambientale infatti, Lockheart *et al.* (1997) hanno dimostrato come cambiamenti di Δ nella composizione lipidica siano correlati al periodo di formazione, alla temperatura ed alla posizione della pianta. In particolare si è notato come l'incremento delle temperature induca più alte discriminazioni in relazione all'attività della Rubisco e come i lipidi sintetizzati in organi posti all'ombra abbiano valori di Δ più alti anche oltre il 3 % rispetto a quelli esposti alla luce (Lockheart *et al.*, 1997).

La firma isotopica è stata applicata anche nello studio della lipogenesi in semi di Brassica. Utilizzando gli isotopi come marker è stato dimostrato, ad esempio, quali siano le dinamiche di utilizzo del C durante la sintesi degli acidi grassi e quali siano i meccanismi di formazione e derivazione dei precursori (Schwender e Ohlrogge, 2002).

Considerando inoltre che i due principali enzimi carbossilanti coinvolti nella sintesi dei lipidi (Rubisco ed Acetil CoA) sono influenzati dalla luce ed hanno un'azione discriminante contro ^{13}C e considerando le differenze di Δ , dimostrate da Lockheart et al. (1997), tra i lipidi di organi alla luce rispetto ad organi all'ombra, è verosimile ipotizzare l'uso della composizione isotopica quale strumento di studio dell'effetto dell'irradianza sulla lipogenesi e sulla sintesi dei diversi acidi grassi nelle oleaginose a seme verde. Ad esempio, può essere la firma isotopica degli acidi grassi indicativa della loro composizione? Può aiutare a comprendere meglio alcuni percorsi enzimatici chiave nella formazione di particolari acidi grassi? È rispondente delle condizioni di luce e nelle diverse parti della pianta? È correlata ad altri parametri fisiologici della coltura? E' correlata al livello produttivo, al contenuto in lipidi del seme a alla sua composizione acidica? E' la sua dinamica nel tempo utile a interpretare cambiamenti fisiologici nella lipogenesi?

4.3 FLUORESCENZA

4.3.1 Aspetti Generali e Possibili Applicazioni

La misura della fluorescenza permette lo studio dell'apparato fotosintetico attraverso l'analisi del funzionamento del fotosistema II (PSII).

Il principio generale si basa sul fatto che l'energia luminosa assorbita dal PSII, essendo in eccesso, viene solo in parte utilizzata per la fotosintesi (Φ_p), mentre la restante parte viene dissipata sottoforma di calore (Φ_d) e fluorescenza (Φ_f) (Maxwell e Johnson, 2000) (Fig.4.13).

Questi tre processi sono in competizione fra loro e, per questo, aumentando l'efficienza di uno diminuiscono gli altri due. Considerando l'energia di un fotone pari all'unità, la relazione fra i tre processi può essere espressa come:

$$\Phi_p + \Phi_d + \Phi_f = 1$$

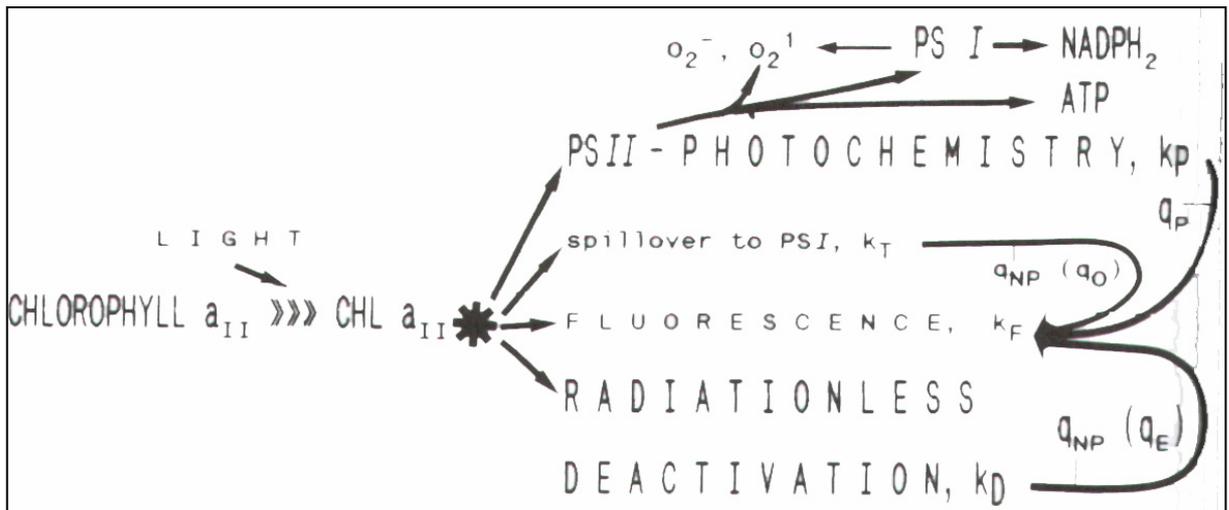


Fig. 4.13 Schema di utilizzo della radiazione luminosa nei fotosistemi durante le reazioni alla luce della fotosintesi (Hall et al., 1984)

In base a questa relazione la fluorescenza dipende direttamente dalla regolazione dei processi di fotosintesi e di dissipazione. Per questo la sua misura può essere un buono strumento per quantificare entrambi i processi (Lambers et al., 2000) ed inoltre, può essere utilizzata come parametro di efficienza del PSII (Maxwell e Johnson, 2000).

Kautsky et al., (1960) dimostrarono che trasferendo materiale fotosintetico da buio a luce si ottenevano differenze di quantità di fluorescenza in funzione della diversa saturazione degli accettori di elettroni del fotosistema. Questo accade perché, passando da buio a luce, si ha una graduale saturazione degli accettori ed una graduale chiusura dei centri di reazione del PSII. L'emissione della fluorescenza, quindi, segue un andamento caratteristico detto "Kautsky curve" ottenibile trattando con luce saturante una foglia precedentemente acclimatata al buio (Bolhar-Nordenkampf e Öquist, 1993; Schreiber et al., 1995) (Fig 4.14).

All'inizio della curva si ha un valore minimo di fluorescenza (F_0) che indica l'ossidazione dell'accettore primario del trasporto elettronico e l'apertura dei centri di reazione del fotosistema. F_0 corrisponde al valore di fluorescenza che può essere misurato durante un periodo di acclimatamento a luce modulata.

Successivamente, come conseguenza di un impulso di illuminazione saturante, il valore di fluorescenza raggiunge rapidamente un massimo (F_m) che indica la chiusura di tutti i centri di reazione e la totale riduzione dell'accettore. Inoltre mantenendo l'illuminazione ambiente dopo l'induzione saturante, la fluorescenza decresce gradualmente (quenching) fino a stabilizzarsi al valore $F > F_0$ (Lambers et al., 2000) (Fig. 4.13). In queste condizioni, un altro impulso di luce saturante provoca un aumento di fluorescenza (F'_m) comunque sempre minore di F_m .

I principali parametri della "Kautsky curve" sono comunemente utilizzati per calcolare una serie di coefficienti con cui si

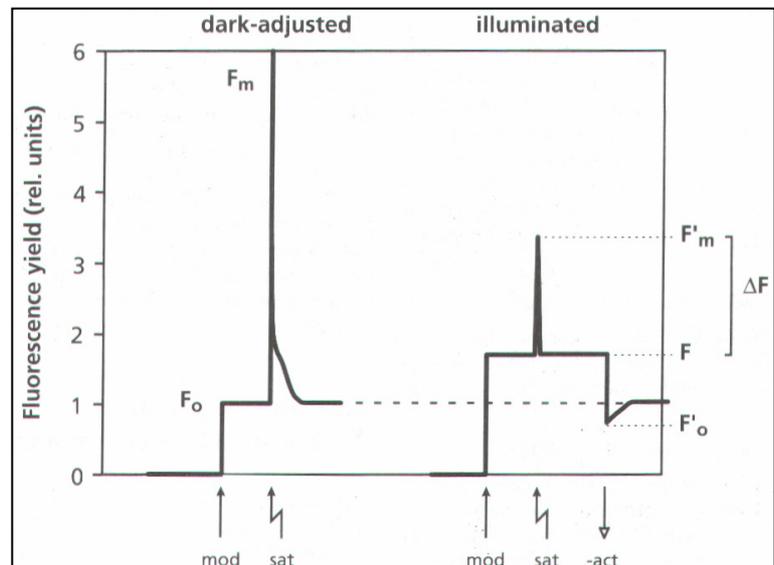


Fig. 4.13 Cinetica della fluorescenza in foglie adattate al buio e foglie adattate alla luce (Lambers et al, 2000)

quantifica l'efficienza del fotosistema e si descrivono gli effetti fotochimici e non, sul quenching. In particolare la curva può essere suddivisa in due parti: la prima, fino F_m , che descrive la risposta assoluta del fotosistema dopo adattamento al buio; la seconda, da F_m in poi, che descrive la risposta del fotosistema relative alle condizioni ambientali (Genty et al., 1989).

In entrambi i casi correlando i dati di fluorescenza con quelli di fotosintesi si può ottenere una stima dell'efficienza di utilizzo della luce nei processi fotochimici (Maxwell e Johnson, 2000).

Uno dei parametri maggiormente utilizzati è l'efficienza del fotosistema II (Φ_{PSII}) (Genty et al., 1989). Tale parametro può essere espresso sia in termini di efficienza potenziale su foglie adattate al buio, che in termini di efficienza relativa alle condizioni ambientali adottate. Nel primo caso, l'efficienza potenziale del PSII dipende dai valori di F_0 ed F_m e viene espressa come:

$$\Phi_{PSII}_{max} = \frac{(F_m - F_0)}{F_m} = \frac{F_v}{F_m}$$

Tale rapporto è indice dell'efficienza fotosintetica del PSII ed in condizioni ottimali può variare da valori da 0,75 a 0,85 con optimum, misurato su diverse specie, di 0,83 (Björkman e Demmig, 1987; Johnson *et al.*, 1993).

Valori inferiori di F_v/F_m indicano condizioni di stress della pianta che provocano riduzione della performance del fotosistema e, di conseguenza, incrementi di F_0 o diminuzioni di F_m in relazione alla riduzione della quantità di accettori e siti attivi nel PSII causati dallo stress. E' stato ben documentato, infatti, come il PSII sia particolarmente sensibile a fattori di stress quali basse e alte temperature, eccessiva radiazione e siccità (Havaux e Lannoye, 1984; Powles, 1984; Smillie, 1979) Per ognuno di questi, la fluorescenza è risultato un ottimo strumento di determinazione della risposta allo stress. Ad esempio in condizioni di eccessiva illuminazione è stata dimostrata una buona correlazione fra la fotoinibizione e la diminuzione del rapporto F_v/F_m (Krause, 1988; Powles, 1984).

L'efficienza del PSII in condizioni ambientali può essere utilizzata per calcolare il tasso di trasporto elettronico generato dalla luce assorbita (J_f) (Genty *et al.*, 1989):

$$J_f = \Phi_{PSII} \cdot I \cdot a \cdot \beta$$

dove I è l'irradianza, a l'assorbanza delle foglie (in genere 0,8 - 0,85) e β è la frazione di quanti assorbiti che raggiungono il PSII.

J_f generalmente è ben correlato con il tasso di fotosintesi rilevabile mediante scambi gassosi e, combinando entrambe le misure, è possibile stimare la concentrazione di CO_2 al sito di carbossilazione (P_c):

$$P_c = \frac{\Gamma [J_f + 8(A + R)]}{[J_f - 4(A + R)]}$$

dove Γ è il punto di compensazione della CO_2 con luce in assenza di respirazione oscura (R_d).

Tuttavia, le misure di fluorescenza sono comparabili con quelle degli scambi gassosi solo se riferite alla stessa foglia e non sono mai comparabili alle condizioni fotosintetiche di altri organi della stessa pianta.

Riassumendo, la fluorescenza può essere un valido strumento per esaminare l'acclimatamento delle piante a differenti microambienti, analizzare approfonditamente il funzionamento del PSII e quantificare la fotoinibizione in risposta alla temperatura (Gamon e Pearcy, 1989; Groom e Baker, 1992), all'eccesso di luce (Ögren e Sjöström,

1990) e allo stress idrico (Epron et *al.*, 1992), attraverso l'analisi dei cambiamenti di F_v/F_m e F_0 (He et *al.*, 1996; Valladares e Pearcy, 1997).

Considerando la complessità dei rapporti fra fotosintesi e sintesi degli oli nelle Brassicacee, l'analisi della fluorescenza, oltre ad approfondire la conoscenza sul meccanismo fotosintetico di foglie (Allen et *al.*, 1997), di silique e di semi (King et *al.*, 1998), potrebbe anche aiutare nell'interpretazione delle risposte fisiologiche dei vari organi in diverse condizioni ambientali e lungo il profilo della pianta in relazione alla produzione dei lipidi.

5. MATERIALI E METODI

Le ricerche sono state condotte presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA) dell'Università di Bologna nel triennio 2005-2007 e hanno riguardato prove agronomiche a pieno campo, svolte negli anni 2005 e 2006 e una prova in ambiente controllato (camera di crescita) svolta nell'anno 2007.

Le prove di pieno campo hanno avuto come obiettivo lo studio dell'influenza dell'epoca di raccolta sui caratteri quanti-qualitativi della produzione di Brassicaceae oleaginose (*Brassica napus* L. e *Brassica carinata* Braun). La prova in ambiente controllato ha avuto come obiettivo lo studio dell'effetto della luce sulla lipogenesi e sulla qualità dell'olio di *Brassica carinata* (Braun).

Le ricerche si sono avvalse della collaborazione con la sezione "Lipidi" del Dipartimento di Scienze degli Alimenti, e con "Chimica Agraria" (DiSTA), entrambi dell'Università di Bologna.

Di seguito verranno riportate dettagliatamente tutte le metodologie utilizzate suddivise per anno e ricerca

5.1 TEST AGRONOMICI A PIENO CAMPO (BIENNIO 2005-06)

5.1.1 Aspetti Agronomici

Nelle annate 2005 e 2006 sono state realizzate due prove di campo analoghe con lo scopo di valutare la produttività di alcune varietà di *Brassica napus* L. e *Brassica carinata* Braun in relazione all'epoca di raccolta.

In entrambi gli anni le ricerche sono state condotte in località Cadriano (BO) (44° 33' N, 11° 21' E, 32 m s.l.m.) su terreno franco, nella prima annata, e su terreno di medio impasto tendente al sabbioso-limoso nella seconda. Entrambi i terreni, sono risultati dall'analisi sufficientemente dotati di sostanza organica e minerali (Tab. 5.1).

In entrambe le annate la precessione culturale è stata frumento. Ciò ha consentito un'ottimale preparazione del letto di semina secondo le consuete tecniche della zona. E' stata eseguita una lavorazione principale (aratura a 30cm di profondità), seguita da

successive erpicature fino ad ottenere un affinamento adeguato alle ridotte dimensioni del seme. Come concimazione di fondo, stati distribuiti, in entrambe le annate, 150 Kg ha⁻¹ di P₂O₅ che si è provveduto ad interrare con l'ultima erpicatura, qualche giorno prima della semina.

E' stato adottato uno schema sperimentale a Split-Plot a 4 ripetizioni in cui sono state saggiate l'epoca di raccolta come fattore principale (parcelle) e le varietà come sub-fattore (sub-parcelle).

Nell'annata 2005 le sub-parcelle erano composte da 6 file lunghe 7m e distanti 0.4 m, per una dimensione totale alla semina di 16.8 m². Nell'annata successiva, invece, erano composte da 8 file distanti 0.4 m per una dimensione totale alla semina di 22.4 m² per sub-parcella. In entrambe le annate, sono state

Parametro	Anno 2005	Anno 2006	Unità
Sabbia	30	58	%
Limo	44	24	%
Argilla	26	18	%
pH	7.75	6.30	
Calcare tot.	2.1	0.0	% CaCO ₃
Calcare att.	1.8	0.0	% CaCO ₃
S. O.	1.63	1.08	%
C.S.C.	27.2	13.7	meq/100g
N tot.	1.1	0.7	‰
P ₂ O ₅ ass.	30.5	32.1	ppm
K ₂ O ass.	156	123	ppm

Tab. 5.1: *Cadriano 2005-2006: caratteristiche chimico-fisiche del terreno di prova.*

seminate 4 varietà: 2 di *B.napus* (Golden e Azuma 156) e 2 di *B.carinata* (ISCI 7, CT204). La semina, avvenuta in data 26 ottobre 2004 nella prima annata e 18 ottobre 2005 nella seconda, è stata effettuata con una seminatrice sperimentale di precisione Vignoli-Bassi, opportunamente tarata con dischi alveolari da brassiche, al fine di ottenere un investimento medio iniziale di 150 semi m⁻².

L'emergenza è stata rilevata per tutte le varietà il 2 novembre 2004 e il 27 ottobre 2005 e, prima dell'inverno, è stato raggiunto lo stadio ottimale di 4-5 foglie vere.

Alla ripresa vegetativa, 17 marzo 2005 e 14 marzo 2006, è stata effettuata una concimazione azotata di copertura alla dose di 80 Kg ha⁻¹ di N (Urea) seguita da una sarchiatura manuale per il controllo delle malerbe. Allo stadio di formazione delle silique (mese di maggio), si è provveduto alla copertura delle parcelle di *B.napus* con rete a maglia stretta per evitare la predazione degli uccelli.

La raccolta parcellare è stata effettuata su una superficie di 14m² (5 file) in due diverse epoche (precoce e tardiva) comuni ad entrambe le annate. La raccolta precoce è stata

effettuata alla fase fenologica G5 ovvero “semi colorati” (Giugno) procedendo ad uno sfalcio manuale dell’intera superficie di raccolta seguito da trebbiatura, una volta completata l’essiccazione in campo. Nell’epoca tardiva, la raccolta è stata effettuata a macchina a maturazione completa del seme (fine Giugno - inizio Luglio). Per entrambi i metodi è stata utilizzata una mietitrebbia parcellare con fronte di raccolta di 2m opportunamente tarata per le brassicaceae.

5.1.2 Andamento Meteorologico

Nelle due annate di sperimentazione in campo, l’andamento meteorologico si è diversificato sia per le temperature, sia per quantità e distribuzione delle precipitazioni. L’annata 2005 è stata caratterizzata da una piovosità totale di 610 mm, maggiore di circa 73 mm rispetto alla media del periodo 1984-2004. Gli eventi piovosi non sono stati uniformi durante il periodo infatti, circa il 60% della piovosità totale è caduta nei 3 mesi iniziali (da ottobre a dicembre) mentre, dalla ripresa vegetativa in poi, le precipitazioni sono risultate pressoché analoghe a quelle medie, sia come quantità che come distribuzione (Fig. 5.1).

Per quanto riguarda le temperature la prima annata è stata caratterizzata da un autunno mite, con temperature superiori alla media tranne che nella terza decade di novembre, ed un inverno con minime continuativamente sotto lo zero da metà gennaio a inizio marzo. Le temperature estive sono state superiori alla media (anche oltre 5°C) la seconda decade di maggio e le ultime due decadi di giugno (Fig. 5.1).

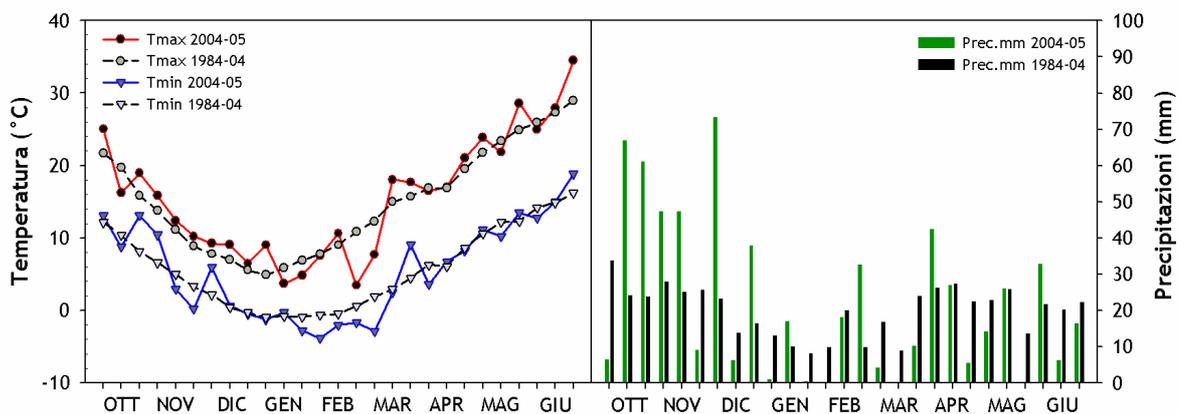


Fig. 5.1: Confronto fra l’andamento meteorologico dell’annata 2005 e quello medio del ventennio 1984-2004 (periodo Ottobre 2004 – Giugno 2005). A sinistra sono riportate temperature massime (Tmax) e minime (Tmin) in °C e a destra le precipitazioni in mm. I dati sono riferiti alle decadi di ogni mese.

L'annata 2006 è risultata poco più piovosa della precedente, complessivamente sono caduti 632 mm di pioggia, +95 mm rispetto alla media del ventennio precedente. Come nel 2005 la distribuzione delle precipitazioni è stata caratterizzata da un periodo autunnale (ottobre – dicembre) con eventi particolarmente abbondanti (374 mm in totale) dei quali circa il 50% concentrato nella sola prima decade di ottobre (Fig. 5.2).

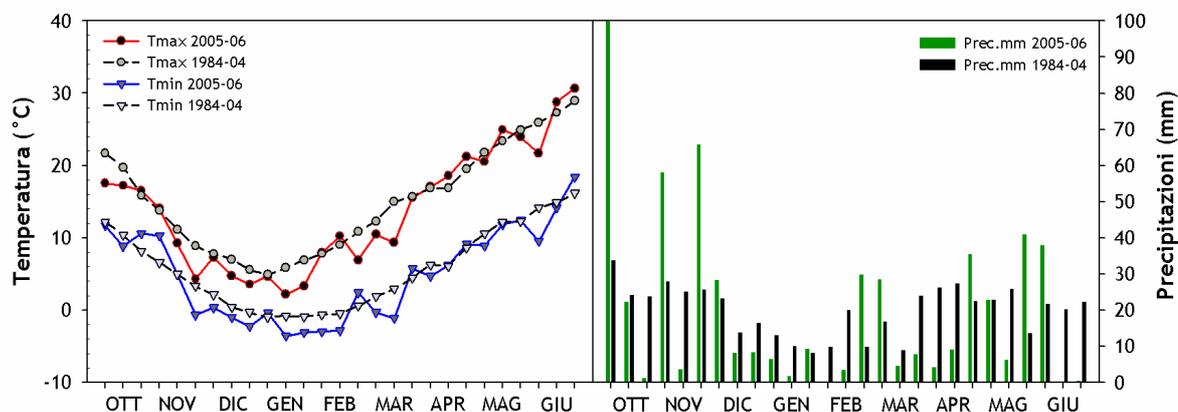


Fig. 5.2: Confronto fra l'andamento meteorologico dell'annata 2006 e quello medio del ventennio 1984-2004 (periodo Ottobre 2005 – Giugno 2006). A sinistra sono riportate temperature massime (Tmax) e minime (Tmin) in °C e a destra le precipitazioni in mm. I dati sono riferiti alle decadi di ogni mese.

Dalla ripresa vegetativa alla maturazione (da marzo in poi), sono caduti in totale solo 198 mm, circa 50 in meno rispetto alla media. Durante l'intero periodo, infatti, solo in 5 decadi si sono verificate piovosità superiori alla media, due delle quali consecutive da fine maggio a inizio giugno (Fig. 5.2).

L'annata 2006 è risultata più fredda sia rispetto alla precedente (in media -1.8°C le massime e -0.7°C le minime) sia rispetto alla media. In particolare sia le temperature massime che le minime sono state quasi sempre inferiori a quelle del periodo di riferimento in media di circa 1°C e solo a fine ottobre e fine giugno sono risultate superiori (Fig. 5.2).

In particolare l'annata è stata caratterizzata da un autunno breve poiché, già da metà novembre e per quasi tutto il periodo invernale, le temperature minime hanno stazionato attorno agli 0°C con punte, tra gennaio e febbraio, mai inferiori ai -4°C . Dalla ripresa vegetativa in poi, invece, sia le temperature massime che quelle minime hanno rispecchiato i valori medi del periodo di riferimento. Infine, solamente tra la seconda e la terza decade di giugno sono stati raggiunti i 30°C , subito dopo un inizio mese con temperature inferiori alla media di circa 4°C (Fig. 5.2).

5.1.3 Rilievi di Campo

In entrambe le annate, durante tutto il periodo vegetativo, sono stati effettuati rilievi fenologici, biometrici e produttivi.

Su un'area di saggio di 1m², ricavata all'interno di ogni parcella, è stato effettuato il conteggio delle piante in tre fasi successive: emergenza (A), levata (L) e maturazione (R). In questo modo è stato possibile quantificare l'investimento reale e la percentuale di sopravvivenza delle piante in tre fasi significative del ciclo della pianta.

In ogni parcella sono state rilevate alcune fasi fenologiche secondo la classificazione del CETIOM (Cetiom, 2003; <http://www.cetiom.fr/index.php?id=8885>): *emergenza (A)*, *inizio levata (C2)*, *bottoni fiorali (D1)*, *inizio fioritura (F1)*, *fioritura (F2)*, *inizio formazione silique (G1)*, *silique bollose (G4)*, *silique con semi colorati (G5)* e *maturazione e raccolta (R)* (Fig. 5.3). Tale classificazione è riferita alla scala fenologica universale BBCH (Sylvester-Bradley, 1985; Weber and Bleiholder, 1990; Lancashire et al., 1991; <http://www.bba.de/veroeff/bbch/bbcheng.pdf>) e considera, in maniera semplificata, solo le fasi principali che, secondo la metodologia suggerita dallo stesso CETIOM, sono rilevabili quando almeno il 50% delle piante della parcella presenta le caratteristiche descritte (CETIOM, 2003).

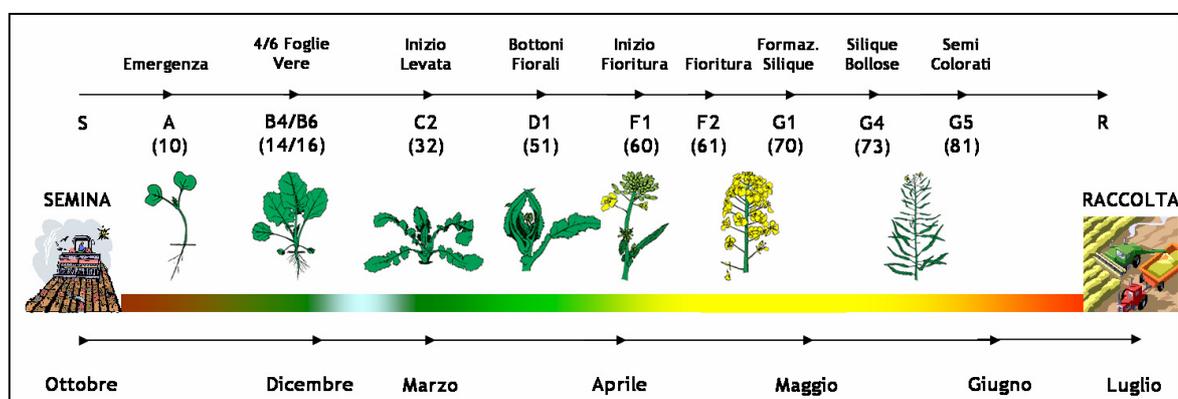


Fig. 5.3: Classificazione cronologica delle fasi fenologiche delle Brassicaceae. Di ogni fase fenologica sono riportati i codici della classificazione CETIOM (lettere) e i corrispondenti della classificazione BBCH (numeri fra parentesi).

Sulla stessa area di saggio su cui sono stati effettuati i conteggi delle piante, alla fase di semi colorati (G5), è stata rilevata l'altezza dal colletto di 15 piante a pieno sviluppo e la produzione potenziale dell'intera area. Per ottenere quest'ultima, in ogni area di saggio le piante sono state sfalciate verdi e le silique, poste all'interno di sacchi per evitare perdite, sono state essiccate in stufa a 105°C fino a peso costante. Successivamente si è proceduto con una sgranatura manuale e pulitura del seme ed infine alla pesatura del campione.

Dopo la raccolta, effettuata su una superficie di 14 m² per parcella, i campioni di seme ottenuti sono stati posti in stufa a 60°C fino al raggiungimento di un'umidità di conservazione media di circa 8%. In seguito sono stati puliti dalle impurità e pesati al fine di quantificare la produzione. Dal campione totale sono stati poi ottenuti 3 sub-campioni destinati alla determinazione del peso di 1000 semi, sostanza secca (in stufa a 105°C) e macinazione (circa 50g di seme) per le successive analisi di laboratorio.

5.1.4 Analisi di Laboratorio

Le analisi di laboratorio hanno riguardato la quantificazione e la caratterizzazione qualitativa della frazione lipidica dei semi raccolti.

La fase di quantificazione è stata svolta presso il laboratorio dell'AUB di Cadriano (BO) utilizzando le farine derivate dalla macinazione; l'analisi qualitativa è stata svolta direttamente sugli oli estratti, presso il laboratorio di analisi dei lipidi del DiSA (Dipartimento di Scienze degli Alimenti) dell'Università di Bologna.

Tutti i campioni sono stati analizzati in singolo poiché si poteva disporre di 4 repliche di campo da cui è stato ugualmente possibile ottenere una buona ripetibilità.

Analisi del contenuto di olio

La quantificazione dell'olio è stata eseguita secondo la metodica Soxhlet che consiste in un'estrazione con solvente apolare con l'ausilio dell'omonima apparecchiatura (Fig. 5.4).

Un ditale di cellulosa viene riempito con circa 3g di campione macinato, una spatola di solfato di Na anidro e una di sabbia di quarzo e viene posto nell'estrattore.

L'estrattore viene raccordato su un pallone (precedentemente asciugato in stufa a 105°C per 30' e pesato) contenente circa 200ml di *n*-esano (solvente) e, in seguito, viene raccordato al refrigerante. Il pallone, montato al di sotto del sistema, viene riscaldato a bagnomaria a circa 90°C per ottenere l'evaporazione del solvente che, condensandosi sul refrigerante, ricade sul campione estraendo l'olio. Una volta riempita la camera dell'estrattore di esano e olio, solvente e grasso ricadono nel pallone mediante un sistema di ritorno a sifone. Il solvente, quindi, viene fatto ricadere in continuo sul campione per almeno 6 ore sfruttando la diversa temperatura di ebollizione rispetto ai lipidi (rispettivamente 60°C e 200°C) e, alla fine del ciclo, viene raccolto insieme all'olio nel pallone. Successivamente, dopo aver distillato il solvente, si determina il peso del pallone

contenente l'olio e, per differenza con la pesata a vuoto, la quantità e la percentuale di lipidi contenuti nel campione.

Dopo la pesatura, l'olio estratto è stato recuperato con 2 lavaggi da 5 ml di soluzione di *n*-esano/isopropanolo 3:1 (v/v) e conservato a -18°C in contenitori di vetro chiusi ermeticamente in modo da non alterarne le caratteristiche prima dell'analisi qualitativa.

Analisi qualitativa dell'olio

La metodica applicata per l'analisi della composizione acidica, è composta da: prelievo di una quantità di olio, diluizione, transesterificazione ed analisi in gascromatografo.

Una quantità nota di campione oleoso, conservato in soluzione di esano/isopropanolo, viene posta in provetta e portata a secco a bagnomaria a 40°C e in corrente di N.

L'olio così ottenuto, viene pesato, diluito con *n*-esano e trattato con un eccesso di soluzione metanolica di KOH 2N secondo le seguenti proporzioni: 50mg di olio, 100µl

di MeKOH 2N, 5ml di *n*-esano. In questa maniera, dopo 1' di agitazione con VORTEX, si ottiene la completa transesterificazione dei trigliceridi con formazione e separazione di glicerina, stratificata sul fondo, e metilesteri degli acidi grassi come surnatante.

