

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI VERONA
LAURA MAGISTRALE IN
BIOTECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI

TESI DI LAUREA

STUDIO DEGLI EFFETTI DELL'OZONO SU *DIPLLOTAXIS*
***TENUIFOLIA* VALUTATI IN CAMPO E IN CONDIZIONI**
CONTROLLATE

Relatrice: Prof.ssa Linda Avesani
Co-relatrice: Prof.ssa Elodie Vandelle

Candidato: Riccardo Greco
Matricola: VR450623

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

Indice

1. Introduzione	- 2 -
1.1 L'ozono	- 2 -
1.2 L'acqua ozonizzata	- 3 -
1.3 Le specie reattive dell'ossigeno (ROS): cosa sono, come si formano e cosa causano alla cellula	- 7 -
1.4 Diplotaxis tenuifolia	- 16 -
2. Obiettivi della tesi	- 23 -
3. Materiali e metodi	- 25 -
3.1 Materiale vegetale	- 25 -
3.2 Ozonizzazione	- 25 -
3.3 Germinazione in vitro	- 25 -
3.4 Analisi di crescita radicale differenziale	- 26 -
3.5 Coltivazione in campo	- 26 -
3.6 Campionamento in campo	- 28 -
3.7 Misurazioni con SPAD-502Plus	- 28 -
3.8 Misura del calo peso e del peso medio per foglia	- 29 -
3.9 Spettrometria di massa	- 29 -
3.10 Estrazione dell'RNA e retro-trascrizione a cDNA	- 30 -
3.11 Real Time RT-qPCR	- 31 -
4. Risultati e Discussione	- 33 -
4.1 Prove di germinazione	- 33 -
4.2 Valutazione della crescita della radice e dell'ipocotile	- 37 -
4.4 Misurazione con spettrofotometro SPAD-502Plus	- 46 -
4.5 Valutazione del calo peso	- 50 -
4.6 Spettrometria di massa	- 54 -
4.7 Valutazione dell'espressione di geni marcatori delle vie di difesa	- 62 -
5. Conclusione	- 68 -
6. Bibliografia	- 72 -

1. Introduzione

1.1 L'ozono

L'ozono, una forma allotropica dell'ossigeno composta da tre dei suoi atomi, possiede un'emi-vita a temperatura ambiente di 20 minuti, dissociandosi tanto facilmente in aria quanto in acqua. La molecola si forma naturalmente in piccole dosi nella stratosfera grazie all'azione di radiazioni UV solari che colpiscono l'ossigeno. In forma gassosa l'ozono è instabile e rimane poco tempo nell'aria decomponendosi velocemente: nella parte più alta dell'atmosfera, radiazioni UV ad alta intensità degradano le molecole di ozono convertendole ad ossigeno; questo processo prevede l'assorbimento della radiazione UV che, in questo modo, non raggiunge la superficie terrestre.

Con una più bassa concentrazione, l'ozono si trova anche nella troposfera (strato più basso dell'atmosfera), formato come prodotto secondario di reazioni fotochimiche a partire da idrocarburi, ossigeno e azoto rilasciati dai tubi di scappamento delle automobili, dall'industrie, ma anche da foreste e vulcani. L'ozono in questo strato rientra nella categoria di inquinante dell'aria causando effetti negativi sulla crescita e produttività delle piante, oltre che inducendo una continua ossidazione su tutti gli organismi viventi e tutte le superfici minerali. L'effetto dell'ozono sulle piante dipende dalla sua concentrazione e dal tempo di esposizione: un'esposizione definita "cronica" (a bassi livelli) può portare ad una diminuzione della fotosintesi, inibizione della crescita e senescenza, al contrario, un'esposizione detta "acuta" (ad alti livelli per un breve tempo) può condurre direttamente alla morte cellulare con lesioni nettamente visibili. Quest'ultima via è un processo che condivide diverse similarità con la morte cellulare programmata nella risposta ipersensibile indotta da patogeni (Vainonen and Kangasjärvi 2015).

1.1.1 Gli impieghi dell'ozono gassoso

L'ozono gassoso, ad oggi, lo si sfrutta con successo contro un gran numero di patogeni come virus, batteri, protozoi, funghi e metazoi. Un vantaggio-svantaggio di questo metodo è la sua aspecificità: non è in alcun modo phylum- o specie-specifico. Inoltre, a differenza di altri metodi di disinfezione o fungicidi convenzionali (e.g. MeBr, cloropicrina, metalaxyl e metam sodio), l'ozono è

considerato “*environmental-friendly*”. Il meccanismo di azione consiste nel distruggere la membrana microbica attraverso forti ossidazioni, attaccando lipoproteine e lipopolisaccaridi, determinando cambiamenti nella permeabilità complessiva del microrganismo e causandone la morte. In determinate circostanze, può agire anche su spore fungine o uova di nematode; in quest’ultimo caso è stato osservato come l’ozono induca la formazione di bolle sulla superficie proteica a rivestimento delle uova di *Toxocara canis*, un nematode parassita dei cani (Ooi, Lin, and Wang 1998).

L’ozono viene largamente adoperato in diversi passaggi dell’industria alimentare moderna come agente sanificante. Data la sua rapida degradazione e la mancanza di tracce residue lo si ritiene un mezzo sicuro per garantire alti standard di sicurezza alimentare. Il suo principale utilizzo è volto ad aumentare la *shelf-life* di prodotti alimentari grazie all’eliminazione di microrganismi che possono causare il deterioramento dell’alimento e/o essere nocivi per l’uomo.

Nel corso della storia, ad ogni modo, ci si è accorti di come i trattamenti con ozono avessero altri benefici oltre a quelli appena descritti. Infatti, è risultato essere efficace nella degradazione di pesticidi (Souza et al. 2018) e micotossine (Zhu 2018) (di cui limita la formazione durante il periodo di immagazzinamento dell’alimento). Il suo impiego va comunque valutato caso per caso perché dalla degradazione di queste molecole potrebbero derivare molecole più tossiche di quelle di partenza.

1.2 L’acqua ozonizzata

Diversi studi hanno rivelato che l’ozono in soluzione acquosa è un possibile candidato come agente di controllo dei microrganismi in grado di sfruttare i caratteri antimicrobici dell’ossidante con tutte le possibilità di utilizzo dell’acqua (Kim, Yousef, and Dave 1999; Kobayashi et al. 2011; Najarian et al. 2018).

1.2.1 Preparazione

Quella che, a questo punto, prende il nome di “acqua ozonizzata” è prodotta in due fasi: (i) dapprima viene generato ozono in un ambiente controllato per mezzo di una scintilla che impatta con molecole di ossigeno, (ii) in un secondo momento, l’ozono viene spinto in acqua per mezzo di pietre porose che generano microbolle. La

molecola triatomica è insolubile in acqua, perciò quello di cui si satura la soluzione sono tutti gli ioni figli che genera reagendo con le molecole di H₂O.

1.2.2 Gli impieghi dell'acqua ozonizzata

L'acqua ozonizzata, come la forma gassosa, è utilizzata al giorno d'oggi per il controllo di contaminazioni negli ambienti più disparati: iniziando dal trattamento delle acque di irrigazione all'interno delle serre fino a quelle comunali, ma anche nell'immagazzinamento e conservazione di prodotti alimentari post-raccolta e nella già citata industria alimentare. Il carattere aspecifico e l'impossibilità di indurre resistenza nei microrganismi fanno dell'acqua ozonizzata un'ottima candidata per la sanificazione degli ambienti ospedalieri.

Se, da un lato, non vi sono evidenze per cui l'acqua ozonizzata risulti essere meno fitotossica rispetto all'ozono gassoso (Sloan and Engelke 2005), dall'altro lato sembra che esposizioni a bassi livelli di ozono gassoso (come quelli che solitamente vengono dissolti in acqua) permettano di ridurre danni visibili sulla pianta stimolando una sorta di adattamento ad uno stress ossidativo (Kovalchuk et al. 2003). In aggiunta, diversi studi riportano evidenze per cui basse dosi di ozono stimolerebbero risposte tipiche di una resistenza sistemica acquisita (SAR-Systemic Acquired Resistance): un meccanismo di difesa indotta, il cui funzionamento è tutt'ora in fase di discussione, che conferisce alla pianta una protezione di lunga durata contro possibili attacchi di patogeni. Con questi presupposti, si è pensato di usarla direttamente sulle piante sia per stimolare la loro difesa contro possibili patogeni sia per limitare l'uso di prodotti chimici che potrebbero lasciare residui sul prodotto destinato, alla fine, al consumatore.

1.2.3 Caratteristiche dell'acqua ozonizzata

Una volta immesso in acqua, l'ozono ha un'emi-vita variabile, anche se generalmente molto breve in quanto reagisce immediatamente con i composti organici e i microrganismi che si possono trovare frequentemente in sospensione. È facile pensare come l'acqua ozonizzata subisca l'azione di vari fattori ambientali che arrivano ad influenzare l'efficacia del trattamento:

- *Temperatura*

Una diminuzione nella temperatura porta ad un aumento della solubilità dell'ozono, ma anche ad un'azione meno aggressiva nei confronti dei microrganismi. Dall'altro lato, però, all'aumentare della temperatura, è accelerata la dissociazione negli ioni figli.

- *pH*

La stabilità dell'ozono in soluzione aumenta al diminuire del pH. La letalità della molecola è direttamente proporzionale all'acidità della soluzione in cui si trova: più è acida (basso pH) più è letale, meno è acida (alto pH) meno è letale (Farooq, Chian, and Engelbrecht 1977; Foegeding 1985).

- *Umidità*

È stato dimostrato come i microrganismi subissero l'effetto dell'ozono in maniera più rapida con un alto Relative Humidity (RH) piuttosto che con uno basso: l'RH è un indice della quantità di sostanza gassosa che un dato ambiente riesce a trattenere senza raggiungere il suo punto di condensazione. A favore di quanto riportato, Guerin (Guerin 1963) ha riscontrato una maggiore resistenza all'ozono da parte dei microrganismi essiccati rispetto alle cellule vive ed idratate.

1.2.4 Metodi di utilizzo dell'acqua ozonizzata sulle piante

Di recente interesse è l'uso dell'acqua ozonizzata direttamente sulle piante allo scopo di controllare le malattie e migliorarne la crescita. Tra le tecniche di trattamento che è possibile osservare nel panorama agricolo, si citano quella per endoterapia, per nebulizzazione e per irrigazione (i cui effetti sono i meno studiati al momento).

1.2.4.1 Acqua ozonizzata per irrigazione

La preparazione della sospensione è sempre la stessa per tutte tre le tecniche e quella per irrigazione, nello specifico, non ha nulla che si discosti da una classica irrigazione con acqua non trattata. L'acqua ozonizzata pronta è fatta passare in tubi posti sotto le radici dove viene rilasciata e assorbita dalla pianta. In questo modo entrano in gioco moltissimi fattori che rendono il meccanismo d'azione dell'acqua ozonizzata difficile da capire e da studiare: può reagire con tutti gli organismi del

suolo, con la superficie delle radici, con la componente organica del suolo fortemente ossidabile, con le particelle di origine minerale ed addirittura con tutte quelle proteine che insieme ricoprono l'attività enzimatica del suolo.

1.2.4.2 Acqua ozonizzata per iniezione in tronco o endoterapia

L'endoterapia è la soluzione a molte malattie vegetali di piante con tronco (e.g. la vite) causate da patogeni che riescono a penetrare al suo interno. All'alba del XXI secolo non è più possibile adoperare antibiotici, arsenito di sodio o altri composti considerati nocivi per la salute umana e/o per l'ambiente. Nel momento in cui si spruzza acqua ozonizzata sulla pianta il suo effetto è maggiore sulla sua superficie; infatti, nel momento in cui l'acqua permea all'interno delle membrane l'ozono si è dissociato quasi del tutto e la reattività rasenta lo zero. Con l'iniezione nel tronco, invece, si fa interagire l'acqua ozonizzata alla massima reattività con il patogeno, limitando dispersioni inutili e azzerando eventuali rischi per l'operatore. In un lavoro del 2020 questa tecnica è stata messa alla prova su vite: i ricercatori l'hanno messa a confronto con un controllo e con piante trattate sia con endoterapia che con soluzione spray. I risultati migliori, sia sotto l'aspetto organolettico dell'acino sia sotto quello fitopatologico, sono stati ottenuti nei soggetti che hanno subito la sola iniezione diretta (Campayo et al. 2020).

1.2.4.3 Acqua ozonizzata per nebulizzazione

Tra le tre metodiche, l'acqua ozonizzata spray è forse quella con gli effetti più evidenti sulla pianta. In campo consiste nella nebulizzazione della sospensione direttamente sulle piante attraverso un atomizzatore o degli sprinkler che spargono micro-gocce su un'area specifica. Tian et al. (Tian R. et al. 2018) hanno condotto un'analisi sugli effetti che la nebulizzazione di acqua ozonizzata può avere su coltivazioni di cetrioli e pomodori. I dati raccolti hanno permesso loro di affermare come le risposte allo stress ossidativo indotto dall'ozono siano specie-specifiche; nonostante, comunque, abbiano avuto ottimi riscontri sia in parametri macroscopici (quali numero di frutti per pianta, il loro peso individuale e totale) sia in parametri microscopici (come l'attività di enzimi antiossidanti e la conduttività delle membrane che era maggiore nelle piante trattate a causa di un maggior passaggio di ioni usati come segnale dell'aumento di ROS nell'apoplasto).

1.3 Le specie reattive dell'ossigeno (ROS): cosa sono, come si formano e cosa causano alla cellula

Bisogna precisare che tutti gli effetti dell'ozono, sia in forma gassosa o acquosa, descritti fino ad ora non sono direttamente causati dalla suddetta molecola triatomica. L'ozono, infatti, reagisce in breve tempo con l'ossigeno e l'acqua, sempre presenti negli ambienti naturali, generando le specie (o forme) reattive dell'ossigeno (ROS): le vere responsabili delle reazioni di ossidazione. L'ozono è solo una delle possibili vie con cui le ROS si possono formare, altre vie includono: la scarica elettrica di un fulmine, le radiazioni UV, certi specifici enzimi, alcuni metalli catalizzatori, altri radicali liberi e molte altre. Le ROS sono una sottoclasse dei radicali liberi, ovvero molecole e ioni che si contraddistinguono per la loro elevata reattività. Questi composti possono legarsi e reagire tra loro, o anche con altre molecole, generando altri radicali.

Le ROS sono le effettive protagoniste nelle reazioni di ossidazione ad opera dell'ossigeno, tra loro ci sono: il radicale idrossido (OH^\cdot), il perossido di idrogeno (H_2O_2), il superossido (O_2^\cdot) e l'ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$).

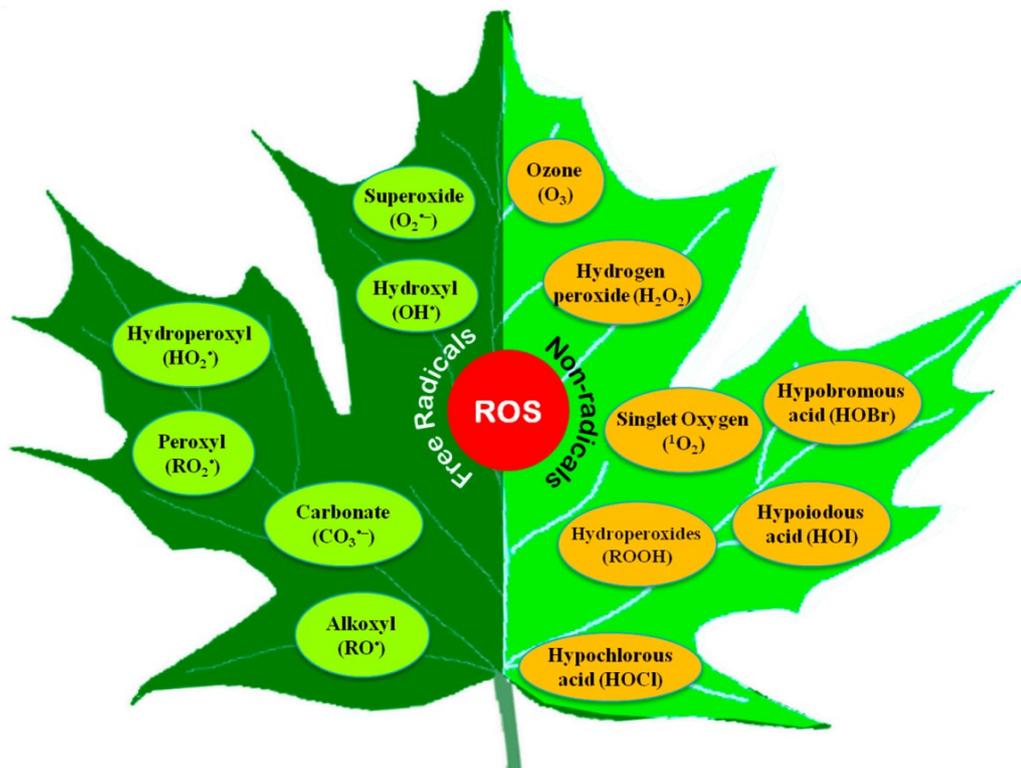


Figura 1 Diverse Specie Reattive dell'Ossigeno trovate nelle piante (Hasanuzzaman, Bhuyan, Parvin, et al. 2020)

Questi composti attaccano principalmente tre componenti di un organismo vivente: i lipidi, le proteine e, qualora dovessero avere un'emi-vita o un effetto più duraturo, il DNA. La si definisce "perossidazione lipidica" la reazione che avviene tra le ROS e i lipidi delle membrane cellulari, dovuta all'attacco dei doppi legami lipidici generando nuovi radicali che, con un effetto a cascata, determinano un danno esteso. Siccome, come verrà spiegato meglio in seguito, le ROS sono molto comuni nelle piante in fase di stress che le hanno portate ad evolversi in modo da riconoscere parti di lipidi ossidati e attivare, quindi, le risposte necessarie.

L'ossidazione di una proteina comporta un danneggiamento del gruppo funzionale degli aminoacidi che la compongono, alterando il ripiegamento stesso della molecola.

Infine, anche se meno frequentemente, anche il DNA può subire un'alterazione della struttura delle basi azotate stesse causata da ROS esogene. A meno che non vi sia la mano dell'uomo, difficilmente grandi quantità di ROS atmosferiche si accumuleranno attorno ad una pianta. In genere questi composti sono prodotti dalla cellula stessa (al suo interno o esterno) nel momento in cui si trova in condizioni di stress da troppa luce, mancanza d'acqua, caldo/freddo o anche quando attaccata da un patogeno. Sotto condizioni di stress osmotico, ad esempio, come salinità o mancanza d'acqua, gli stomi si chiudono portando ad una diminuzione della concentrazione di CO₂ nel mesofillo. In questo modo, le reazioni fotosintetiche del ciclo di Calvin si interrompono e i prodotti della fase luce-dipendente, quali ATP o NADPH, non possono essere consumati (Kreslavski et al. 2013). Così facendo, NADPH non viene ossidato e, data l'alta concentrazione del prodotto, secondo un meccanismo di feed-back negativo, viene inibito l'uso di NADP⁺ come accettore di elettroni. Alla fine della catena di trasporto degli elettroni, quindi, si pone l'ossigeno in veste di accettore generando certe ROS (Pospíšil 2009; Kordrostami, Rabiei, and Ebadi 2019). È proprio questo uno dei due effetti che le ROS possono avere in una pianta: da una parte (ad alte concentrazioni) causano danno, ossidazioni e stress alla pianta, mentre dall'altra (a basse concentrazioni) fungono da messaggeri secondari per l'attivazione delle risposte stress-indotte.

1.3.1 Sintesi di ROS da parte della cellula

Le ROS e lo stato di ossido-riduzione di varie molecole nei diversi ambienti della cellula sono importanti indicatori della salute di una pianta. Se si prende come esempio l'attacco da parte di un patogeno, si può pensare, come già anticipato, che la pianta riesca a riconoscere le sue stesse macromolecole danneggiate attraverso recettori specifici. In tale situazione può essere anche indotta un'alterazione nell'omeostasi ionica, alcuni recettori potrebbero riconoscere composti patogeni, potrebbero cambiare le concentrazioni di Ca^{2+} (noto per essere un importante messaggero secondario nelle piante), oppure è possibile che vengano accumulate ROS a livello dell'apoplasto. Quest'ultimo punto è ancora argomento di forte dibattito perché si sa molto poco rispetto a cosa possa accadere dopo. Gli enzimi responsabili dell'accumulo di ROS nell'apoplasto vi si affacciano rimanendo ancorati alla membrana cellulare, questi appartengono alle classi delle perossidasi (Bindschedler et al. 2006) e NADPH ossidasi (anche conosciute come RBOH) (Suzuki et al. 2011). La seconda classe è responsabile della liberazione di O_2^- , mentre la prima ha il compito di detossificarlo producendo, però, perossido di idrogeno. La carica di questo anione gli impedisce di permeare la membrana per diffusione; perciò, diventa substrato delle perossidasi che formano H_2O_2 capace di arrivare nel citoplasma dove può trasmettere il messaggio.

All'interno della cellula vegetale, durante una risposta ipersensibile, la produzione di ROS ha un nuovo innalzamento ad opera dei mitocondri (in particolar modo in quegli organi della pianta che non ricevono la luce del sole come le radici), dei perossisomi e, supportato da diverse evidenze sperimentali, dei cloroplasti (Zurbriggen et al. 2010; 2009). A favore dell'ipotesi secondo cui il cloroplasto produca ROS come segnale intracellulare di stress è stato osservato un aumento bifasico della concentrazione di questi radicali. Nell'arco dei primi dieci minuti dall'infezione ha luogo la prima fase indotta principalmente delle NADPH ossidasi apoplastiche. La seconda fase, invece, si verifica a distanza di diverse ore dal momento dell'infezione (Jones and Dangl 2006). La supposizione che vede il cloroplasto coinvolto nei meccanismi di difesa di una pianta è avvalorata dalle osservazioni di Roden e Ingle (2009) secondo cui la resistenza delle piante ai patogeni sia diversa tra periodi di luce e di buio. Inoltre, alcuni meccanismi di

attacco batterici e virali vanno proprio a ledere il “traffico proteico” destinato al cloroplasto (Padmanabhan and Dinesh-Kumar 2010).

Nel momento in cui il cloroplasto riceve il segnale dall'esterno induce la reazione di Mehler: processo che porta alla riduzione dell'ossigeno molecolare, a partire da una ferro-zolfo proteina elettrone-donatrice, con formazione di O_2^- . Questo, insieme a due H^+ , catalizzati dall'enzima SOD, produce molecole di acqua e H_2O_2 . Il composto, poi, potrebbe subire una conversione a $HO^$ catalizzata da cationi bivalenti come il Fe^{2+} (Sabater and Martín 2013). In questo modo, all'interno della cellula, vi è accumulo di una miscela di ROS: le concentrazioni delle sue componenti variano di volta in volta a seconda dello stimolo che le ha generate e della risposta che devono attivare (Møller and Sweetlove 2010).

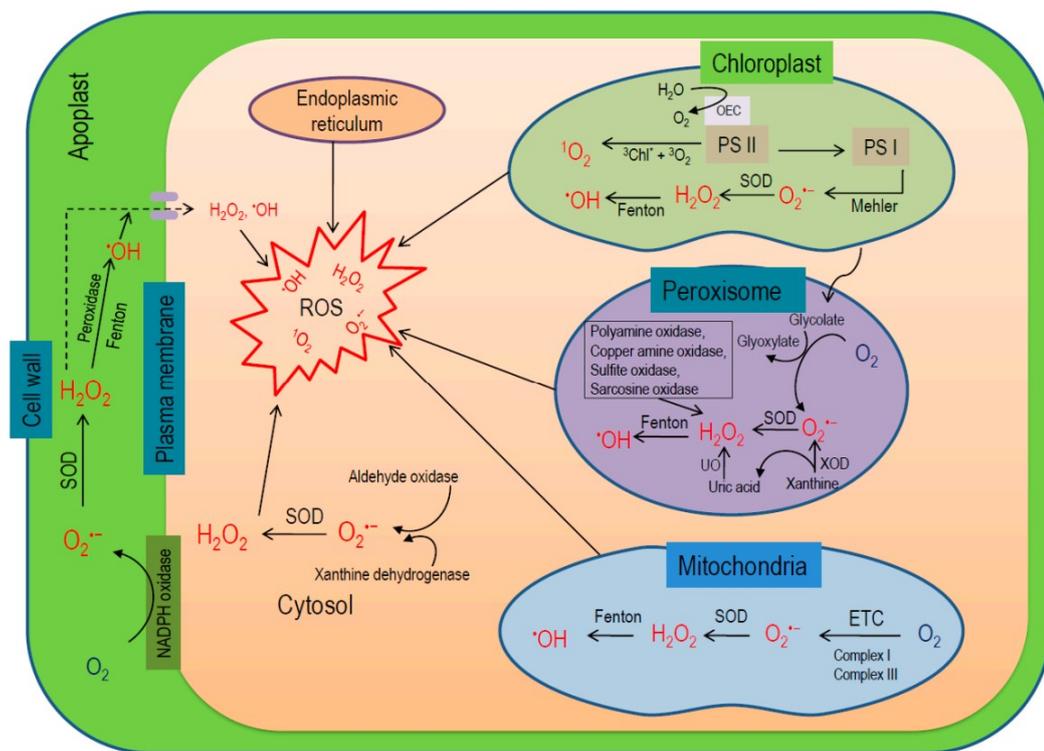


Figura 2 Processi di sintesi di ROS nelle cellule vegetali s (ROS, reactive oxygen species; H_2O_2 , hydrogen peroxide; O_2^- , superoxide anion; 1O_2 , singlet oxygen; $\cdot OH$, hydroxyl radical; SOD, superoxide dismutase; UO, urate oxidase; XOD, xanthine oxidase; ETC, electron transport chain; PS I, photosystem I; PS II, photosystem II; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate). (Hasanuzzaman, Bhuyan, Zulfiqar, et al. 2020)

1.3.2 Trasduzione del segnale

Si sa ancora poco circa le modalità con cui il segnale è trasmesso al citoplasma, al cloroplasto, al nucleo e a tutto il resto degli organelli interessati. Ci si è fatti solo un'idea di come ciò possa avvenire sulla base di meccanismi già noti. L'anione superossido, già nominato nei paragrafi precedenti, ipotizzando sia la molecola-segnale, avrebbe bisogno di recettori altamente specifici o canali anionici nelle immediate vicinanze dell'enzima che lo produce.

Contrariamente a questo anione, le ipotesi per l'ingresso di H₂O₂ nella cellula sono più plausibili: la relativamente lunga emi-vita ed una struttura e un dipolo simili a quelli di una molecola d'acqua le impediscono di permeare attraverso le membrane, ma, allo stesso tempo, permettono loro di diffondere attraverso le acquaporine (Soto et al. 2012). Come le acquaporine, sulla membrana plasmatica è possibile trovare anche canali ionici sensibili ad una regolazione redox-guidata (ad esempio il canale del potassio SKOR) (Garcia-Mata et al. 2010).

Tra le varie vie che possono essere attivate per permettere l'ingresso nella cellula ai segnali generati dalle ROS c'è anche quella Ca²⁺-dipendente. Non si è ancora in grado di capire, però, se siano le ROS ad attivare la via del calcio o viceversa: da un lato lo ione calcio è responsabile della regolazione delle RBOH extracellulari, mentre dall'altro, le ROS attivano i canali dello ione bivalente. Ad oggi, non è ancora chiaro quale delle due parti attivi per prima le risposte ad uno stress, biotico o abiotico che sia. Molto probabilmente la loro è un'azione regolatoria continua per la trasmissione del segnale sia inter- che intra-cellula (Miller et al. 2009; Mori and Schroeder 2004).

Nel lavoro di Torres et al. (2013), invece, si sono ottenute conclusioni fuori dal coro: la possibilità che le RBOH lavorino insieme a delle G-proteins. Queste sono proteine di membrana che, già in altri pathways, sono responsabili della trasduzione del segnale dall'esterno all'interno della cellula.

Tra gli altri meccanismi che la cellula può mettere in atto per percepire le ROS e reagire c'è il riconoscimento degli effetti dei radicali sulle macromolecole: modificazioni ossidative dei residui di cisteina, selenocisteina e metionina nelle proteine (Jeong et al. 2011), ossidazione dei lipidi con produzione di ossolipina (Montillet et al. 2004) e il monitoraggio dello stato redox della cellula. In condizioni

standard, quest'ultimo è controllato da diverse molecole definite antiossidanti il cui compito è quello di prevenire e ridurre i danni che le ROS possono procurare all'organismo. Queste molecole (e le loro controparti ossidate) fungono da indicatori dello stato di ossidazione di una cellula, superata una certa soglia la cellula andrà incontro a morte.

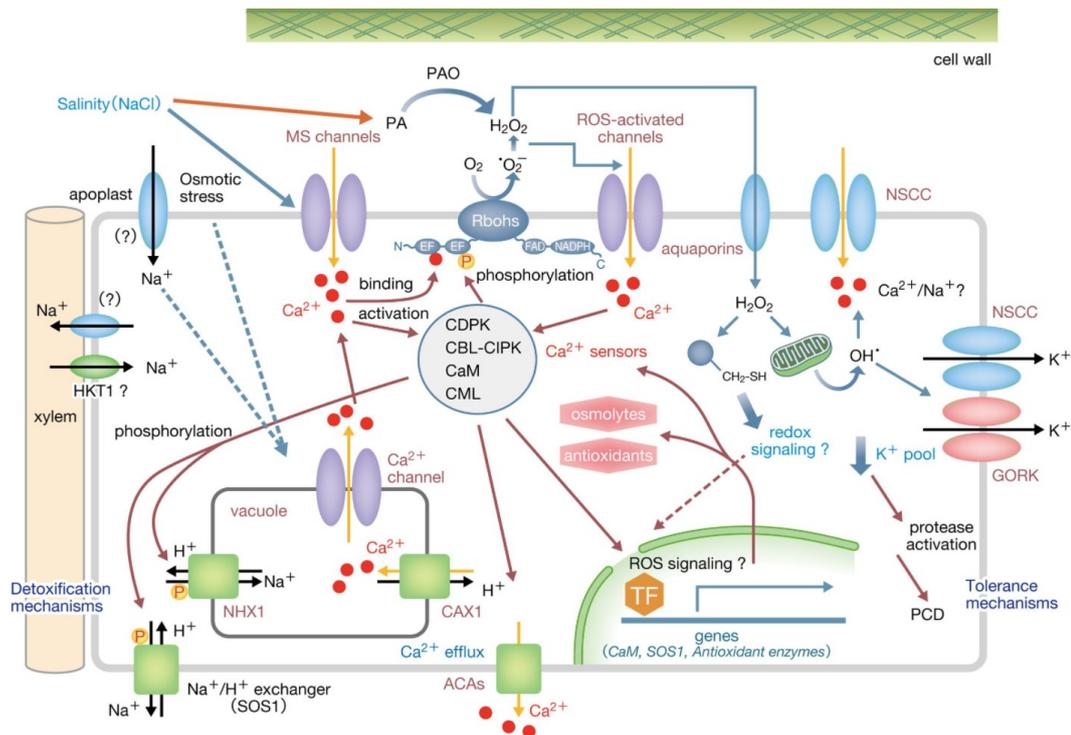


Figura 3 Un possibile network di segnali Ca^{2+} -ROS sotto condizioni di stress salino. Le frecce tratteggiate indicano delle vie che sono state ipotizzate ma non provate sperimentalmente. ACA, autoinhibited Ca^{2+} -ATPase; PA, polyamine; PAO, polyamine oxidase. (Kurusu, Kuchitsu, and Tada 2015)

1.3.3 Meccanismi di difesa contro l'eccesso di ROS

Come anticipato nel paragrafo precedente, gli antiossidanti sono molecole prodotte dalle piante al fine di proteggersi da eventuali danni ossidativi, trasformando i radicali liberi in una forma meno tossica e meno reattiva. Queste molecole sono ubiquitarie in tutte le piante e specifiche per ogni tipo di stress, ma la loro concentrazione e la loro attività variano sulla base di vari fattori: la specie della pianta, lo stadio di sviluppo, le condizioni metaboliche e la durata ed intensità dello stress (Caverzan, Casassola, and Brammer 2016). Di questo gruppo di composti fanno parte gli antiossidanti enzimatici e quelli non-enzimatici.

1.3.3.1 Gli antiossidanti non-enzimatici

- *Acido ascorbico*

L'acido ascorbico è forse il più abbondante tra gli antiossidanti non-enzimatici e ricopre un importante ruolo sia nello sviluppo della pianta che nella sua protezione. Ci sono, ormai, diverse pubblicazioni che attestano il suo lavoro di detossificazione delle ROS, nello specifico dell'ossigeno singoletto e del radicale idrossile (Das and Roychoudhury 2014a; Yu et al. 2019).

- *Glutathione*

Si tratta di un composto non proteico idro-solubile a basso peso molecolare. Partecipa alla catena di reazioni di ossido-riduzioni per la detossificazione del perossido di idrogeno che vede, in sequenza, NADPH, l'ascorbato e, infine, il glutathione. Questa serie di reazioni fa tutta riferimento al ciclo dell'ascorbato-glutathione che li vede protagonisti e che ha luogo in diversi compartimenti cellulari, tra cui i mitocondri, i cloroplasti, ma anche il citoplasma. Questo ciclo permette di decomporre il perossido di idrogeno e formare acqua in un pathway che vede partecipare anche le controparti ossidate e i relativi enzimi che catalizzano le ossido-riduzioni (Tsai et al. 2005).

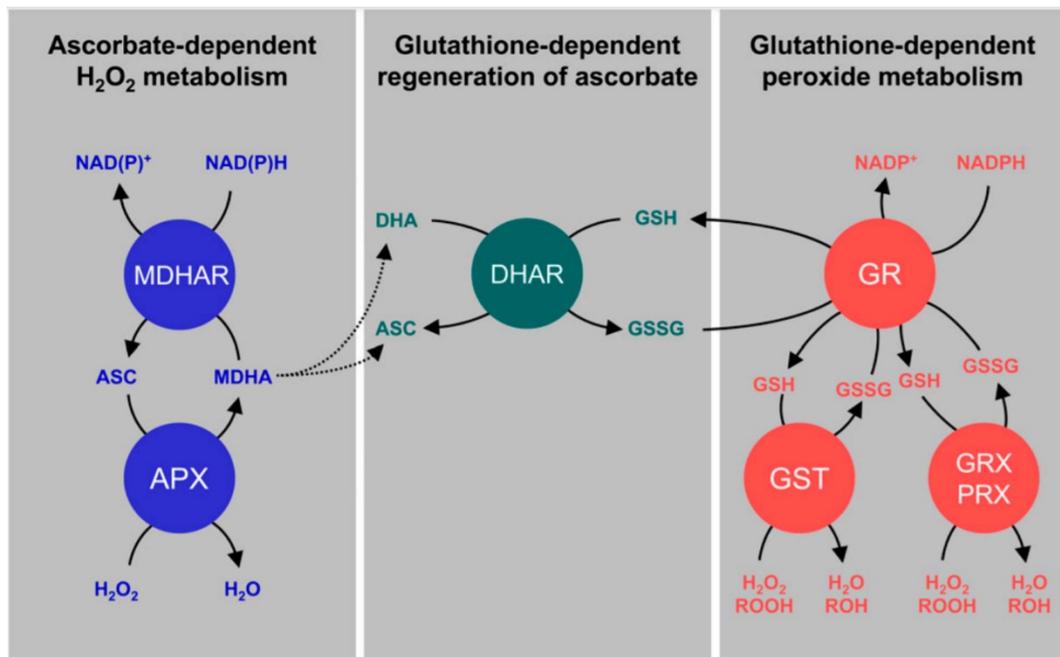


Figura 4 Ciclo ascorbato-glutathione (Foyer and Noctor 2011)

- *Carotenoidi*

Fanno parte del gruppo dei tetra-terpeni e la maggior parte deriva da una catena di 40 atomi di carbonio. Sono composti altamente idrofobici e per questo sono sempre immersi nel doppio strato fosfolipidico. Svolgono diversi compiti all'interno della cellula essendo pigmenti importanti nella difesa della pianta da radiazioni UV e potenti recettori per le ROS.

1.3.3.2 Gli antiossidanti enzimatici

Come i composti precedenti, anche questi si localizzano in compartimenti diversi della cellula

- *Superossido Dismutasi (SOD)*

SOD è un metallo-enzima codificato da una piccola famiglia genica che cambia lo ione metallico nel sito attivo a seconda del compartimento in cui l'enzima lavora. È considerato la prima linea di difesa contro le ROS perché usa come substrato due molecole di O_2^- per produrre O_2 e H_2O_2 (Bowler, Montagu, and Inze 1992). Diversi studi hanno dimostrato che per migliorare la difesa delle piante a stress ossidativi, in certe circostanze, è sufficiente indurre l'espressione delle SOD cloroplastiche (Greene 2002; Das and Roychoudhury 2014b; Dumanović et al. 2021).

- *Catalasi (CAT)*

Questo enzima ha la particolarità di essere localizzato nel perossisoma e riesce, quindi, a funzionare solo in condizioni di alto stress. Inoltre, le catalasi non necessitano di energia o di un elettrone-donatore per catalizzare la reazione di detossificazione di H_2O_2 a formare acqua e ossigeno (Anjum et al. 2016; Mhamdi et al. 2010).

- *Perossidasi (POD)*

Le perossidasi catalizzano la medesima reazione trattata dalle catalasi. Al contrario della classe di enzimi precedente, però, si trova nel citosol, nel vacuolo, nei cloroplasti e nella regione dell'apoplasto (Sofa et al. 2015).

- *Glutatione Reduttasi e Glutatione-S-Transferasi (GR e GST)*

L'enzima glutazione reduttasi completa il ciclo dell'ascorbato-glutatione in cui ha il compito di ridurre il glutatione con un elettrone preso da un NADPH. Nonostante gli studi su questo enzima si siano concentrati sui compartimenti del cloroplasto e del mitocondrio, alcune sue isoforme sono state trovate anche nel citosol.

La glutatione-S-transferasi, invece, è un enzima che si occupa di catalizzare la reazione di condensazione del glutatione con composti tossici che si trovano nel citosol. In questo senso, anche i prodotti generati dall'ossidazione ad opera delle ROS sono considerati "composti tossici" da legare al glutatione.

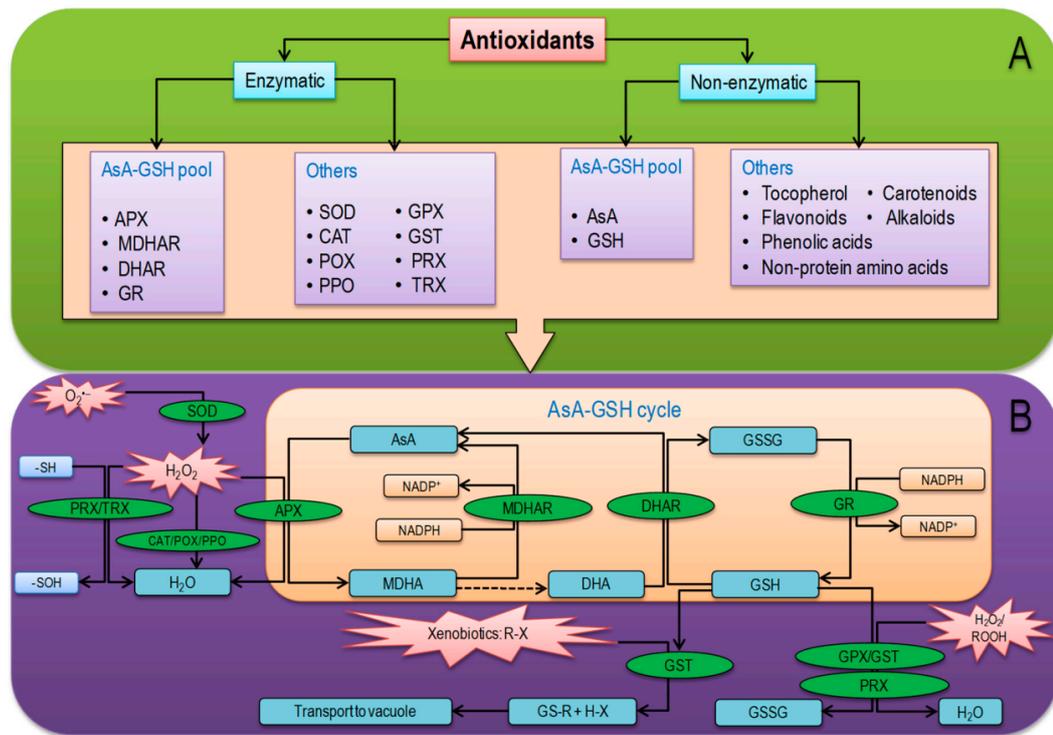


Figura 5 Una visione d'insieme del sistema di difesa composto dagli antiossidanti: **A** elenco di tutti gli antiossidanti e **B** meccanismi antiossidanti enzimatici e non-enzimatici combinati. APX, ascorbate peroxidase; AsA, ascorbate; CAT, catalase; DHA, dehydroascorbate; DHAR, dehydroascorbate reductase; GPX, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; GST, glutathione S-transferase; H₂O₂, hydrogen peroxide; MDHA, monodehydroascorbate; MDHAR, monodehydroascorbate reductase; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; O₂⁻, superoxide anion; POX, peroxidases; PRX, peroxiredoxins; R, aliphatic, aromatic, or heterocyclic group; ROOH, hydroperoxides; -SH, thiolate; SOD, superoxide dismutase; -SOH, sulfenic acid; TRX, thioredoxin; X, sulfate, nitrite, or halide group. (Hasanuzzaman, Bhuyan, Zulfiqar, et al. 2020)

1.4 *Diplotaxis tenuifolia*

Questo studio è nato da osservazioni fatte in campo su piante di rucola. Queste, in seguito al trattamento con acqua ozonizzata, mostravano un fenotipo migliorato in termini di peso e dimensione.

“Rucola” è un nome collettivo che indica molte specie della famiglia delle *Brassicaceae*. Le specie più abbondanti che spiccano sulle altre sono:

- *Eruca sativa*

Una specie diploide annuale che fiorisce durante la primavera. La si può trovare in zone marginali mescolata in mezzo ad altre piante adattatesi per la crescita su terreni poveri.

- *Diplotaxis muralis*

Si tratta di una specie perenne e poliploide. È in grado di fiorire dall'estate all'autunno e, come la precedente, preferisce suoli poveri e duri. Viene raccolta da campi aperti non coltivati e poi venduta perché sembra essere la meno adattabile alla coltivazione.

- *Diplotaxis tenuifolia*

Questa è una specie diploide e perenne, caratteristica che l'accomuna alla precedente, infatti, le radici sono in grado di resistere a tutto l'inverno permettendole di fiorire dalla tarda primavera fino all'autunno. Anch'essa sembra essersi adattata alla crescita su terreni calcarei e poveri di nutrienti. Questa specie è la più apprezzata in cucina e, per questo motivo, in alcune zone d'Italia è anche coltivata in campo. Per la maggior parte dei casi, però, il campo aperto rimane la principale fonte di piante destinate ai mercati locali.

All'interno del genere *Diplotaxis* c'è un'alta variabilità morfologica dimostrata da diversi caratteri. Gli steli, le foglie e i sepali, per esempio, possono essere ricoperti di tricomi differenti per dimensione, posizione e distribuzione. Le foglie e i fiori sono estremamente variabili in forma, dimensione, disposizione delle venature o colore (nel caso del fiore che può essere giallo, bianco o anche viola) (Padulosi and Pignone 1997).

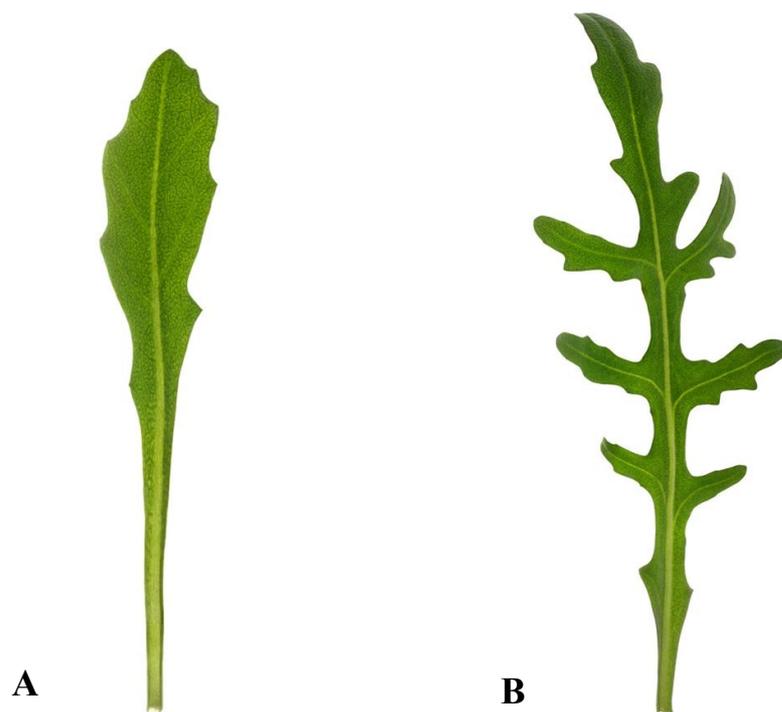


Figura 6 Confronto tra le foglie di *Eruca sativa* (A) e *Diplotaxis tenuifolia* (B)

1.4.1 Area di produzione

La protagonista di svariate insalate è cresciuta nell'area del Mediterraneo sin dai tempi dei Romani per poi diffondersi in svariate zone del mondo. Ad oggi, si riconoscono 30 specie appartenenti al genere *Diplotaxis*, distribuite prevalentemente nel Centro-Europa, fino a nord-ovest dell'Africa (Schmidt and Bancroft 2011). Come citato, alcune specie di rucola sono tutt'ora coltivate per la commercializzazione e in Italia questo può avvenire sia in campo aperto che in serre controllate in diverse regioni della penisola. In Veneto, nello specifico, 130-150 ettari sono adibiti alla coltivazione di rucola (così come in Campania, Lazio, Puglia, Lombardia, Abruzzo e Sardegna) e solo 120 di questi sono distribuiti tra le province di Venezia, Verona e Padova con una percentuale maggiore coltivata in serra. La produzione totale della regione si aggira intorno alle 2400 tonnellate, divise in 16-18 t/ha per *Eruca sativa* e in 19-21 t/ha per *Diplotaxis tenuifolia*. Il prodotto finale è, poi, indirizzato ai mercati ortofrutticoli sparsi per tutte le province della regione, ai mercati di altre province del Nord-Italia (quali Trieste, Udine, Milano e diversi altri) o direttamente alle catene dei supermercati (per esempio ALI, COOP,

INTERSPAR, PAM, La Rinascente ecc.); una piccola parte è, inoltre, esportata in Svizzera e Germania (Padulosi and Pignone 1997).



Figura 7 Rappresentazione della distribuzione dei campi coltivati a rucola nella regione Veneto (Padulosi and Pignone 1997)

1.4.2 Tipo di terreno e trapianto

La rucola riesce a crescere anche su suoli particolarmente calcarei, ma questo non vuol dire che siano le condizioni di crescita ottimali. In questi casi, infatti, dispone un fenotipo stentato con poche foglie strette mostrando i segni di un perpetuo stress idrico con riduzione della crescita e della resa fino alla morte della pianta (Bianco and Boari 1997). *E. sativa* è in grado di crescere in quasi tutte le tipologie di terreno, mentre *D. tenuifolia* preferisce suoli più calcarei.