Per ottenere il profilo degli acidi grassi, 1µl di surnatante è stato iniettato in un gascromatografo "Carlo Erba" HRGC 4160 equipaggiato con una colonna capillare apolare Restek Rtx-2330 (lunghezza 30m, diametro interno 0.25mm e spessore film interno 0.2µ), detector FID a ionizzazione di fiamma, rapporto di splittaggio 1/42 e flusso di elio in colonna (1.09ml/min a 35°C). Al fine di ottenere una buona separazione dei picchi nel cromatogramma è stata utilizzata la seguente programmata: temperatura iniziale 160°C per 10 minuti, rampa di temperatura da 160 a 240°C con incremento di 7°C al minuto e temperatura finale di 240°C per 20 minuti.

I dati ottenuti sono stati acquisiti ed integrati con il software Turbochrom Navigator TCNav 6.1.1.0.0:K2O (Perkin Elmer Corp.). Con lo stesso programma si è proceduto,

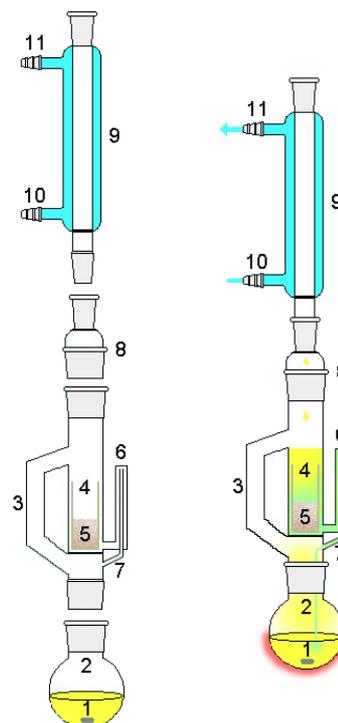


Fig. 5.4: Apparecchio di Soxhlet: 1. Solvente; 2. Pallone; 3. Estrattore; 4. Ditale in cellulosa; 5. Campione; 6/7. Sifone di ritorno; 8. Raccordo refrigerante; 9. Refrigerante; 10. Entrata H₂O refig.; 11. Uscita H₂O Refrigerante

FONTE: [EN Wikipedia](#)

successivamente, alla correzione manuale dell'integrazione così da ottenere una migliore standardizzazione dei risultati dell'analisi (Fig. 5.5).

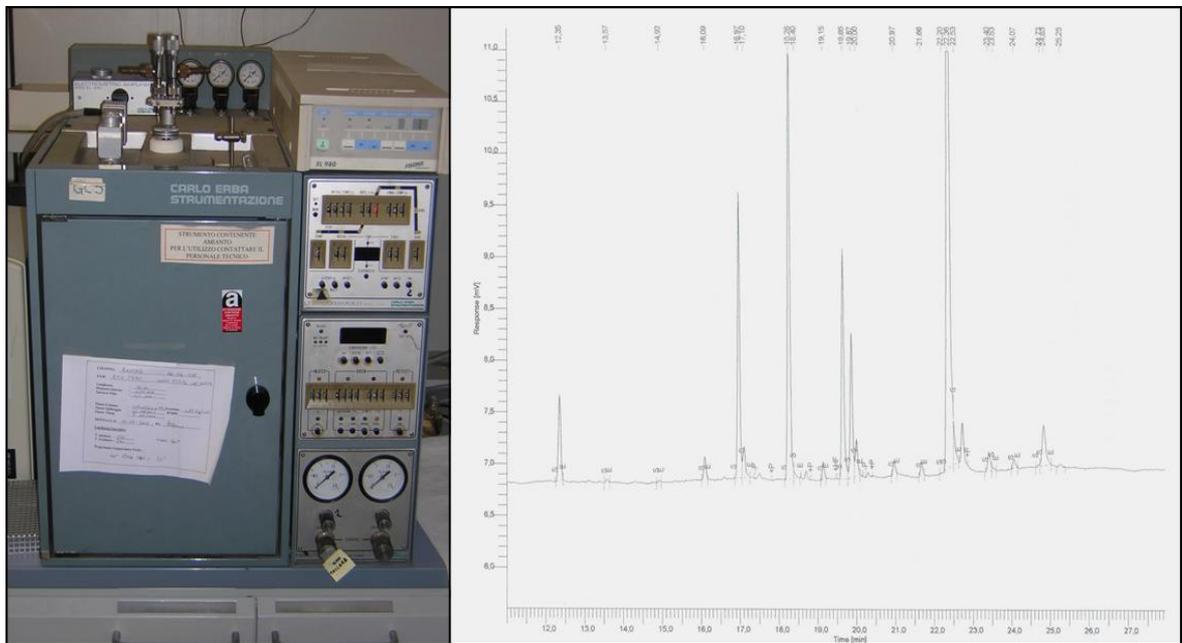


Fig. 5.5: A sinistra gascromatografo Carlo Erba HRGC 4160; a destra esempio di tracciato cromatografico ottenuto da un'analisi completa dell'olio di *Brassica carinata* (Braun) varietà CT204.

5.2 TEST IN AMBIENTE CONTROLLATO (ANNO 2007)

5.2.1 Aspetti Agronomici

Nell'annata 2007 è stata realizzata una prova in ambiente controllato con l'obiettivo di studiare gli effetti dell'intensità luminosa sulla sintesi dei lipidi lungo il profilo di *Brassica carinata* (Braun).

La ricerca, condotta interamente su piante in vaso, è stata strutturata in due fasi: un periodo preliminare di allevamento fino alla formazione silique, svolta presso l'Azienda sperimentale dell'Università di Bologna di Ozzano (BO) (44° 25' N, 11° 28' E, 80 m s.l.m.), e un periodo di trattamento luminoso in cella di crescita, durante il riempimento del seme, fino a maturazione completa.

Affinché gli effetti del trattamento potessero essere significativi, la fase di allevamento è stata fondamentale per ottenere un insieme di individui uniformi per morfologia e produttività. Per questo motivo, sulla base delle informazioni ottenute dalle sperimentazioni precedenti, è stata scelta la varietà CT204 distintasi in campo, fra le *B. carinata*, per uniformità e potenzialità produttiva.

Le piante sono state allevate in vasi di plastica, di diametro 21cm e volume 6.6 litri, riempiti con un substrato di coltivazione costituito da 2 parti di sabbia fine e 1 parte di torba neutra di sfagno (Tab. 5.2).

I vasi, per tutto il periodo di crescita delle piante, sono stati mantenuti sotto un tunnel ombreggiato così da ottenere uniformità di illuminazione. Inoltre, sono stati predisposti periodici spostamenti in serra fredda,

durante l'inverno, così da evitare possibili danni durante le gelate notturne (Fig. 5.6).

La semina è stata effettuata il 13/10/2006 su 30 vasi per ognuno dei quali, in base alla germinabilità del germoplasma disponibile, sono stati posti 10-15 semi così da riuscire ad ottenere un numero sufficiente di piantine germinate.

In data 18/10/2006 è avvenuta l'emergenza e, dopo circa 20 giorni dalla semina, durante la fase fenologica B2 (2 foglie vere), è stato effettuato un diradamento così da lasciare per ogni vaso le 2 piante più uniformi (Fig. 5.7).

Elemento	% sulla S.S.
C organico	46
N organico	0,8
S.O.	80
pH	6

Tab. 5.2: Composizione della torba utilizzata come substrato.
FONTE: COMPO



Fig. 5.6: Piante di *Brassica carinata* (Braun) var. CT204 allevate in vaso sotto tunnel ombreggiato.



Fig. 5.7: Piante di *Brassica carinata* (Braun) var. CT204 in fase fenologica B4 (4 foglie vere) 25 giorni dopo il diradamento.

Durante tutto il periodo di prova, il terreno è stato mantenuto sempre in condizioni di capacità di campo effettuando un'irrigazione settimanale durante l'inverno (salvo eventi piovosi naturali) e 2 irrigazioni settimanali dalla ripresa vegetativa fino a fine ciclo vegetativo per evitare possibili stress idrici.

La concimazione è stata effettuata somministrando la soluzione Ruakura (Smith et al., 1983; Choesin e Boerner, 1991) in ragione di 150ml kg⁻¹ di substrato con cadenza mensile, da dicembre per tutto il periodo di riposo vegetativo, e settimanale dalla ripresa vegetativa fino a fine ciclo (Tab. 5.3).

Soluzione A		Soluzione B		Soluzione C	
Sale	g l ⁻¹	Sale	g l ⁻¹	Sale	mg l ⁻¹
Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	4.94	KH ₂ PO ₄	2.67	H ₃ BO ₃	128.80
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	16.78	K ₂ HPO ₄	1.64	CuCl ₂ ·2H ₂ O	4.84
NH ₄ NO ₃	8.48	K ₂ SO ₄	6.62	MnCl ₂ ·4H ₂ O	81.10
KNO ₃	2.28	Na ₂ SO ₄	0.60	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.83
		NaCl	0.33	ZnCl ₂	23.45
				Citrato Ferrico	592.25

Tab. 5.3: Composizione delle 3 soluzioni componenti la Ruakura solution.

Per la preparazione di 5l di Ruakura solution occorre miscelare insieme le 3 soluzioni base e diluire con H₂O secondo le seguenti proporzioni:

200ml di soluzione A + 200ml di soluzione B + 100ml di soluzione C + 4.5l di H₂O distillata

5.2.2 Celle Climatiche

Per la fase in ambiente controllato sono stati scelti 24 individui uniformi secondo un criterio che prevedeva, su ognuno, la constatazione della fase fenologica G1, ovvero almeno 10 silique riconoscibili nei palchi basali dell'infiorescenza, e almeno l'80% dei restanti fiori aperti e impollinati per via entomofila. Tali condizioni sono risultate necessarie per poter ottenere un numero di silique per pianta sufficiente per tutte le fasi successive della sperimentazione.

Le piante sono state trasferite in una cella di crescita di dimensioni 2m x 2m dotata di controllo della temperatura, umidità relativa e fotoperiodo in data 12/04/2007. In accordo con alcune ricerche effettuate su Brassicaceae (Turnham e Northcote, 1983; Ruuska et al., 2004; Goffman et al., 2005), per tutto il trattamento sono state mantenute nelle seguenti condizioni ambientali: fotoperiodo con 16 ore di luce e 8 di buio; temperatura di 25°C nelle ore di luce e 15°C nelle ore di buio. Le temperature e l'umidità sono state monitorate in continuo con una stazione meteorologica dotata di datalogger interno.

All'entrata in cella, le piante sono state suddivise in due gruppi da 12 individui ciascuno e sono state poste su 2 distinti bancali in modo da simulare una fila in campo. La cella è stata poi suddivisa in due sotto-ambienti, per mezzo di una parete artificiale mobile permeabile al flusso d'aria, ognuno dei quali è stato illuminato in maniera differente a seconda del trattamento (Fig. 5.8). In particolare, sul primo gruppo di piante è stata simulata la condizione di campo con un'illuminazione dall'alto (L1) mentre, sul secondo, è stata applicata una doppia illuminazione sia dall'alto che lungo tutto il profilo verticale (L2).



Fig. 5.8: Cella di crescita: distribuzione delle piante e dei trattamenti. A dx illuminazione L1 e a sx doppia illuminazione L2.



Fig. 5.9: Cella di crescita: particolare dell'illuminazione in L1 (sinistra in alto) e L2 (sinistra in basso) e vista generale delle due zone a diversa intensità di illuminazione.

L'intera illuminazione è stata effettuata con tubi al neon (Philips Master TL-D 58W/840); in particolare, per l'illuminazione dall'alto sono stati utilizzati 6 tubi posizionati ad una distanza di 2 m dal piano del bancale mentre, per l'illuminazione laterale, sono stati utilizzati 12 tubi raggruppati a 2 a 2 e posti ogni 30 cm a partire dal bancale (Fig. 5.9).

Il PAR è stato rilevato, lungo il profilo di ogni trattamento, con un EMS 7/L Canopy Analyser con datalogger, dotato di 30 sensori di 40mm di diametro disposti su un'estensione di 750mm.

Per entrambi i trattamenti sono state effettuate misurazioni sul profilo verticale ogni 10cm partendo dalla fonte luminosa e solo per il trattamento L2 è stata misurata, in maniera analoga, anche l'estinzione orizzontale. I rilievi sono stati effettuati sulla cella vuota il 23/03/2007 (taratura) e successivamente in presenza delle piante il 16/04/2007 (ad inizio prova), 04/05/2007 e 29/05/2007.

Infine, per tutto il periodo di trattamento, la cella è stata dotata di un analizzatore di gas all'infrarosso collegato a datalogger per il monitoraggio continuo della concentrazione di CO₂ nell'ambiente di prova con rilievi ogni minuto.

5.2.3 Rilievi di Campo

Durante tutto il periodo di coltivazione sono stati eseguiti diversi rilievi con lo scopo di caratterizzare sia la fenologia che la biometria delle piante.

Le fasi fenologiche sono state rilevate utilizzando la stessa metodologia delle annate precedenti alle quali si rimanda per una descrizione dettagliata (CETIOM, 2003).

Per quanto riguarda la biometria, invece, i rilievi sono stati eseguiti ogni 15 giorni dall'inizio del trattamento.

All'entrata in cella, delle 12 piante disponibili per ogni trattamento, 8 (PHY) sono state destinate ai rilievi di carattere fisiologico, mentre 4 (BIO) sono state destinate

ai rilievi biometrici. Inoltre, lungo il profilo di ogni pianta, sono state distinte una zona vegetativa basale F (foglie basali) e una riproduttiva S (silique e foglie apicali) (Fig. 5.10),

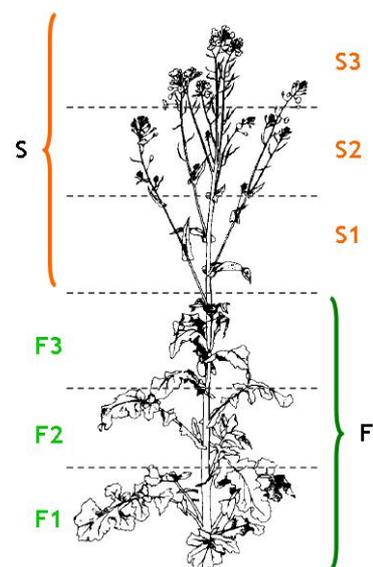


Fig. 5.10: Schema di suddivisione delle porzioni di pianta in cui sono stati effettuati i rilievi.

su cui sono state create 3 sotto-porzioni (F1 e S1 prossimali, F2 e S2 mediane e F3 e S3 distali) ognuna pari a circa 1/3 della porzione principale (Fig. 5.10). Infine in ogni sottoporzione di F e di S sono state selezionate rispettivamente 3 foglie e 3 silique su cui sono stati effettuati sia rilievi biometrici che fisiologici.

Ogni rilievo biometrico prevedeva, su tutte le piante, la misura dell'altezza e il conteggio del numero di foglie e silique. Sulle piante BIO, sono stati anche misurati, in maniera non distruttiva, area fogliare (AF), area delle silique (ASil), numero medio di semi per siliqua e, quando possibile, superficie media dei semi.

L'area fogliare e delle silique è stata calcolata con metodo non distruttivo utilizzando un modello biometrico appositamente calibrato per *Brassica carinata*. In particolare, da una prova a pieno campo di Cadriano sono state prelevate 60 foglie e 60 silique sulle quali sono state misurate sia la superficie reale mediante Licor 3000 Area Meter, sia lunghezza e larghezza della foglia e della siliqua assumendone una forma rettangolare (Rodrigues Pereira, 1977; Tuberosa e Pesci, 1978).

Dalla correlazione fra le due misure è stato possibile calcolare un coefficiente di correzione (Fig. 5.11) che è stato utilizzato per il calcolo della superficie dei due organi. Va precisato che nella calibrazione del modello non si tiene conto del rigonfiamento delle silique essendo la lettura di tipo bidimensionale. Ciò determina una sottostima dell'area reale della siliqua proporzionale alle dimensioni del seme che in generale sono positivamente correlate al rigonfiamento della siliqua.

Il conteggio del numero dei semi è stato effettuato, in tutti i rilievi, su una siliqua per sottoporzione di S in ognuno degli individui BIO. Dopo il conteggio, su almeno 5 semi per

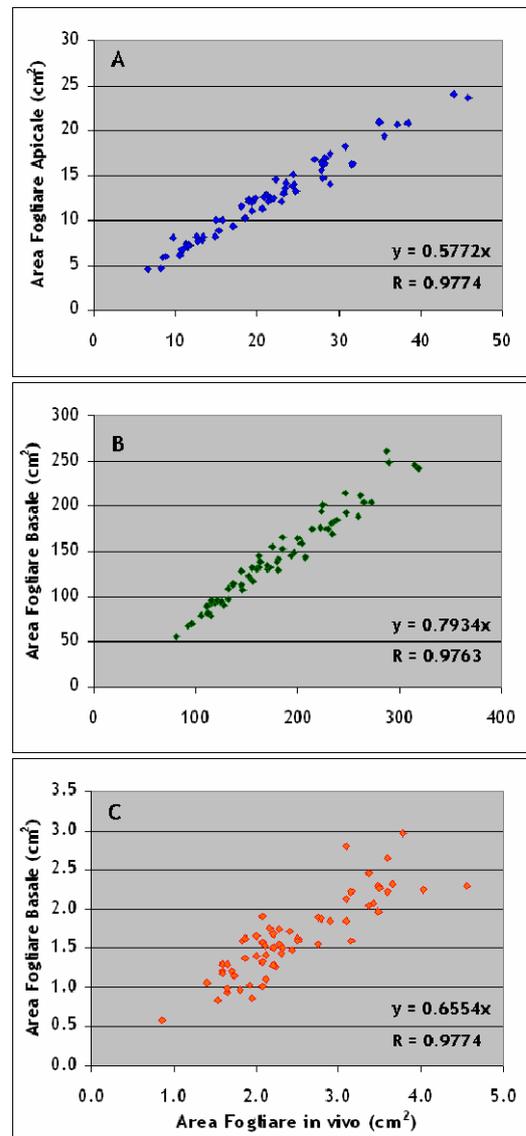


Fig. 5.11: Correlazione fra Area Calcolata di foglie e silique e Area Fogliare o Area delle Silique effettivi.

Nei tre grafici sono riportati i coefficienti di correlazione per le foglie basali (A), foglie apicali (B) e silique (C).

siliqua è stato misurato il diametro con un calibro digitale e di conseguenza la superficie media dei semi stessi.

A maturazione completa, è stata effettuata la raccolta manuale delle silique per determinare la produzione totale di ogni pianta e di ogni porzione di S. Dopo la raccolta, le silique sono state essiccate in stufa a 60°C, sgranate e il seme ottenuto è stato pesato (peso totale del campione e peso di 1000 semi) e macinato per le analisi successive.

Infine, su un piccolo campione di farina è stata stimata la percentuale di umidità utilizzando una termobilancia elettronica.

5.2.4 Misura dei Parametri Fisiologici

Durante il periodo di riempimento del seme, sulle foglie e silique selezionate nelle varie porzioni di pianta, sono stati effettuati diversi rilievi non distruttivi per valutare lo stato dell'apparato fotosintetico (fluorescenza, scambi gassosi e SPAD). A questi rilievi sono stati accoppiati, su foglie e silique adiacenti, prelievi di campioni di tessuto per l'analisi di *RWC* (*Relative Water Content*), *SLA* (*Specific leaf Area*) e, successivamente, contenuto di pigmenti clorofilliani (vedi capitolo 7.2.6).

Fluorescenza e SPAD

I rilievi di fluorescenza e SPAD sono stati eseguiti su tutte le PHY due volte la settimana sia sulle foglie (entrambi) che sulle silique (solo fluorescenza dalla fase fenologica G2).

Per il rilievo della fluorescenza è stato utilizzato un fluorimetro Handy-Pea della Hansatech che, oltre ai normali parametri di fluorescenza, consente di ottenere misure in continuo per tutta la durata dell'analisi applicabili, ad esempio, come base dell'OJIP Test.

La misura è iniziata ponendo sulla foglia/siliqua una clip ombreggiante che permette di oscurare una porzione di tessuto fotosintetico. Dopo 20' di oscuramento è stato posto sulla clip il detector ed è stata effettuata la misurazione applicando una illuminazione di intensità $2000\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ per 1 secondo (Fig. 5.12).

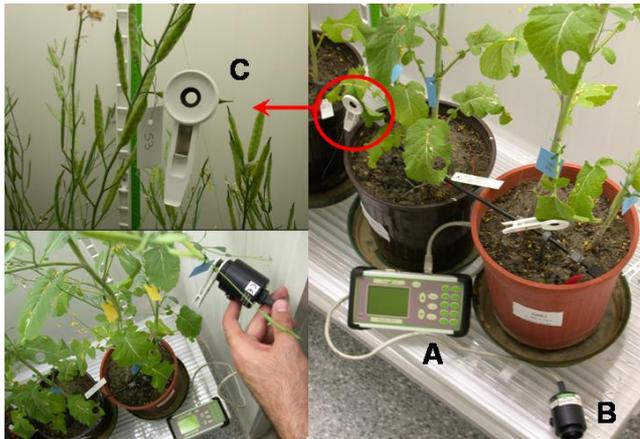


Fig. 5.12: Fluorimetro Handy Pea. A: Fluorimetro e Datalogger; B: Lampada e Detector; C: Clip con camera ombreggiata



Fig. 5.13: Analizzatore di contenuto di clorofilla SPAD Minolta A-501.

Il periodo di ombreggiamento e l'intensità luminosa sono state stimate per mezzo di un'opportuna taratura dello strumento su 30 foglie e 30 silique di piante tipo di *B. carinata*. Sulle stesse foglie utilizzate per la misura della fluorescenza, sono stati determinati, contemporaneamente, anche i contenuti indicizzati di clorofilla mediante il metodo spettrometrico (SPAD-502 Minolta) al fine di valutare una relazione con i valori di fotosintesi netta (Fig. 5.13). Ogni dato SPAD raccolto è scaturito dalla media di 5 letture per ogni foglia analizzata.

Scambi gassosi

Le misure di scambi gassosi sono state effettuate ogni settimana su 3 piante PHY per ogni trattamento. In particolare sono state eseguite due tipi di misurazione: curve A-C_i (19/04/2007; 24/04/2007; 08/05/2007 e 24/05/2007), per ottenere la valutazione dell'efficienza di carbossilazione e trasporto elettronico (Farquhar et al., 1980), e curve luce (03/05/2007; 15/05/2007 e 30/05/2007) per ottenere una misura dell'efficienza d'uso della radiazione luminosa.

Per tutti i rilievi di scambi gassosi fra pianta e atmosfera, è stato utilizzato un sistema portatile IRGA (analizzatore di gas all'infrarosso) a ciclo aperto CIRAS-2 (PP-System) in grado di misurare i flussi e le concentrazioni di H₂O e CO₂ in entrata e uscita da una cuvette contenente una porzione di foglia da analizzare (Fig. 5.14).

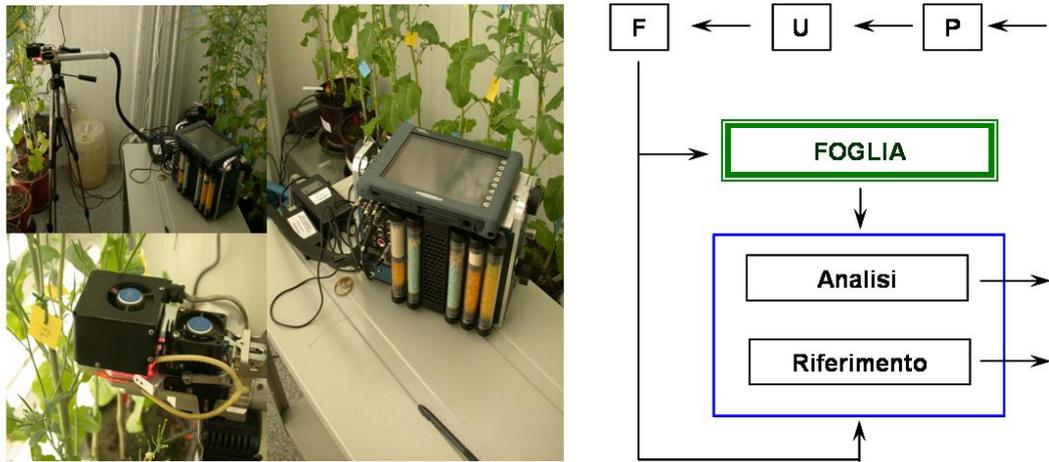


Fig. 5.14: CIRAS – 2 (PP-System) utilizzato per la misura degli scambi gassosi. A destra schema di rappresentazione del sistema aperto di misurazione. P: Pompa; F: misuratore di flusso; U: Unità di condizionamento dell'aria.

Le curve $A-C_i$ sono state ottenute misurando l'assimilazione netta a differenti concentrazioni di CO_2 sottostomatica (C_i). Le curve sono state ottenute modificando i contenuti di CO_2 all'ingresso della cuvette (C_a) ad ogni rilievo. Partendo dalla misurazione a concentrazione ambiente ($C_a = 340$ ppm) si è passati a $C_a = 0$ e successivamente, con incrementi di 150-200 ppm ogni rilievo, si è arrivati fino a $C_a = 1000$ ppm.

Per le curve luce, invece, è stata applicata sulla cuvette una lampada dotata di led adatta alla modulazione fine del PAR. Mantenendo sempre un $C_a = 340$ ppm, le curve sono state costruite a partire da $PAR = 0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fino $PAR = 2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ incrementando di 200-300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in ognuna delle 8 letture effettuate.

RWC e SLA

Su foglie analoghe a quelle utilizzate per i rilievi strumentali, sono stati prelevati dischetti fogliari di $3,14 \text{ cm}^2$ di superficie ciascuno, su cui è stato stimato il contenuto idrico relativo *RWC* (Relative Water Content) secondo la seguente formula:

$$\text{RWC (\%)} = [(\text{PF}_i - \text{PS}) / (\text{PF}_r - \text{PS})] \cdot 100$$

PF_i = Peso Fresco del campione fogliare appena prelevato

PF_r = Peso Fresco del campione reidratato dopo 24h in H_2O distillata e al buio

PS = Peso secco (60°C fino peso costante)

L'*RWC* così calcolato, è stato assunto come indice dello stato idrico della foglia e congiuntamente, conoscendo PS e area della porzione prelevata, è stato possibile calcolare

anche il coefficiente specifico di area fogliare *SLA* (*Specific Leaf Area*) utilizzato come ulteriore indicatore fogliare.

5.2.5 Analisi Quanti-Qualitative sugli Oli

Le analisi quanti-qualitative hanno riguardato al quantificazione dell'olio e la caratterizzazione della sua composizione acidica.

Per entrambe le tipologie di analisi sono stati utilizzati gli stessi strumenti e le stesse metodiche applicate nei precedenti anni di sperimentazione (Soxhlet e analisi al gas-cromatografo).

Vista l'esigua quantità di seme ottenibile da una singola pianta, si sono potuti analizzare solo i campioni delle porzioni S2 e S3. Più in particolare, a causa della poca farina disponibile, l'estrazione dell'olio è stata eseguita, per tutte le repliche, su un campione di 0,5g anziché di 3g come da metodica ufficiale. Per questo motivo, è stata eseguita una taratura dello strumento di Soxhlet con quantità crescenti di campione (0,5g-1g-1,5g...etc.) per quantificare l'errore strumentale e poter correggere il dato ottenuto.

5.2.6 Quantificazione dei Pigmenti Clorofilliani ed Estrazione degli Zuccheri Solubili

La quantificazione dei pigmenti clorofilliani e l'estrazione degli zuccheri solubili sono state effettuate su tessuti di foglia (dischetti fogliari di diametro 1cm), siliqua e seme prelevati da 5 individui PHY per ogni trattamento, comprensivi dei 3 su cui è stata eseguita l'analisi degli scambi gassosi. Tutti i tessuti, prelevati possibilmente in contemporanea all'analisi degli scambi gassosi, sono stati subito posti in N liquido e, successivamente, conservati a -80°C (193 K). Inoltre, ogni prelievo di tessuto è stato effettuato sempre sugli stessi organi, adiacenti a quelli utilizzati per i rilievi fisiologici non distruttivi.

Per ottenere un'adeguata evoluzione temporale dei risultati, le analisi sono state eseguite su campioni prelevati nelle seguenti date: 16/04/2007; 30/04/2007; 14/05/2007; 28/05/2007.

Quantificazione dei pigmenti clorofilliani

La determinazione della concentrazione dei pigmenti clorofilliani in foglie, silique e semi è stata eseguita applicando la metodologia utilizzata da Aranjuelo (Aranjuelo *et al.*, 2007), opportunamente modificata in relazione ai diversi tessuti analizzati.

Dopo la pesatura, un campione di tessuto (dischetti fogliari, silique o semi) prelevato durante il ciclo vegetativo, è stato posto in un mortaio refrigerato e ombreggiato ed è stato trattato con 10ml di etanolo 95% (v/v) (solvente di estrazione). L'estratto ottenuto, è stato centrifugato per 10' a 3000 giri/min e, successivamente, 1ml di surnatante è stato diluito con 4 ml di etanolo 95% (v/v) e il tutto posto in una cuvette. E' stata poi misurata l'assorbanza della soluzione alle lunghezze d'onda 750, 665, 649 e 470nm con uno spettrofotometro Perkin-Elmer Lambda 1 UV/VIS. Le concentrazioni di clorofilla a, clorofilla b e carotenoidi sono state calcolate sostituendo i coefficienti di estinzione rilevati alle equazioni descritte da Liechtenthaler (1987) (Tab. 5.4).

Pigmento	Equazione di Calcolo della Concentrazione
C_a	$13.36A_{665} - 5.19A_{649}$
C_b	$27.43A_{649} - 8.12A_{665}$
C_{a+b}	$5.24A_{665} + 22.24A_{649}$
C_{x+c}	$\frac{1000A_{470} - 2.13C_a - 97.64C_b}{209}$

Solvente: Etanolo 95% (v/v)

Tab. 5.4: *Equazioni di Liechtenthaler (1987) per la determinazione di Clorofilla A (C_a), Clorofilla B (C_b) e Carotenoidi totali (C_{x+c}) in estratti di tessuto fotosintetico. La concentrazione dei pigmenti viene espressa in $\mu\text{g ml}^{-1}$ di estratto.*

Estrazione degli zuccheri solubili

Al fine di valutare la firma isotopica del carbonio nel primo stadio della catena metabolica di formazione dei lipidi, sono stati estratti gli zuccheri solubili.

La determinazione è stata eseguita sugli stessi tessuti su cui erano già stati quantificati i pigmenti clorofilliani e, per questo, è stata utilizzata la restante parte dell'estratto già a disposizione dall'analisi precedente.

Tale estratto è stato portato a secco in stufa a 40°C e, il deposito rimasto, è stato ridiluito in 8ml di H₂O. Successivamente sono stati aggiunti 2ml di acetone (per eliminare possibili residui lipidici e fosfolipidici) ed il tutto è stato centrifugato a 3000 giri/min per 20'.

Il surnatante ottenuto, prevalentemente composto da una soluzione acquosa di acidi organici, aminoacidi e zuccheri, è stato sottoposto a filtraggi sequenziali con resine a scambio ionico DOWEX-50 (H⁺) e DOWEX-1 (Cl⁻). La prima resina ha permesso la separazione di aminoacidi da acidi organici e zuccheri solubili mentre, la seconda, la separazione degli acidi organici ottenendo, alla fine, una soluzione acquosa di zuccheri solubili. Su 2ml di soluzione è stata determinata la concentrazione zuccherina utilizzando il metodo della colorazione con reagente DNS (acido 3,5-dinitrosalicilico) ed è stata effettuata la lettura dell'assorbanza a 530nm come riportato da Summer J.B. (1921) mentre, la restante parte della soluzione è stata conservata a -18°C.

5.2.7 Estrazione e Purificazione degli Acidi Grassi

Per la seconda fase di valutazione della firma isotopica del carbonio lungo la catena metabolica dei lipidi, si è proceduto alla purificazione dei principali acidi grassi monoinsaturi: l'acido oleico (C18:1) ed acido erucico (C22:1), rispettivamente prodotto intermedio e prodotto finale della catena.

La metodica utilizzata prevede la separazione degli acidi grassi utilizzando la tecnica della cromatografia su strato sottile (TLC) a ioni d'argento e una successiva quantificazione.

La tecnica di separazione su TLC-argentata, è utilizzata normalmente per l'identificazione e quantificazione degli isomeri *trans* degli acidi grassi monoinsaturi e per la separazione in classi degli esteri metilici degli acidi grassi in base al grado di insaturazione (Morris, 1966). Tale separazione è possibile poiché gli ioni d'argento, depositati sullo strato siliceo della lastra TLC, interagiscono con i doppi legami degli acidi grassi causando una modificazione della polarità in funzione del grado di insaturazione e della conformazione spaziale (Morris, 1966).

Nel caso dell'analisi sugli oli di *B.carinata*, dovendo distinguere due acidi grassi monoinsaturi, è stata necessaria una modifica del tempo di eluizione rispetto alla metodica di partenza. La metodica standard prevede l'utilizzo di una soluzione di eluizione composta da n-esano ed etere di-etilico in proporzione 9:1 (v/v) applicata per un tempo di sviluppo di circa 30min. Nel caso specifico dell'olio di *B.carinata*, è stata mantenuta la stessa soluzione ma è stato applicato un tempo di eluizione di 45min. In questo modo, è stato possibile separare il C22:1 dal C18:1, pur essendo entrambi monoinsaturi *cis*. Infatti il C22:1 si è posizionato in una zona più alta della lastra TLC rispetto al C18:1 (Fig. 5.15). Le posizioni sono state distinte anche perché negli oli vegetali mancano gli isomeri *trans* che altrimenti coprirebbero la posizione 4 (Fig. 5.15)

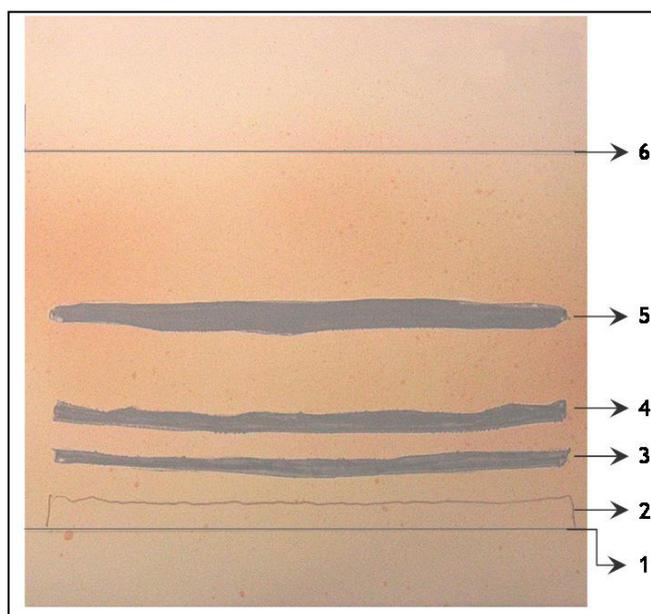


Fig. 5.15: Esempio di lastra TLC sviluppata: 1. Linea di deposizione; 2. Banda degli acidi grassi polinsaturi; 3. Banda dell'acido oleico; 4. Banda dell'acido erucico; 5. Banda degli acidi grassi saturi; 6. Fronte del solvente..

La purificazione degli acidi grassi è stata effettuata sui campioni di olio delle porzioni S2 e S3 degli stessi 5 individui PHY su cui sono state fatte le analisi dei pigmenti clorofilliani e l'estrazione degli zuccheri solubili.

Circa 15mg di olio, conservato in soluzione di esano/isopropanolo 3:1 (v/v), vengono messi in provetta e portati a secco ponendoli a 40°C e in corrente di N. L'olio ottenuto viene pesato, diluito con *n*-esano fino ad ottenere una concentrazione di 12mg ml⁻¹ e transesterificato con un eccesso di soluzione metanolica di KOH 2N secondo le seguenti proporzioni: 50mg di olio, 100µl di MeKOH 2N poi, vengono aggiunti 50µl di standard interno C13:0.

Una lastra TLC di silice, preventivamente trattata con una soluzione di AgNO₃ 10% (p/v) e attivata per 30' in stufa a 110°C, viene seminata con un quantitativo di surnatante equivalente a 2mg di metilesteri e, successivamente, viene messa per 45' in sviluppo in un'apposita camera di vetro contenente una soluzione di eluizione *n*-esano/etere 9:1 (v/v). Terminato lo sviluppo, la visualizzazione delle bande (secondo la disposizione di Fig. 5.15) è stata ottenuta mediante nebulizzazione della lastra con una soluzione metanolica di 2',7'- diclorofluoresceina sale sodico (0,1%, p/v) e osservazione sotto lampada UV (254nm).

Le bande riconoscibili sono state asportate dalla TLC ed estratte con cloroformio. La soluzione ottenuta, dopo essere stata portata a secco in corrente di N, viene ridiluita con 50µl di esano ed 1µl viene iniettato a gas-cromatografo utilizzando le stesse impostazioni usate per la caratterizzazione della composizione acidica.

Per ogni campione sono state eseguite 4 iniezioni: campione totale, banda dell'acido oleico, banda dell'acido erucico e banda dei saturi. Dalla comparazione delle aree dello standard e degli acidi grassi nel totale e nelle bande è stato possibile quantificare sia la concentrazione degli acidi grassi nelle bande sia il quantitativo di C in ogni banda.

5.2.8 Misure di Discriminazione Isotopica del Carbonio

La determinazione dei rapporti isotopici del carbonio è stata eseguita sugli zuccheri e sugli esteri metilici degli acidi grassi estratti in precedenza dai campioni vegetali disponibili considerando, per il carbonio del CH₃ derivato da metilazione, il rapporto isotopico statistico.

Le analisi sono state realizzate con uno spettrometro di Massa isotopica Thermo Fisher, mod. Delta Plus accoppiato ad un analizzatore elementare NA 1500 Carlo Erba.

Una quantità di campione, dipendente dalla sua concentrazione in C, è stata posta in capsule di stagno ed essiccata completamente. Successivamente, dopo averle chiuse, le capsule vengono combuste all'interno dell'analizzatore elementare a circa 1030°C. I prodotti di combustione (CO₂, N₂, NO_x e H₂O) vengono trasportati con un flusso di elio all'interno di una colonna di perclorato di magnesio che trattiene l'H₂O, poi in un tubo di riduzione che riduce gli ossidi di azoto a N₂ ed infine, in una colonna cromatografica che separa N₂ dalla CO₂. Azoto e Anidride carbonica, così separati, vengono trasportati dal flusso di elio, mediante interfaccia capillare, allo spettrometro di massa che procede alla quantificazione degli isotopi mediante intercettazione degli stessi in gabbie di Farady specifiche per ogni massa isotopica.

I rapporti isotopici dei campioni vengono calcolati in base a quelli di CO₂ di riferimento calibrata per mezzo dello standard universale VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite). Infine, per tutte le analisi è stata utilizzata la tecnica di spettrometria di massa isotopica a flusso continuo (CF-IRMS nella versione inglese, continuous flow-isotope ratio mass spectrometry), che ha consentito una maggiore precisione di analisi anche su campioni di così piccola entità.

5.3 ANALISI STATISTICA

Esperimenti agronomici a pieno campo

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il test della varianza (ANOVA) tenendo separati i due anni. La scelta di non raggruppare le due annate è dovuta alla mancanza di omogeneità delle varianze anche in seguito a trasformazione logaritmica dei dati elementari (test di Bartlett). Pur tuttavia, vista la disomogeneità climatica nel corso delle due annate, si è ritenuto non meno interessante discutere le riposte produttive delle due colture a specifiche condizioni ambientali. Ciò giustifica anche la scelta di non ricorrere a test non parametrici che, malgrado la minore potenza statistica, avrebbero permesso di raggruppare le due annate.

L'analisi della varianza è stata realizzata mediante il pacchetto statistico CoStat 6.311 (CoHort software Ltd, USA) utilizzando la funzione adatta a schemi distributivi parcellari a split-plot. Le parcelle erano infatti disposte secondo tale schema, in 4 blocchi ripetuti, con parcelle principali riservate alla modalità di raccolta (R1 e R2) e sub-parcelle alle 4 varietà. Nei casi in cui il test ANOVA ha restituito differenze significative ($P \leq 0.01$ o

≤ 0.05) si è proceduto alla separazione statistica delle medie mediante test LSD di Fisher ($P \leq 0.05$).

Esperimenti in ambiente controllato

Due trattamenti a diversa illuminazione (L1 ed L2) sono stati applicati ad un totale di 24 piante, ciascuna rappresentante una ripetizione ($n=12$), poste in camere di crescita in maniera randomizzata. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il pacchetto software SigmaStat, con ovvia modifica del criterio di analisi in relazione al presente disegno sperimentale. La separazione delle medie è stata condotta mediante test di Tukey che risulta più robusto nell'individuare eventuali differenze significative nel caso in esame. L'effetto dell'irradianza è stato valutato, oltre che sulla totalità della pianta, anche in 6 porzioni di pianta sovrapposte, 3 interessanti le foglie e 3 le silique. In tal caso sono stati quindi esaminati anche gli effetti significativi ($P \leq 0.05$) derivanti dall'interazione fra livello di radiazione e porzione della pianta.

6. RISULTATI

I risultati ottenuti nel triennio di sperimentazione 2004-2007, sono di seguito organizzati in due distinte sezioni di studio: nella prima sono esposti gli aspetti agronomici analizzati con le prove in campo nel biennio 2004-2006 mentre nella seconda, vengono descritti gli aspetti eco-fisiologici indagati in ambiente controllato nell'annata 2006-2007. In questa maniera si sviluppa un quadro di lettura completo sulle problematiche della produttività delle Brassicaceae, affrontandone dapprima gli aspetti legati alla tecnica agronomica e, successivamente, alcuni aspetti eco-fisiologici legati alla fisiologia di formazione degli oli.

6.1 ASPETTI AGRONOMICI

6.1.1 Ciclo Vegetativo, Investimento e Biometria

Nelle due annate di sperimentazione in campo, la durata complessiva del ciclo vegetativo (da emergenza a maturazione) si è diversificata sia fra le specie che nella durata delle singole fasi fenologiche.

In entrambe le annate, come atteso, *B. napus* (var. Azuma 156 e Golden) è risultata più precoce rispetto a *B. carinata* (var. CT204 e ISCI7) rispettivamente di 9 giorni nel 2005 e 14 nel 2006. In particolare, nel primo anno, a *B. napus*, per completare il ciclo, si sono resi necessari 231 giorni e 240 per le *B. carinata*, rispettivamente 6 e 11 giorni in meno rispetto al secondo anno (Fig 6.1).

In entrambe le annate il ciclo vegetativo è stato caratterizzato da una fase iniziale di crescita (da emergenza a inizio levata - E-C2) molto lunga, ma, mentre nel 2005 entrambe le specie hanno completato la fase in 134 giorni, nella seconda le *B.napus* hanno impiegato in media 5 giorni in più rispetto alle *B.carinata* per un totale di 143 giorni.

Alla ripresa vegetativa, verificatasi a metà marzo in entrambi gli anni, anche le fasi di induzione a fiore (C2-D1) e fioritura (D1-D2), hanno presentato differenze fra specie e annate. Le *B. napus* hanno raggiunto la fioritura (F2) più precocemente impiegando

mediamente 35 giorni nel 2005 e 30 nel 2006, ovvero 13 e 15 giorni in meno rispetto alle *B. carinata* (Fig. 6.1).

Analogamente, nell'ultima fase del ciclo (da formazione silique a maturazione - G1-M), sono state riscontrate delle differenze. Infatti, mentre *B. napus* ha impiegato mediamente, in entrambe le annate, 59 giorni per raggiungere la maturazione, *B. carinata* ne ha impiegati 54 nel 2005 e 64 giorni nel 2006.

Tali differenze, sono interessanti soprattutto andando a scomporre il periodo sopracitato nelle due fasi critiche di formazione del seme: riempimento (G1-G5) e maturazione (G5-M).

In particolare, nel 2005 G1-G5 è durata in media 46 giorni per tutte le varietà in prova, circa 4 giorni in meno rispetto alla media del 2006 (Fig. 6.1). Da notare inoltre

come, nella seconda annata, vi sia stata un'interessante differenziazione fra le due acces-

sioni di *B. carinata*, infatti, CT 204 è risultata la varietà più tardiva con una durata media della fase di 53 giorni, 5 in più rispetto alle altre varietà.

Anche la durata della maturazione è risultata molto interessante poiché per le *B. napus* è stata analoga nelle due annate (mediamente 10 giorni) a differenza delle *B. carinata* le quali, nella prima annata hanno impiegato circa 8 giorni mentre, nella seconda, quasi il doppio (mediamente 14 giorni) (Fig. 6.1).

L'investimento medio all'emergenza è risultato diverso nelle due annate con differenze significative fra le varietà: nel 2005 è stato rilevato un investimento medio di 98 piante m⁻²; nel 2006 in R1 è risultato di 72 piante m⁻² mentre in R2 di 63 piante m⁻² (Tab. 6.1), quindi mediamente 30 piante in meno rispetto l'anno precedente.

Tuttavia, nonostante queste differenze iniziali, per effetto di una maggiore sopravvivenza delle piante nell'annata 2006 rispetto alla precedente (rispettivamente 82.6% e 61.6% nel

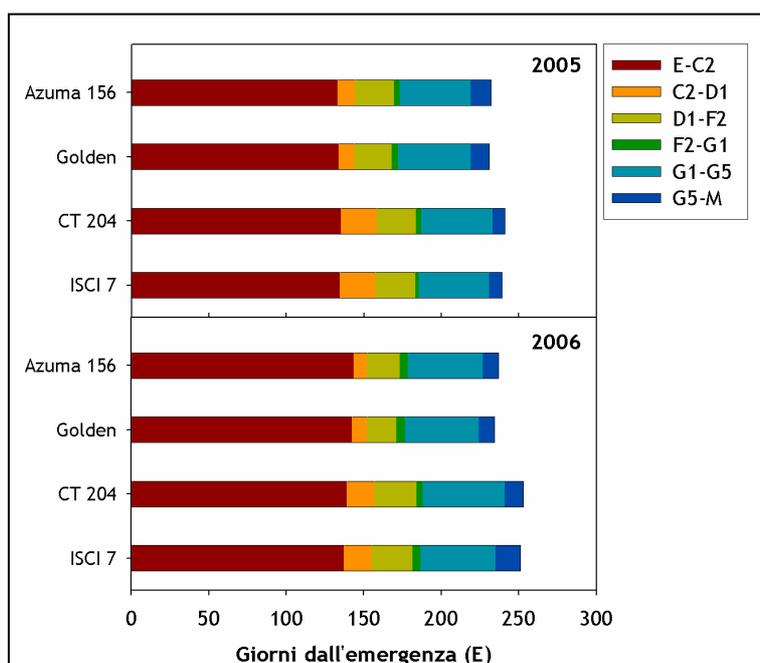


Fig. 6.1: Durata delle fasi fenologiche delle varietà di *B.napus* (Azuma 156 e Golden) e *B.carinata* (CT204 e ISCI7) in prova nelle annate 2005 e 2006. La classificazione fenologica di riferimento utilizzata è quella proposta dal CETIOM per le Brassicaceae.

periodo E-M), l'investimento medio alla raccolta è risultato simile nelle due annate (60 piante m⁻² nel 2005 e 56 piante m⁻² nel 2006) col valore molto vicino a quello teoricamente ottimale per le Brassicaceae (60-70 piante m⁻² - Tab. 6.1)

Per quanto riguarda la sopravvivenza durante il ciclo vegetativo (periodo E-M), nell'anno 2005 si sono state riscontrate differenze significative fra le varietà: le accessioni di *B. carinata* si sono dimostrate mediamente più sensibili all'autodiradamento (56% di sopravvivenza) rispetto a quelle di *B. napus* (65% di sopravvivenza) (Tab. 6.1).

Varietà	Specie	Annata 2004-2005									Annata 2005-2006								
		Inv. (E)			Inv. (M)			Sopr. (E-M) (%)			Inv. (E)			Inv. (M)			Sopr. (E-M) (%)		
		R1	R2	M	R1	R2	M	R1	R2	M	R1	R2	M	R1	R2	M	R1	R2	M
Azuma 156	<i>Bn</i>	84	79	81	47	43	45	57	55	56	61	57	59	51	50	50	85	87	86
Golden	<i>Bn</i>	99	99	99	82	75	78	82	75	79	85	65	75	70	54	62	82	83	82
CT 204	<i>Bc</i>	113	126	119	58	57	57	50	45	47	59	56	57	44	48	46	74	86	80
ISCI 7	<i>Bc</i>	102	82	92	71	50	60	70	60	65	84	74	79	70	60	65	83	80	82
Media		99	96	98	65	56	60	65	59	62	72	63	68	59	53	56	81	84	83
	Varietà	**			**			**			**			**			ns		
	Raccolta	ns			ns			ns			*			*			ns		
	VxR	ns			ns			ns			ns			ns			ns		

Tab. 6.1: Investimento all'emergenza Inv. (E), Investimento alla maturazione Inv. (M) e Sopravvivenza durante il ciclo vegetativo Sopr.(E-M) nelle annate 2004-2005 e 2005-2006. L'investimento è espresso in piante m⁻² mentre, la sopravvivenza in % di piante vive rispetto all'investimento all'emergenza.

Per quanto riguarda la biometria, infine, sono stati presi in considerazione altezza e ramificazioni a completo sviluppo.

L'altezza ha presentato significative differenze sia negli anni che fra le varietà. Le *B. carinata* hanno avuto un accrescimento medio maggiore rispetto alle *B. napus* di circa 30 cm. Inoltre, R1 è risultata mediamente più alta di R2 in tutte le varietà in entrambi gli anni. Confrontando le varietà, le uniche differenze sono emerse in carinata con la varietà ISCI 7 più alta di circa 20 cm rispetto a CT 204 (Tab. 6.2).

Varietà	Specie	Annata 2004-2005						Annata 2005-2006					
		Altezza (cm)			Ramificazioni (n°)			Altezza (cm)			Ramificazioni (n°)		
		R1	R2	M	R1	R2	M	R1	R2	M	R1	R2	M
Azuma 156	<i>Bn</i>	131	121	126	8	6	7	130	114	122	7	4	6
Golden	<i>Bn</i>	126	121	124	5	5	5	122	121	121	5	4	4
CT 204	<i>Bc</i>	153	143	148	15	8	12	144	142	143	8	8	8
ISCI 7	<i>Bc</i>	173	163	168	12	11	12	164	165	164	10	10	10
Media		146	137	141	10	8	9	140	135	137	8	7	7
	Varietà	**			*			**			**		
	Raccolta	**			ns			*			ns		
	VxR	ns			ns			*			ns		

Tab. 6.2: Altezza e Ramificazioni ad accrescimento completo nelle annate 2004-2005 e 2005-2006. L'altezza è espressa in cm mentre, le ramificazioni in n° per pianta..

Il numero di ramificazioni per pianta è risultato significativamente differente fra le specie con le accessioni di *B. napus* meno ramificate di quelle di *B. carinata* (Tab. 6.2).

6.1.2 Produzione

La produzione potenziale di semi (ovvero la produzione ottenuta raccogliendo e sgranando a mano un m² di piante) si è diversificata fra le varietà in entrambi gli anni e, solo nel 2005, anche fra le raccolte. La potenzialità produttiva della prima annata è risultata

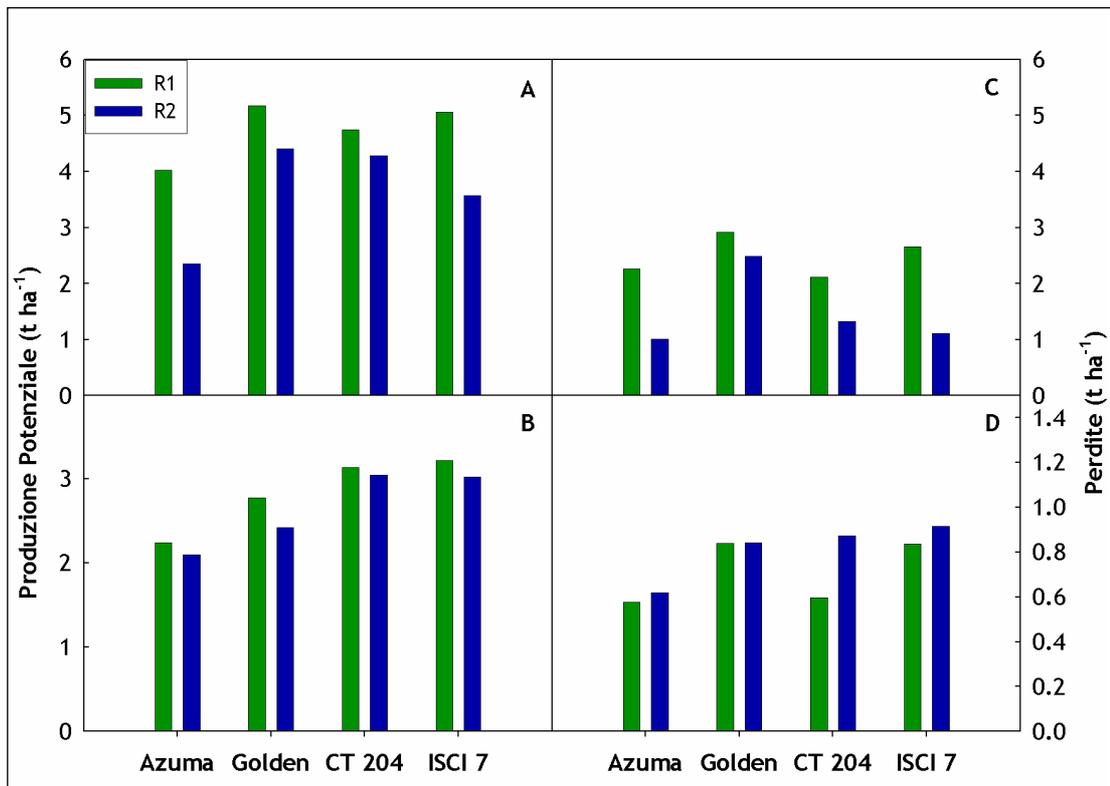


Fig. 6.2: Produzione potenziale nelle annate 2004-2005 (A) e 2005-2006 (B) e Perdite alla raccolta nelle annate 2004-2005 (C) e 2005-2006 (D).

mediamente maggiore rispetto a quella della seconda (4.2 t ha⁻¹ per il 2005 e 2.7 t ha⁻¹ nel 2006), inoltre le varietà di *B. carinata* (4.4 t ha⁻¹ nel 2005 e 3.1 t ha⁻¹ nel 2006) sono risultate in media più produttive di quelle *B. napus* (4 t ha⁻¹ e 2.4 t ha⁻¹) (Fig. 6.2a,b).

Nell'annata 2005, R1 ha mostrato in tutte le varietà una potenzialità produttiva significativamente maggiore rispetto a R2 (in media 4.8 t ha⁻¹ nel 2005 e 3.7 t ha⁻¹ nel 2006). Sussistono però significative differenze fra varietà: fra le *B. carinata*, ad esempio, ISCI 7 in R1 è risultata più produttiva di CT204, viceversa, in R2, è risultata più produttiva CT204 (Fig. 6.2a). Fra le *B. napus*, invece, la varietà migliore è stata, in entrambe le raccolte, Golden con potenzialità produttive paragonabili a quelle di ISCI7. Azuma 156,

infine, è risultata la varietà con la potenzialità produttiva minore in entrambe le raccolte (Fig. 6.2a).

Nell'annata 2006, invece, non ci sono state differenze significative nella produttività potenziale delle due raccolte. Come nell'annata precedente, la migliore potenzialità è stata espressa da ISCI7 (in media 3.1 t ha^{-1}) nelle *B. carinata* e Golden (in media 2.6 t ha^{-1}) nelle *B. napus* mentre la varietà a più bassa potenzialità è risultata nuovamente Azuma 156 (2.2 t ha^{-1}). CT 204, infine, ha dimostrato una potenzialità analoga a quella di ISCI7 (3 t ha^{-1}) e, a differenza dell'annata precedente, maggiore rispetto a Golden (Fig. 6.2b).

Per differenza fra produzione potenziale e reale, sono state quantificate le perdite alla raccolta. Come già visto per la produzione potenziale anche le perdite sono risultate diverse fra le due annate. Nel 2005, ma non nel 2006, sono riscontrabili differenze significative nelle perdite in funzione delle varietà e delle raccolte.

L'annata 2005, è stata caratterizzata da un quantitativo di perdite in media oltre 2 volte superiore rispetto a quelle del 2006 (1.98 t ha^{-1} nel 2005 e 0.76 t ha^{-1} nel 2006) con differenze fra le raccolte di circa 1 t ha^{-1} (2.5 t ha^{-1} in R1 e 1.5 t ha^{-1} in R2) (Fig 6.2c e 6.2d).

Fra le varietà, quelle che hanno subito maggiori perdite in R1 sono state Golden e ISCI7 (rispettivamente 2.92 e 2.65 t ha^{-1}). E' interessante inoltre notare che anche in R2 Golden è stata la varietà con maggiori perdite (2.48 t ha^{-1}) mentre le altre hanno avuto perdite minori rispetto a R1 e pressoché analoghe fra loro (Fig 6.2c e 6.2d).

L'annata 2006 è stata caratterizzata da perdite medie di 0.8 t ha^{-1} in entrambe le raccolte senza sostanziali differenze fra le varietà.

Per effetto delle diverse produttività potenziali e delle perdite alla raccolta, la produzione reale di seme, cioè quella ottenuta con raccolta meccanizzata convenzionale, è risultata diversa fra varietà, modalità di raccolta e annata.

In particolare, nel 2005, si è avuta una produttività media di 2.2 t ha^{-1} con differenze significative solo fra le varietà: la varietà più produttiva è risultata CT204 con 2.8 t ha^{-1} , la meno produttiva Azuma 156 con 1.5 t ha^{-1} . Più in generale le *B. carinata* si sono dimostrate più produttive con rese di seme medie superiori di quasi 1 t ha^{-1} rispetto a quelle delle *B. napus* (rispettivamente 2.6 t ha^{-1} e 1.8 t ha^{-1}) (Fig. 6.3).

L'annata 2006, invece, è stata caratterizzata da produzioni mediamente inferiori rispetto al 2005 dell'11%, con modeste, ma statisticamente significative differenze tra raccolte e tra varietà. R1 è risultata mediamente più produttiva di 0.4 t ha^{-1} rispetto a R2 in tutte le varietà (rispettivamente 2.1 t ha^{-1} e 1.8 t ha^{-1}) (Fig. 6.3).

Fra le varietà, come nell'annata precedente, CT204 è risultata la più produttiva in tutte e due le raccolte (2.53 t ha⁻¹ in R1 e 2.17 t ha⁻¹ in R2), mentre Azuma 156 la meno produttiva (1,7 t ha⁻¹ in R1 e 1.5 t ha⁻¹ in R2). Più in generale, anche nel 2006 le *B. carinata* sono risultate più produttive delle *B. napus* in media di circa 0.6 t ha⁻¹ in entrambe le raccolte (Fig. 6.3).

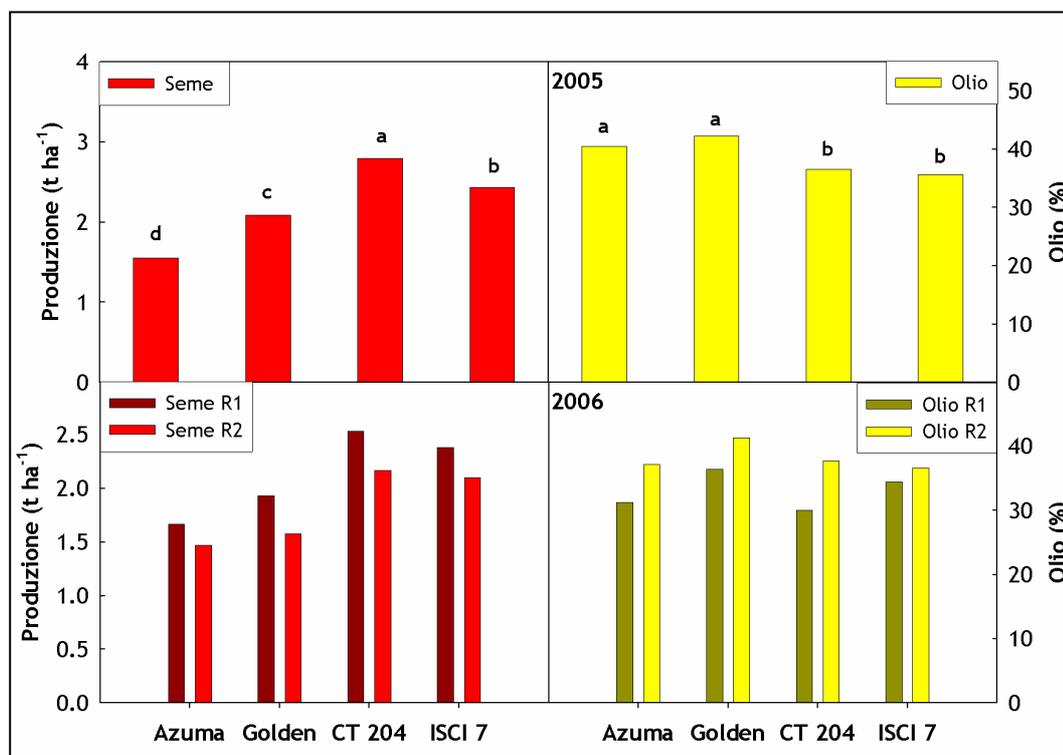


Fig. 6.3: Produzione di seme e contenuto di olio negli anni 2005 e 2006.

Il contenuto di olio nel seme, si è diversificato fra le varietà, le raccolte e gli anni. Nel 2005 è stato accumulato in media più olio rispetto al 2006 (38.7% contro 35.6%).

Nel 2005 la differenza d'accumulo di olio si è registrata solo fra le specie poiché all'interno di esse le varietà si sono equivalse. Le *B. napus*, hanno accumulato circa il 5% in più di olio rispetto alle *B. carinata* (rispettivamente 41% e 36%) (Fig.6.3).

Nel 2006 *B. napus* ha accumulato più olio rispetto a *B. carinata* sebbene la differenza fra le due specie sia risultata minore e pari a circa al 2% (in media 36.5% per *B. napus* e 34.7% per *B. carinata*) (Fig. 6.3).

Solo nell'annata 2006, inoltre, si è evidenziata una differenza di accumulo di olio correlabile alla raccolta: infatti vi è stato un maggiore accumulo di olio in R2 rispetto ad R1 con una differenza fra le due raccolte di circa 5% (in media 38% in R2 e 33% in R1). Significativa è anche l'interazione fra varietà e raccolta poiché, tutte le accessioni hanno accumulato più olio in R2 rispetto a R1 tranne la ISCI 7 che non ha presentato sostanziali differenze accumulato.

6.1.3 Qualità

In entrambe le annate non si sono avute differenze significative fra le composizioni acide in relazione alle raccolte, ma solamente in relazione alle varietà.

Nella prima annata, l'olio di *B. napus* è risultato più ricco di acidi grassi monoinsaturi rispetto a quello di *B. carinata* (rispettivamente 66.1% e 53.4%), che, per contro è risultato più ricco di acidi grassi polinsaturi (rispettivamente 34.2% e 23.8%).

Fra i monoinsaturi, inoltre, è risultato molto interessante ai fini della caratterizzazione della qualità dell'olio il rapporto fra acido erucico ed acido oleico.

L'acido erucico, in particolare, è risultato presente in quantità maggiore in tutte le varietà sebbene, fra queste, vi siano differenze significative. Azuma 156 e CT204, infatti, hanno mostrato un contenuto di acido erucico simile fra loro e pari al 40%, superiore di circa l'8% rispetto alle altre due varietà in prova (Fig. 6.4). Anche l'acido oleico, come l'erucico, è risultato significativamente differente fra le varietà e, tra queste, Golden è risultata quella con il contenuto maggiore (24%). Da notare, inoltre come entrambe le *B. carinata* abbiano avuto il minor contenuto di acido oleico (10.2%) e, per questo motivo, il loro rapporto fra erucico e oleico è risultato maggiore rispetto a quello delle *B.napus* (Fig. 6.4).

Come nella prima, anche nella seconda annata l'olio di *B. napus* è risultato più ricco di acidi grassi monoinsaturi rispetto a quello di *B. carinata* (rispettivamente 61.9% e 52.5%). Tuttavia, rispetto al 2005, la quantità di monoinsaturi è diminuita mediamente di circa il 2%, con cali più importanti per le *B. napus* rispetto alle *B. carinata*. Per contro, i polinsaturi sono invece aumentati mediamente del 4.7% in entrambe le varietà (Fig. 6.5).