La preparazione del terreno che ospiterà le piante richiede una particolare attenzione, soprattutto nel caso in cui si volesse partire dal seme, in quanto determinante della buona o cattiva riuscita dell'operazione. In campi con suoli medio-argillosi, è consigliabile iniziare con un'aratura di una profondità di 30-35 cm seguita da una rottura delle zolle non troppo finemente; questo passaggio dovrebbe sotterrare i resti del raccolto precedente ed evitare che la superficie si

compatti eccessivamente. Per suoli sabbiosi, invece, è preferibile solamente vangare ad una profondità di 25-30 cm. Al termine di questi processi, è possibile procedere con la semina o il trapianto di piantine già cresciute; a seconda del metodo di raccolta a valle, le piante possono essere interrate in modo casuale su una superficie o disposte lungo linee rette e, talvolta, posizionate su baulature del terreno che favoriscono il passaggio degli operatori tra una linea e l'altra (Fig. 8).

1.4.3 Coltivazione

Per ottenere la resa migliore da coltivazioni di rucola è sconsigliata la successione di colture per diversi cicli colturali perché questo potrebbe favorire l'arrivo di parassiti. D'altro canto, però, in Veneto sono stati ottenuti ottimi risultati in fatto di produttività coltivando pomodori, peperoni, cetrioli e zucchine (appartenenti a due famiglie specifiche quali le *Solanaceae* e le *Cucurbitaceae*) in seguito a raccolta di rucola; questa pianta sembrerebbe avere la capacità di controllo delle infestazioni da nematode. Le tecniche colturali messe in atto cambiano a seconda che si tratti di *E. sativa* o di *D. tenuifolia*. Per la prima, per esempio, sono necessari 5-8 g di semi per metro quadrato per garantire una germinazione abbondante, mentre nel caso della seconda sono sufficienti 0.8 g/m² per ottenere la medesima densità colturale. *E. sativa* germina dopo 24 ore dalla semina durante l'estate con temperature intorno ai 25°C, mentre impiega 2-3 giorni nei periodi più freddi dell'anno. *D. tenuifolia*, invece, con una temperatura intermedia di 20-22°C germina in 2-3 giorni e, in seguito, il trapianto può essere fatto tramite macchinari appositi o, come per la maggior parte delle volte, a mano sia in campi aperti che nelle serre. Il trapianto viene fatto su un terreno coperto da un film di polietilene in buchi disposti in riga a distanza di 20 cm l'uno dall'altro in modo da evitare la crescita di erbe infestanti; questa procedura è preferita alla semina diretta in campo in quanto riduce il ciclo produttivo e aumenta la periodicità con cui la si raccoglie.

1.4.4 Irrigazione e fertilizzazione

Nonostante la rucola riesca a crescere su terreni aridi, in un'ottica di miglioramento della produzione è consigliabile un suolo con una buona disponibilità d'acqua che la trattienga senza generare ristagni (sono stati condotti diversi studi per capire quali

fossero le condizioni ottimali di irrigazione (Bianco 1995)). Il meccanismo di irrigazione maggiormente utilizzato è attraverso nebulizzazione o gocciolamento sulle piante tramite sprinkler. Nelle prime fasi di vita della pianta le irrigazioni devono essere abbondanti andando via via decrescendo nel corso del tempo perché, data l'alta densità fogliare, l'acqua potrebbe accumularsi senza evaporare o arrivare al suolo favorendo l'arrivo di vari patogeni.

La fertilizzazione delle coltivazioni varia sia per le forme con cui il fertilizzante è somministrato sia per le molecole nutrienti che vengono fornite; il metodo più diffuso e antico prevede l'uso di sostanze chimiche in forma solida ed è sfruttato per la fertilizzazione con azoto, un composto particolarmente importante per una pianta con un breve ciclo biologico (Baggio and Pimpini 1995). Modeste dosi di fosforo e potassio sono sufficienti per una nutrizione efficiente di queste piante. I metodi di fertilizzazione più recenti, dall'altro lato, prevedono l'uso di sostanze organiche che vengono disciolte in acqua e date attraverso i normali sistemi di irrigazione: per questo motivo si parla di *fertirrigazione*. Diversamente da quanto accadeva in passato, oggi gli agricoltori pongono una maggiore attenzione alle quantità degli elementi nutritivi e, inoltre, a ciò che la fonte d'acqua (e.g. pozzi, corsi d'acqua vicini etc.) può contenere: alte dosi di bicarbonati vengono neutralizzate, ad esempio, aggiungendo acido nitrico o fosforo.

1.4.5 Raccolta

Una volta raggiunta la lunghezza di 12-15 cm le foglie di rucola sono pronte per essere raccolte, dopo un periodo che può andare dai 20 ai 60 giorni dopo la semina o il trapianto variando in funzione della specie, del mercato di destinazione, delle condizioni ambientali e del periodo dell'anno. Tutti questi fattori fanno sì che si dilati o si accorci il tempo necessario alle foglie per raggiungere la crescita ottimale. La raccolta della rucola consiste in veri e propri tagli delle foglie fatti con un coltello poco sotto l'altezza dei cotiledoni in modo da indurre una ricrescita più veloce e rigogliosa. È possibile arrivare fino a 4-5 tagli ad intervalli di 10-20 giorni per *E. sativa* e 1-3 tagli a 15-30 giorni per *D. tenuifolia*; questi valori non sono stringenti, ma possono aumentare in condizioni ambientali favorevoli, nonostante sia necessario, prima o poi, estirpare la coltivazione a causa della perdita di proprietà

organolettiche richieste dal mercato. Infatti, la morfologia della foglia in entrambe le specie di rucola cambia tra un taglio e l'altro diventando sempre più lobata e allungata. Durante l'estate, in cui ci sono periodi di luce più lunghi rispetto a quelli di buio, si possono fare meno tagli a causa della precoce induzione della fioritura che modifica il quadro aromatico delle foglie; se si ottengono piante sufficientemente grandi in autunno, invece, è possibile arrivare fino a 6 tagli per *E. sativa* e 4 tagli per *D. tenuifolia*.

1.4.6 Proprietà della rucola e delle Brassicaceae in generale

Dopo la raccolta, la rucola arriva su svariate tavole del mondo e, al giorno d'oggi, è considerata una pianta medicinale; diversi lavori ne hanno studiato gli effetti antinfiammatori, antiossidanti e di stimolazione del sistema immunitario (Bell and Wagstaff 2019). Importanti sono anche i composti organici volatili (VOCs) che questa pianta rilascia comprendendo alcoli, chetoni, aldeidi, acidi grassi, esteri e altri (Bell et al. 2016; Blažević and Mastelić 2008); è ormai noto che il tipico aroma della rucola sia la somma di tutte queste molecole, in particolare dei prodotti di idrolisi dei glucosinolati. Le foglie di rucola, infatti, sono ricche in fitonutrienti quali i polifenoli, glucosinolati, fitosteroli, vitamine, carotenoidi e fibre, i veri responsabili degli effetti positivi sulla salute umana (Bell and Wagstaff 2014; Khoobchandani et al. 2011; Spadafore et al. 2016).

Tutta la famiglia delle *Brassicaceae* (o *Cruciferae*) acquisì notevole interesse nel corso degli anni '90 grazie alla pubblicazione di numerosi studi sulla fisiologia di *Arabidopsis thaliana* (appartenente a questa famiglia). Una pianta che, date le innumerevoli informazioni ottenute, viene tutt'oggi considerata un organismo modello. La rucola non è la sola *Brassica* di interesse commerciale, ma sono inclusi anche molti olii di semi (e.g. olio di ravizzone, olio di colza ecc.), altre verdure, condimenti e piante per il foraggio degli animali. Un condimento esemplificativo è la mostarda, data da un misto degli estratti di *Brassica juncea* e *Sinapis alba*. Altre specie, invece, come *Brassica carinata*, *Camelina sativa*, *Crambe abyssinica* ed *Eruca vesicaria*, sono in fase di studio in quanto potenziali fonti di olii e/o proteine, carburante biodisel, o possibili piattaforme per il Molecular farming (Gugel and Falk 2006; Warwick et al. 2006; Warwick and Gugel 2003).

Molti generi di *Brassicaceae* sono stati studiati per la caratteristica composizione chimica con proprietà chemoprotettive, il contenuto in olio, gli acidi grassi dei semi e la composizione in glucosinolati, flavonoidi e carotenoidi. Il gusto pungente di questa famiglia è dato proprio dalla presenza di glucosinolati. Sono composti contenenti zolfo prodotti dalla pianta come primo meccanismo difensivo contro i predatori (Aggarwal and Shishodia 2006). L'idrolisi dei glucosinolati avviene ad opera delle mirosinasi naturalmente sintetizzate dalla pianta che rilascia, tra i prodotti, indolo e isotiocianato noti per essere coinvolti nei processi anticarcinogenici (Aggarwal and Shishodia 2006). All'interno del gruppo *Cruciferae*, i glucosinolati hanno una distribuzione che varia molto in base alla specie, all'organo e alla sua età, a fattori ambientali e anche alle condizioni di coltivazione. In merito a questo, la rucola non è da meno, in quanto è stato dimostrato come contenga alti livelli di vitamina C, glucosinolati, flavonoidi e composti fenolici (Martínez-Sánchez et al. 2006). I flavonoidi sono uno dei diversi gruppi di composti di origine vegetale con attività antiossidante, volta all'inibizione delle ROS, proteggendo, così, il macchinario fotosintetico e limitando i danni dei radicali liberati in seguito ad un attacco di un patogeno (Winkler et al. 2007).

2. Obiettivi del la tesi

L'ozono, una forma allotropica dell'ossigeno composta da tre dei suoi atomi, si forma naturalmente in piccole dosi nella stratosfera grazie all'azione di radiazioni UV solari che colpiscono l'ossigeno. In forma gassosa l'ozono è instabile, ha un'emi-vita di 20 minuti a temperatura ambiente, decomponendosi velocemente sia in aria che in acqua. L'ozono gassoso, ad oggi, lo si sfrutta con successo contro un gran numero di patogeni grazie alla sua aspecificità; il suo principale utilizzo, infatti, è volto ad aumentare la *shelf-life* di prodotti alimentari grazie all'eliminazione di microrganismi che possono causare il deterioramento dell'alimento e/o essere nocivi per l'uomo. A differenza di altri metodi di disinfezione, l'ozono è considerato "*environmental-friendly*" in quanto non genera residui tossici destinati a permanere nel suolo o a essere dilavati nelle falde acquifere.

Diversi studi, in aggiunta, hanno rivelato che l'ozono in soluzione acquosa è un possibile candidato come agente di controllo dei microrganismi grazie ai caratteri antimicrobici dell'ossidante e alle potenzialità d'uso dell'acqua (Kim, Yousef, and Dave 1999; Kobayashi et al. 2011; Najarian et al. 2018). Tra tutte le possibili modalità di somministrazione, l'acqua ozonizzata spray è forse quella con gli effetti più evidenti sulla pianta e consiste nella nebulizzazione della sospensione direttamente sulle piante attraverso un atomizzatore o degli *sprinkler* che spargono micro-gocce su un'area specifica. Bisogna precisare, inoltre, che tutti gli effetti indotti dall'ozono non sono direttamente causati dalla suddetta molecola. L'ozono, infatti, reagisce in breve tempo con l'ossigeno e l'acqua generando le cosiddette specie reattive dell'ossigeno (ROS): le effettive responsabili delle reazioni di ossidazione dei composti organici e di quelli inorganici.

Le cellule vegetali, che subiscono l'attacco di queste ROS, attivano i processi di difesa e tra i primi si osserva la produzione di antiossidanti che trasformano i radicali liberi in una forma meno tossica e meno reattiva. All'interno di questo gruppo di composti si possono distinguere gli antiossidanti enzimatici (SOD, CAT, POD, GR e GST) e quelli non-enzimatici (ascorbato, glutatione, carotenoidi ecc). Sulla base di questi presupposti, questa tesi si pone lo scopo di investigare le cause dietro una maggior crescita di piante di *Diplotaxis tenuifolia* trattate con acqua

ozonizzata in diverse modalità; il punto di partenza di questo lavoro sono osservazioni fatte in campo che riportano un notevole aumento del peso e una migliore difesa (contro funghi e insetti) del raccolto trattato rispetto al non trattato. Il lavoro è stato condotto grazie alla collaborazione dell'Università degli Studi di Verona con l'azienda *Ecofarm Storti s.r.l.*: una realtà commerciale della controllante *Storti Spa* che ha come obiettivo il miglioramento della salubrità alimentare del prodotto finito nel settore zootecnico e agricolo. In particolare, l'azienda, nell'ambito di questo studio, ha fornito i macchinari necessari alla produzione di ozono gassoso e acqua ozonizzata utilizzati sia in laboratorio che in campo.

Nello specifico, nell'ipotesi dell'induzione di *biopriming* (modificazione epigenetica che rende più accessibili alcuni geni) sono stati trattati semi di *D.tenuifolia* allo scopo di condurre studi sulla germinabilità e sulla crescita della radice e dell'ipocotile.

In un secondo momento, è stata condotta la valutazione del calo peso delle piante in campo nel periodo di campionamento analizzando dapprima il peso fresco complessivo e poi, separatamente, il peso secco e quello dell'acqua evaporata. Tramite uno spettrofotometro SPAD-502Plus, in campo sono state esaminate variazioni nella capacità di assorbimento dovute ad alterazioni della concentrazione di clorofilla nelle foglie. Infine, gli stessi campioni sono stati sottoposti ad un'analisi di spettrometria di massa e ad una di Real time RT-qPCR; con la prima è stato messo a confronto l'insieme dei metaboliti polari e mediamente polari tra piante trattate e non, mentre la seconda ha permesso di verificare l'eventualità di un effetto delle ROS a livello genetico con una maggiore espressione dei *pathway* di difesa.

3. Materiali e metodi

3.1 Materiale vegetale

Per le analisi molecolari, sia *in vitro* che *in campo*, sono state utilizzate piante di rucola (*Diplotaxis tenuifolia*) della varietà commerciale jolizia per l'industria e il consumo.

Dove non diversamente specificato, il materiale vegetale è stato campionato da piante adulte cresciute *in campo*.

3.2 Ozonizzazione

La fase di ozonizzazione è necessaria per produrre l'acqua con cui sono state trattate le piante. Questo processo consiste nell'insufflare ozono gassoso in acqua attraverso una pietra porosa.

La parte dell'esperienza che è stata svolta *in campo* prevede i trattamenti per irrigazione e per nebulizzazione, mentre, per la parte *in vitro* solo per nebulizzazione ma con concentrazioni di ozono diverse. La concentrazione di ozono che si trova in soluzione acquosa è misurata indirettamente grazie ad un voltmetro che restituisce un valore espresso in mV; la soglia di ozono, scelta arbitrariamente, è di 600 mV che diminuisce a mano a mano che l'ozono (prima) e le ROS (dopo) si degradano. Da un lato si immette ozono fino a 600 mV lasciando che decresca nel resto del tempo, dall'altro la concentrazione è mantenuta attorno al valore soglia per tutta la durata della preparazione. L'ozono è stato prodotto da un generatore multifunzione denominato *ARIASANA HOME* distribuito da *Storti Ecofarm Srl*. La potenza di erogazione dell'ozono che genera la macchina è di 600 mg/h.

3.3 Germinazione *in vitro*

Per la germinazione *in vitro* si è ritenuto necessario un passaggio di sterilizzazione dei semi prima del trattamento. I semi di *Diplotaxis tenuifolia* sono stati sterilizzati in una soluzione di candeggina commerciale al 20% per 5 minuti e le tracce di candeggina residua sono state eliminate in un secondo momento con 4 lavaggi di 5 minuti ciascuno in H₂O sterile. I semi, forniti dalla Società agricola "Marconi vivai"

di Roverbella (MN), si presentavano aggregati gli uni agli altri in gruppi di 15-20 e ricoperti da una concia per proteggerli da eventuali attacchi patogeni. Una volta messi in acqua, è risultato facile disgregarli per aumentare l'efficienza della sterilizzazione e per valutare se il trattamento avesse effetti sulla germinabilità del seme.

Una volta sterilizzati e trattati i semi (vedi paragrafo *Ozonizzazione*), per la valutazione differenziale della crescita radicale su piastra quadrata, 7 di questi sono stati posati garantendo sufficiente spazio tra una pianta e l'altra.

È da segnalare il fatto che, per la parte in laboratorio, a differenza di quella in campo, le piante hanno subito i trattamenti sin dallo stadio di seme. Questo è stato fatto per poter valutare il *biopriming* trattato successivamente.

3.4 Analisi di crescita radicale differenziale

È stata condotta un'analisi della crescita radicale in laboratorio confrontando tre gruppi di campioni: i non trattati, i trattati con acqua ozonizzata a concentrazione tenuta fissa e i trattati con carica d'ozono lasciata decrescere (vedi paragrafo *Ozonizzazione*). In seguito alla sterilizzazione e al trattamento, i semi di *Diplotaxis tenuifolia* sono stati posti in ciascuna piastra sul seguente terreno di crescita: 2.15 g/L MS, 10 g/L di saccarosio e 0.7% di agar, con un pH finale di 5.8. Per fare in modo che il terreno si solidificasse su un lato solo, le piastre sono state mantenute inclinate mentre veniva colato. Questo ha permesso di posare i semi sul confine tra la parte col terreno e quella senza. Mantenendo le piastre in verticale durante tutto il periodo di crescita, è stata indotta una radicazione verosimile a come avverrebbe normalmente in campo. Le piastre sono state poste in camera di crescita per 10 giorni ad una temperatura costante di 25°C. Al termine di questo periodo, l'apparato radicale e gli ipocotili di tutte le piante sono stati misurati grazie al programma *ImageJ* e i dati sono stati messi a confronto con *Excel*.

3.5 Coltivazione in campo

La coltivazione in campo è stata condotta presso un'azienda agricola nei dintorni di Isola della Scala (VR). La germinazione delle piante è avvenuta in vaso e sono state, poi, trasferite in terra nel mese di ottobre 2020 per essere, infine, eradiccate a giugno

2021. Le piante erano disposte sotto tre capannoni agricoli con un'estensione di 6x40 metri ciascuno. Lungo ogni capannone correva una baulatura composta di cinque sporgenze del terreno su cui crescevano quattro file di piante. Ad ogni capannone corrispondeva un trattamento diverso: nel primo, acqua non trattata veniva spruzzata sulle piante tramite sprinkler; nel secondo, sempre tramite nebulizzatori, veniva spruzzata acqua ozonizzata; nell'ultimo, invece, sfruttando tubi sotto la baulatura si irrigava con acqua ozonizzata. Le piante hanno, quindi, ricevuto i diversi trattamenti a partire dal trapianto, mentre nella fase precedente in vaso sono state annaffiate con acqua non trattata. Le somministrazioni di acqua ozonizzata avvenivano una volta a settimana, passando a due con l'aumento della temperatura indotto dalla stagione. Nel periodo dall'inizio di marzo alla fine di aprile, una volta a settimana, le piante sono state fertilizzate apportando diversi nutrienti come azoto, potassio, magnesio, fosforo, ferro e boro.



Figura 8 *Fotografie raffiguranti i filari di piante di rucola in campo. La baulatura consiste nel muovere il terreno fino ad ottenere i rialzamenti che è possibile osservare nelle foto. Si riportano due stadi diversi di sviluppo, nella seconda in cui le piante sono ancora giovani si noti la disposizione a gruppi di quattro file molto vicine tra loro*

3.6 Campionamento in campo

Il campionamento si è protratto per un periodo di 4 mesi da marzo a giugno 2021. Durante questo periodo sono state raccolte piante in funzione di due variabili: i tagli ad opera dell'agricoltore per la vendita e i trattamenti. La prima campionatura è stata ripetuta cinque volte ed è stata fatta in corrispondenza dei giorni di raccolta dati dall'agricoltore. In questo caso, sono state raccolte 15 piante in triplicato biologico per ciascun trattamento considerato. Il secondo campionamento è stato ripetuto tre volte durante i quattro mesi. Come tempo zero è stato preso il giorno di irrigazione con acqua ozonizzata e a seguire anche i giorni 1, 3 e 5 dopo il trattamento. Di volta in volta, per ciascun capannone, sono state raccolte 5 foglie per 3 piante diverse in triplicato biologico. In tutti i casi sopra riportati, i campioni raccolti sono stati messi immediatamente in ghiaccio secco e, una volta in dipartimento, sono stati conservati a -80°C.

3.7 Misurazioni con SPAD-502Plus

Tra gli effetti che sono stati osservati in campo si riporta una maggiore dimensione e, conseguentemente, un maggior peso della pianta trattata rispetto a quella non trattata. Una delle ipotesi di partenza considerava l'eventualità di una concentrazione più alta di clorofilla nelle foglie e, quindi, una produzione maggiore di fotosintati. Contemporaneamente ad ogni campionamento, è stato usato l'indicatore di clorofilla *SPAD-502Plus*® (*Konica Minolta*) per raccogliere i dati corrispondenti. La clorofilla ha dei picchi di assorbimento nelle lunghezze d'onda del blu (400-480 nm), del rosso (580-700 nm) e debolmente del verde (480-580 nm); praticamente nullo è l'assorbimento nella regione dell'infrarosso (850-1050 nm). Questo strumento emette picchi di luce nel rosso e nell'infrarosso e restituisce il rapporto tra le relative assorbanze. Il valore SPAD ottenuto permette quindi di risalire alla concentrazione di clorofilla nella foglia presa a campione (*Konica Minolta Sensing 2009*).

Le misurazioni SPAD sono state prese da tre foglie per sei piante diverse in triplicato biologico per ciascun trattamento. I singoli dati riportati per ogni foglia corrispondono alla media di tre misurazioni ottenuta grazie allo strumento stesso.

3.8 Misura del calo peso

È stata condotta una valutazione del calo peso al fine di verificare la maggiore crescita osservata in campo (citata nel paragrafo precedente). L'analisi consiste nell'essiccare mazzi di foglie di rucola a 80°C *overnight*. Per la misura del calo peso, i mazzi erano di 60 foglie ciascuno suddivisi in tre pool. Le foglie sono state scelte casualmente ammettendo tutta la variabilità di forme e dimensioni. I dati così ottenuti sono stati elaborati attraverso *Excel*.

3.9 Spettrometria di massa

Al fine di valutare eventuali differenze nella composizione metabolica tra piante trattate con acqua ozonizzata e piante non trattate è stata sfruttata la spettrometria di massa. I campioni provenienti dal campo sono stati macinati finemente e circa 100 mg sono stati adoperati per l'estrazione in 2 mL di metanolo LC-MS (Honeywell, Seezle, Germania). I campioni, a questo punto, sono stati miscelati con vortex per 30 s e sonicati per 15 min in un bagno di acqua e ghiaccio a 40 kHz nel bagno ultrasonico *Sonica Ultrasonic Cleaner* (SOLTEC, Milano, Italia). In seguito, sono stati centrifugati a 14000x g per 10 min recuperando, infine, il surnatante. Gli estratti sono stati diluiti 1:80 (v/v) con acqua LC-MS e filtrati attraverso filtri *Minisart RC4* con pori da 0.2 µm (Sartorius, Göttingen, Germania) iniettando 2 µl della soluzione ottenuta nel sistema UPLC -ESI-QToF per l'analisi metabolica untargeted. L'UPLC consiste di un sistema *ACQUITY I-Class* (Waters, Milford, MA, USA) equipaggiato con una colonna a fase inversa *BEH C18* (2.1 mm x 100 mm, 1.7 µm) termostata a 30°C. Il metodo cromatografico è durato 25 min e ha previsto i seguenti passaggi:

- I. Condizione iniziale all'1% di B;
- II. Condizione isocratica all'1% di B per 1 min;
- III. Gradiente dal 40% di B a 10 min;
- IV. Gradiente al 70% di B a 13.5 min;
- V. Gradiente al 90% di B a 15 min;
- VI. Gradiente al 100% di B da 16.5 min;
- VII. Condizione isocratica al 100% di B fino a 20 min;

VIII. Ritorno ad 1% di B e condizione isocratica (riequilibrio per ripristinare la condizione iniziale) fino a 25 min.

I solventi utilizzati sono: (A) acqua acidificata con 0.1% (v/v) di acido formico e (B) acetonitrile. Il flusso è stato impostato a 0.350 ml/min. I campioni sono stati posizionati all'interno di un sistema autocampionatore *FTN Autosampler* e mantenuti a 8°C. Il sistema UPLC è stato collegato ad uno spettrometro di massa *Xevo G2-XS QToF* (Waters). Lo spettrometro di massa era equipaggiato con una sorgente di ionizzazione electrospray (ESI) operante in modalità di ionizzazione negativa e positiva. Il range di scansione è stato impostato a 50–2000 m/z e il tempo di scansione a 0.3 s. L'argon è stato usato come gas per la CID (collision induced fragmentation) e l'energia di collisione è stata fissata a 35 V. La gestione di tutte le funzioni del sistema UPLC, PDA ed ESI/QqTOF è stata affidata al software *Masslynx v4.1* (Waters). Al fine di controllare l'accuratezza dello spettrometro di massa, una soluzione di 100 pg/μl di leucina-enkefalina è stata iniettata con un flusso di 10 μl /min generando un segnale di 556.2771 in modalità di ionizzazione positiva e 554.2615 in modalità negativa.