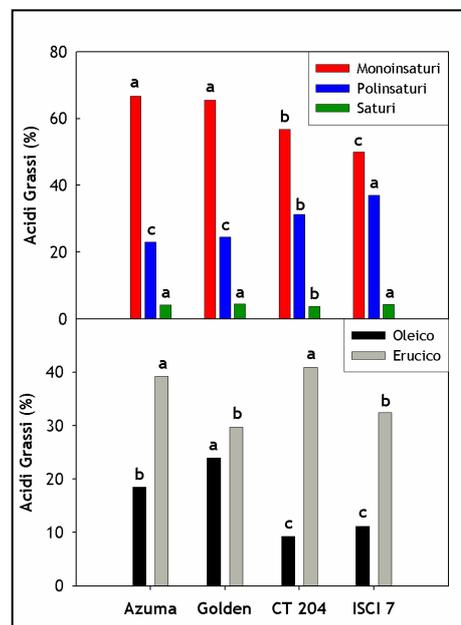


Fig. 6.4: Composizione acidica degli oli e contenuto di acido erucico e acido oleico nell'annata 2004-2005.

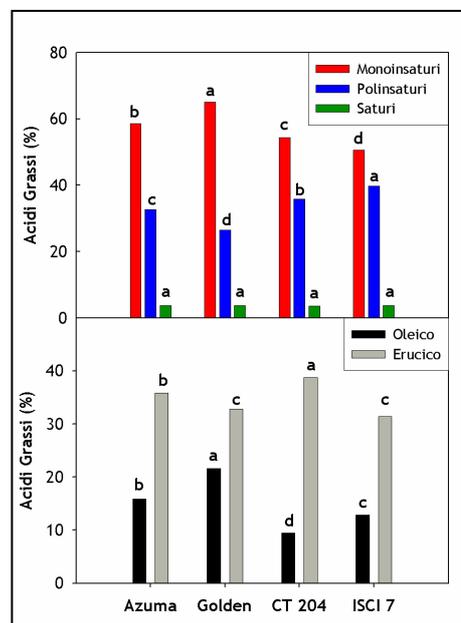


Fig. 6.5: Composizione acidica degli oli e contenuto di acido erucico e acido oleico nell'annata 2005-2006.

Tale diminuzione dei monoinsaturi, comunque, non si è ripercossa sul rapporto fra acido erucico e oleico che è rimasto pressochè analogo a quello dell'annata precedente.

Anche nel 2006, inoltre, sia acido oleico che acido erucico sono risultati significativamente differenti fra le varietà. A differenza del 2005, tuttavia, il maggiore contenuto di acido erucico è stato mostrato solo da CT204 (38.7%) che, inoltre, ha registrato anche il minore contenuto di acido oleico (9.5%) (Fig. 6.5). Per quanto riguarda l'acido oleico, come nel 2005, Golden è risultata la varietà con il contenuto maggiore (21.6%) e, più in generale, le differenze con le altre varietà sono rimaste pressochè invariate rispetto all'annata precedente (Fig. 6.5).

6.2 TEST IN AMBIENTE CONTROLLATO

6.2.1 Monitoraggio dei Parametri Ambientali

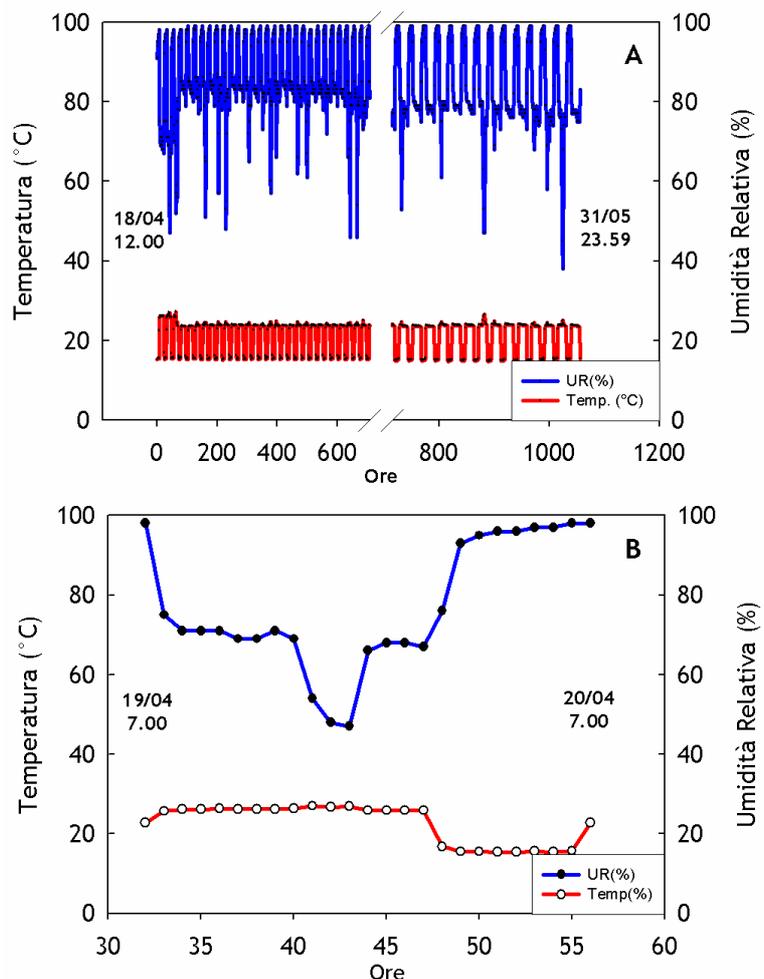
Durante tutto il periodo di prova sono stati monitorati diversi parametri ambientali: temperatura, umidità relativa e concentrazione di CO₂ sono stati rilevati in continuo; l'estinzione della luce lungo il profilo della pianta è stata rilevata all'inizio, in un momento intermedio ed alla fine della prova.

L'andamento di umidità relativa è stato regolare oscillando fra il 75% di giorno e il 98% di notte. Temporanee variazioni del normale andamento sono state causate dalla inevitabile presenza di operatori nella cella (Fig. 6.6a). Le temperature si sono sempre mantenute prossime ai valori impostati anche durante la presenza di operatori in cella (Fig. 6.6).

Dai rilievi di intensità luminosa, il valore massimo di PAR disponibile alla fonte luminosa (160cm da terra) è stato di 260 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in L1 e 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in L2.

Differente fra i due trattamenti è risultata anche la

trasmissione lungo il profilo della pianta. In particolare, nel rilievo del 16/04, l'estinzione è stata pressochè analoga fra i due trattamenti fino ad un'altezza di 110cm in cui è risultato disponibile poco più del 40% del PAR iniziale. Tale andamento è da mettere in relazione all'analogo sviluppo degli strati S3 e S2 in entrambe le illuminazioni. Scendendo ancora lungo il profilo, L1 ha mostrato valori di trasmissione minori rispetto a quelli di L2 fino al livello di terra dove il PAR disponibile nei due trattamenti è risultato 5% in L1 e 16% in



tutto il periodo di prova in cella (A) e durante una sola giornata tipo (B). Il tempo è espresso in ore dall'inizio del trattamento.

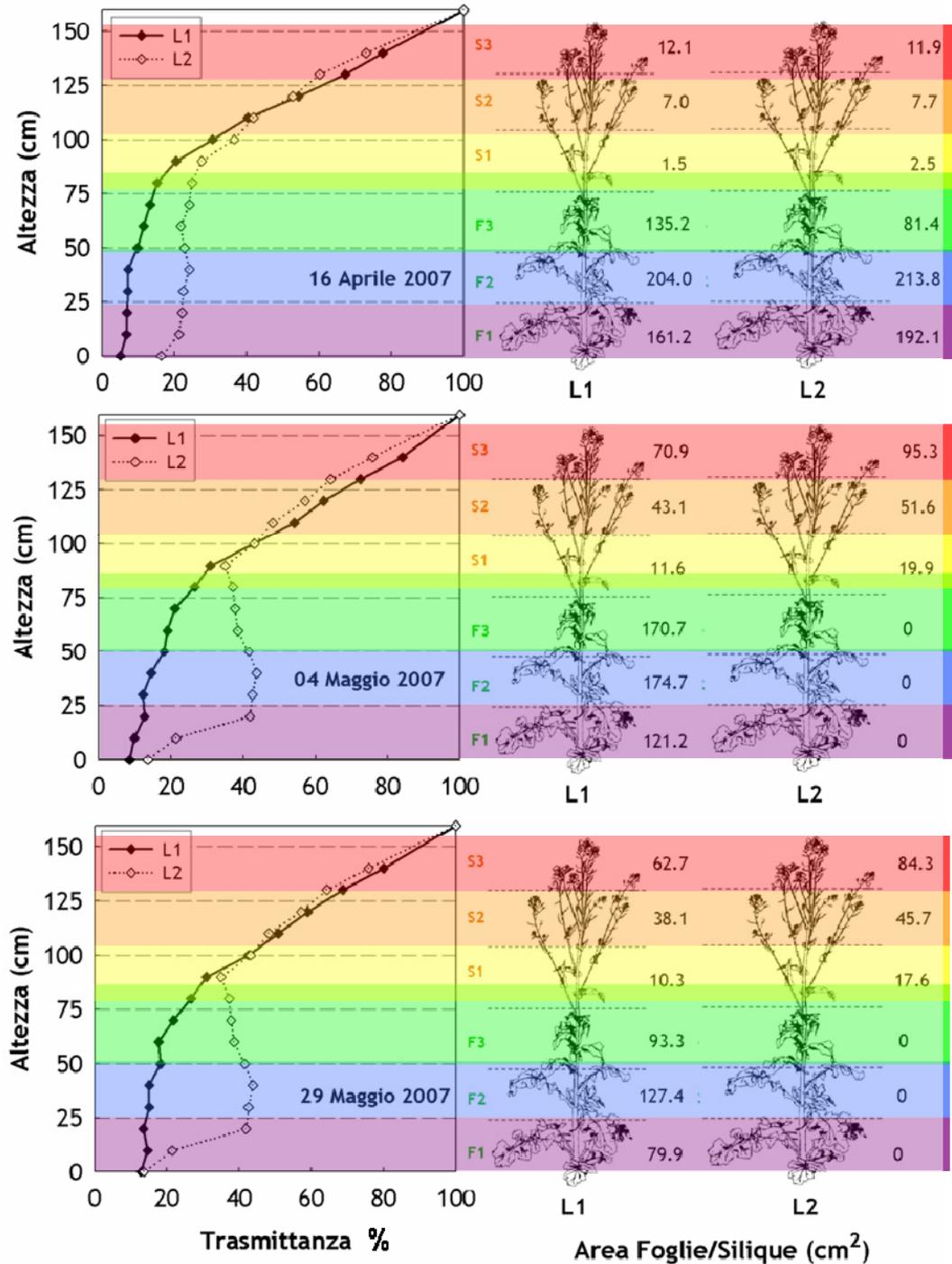


Fig. 6.7: A sinistra la Trasmittanza (%) misurata nella cella in funzione dell'altezza e del tipo di trattamento. A destra la superficie totale fogliare e delle silique negli strati di pianta interessati dai rilievi.

L2 (Fig. 6.7). In quest'ultimo, inoltre, il livello di trasmittanza è stato costantemente superiore a quello di L1 in media di circa 13% da 75 cm a terra. Tale differenza, considerato lo sviluppo dei vari strati fogliari pressochè analogo fra i due trattamenti, si può spiegare esclusivamente attraverso l'effetto dell'illuminazione laterale in L2 (Fig. 6.7).

Nei rilievi successivi (04/05 e 29/05) l'andamento dell'estinzione luminosa è stato pressochè analogo e, a differenza del primo rilievo, l'estinzione della luce è stata superiore in L2 rispetto a L1 fino a circa 100cm da terra anche in relazione al maggiore sviluppo di S1, S2 e S3 in L2. Da 100cm fino a terra, invece, le differenze di trasmittanza fra i due livelli di illuminazione sono risultate maggiori rispetto al 16/04 ed in particolare, in L2 il PAR disponibile è risultato pressochè costante su valori medi attorno al 40%, doppi rispetto ai valori riscontrati in L1 (Fig. 6.7). Le maggiori differenze di assorbimento di luce da parte di L2 rispetto a L1 da 75cm fino terra, si possono spiegare da una parte con la presenza dell'illuminazione laterale e dall'altra con l'assenza di foglie negli strati F1, F2 e F3 nel trattamento L2. Da notare, inoltre, come, a fine ciclo (29/05), la progressiva riduzione dell'area fogliare in F1, F2 e F3 anche in L1 coincide con valori di assorbenza maggiori (17%) a livello di terra rispetto all'annata precedente (Fig. 6.7).

Va rilevato che, l'andamento di trasmittanza riportato per le due situazioni non tiene conto dell'inclinazione delle foglie più o meno perpendicolarmente ai raggi di luce provenienti dalla sorgente laterale, e quindi riflette solo parzialmente la quota reale di PAR disponibile in L2. Al fine di valutare la sottostima potenziale del livello di luce in L2 nei vari strati, la trasmittanza è stata rilevata anche ponendo i sensori di PAR in maniera ortogonale alla sorgente di luce laterale in presenza di piante a completo sviluppo fogliare o defogliate (Fig. 6.7b). Ovviamente i due andamenti rappresentano due situazioni estreme con foglie

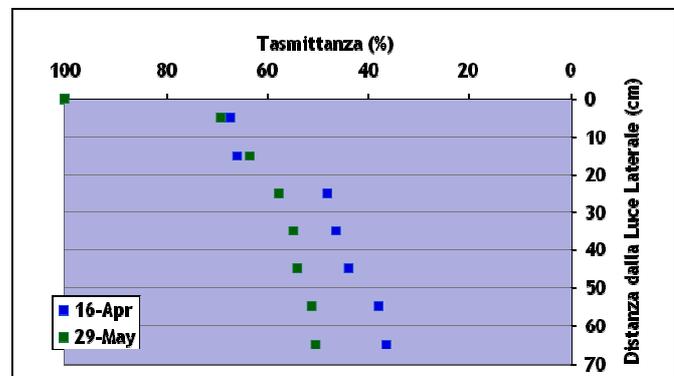


Fig. 6.7b: Livello di trasmittanza in funzione della distanza dalla fonte luminosa laterale.

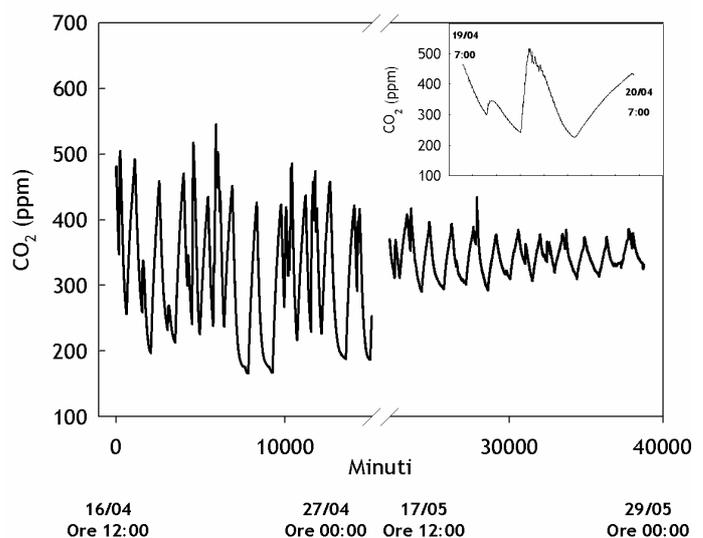


Fig. 6.8: Andamento della concentrazione di CO₂ nella cella durante tutto il periodo di prova (sinistra) e in una giornata tipo (destra).

perpendicolari alle sorgenti verticali e orizzontali; in realtà le foglie hanno conformazione parzialmente prostrata per cui il livello di sottostima è intermedio alla somma dei valori PAR provenienti dalle due misurazioni e parzialmente compensato dalla quota variabile di luce, comunque intercettata, proveniente dalla sorgente laterale.

La concentrazione di CO₂ nell'ambiente è risultata in media sui 400ppm con una grande variabilità dovuta all'alternanza buio/luce e allo sviluppo della pianta. In particolare, nel periodo dal 16/04 al 27/04 è stata rilevata una variabilità maggiore (in media da 500ppm di notte a 280ppm di giorno) poiché le piante erano al massimo sviluppo sia di silique che di foglie. Nel periodo successivo (dal 17/05 al 29/05), la variabilità è risultata minore (in media 400ppm di notte e 300ppm di giorno) a causa della diminuzione di superficie fogliare sintetizzante soprattutto in L2 (Fig. 6.8). La presenza occasionale dell'operatore in camera di crescita ha anche causato un aumento temporaneo di CO₂ (Fig. 6.8).

6.2.2 Aspetti Ecofisiologici

6.2.2.1 Sviluppo della Pianta e Caratteri Morfologici

Il regime luminoso ha influito considerevolmente sulla durata delle fasi fenologiche (Fig. 6.9). Il ciclo fenologico dell'annata 2007 si può considerare composto di due diverse macrofasi: macrofase di allevamento, comune ai due trattamenti fino alla formazione delle silique e la macrofase di riempimento seme e maturazione.

Nella macrofase di allevamento, la fase fenologica di fioritura (F2) è stata rilevata dopo 159 giorni dall'emergenza e il trattamento è iniziato in fase G1 13 giorni dopo. Complessivamente, quindi, la fase E-G1 ha avuto una durata di 172 giorni (Fig. 6.9).

Nel primo periodo, tutte le piante hanno manifestato ovviamente la stessa durata di fasi fenologiche, invece, per effetto del trattamento luminoso, la durata del periodo di

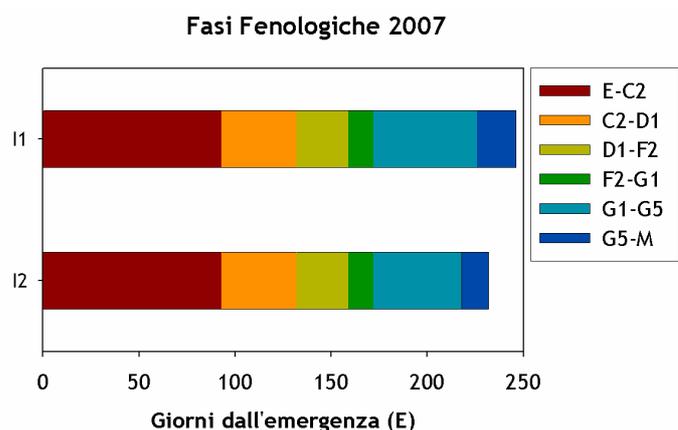


Fig. 6.9: Confronto delle durate delle fasi fenologiche nei due diversi trattamenti luminosi. La classificazione fenologica di riferimento utilizzata è quella proposta dal CETIOM per le Brassicaceae.

riempimento seme (G1-G5) è risultata più lunga di 8 giorni in L1 rispetto a L2 (54 giorni L1 e 46 giorni L2). Analogamente al periodo di riempimento seme, anche il periodo di maturazione è risultato più lungo in L1 (20 giorni) rispetto ad L2 (14 giorni) (Fig. 6.9).

In totale la differenza fra le durate complessive del ciclo fenologico nelle due differenziazioni luminose è stata di ben 14 giorni (246 giorni per L1 e 232 giorni per L2); la fase di riempimento seme si è conclusa dopo 67 giorni dalla fioritura in L1 e dopo 59 giorni in L2 ed infine, la maturazione è avvenuta dopo 87 giorni dalla fioritura in L1 e dopo 73 giorni in L2 (Fig. 6.9).

Contrariamente alle differenze nella durata delle fasi fenologiche, a livello morfologico, non sono state rilevate differenze significative fra i trattamenti sia in altezza (in media 126.7cm) sia nel numero di ramificazioni (in media 9 ramificazioni per pianta).

Al primo rilievo biometrico (16/04) l'area fogliare complessiva è risultata in media 490cm², l'area delle silique 43cm² e l'area dei semi 2.8cm². Per contro, nei due rilievi successivi (27/04 e 14/05), e per tutta la durata del trattamento, l'accrescimento delle piante si è significativamente diversificato fra le due illuminazioni.

In particolare, l'area fogliare, nell'illuminazione L1 è rimasta pressochè costante fino al 14/05 (3° rilievo) su valori medi di circa 470cm² per poi decrescere a fine ciclo (29/05) a causa della senescenza, fino a valori di 300cm². Viceversa, nell'illuminazione L2, la senescenza fogliare è risultata molto anticipata tanto che, già da 29/04 (secondo rilievo), l'area fogliare è risultata dimezzata rispetto ad inizio trattamento (247.5 cm²). Sempre in L2 il processo di senescenza si è completato già in data 14/05 (le piante si presentavano completamente defogliante) (Fig. 6.10).

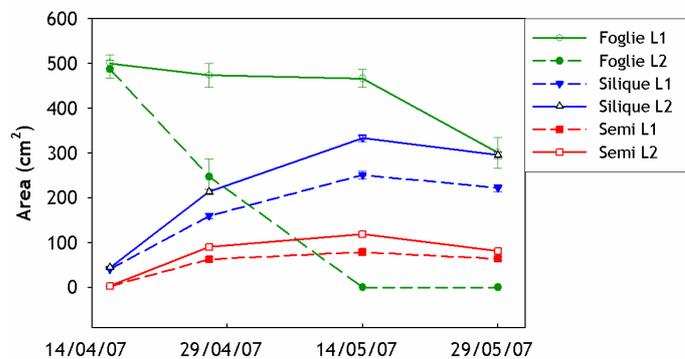


Fig. 6.10: Andamento dello sviluppo dell'area fogliare, delle silique e dei semi nei due trattamenti durante tutto il periodo di prova

Anche l'accrescimento delle silique si è differenziato significativamente fra le due illuminazioni sebbene l'andamento di crescita durante il ciclo sia risultato pressochè analogo. In particolare, le silique di L2 hanno mostrato un accrescimento maggiore rispetto a quelle di L1 già a partire dal 29/04 in cui la differenza fra i due trattamenti è stata di 53.8 cm² (rispettivamente 213.8 cm² in L2 e 160 cm² in L1) (Fig. 6.10).

Nel rilievo successivo (14/05), le silique hanno raggiunto il massimo accrescimento in entrambi i trattamenti con differenze ancora maggiori rispetto al periodo precedente (333.6 cm² in L2 e 251 cm² in L1) (Fig. 6.10).

Nell'ultimo rilievo, infine, in entrambi i trattamenti si è avuta una diminuzione dell'area delle silique dovuta probabilmente a perdita di acqua per senescenza e, nonostante ciò, la differenza rilevata fra i due trattamenti è rimasta pressochè invariata rispetto la precedente (295.4 cm² in L2 e 222cm² in L1) (Fig. 6.10).

L'accrescimento del seme ha seguito un andamento molto simile a quello delle silique con differenze significative fra i due trattamenti. In particolare, l'area dei semi di L2 è risultata maggiore rispetto a quella L1 in tutti i rilievi con una differenza massima fra i due di 40cm² riscontrata in data 14/05. Anche i semi, a fine ciclo, hanno avuto subito una diminuzione dell'area in relazione allo stato di maturazione e, in data 29/05 la loro estensione è risultata

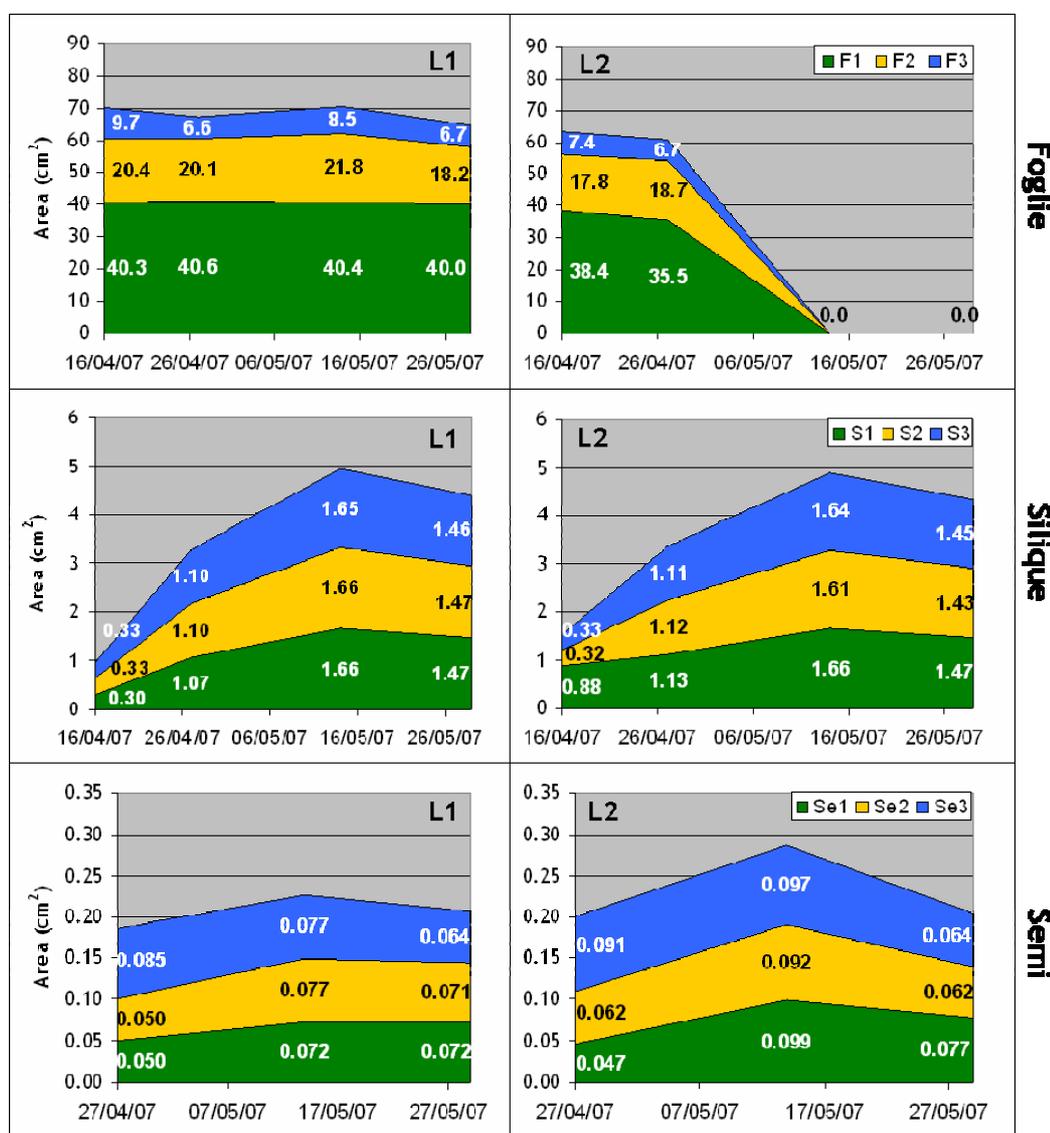


Fig. 6.11: Area specifica di foglie, silique e semi, in funzione dello strato, del tempo e del trattamento.

81 cm² in L2 e 64.1 cm² in L2 (Fig. 6.10).

L'estensione media fogliare, presenta differenze significative fra gli strati e in particolare, in ogni strato e in tutti i rilievi, le foglie di L2 sono risultate mediamente più piccole rispetto alle foglie di L1 (Fig. 6.11).

In particolare, in L1, l'estensione delle foglie di F1 è risultata in media il doppio rispetto a quella di F2 e 5 volte rispetto a quella di F3 (40.3cm² F1, 20.1cm² F2 e 7.9cm² F3). In L2, con analoghe proporzioni fra strati, la superficie fogliare prima della senescenza, confrontata coi risultati di L1, è in media minore e vale 38.5cm² in F1, 18.3cm² in F2 e 7cm² in F3 (Fig. 6.11).

Per quanto riguarda le silique, l'estensione media è risultata analoga fra gli strati e fra le illuminazioni, sebbene durante il trattamento siano rilevabili differenze fra i rilievi. In particolare, dal primo rilievo (16/04) in cui l'area media della siliqua è risultata 0.33cm², è stato raggiunto il massimo accrescimento al terzo rilievo (1.64cm²) a cui è seguito un calo fisiologico medio di 0.2cm² il 29/05 in relazione allo stato di maturazione (Fig. 6.11).

Va aggiunto che il modello allometrico utilizzato per la determinazione dell'area delle silique, essendo basato sulla proiezione bidimensionale delle stesse, non tiene conto del rigonfiamento delle silique dovuto alle maggiori o minori dimensioni dei semi in esse contenuti. Essendo la dimensione dei semi notevolmente variata nei due livelli (> in L2) è ipotizzabile che le superfici delle silique in L2 siano sottostimate rispetto ai valori reali.

Infine, l'andamento delle dimensioni del seme ha mostrato differenze esclusivamente fra gli strati a inizio e fine trattamento, e fra le illuminazioni a differenza solo nel rilievo intermedio. Nel primo rilievo, i semi di S3 sono risultati mediamente più grandi di quelli degli altri strati di circa 0.03cm² in tutti e due i trattamenti probabilmente in relazione alla scalarità di formazione delle silique. Nel rilievo intermedio, invece, è stato raggiunto lo sviluppo massimo del seme che è risultato analogo in tutti gli strati e maggiore in L2 rispetto a L1 in media di 0.02cm² (0.075 in L1 e 0.092 in L2) (Fig. 6.11).

Nell'ultimo rilievo (29/05), la grandezza del seme è risultata ancora mediamente analoga fra i trattamenti e diversa fra gli strati. In particolare, in entrambe le illuminazioni lo strato con i semi più grandi è risultato S1 (0.072 cm² in L1 e 0.077 cm² in L2) mentre S3 quello con i semi più piccoli (0.064 cm²) in entrambi i trattamenti. Particolare, invece, è stato S2 poiché in L1 è risultato analogo a S1 mentre in L2 a S3. Tali differenze sono probabilmente imputabili alla scalarità di maturazione nei diversi strati (Fig. 6.11).

In generale, la differenza fra trattamenti sulla superficie totale di silique è dovuta al maggior numero medio di silique (89 e 102 in L1 ed L2). Di conseguenza, anche il numero di semi è risultato maggiore in L2 rispetto ad L1 (952 e 1244, nell'ordine dato).

6.2.2.2 Parametri morfo-fisiologici della foglia (RWC, SLA e SPAD)

Fra i parametri morfo-fisiologici della foglia è stato possibile confrontare RWC, SLA nei due trattamenti solo nel primo rilievo poiché, nei successivi, la senescenza fogliare di L2 era già avanzata. Per questo motivo viene descritto l'andamento dei parametri durante il trattamento solamente per l'illuminazione L1. Anche lo SPAD è stato confrontabile solo nella prima parte del trattamento, ma il maggior numero di rilievi di questo valore ne hanno permesso un miglior confronto.

Nel primo rilievo lo SLA si è significativamente differenziato fra gli strati, ma non fra i trattamenti. In particolare, in F1 e F2 è risultato equivalente ed in media su valori di $37 \text{ m}^2 \text{ Kg}^{-1}$ mentre in F3 il valore medio è risultato essere $25 \text{ m}^2 \text{ Kg}^{-1}$.

Nonostante non vi siano differenze significative fra i trattamenti, i valori di L2 risultano mediamente inferiori di circa il 10% rispetto a quelli di L1.

Analizzando l'andamento dello SLA in L1 durante tutto il periodo di trattamento è possibile notare come in tutti i rilievi i valori di F1 e F2 siano sempre rimasti costanti mentre, in F3, si può notare un aumento progressivo da inizio trattamento fino a raggiungere a fine trattamento, un valore di $33 \text{ m}^2 \text{ Kg}^{-1}$ analogo a quello degli altri due strati (29/05) (Fig. 6.12).