I cromatogrammi grezzi sono stati sottoposti all'analisi del software *Progenesis QI* (Waters) in modo da poter allineare i picchi e valutare tutte le m/z features attribuite ai metaboliti presenti nel campione. Il programma ha prodotto due dataset (uno per la ionizzazione negativa e uno per la positiva). Il dataset completo, a questo punto, è stato caricato nel software *SIMCA-P* (Umetrics, Sweden) per un'analisi statistica multivariata. In accordo con il metodo "Pareto scaling", il dataset è stato sottoposto ad una *principal component analysis* (PCA) per valutare il raggruppamento dei campioni sulla base della composizione metabolica.

3.10 Estrazione dell'RNA e retro-trascrizione a cDNA

L'RNA totale è stato ottenuto da piante di rucola precedentemente macinate con mortaio e pestello mantenute a -80°C. Si è estratto usando il reagente *TRIzol* (*Invitrogen*) e seguendo i protocolli rilasciati dall'azienda produttrice con piccole modifiche (ThermoFisher Scientific 2020). È stata determinata la purezza dell'RNA tramite spettrofotometro *NanoDrop* (*ThermoFisher scientific*), i campioni che hanno riportato un rapporto 260/230 inferiore a 1.8 sono stati

sottoposti ad un passaggio con LiCl per eliminare gli eventuali contaminanti. A questi campioni viene aggiunto LiCl fino ad una concentrazione finale di 2.5 M, sono stati, poi, incubati per circa 30 minuti alla temperatura di -20°C. L'RNA è stato centrifugato a 12000x g per 20 minuti a 4°C, il surnatante è stato scartato. A questo punto, seguono due passaggi in cui il pellet è stato lavato in etanolo 70% freddo e centrifugato di nuovo a 12000x g per 5 minuti a 4°C. Una volta eliminato nuovamente il surnatante, l'RNA è stato fatto seccare all'aria e poi risospeso in H₂O Milli-Q. Eventuali tracce residue di DNA sono state eliminate con un trattamento con *TurboDNase (Ambion)* seguendo i passaggi riportati dell'azienda produttrice (Life Technologies Corporation 2012). Infine, si è valutata l'integrità dell'RNA con un'elettroforesi su gel di agarosio all'1%.

Partendo da 2 µg di RNA, è stato sintetizzato il cDNA usando la *SuperScript II (ThermoFisher)* attraverso i protocolli rilasciati dall'azienda stessa (ThermoFisher Scientific 2004). Al fine di verificare che il cDNA fosse stato retro-trascritto correttamente e che non vi fossero contaminazioni da genomico, i campioni sono stati sottoposti ad una PCR e ad un'elettroforesi su gel di agarosio 1%. Il programma di PCR utilizzato è il seguente: un ciclo a 95°C per 5 minuti, 27 cicli in cui si succedono 30 secondi a 95°C, 30 secondi a 58°C e 20 secondi a 72°C, infine, un ultimo ciclo di 5 minuti a 72°C al termine del quale i campioni sono mantenuti a 12°C.

3.11 Real Time RT-qPCR

Il cDNA diluito è stato usato come template in un'analisi di espressione genica tra geni di difesa selezionati. L'analisi è stata condotta tramite una real time RT-qPCR usando il template e la *GoTaq® qPCR Master Mix (Promega)*. Questo metodo permette simultaneamente di amplificare e quantificare l'acido nucleico, e unito alla retro-trascrizione, restituisce i livelli di espressione di specifici RNA. Tutte le reazioni di PCR hanno seguito lo stesso programma: un ciclo di 2 minuti a 50°C seguito da 10 minuti mantenuti a 95°C, 40 cicli in cui si alternano parti di 15 secondi a 95°C e parti di 30 secondi a 58°C; nella parte finale sono state annotate le curve di dissociazione. Nel corso dell'esperimento sono stati presi, dapprima l'ubiquitina (UBQ3) e poi la tubulina (TUB6), come riferimento per le valutazioni finali. I geni

di *D. tenuifolia* oggetto di studio sono stati ottenuti tramite allineamento BLAST dei contig assemblati per RNA-Seq da Cavaiuolo (Cavaiuolo et al. 2017) con i corrispettivi ortologi in *Arabidopsis thaliana*. A causa di limiti tecnici dovuti dall'alto numero dei campioni e di geni in esame contro i soli 96 pozzetti per piastra, è stato necessario adoperare tre piastre per ciascuna replica dell'esperimento (una con UBQ3 e l'altra con TUB6). In ogni piastra, inoltre, sono state caricate delle mix con il cDNA delle tre repliche biologiche, le soluzioni erano tante quanti erano i trattamenti per ogni *time point*; successivamente, alle mix sono stati aggiunti i primer per i geni housekeeping. In questo modo, confrontando i Cq ottenuti per ogni mix nelle tre piastre e valutandone la deviazione standard, si può affermare che tutti i campioni sono stati amplificati allo stesso modo e che, quindi, i risultati delle tre piastre sono confrontabili tra loro. Infine, data la bassa variabilità dei suddetti dati, è stato possibile paragonare le espressioni dei diversi geni marker in esame.

Nome	Sequenza	Lunghezza	Tm	GC%	Ta	Amplicone
UBQ3_f	CCTAATCATCGGCGTTCACA	20	58.07	50.00	53.37	114
UBQ3_r	TGCTCTCGTATGGTGTTCG	21	58.67	47.62		
TUB6_f	CACAAAGGAAGTAGACGAGCAG	22	59.01	50.00	54.04	90
TUB6_r	CTTGACTTCACGTTGTTCCGGT	21	59.07	47.62		
PR1_f	ATATTTGCTGGCCGCTCAAG	20	58.97	50.00	54.29	127
PR1_r	CCGTTGCACTTGTAGCTGTT	20	59.06	50.00		
MYC2_f	TAGGTCCAGCCTTCGTTTGT	20	58.95	50.00	53.78	145
MYC2_r	CCTCCGACATCTCAGCCTTA	20	58.60	55.00		
BGL2_f	TCAATGTTCTGCATCGCCTG	20	58.91	50.00	53.94	146
BGL2_r	GAAAGCCAAAGTGAAGCCCA	20	58.96	50.00		

Tabella 1 Primer disegnati sui geni ottenuti dal BLAST. Sono stati usati nella reazione di Real time e si riportano le loro caratteristiche.

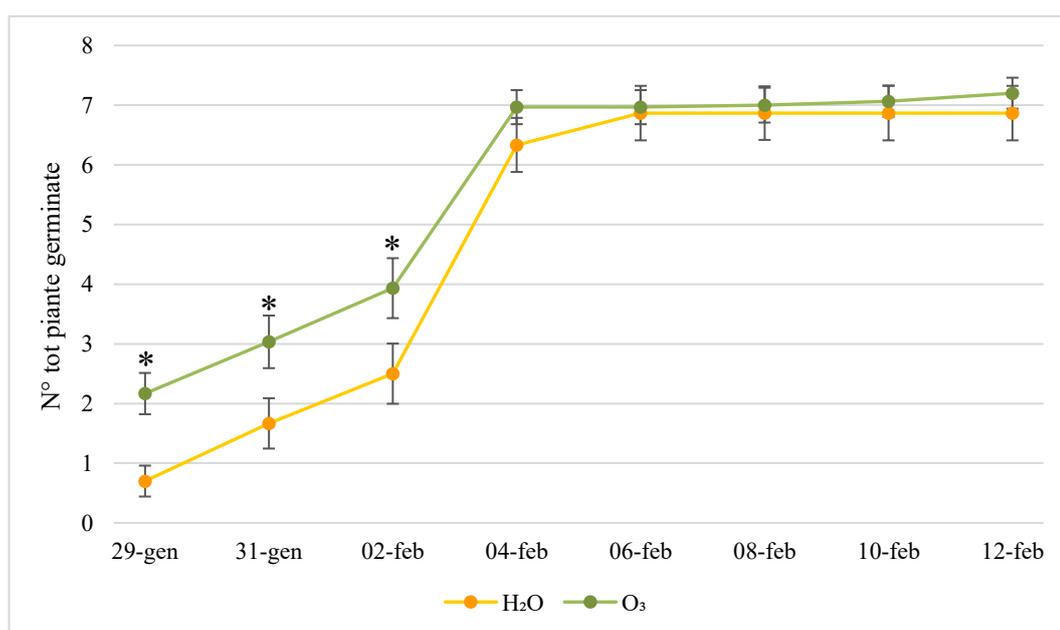
4. Risultati e Discussione

Il lavoro e gli esperimenti riportati in questo studio sono stati condotti grazie alla collaborazione tra l'Università degli Studi di Verona e l'azienda *Ecofarm Storti s.r.l.*, una realtà commerciale della controllante *Storti Spa* che ha come obiettivo il miglioramento della salubrità alimentare del prodotto finito nel settore zootecnico e agricolo. In particolare, l'azienda, nell'ambito di questo studio, ha fornito i macchinari necessari alla produzione di ozono gassoso e acqua ozonizzata utilizzati sia in laboratorio che in campo.

4.1 Prove di germinazione

In una camera di crescita con parametri standard (citati di seguito) sono stati messi 60 vasi in cui sono stati piantati 10 semi di *Diplotaxis tenuifolia* per ogni vaso: 30 vasi sono stati trattati con acqua ozonizzata nebulizzata, mentre altrettanti hanno subito lo stesso trattamento con acqua del rubinetto. I campioni sono stati fatti crescere in camera di crescita per due settimane in condizioni controllate: ciclo continuo luce-buio di 8 e 16 ore rispettivamente, una temperatura intorno ai 24°C e umidità relativa al 70%. Inoltre, ogni due giorni, a partire dal giorno di germinazione, sono stati raccolti dati relativi al numero di semi germinati per vaso e all'altezza media delle piante. Le figure 9 e 10 riportano i dati ottenuti.

A – Numero totale di piante germinate



B – Numero di piante di “nuova germinazione” giorno per giorno

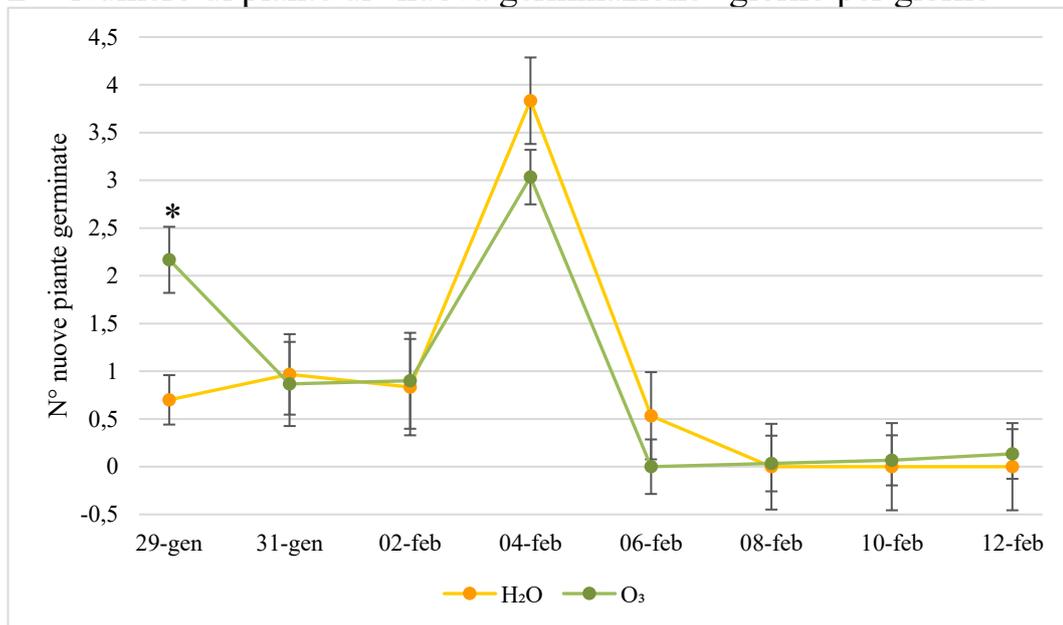


Figura 9 I grafici riportano il numero medio di piante germinate lungo un periodo di analisi di due settimane. In giallo si riportano gli andamenti dei campioni non trattati, mentre in verde quelli dei campioni trattati con O₃. I dati sono presentati come media ± ES (**p*-value<0.05 usando il test statistico T di Student con *n*=3). Il grafico A riporta il conteggio cumulativo delle germinazioni durante le due settimane. Il grafico B indica solo le “nuove germinazioni” che ci sono state giorno per giorno.

La figura 9A riguarda il numero medio di piante per vaso nel corso del tempo; in particolare, è possibile osservare una prima crescita fino al tempo di 10 “*days post-sowing*” (DPS), dopo la germinazione si è stabilizzata senza un ulteriore aumento significativo fino a 18 DPS. In merito a questo, i primi tre giorni mostrano uno sviluppo maggiore delle piante trattate con acqua ozonizzata con una differenza ritenuta significativa in seguito ad un T di Student con un *p*-value<0.05, mentre per il resto del tempo il tipo di trattamento non sembra influire in alcun modo sulla crescita.

La figura 9B, invece, riporta la differenza del numero medio di piante tra un tempo e quello precedente, ossia tutte le piante germinate tra due tempi. È subito evidente un tasso di germinazione maggiore indotto dall’acqua ozonizzata al primo giorno di raccolta dati, a questo seguono due giorni in cui i valori sono simili tra i due trattamenti. Lo scarto iniziale dell’acqua ozonizzata, quindi, è ciò che rende significativi i primi tre valori del primo grafico, non essendoci differenze nelle

nuove germinazioni, si mantiene la differenza iniziale. Questo fino a 10 DPS, giorno in cui il gruppo dei non trattati ha un picco di germinazioni superiore a quello dell'acqua ozonizzata, che corrisponde al punto del primo grafico in cui i due andamenti si sovrappongono.

Inoltre, la Figura 10 mostra l'andamento della crescita delle plantule nelle prime due settimane: tra i 30 vasi, per ogni trattamento ne sono stati scelti 10 in modo casuale di cui è stata misurata l'altezza media ogni due giorni.

Altezza media per vaso

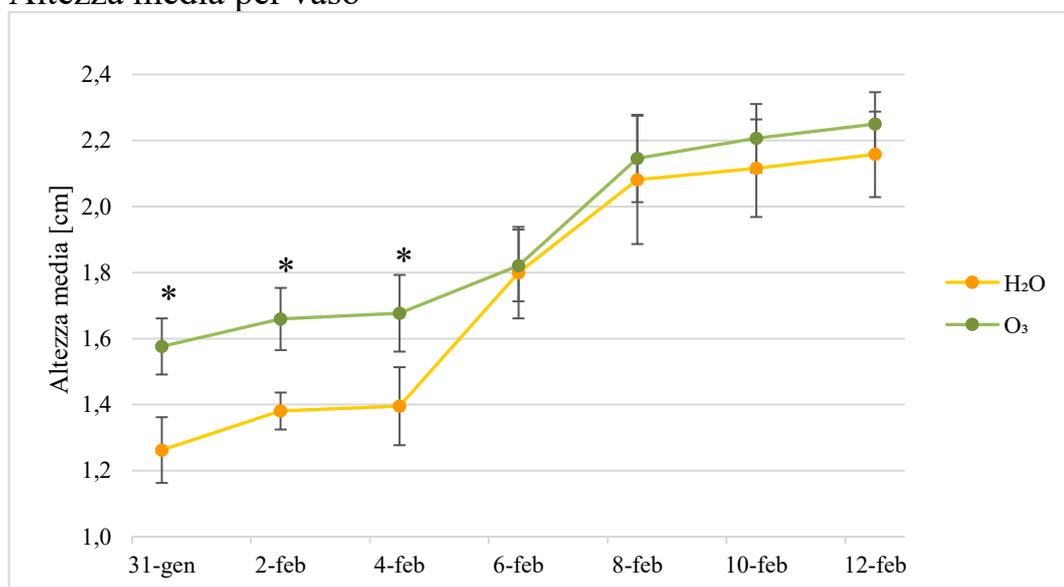


Figura 10 Andamento della crescita della pianta nel corso delle due settimane di osservazione; ne è stata misurata l'altezza degli ipocotili divisi in non trattati (linea gialla) e trattati (linea verde). I dati sono presentati come media \pm ES (* p -value <0.05 usando il test statistico T di Student con $n=3$).

È evidente la similarità con l'andamento della germinazione nel corso del tempo: i primi tre tempi riportano una differenza significativa (con un p -value <0.05) delle piante trattate rispetto alle non trattate, lo scarto non è più significativo a partire da 12 DPS (tempo in cui il p -value supera il valore di 0.05) col raggiungimento della medesima altezza media per entrambi i gruppi.

Molte molecole chimiche e biologiche hanno il potenziale per fungere da induttore del *biopriming* contro un'ampia gamma di stress abiotici (Beckers and Conrath 2007): *reactive oxygen-nitrogen-sulfur species* (RONSS) in particolare H₂O₂, ormoni come salicilato (SA), aminoacidi, ma anche il fungicida di sintesi chimica kresoxim-methile (Filippou et al. 2016). Piante pretrattate con uno di questi

composti a specifici stadi di sviluppo (e.g. semi in fase di germinazione o in stato vegetativo/riproduttivo) mostrano una maggiore tolleranza sistemica; inoltre, eventuali stress abiotici sembrerebbero avere un impatto minore sulla loro fisiologia e/o crescita rispetto alle piante non-pretrattate.

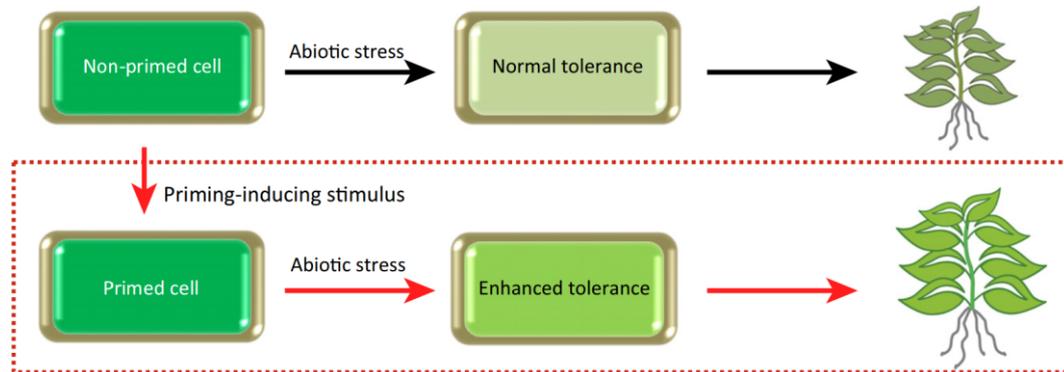


Figura 11 Agenti induttori del bioprimering, usati come pretrattamento sulle piante, conferiscono una migliore tolleranza cellulare tradotta in una crescita non limitata da stress (Savvides et al. 2016)

Applicazioni esogene a bassa concentrazione di queste molecole causano un innalzamento dei livelli endogeni, ma senza l'inibizione della crescita della pianta (Wahid et al. 2007); i dati raccolti e sopracitati potrebbero rientrare proprio in questa casistica, l'acqua ozonizzata viene somministrata per nebulizzazione con una carica d'ozono bassa. Un aumento dei livelli endogeni di ROS è stato osservato anche in piante non-pretrattate esposte a stress abiotici con la particolarità, in questo caso, che la crescita veniva inibita (Hu et al. 2012; Shi et al. 2010). Tra i diversi cambiamenti indotti dal *bioprimering* è stato osservato un aumento dei livelli di trascritti relativi ad antiossidanti enzimatici (Christou et al. 2013) e/o a componenti per la biosintesi di ascorbato e glutazione (Wei et al. 2015). Questo aumento dei livelli di antiossidanti all'interno delle piante pretrattate era accompagnato da una diminuzione del contenuto in malondialdeide (MDA) e da una dispersione elettrolitica: importanti indicatori di più bassi livelli di perossidazione lipidica e di integrità della membrana cellulare.

Oltre alla capacità antiossidante, in lavori precedenti, i semi pretrattati hanno mostrato una più veloce attività dell' α - e/o β -amilasi che si traduce in una maggiore degradazione dell'amido e accumulo di zuccheri. Questi processi sono fondamentali per un aumento della respirazione cellulare, della vitalità dei semi e

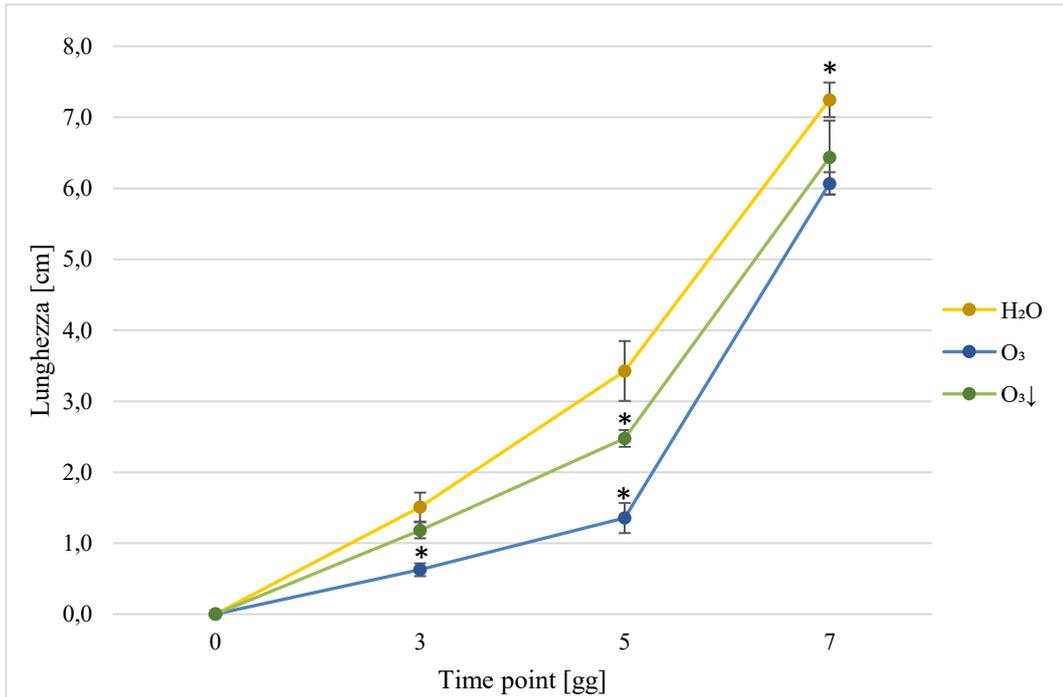
del tasso di germinazione rispetto a semi non-pretrattati (Wei et al. 2015; Zheng et al. 2009).

Questo esperimento si è soffermato sulla valutazione del tasso di germinazione e sull'altezza delle plantule nel corso del tempo al fine di confermare le ipotesi sopra-descritte anche per pretrattamenti con acqua ozonizzata, quindi contenente alte dosi di H₂O₂ e altre ROS.

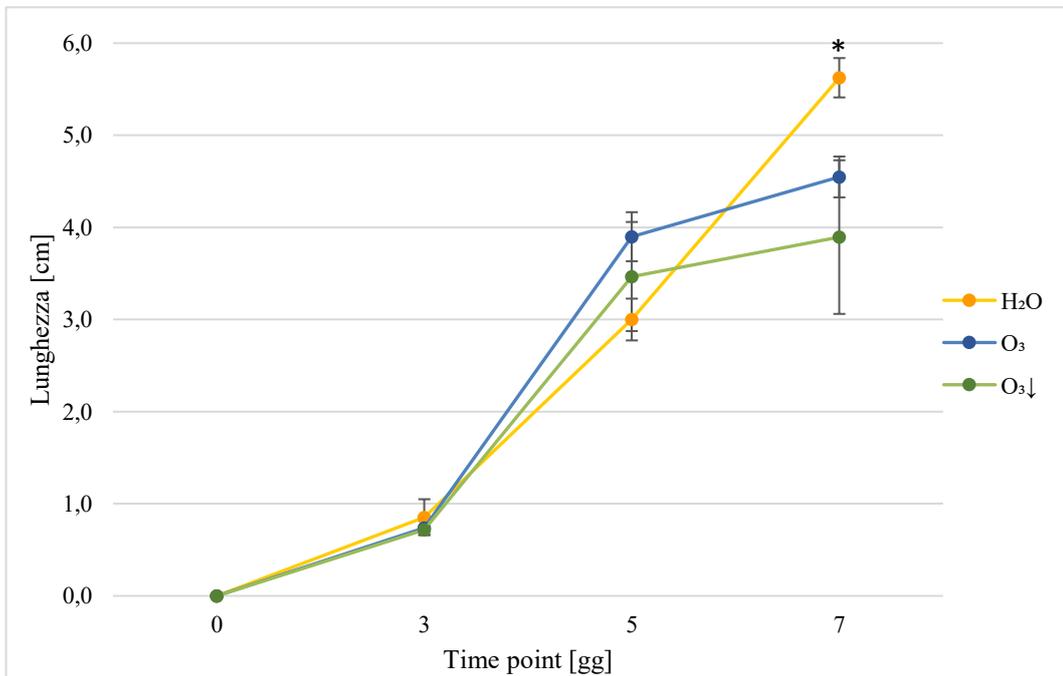
4.2 Valutazione della crescita della radice e dell'ipocotile

Successivamente, si sono voluti valutare gli effetti dell'acqua ozonizzata sulla crescita dell'apparato radicale e su quella della parte aerea. In questo caso, tre gruppi di semi di *D. tenuifolia* sono stati trattati *in vitro* con H₂O, con O₃ mantenuto a 600 mV per 20 min (d'ora in poi indicato con la dicitura "O₃") e con O₃ portato fino a 600 mV e, poi, lasciato decrescere fino alla fine del tempo di trattamento (quest'ultimo è quello che più si avvicina a quanto accade all'acqua ozonizzata usata in campo al quale si farà riferimento con "O₃↓" d'ora in poi). Dopo vari trattamenti, 7 semi sono stati posati in piastra, mentre la parte restante, a distanza di 24 ore, ne ha subito un secondo da cui altri 7 semi sono stati presi e posati. I semi rimasti, ad un ulteriore intervallo di 24 ore, sono stati trattati e posati per la terza e ultima volta. Di seguito si riportano le figure 12A, 12B e 12C, ognuna rappresentante un numero di trattamenti diverso che i semi hanno ricevuto.

A – Crescita radicale dopo 1 trattamento



B – Crescita radicale dopo 2 trattamenti



C – Crescita radicale dopo 3 trattamenti

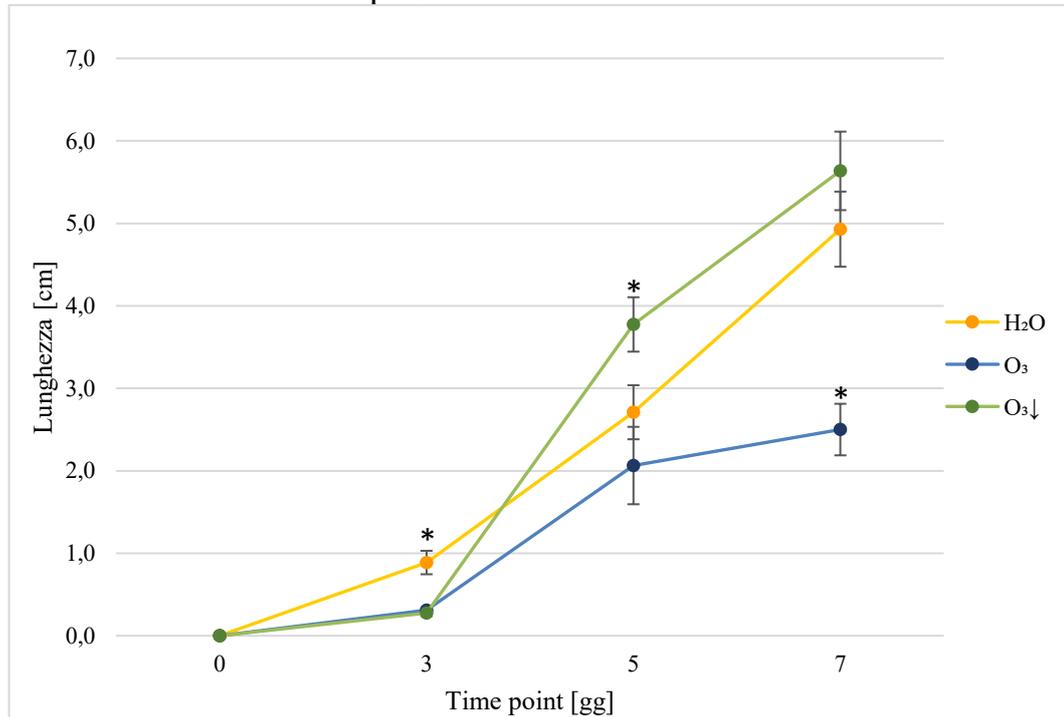


Figura 12 Ciascun grafico rappresenta la lunghezza delle radici (espressa in centimetri) nel corso del tempo di osservazione delle piastre. Sull'asse delle ascisse si trovano i tre tempi (espressi in giorni post-germinazione) in cui sono state prese le misure e il tempo zero in cui, ovviamente, non era presente alcuna radice. Il singolo time point presenta tre punti di diverso colore che corrispondono alla lunghezza radicale media tra i replicati: in giallo si riportano i valori relativi ai campioni non trattati, in blu quelli O₃, mentre in verde quei campioni trattati con O₃↓. **A** semi con un solo trattamento, **B** semi con due trattamenti e **C** semi con tre trattamenti. I dati sono presentati come media ± ES (*p-value<0.05 usando il test statistico T di Student con n=3).

Per cominciare, si consideri la figura 12A, riportante il grafico relativo ad un solo trattamento; è subito evidente che l'acqua ozonizzata influisce negativamente sulle radici che mostrano un tasso di crescita inferiore rispetto al controllo; tuttavia, l'andamento della crescita nel tempo è conservato nelle tre condizioni, ovvero lento all'inizio e più veloce a partire dal quinto giorno post-germinazione (DPG) fino al settimo DPG. Ad ogni modo, secondo i risultati ottenuti con un singolo trattamento, l'acqua ozonizzata O₃↓ e quella O₃ non hanno effetti significativi sulla radice, all'opposto questo primo impatto del seme con l'ozono potrebbe indurre maggiormente le vie di difesa a discapito dei processi dello sviluppo.

La figura 12B riporta dei risultati lievemente differenti; infatti, tutti i gruppi in esame sembrano avere una crescita minore rispetto ai campioni trattati una volta sola. Contrariamente a prima, due trattamenti a distanza di 24 ore di acqua ozonizzata O₃↓ influiscono negativamente sulla pianta con risultati anche peggiori

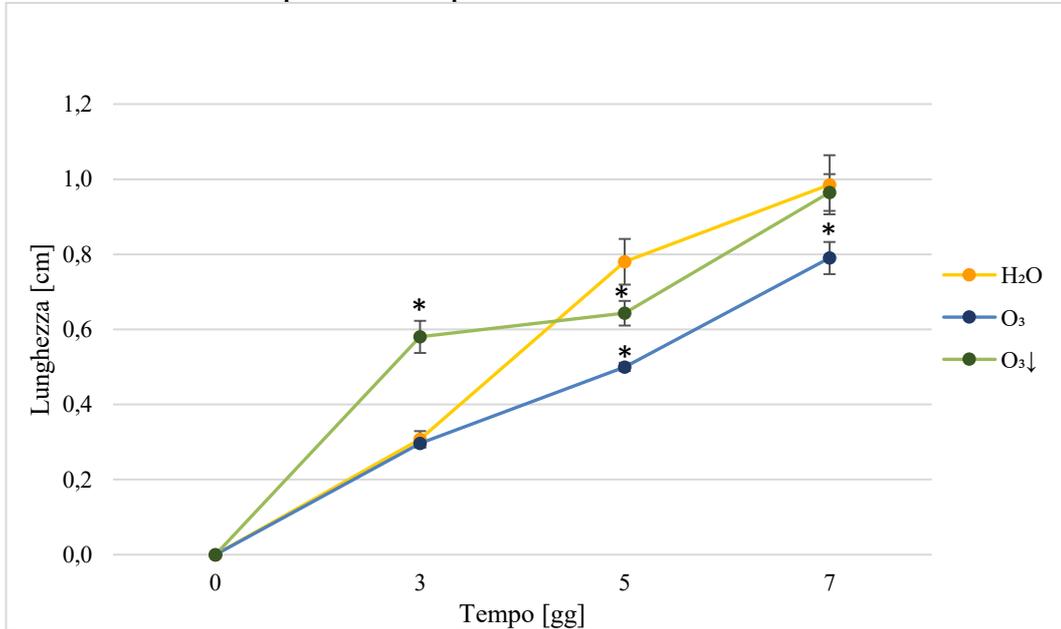
del trattamento con acqua ozonizzata O₃. Non vi è significatività statistica in nessuno dei punti considerati in quanto l'ozono genera una grande varietà di risposte; fatta eccezione per le radici non trattate a sette giorni il cui *p-value* è risultato inferiore a 0.05 con un test statistico T di Student contro tutte le altre.

Prendendo in esame il caso in cui i semi sono stati trattati 3 volte a distanza di 24 ore l'una dall'altra (Figura 12C), invece, la crescita non sembra essere stimolata. Sin dal terzo giorno di osservazione le radici dei campioni trattati con acqua ozonizzata O₃↓ erano molto più corte di quelle trattate una sola volta, questa affermazione è confermata da un T di Student tra i gruppi con un *p-value*<0.05. Le piante trattate con acqua ozonizzata O₃ erano le uniche a discostarsi dalle altre con risultati, però, negativi: le radici, infatti, erano significativamente più corte di quelle degli altri due gruppi. In questo terzo esperimento, è lampante l'effetto negativo dell'acqua ozonizzata O₃ sull'apparto radicale di piante trattate sin dallo stadio di seme; infatti, l'ozono a 600 mV si è rivelato essere un agente limitante per uno sviluppo in linea con quello delle piante non trattate. L'acqua ozonizzata O₃↓, d'altro canto, potrebbe essere uno shock iniziale, ma, data ripetutamente, potrebbe indurre la pianta ad abituarsi ad un ambiente fortemente ossidante come questo.

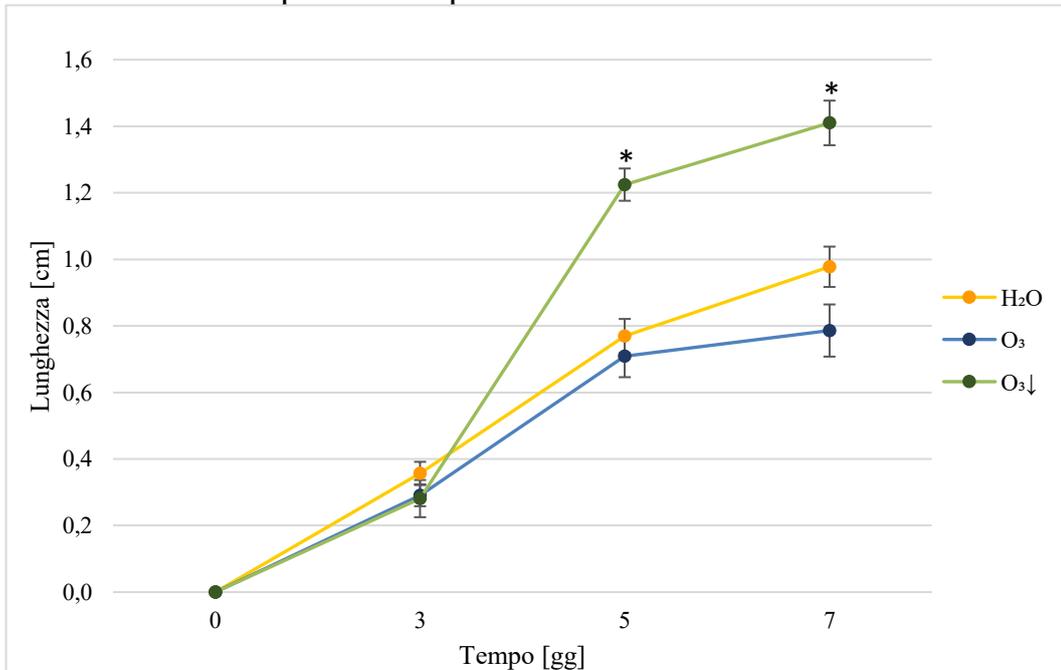
Inoltre, in nessuno dei casi considerati le plantule trattate con acqua ozonizzata O₃ riportavano effetti benefici: talvolta, per motivi ancora non noti, la germinazione è avvenuta al contrario con cotiledoni rivolti verso il basso e radici in alto esposte all'aria (questi episodi aumentavano con l'incremento del numero di trattamenti).

Delle medesime piante, poi, sono stati misurati anche gli ipocotili; di seguito si riportano tre grafici organizzati come i precedenti.

A – Crescita dell'ipocotile dopo 1 trattamento



B – Crescita dell'ipocotile dopo 2 trattamenti



C – Crescita dell'ipocotile dopo 3 trattamenti

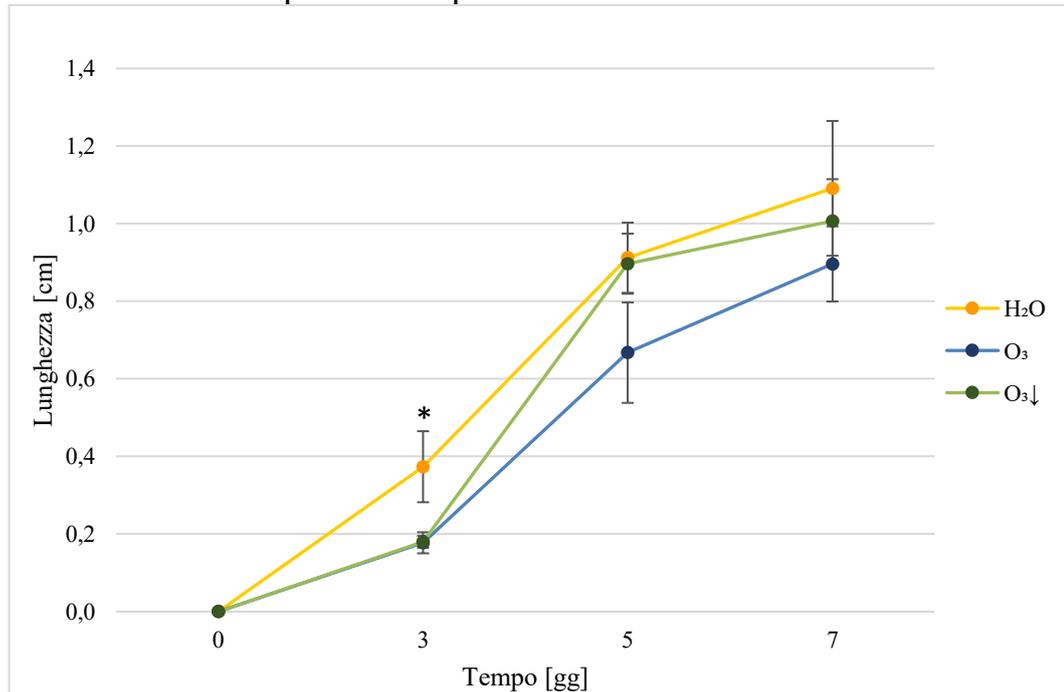


Figura 13 I grafici rappresentano la lunghezza degli ipocotili (espressa in centimetri) per il tempo di osservazione delle piastre. Sull'asse delle ascisse si trovano i tre tempi (espressi in giorni post-germinazione) in cui sono state prese le misure e il tempo zero in cui, ovviamente, non era presente alcun ipocotile. I punti corrispondono alla lunghezza della plantula media tra i replicati: in giallo si riportano i valori relativi ai campioni non trattati, in blu quelli O₃, mentre in verde quei campioni trattati con O₃↓. **A** semi con un solo trattamento, **B** semi con due trattamenti e **C** semi con tre trattamenti. I dati sono presentati come media ± ES (**p*-value<0.05 usando il test statistico T di Student con n=3).

Osservando la figura 13A, si può notare come l'andamento sia diverso rispetto a quello delle radici nelle stesse condizioni. Come per le radici, anche in questo caso il trattamento con acqua ozonizzata O₃, pur essendo uno solo, ha indotto un rallentamento della crescita definendo lunghezze inferiori a quelle degli altri due gruppi di campioni. Anche le altre due curve hanno valori medi distinti tra loro e quindi statisticamente significativi (ovvero con un T di Student che ha restituito un *p*-value<0.05), nonostante riportino un lieve effetto negativo del trattamento con acqua ozonizzata O₃↓; in questo grafico, infatti, la curva verde (O₃↓) si trova al di sotto di quella gialla (non trattate) con uno scarto di soli 0.1 cm che, al settimo giorno, si annulla a dimostrazione degli effetti blandi di questo trattamento.

La figura 13B è estremamente diversa da tutte le altre considerate finora. In questo esperimento, gli ipocotili non trattati e quelli trattati con acqua ozonizzata O₃ seguono entrambi la stessa crescita nel corso del tempo. Il primo trattamento

ricevuto potrebbe aver indotto un *biopriming* che, svolgendo la cromatina a livello dei geni di risposta a stress, permetterebbe alle piante di reagire più velocemente all'arrivo del secondo; la pianta, a questo punto, si concentrerebbe per lo più sui processi di difesa verso le nuove ROS in arrivo, piuttosto che attivare le vie di crescita. La curva di crescita dei semi trattati con acqua ozonizzata O₃↓ si distingue dalle altre a partire da 5 DPG con una differenza di 0.4 cm circa ritenuta significativa grazie ad un T di Student (*p-value*<0.05). L'ozono potrebbe aver generato una cascata di segnali con risultato l'attivazione dei geni di difesa a stress ossidativi (come per l'acqua ozonizzata O₃ descritta precedentemente). All'arrivo del secondo trattamento, il seme disponeva già di tutti i composti antiossidanti necessari per la degradazione delle ROS. La loro bassa concentrazione nell'acqua del trattamento, quindi, potrebbe aver funzionato da messaggero secondario simulando il compito delle ROS "plant-made" e attivando risposte all'interno della cellula; ad oggi molto si sa sulle ROS, sui loro effetti ossidanti e come possono essere detossificate, ma, allo stesso tempo, molto poco si sa circa il loro ruolo da messaggeri secondari. In particolare, le ROS sembrerebbero agire su una cascata *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) con risultato l'attivazione di specifici fattori di trascrizione (TFs).

In *Arabidopsis*, per esempio, H₂O₂ attiva AtMPK3 e AtMPK6 (*Arabidopsis thaliana* MAPK3/6) attraverso l'attività di ANP1 (MAPKKK *Arabidopsis* NPK1-RELATED PROTEIN KINASE1) e induce AtNDPK2 (*Arabidopsis thaliana* NUCLEOTIDE DIPHOSPHATE KINASE2) (Moon et al. 2003). Le piante che sovra-esprimono *AtNDPK2* contengono basse concentrazioni di ROS e hanno una maggiore tolleranza allo stress ossidativo, salino e al freddo; *AtNDPK2*, inoltre, stimola l'espressione dei geni che codificano per antiossidanti. Siccome *in vitro* è stata osservata l'interazione tra *AtNDPK2* e *AtMPK3/6*, è stato proposto un modello in cui uno stress ossidativo attiva *AtNDPK2* inducendo l'espressione dei geni per gli antiossidanti che regolano lo stato redox della cellula e che generano una cascata di segnali.

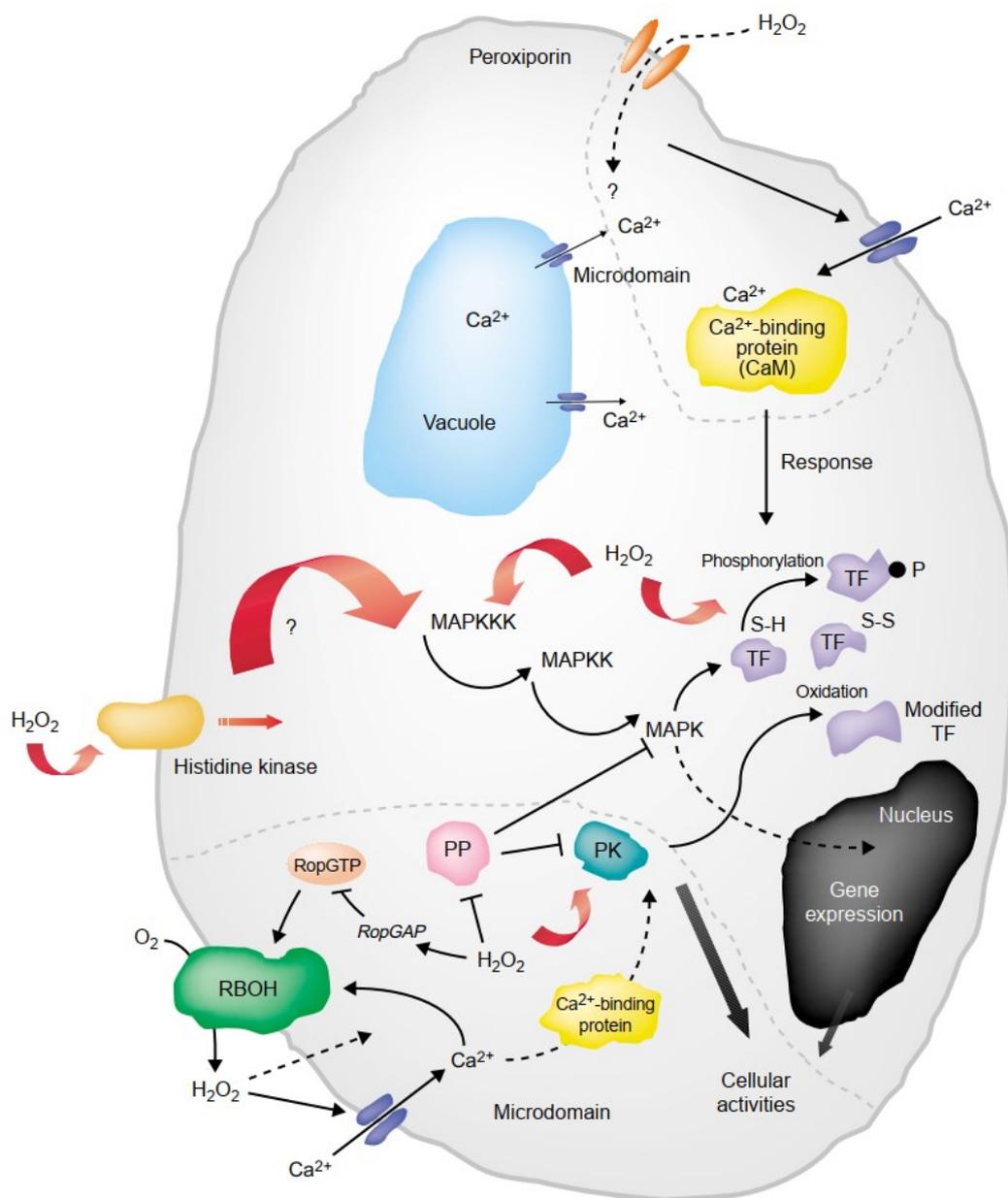


Figura 13 Signalling di H₂O₂ all'interno della cellula vegetale (Baxter-Burrell et al. 2002)

Mou et al. (2003) hanno riportato come modificazioni redox di questo tipo siano essenziali nella regolazione di NPR1 (NON-EXRESSOR OF PR1), proteina centrale della resistenza sistemica acquisita (systemic acquired resistance, SAR). In un momento di induzione della SAR, con alte dosi di SA, NPR1 ridotto e

monomeric entra nel nucleo, interagisce con una *DNA-binding protein* anch'essa ridotta e attiva la trascrizione dei geni regolatori di SA.