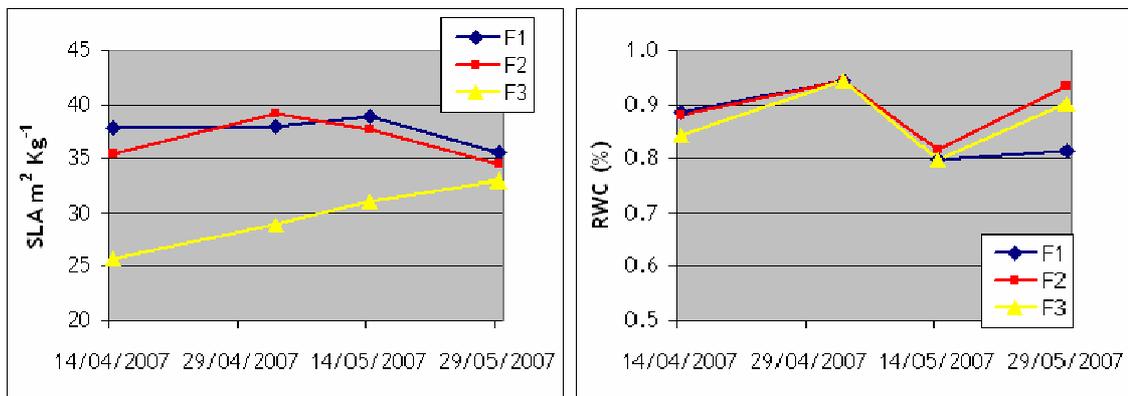


Fig. 6.12: a destra l'andamento di SLA (Specific Leaf Area) ed a sinistra RWC (Relative Water Content) nei vari strati fogliari durante tutto il trattamento.

RWC, nel primo rilievo è risultato mediamente 0.85 senza differenze significative né tra i trattamenti né tra gli strati. Analizzando l'andamento durante il trattamento in L1, si

può notare come per i tre quarti del ciclo il valore di RWC non vari tra gli strati, ma solamente tra un rilievo e l'altro. Invece, nell'ultimo rilievo, l'RWC si è maggiormente differenziato fra gli strati, infatti, F2 e F3 hanno mostrato valori simili e maggiori rispetto a F1 (0.9 per F2 e 0.8 per F3) (Fig. 6.12).

Nei primi tre rilievi i valori di SPAD sono risultati costanti e significativamente differenti sia fra i trattamenti che fra gli strati. In particolare, i valori di L2 sono risultati mediamente minori rispetto a quelli di L1 e, fra gli strati, si è verificato un andamento decrescente dei valori dall'alto verso il basso ($F3 > F2 > F1$), più evidente in L2 rispetto ad L1 (Fig. 6.13). La differenza fra i tre strati è risultata maggiore in L2 rispetto ad L1 ed in particolare F3 è risultato lo strato con i valori SPAD più alti in entrambi i trattamenti (61.6 in L1 e 57.3 in L2). F2, invece, ha mostrato valori intermedi rispetto a F1 e F3 e, rispettivamente minori di 14.7 in L1 e 17.7 in L2 rispetto a quest'ultimo. F1, infine, è risultato lo strato con i valori SPAD minori (38.2 in L1 e 30.7 in L2) (Fig. 6.13).

L'andamento dello SPAD di L1 durante tutto il trattamento, infine, è stato caratterizzato da un decremento costante in tutti e tre gli strati, ma con decrementi relativi maggiori in F3 rispetto a F2 e F1. Per effetto di questo trend, alla fine del trattamento (01/06) le differenze relative fra gli strati sono risultate minori e i valori di SPAD misurati sono risultati rispettivamente 32.2

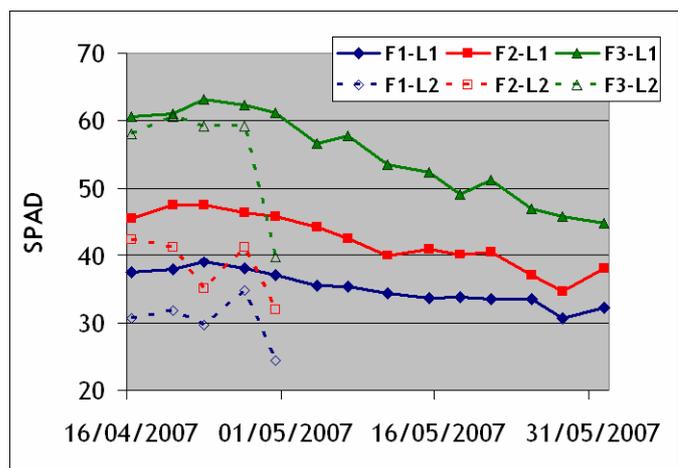


Fig. 6.13: Andamento dell'indice SPAD nei vari strati di foglie e silique durante tutto il trattamento.

in F1, 38 in F2 e 44.8 in F3 con decrementi, rispetto ad inizio ciclo, del 27% in F3, 16% in F2 e 14% in F1 (Fig. 6.13).

6.2.2.3 Pigmenti Fotosintetici

Il contenuto di pigmenti fotosintetici è stato differente fra organi (foglie, silique e seme), illuminazione ed in alcuni casi fra gli strati. In generale, il pigmento che si trova in quantità maggiore in tutti e tre gli organi è la clorofilla A che mediamente è risultata in tutti gli strati più che doppia rispetto alla quantità di clorofilla B e di carotenoidi. La quantità di questi ultimi invece, è risultata mediamente analoga in tutti e tre gli organi (Fig. 6.14, 6.15 e 6.16).

Per quanto riguarda le foglie, il contenuto di clorofilla A si è diversificato tra le due illuminazioni ed in particolare in I1 è risultato mediamente maggiore rispetto a I2 durante tutto il trattamento. In I1 il contenuto di clorofilla A non si è differenziato tra F2 ed F3 in nessuno dei rilievi effettuati ed in media è risultato di circa $10 \mu\text{g mg}^{-1}$ s.s.. Solo nel primo rilievo (16/4) è stato possibile fare un confronto anche con F1 che è risultato inferiore rispetto agli altri due strati di poco meno della metà. Più in generale, il contenuto di clorofilla A in I1 è risultato calante nel tempo ed è passato da valori medi prossimi a $12 \mu\text{g mg}^{-1}$ s.s., all'inizio del trattamento, fino a valori prossimi a $8 \mu\text{g mg}^{-1}$ s.s. a fine trattamento (Fig. 6.14).

In I2 invece, la quantità media iniziale di clorofilla A è risultata circa $8 \mu\text{g mg}^{-1}$ s.s. senza differenze significative fra gli strati. Successivamente al secondo rilievo (30/4), poco prima

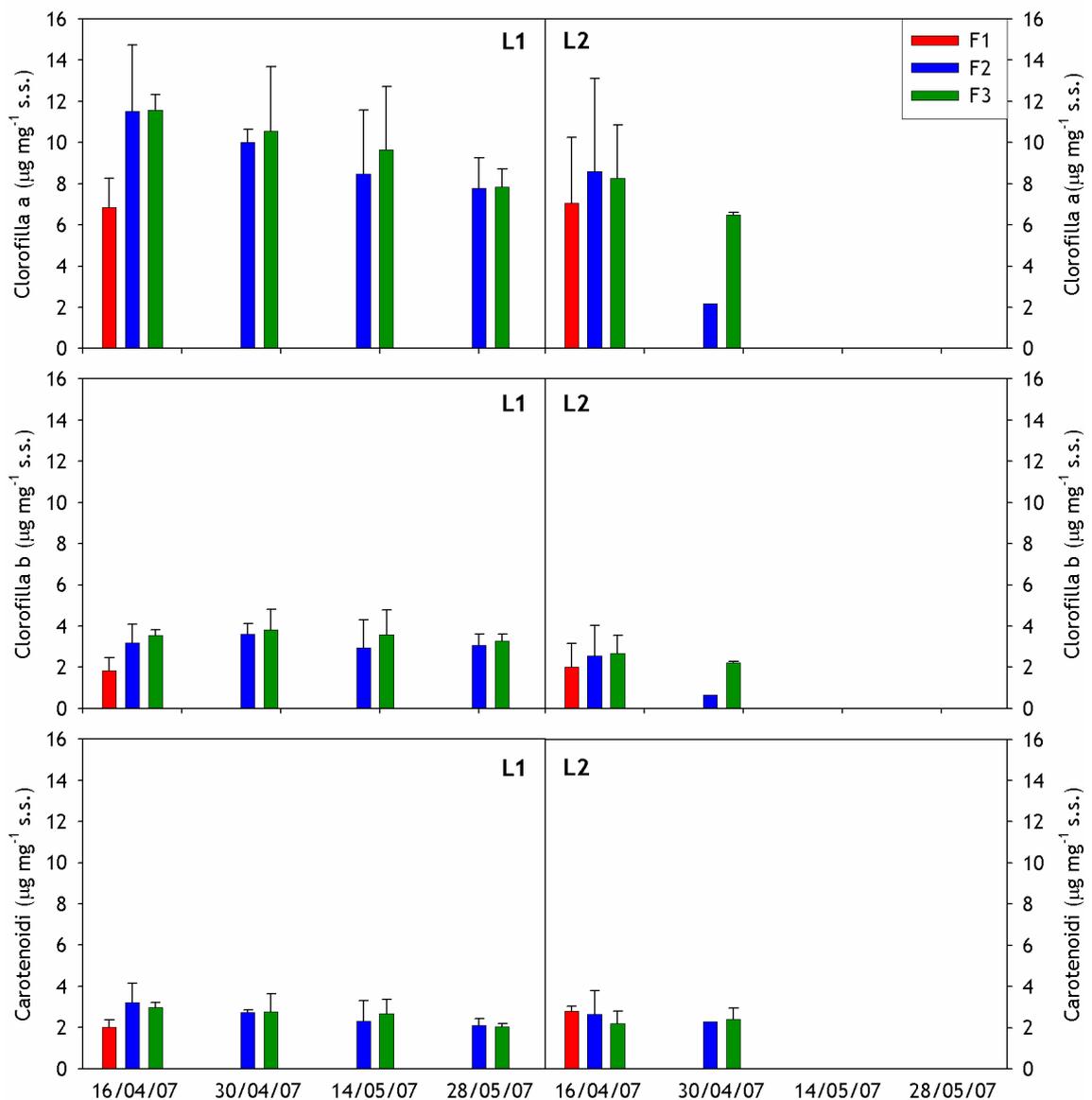


Fig. 6.14: Contenuto di clorofilla A, clorofilla B e carotenoidi negli strati fogliari dei due trattamenti durante tutto il periodo di prova.

della senescenza, il contenuto medio di clorofilla A si è ridotto in modo considerevole solo in F2 ($2 \mu\text{g mg}^{-1} \text{s.s.}$) (Fig. 6.14).

La quantità di clorofilla B, invece, non si è inizialmente differenziata fra le due illuminazioni ed in media è risultata circa $3 \mu\text{g mg}^{-1} \text{s.s.}$. Tuttavia, analogamente a quanto visto per la clorofilla A nel primo rilievo F1 è risultato minore rispetto agli altri due strati solo in I1. Nei rilievi successivi la quantità di clorofilla B si è mantenuta costante in I1 mentre in I2 è diminuita nella stessa maniera della clorofilla A (Fig. 6.14).

I carotenoidi non sono stati significativamente differenti fra le illuminazioni e quantitativamente sono risultati simili alla clorofilla B. Anche in questo caso, in entrambe

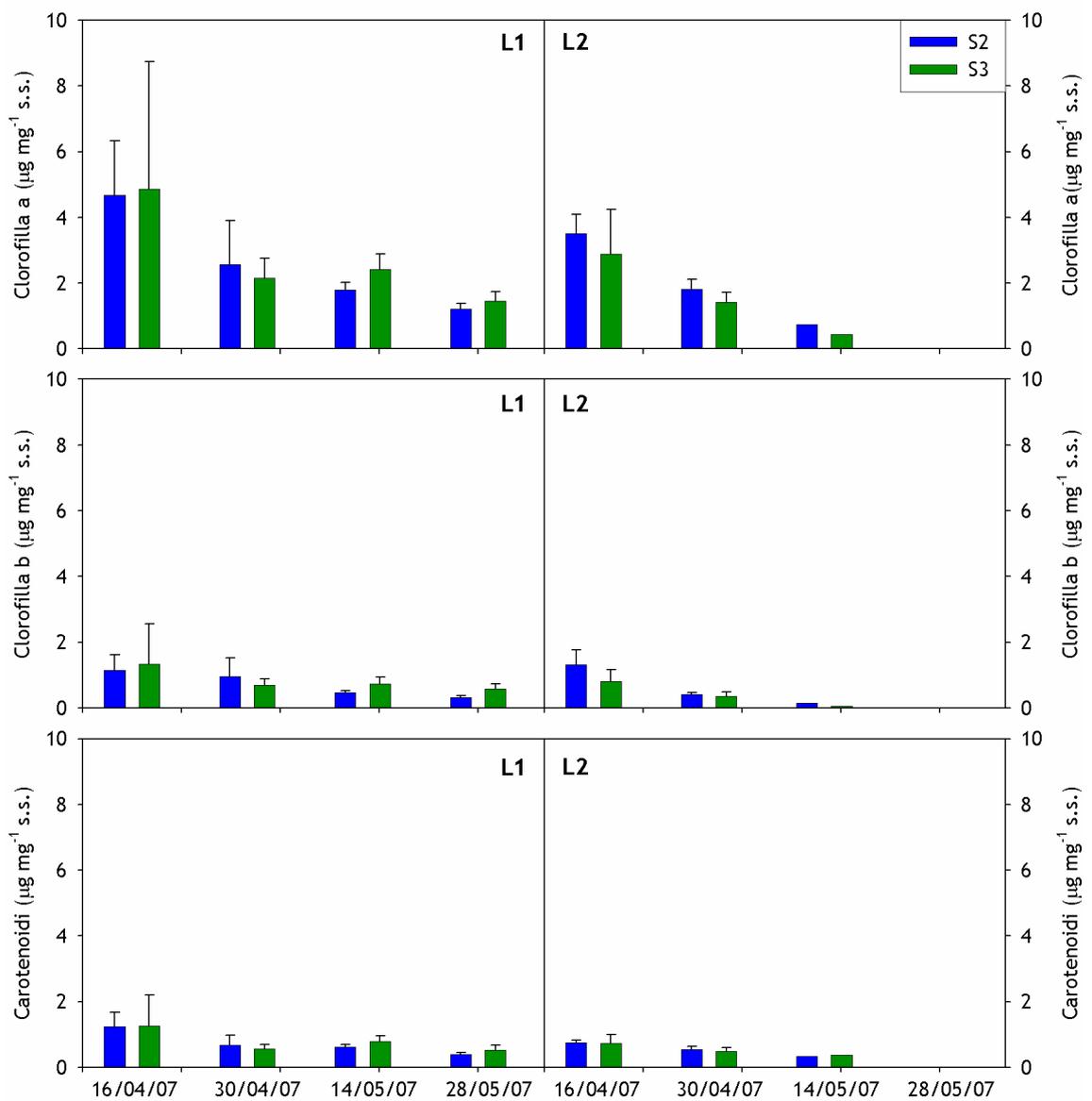


Fig. 6.15: *Contenuto di clorofilla A, clorofilla B e carotenoidi negli strati di silique dei due trattamenti durante tutto il periodo di prova.*

le illuminazioni F2 ed F3 non sono mai stati differenti mentre F1 nel primo rilievo è risultato significativamente inferiore (Fig. 6.14).

Durante tutti i rilievi, inoltre, la quantità di carotenoidi è rimasta costante sia in I1 che in I2 a differenza di quanto visto per le clorofille.

Le silique, invece, sono caratterizzate da un contenuto di pigmenti medio inferiore di circa due terzi rispetto a quello delle foglie in tutti e due i trattamenti.

La clorofilla A, pur avendo un andamento simile tra le due illuminazioni, si è differenziata

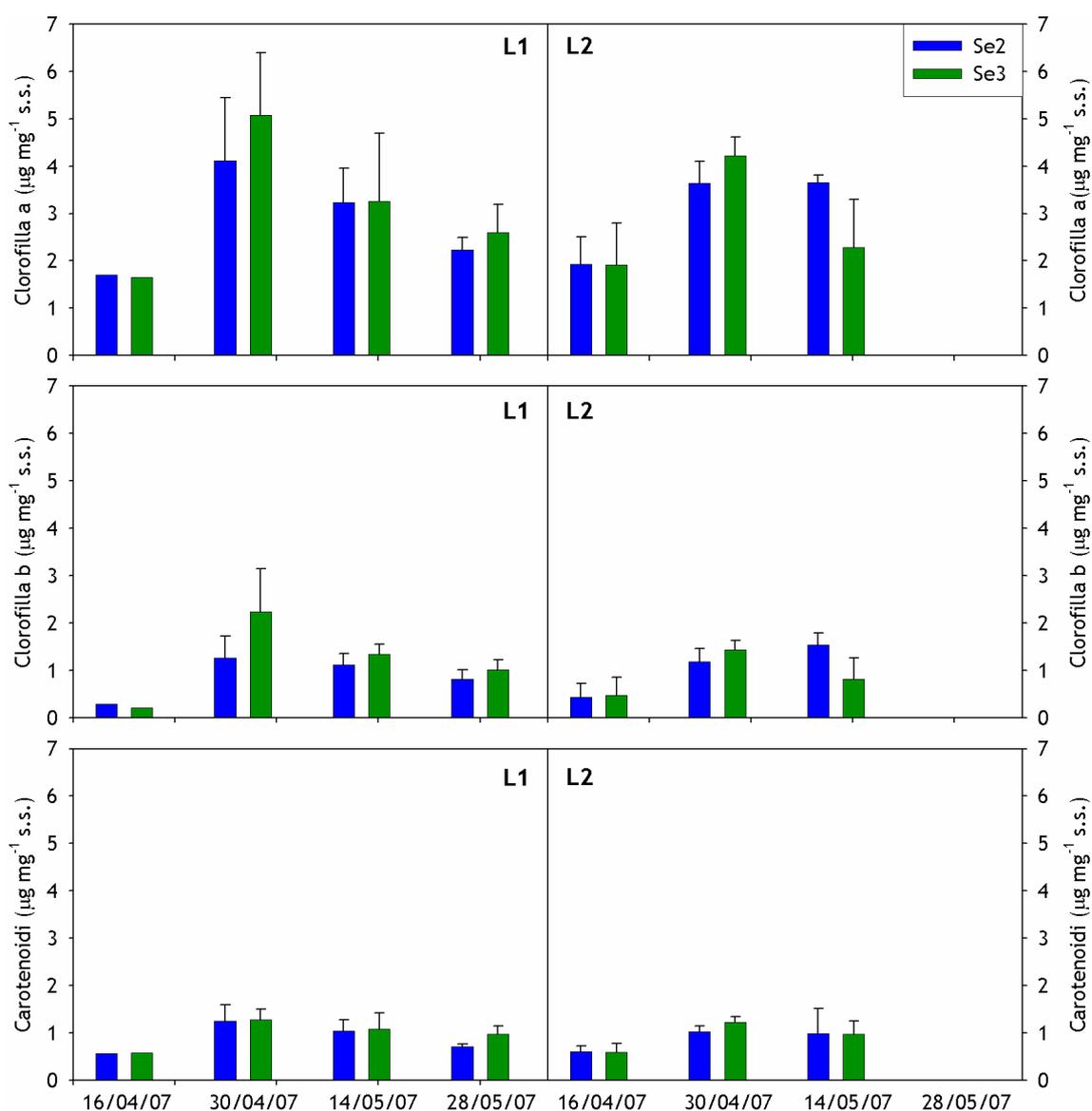


Fig. 6.16: Confronto del contenuto di clorofilla A, clorofilla B e carotenoidi dei semi, nei due trattamenti durante tutto il periodo di prova.

fra gli strati solamente nelle fasi finali di I1 infatti, S3 è risultato significativamente maggiore di S2 sia il 14/5 che il 28/5. Come per le foglie, il contenuto di clorofilla A è

diminuito da inizio a fine trattamento sia in I1 che in I2 ma, mentre il primo è passato da $4,4 \mu\text{g mg}^{-1}$ s.s. a $1,8 \mu\text{g mg}^{-1}$ s.s. nell'arco di tutto il ciclo, il secondo è diminuito più velocemente e in circa un mese è passato da $3,7 \mu\text{g mg}^{-1}$ s.s. a circa $1 \mu\text{g mg}^{-1}$ s.s. (Fig. 6.15)

La clorofilla B delle silique è risultata circa un quarto rispetto alla clorofilla A e, analogamente a quest'ultima, è diminuita con modalità simile nelle due illuminazioni mantenendo le differenze significative fra gli strati solo negli ultimi due rilievi di I1 (Fig. 6.15).

I carotenoidi sono risultati quantitativamente simili alla clorofilla B nei due trattamenti ma, a differenza di quest'ultima, non sono ravvisabili differenze significative fra gli strati. Anche in questo caso l'andamento nel tempo è risultato calante sia in I1 che in I2; in I1 si è passati da una quantità iniziale di $1,7 \mu\text{g mg}^{-1}$ s.s. a $0,5 \mu\text{g mg}^{-1}$ s.s. di fine trattamento mentre in I2 si è passati da circa $0,6 \mu\text{g mg}^{-1}$ s.s. a circa $0,2 \mu\text{g mg}^{-1}$ s.s. nell'arco di un solo mese (16/4-14/5) (Fig. 6.15).

I semi hanno avuto un contenuto di pigmenti mediamente superiore a quello delle silique di circa il 15% in tutti e due i trattamenti.

La clorofilla A è risultata mediamente simile nelle due illuminazioni sia per quantità che per dinamica nel tempo. In I1 non si riscontrano differenze significative fra gli strati mentre in I2 gli strati risultano differenti solamente nel rilievo del 14/5.

L'andamento nel tempo della clorofilla A è stato caratterizzato sia in I1 che in I2 da un aumento nel periodo 16/4 – 30/4 e una successiva diminuzione nel periodo dal 30/4 a fine trattamento. Anche per i semi la diminuzione del pigmento è risultata più rilevante in I2 rispetto a I1 (Fig. 6.16).

La clorofilla B è risultata circa la metà rispetto alla clorofilla A (in media circa $1,5 \mu\text{g mg}^{-1}$ s.s.). Rispetto a quest'ultima l'andamento è stato analogo mentre sono diverse le differenze fra gli strati solamente in I1. Infatti, nel secondo rilievo Se3 è risultato circa il doppio rispetto a Se2 (Fig. 6.16).

I carotenoidi, pur risultando in media quantitativamente simili alla clorofilla B, si sono mantenuti costanti nel tempo e non si sono mai differenziati fra gli strati.

Più in generale, i rapporti clorofilla A / clorofilla B (Ca/Cb) e carotenoidi / clorofille (Car/Chl) in media si sono differenziati solo fra gli organi e non fra i trattamenti.

Il rapporto Ca/Cb, infatti, è risultato mediamente minore nelle foglie rispetto a quello di silique e semi che invece sono risultati pressoché analoghi (rispettivamente 3 nelle foglie e 3,7 in silique e semi).

Come per Ca/Cb anche il rapporto Car/Chl è risultato mediamente minore nelle foglie e analogo per silique e semi (rispettivamente 0,24 in foglie e 0,27 in silique e semi). Da notare, infine, come in tutti gli organi Ca/Cb sia diminuito costantemente da inizio a fine trattamento mentre Car/Chl è rimasto pressoché costante per tutto il tempo.

6.2.2.4 Risposta Fotosintetica

6.2.2.4.1 Risposta al Variare della CO₂

Le risposte di fotosintesi alla concentrazione intercellulare di CO₂ ($A-C_i$) sono stati effettuati in 4 momenti del ciclo (19/04; 24/04; 08/05; 24/05) solo in due, tuttavia, è stato possibile il confronto fra trattamenti a causa del sopraggiungere della senescenza fogliare in L2.

Dei parametri misurati vengono descritti la fotosintesi netta (A), l'efficienza di carbossilazione ($V_{c_{max}}$), l'efficienza di trasporto elettronico (J_{max}) e la respirazione diurna (R_d).

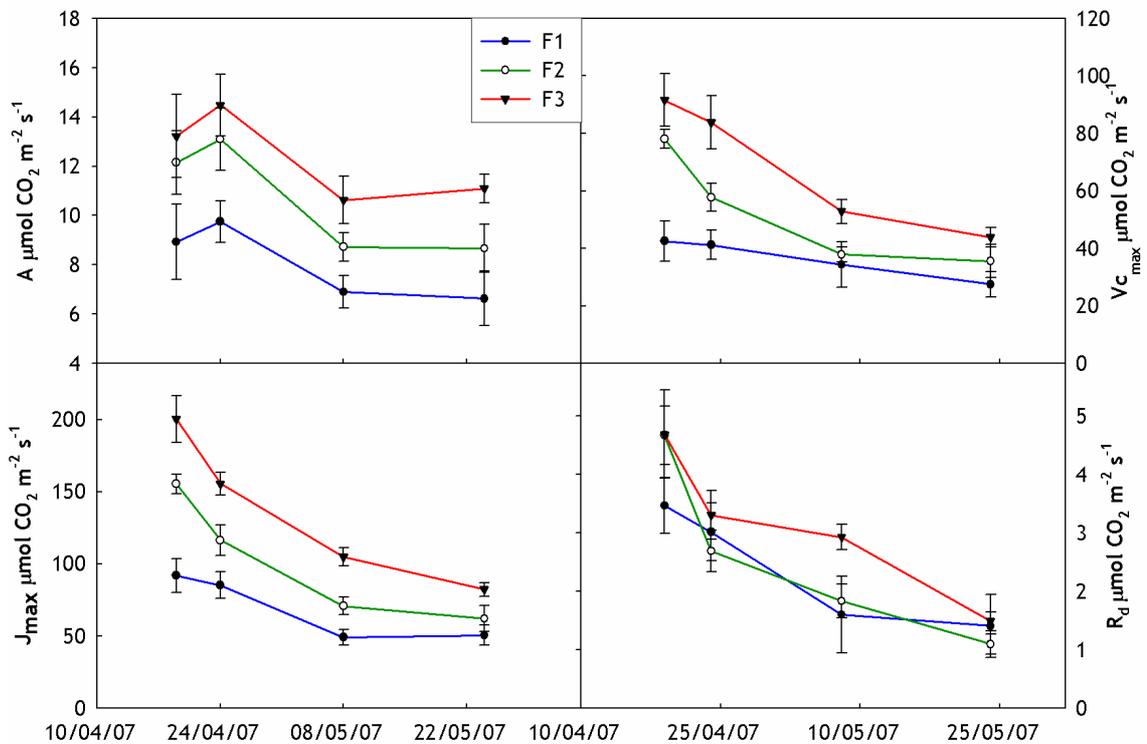


Fig. 6.17: In alto a sinistra andamento dell'assimilazione netta nei tre strati fogliari, in alto a destra andamento della velocità di carbossilazione, in basso a sinistra l'andamento dell'efficienza di trasporto elettronico, in basso a destra l'andamento della respirazione diurna.

Dai primi due rilievi si nota come siano riscontrabili differenze significative solamente fra gli strati fogliari e non fra le illuminazioni per tutti e tre i parametri.

La fotosintesi netta (A) non è risultata differente fra i due trattamenti ma solamente fra gli strati. In particolare, considerando la media del periodo, F3 è risultato essere lo strato con la A maggiore (in media $12.9 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) superiore rispettivamente di $1.6 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in confronto a F2 e di $4.4 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ rispetto a F3 (Fig. 6.17).

Da notare, inoltre, F3 ed F2 si sono differenziati solo dal terzo rilievo in avanti per effetto di una maggiore perdita di efficienza fotosintetica rispetto a quest'ultimo nel periodo 24/04 – 08/05 (Fig. 6.17). In generale, i tre strati, benché diversi nei valori di A , hanno mostrato andamenti speculari: crescenti tra il primo e secondo rilievo; decrescenti dal secondo al terzo rilievo; stabili dal terzo al quarto rilievo. Dal secondo al terzo rilievo è possibile notare un calo di fotosintesi netta medio del 30%. Successivamente dal terzo al quarto rilievo i valori sono rimasti costanti e, in data 24/05 sono risultati rispettivamente $11.1 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in F3, $8.7 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in F2 e $6.6 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in F1 (Fig. 6.17).

Per quanto riguarda $V_{c_{\max}}$, lo strato più efficiente è risultato F3 con valori medi, durante tutto il periodo di trattamento, di $74.5 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Viceversa F1 è risultato lo strato meno efficiente (in media $38.2 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) mentre F2 è risultato intermedio fra i due (in media $57.5 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Fig. 6.17).

L'andamento di $V_{c_{\max}}$ è risultato decrescente durante tutto il periodo sia per F2 che per F3 ma quest'ultimo, pur passando da un valore massimo di $91.6 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (19/04) ad un minimo di $43.6 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (24/05), è rimasto sempre significativamente superiore agli altri due. F2, invece, pur rimanendo sempre su valori intermedi fra gli strati (da $78.1 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ il 19/04 a $35.6 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ il 24/05), già dal terzo rilievo è risultato analogo ad F1 a causa di importanti decrementi di efficienza fotosintetica maggiori rispetto a F3 soprattutto nei primi due rilievi avvicinandosi così più ai valori rilevati in F1 (rispettivamente -51% per F2 e -42% per F3 dal 16/04 al 08/05) (Fig. 6.17). Anche l'efficienza di F1 è diminuita con il tempo passando da $42.5 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, di inizio trattamento, a $27.5 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ di fine trattamento, ma con un decremento complessivo minore rispetto agli altri due strati (Fig. 6.17).

Analogamente a quanto visto per $V_{c_{\max}}$ anche per J_{\max} lo strato maggiormente efficiente è risultato F3 (in media 149.7); F2 è risultato avere un'efficienza intermedia mediamente pari a $112.7 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ mentre, F1 è risultato essere lo strato meno efficiente con valori medi di $75.6 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. L'andamento quindi riscontrato è decrescente nel

tempo e basipeto lungo il profilo della pianta con perdite di efficienza percentualmente maggiori (fino al 60%) nei due strati più alti.

Anche in questo caso l'andamento è risultato decrescente in tutti e tre gli strati e, analogamente a $V_{c_{max}}$, F2 e F3 hanno mostrato perdite di efficienza maggiori rispetto a F1 passando da inizio a fine trattamento. In particolare, F3 e F2 hanno subito un decremento pari al 60% (rispettivamente da 200 a 80 $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ F3 e da 155 a 62 $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ F2) mentre F1 è diminuita del 45% (da 91 a 50 $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Per effetto di questo andamento, come già visto per $V_{c_{max}}$, anche per J_{max} a fine trattamento l'efficienza di F2 e F1 sono risultate analoghe e significativamente differenti rispetto a F3 sebbene le l'efficienza dei tre strati a fine ciclo sia risultata molto simile (Fig. 6.17).

Infine, per quanto riguarda la Respirazione (Rd) i valori maggiori sono stati riscontrati su F3 (in media circa 3.4 $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) mentre gli altri due strati non sono risultati mediamente differenti (2.94 $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ per F2 e 2.62 $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ per F1). Più in generale R1 e R2 non risultano significativamente differenti in nessuno dei rilievi mentre R3, tranne l'ultimo rilievo, è sempre maggiore degli altri due e significativamente differente rispetto a R1. R2, inoltre, non è significativamente differente rispetto a R3 tranne che nel terzo rilievo (Fig. 6.17). Infine, anche l'andamento della respirazione è decrescente nel tempo come gli altri due parametri e passa mediamente da 4.3 $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a 1.3 $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ con differenze fra gli strati non significative a fine ciclo (Fig. 6.17).

6.2.2.4.2 Risposta al Variare della luce

La risposta fotosintetica al variare della luce è stata saggiata solo su piante dell'illuminazione L1 con tre rilievi eseguiti il 08/05, il 15/05 e il 30/05 in cui sono stati raccolti i dati di fotosintesi (A_{max}), efficienza quantica (Q_e), punto di compensazione (PC), punto di saturazione (SP) e respirazione (Rd).

Per quanto riguarda A_{max} gli strati si sono differenziati significativamente ed in particolare F3 è risultato avere capacità più alta (in media 12.4 $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), F2 è risultato lo strato con valori intermedi (in media 8.7 $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ed F1 lo strato con capacità minore (in media 6 $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Fig 6.18).

L'andamento di A_{max} è stato abbastanza stabile in tutti e tre gli strati sebbene si possano notare alcune particolarità. Nel primo rilievo, ad esempio, si è avuto il massimo di A_{max} in F3 (14.4 $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) con differenze dagli altri strati rispettivamente di 5 $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in F2 e 8 $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in F1. Nelle altre due date, invece, le differenze fra gli

strati pur rimanendo considerevoli, sono risultate minori perché a parità di valori di F1 e F2 vi è stata una diminuzione di A_{max} in F3 di almeno $3 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in data 15/05 (Fig 6.18).