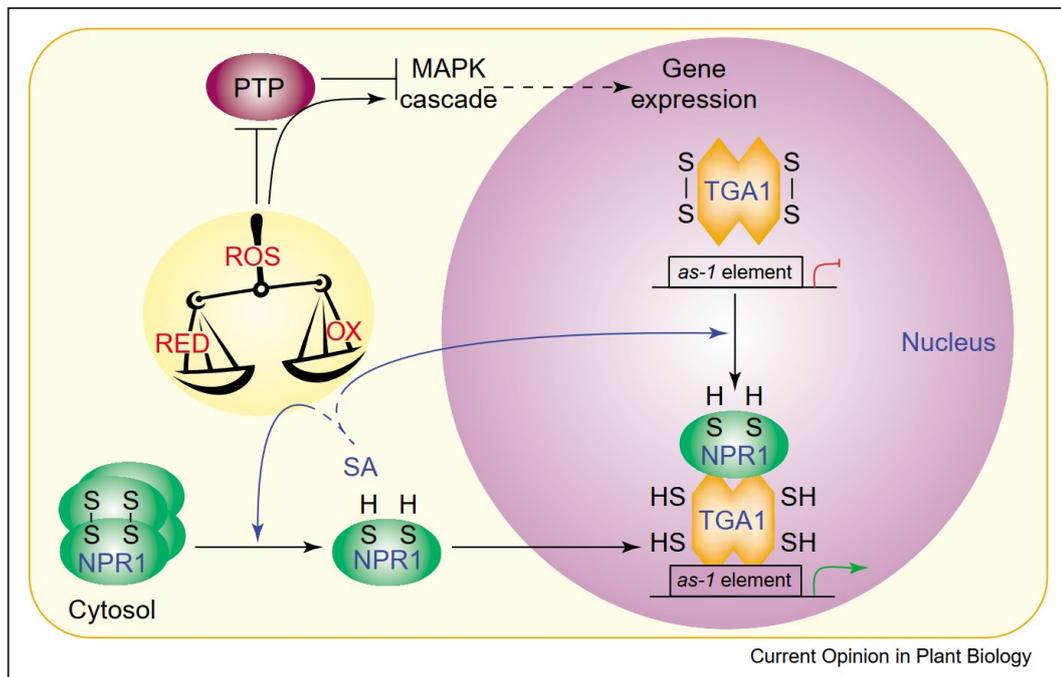


Figura 14 Sensori dei cambiamenti redox (Laloi, Apel, and Danon 2004)

Cambiamenti nello stato redox della cellula, inoltre, si potrebbero ripercuotere anche sulla catena di trasporto degli elettroni o sul *pool* di composti legati alla fotosintesi (e.g. tioredossina o glutatione) all'interno del cloroplasto; in questo caso verrebbe indotta l'espressione delle proteine cloroplasto-specifiche sia codificate dal plastoma che dal nucleo stesso (Pfannschmidt 2003).

In particolare, il cloroplasto, in situazioni di alte concentrazioni di ROS nell'apoplasto, accumula O_2^- responsabile della regolazione di un gran numero di geni nucleari (op den Camp et al. 2003); questa ROS induce l'espressione di PR1 e PR5 (PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN1/5) e l'accumulo di SA dipendente da EDS1 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1) (Ochsenbein et al. 2006). In lavori precedenti, inoltre, è stata dimostrata la capacità di O_2^- di fungere da segnale retrogrado che influisce sull'espressione genica nucleare. Data la sua breve emi-vita nell'ordine dei nanosecondi, è stata riportata la produzione di messaggeri secondari volti a svolgere questa attività a feedback, quali: specie elettrofile reattive, l'ossilipina, peptidi ossidati e un composto prodotto dal taglio dei

carotenoidi chiamato β -ciclocitrato (Farmer and Mueller 2013; Fischer, Hideg, and Krieger-Liszkay 2013; Laloi and Havaux 2015; op den Camp et al. 2003).

In definitiva, trattamenti con acqua ozonizzata, che generano uno squilibrio dello stato redox della cellula, hanno la capacità di attivare e/o reprimere svariati geni generando una risposta di segnali a cascata e influenzando la crescita e la difesa dell'organismo.

4.4 Misurazione con spettrofotometro SPAD-502Plus

In questo esperimento e in tutti quelli descritti in seguito, i campioni a cui si farà riferimento sono stati raccolti in un campo proprietà di un'azienda agricola nei pressi di Isola della Scala (VR). Le piante di *D.tenuifolia* che saranno prese in considerazione sono state seminate in un vivaio e, in ottobre 2020, trapiantate in campo. La loro disposizione in terra, come descritto nel capitolo "*Materiali e metodi*", è di quattro file vicine poste su baulature del terreno e sotto capannoni 6x40 metri.

Il periodo di campionatura che sarà preso in considerazione in tutti i prossimi paragrafi è compreso tra il 26 marzo e l'8 giugno 2021; complessivamente sono stati fatti 5 campionamenti distribuiti lungo tutto il periodo per valutare se la stagione potesse influire sull'efficacia o meno dei trattamenti. Le misurazioni SPAD sono state condotte in campo un giorno prima che le piante venissero campionate: si tratta di valutazioni della concentrazione della clorofilla nelle foglie attraverso l'uso dello spettrofotometro SPAD. Per l'esperimento di valutazione dell'espressione genica tramite *Real time RT-qPCR*, invece, le modalità di campionamento sono differenti: le piante sono raccolte a 0, 1, 3 e 5 *days post-treatment* (DPT) per tre volte lungo tutto il periodo sopra-citato.

A partire dai dati SPAD così ottenuti e tabulati è stata calcolata la media, la deviazione e l'errore standard che hanno permesso di ottenere la figura 15.

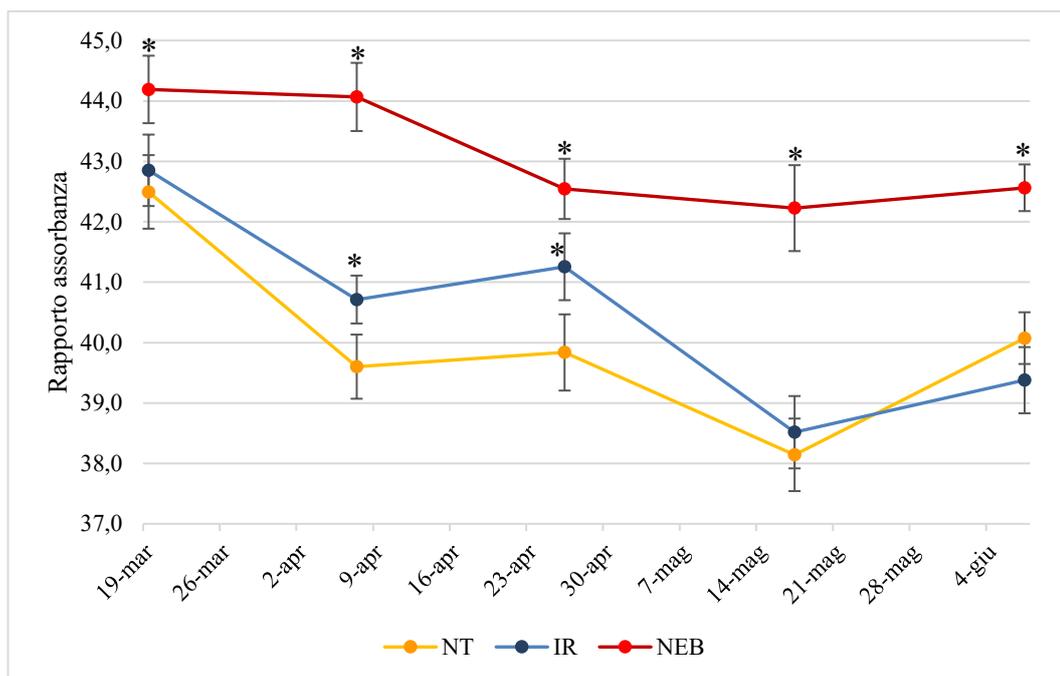


Figura 15 Grafico dei valori di SPAD raccolti in cinque time point durante tutto il periodo di campionamento. Il non trattato è indicato dalla sigla NT e dalla linea gialla, il trattato per irrigazione ha la sigla IR e la linea azzurra, mentre il trattato per nebulizzazione riporta la sigla NEB e la linea rossa. I dati sono presentati come media \pm ES (* p -value <0.05 usando il test statistico T di Student con $n=3$).

Nella figura 15 si riporta il valore di assorbanza in funzione del giorno di campionamento; in particolare, è possibile osservare tre linee: la gialla indica l'andamento dei valori SPAD medi delle piante non trattate (indicate con la sigla "NT"), la blu i valori delle piante trattate con acqua ozonizzata somministrata per irrigazione attraverso tubi sotto terra (sotto la sigla "IR"), mentre la linea rossa rappresenta l'andamento dell'assorbanza in piante trattate con acqua ozonizzata data per nebulizzazione (riportate con "NEB"). L'asse delle ascisse comprende tutto il periodo di campionamento, andando dal 19 marzo al 7 giugno 2021, e permette di osservare come i valori decrescano repentinamente in corrispondenza della metà di maggio; in generale, infatti, tutti i gruppi di campioni considerati seguono il medesimo andamento, partendo a metà marzo con valori simili, decrescendo via via fino al sopracitato punto di minimo e risalendo nuovamente con l'arrivo della stagione estiva. Ciò che diversifica i trattamenti, però, è l'intervallo di valori di assorbanza all'interno del quale si muovono: i gruppi NT e IR sono accomunati dalle stesse medie di valori che, andando da assorbanza 38 fino a 43, si direbbero influenzati dai soli fattori ambientali esterni (come stagione e condizioni

meteorologiche). Nelle piante trattate NEB, invece, i valori si discostano da quelli delle altre due linee seguendo un andamento diverso e, anche in questo caso, come nei precedenti, i dati si abbassano man mano che si giunge a maggio; tuttavia, la particolarità sta nella sua minor pendenza e minor differenza tra i punti di massimo e minimo registrati. Inoltre, l'analisi statistica T di Student condotta su questo esperimento ha permesso di definire significativi i valori SPAD di NEB con un $p\text{-value} < 0.05$ rispetto a quelli di NT e IR.

L'ozono dato per nebulizzazione, entrando in contatto con la parte della pianta di interesse, sembra avere, quindi, un effetto anche sul cloroplasto che ha un ruolo centrale nell'assorbimento della luce. Il cloroplasto è in grado, inoltre, di rispondere a segnali ROS provenienti da altri compartimenti cellulari; quando la concentrazione di ROS è alta nell'apoplasto, per un meccanismo di trasduzione ancora sconosciuto, si alza anche quella all'interno del cloroplasto: in merito, Vahisalu et al. (2010) riportano un caso simile nelle cellule di guardia. Come descritto nel paragrafo precedente, il cloroplasto sembrerebbe "comunicare" con il nucleo e le altre componenti cellulari attraverso dei veri e propri messaggeri secondari; nello specifico, le ROS, e lo stato redox di un ambiente cellulare, fungono proprio da punto di partenza di questa cascata di segnale. Mittler et al. (2011) hanno dimostrato, attraverso l'uso di mutanti, come l'acclimatazione a condizioni di elevata luce dipenda dall'azione congiunta delle ROS derivanti dalla fotorespirazione e le ROS citosoliche normalmente prodotte.

Oltretutto, se si pensa ad una trasduzione di un segnale si immagina una molecola che si sposta da un compartimento cellulare ad un altro, ma non è sempre così; può capitare, infatti, che siano gli organelli stessi a muoversi all'interno del cytosol per avvicinarsi al target. Il movimento garantisce anche l'omeostasi delle ROS e la sua importanza è stata dimostrata in semi di riso mancanti di PHOT1a (recettore della luce blu che induce lo spostamento del cloroplasto) in cui aumentavano le dosi di H_2O_2 nelle foglie, diminuiva la degradazione delle ROS, la fotosintesi e la crescita sotto condizioni di luce (Goh et al. 2009). Il movimento del cloroplasto non è necessario solo per consegnare specifici messaggeri, ma serve alla pianta per crescere sotto condizioni di luce variabili e per proteggere i fotosistemi evitando danni dovuti all'eccesso di luce. In merito a questo, tra le altre molecole, la

zeaxantina potrebbe svolgere un ruolo nella percezione della luce; questo composto viene accumulato nel cloroplasto in presenza di una forte luce blu, situazione in cui il cloroplasto è lontano dalla fonte luminosa (Tlačka, Runquist, and Fricker 1999). In aggiunta, grazie alle dimostrazioni di svariati lavori, l'acido ascorbico sembra avere un ruolo centrale sia nel movimento del cloroplasto che nella sintesi di zeaxantina. La via di biosintesi della zeaxantina, quindi, potrebbe essere lo strumento che la cellula vegetale sfrutta per mettere in collegamento il movimento del cloroplasto, il livello di antiossidanti e il metabolismo delle ROS (Müller-Moulé, Conklin, and Niyogi 2002).

L'ARPAV (Agenzia Regionale per la Prevenzione e Protezione Ambientale del Veneto), dipartimento regionale per la sicurezza del territorio, sul cui portale online è possibile sfruttare il servizio meteorologico, mette a disposizione un gran numero di parametri ambientali sia in tempo reale che registrati in passato; in particolare, è possibile concentrarsi sulla misurazione delle radiazioni solari espresse in MJ/m² e scegliere tra le stazioni sparse per il territorio veneto quella più vicina alla coltivazione di rucola, ovvero la sede di Buttapietra (VR) (https://www.arpa.veneto.it/bollettini/storico/2021/0127_2021_RADSOL.htm). In questo modo è possibile consultare tutti i bollettini passati focalizzandosi sull'andamento delle radiazioni solari giorno per giorno in tutti i mesi del 2021; scorrendo tutti i valori tabulati, si può osservare un notevole aumento delle radiazioni verso il 24 di marzo (periodo del primo campionamento), seguito da una crescita meno ripida fino al 9 aprile (data del secondo campionamento) e, infine, un altro picco di radiazioni solari fino al 27 aprile circa (giorno della terza raccolta dei campioni).

Inoltre, durante periodi di stress abiotici, come un aumento della temperatura, le piante riducono l'attività fotosintetica favorendo altri pathway (Ashraf and Harris 2013); nella figura 16 si riporta la temperatura media per settimana registrata durante il periodo di campionamento in cui si può osservare come nel mese di maggio 2021 vi sia stato un innalzamento delle temperature repentino, ma corrispondente ad un comprensibile abbassamento dei valori di SPAD.

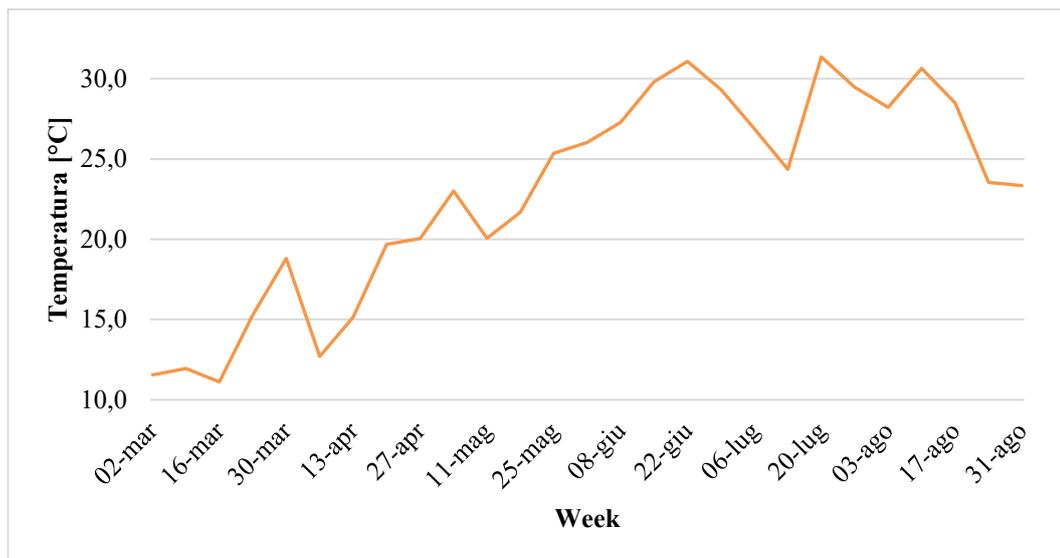


Figura 16 Andamento delle temperature medie settimanali relative al periodo di campionamento

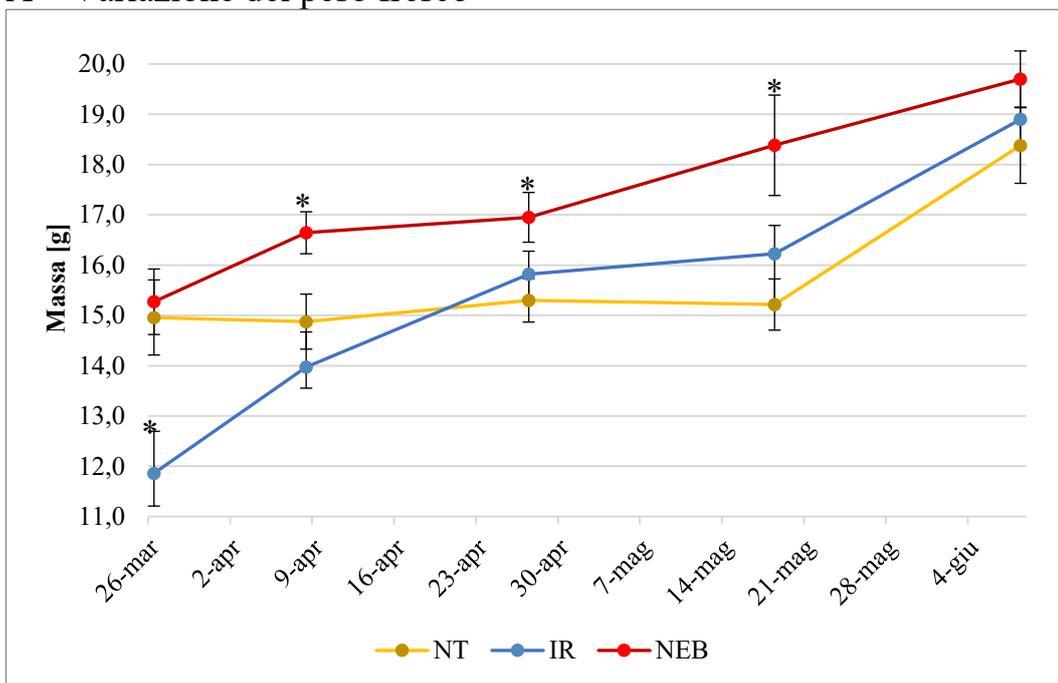
Il rapido aumento delle temperature e delle radiazioni solari sono riconosciute fonti di stress per la pianta che potrebbero andare a colpire il complesso fotosintetico e il cloroplasto in toto (Al-Khatib and Paulsen 1989; Havaux and Tardy 1999; Mishra and Singhal 1992). Con questi presupposti, è possibile supporre che i trattamenti esogeni con acqua ozonizzata nebulizzata sulle piante abbiano facilitato lo spostamento dei cloroplasti all'interno della cellula; in questo modo, questi organelli potrebbero essersi disposti in modo tale da massimizzare l'assorbimento della luce solare in arrivo, restituendo, allo stesso tempo, valori di SPAD maggiori rispetto al non trattato e a IR in cui l'ozono non è arrivato agli organi fotosintetici.

4.5 Valutazione del calo peso

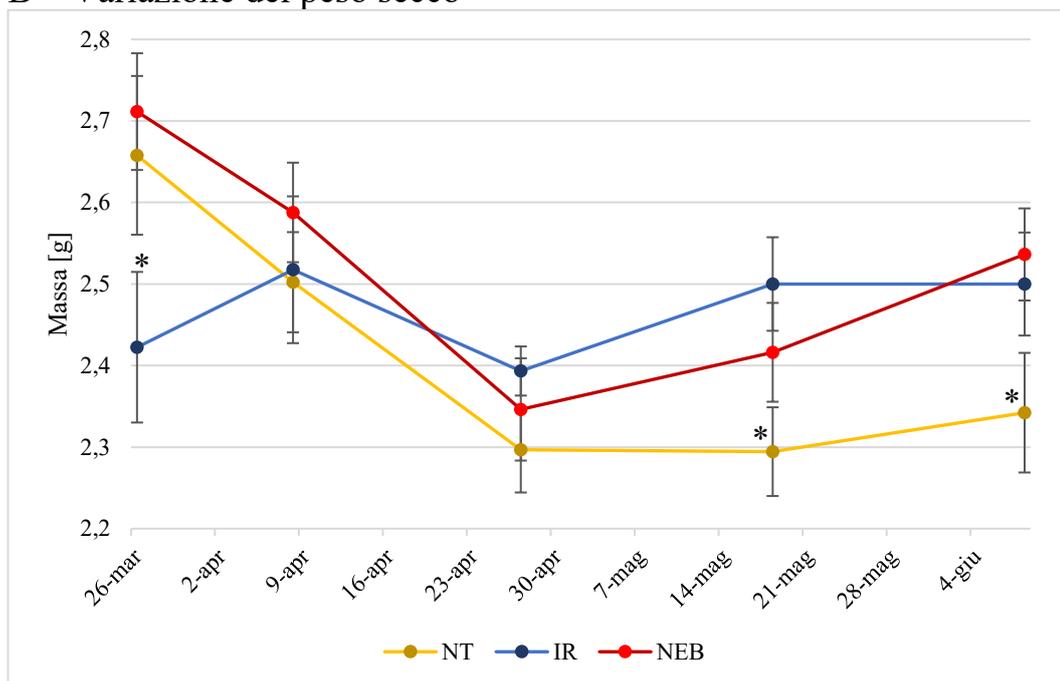
Parte delle piante raccolte durante il campionamento in campo è stata adoperata per la misurazione del calo peso al fine di valutare se i trattamenti con ozono inducono una variazione del peso della sostanza secca o del contenuto d'acqua nelle piante. Le foglie per ogni pool sono state scelte casualmente comprendendo tutta la variabilità in termini di dimensioni e forma prima che venissero messe in stufa *overnight* a 80°C; inoltre, ogni foglia è stata privata del picciolo in modo da misurare la sola lamina fogliare per ridurre al minimo la variabilità di peso introdotta dai tagli fatti ad altezze diverse.