Per quanto riguarda l'efficienza quantica (Q_e) vi sono differenze sia fra gli strati che nel loro andamento. In particolare, l'08/05 i tre strati sono risultati significativamente diversi ed F3 è risultato avere la migliore efficienza ($0.064 \text{ moli CO}_2 \text{ fotone}^{-1}$) rispetto agli altri due (rispettivamente $0.052 \text{ moli CO}_2 \text{ fotone}^{-1}$ in F2 e $0.036 \text{ moli CO}_2 \text{ fotone}^{-1}$ in F1). Nel

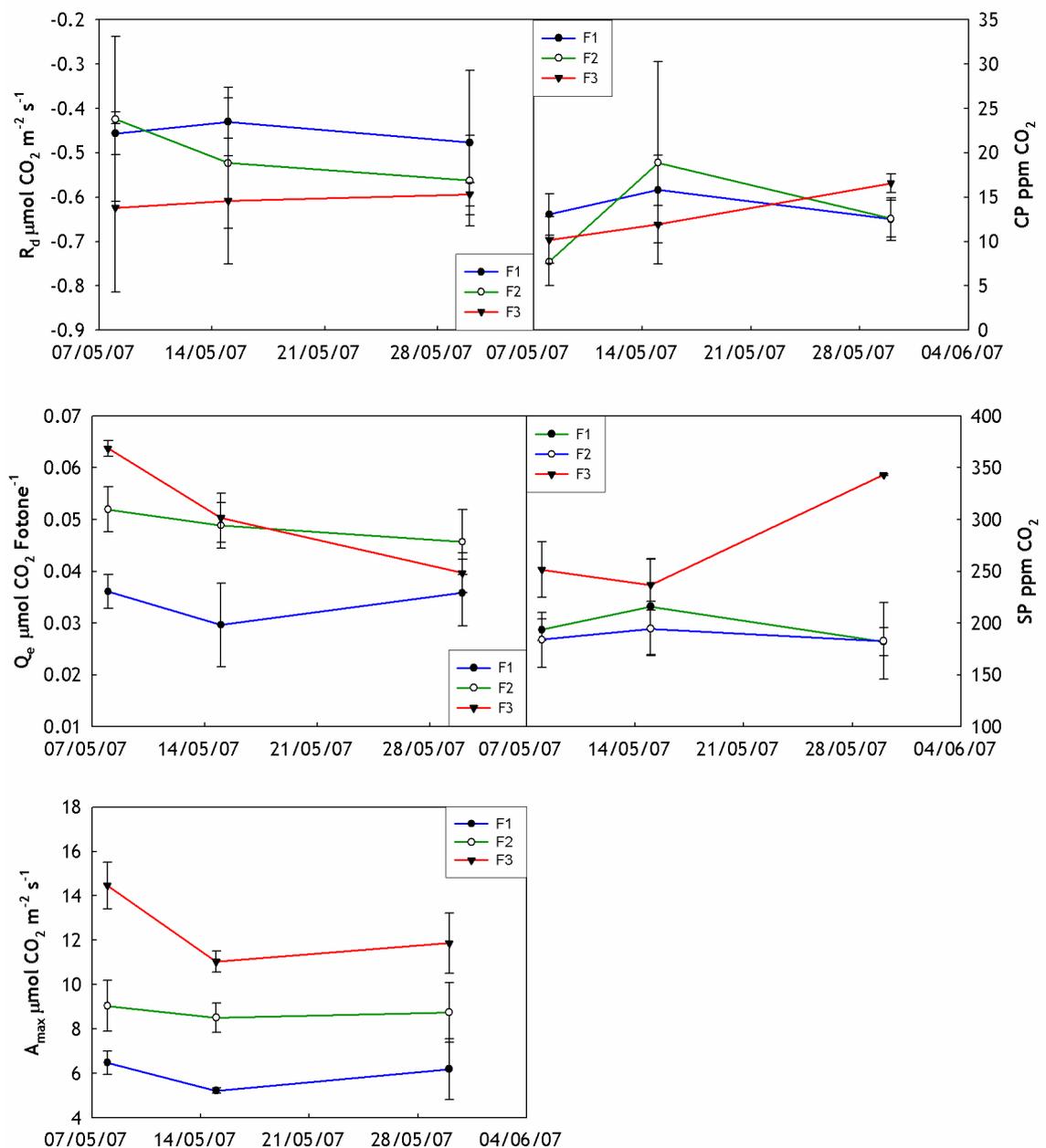


Fig. 6.18: In alto a sinistra l'andamento della respirazione, in alto a destra l'andamento del punto di compensazione; al centro a sinistra l'andamento dell'efficienza quantica, al centro a destra l'andamento del punto di saturazione, in basso l'andamento dell'assimilazione massima nei tre strati di foglie.

rilievo del 16/05, invece, a causa di una diminuzione di efficienza di F3 fino a livelli paragonabili a F2 (in media 0,05 moli CO₂ fotone⁻¹) l'unico strato significativamente differente dagli altri è risultato F1. Nel terzo rilievo, infine, l'efficienza media è risultata 0.040 moli CO₂ fotone⁻¹ senza più differenze significative fra gli strati. Riassumendo, a differenza di F1 e F2 che hanno mantenuto valori di efficienza pressoché costanti durante i tre rilievi, F3 ha avuto un andamento decrescente passando da un'efficienza iniziale di 0.063 moli CO₂ fotone⁻¹ ad una finale di 0.042 moli CO₂ fotone⁻¹ (Fig. 6.18).

Analizzando il punto di compensazione (CP), invece, si può notare come sebbene non sussistano differenze significative fra gli strati tranne che nell'ultima data, l'andamento dei tre strati si è molto diversificato. In particolare, mentre F3 è risultato sempre crescente passando da 10 ppm CO₂ a 16 ppm CO₂, F2 e F1 hanno avuto un andamento simile mostrando un accrescimento fra il primo e il secondo rilievo e un decremento fra il secondo e il terzo rilievo. Interessante notare, inoltre, come tra il primo e il secondo rilievo lo strato F2 abbia avuto l'aumento maggiore rispetto agli altri strati passando da 7 ppm CO₂ a 18 ppm CO₂ ma, nonostante questo, passando all'ultima data, F2 è risultato analogo a F1 (in media 12 ppm CO₂) ed entrambi sono risultati significativamente differenti da F3 che è risultato avere un valore superiore di CP (18 ppm CO₂) (Fig. 6.18)

Il punto di saturazione (SP) presenta valori significativamente differenti solo nella prima e nell'ultima data di rilievo. In particolare mentre F2 e F1 hanno avuto un andamento analogo con valori medi di circa 190 ppm CO₂ in tutte le date, F3 è sempre risultato significativamente maggiore (in media 277 ppm CO₂) con un valore massimo di 343 ppm CO₂ registrato nell'ultimo rilievo (Fig. 6.18).

L'andamento della respirazione (R_d) è risultato abbastanza stabile in tutti gli strati che non si sono differenziati statisticamente in nessuno dei rilievi. Più in generale in tutto il periodo si è avuto un R_d medio di -0.5 μmoliCO₂ m⁻² s⁻¹ con valori medi fra gli strati compresi da -0.6 μmoliCO₂ m⁻² s⁻¹ di F3 e -0.4 μmoliCO₂ m⁻² s⁻¹ di F1 (Fig. 6.18).

6.2.2.5 Fluorescenza

La fluorescenza è stata misurata sia sulle foglie che sulle silique con rilievi bisettimanali a partire dal 16/04.

Per quanto riguarda le foglie l'andamento di F_0 è risultato crescente passando da valori iniziali medi di 350 a inizio ciclo in tutti e due i trattamenti a valori di 500 in L2, prima

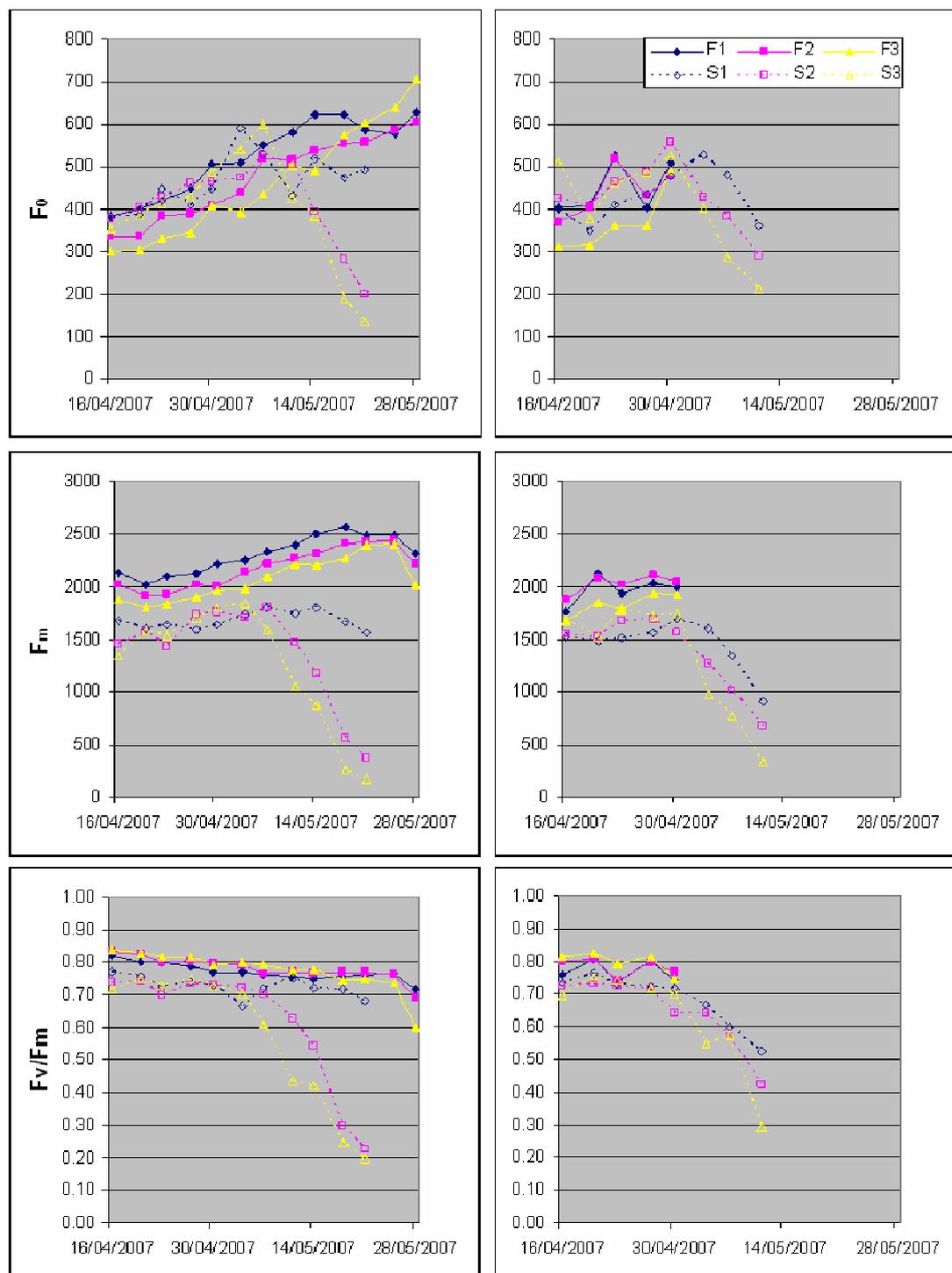


Fig. 6.19: Confronto dell'andamento di F_0 , F_m e F_v/F_m in foglie e silique: a sinistra l'andamento nel trattamento L1, a destra l'andamento nel trattamento L2.

della senescenza fogliare, e 650 in L1 a fine ciclo. Sono risultate differenze significative fra gli strati ed in media, in entrambi i trattamenti, F3 è risultato inferiore rispetto agli altri due strati di circa il 6% (Fig. 6.19).

F_m è risultato significativamente differente fra i due trattamenti e fra gli strati. In particolare L2 è risultato inferiore rispetto a L1 (in media rispettivamente 1925.5 e 2187) ed anche in questo caso l'andamento durante tutto il periodo di trattamento è stato crescente in tutti gli strati fino al penultimo rilievo in cui è stato raggiunto un valore medio di 2400. Dal penultimo all'ultimo rilievo, viceversa, c'è stata una diminuzione in tutti e tre gli strati tale per cui, a fine trattamento, il valore medio di F_m è risultato circa 2187 (Fig. 6.19).

Come già visto per F_0 , inoltre, anche in F_m gli strati si sono significativamente differenziati ed in particolare, F3 è risultato mediamente inferiore dell'8% rispetto agli altri due strati in entrambi i trattamenti (Fig. 6.19).

Per effetto dell'andamento di F_0 e F_m , l'efficienza quantica del fotosistema (F_v/F_m) è risultata mediamente simile fra i due trattamenti (rispettivamente 0.77 in L1 e 0.78 in L2) ma con andamenti differenti. In particolare in L1 F_v/F_m è diminuito da un valore iniziale medio di 0,84 a un valore finale medio di circa 0.65; in L2 il rapporto iniziale è stato inferiore ad L1 (0.78) ed in seguito si è mantenuto pressoché costante fino alla senescenza fogliare (Fig. 6.19). Per quanto riguarda le differenze fra gli strati F3 è risultato ancora una volta il più efficiente, ma con differenze significative solo in L2.

Le silique hanno avuto un andamento diverso rispetto alle foglie sia per F_0 che per F_m e F_v/F_m .

F_0 è risultato significativamente diverso fra le due illuminazioni e non fra gli strati. In particolare, i trattamenti sono risultati diversi solamente nella fase iniziale e nella fase finale del riempimento seme. Nella fase iniziale L1 è risultato mediamente inferiore rispetto a L2 di circa 100 (rispettivamente 380 per L1 e 480 per L2), nella fase finale, invece, L2 è diminuito di più rispetto a L1 tanto che in data 19/5 (ultimo rilievo per L2) la differenza media fra i due trattamenti è circa 150 (Fig. 6.19).

In generale l'andamento di F_0 nei due trattamenti è stato simile sebbene, a causa della senescenza anticipata, L2 abbia raggiunto i valori minimi circa dieci giorni prima rispetto a L1. Da notare inoltre, che in L1 il valore di S1 si è mantenuto costante negli ultimi tre rilievi (in media 500) a differenza di S2 e S3 che invece, sono diminuiti fino a valori medi di 180 (Fig. 6.19).

L'andamento di F_m è risultato simile nei due trattamenti anche se, come già visto in precedenza per F_0 L2 ha subito una notevole diminuzione anticipata di circa dieci giorni rispetto a L1. Per questo motivo F_m si è differenziato significativamente fra i due trattamenti solo dopo il rilievo del 7/5 nel quale tutti e tre gli strati di L2 sono diminuiti, seppure con differenze fra loro, da un valore medio di 1500 ad un valore medio di 600 mentre, in L1 solamente S2 e S3 sono diminuiti fino a valori di 250 e S1 è rimasto costante (1500) (Fig. 6.19).

Si nota che come per F_0 anche per F_m S3 è lo strato che è diminuito maggiormente nel tempo in entrambi i trattamenti.

F_v/F_m è rimasto costante in entrambi i trattamenti e in tutti gli strati fino al 7/5 su valori medi di 0,75. Successivamente i due trattamenti si sono differenziati: in L1, S1 ha mantenuto un'efficienza quantica costante fino al rilievo del 30/5 a differenza di S2 e S3 che sono diminuiti fino a valori di 0,22 nella stessa data. In L2 invece, l'efficienza quantica è diminuita in maniera analoga in tutti e tre gli strati fino ad un valore minimo medio di 0,42 in data 18/5 (Fig. 6.19).

6.2.2.6 Discriminazione Isotopica del Carbonio

La discriminazione isotopica del carbonio (Δ), che è stata analizzata sugli zuccheri solubili di foglie, silique e semi, si è sempre differenziata fra trattamenti, mai fra strati.

Il Δ delle foglie è risultato in media significativamente maggiore in L1 rispetto a L2 in tutti i rilievi in cui è stato possibile confrontarlo (22,7 per L1 e 21,4 per L2).

Anche nelle silique la discriminazione di L1 è risultata mediamente superiore in tutti i rilievi in cui è stato possibile confrontarla fra i trattamenti (16/4, 30/4 e 14/5).

Dal primo al secondo rilievo la differenza di discriminazione fra i due trattamenti è passata da circa 0,7 a circa 3,3 per effetto di un considerevole aumento di Δ in L1 (da 19 a circa 21,8) (Fig. 6.20). Nel terzo rilievo, anche Δ di L2 è aumentato considerevolmente tanto che fra i due trattamenti non sono più ravvisabili differenze significative (in media 21,5).

Il Δ dei semi è risultato molto differente fra i due trattamenti (differenza media 2.3) ma simile nell'andamento dal 16/4 al 14/5 (da 17,7 a 19,6 in L2 e da 19,8 a 21,4 in L1) (Fig. 6.20).

Nell'ultimo rilievo (28/5) è possibile confrontare foglie, silique e semi solo in L1 ed è interessante notare come, le silique abbiano avuto sempre un Δ minore rispetto a foglie e semi. Questi ultimi, a inizio ciclo, sono risultati minori delle foglie e a fine ciclo superiori (Fig. 6.20).

Infine, la discriminazione isotopica degli acidi grassi monoinsaturi: acido erucico e acido oleico, contenuti nell'olio prodotto, è risultata simile fra loro e significativamente differente solo fra i trattamenti in particolare in L1 ha avuto un Δ medio di 24,1 superiore di 2,3 rispetto a L2 (Fig. 6.20).

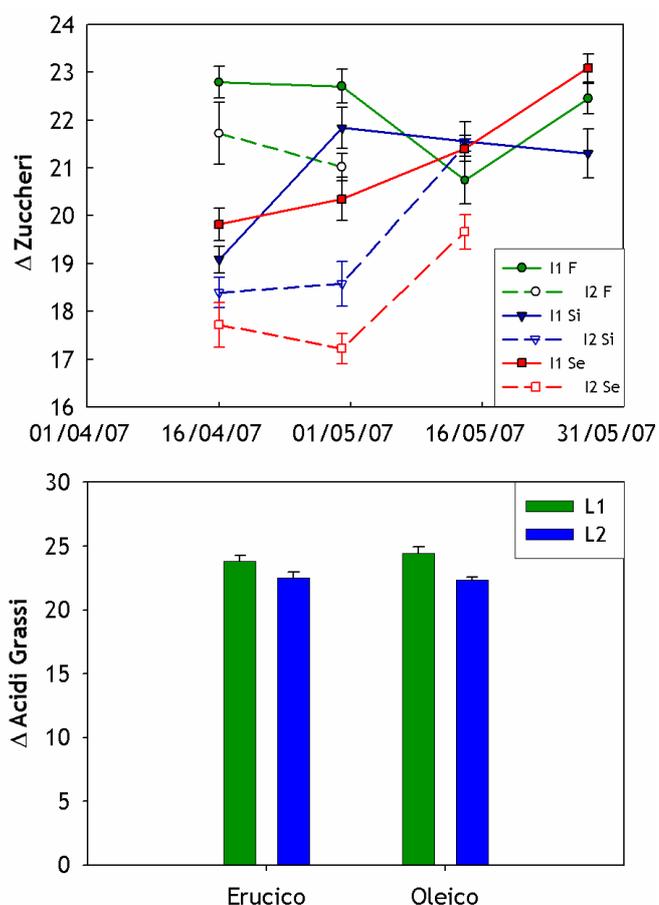


Fig. 6.20: In alto l'andamento della discriminazione isotopica del carbonio in foglie silique e semi nei due trattamenti durante il periodo di prova. In basso la discriminazione isotopica di acido erucico e di acido oleico nei due trattamenti.

6.2.2.7 Caratteri Produttivi e Sintesi degli Acidi Grassi

La produzione di seme totale per pianta e la produzione di biomassa per pianta si sono significativamente differenziate fra i trattamenti. In particolare, le piante L2 hanno prodotto mediamente il 62% in più di seme e il 57% in più di biomassa rispetto a quelle L1 (Fig. 6.21).

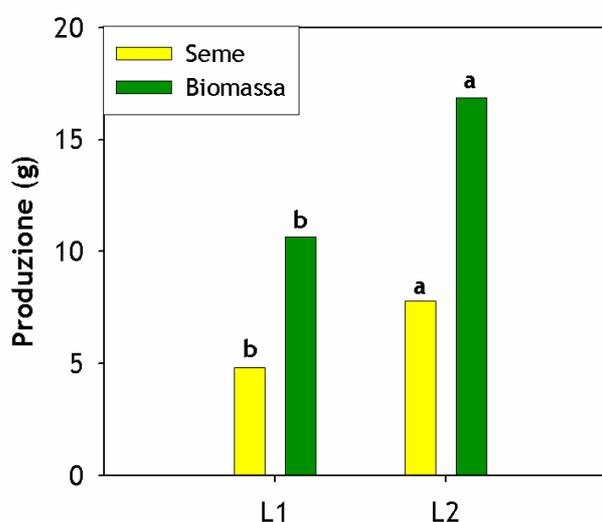


Fig. 6.21: Produzione di seme e biomassa nei due trattamenti.

Anche per quanto riguarda la produzione di seme fra gli strati è

possibile notare differenze significative. In particolare, in entrambe le illuminazioni, S3 e S2 sono risultati gli strati maggiormente produttivi con produzioni medie di 2g in L1 e 3.3g

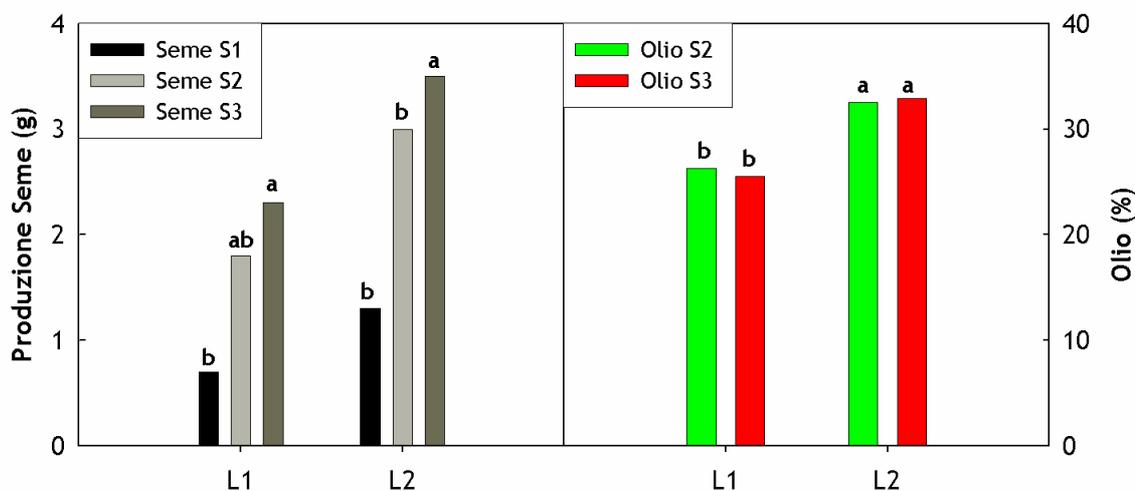


Fig. 6.22: A sinistra la produzione di seme nei singoli strati, nei due trattamenti; a destra il contenuto di olio negli strati S2 ed S3 nei due trattamenti.

in L2 superiori rispetto a quelle di S1 rispettivamente di 1.3g in L1 e 2g in L2. Nonostante ciò, in L1 la produzione di S2 non è risultata significativamente differente neppure rispetto a S1 (Fig. 6.22).

La produzione di olio è risultata maggiore in L2 rispetto ad L1 senza differenze significative fra gli strati. Il contenuto di olio di L2 è risultato mediamente 32.7% superiore rispetto a L1 del 6.7% (Fig. 6.22).

In base a quanto detto, per effetto della differente produzione di seme lungo il profilo, anche la produzione di olio in grammi si è differenziata fra gli strati in senso acropeto.

A livello qualitativo alcune componenti acide sono risultate differenti significativamente sia fra gli strati che fra i trattamenti.

In particolare, il contenuto di acidi grassi saturi è risultato analogo sia fra gli strati che fra i trattamenti ed in media pari al 4.4%. Gli acidi grassi monoinsaturi sono risultati significativamente superiori in L1 (rispettivamente 54% e 51% in L1 ed L2) con significative interazioni fra luce e strato. Infatti, in L1 lo strato S2 è risultato più ricco di monoinsaturi rispetto a S3, al contrario di quanto accaduto in L2 (Fig 6.23).

Anche gli acidi grassi polinsaturi, sono risultati differenti fra le due illuminazioni con andamento opposto rispetto ai monoinsaturi. In questo caso, infatti, L2 è risultato significativamente superiore rispetto ad L1 (rispettivamente 34.9% e 29.4%), ancora con significativa interazione “luce x strato”: in L1, S3 è risultato mediamente più ricco di S2; l’opposto di quanto accaduto in L2 (Fig. 6.23).

Il contenuto di acido oleico ed acido erucico non è mutato fra gli strati. Il

livello di luce ha inciso unicamente sul contenuto di oleico che è risultato maggiore (+2.7%) in L1 (Fig 6.23).

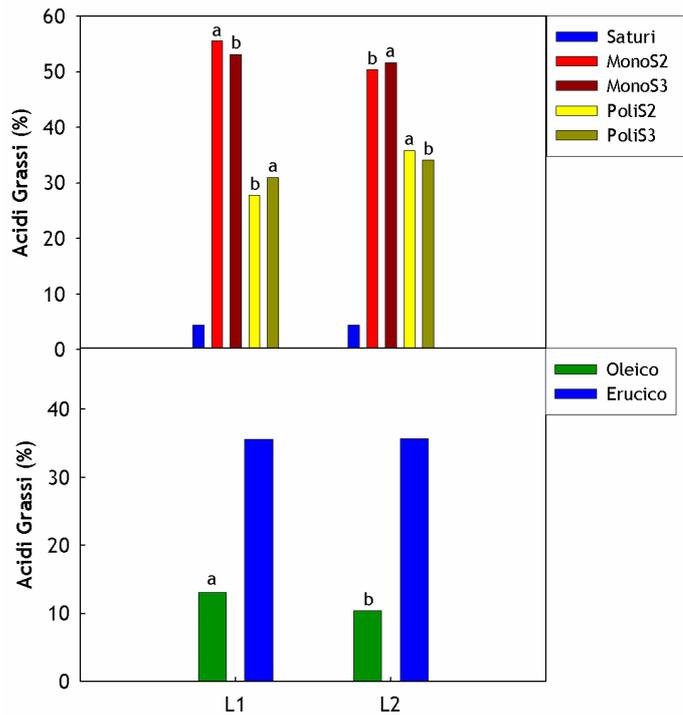


Fig. 6.23: In alto la composizione acidica totale nei due trattamenti; in basso il contenuto di acido oleico ed erucico nei due trattamenti.

7. DISCUSSIONI

7.1 TEST AGRONOMICI A PIENO CAMPO

Effetto dell'andamento climatico

L'andamento meteo dell'annata 2005 ha favorito un'adeguata emergenza ed un accrescimento iniziale idoneo a superare l'inverno senza subire significativi danni da freddo. Dalla ripresa vegetativa in poi, nelle fasi di fioritura e formazione silique, la pioggia caduta ha garantito un apporto idrico in media sufficiente e continuativo mentre, nella fase di maturazione le temperature massime, sempre superiori ai 30°C e le scarse precipitazioni, hanno contribuito ad una precoce chiusura del ciclo.

Nell'annata 2006 l'abbondante piovosità autunnale non ha permesso un'elevata emergenza tuttavia, nonostante le temperature minime inferiori alla media per tutto l'inverno, alla ripresa vegetativa non si sono avuti danni da freddo rilevanti. Successivamente, nel periodo di fioritura e riempimento seme, la piovosità inferiore alla media ha contribuito a ridurre la potenzialità produttiva delle piante. La chiusura del ciclo, infine, è avvenuta regolarmente, poiché nel mese di giugno le temperature e le precipitazioni sono risultate nella media.

In sintesi, l'andamento climatico ha diversificato la durata del ciclo fenologico fra gli anni, soprattutto nelle fasi iniziali e finali. Ma, mentre nella prima parte del ciclo non ha influito significativamente sulla crescita della pianta, nelle fasi finali (da fioritura a maturazione) ha invece provocato differenze nella formazione e riempimento del seme.

La diversa percentuale di mortalità di piante nei due anni, che ha significativamente modificato la densità di individui alla maturazione, non ha influito sulla produzione finale, probabilmente grazie all'effetto di compensazione fra il minor numero di piante e la migliore utilizzazione della luce da parte della coltura (Diepenbrock, 2000).

Effetto dell'epoca di raccolta

La significativa riduzione di produzione potenziale (produzione ottenuta con raccolta manuale), ravvisata in entrambe le annate, può essere attribuita alla diversa incidenza della crodatura del seme in maturazione; crodatura, che nel primo anno è stata ulteriormente accentuata dalle più elevate temperature del mese di giugno che hanno accorciato la fase di maturazione. In tali condizioni, le perdite alla raccolta sono state più elevate in R1 poiché

tale raccolta è stata svolta in due successivi passaggi. Nel 2006 invece, con decorso di maturazione più regolare, le perdite di seme sono risultate analoghe fra le due tecniche a causa della maggiore incidenza della meccanizzazione. Ne deriva che, in base alla produzione reale ottenuta in condizioni di anticipata maturazione, come avvenuto nel 2005, la raccolta diretta (R2) sembrerebbe più conveniente, mentre in condizioni di più regolare maturazione, anno 2006, la raccolta anticipata sembra garantire maggiori produzioni di seme. E' ipotizzabile che, per le stesse ragioni, nel 2005 l'epoca di raccolta non abbia inciso sulla produzione di olio, mentre nel 2006, il protrarsi del periodo di raccolta in R2 abbia consentito un maggior accumulo di olio (Bhardwaj e Hamama, 2003). Più in generale, nonostante le differenze di produzione di seme e di contenuto di lipidi nelle due annate, la produzione a ettaro di olio non è mai risultata differente fra le due tipologie di raccolta.

A livello qualitativo l'epoca di raccolta non ha avuto influenza sulla composizione acidica in nessuno dei due anni, tuttavia, si sono verificate limitate variazioni nel rapporto fra acidi grassi monoinsaturi e polinsaturi dovute probabilmente alle diverse condizioni climatiche. Fra i principali fattori influenzanti il rapporto fra queste due tipologie di acidi grassi, infatti, vi sono le temperature nel periodo di riempimento del seme che, quando diminuiscono, determinano un aumento dell'insaturazione (Lotti, 1987; Harwood, 1997, Izzo, 2003). Per questo motivo nel 2006 la presenza della componente polinsaturata è stata più rilevante rispetto al 2005 caratterizzato da temperature mediamente più elevate. L'epoca di raccolta non pare incidere neanche sulle concentrazioni dei due principali acidi monoinsaturi (oleico ed erucico) in accordo anche a quanto riportato da altri autori (Bardwaj e Hamama, 2003). Oleico ed erucico, tuttavia hanno mostrato una significativa correlazione inversa, che pare giustificata dal percorso di formazione degli stessi, essendo l'acido oleico precursore di quello erucico (Ohlrogge e Browse, 1995; Slabas et al., 2001; Barker et al., 2007), e quindi al diminuire del primo è logico attendersi un aumento del secondo (Barker et al., 2007).

In definitiva, i due anni di prove agronomiche hanno rivelato un'importanza primaria delle condizioni climatiche sulla lipogenesi, sia quantitativamente che qualitativamente. Ciò sembra in qualche modo prevaricare l'importanza di alcuni aspetti di tecnica colturale, quale la scelta dell'epoca ottimale di raccolta che comunque, risulta imprescindibile dalla conoscenza degli effetti del clima sul metabolismo dei lipidi. Per tale motivo, si è ritenuto di proseguire l'attività adottando un approccio più riduzionista e volto a interpretare in maniera più meccanicistica gli effetti della distribuzione della luce lungo il profilo della

pianta sulla formazione dei lipidi. La scelta di studiare l'effetto della radiazione piuttosto che di altri fattori ambientali quali disponibilità idrica, nutrizionale, temperatura ecc. è giustificata dal minor interesse della ricerca su questo aspetto che pure si è dimostrato di cruciale importanza nell'ottimizzare la lipogenesi in specie quali Brassicaceae o oleaginose affini a seme verde (Singal et al., 1995; Kang e Rawsthorne, 1996; King et al., 1997; King et al., 1998; Ruuska et al., 2004; Schwender et al., 2004; Li et al., 2006).