Le figure 17A, 17B e 17C di seguito riportano la variazione del peso (fresco, secco e dell'acqua persa) nel corso dei diversi campionamenti; come nei casi precedenti, si fa riferimento alle piante cresciute in campo e divise in NT, IR e NEB (si veda il paragrafo "Misurazione con spettrofotometro SPAD").

A – Variazione del peso fresco



B – Variazione del peso secco



C – Variazione del peso dell'acqua evaporata

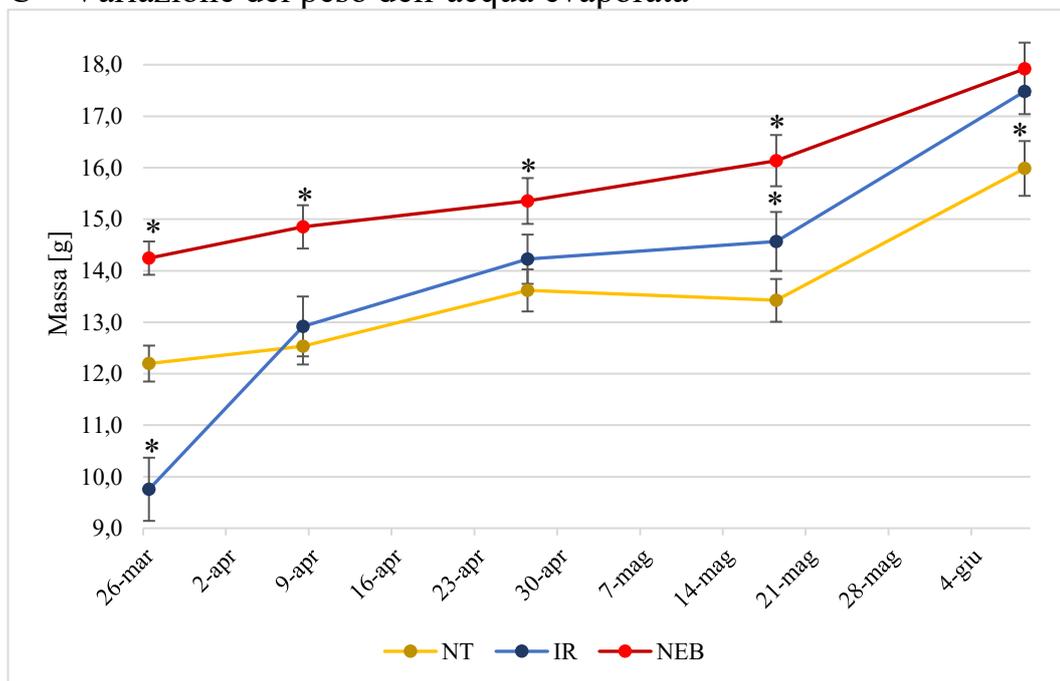


Figura 17 Tre grafici relativi alla variazione dei pesi (espressi in grammi) delle piante riscontrata nel periodo di raccolta. In giallo e con NT si indicano i campioni non trattati, con IR e l'azzurro i trattati per irrigazione, invece con NEB e il rosso quelli trattati per nebulizzazione. **A** Andamento del peso fresco, **B** peso secco e **C** curve per la variazione del peso di acqua perso dalla pianta. I dati sono presentati come media \pm ES (* p -value < 0.05 usando il test statistico T di Student con $n=3$).

La figura 17A mostra le fluttuazioni in termini di massa della sostanza fresca nel corso del tempo. Tutte le linee hanno una pendenza complessivamente crescente che sembra essere influenzata dall'andamento della temperatura in quel periodo: se si confronta, infatti, il grafico delle temperature medie settimanali con questo, si nota un aumento dei valori in entrambi i casi. È interessante notare come i campioni NEB abbiano nel complesso un peso fresco superiore agli altri trattamenti considerati e, in aggiunta, analisi statistiche hanno restituito una significatività per la maggior parte di questi punti (tramite un T di Student con $p\text{-value}<0.05$); significatività presente anche per il campione IR della prima raccolta, probabilmente dovuta alla temperatura: le piante sono state campionate il 26 marzo 2021, periodo in cui la temperatura era intorno ai 15°C, ovvero un valore che normalmente rallenta le reazioni di decomposizione dell'ozono e delle ROS in acqua permettendo di mantenere alte dosi per tempi più lunghi. In questo, l'acqua che è arrivata alle piante aveva una carica d'ozono particolarmente elevata; si verifica l'opposto, invece, con i campionamenti successivi: le temperature si alzano, l'ozono e le ROS reagiscono prima e in campo arriva un'acqua meno carica rispetto alla precedente, in modo tale da ottenere maggiori benefici e meno stress sulla pianta.

Per comprendere meglio il fenomeno, si può fare riferimento alla figura 17B in cui si riportano i dati graficati relativi alle variazioni del peso secco nel corso del tempo. Diversamente da quanto osservato prima, il valore di massa si abbassa notevolmente rispetto all'inizio intorno al 27 aprile. Nel periodo che va da inizio marzo a fine aprile, le temperature hanno subito un netto innalzamento da 12°C medi fino a 22°C, l'umidità relativa, inoltre, è mantenuta tra una percentuale media del 60% e dell'80%; questi sono tutti fattori, però, che non motivano in alcun modo la decrescita di massa repentina. Nel paragrafo “*Misurazione con spettrofotometro SPAD-502Plus*” si fa riferimento ad un aumento dell'intensità luminosa nel pieno del periodo di campionamento.

Il repentino innalzamento della temperatura e delle radiazioni solari potrebbe aver indotto una maggiore crescita delle piante; queste, data la vicinanza l'una con l'altra, potrebbero contendersi l'assorbimento della luce. Non ritenendo vantaggioso estendersi lateralmente data l'estrema vicinanza tra loro, le piante

potrebbero aver preferito allungarsi verso l'alto. In questo caso, considerando la variazione dei parametri ambientali nel giro di 2-3 giorni, lo sviluppo è avvenuto in tempi molto brevi. L'improvviso bisogno di crescere potrebbe aver fatto sì che la pianta preferisse allungare il picciolo, piuttosto che ampliare la superficie fogliare, per superare le altre in altezza. Un processo di questo tipo può avvenire per divisione cellulare o per distensione cellulare; quest'ultimo, in particolare, avviene ad opera di un allargamento del vacuolo con maggiore acquisizione d'acqua, aumenta la pressione di turgore e la cellula si espande. Inoltre, come già accennato prima, il picciolo è stato tagliato prima di ogni misurazione del peso impendendo ogni valutazione in merito. Con questi presupposti, si è in grado di ipotizzare cosa potrebbe essere successo il 27 aprile 2021, data in cui è stato registrato il più basso valore di peso secco.

La figura 17C, infine, si riferisce alla variazione del contenuto d'acqua nei campioni nel corso del tempo il cui andamento che si osserva è simile a quello del peso fresco. La figura 17C conferma la differenza consistente tra i dati del primo campionamento in cui IR influisce negativamente sullo sviluppo, mentre NEB ha degli effetti positivi. Questo trattamento mantiene una differenza significativa ($p\text{-value}<0.05$) per tutti i campionamenti, ad eccezione dell'ultimo. Le motivazioni che potrebbero risiedere a monte dei dati mostrati sono le stesse riportate per la figura 17A: concentrazioni basse di ozono e condizioni ambientali favorevoli potrebbero favorire un maggiore assorbimento d'acqua oltre che (come ipotizzato nel paragrafo "*Misurazione con spettrofotometro SPAD-502Plus*") stimolare l'assorbimento della luce.

4.6 Spettrometria di massa

L'analisi di spettrometria di massa è stata fatta sulla popolazione di campioni raccolti in campo divisi in NT, IR e NEB. Per ogni trattamento sono stati raccolti tre replicati biologici composti da 15 piante ognuno. Per cominciare, è stata costruita una libreria di metaboliti secondari mediamente polari tipici di *Diplotaxis tenuifolia* al fine di identificare le molecole rappresentative dei picchi più abbondanti nei cromatogrammi. I risultati, purtroppo, non stati concordi con quelli attesi in partenza: non è stato possibile identificare alcuna molecola significativa in

quanto non sono state osservate differenze in nessuno dei gruppi considerati. Si riporta una rappresentazione della distribuzione dei campioni ottenuta tramite PCA (*Principal Component Analysis*), ovvero una tecnica per la semplificazione dei dati nell'ambito di una statistica multivariata come può essere quella per i risultati di una spettrometria di massa.

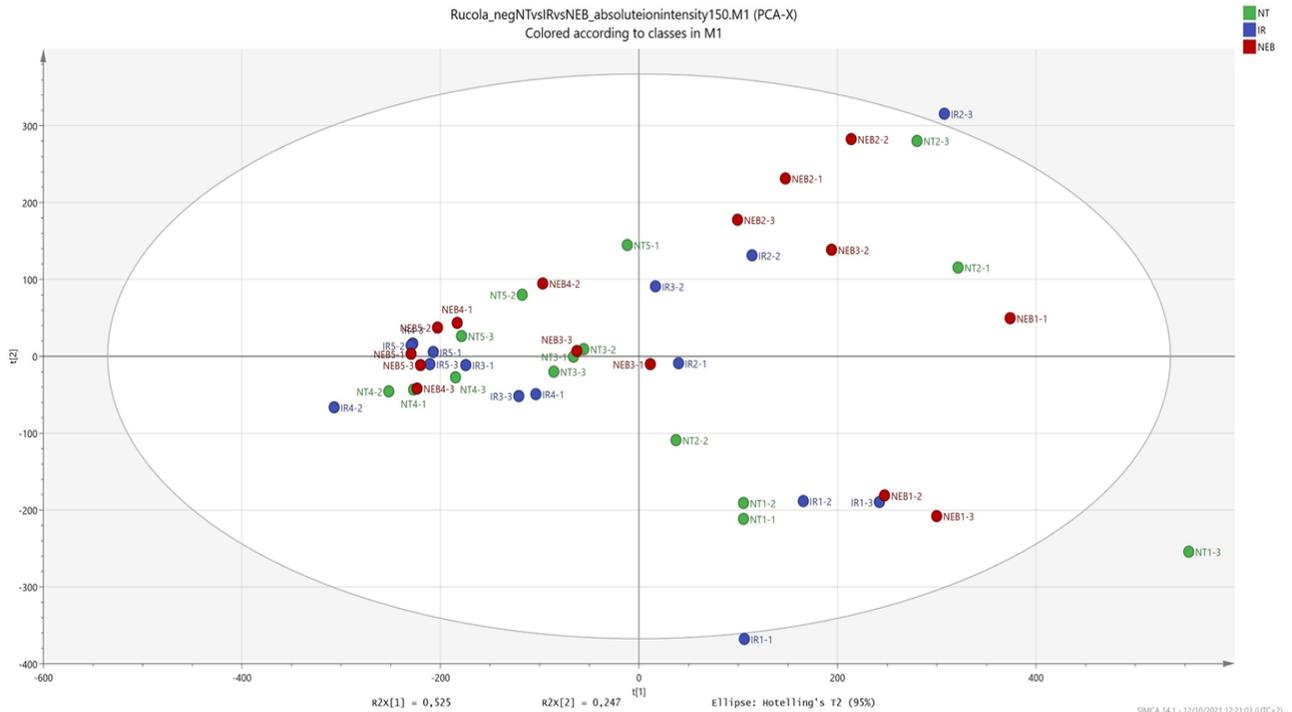


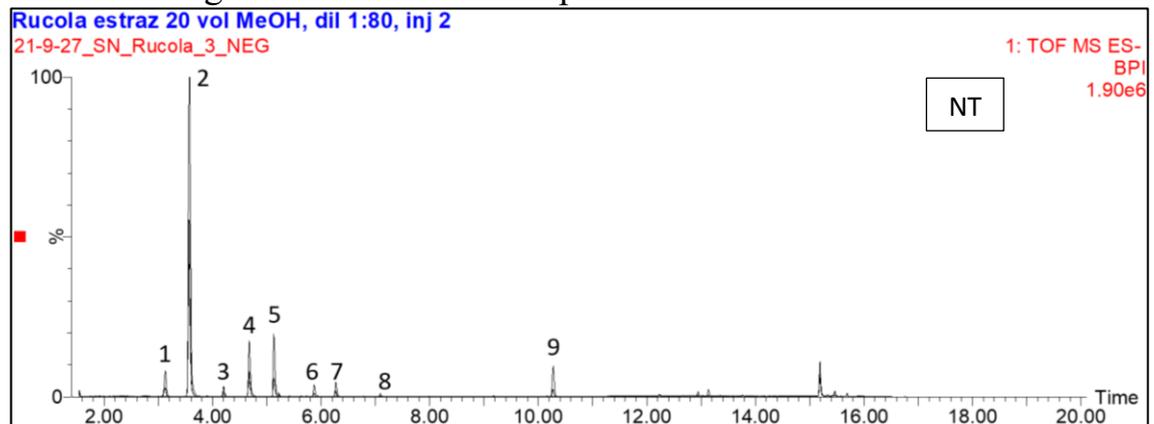
Figura 18 Rappresentazione grafica output di un'analisi PCA in cui i punti sono caratteristici di un pool, un trattamento e un giorno di campionamento. Il codice identificativo che riportano è "trattamento"+"gg_campionamento"- "pool": il "trattamento" può essere NT (non trattato), IR (irrigazione) e NEB (nebulizzazione), il "gg_campionamento" è un numero che va da 1 a 5 (a rappresentare 26-mar, 8-apr, 27-apr, 18-mag, 8-giu) e, infine, il "pool" che indica il replicato biologico di appartenenza e va da 1 a 3.

In questa analisi si raggruppano tutti i campioni descritti all'inizio del paragrafo per ciascuno dei 5 giorni di campionamento distribuiti nel periodo da marzo a giugno. Si nota subito come non vi sia alcun raggruppamento caratteristico che permetta di stabilire una differenza tra un gruppo rispetto ad un altro: a sinistra si trovano concentrati in un punto tanto i non trattati quanto i trattati di uno stesso tempo di campionamento, mentre a destra si osservano campioni maggiormente dispersi, ma anche in questo caso suddivisi in base al giorno di raccolta. Tutto questo permette di affermare che l'unico fattore che sembra avere un effetto a livello dei metaboliti

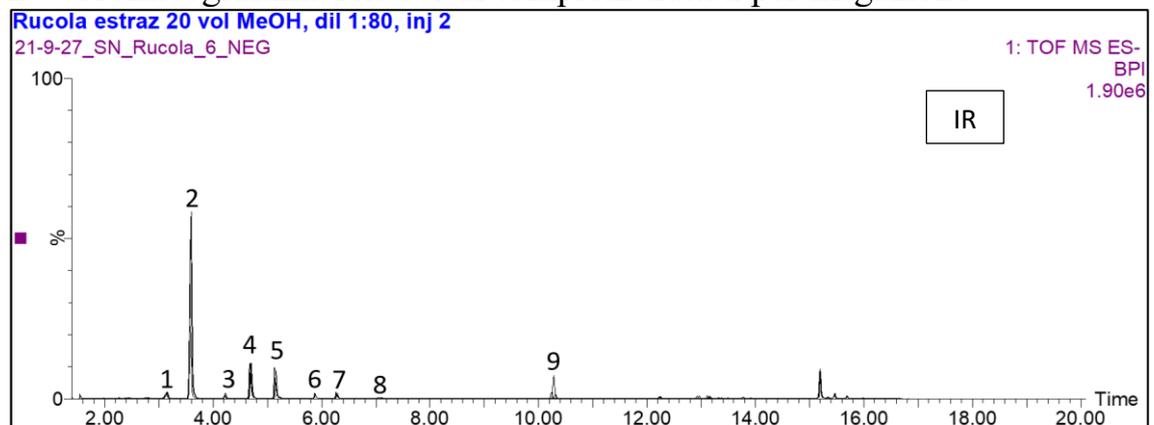
mediamente polari (in esame in questa analisi) è quello ambientale che varia col procedere della campionatura.

Di seguito si riportano tre cromatogrammi a solo scopo rappresentativo: ciascuno è ottenuto dalla sovrapposizione dei cromatogrammi dei triplicati biologici di ogni trattamento campionati in data 26 marzo 2021.

A – Cromatogramma relativo ai campioni non trattati



B – Cromatogramma relativo ai campioni trattati per irrigazione



C – Cromatogramma relativo ai campioni trattati per nebulizzazione

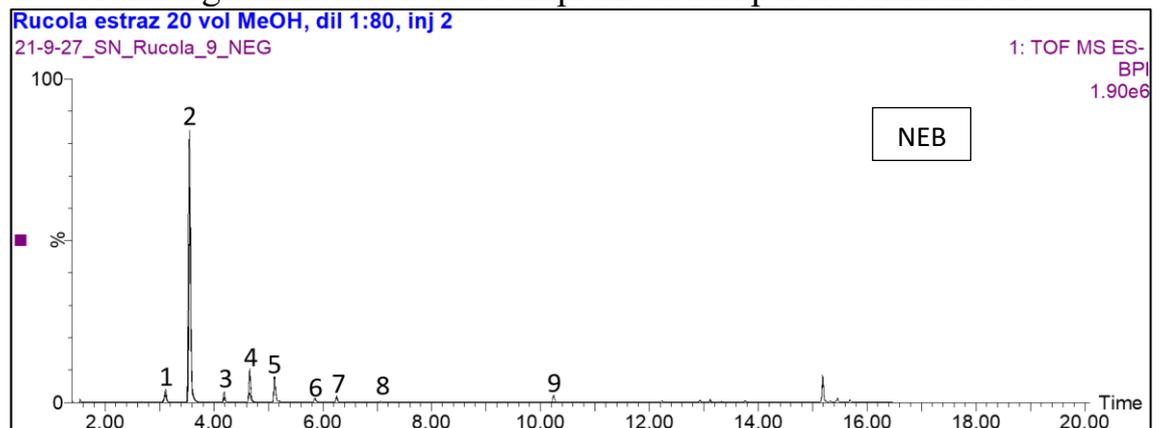
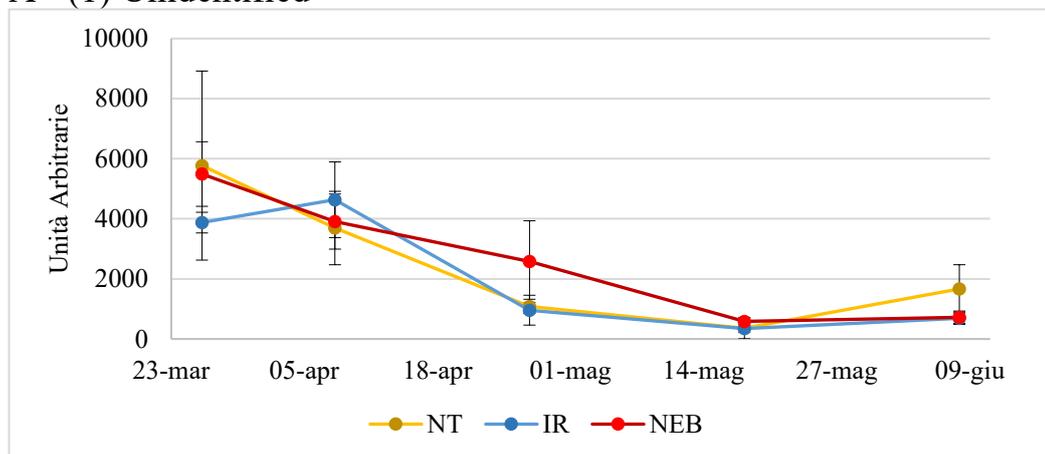


Figura 19 Rappresentazione dei dati output di un'analisi in spettrometria di massa: tre cromatogrammi frutto della sovrapposizione di altrettanti spettri rappresentativi dei pool di ogni trattamento. Cromatogrammi relativi ai campioni **A** non trattati, **B** trattati per irrigazione e **C** trattati per nebulizzazione. I numeri riportati nei cromatogrammi indicano i metaboliti più abbondanti nel campione che sono stati citati di seguito.

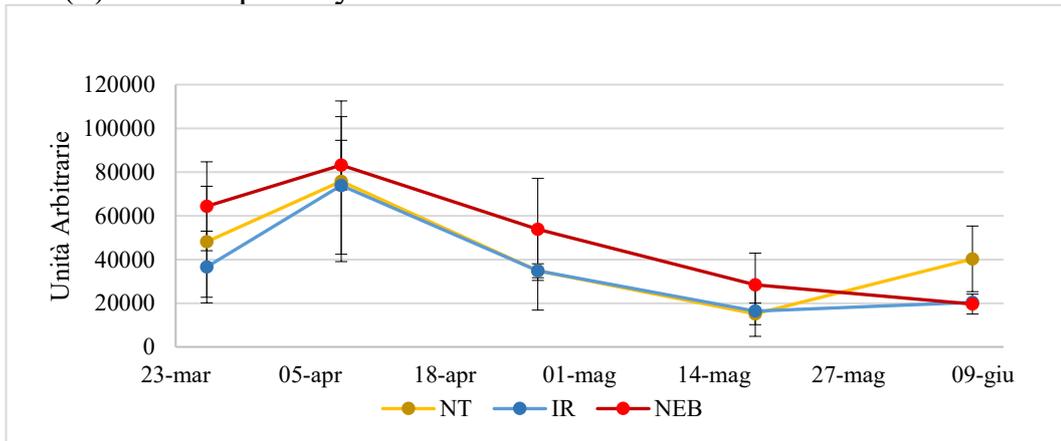
Le figure 19A, 19B e 19C permettono di confrontare i picchi relativi alle classi di molecole più abbondanti eluite nello stesso momento. I cromatogrammi sono stati, poi, processati al fine di identificare le molecole più rappresentative tra quelle che costituiscono i picchi maggiori, ovvero i nove indicati dalla numerazione; l'ultimo picco, invece, presente in tutti e tre i gruppi, allo stesso tempo di ritenzione e con la medesima altezza, rappresenta segnali di fondo della fase mobile adoperata.

Analizzando la distribuzione dei picchi per ciascun tempo di ritenzione, in base ai loro valori di massa su carica (m/z) sono stati individuati i composti più abbondanti, confermati dal pattern di picchi a valori di m/z tipici dei loro prodotti di frammentazione. In un secondo momento, come ulteriore conferma del fatto che i trattamenti non sembrerebbero sortire alcun effetto sulla parte metabolica mediamente polare in rucola, sono state messe a grafico le aree dei picchi espresse in UA (Unità Arbitrarie) di ogni metabolita valutandone le variazioni nel corso del campionamento (a seguire si riportano i risultati).