7.2 TEST IN AMBIENTE CONTROLLATO

Effetto del Livello di Luminosità sullo Sviluppo della Pianta

E' noto come gli effetti della differente intensità luminosa si manifestino soprattutto sulla durata del ciclo fenologico e sulla potenzialità produttiva della pianta, entrambi correlati ad una maggiore efficienza del metabolismo.

Nel caso di *B. carinata* la maggiore intensità di luce ha provocato una riduzione del ciclo fenologico, valutabile in circa 15 giorni, segno diretto di un invecchiamento precoce della pianta, verosimilmente causato da un'accelerazione del processo di assimilazione e lipogenesi.

Nel complesso, la pianta ha sviluppato una maggior potenzialità produttiva aumentando di circa il 25% la superficie fotosintetizzante complessiva dell'apparato riproduttivo (silique + semi). L'aumento dell'area fotosintetizzante dei semi è dato sia dall'incremento del numero, che del rapporto superficie/semi. Al contrario, la maggior superficie di silique in condizioni di maggior luminosità risulta accresciuta per l'aumento del numero, ma non del rapporto superficie/silique. Diversamente le foglie, all'aumentare dell'intensità luminosa, hanno progressivamente diminuito la superficie fotosintetizzante in relazione ad un più precoce sopraggiungimento della senescenza.

Il maggior numero di semi in L2 è prevedibilmente attribuibile alla relazione positiva fra numero delle silique e semi, come anche confermato da Diepenbrock e Grosse (1995). Allo stesso modo è ipotizzabile che la dimensione del seme sia aumentata grazie alla maggiore disponibilità di assimilati dovuta al più elevato PAR intercettato (Keiller e Morgan, 1988; Andersen et al., 1996). D'altro canto, la crescita volumetrica dei semi dovrebbe indurre anche l'espansione della superficie di ogni singola silique (Singal et al., 1995; King et al., 1997; Diepenbrock, 2000), in contrasto a quanto precedentemente riportato circa l'effetto non significativo della luce sulle dimensioni delle silique (paragrafo 6.2.2.1). Tale

apparente contraddizione va probabilmente attribuita all'eccessiva semplificazione del modello allometrico adottato per il calcolo della superficie delle silique che non tiene conto della più o meno elevata espansione radiale dell'epidermide della siliqua dovuta al rigonfiamento (Fig. 7.1). In altri termini, l'approccio bidimensionale adottato per il calcolo della superficie non consente di valutare l'entità del rigonfiamento delle silique nonostante non cambino lunghezza e larghezza. Ne deriva perciò la probabile sottostima dell'effettiva superficie delle silique in L2.

La morfologia delle piante esposte alle diverse illuminazioni si presenta differente anche in

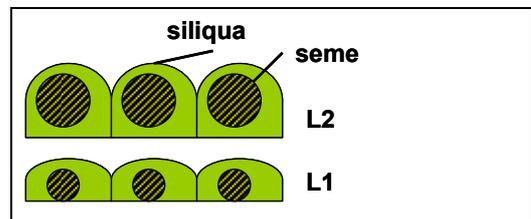


Fig. 7.1. Schematizzazione del profilo di siliqua nei due livelli di luce (L1 ed L2). Il modello allometrico di calcolo delle superficie considera solo le dimensioni trasversale e longitudinale ignorando quindi l'aumento della superficie causata dal rigonfiamento più o meno marcato dovuto alla dimensione del seme in essa contenuto.

relazione all'area fogliare. Fisiologicamente, il fenomeno atteso consiste in una brusca diminuzione dell'area fogliare in corrispondenza dell'accrescimento delle silique (Diepenbrock, 2000) che sono normalmente più esposte alla radiazione rispetto alle foglie e perciò esercitano una forte azione competitiva nei riguardi di queste ultime (Gammelvind et al., 1996). Quanto atteso trova pieno riscontro nei risultati che mostrano un'accentuata e precoce defogliazione della piante L2. Al contrario la minor disponibilità di luce comporta la persistenza delle foglie sulla pianta fino a poco prima della fine del ciclo. L'intensità luminosa non parrebbe invece influire sulla distribuzione delle silique lungo il profilo della pianta, che sembra dipendere maggiormente da fattori genetici piuttosto che ambientali (Rakow, 1978; Jenkins e Leitch, 1986; Grosse, 1989).

Effetto del Livello di Luminosità sulla Fotosintesi

L'effetto della quantità di radiazione luminosa sulla capacità di assimilazione della coltura è stato valutato in base a indicatori di efficienza fotosintetica ricavati da curve di fotosintesi in risposta a livelli di luce e CO₂ crescenti. In particolare, sono stati presi in esame: assimilazione netta (A), efficienza massima di carbossilazione (V_{cmax}), efficienza massima di trasporto elettronico (J_{max}) ed efficienza quantica (Q_e).

Dall'analisi dei singoli parametri, indipendentemente dal livello di luce a cui erano sottoposte le piante, si è notata una netta differenza fra strati in tutti i parametri considerati. Nello specifico, è stato evidenziato un netto incremento di efficienza fotosintetica in direzione acropeta, probabilmente dovuto sia all'acclimatamento in condizioni di maggior luminosità che al minor livello di senescenza degli organi apicali in confronto a quelli posti

nella parte mediana e basale del profilo. A titolo esemplificativo viene riportata in Fig. 7.2 la variazione di risposta fotosintetica all'aumentare della concentrazione di CO_2 sottostomatica nei tre strati (F1-F3). Alla stessa conclusione si giunge analizzando la relazione tra assimilazione netta ed il PAR (Fig. 7.3).

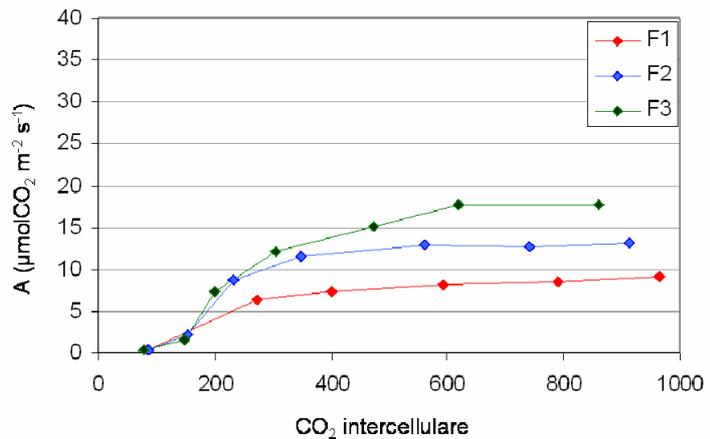


Fig. 7.2: Confronto fra le variazioni di risposta fotosintetica all'aumentare delle concentrazioni di CO_2 sottostomatica (curve A-Ci) nei diversi strati fogliari.

Andando invece ad analizzare l'efficienza del PSII mediante emissione in fluorescenza, si evidenzia ulteriormente come l'intensità luminosa non influenzi la qualità del fotosistema, limitatamente alle fasi iniziali di riempimento del seme. La maggiore illuminazione ha invece causato il decadimento anticipato del PSII parallelamente all'invecchiamento della pianta avvenuto,

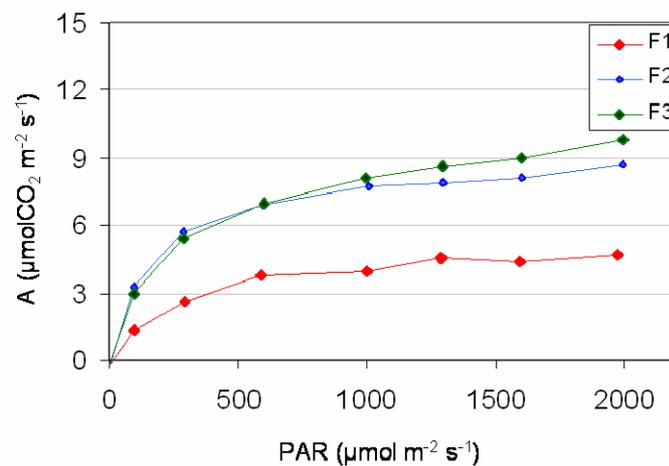


Fig. 7.3: Confronto fra le variazioni di risposta fotosintetica all'aumentare del PAR (curve luce) nei diversi strati fogliari.

come detto, precocemente in L2. La stessa dinamica è stata rilevata anche a carico del PSII delle siliquie e anche sulla composizione dei pigmenti fotosintetici (Chl_a e Chl_b) che sono risultati inferiori in L2 già al primo rilievo.

Gli andamenti dei valori SPAD sono risultati in pieno accordo con i valori precedenti benché non siano state riscontrate correlazioni significative fra questi e il contenuto di clorofilla nei vari strati della pianta. E' possibile che la maggiore diluizione dei pigmenti nelle foglie basali (F2) rispetto alle foglie apicali (F3) abbia determinato l'assenza di correlazione. A conferma di ciò, il valore di SLA in F3 è risultato molto minore rispetto a quello di F2.

Un altro interessante aspetto che riguarda l'efficienza fotosintetica della pianta è la composizione dei pigmenti fotosintetici delle silique. In accordo a quanto riportato da King *et al.* (1997), le silique, pur avendo un contenuto di clorofille inferiore di circa il 70% rispetto alle foglie, presentano un'efficienza del PSII di poco inferiore. Questo significa che le silique, pur avendo un contenuto di clorofille inferiore, hanno un'efficienza nell'utilizzo della luce pari a quella delle foglie, il che avvalorava l'ipotesi di un loro ruolo non secondario, sia come competitori con le foglie, sia ai fini del riempimento del seme.

Effetto del Livello di Luminosità sulla Relazione tra Fotosintesi e Sintesi dei Lipidi

Lo studio dei processi produttivi della pianta e la correlazione fra le varie vie biosintetiche, in relazione ai fattori ambientali, può essere effettuato attraverso l'analisi della discriminazione isotopica delle molecole prodotte. Nel caso della sintesi dei lipidi delle Brassicaceae, essendo chiaro il legame fra fotosintesi e sintesi degli acidi grassi (King *et al.*, 1997; King *et al.*, 1998; Ruuska *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006), si è deciso di studiare la relazione fra i due processi attraverso il confronto della composizione isotopica degli zuccheri di foglie, silique e semi con quella dei lipidi nei due trattamenti.

Dai dati ottenuti si deduce che la discriminazione isotopica degli zuccheri risulta minore nelle piante maggiormente esposte in relazione ad una differente influenza del livello di irradianza sulla conduttanza stomatica e sull'attività della Rubisco.

All'interno della stessa pianta, poi, non ci sono differenze di discriminazione tra gli strati ma solo tra gli organi. In particolare, il Δ delle foglie rispetto a silique e semi è in accordo con il diverso meccanismo di organizzazione della Rubisco infatti, mentre nelle foglie viene organizzata solamente la CO₂ atmosferica e il livello di discriminazione dipende solo dalla sua diffusione all'interno dei tessuti, in silique e semi è stato dimostrato come la Rubisco agisca anche nella rifissazione della CO₂ prodotta dalla sintesi dei lipidi (Schwender *et al.*, 2004). Tale CO₂, è arricchita di ¹³C poiché, durante la formazione dei lipidi, si ha elevata discriminazione. Per questo motivo con il meccanismo di rifissazione, gli zuccheri prodotti da silique e semi sono meno discriminati rispetto a quelli delle foglie.

Più in generale, è stato dimostrato come l'apporto di fotosintetati al seme, in condizioni normali, è sostanzialmente a carico della siliqua (Sheoran *et al.*, 1991; Singal *et al.*, 1992) quindi, non dovrebbe esserci nessuna differenza di Δ fra gli zuccheri ritrovati nel seme rispetto a quelli della siliqua. Dai dati ottenuti, invece, si evidenzia una minore

discriminazione isotopica degli zuccheri del seme che può essere spiegata con una produzione intrinseca.

L'andamento del Δ degli zuccheri del seme è inversamente proporzionale rispetto alla quantità di produzione degli oli il cui Δ si mantiene costantemente elevato. Si evidenzia come, nel momento di maggiore produzione di olio intorno al 30° giorno dalla fioritura (Goffman *et al.*, 2004), i valori di Δ relativi agli zuccheri del seme raggiungono i livelli minori; al contrario a fine ciclo il Δ degli zuccheri torna a salire in corrispondenza della conclusione della sintesi degli oli.

La differenza di discriminazione degli acidi grassi rispetto agli zuccheri è stata spiegata con l'effetto discriminante di PEP nella formazione di Acetil CoA (DeNiro e Epstein, 1971). Se così fosse si potrebbe spiegare una differenza isotopica fra grassi e zuccheri dell'entità di circa 2‰ (O'Leary, 1981). I dati sperimentali, invece, mostrano differenze più elevate rispetto a quelle giustificabili con la sola attività della PEP; sorge pertanto spontanea l'ipotesi della presenza di un'altra azione discriminante durante il processo di sintesi degli acidi grassi a livello plastidico visto che non ci sono differenze di discriminazione fra acido oleico ed acido erucico. In alternativa, la differenza di Δ potrebbe essere dovuta solamente ad una maggiore attività discriminante di PEP in relazione al tasso di formazione di acidi grassi.

Parallelamente all'aumento della sintesi dei lipidi si nota un aumento della concentrazione dei pigmenti fotosintetici nel seme che indica un incremento dell'efficienza fotosintetica di quest'organo in risposta alla maggior necessità di substrati. Per di più il contenuto di carotenoidi del seme è mediamente maggiore rispetto a quello delle silique; ciò si spiega sapendo che il seme ha a disposizione meno luce perché filtrata da queste ultime (Ruuska *et al.*, 2004). Tale adattamento del fotosistema dimostra ulteriormente come la capacità fotosintetica del seme sia fondamentale nella sintesi degli oli in accordo con quanto affermato da Goffmann *et al.*, 2005; Ruuska *et al.*, 2004; Schwender *et al.*, 2004.

Effetto del Livello di Luminosità sulla Produzione e Qualità dell'Olio

Allo scopo di analizzare l'effetto del livello di luminosità sulla produttività della pianta, vengono prese in considerazione la produzione di seme e la qualità dell'olio nei due trattamenti.

Appare chiaro come l'intensità luminosa influenzi la quantità di seme originato infatti, le piante più illuminate sono risultate anche le più produttive come d'altra parte atteso in accordo con quanto già affermato da Li *et al.*, 2006.

Dai dati è emersa una differenziazione fra gli strati: lo strato meno produttivo è risultato essere quello inferiore (S1) mentre non sono risultate differenze tra gli altri due. Tale distribuzione della produzione è semplicemente correlabile alla distribuzione delle silique nella pianta (Rakow, 1978; Jenkins e Leitch, 1986; Grosse, 1989).

Considerando l'analisi della produzione di olio, si rileva che le piante più esposte alla luce ne hanno accumulato di più in accordo a quanto affermato da Ruuska et al., 2004 e Li et al., 2006. Non si sono avute differenze lungo il profilo della pianta ma, la maggiore efficienza di biosintesi legata alla maggiore illuminazione ha determinato un incremento in toto della biosintesi degli acidi grassi.

Riguardo la qualità degli oli estratti, la maggiore illuminazione ha stimolato la sintesi di acidi grassi polinsaturi a discapito dei monoinsaturi. Questo può essere messo in relazione al fatto che al crescere dell'intensità luminosa i semi sono capaci di emettere più O₂ e quindi di stimolare una maggiore insaturazione (King et al., 1998).

Tra gli acidi grassi monoinsaturi non vi sono, invece, differenze relazionabili alle diverse illuminazioni per quanto riguarda l'acido erucico mentre l'intensità luminosa superiore è legata ad una minore produzione di acido oleico. Quanto affermato conferma ancora una volta il fatto che la luce stimola la produzione di polinsaturi mentre la quantità di acido erucico sembra dipendere solo da un controllo genetico.

8. CONCLUSIONI

Nel triennio di ricerca effettuata sulle Brassicaceae si sono studiati diversi aspetti riguardanti la produzione di seme, la produzione di olio e la qualità dell'olio con un'ottica di utilizzo industriale.

Nel primo biennio, con un approccio agronomico, sono stati provati due diversi metodi di raccolta con l'obiettivo di stabilire quale dei due possa garantire una maggiore produzione e una maggiore qualità di olio.

Nel terzo anno, con una prova in ambiente controllato, si sono studiati diversi aspetti della fisiologia della pianta, tutti finalizzati a quantificare la risposta produttiva e qualitativa della Brassica carinata in base all'intensità della luce.

Nei primi due annate si è notato che l'andamento climatico nel periodo di formazione del seme ha avuto una grossa influenza sia sulla produzione potenziale della pianta sia sull'incidenza delle perdite rispetto al metodo di raccolta.

Nel primo anno non si sono verificate differenze di quantità di produzione di seme fra le due modalità di raccolta nonostante che la produzione potenziale sia risultata maggiore nella tipologia anticipata. Ciò è dovuto al fatto che, quando il ciclo produttivo si chiude anticipatamente, la raccolta effettuata in due tempi provoca più perdite perché vi è un'accentuata crodatura del seme. Anche il contenuto di olio, in queste condizioni, non si è differenziato fra le raccolte. Ne consegue che, a parità di produzione ettariale di seme e di olio, la raccolta diretta è più conveniente.

Nel secondo anno, con condizioni ambientali ideali, la raccolta con sfalcio ha permesso una maggiore produzione di seme mentre le perdite sono risultate analoghe fra le due modalità di raccolta. Il contenuto di olio, viceversa, è risultato minore nella raccolta anticipata perché non si è completata la fase di accumulo nei semi.

La produzione ettariale di olio, quindi, non si è differenziata fra le raccolte per cui anche nel secondo anno è risultata più conveniente la raccolta diretta a discapito di quella anticipata. La variabilità di condizioni climatiche fra le due annate ha influenzato il livello produttivo medio che è risultato maggiore nel primo anno. Nonostante questo, le due specie (*B.carinata* e *B.napus*) hanno mostrato un comportamento produttivo analogo nei due anni; in particolare, *B.carinata* ha prodotto più seme rispetto a *B.napus* mentre quest'ultima ha accumulato più olio rispetto a *B.carinata*. Di conseguenza *B.carinata* ha

mostrato una produzione ettaria di olio maggiore rispetto a *B.napus* indipendentemente dal tipo di raccolta.

La qualità dell'olio non è stata influenzata dai metodi di raccolta in nessuna delle due annate e se ne deduce che le differenze nel rapporto tra acidi grassi monoinsaturi e acidi grassi polinsaturi dipendono solamente dalle diverse condizioni climatiche nei due anni e gli scostamenti di qualità non sono tali da modificare le caratteristiche complessive dell'olio.

Nel terzo anno l'applicazione di due diverse intensità luminose in ambiente controllato ha evidenziato che, aumentando l'intensità di luce, si può ottenere una riduzione sensibile della durata del ciclo produttivo, un aumento della potenzialità produttiva della piante in termini di numero di siliques e semi ed un aumento sostanziale nel rapporto di competizione delle siliques rispetto alle foglie.

L'efficienza fotosintetica fogliare della brassica è risultata differente lungo il profilo della pianta e, indipendentemente dalla radiazione luminosa, presenta un andamento calante dall'alto verso il basso mostrando un'elevata sensibilità nella risposta in base alla luce disponibile ed evidenzia un differente livello di senescenza.. La maggiore intensità luminosa ha determinato inoltre, una riduzione anticipata ed uniforme dell'efficienza del fotosistema delle foglie e delle siliques in tutti gli strati. Con minore illuminazione, la senescenza è avvenuta più tardivamente e, nel caso delle siliques, con minore uniformità.

Ne consegue che l'uniformità di maturazione dipende sia dalla posizione delle siliques sulla pianta sia dalla quantità di luce intercettata. Perciò, per avere una maggiore contemporaneità di maturazione, è fondamentale che l'architettura della pianta permetta un'intercettazione luminosa uniforme.

In condizioni di maggiore illuminazione, la discriminazione isotopica degli zuccheri in foglie, siliques e semi e dei grassi è minore; questo può essere correlato al più alto tasso di assimilazione indotto dalla maggiore esposizione alla luce.

Considerando solo gli zuccheri, indipendentemente dallo strato, la discriminazione isotopica decresce passando da foglie a siliques ed infine a semi; si evidenziano quindi meccanismi di utilizzazione della anidride carbonica differenti fra gli organi. Nel caso di siliques e seme il fenomeno è dipeso dalla contemporanea produzione di lipidi.

Focalizzando l'attenzione sull'andamento della discriminazione isotopica degli zuccheri del seme, si evince che esiste un forte legame fra la fissazione del carbonio e il tasso di produzione dei lipidi. Più aumenta la capacità di utilizzo dell'anidride carbonica, più aumenta la quantità dei lipidi prodotta.

Questo meccanismo conferma come nei semi vi sia una capacità di rifissazione dell'anidride carbonica legata alla formazione dei lipidi e come questo meccanismo, stimolato dalla luce, sia fondamentale per aumentare la quantità di grassi prodotti.

La differenza fra discriminazione isotopica dei grassi e quella degli zuccheri del seme non sembra essere giustificata solamente da un effetto di discriminazione degli enzimi che partendo dagli zuccheri formano i precursori degli acidi grassi. E' possibile quindi, che vi sia un ulteriore effetto di discriminazione durante la porzione di sintesi degli acidi grassi svolta nel cloroplasto, poiché non si è evidenziata discriminazione fra acido erucico ed acido oleico in nessuna delle due illuminazioni.

Riassumendo, *Brassica carinata* sfrutta in maniera efficace l'aumento della luminosità e questo porta ad un aumento sensibile della produzione di seme e di accumulo di olio lungo tutto il profilo della pianta. L'aumento di intensità luminosa non produce nessun effetto sul contenuto di acido erucico mentre aumenta la quantità di acidi grassi polinsaturi.

Dai risultati sperimentali ottenuti, la *Brassica carinata* è una pianta che trae beneficio dall'incremento di disponibilità luminosa e mantiene elevati standard produttivi anche in condizioni climatiche siccitose potendo così valorizzare anche areali tipici del centro-sud Italia.

L'architettura della pianta è risultata un fattore significativo nella determinazione della potenzialità produttiva ed è possibile migliorare la contemporaneità di maturazione e ottimizzare il metodo di raccolta facendo in modo che l'intercettazione luminosa sia il più uniforme possibile in tutte le siliques. Questo permetterebbe di aumentare la resa in olio per ettaro rendendo la coltivazione più conveniente per gli scopi industriali.

9. BIBLIOGRAFIA

- AHMAD, A., ISHRAT, K., ABDIN, M.Z., 2000.** Effect of sulfur fertilisation on oil accumulation, acetyl-CoA concentration, and acetyl-CoA carboxylase activity in the developing seeds of rapeseed (*Brassica campestris* L.). *Aust. J. Agric. Res.*, 51, 1023-1029.
- ALBAN C., DOUCE R., 1998.** Biotin-dependent carboxylases and their biotinylation in higher plants. *Plant lipid biosynthesis. Fundamentals and agricultural applications.* Society for experimental biology. Cambridge University Press, Seminar series, 67, 29-48
- ALBAN C., BALDET P., DOUCE R., 1994.** Localization and characterization of two structurally different forms of acetyl-CoA carboxylase in young pea leaves, of which one is sensitive to aryloxy-phenoxypropionate herbicides. *Biochemical Journal.* 300. 557-65.
- ALLEN, E.J., MORGAN, D.G., RIDGMAN, W.J., 1971.** A physiological analysis of the growth of oilseed rape. *J. Agric. Sci.*, 77, 339-341.
- ALLEN, D.J., MCKEE, I.F., FARAGE, P.K., BAKER, N.R., 1997.** Analysis of limitations to CO₂ assimilation on exposure of leaves of two *Brassica napus* cultivars to UV-B. *Plant, Cell and Environment*, 20, 633-640.
- ANDERSEN, M.N., HEIDMANN, T., PLAUBORG, F., 1996.** The effects of drought and nitrogen on light interception, growth and yield of winter oilseed rape. *Acta Agric. Scand.; B* 46; 55-67.
- ANDREWS, T.J., KANE, H.J., 1991.** Pyruvate is a by-product of catalysis by ribulose-biphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Biol. Chem.*, 266, 9447-9452.
- ARANJUELO, I., IRIGOYEN, J.J., SANCHEZ-DIAZ, M., 2007.** Effect of elevated temperature and water availability on CO₂ exchange and nitrogen fixation of nodulated alfalfa plants. *Env. J. Exp. Bot.* 59, 99-108.
- ARONDEL, V., LEMIEUX, B., HWANG, I., GIBSON, S., GOODMAN, H.M., SOMERVILLE, C., 1992.** nMap-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in *Arabidopsis*. *Science.* 258, 1353-1355.
- BETTEY M., IRELAND R.J., SMITH A.M., 1992.** Purification and characterization of acetyl-CoA carboxylase from developing pea embryos. *Journal of Plant Physiology*, 140, 513-20.

- BAO, X., POLLARD, M., OHLROGGE, J., 1998.** The biosynthesis of erucic acid in developing embryos of *Brassica rapa*. *Plant Physiol.* 118, 183-190.
- BERNERTH, R., FRENTZEN, M., 1990.** Utilization of erucoyl-CoA by acyl-transferases from developing seeds of *Brassica napus* (l) involved in triacylglycerol biosynthesis. *Plant Sci.* 67, 21-28.
- BHARDWAJ, H.L., HUMANA, A.A., 2003.** Accumulation of glucosinolate, oil, and erucic acid in developing *Brassica* seeds. *Industrial Crops and Products*, 17, 47-51.
- BJÖRKMAN, O., 1981.** Response to different quantum flux densities. In: Lange O.L., Nobel P.S., Osmond C.B., Zigler H., (eds), *Encyclopedia of Plant Physiol.*, Springer-Verlag, Berlin, 12A, 57-107.
- BJÖRKMAN, O., DEMMIG, B., 1987.** Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence at 77 k among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170, 489-504.
- BILSBORROW, P.E., NORTON, G., 1984.** A consideration of factors affecting the yield of oilseed rape. *Aspects Appl. Biol.*, 6, 91-100.
- BOLHAR-NORDENKAMPF, H.R., ÖQUIST, G., 1993.** Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: *Photosynthesis and production in a changing environment*, D.O. Hall, J.M.O. Scurlock, H.R. Bolhar-Nordenkampf, R.C. Leegood, & S.P. Long (eds). Chapman & Hall, London, 193-206.
- BOWES, G., OGREN, W.L., HAGEMAN, R.H., 1971.** Phosphoglycolate production catalysed by fructose diphosphate carboxylase. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 45, 71116-71122.
- BOYER, J.S., BOWEN, B.I., 1970.** Inhibition of oxygen evolution in chloroplasts isolated from leaves with low water potential. *Plant Physiol.*, 45, 612-615.
- BRAY, E.A., 1997.** Plant response to water deficit. *Trends in Plant Sciences*, 2, 48-54.
- BRUGNOLI, E., HUBICK, T.H., VON CAEMMERER, S., WONG, S.C., FARQUHAR, G.D., 1988.** Correlation between the carbon isotope discrimination in leaf starch and sugars of C₃ plants and the ratio of intercellular and atmospheric partial pressure of carbon dioxide. *Plant. Physiol.*, 88, 1418-1424.
- BRUGNOLI E., LAUTERI M. 1991.** Effect of salinity on stomatal conductance, photosynthetic capacity, and carbon isotope discrimination of salt-tolerant (*Gossypium hirsutum* L.) and salt-sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C₃ non-halophytes. *Plant Physiol.*, 95, 628-635.

- BRUGNOLI E., SCARTAZZA A., LAUTERI M., MONTEVERDI M.C., MÀGUAS C. 1998.** Carbon isotope discrimination in structural and non-structural carbohydrates in relation to productivity and adaptation to unfavourable conditions. In: Stable isotope. Griffith H. ed., BIOS Scient. Publ Ltd, Oxford, pp 133-146.
- BRUGNOLI, E., FARQUHAR, G.D., 2000.** Photosynthetic fractionation of carbon isotopes. In: R.C. Leegood, T.D. Sharkey, S. Von Caemmerer (eds.). Photosynthesis: Physiology and Metabolism, Kluwer Academic Publishers Printed in The Netherlands, 2-36.
- BUCHANAN, B.B., 1991.** Regulation of CO₂ assimilation in oxygen photosynthesis: the ferredoxin/thioredoxin system. Arch. Biochem Biophys. 288, 1-9.
- BUCHANAN, B.B., 1980.** Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. Ann. Rev. Plant Physiol. 31, 341-374.
- CAO, Y.Z., OO, K.C., HUANG, A.H.C., 1990.** Lysophosphatidate acyltransferase in the microsomes from maturing seeds of meadowfoam (*Limnanthes alba*). Plant Physiol., 94, 1190-1206.
- CASSAGNE, C., LESSIRE, R., BESSOULE, J.J., MOREAU, P., CRÉACH, A., SCHNEIDER, F., STURBOIS-BALCERZAK, B., 1994.** Biosynthesis of very long chain fatty acids in higher plants. Progress in Lipid Research, 33, 55-69.
- CHAMPOLIVIER, L., MERRIEN, A., 1996.** Effects of water stress applied at different growth stages to *Brassica napus* L. var. *oleifera* on yield, yield components and seed quality. Eu. J. Agron., 5, 153-160.
- CHEEMA, M.A., MALIK, M.A., HUSSAIN, A., SHAH, S.H., BASRA, S.M.A., 2001.** Effects of time and rate of nitrogen and phosphorus application on the growth and the seed and oil yields of Canola (*Brassica napus* L.). J. Agron. Crop Sci. 186, 103-110
- CETIOM, 2003.** Le rendez vous du colza. Colza d'hiver. Les cahiers techniques du Cetiom, 4-5.
- CHOESIN, D.N., BOERNER, R.E.J., 1991.** Allyl isothiocyanate release and the allelopathic potential of *Brassica napus* (Brassicaceae). Am. J. Bot. 78, 8, 1083-1090.
- CONDON A.G., RICHARD R.A., FARQUHAR G.D. 1992.** The effect of variation in soil water availability, vapour pressure deficit, and nitrogen nutrition on carbon isotope discrimination in wheat. Aust J Agric Res, 43, 1463-1711.

- CRAUFURD P.Q., WHEELER T.R., ELLIS R.H., SUMMERFIELD R.J., WILLIAMS J.H. 1999.** Effect of temperature and water deficit on water-use efficiency, carbon isotope discrimination, and specific leaf area in peanut. *Crop Sci.*, 39, 136-142.
- DE NIRO, M.G., EPSTEIN, S., 1971.** Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science*, 197, 261-263.
- DEHAYE L., ALBAN C., JOB C., DOUCE R., JOB D., 1994.** Kinetics of the two forms of acetyl-CoA carboxylase from *Pisum sativum*. Correlation of the substrate specificity of the enzyme and sensitivity towards aryloxyphenoxypropionate herbicides. *European Journal of Biochemistry*, 225, 1113-23.
- DIEPENBROCK, W., 2000.** Yield analysis of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) : a review. *Field Crops Research*, 67, 35-49.
- DIEPENBROCK, W., GROSSE, F., 1995.** Rapeseed (*Brassica Napus* L.) physiology. In: Diepenbrock, W., Becker, H.C. (eds.), *Physiological Potentials for Yield Improvement of Annual Oil and Protein Crops*. *Adv. Plant Breeding*, 17, 21-53.
- DOMERGUE, F., 1997.** Caractérisation et purification de la 3-hydroxy-acyl-CoA déshydrogénase et de la 3-cétoacyl-CoA synthase, composantes de l'oléoyl-CoA elongase de *Brassica napus*. PhD thesis, Université Victor Ségalen, Bordeaux, 2.
- DOMERGUE, F., BESSOULE, J-J., MOREAU, P., LESSIRE, R., CASSAGNE, C., 1998.** Recent advances in plant fatty acid elongation. *Plant lipid biosynthesis. Fundamentals and agricultural applications*. Society for experimental biology. Cambridge University Press, Seminar series, 67, 1-26.
- DOWNEY, R.K., CRAIG, B.M., 1964.** Genetic control of fatty acid biosynthesis in rapeseed (*Brassica napus*, L.). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 41, 475-8.
- DRY, L.B., BRYCE, J.H., WISKICH, J.T., 1987.** Regulation of the mitochondrial respiration. In: *The biochemistry of plants*. Davies P.P. (ed) Academic Press., 213-253.
- EGLI, D.B., 1998.** Seed growth and development. In: D.B. Egli, ed., *Seed Biology and the yield of grain crops*, Ed. 1 Cab International, New York, 15-37.
- EGLI, M.A., GENGENBACH, B.G., GRONWALD, J.W., SOMERS, D.A., WYSE, D.L., 1993.** Characterization of maize acetyl-CoA carboxylase. *Plant Physiology*, 101, 499-506.
- ELLIS, R.J., 1979.** The most abundant protein in the world. *Trend Biochem. Sci.* 4, 241-244.
- EPRON, D., DREYER, E., BREDAS, N., 1992.** Photosynthesis of oak trees (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) during drought stress under field conditions: diurnal course of net CO₂

assimilation and photochemical efficiency of photosystem II. *Plant, Cell and environment*, 15, 809-820.

EVANS, J.R., 1983. Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat. *Plant Physiol.* 72, 297-302.

EVANS, J.R., 1988. Acclimation by the thylakoid membranes to growth irradiance and the partitioning of nitrogen between soluble and thylakoid proteins. *Aust. J. Plant Physiol.*, 15, 93-106.

FARQUHAR, G.D., RICHARDS, R.A., 1984. Isotope composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Aust. J. Plant Physiol.*, 11, 539-552.

FARQUHAR, G.D., VON CAMMERER, S., 1982. Modelling of photosynthetic response to environmental conditions. *Encycl. Plant Physiol.* 12B, 550-582.

FARQUHAR, G.D., O'LEARY, M.H., BERRY, J.A., 1982. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Aust. J. Plant Physiol.*, 9, 121-137.

FARQUHAR, G.D., VON CAMMERER, S., BERRY, G.A., 1980. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta*, 149, 79-80.

GABRIELLE, B., DENOROY, P., GOSSE, G., JUSTES, E., ANDERSEN, M.N., 1998A. Development and evaluation of a CERES – type model for winter oilseed rape. *Field Crops Res.*, 57, 95-111.

GABRIELLE, B., DENOROY, P., GOSSE, G., JUSTES, E., ANDERSEN, M.N., 1998B. A model of leaf area development and senescence of winter oilseed rape. *Field Crops Res.*, 57, 209-222.

GAMMELVIND, L.H., SCHJOERRING, J.K., MOGENSEN, V.O., JENSEN, C.R., BOCK J.G.H., 1996. Photosynthesis in leaves and siliques of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Soil*, 186, 227-236.

GAMON, J.A., PEARCY, R.W., 1989. Leaf movement, stress avoidance and photosynthesis in *Vitis californica*. *Oecologia*, 79, 475-481.

GENTY, B., BRIANTAIS, J.M., BAKER, N.R., 1989. The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990, 87-92.

GLEIXNER, G., DANIER, H.J., WERNER, R.A., SCHMIDT, H.L., 1993. Correlation between the ¹³C content of primary and secondary plant products in different cells

compartments and that in the decomposing basidiomycetes. *Plant Physiol.*, 102, 1287-1290.

GOFFMAN, F.D., RUCKLE, M., OHLROGGE, J.B., SHACHAR-HILL, Y., 2004. Carbon dioxide concentrations are very high in developing oilseeds. *Plant Physiol. and Biochemistry*, 42, 703-708.

GOFFMAN, F.D., ALONSO A.P., SCHWENDER, J., SHACHAR-HILL, Y., OHLROGGE, J.B., 2005. Light enables a very high efficiency of carbon storage in developing embryos of rapeseed. *Plant Physiol.* 138, 2269-2279.

GRIFFITHS, H., 1991. Applications of stable isotope technology in physiological ecology. *Functional Ecology*, 5, 254-269.

GROOM, Q.J., BAKER, N.R., 1992. Analysis of light-induced depressions of photosynthesis in leaves of a wheat crop during the winter. *Plant Physiology*, 100, 1217-1223.

GROSSE, F., 1989. Untersuchungen zur Ertragsbildung und Ertrags-struktur in einem Winterrapsortiment. PhD Thesis. Christian-Albrechts-University Faculty of Agriculture, Kiel.

HABEKOTTÉ, B., 1997. Options for increasing seed yield of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): a simulation study. *Field Crops Res.* 54, 109-126.

HANSON, H.C., 1917. Leaf structure as related to environment. *Am. J. Bot.*, 4, 533-560.

HARRIS, P., JAMES, A.T., 1969. Effect of low temperature on fatty acid biosynthesis in seeds. *Biochimica et Biophysica Acta*, 187, 13-18.

HARWOOD, J.L., 1988. Fatty acid metabolism. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39, 101-38

HARWOOD, J.L., 1991. Lipid synthesis. In *Target Sites for Herbicide Action*. Ed. R.C. Kirkwood. Pp.57-94. New York: Plenum Press.

HARWOOD, J.L., JONES, A.L., PERRY, H.J., RUTTER, A.J., SMITH, K.L., WILLIAMS, M., 1994. Changes in plant lipids during temperature adaptation. In *Temperature Adaptation of biological Membranes*, ed. A.R. Cossins, London: Portland Press, 107-118

HARWOOD, J.L., 1997. Plant lipid metabolism. *Plant biochemistry* (Dey P.M. and Harbone J.B.). Academic Press, 237-271.

- HARWOOD, J.L., 1998.** What's so special about plant lipids?. Plant lipid biosynthesis. Fundamentals and agricultural applications. Society for experimental biology. Cambridge University Press, Seminar series, 67, 1-26.
- HARWOOD, J.L., 1998.** Environmental effects on plant lipid biochemistry. In: Plant lipid biosynthesis. (Ed.) J.L. Harwood, Cambridge University Press, 305-347.
- HAVAUX, M., LANNOYE, R., 1984.** Effects of chilling temperatures on prompt and delayed chlorophyll fluorescence in maize and barley leaves. *Photosynthetica*, 18, 117-127.
- HE, J., CHEE, C.W., GOH, C.J., 1996.** "Photoinhibition" of *Heliconia* under natural tropical conditions: the importance of leaf orientation for light interception and leaf temperature. *Plant, cell and environment*, 19, 1238-1248.
- HITCHCOCK C., E NICHOLS, B.W., 1971.** Plant lipid biochemistry. London: Academic Press.
- HLOUSEK-RADOJCIC, A., IMAI, H. & JAWORSKI, J.G., 1995.** Oleoyl-CoA is not an immediate substrato for fatty acid elongation in developing seeds of *Brassica napus*. *Plant Journal*, 8(6), 803-9.
- HORVATH, I., TOROK, Z., VIGH, L., KATES, M., 1991.** Lipid hydrogenation induces elevated 18 : 1-CoA desaturase activity in *Candida lipolytica* microsomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1085, 126-130.
- HUBICK, K.T., FARQUHAR, G.D., SHORTER, R., 1986.** Correlation between carbon isotope discrimination and water-use efficiency in diverse peanut germoplasm. *Aust. J. Plant Physiol.*, 13, 803-816.
- IMAI, H., HLOUSEK-RADOJCIC, A., MATHIS, A., JAWORSKI, J., 1995.** Elongation system involved in the biosynthesis of very long chain fatty acids in *Brassica napus* seeds: Characterization and Solubilization. *Plant Lipid Metabolism*, ed. J.C. Kader & P. Mazziak, 118-20. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- IORI, R., LEONI, O., FONTANA, F., LAZZERI, L., PALMIERI, S., ATTENE, G., CIRICIOFOLO, E., LETO, C., MOSCA, G., 1990.** Evoluzione dei principali costituenti qualitativi durante il riempimento e la maturazione del seme di colza (*Brassica napus* L.) in alcuni ambienti di coltivazione. *Rivista di Agronomia*, 2-3, 243-249.
- IVANOV, S., 1927.** Dependence of the chemical composition of oil-containing plants on the climate. *Oil & Fat. Ind.*, 5, 29.
- IZZO, R., PARADOSSI, C., LOTTI, G., 1974.** Gli olii di semi delle diverse zone della calatide del girasole nel corso della maturazione. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, 53, 71

- IZZO, R., 2003.** Il metabolismo lipidico. *Biochimica agraria* (Scarponi L.), Ed. Patron, 7, 315-353.
- JAWORSKI, J.G., STUMPF, P.K., 1974.** Fat metabolism in higher plants. Properties of a soluble stearyl-acyl carrier protein desaturase from maturing *Carthamus tinctoris*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 162, 158-165.
- JAWORSKI, J.G., CLOUGH, R.C. & BAMUM, S.R., 1989.** A cerulenin insensitive short chain 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase in *Spinacia oleracea* leaves. *Plant Physiology*, 90, 41-44.
- JENKINS, P.D., LEITCH, M.H., 1986.** Effects of sowing date on the growth and yield of winter oil-seed rape (*Brassica napus* L.). *J. Agric. Sci., Camb.*, 105, 405-420.
- JOHNSON, G.N., YOUNG, A.J., GRIME J.P., SCHOLE, J.D., HORTON P., 1993.** The dissipation of excess excitation energy in British plant species. *Plant Cell Env.*, 16, 673-679.
- JONES, H., 2006.** Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *J. Exp. Bot.*; 49: 387 - 398.
- KANG, F., RAWSTHORNE, S., 1994.** Starch and fatty acid biosynthesis in plastids from developing embryos of oil seed rape. *Plant J.*, 6, 795-805.
- KANG, F., RAWSTHORNE, S., 1996.** Metabolism of glucose-6-phosphate and utilization of multiple metabolites for fatty acid synthesis by plastids from developing oilseed rape embryos. *Planta*, 199, 321-327.
- KAUTSKY, H., APPEL, W., AMANN, H., 1960.** Chlorophyllfluorescenz und kohlenzureassimilation. *Biochemische Zeitschrift*, 322, 277-292.
- KEILLER, D.R., MORGAN, D.G., 1988.** Distribution of ¹⁴C-labelled assimilates in flowering plants of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J. Agric. Sci., Camb.* 111, 347-355.
- KING, S.P., LUNN, J.E., FURBANK, R.T., 1997.** Carbohydrate content and enzyme metabolism in developing canola siliques. *Plant Physiol.*, 114, 153-160.
- KING, S.P., BADGER, M.R., FURBANK, R.T., 1998.** CO₂ refixation characteristics of developing canola seeds and silique wall. *Aust. J. Plant Physiol.*, 25, 377-386.
- KNUTZON, D.S., LARDIZABAL, K.D., NELSON, J.S., BLEIBAUM, J.L., MAELOR DAVIES, H., METZ, J.C., 1995.** Cloning of a coconut endosperm cDNA encoding a 1 – acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase that accepts medium-chain-length substrates. *Plant Physiol.*, 109, 999-1006.

- KOLLATUKUDY, P.E., CROTEAU, R., BUCKNER, J.S., 1976.** Biochemistry of plant waxes. In Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes, ed. P.E. Kolattukudy, 289-347.
- KONISHI T., SASAKI Y., 1994.** Compartmentalization of two forms of acetyl-CoA carboxylase in plants and the origin of their tolerance toward herbicides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3598-3601.
- KONISHI T., SINOHARA K., YAMADA K., SASAKI Y., 1996.** Acetyl-CoA carboxylase in higher plants: most plants other than gramineae have both the prokaryotic and the eukaryotic forms of this enzyme. Plant Cell Physiology, 37, 1197-200.
- KRAUSE, G.H., 1988.** Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. Physiologia Plantarum, 74, 566-574.
- LAMBERS, H., CHAPIN II, F.S., PONS, T.L., 2000.** Plant physiological ecology. Ed. Springer Verlag New York Berlin, 10-89.
- LANCASHIRE, P.D., BLEIHOLDER, H., LANGELÜDDECKE, P., STAUSS, R., VAN DEN BOOM, T., WEBER, E., WITZEN-BERGER, A., 1991.** An uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. Ann. appl. Biol. 119, 561-601.
- LEACH, J.E., MILFORD, G.F.J., MULLEN, L.A., SCOTT, T., STEVENSON, H.J., 1989.** Accumulation of dry matter in oilseed rape crops in relation to the reflection and absorption of solar radiation by different canopy structures. Aspects Appl. Biol., 23, 117-123.
- LEHNINGER, A.L., 1983.** La biosintesi dei lipidi. Principi di biochimica, Zanichelli, 561-574.
- LESSIRE, R., ABDUL-KARIM, T., CASSAGNE, C., 1982.** Origin of the wax very long chain fatty acids in leek, *Allium porrum* L., leaves: a plausible model. The Plant Cuticle, ed. D. F. Cutler, K. L. Alvin & C. E. Price, 167-80, London: Academic Press.
- LERNMARK, U., GARDESTROM, P., 1994.** Distribution of pyruvate dehydrogenase complex activities between chloroplasts and mitochondria from leaves of different species. Plant Physiol., 106, 1633-1638.
- LI, Y., BEISSON, F., POLLARD, M., OHLROGGE J. 2006.** Oil content of Arabidopsis seeds: The influence of seed anatomy, light and plant-to-plant variation. Phytochemistry, 67, 904-915.
- LIECHTENTHALER, H., 1987.** Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. Plant Cell Membranes. Academic Press, USA, Methods in Enzymology, 148, 351-382.

- LIGHTNER, J., JAMES, JR, D.W., DOONER, H.K., BROWSE, J. 1994.** Altered body morphology is caused by increased stearate levels in a mutant of Arabidopsis. *The Plant Journal*, 6, 401-12.
- LINDQVIST, Y., HUANG, W., SCHNEIDER, G. & SHANKLIN, J., 1996.** Crystal structure of Δ_9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins. *The EMBO Journal*, 15, 4081-92.
- LOCKHEART, M.J., VAN BERGEN, P.F., EVERSLED, R.P., 1996.** Variations in the stable carbon isotope compositions of individual lipids from the leaves of modern angiosperms: implications for the study of higher land plant-derived sedimentary organic matter. *Org. Geochem.*; 26: 137 - 153.
- LONG, S.P., FARAGE, P.K., GARCIA, R.L., 1996.** Measurement of leaf and canopy photosynthetic CO₂ exchange in the field. *J. Exp. Bot.*; 47: 1629 - 1642.
- LORIMER, G.H., 1981.** The carboxylation and oxygenation of Ribulose 1.5-isphosphate: the primary events in photosynthesis and photorespiration. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32, 349-383.
- LOTTI, G., 1985.** I lipidi. *Principi di chimica e biochimica vegetale II*. ETS Editrice, Pisa, 17, 1-70.
- LOTTI, G., GALOPPINI, C., 1965.** la natura dei lipidi presenti negli organi germinativi e nei tessuti di riserva dei semi. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, 42, 289.
- LYNEN, F., 1954.** Partecipation of coenzime A in the constitution of fat. *Nature*, 174, 962.
- MAKINO, A., NAKANO, H., MAE, T., 1994.** Effect of growth temperature on the responses of Rubisco, electron transport components and sucrose synthesis enzymes to leaf nitrogen in rice and their relationship to photosynthesis. *Plant Physiol.* 105, 1231-1238.
- MAILER, R.J., 1989.** Effects of Applied Sulfur on Glucosinolate and Oil Concentrations in the Seeds of Rape (*Brassica napus* L.) and Turnip Rape (*Brassica rapa* L. var. silvestris (Lam.) Briggs). *Aust. J. Agric. Res.*, 40, 617-624.
- MATE, C.J., VON CAEMMERER S., EVANS, J.R., HUDSON, G.S., ANDREWS, T.J., 1996.** The relationship between CO₂ assimilation rate, Rubisco carbamylation and Rubisco activase content in activase-deficient transgenic tobacco suggest a simple model of activase action. *Planta*, 198, 604-613.
- MAXWELL, K., JOHNSON G.N., 2000.** Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Botany*, 51, 345, 659-668.

- MCCARTHY, A.D., HARDIE, D.G., 1984.** Fatty acid synthase – an example of protein evolution by gene fusion. *Trends in Biochemical Sciences*, 9, 60-3.
- MELZER, E., SCHMIDT, H.L., 1987.** Carbon isotope effects on the pyruvate dehydrogenase reaction and their importance for relative carbon –13 depletion in lipids. *J. Biol. Chem.*, 262, 8159-8164.
- MENDHAM, N.J., SALISBURY, P.A., 1995.** Physiology: crop development, growth and yield. In DS Kimber, Di McGregor, eds, *Brassica Oilseeds: Production and Utilization*. CAB International, Wallingford, UK, 11-64.
- MOHANTY, P., BOYER, J.S., 1976.** Chloroplast response to low leaf potentials. *Plant Physiol.*, 57, 704-709.
- MONSI, M., SAEKI, T., 1953.** Über den lichtfaktor in den Pflanzengesellschaften und sein bedeutung für die Stoffproduktion. *Jap. J. Bot.*, 14, 22-52.
- MONTI A., AMADUCCI M.T., PRITONI G., VENTURI G., 2006.** Variation in carbon isotope discrimination during growth and at different organs in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Field Crops Research*, 98, 157-163.
- MONTI A., BRUGNOLI, E., SCARTAZZA, A., AMADUCCI M.T., 2006.** The effect of transient and continuous drought on yield, photosynthesis and carbon isotope discrimination in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *J. Exp. Bot.*, 6, 1253-1262.
- MOREAU, P., JUGUELIN, H., LESSIRE, R., CASSAGNE, C., 1988.** Plasma membrane biogenesis in higher plants: in vivo transfer of lipids to the plasma membrane. *Phytochemistry*, 27, 1631-8.
- MORRIS, L.J., 1966.** Separations of lipids by silver ion chromatography. *J. Lipid Res*, 7, 717-732.
- MURPHY, D.J., PIFFANELLI, P., 1998.** Fatty acid desaturases: structure mechanism and regulation. *Plant lipid biosynthesis. Fundamentals and agricultural applications*. Society for experimental biology. Cambridge University Press, Seminar series, 67, 29-48
- NAKAMURA Y., YAMADA M., 1979.** The light-dependent step of de novo synthesis of long chain fatty acids in spinach chloroplast. *Plant Sci. Lett.* 14, 291-95.
- NELSON D.L., COX M.M., 2002.** Biosintesi dei lipidi. I principi di biochimica di Lehninger. Zanichelli. 760-805
- NIKOIAU BJ, HAWKC JC. 1984.** Purification and characterization of maize leaf acetyl-CoA carboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 228, 86-96.

- NOBEL, P.S., WALKER, D.B., 1985.** Structure of leaf photosynthesis tissue. In *Photosynthetic mechanism and the environment*. Barber, J., Baker, N.R., (eds), Elsevier, am, 501-536.
- ÖGREN, E., SJÖSTRÖM, M., 1990.** Estimation of the effect of photoinhibition on the carbon gain in leaves of a willow canopy. *Planta*, 181, 560-567.
- OHLROGGE, J.B., JAWORSKI, J.G., 1997.** Regulation of fatty acid synthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 109-136.
- OHLROGGE, J.B., BROWSE, J., 1995.** Lipid Bioynthesis. *Plant Cell*, 7, 957-970.
- O'LEARY, M.H., 1981.** Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry*, 20, 553-567.
- O'LEARY, M.H., 1993.** Biochemical basis of carbon isotope fractionation. In: *Stable isotope and plant carbon-water relations*. Ehleringer J.R., Hall, A.E., Farquhar, g.d. (eds.). Academic Press, London, 19-28.
- OSMOND, C.B., WINTER, K., ZIEGLER, H., 1982.** Functional significance of different pathways of CO₂ fixation in photosynthesis. In: *Encyclopaedia of Plant Physiology*, 12B; *Physiological Plant Ecology II* (eds. O.L. Lange, Springer Verlag, New York, 479-547.
- OZER, H., 2003.** Sowing date and nitrogen rate effects on growth, yield and yield components of two summer rapeseed cultivars. *Europ. J. Agron.*, 19, 453-463.
- PAGE R.A., OKADA, S., ARWOOD J.L. 1994.** Acetyl-CoA carboxylase exerts strong flux control over lipid synthesis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*.1210, 369-72.
- PARK, R., EPSTEIN, S., 1961.** Metabolic fractionation of ¹³C and ¹²C in plants. *Plant Physiol.*, 36, 133-138.
- POST-BEITTENMILLER D., JAWORSKI J.G., OHIROGGE, J.B. 1991.** In vivo pools of free and acylated acyl carrier proteins in spinach: evidence for sites of regulation of fatty acid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 1858-65.
- POST-BEITTENMILLER, D., ROUGHAN, G., OHLROGGE, J.B., 1992.** Regulation of plant fatty acid biosynthesis: analysis of acyl-CoA and acyl-acyl carrier protein substrate pools in spinach and pea chloroplasts. *Plant Physiol.*, 100, 923-930.
- POST-BEITTENMILLER, D., 1996.** Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 405-30.
- POWLES, S.B., 1984.** Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35, 14-55.

- RAKOW, G., 1978.** Zur Formulierung von Zuchtzielen für Körner-raps. *Fat. Sci. Technol.*, 80, 93-99.
- RICHARDS, R.A., THURLING, N., 1978a.** Variation between and within Species of Rapeseed (*Brassica campestris* and *B. napus*) in Response to Drought Stress. I Sensitivity at Different Stages of Development. *Aust. J. Agric. Res.*, 29, 469-477.
- RICHARDS, R.A., THURLING, N., 1978b.** Variation between and within Species of Rapeseed (*Brassica campestris* and *B. napus*) in Response to Drought Stress. II Sensitivity at Different Stages of Development. *Aust. J. Agric. Res.*, 29, 479-490.
- RICHARDS R.A., LÓPEZ-CASTANEDA C., GOMEZ-MACPHERSON H., CONDON A.G. 1993.** Improving the efficiency of water use by plant breeding and molecular biology. *Irr. Sci.*, 14, 93-104.
- ROBELIN, M., TRIBOI, A.M., 1983.** Assimilation nette d'une culture de colza d'hiver au cours du cycle de végétation sous l'influence de l'environnement climatique de la densité du peuplement et de la fertilisation azotée. In: *Proceeding of the International Rapeseed Conference*, 6, 98-103.
- ROBERTSON, E.J., WILLIAMS, M., HARWOOD, J.L., LINDSAY, J.G., LEAVER, C.J., LEECH, R.M., 1995.** Mitochondria increase three-fold and mitochondrial proteins and lipids change dramatically in post-meristematic cells in young wheat leaves grown in elevated CO₂. *Plant Physiol.*, 108, 469-474.
- RODRIGUES PEREIRA, A.S, 1977.** Determination of leaf area coefficient in sunflower. *Neth. J. agric. Sci.*, 25, 238-242.
- ROLLETSCHKE, H., BORISJUK, L., KOSCHORRECK, M., WOBUS, U., WEBER, H., 2002.** Legume embryos develop in a hypoxic environment. *J. Exp. Bot.* 53, 1099-1107.
- ROUGAN P.G., SLACK C.R., 1982.** Cellular organization of glycerolipid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33, 97-132.
- RUNDEL, P.W., EHLERINGER, J.R., NAGY, K.A., 1989.** *Stable isotopes in Ecological Research.* Springer-Verlag, New York..
- RUUSKA, S.A., SCHWENDER, J., OHLROGGE, J.B., 2004.** The capacity of green oilseeds to utilize photosynthesis to drive biosynthetic processes. *Plant Physiol.* 136, 2700-2709.
- SAKAKI, T., KONDO, N., SUGAHARA, K., 1983.** Breakdown of photosynthetic pigments and lipids in spinach leaves with ozone fumigation: role of active oxygens. *Physiologia Plantarum*, 5-9, 28-34.

- SAKAKI, T., OHNISHI, J., KONDO, N., YAMADA, M., 1985.** Polar and neutral lipid changes in spinach leaves with ozone fumigation. *Plant and Cell Physiology*, 26, 253-262.
- SAKAKI, T., TANAKA, K., YAMADA, M., 1994.** General metabolic changes in leaf lipids in response to ozone. *Plant and Cell Physiology*, 35, 53-62.
- SALISBURY F.B., ROSS C.W., 1984.** Lipidi e composti aromatici. *Fisiologia Vegetale*, Zanichelli. 14, 218-224.
- SASAKI Y., KONISHI T., NAGANO Y., 1995.** The compartmentation of acetyl-coenzyme A carboxylase in plants. *Plant Physiology*, 108, 445-449.
- SCARTAZZA A., LAUTERI M., GUIDO M.C., BRUGNOLI E. 1998.** Carbon isotope discrimination in leaf and stem sugars, water-use efficiency and mesophyll conductance during different developmental stages in rice subjected to drought. *Aust. J. Plant Physiol.*, 25, 489-498.
- SCHREIBER, U., BILGER, W., NEUBAUER, C., 1995.** Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: *Ecophysiology of photosynthesis*, E-D. Schools & M.M. Caldwell (eds.). Springer-Verlag, Berlin, 49-70.
- SCHWENDER, J., OHLROGGE, J., 2002.** Probing in vivo metabolism by stable isotope labelling of storage lipids and proteins in developing *Brassica napus* embryos. *Plant Physiology*, 130, 347-361.
- SCHWENDER, J., OHLROGGE, J., SHACHAR-HILL, Y., 2004.** Understanding flux in plant metabolic networks. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7, 309-317.
- SCHWENDER, J., GOFFMAN, F.D., OHLROGGE, J., SHACHAR-HILL, Y., 2004.** Rubisco without the Calvin cycle improves the carbon efficiency of developing green seeds. *Nature*, 432, 779-782.
- SEDGWICK, B., 1973.** Biosynthesis and its control in plants. Acad. press, London..
- SHEORAN, I.S., SAWHNEY, V., BABBAR, S., SINGH, R., 1991.** *In vivo* Fixation of CO₂ by attached pods of *Brassica campestris* L. *Ann. Bot.*, 67, 425-428.
- SHINTANI, D.K., OHIROGGE, J.B. 1995.** Feedback inhibition of fatty acid synthesis in tobacco suspension cells. *The Plant Journal*, 7, 577-87.
- SHMID K., ANDREWS J., OHLROGGE J., 2000.** Biosintesi e degradazione degli acidi grassi e dei lipidi. *Metabolismo vegetale*, ed. Calderini Edagricole. 27, 541-561.
- SINGAL, H.R., SHEORAN, I.S., SINGH, R., 1992.** Photosynthetic contribution of pods towards seed yield in Brassica. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.*, B58, 165-370.

- SINGAL, H.R., TALWAR, G., DUA, A., SINGH, R., 1995.** Pod photosynthesis and seed dark CO₂ fixation support oil synthesis in developing *Brassica* seeds. *J. Biosci.*, 20, 49-58.
- SMILLIE, R.M., 1979.** The useful chloroplast: A new approach for investigating chilling stress in plant. In: *Low temperature stress in crop plants* (Lyons, J.M., Graham, D., Raison, J.K., eds), Academic Press, New York, 187-202.
- SMIRNOV, B.P., 1960.** Biosynthesis of higher fatty acids from acetate in isolated chloroplasts of *spinacia oleracea* leaves. *Biokhimiya*, 25, 419.
- SMITH G.S., JOHNSTON C.M., CONFORTH I.S., 1983.** Comparison of nutrient solutions for growth of plants in sand culture. *New Phytol.* 94, 537-548.
- SLABAS A.R., SIMON J.W., BROWN A.P., 2001.** Biosynthesis and regulation of fatty acids and triglycerides in oil seed rape. Current status and future trends. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103, 455-466.
- SLABAS, A.R., HELLYER, A., SIDEBOTTOM, C., BAMBRIDGE, H., COTTINGHAM, I.R., KESSELL, R., SMITH, C.G., SHELDON, P., KEKWICK, R.G.O., DE SILVA, J., WINDUST, J., JAMES, C.M., HUGHES, S.G. & SAFFORD, R., 1987.** Molecular structure of plant fatty acid synthesis enzymes. In *Plant Molecular Biology*, ed. D. von Wettstein & N.H. Chua, vol. 140, NATO Series A, pp. 265-77.
- SLABAS, A.R., SIMON, J.W., BROWN, A.P., 2001.** Biosynthesis and regulation of fatty acids and triglycerides in oil seed rape. Current status and future trends. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103, 455-466.
- STOKER, R., CARTER, K.E., 1984.** Effect on irrigation and nitrogen on yield and quality of oilseed rape. *N.Z. J. Exp. Agric.* 12, 219-224.
- STYMNE, S., STOBART, A.K., 1984.** The biosynthesis of triacylglycerols in microsomal preparations of developing cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biochem. J.* 220, 481-488.
- STUMPF P.K., BRADBEER, C., 1959.** Fat metabolism in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 10, 197.
- STUMPF, P.K., 1984.** Fatty acid biosynthesis in higher plants. In *Fatty Acid Metabolism and its regulation*, ed. S. Numa, 155-179.
- SYLVESTER-BRADLEY, R., 1985.** Revision of a code for stages of development in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Asp. appl. Biol.* 10, Field Trials Methods and Data handling, 395-400.

- TAIZ, L., ZEIGER, E., 2002.** Respirazione e metabolismo lipidico. *Fisiologia vegetale*, Piccin, 371-382.
- TUBEROSA, R., PESCI, C., 1978.** Un metodo non distruttivo per la stima della superficie fogliare del girasole. Abstract del convegno sugli aspetti genetici agronomici e patologici del girasole e sulle caratteristiche industriali, alimentari e commerciali del prodotto. CNR, Pisa 14-15 Dicembre 1978.
- TURNHAM, E., NORTHCOTE, D.H., 1983.** Changes in the activity of acetyl-CoA carboxylase during rape-seed formation. *Biochem. J.* 212, 223-229.
- VALLADARES, F., PEARCY, R.W., 1997.** Interactions between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*. *Plant, Cell and Environment*, 20, 25-36.
- VOELKER, T., KINNEY, A.J., 2001.** Variations in the biosynthesis of seed storage lipids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 335-361.
- VON CAEMMERER, S., QUIK, W.P., 2000.** Rubisco: physiology in vivo. In *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Leegood R.C., Sharkey T.D., von Caemmerer S. Eds., Kluwer Academic Publ., The Netherlands, 86-113.
- VON CAEMMERER, S., FARQUHAR, G.D., 1981.** Some relationship between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta*, 153, 376-387.
- VON WETTSTEIN-KNOWLES, P.M. (1995).** Biosynthesis and genetics of waxes. In *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*, ed. R.J. Hamilton, 91-130. Alloury, Ayr, Scotland: Oily Press.
- WEBER, E. e BLEIHOLDER H., 1990.** Erläuterungen zu den BBCH-Dezimal-Codes für die Entwicklungsstadien von Mais, Raps, Faba-Bohne, Sonnenblume und Erbse - mit Abbildungen. *Gesunde Pflanzen* 42, 308-321.
- WELBURN, A.R., 1988.** Air pollution and Acid rain. Harlow: Logman Scientific.
- WESELAKE, R.J., TAYLOR, D.C., 1999.** The study of the storage lipid biosynthesis using microscope derived cultures of oilseed rape. *Prog. Lipid Res.* 38, 401-460.
- WILLIAMS, M., HARWOOD, J.L., 1997.** Effects of carbon dioxide concentration and temperature on lipid synthesis by young wheat leaves. *Phytochemistry*, 45, 243-250.
- WOLFENDEN, J., WELLBURN, A.R., 1991.** Effects of summer ozone on membrane lipid composition during subsequent frost hardening in Norway Spruce. *New Phytologist*, 118, 232-329.

YATES, D.J., STEVEN, M.D., 1987. Reflection and absorption of solar radiation by flowering canopies of oil-seed rape (*Brassica napus* L.). *J. Agric. Sci., Camb.*, 109, 495-502.

YATSU, L. Y., JACKS, T.J., HENSORLING, T. P., 1971. Isolation of spherosomes (oleosomes) from onion, cabbage, and cottonseed tissues. *Plant Physiol.*, 48, 675-682.

BIBLIOGRAFIA SU INTERNET

<http://www.cetiom.fr/index.php?id=8885>: Classificazione fenologica Colza CETIOM.

<http://www.bba.de/veroeff/bbch/bbcheng.pdf>: Classificazione fenologica BBCH delle mono e dicotiledoni.

http://en.wikipedia.org/wiki/Soxhlet_extractor: Estrattore e metodica di estrazione Soxhlet.