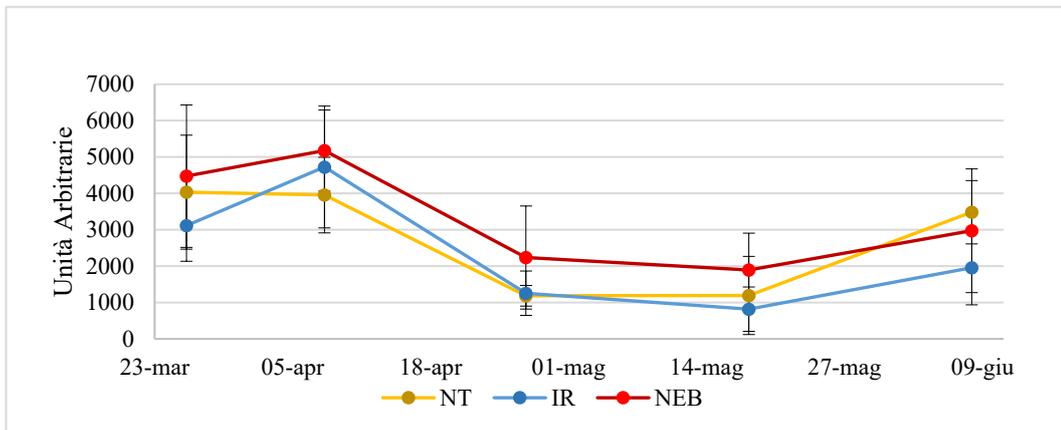
A - (1) Unidentified



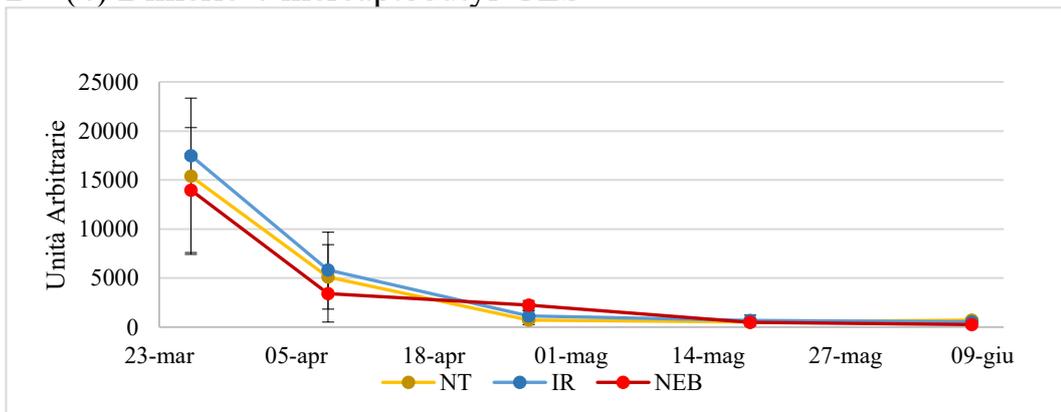
B - (2) 4-mercaptobutyl-GLS



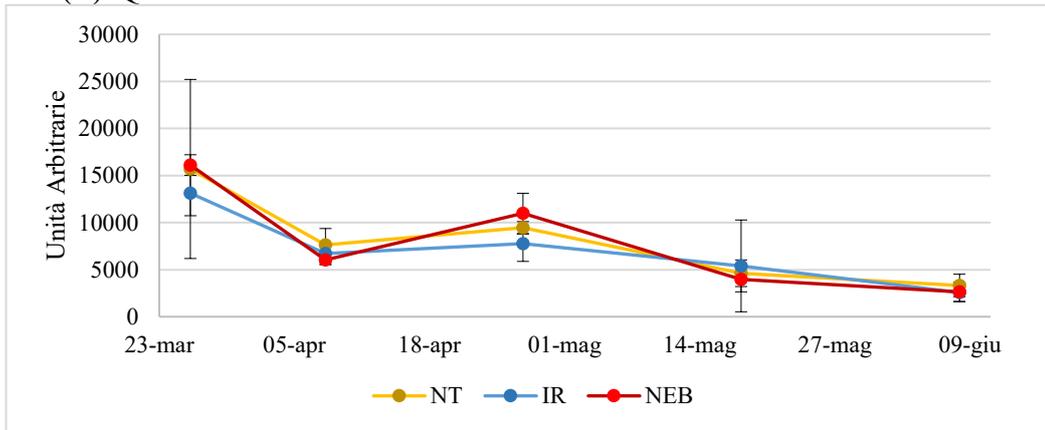
C - (3) Glucoerucin



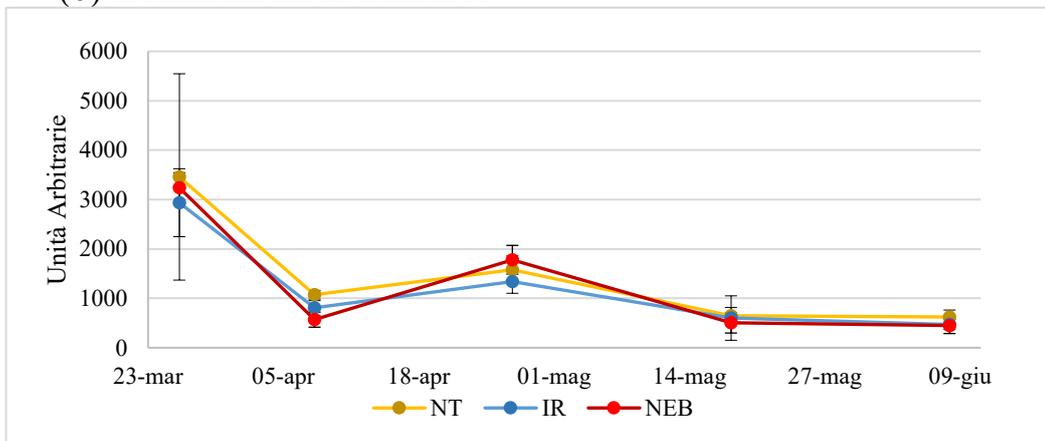
D - (4) Dimeric 4-mercaptobutyl-GLS



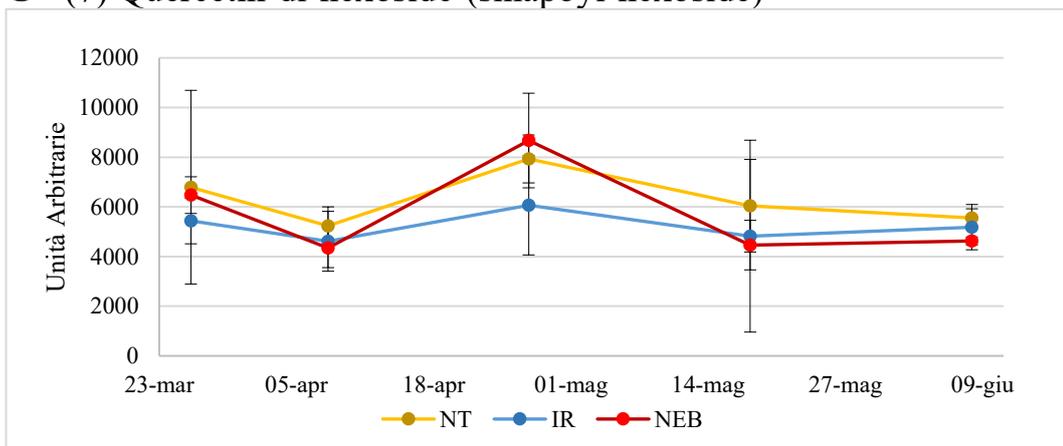
E - (5) Quercetin tri-hexoside



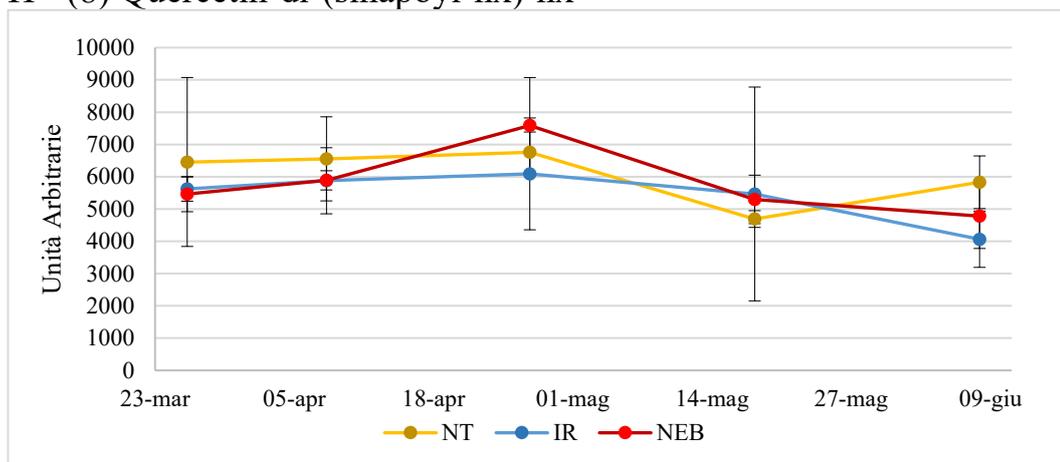
F - (6) Isorhamnetin di-hexoside



G - (7) Quercetin-di-hexoside-(sinapoyl-hexoside)



H - (8) Quercetin-di-(sinapoyl-hx)-hx



I - (9) Unidentified

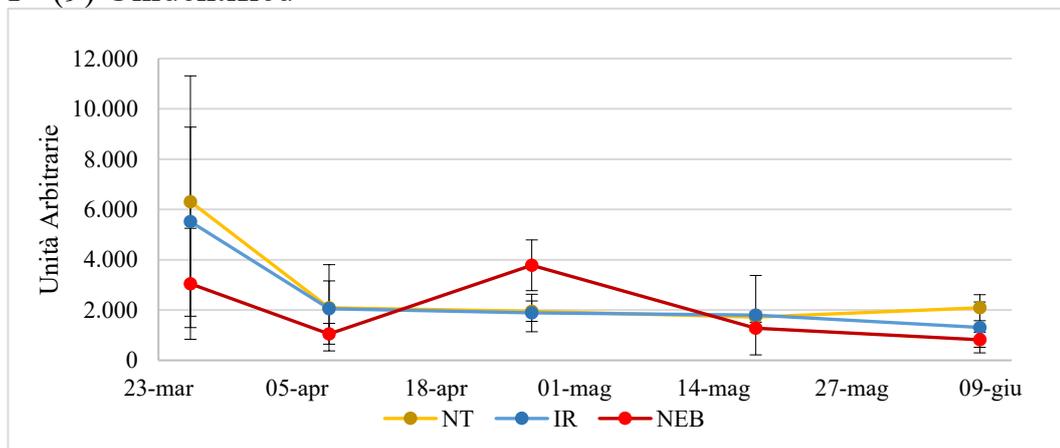


Figura 20 Grafici di espressione di metaboliti secondari tipici di *D.tenuifolia* nel corso del periodo di campionamento

La figura 20 mostra l'assenza di significatività tra i campioni in esame, nella maggior parte dei casi l'andamento dei trattati segue quello dei non trattati ad indicare la dipendenza dai soli parametri ambientali. I metaboliti secondari mediamente polari estratti, in definitiva, sembrano non essere perturbati in alcun modo dai trattamenti con acqua ozonizzata; tuttavia, data la maggiore crescita delle piante, dovrebbe verificarsi una variazione nella componente metabolica che non è stata presa in considerazione in questo lavoro, ossia i metaboliti primari o quelli secondari apolari che ricoprono tutta un'altra serie di compiti all'interno della cellula vegetale.

4.7 Valutazione dell'espressione di geni marcatori delle vie di difesa

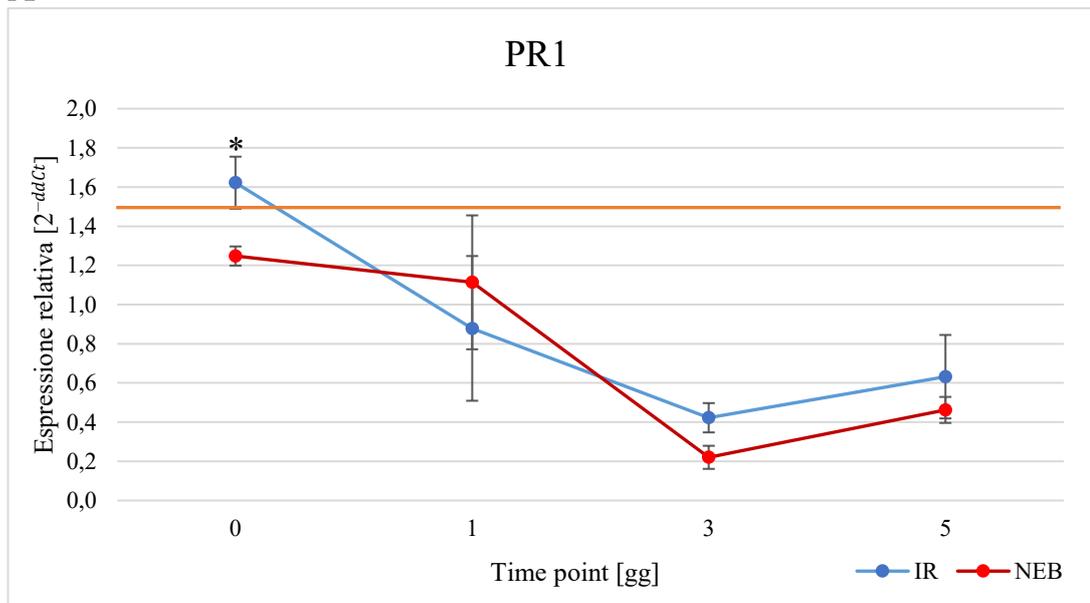
Al fine di valutare l'attivazione delle risposte di difesa nelle piante trattate con acqua ozonizzata, sono stati selezionati diversi geni come marcatori di alcune vie importanti della difesa. In particolare, sono stati scelti i geni che codificano per:

- PR1 (Pathogenesis-Related protein 1), una proteina prodotta in maniera acido salicilico-dipendente, che viene prodotta principalmente in risposta a patogeni biotrofici. Risulta essere un utile marcatore della risposta SAR (Systemic Acquired Resistance).
- MYC2, un fattore di trascrizione con il caratteristico dominio di interazione basic helix-loop-helix (bHLH) leucine zipper. Lega il motivo G-box nel promotore dei geni target e fa parte di un complesso di attivazione trascrizionale. Funge da regolatore positivo o negativo a seconda delle condizioni dell'organismo, inducendo la crescita radicale laterale o reprimendo il metabolismo del triptofano, rispettivamente. E' un regolatore importante coinvolto nelle risposte dipendenti dall'acido jasmonico.
- BGL2 (Beta-1,3-Glucanase 2), proteina con attività di glucosidasi e di idrolasi che è localizzata nell'apoplasto, nella parete cellulare e nel vacuolo, è, inoltre, coinvolta anch'essa nella SAR.
- PDF1.2C (Plant Defensin 1.2C), proteina difensiva prodotta in risposta a segnali della via dipendente dall'etilene e dal jasmonato che non sembra essere indotta direttamente dall'acido salicilico.
- PAL2 (Phenylalanine Ammonia-Lyase 2), fa parte di una famiglia di 4 proteine PAL in *A. thaliana* coinvolte nelle risposte a stress ossidativo o a ferite

Dato che il genoma di *Diplotaxis tenuifolia* non è disponibile, le sequenze dei geni selezionati sono state cercate prima nel genoma della pianta modello *A. thaliana*, appartenente alla stessa famiglia delle *Brassicaceae*, nella banca dati TAIR (The Arabidopsis Information Resource). Quindi, è stato condotto un BLAST per individuare i geni omologhi nei contig di *Diplotaxis tenuifolia* derivanti da un'analisi RNAseq recente (Cavaiuolo et al., 2017). Infine, sono

stati designati dei primer specifici per ogni gene di interesse sulla base delle sequenze di *D. tenuifolia* così ottenute e si è proseguito con l'analisi della loro espressione in diverse condizioni mediante real-time qPCR. Le prossime immagini si riferiscono quindi ai valori di espressione relativa dei geni marker PR1, MYC2 e BGL2, ottenuti con il metodo del 2^{-ddCt} , a diversi tempi dopo i trattamenti. Per l'analisi dell'espressione, sono stati utilizzati due geni housekeeping, UBQ3 e TUB6, che codificano per un'ubiquitina e una tubulina, rispettivamente. Inoltre, al fine di garantire la significatività dei risultati ottenuti, è stata considerata una differenza massima di 0,5 cicli per l'amplificazione di ciascun gene nelle varie repliche eseguite con TUB6 o UBQ3.

A



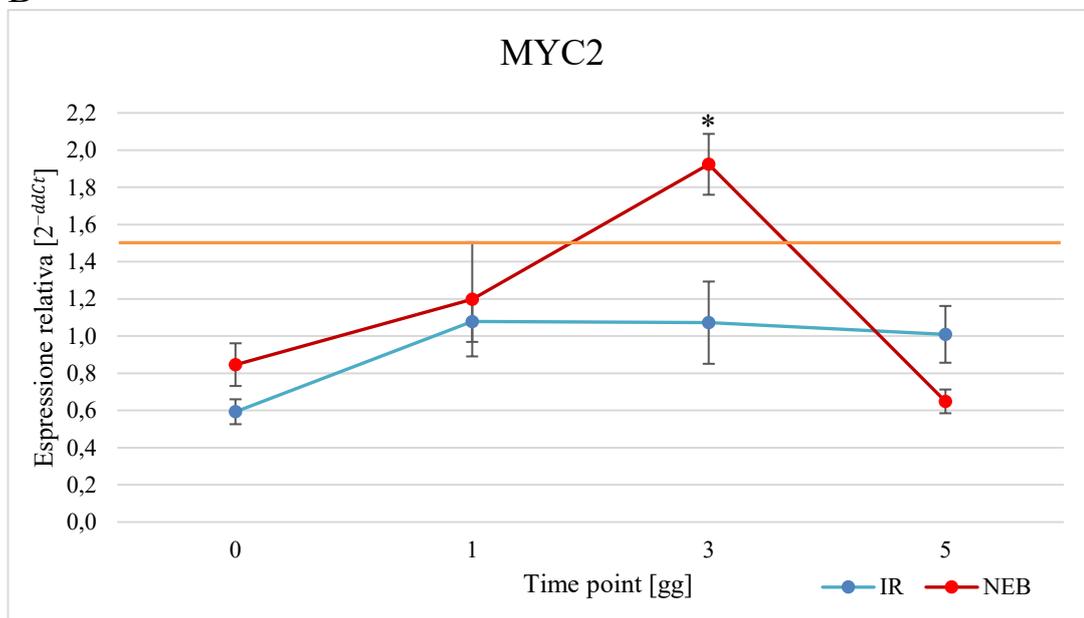
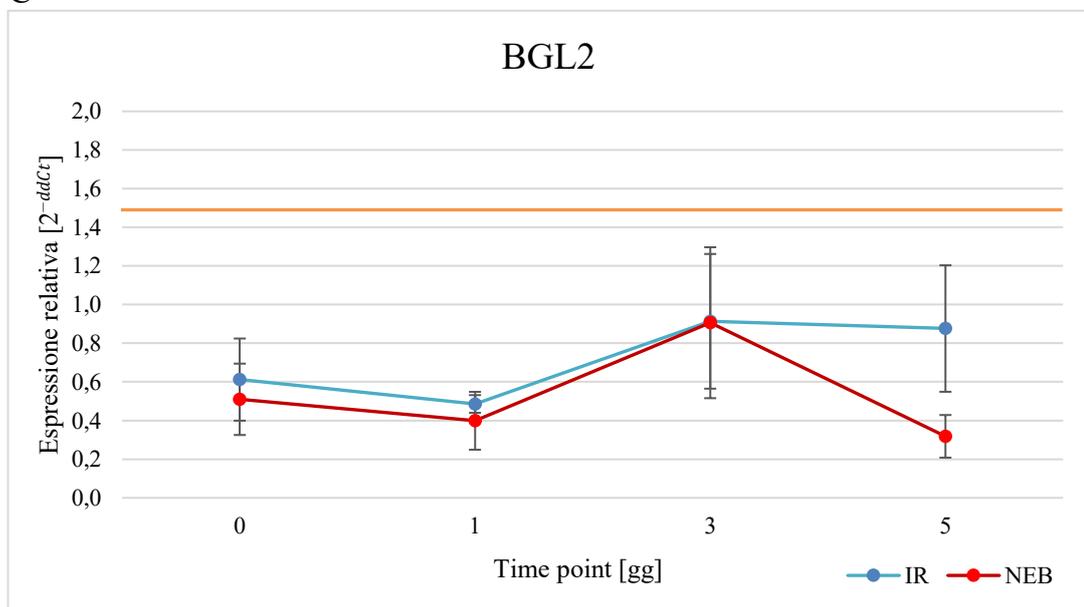
B**C**

Figura 20 Espressione genica relativa dei geni **A** PR1, **B** MYC2 e **C** BGL2 rispetto campione non trattato utilizzato come controllo negativo. Con la linea azzurra si fa riferimento ai campioni trattati per irrigazione, mentre con la linea rossa si indicano quelli trattati per nebulizzazione; inoltre, con una retta arancione viene indicato il limite minimo di significatività pari a 1,5. Sull'asse delle ordinate compare il valore del fold change espresso con 2^{-ddCt} , mentre sulle ascisse si riportano i tempi di analisi, ovvero 0, 1, 3, e 5 giorni post-trattamento.

L'oscillazione dell'espressione genica nei tre tempi di analisi risulta essere pressoché la stessa per entrambi i trattamenti. Inoltre, nel complesso, nessuno dei due trattamenti ha un effetto significativamente differente rispetto alle piante non trattate, come mostrano i valori di *fold change* che non superano il valore-soglia di 1,5 (retta arancione nel grafico) nella maggior parte dei casi. Questo avviene solo per un paio di tempi in tutti i grafici riportati che, però, non sono sufficienti per dimostrare che i trattamenti hanno un effetto sull'espressione dei geni presi in considerazione.

Diversi gruppi di scienziati, in merito all'attivazione delle vie di difesa, hanno definito H_2O_2 come una molecola segnale in grado di conferire tolleranza sotto diverse condizioni di stress biotico o abiotico (S. Neill, Desikan, and Hancock 2002; S. J. Neill et al. 2002; Orozco-Cárdenas, Narváez-Vásquez, and Ryan 2001). Le ROS che il cloroplasto produce in questi episodi potrebbero re-indirizzare gli elettroni dal macchinario fotosintetico in modo da evitare il sovraccarico dell'antenna e il conseguente danno. Karpinski et al. (1999) hanno riportato l'induzione del meccanismo di adattamento all'alta luce (High Light, HL) definendolo come adattamento acquisito sistemico (Systemic Acquired Acclimation, SAA); il meccanismo dipendeva dallo stato redox del plastoquinone (PQ) con produzione di H_2O_2 . Diversi ricercatori sono d'accordo circa il definire la difesa contro i patogeni sovrapposta alle risposte alle condizioni di alta luce (P. M. Mullineaux and Baker 2010; Straus et al. 2010), sebbene la SAA sia risultata essere indipendente dall'accumulo e dalla percezione sia del salicilato che del jasmonato (Rossel et al. 2007). In merito a questo, foglie di una pianta adattata a condizioni di HL mostrano una più alta tolleranza alle infezioni di patogeni, indicando una comunicazione tra i due processi (Griebel and Zeier 2008; Mühlenbock et al. 2008). Nel complesso, tutti i lavori qui riportati indicano una stretta relazione tra la produzione di ROS e tutto il meccanismo per la SAA in cui il cloroplasto svolge un ruolo centrale. La sua alta produzione di O_2^- in condizione di stress (descritta nel paragrafo "*Valutazione della crescita della radice e dell'ipocotile*") porta a morte cellulare programmata, a meno che la pianta in esame non venga incrociata con un'altra JA-deficiente (Ramel et al. 2013), indicando l'importanza di questo ormone nella cascata di segnale indotta da ROS. È risaputo, inoltre, che questo

effetto di induzione della morte cellulare è in contrasto con l'effetto protettivo che ha il JA prodotto dalle ROS apoplastiche (Blomster et al. 2011). Il JA, a questo punto, dovrebbe essere considerato come una molecola che trasporta segnali multipli a seconda delle circostanze, rispetto alla funzione tradizionale nelle vie di difesa in cui è principalmente coinvolto. Dall'altra parte, il salicilato (molecola centrale nella risposta di difesa SAR) sembrerebbe essere un promotore della morte cellulare; esperimenti con mutanti incapaci di produrlo, infatti, mostrano una riduzione della morte cellulare stress-indotta qualsiasi sia il compartimento d'origine del segnale ROS (apoplasto, cloroplasto o perossisoma) (Kangasjärvi, Jaspers, and Kollist 2005; Kaurilind, Xu, and Brosché 2015).

In definitiva, l'induzione del meccanismo SAA tramite *biopriming*, che permette alla pianta di contrastare e adattarsi a stress esogeni, comprende processi di detossificazione, osmoprotezione e omeostasi di proteine e ioni; questo fenomeno è accompagnato da miglioramenti nell'impatto degli stress sulla fisiologia e crescita della pianta, aumentando anche i parametri agronomici come la resa di un campo coltivato (Salethong et al. 2013).

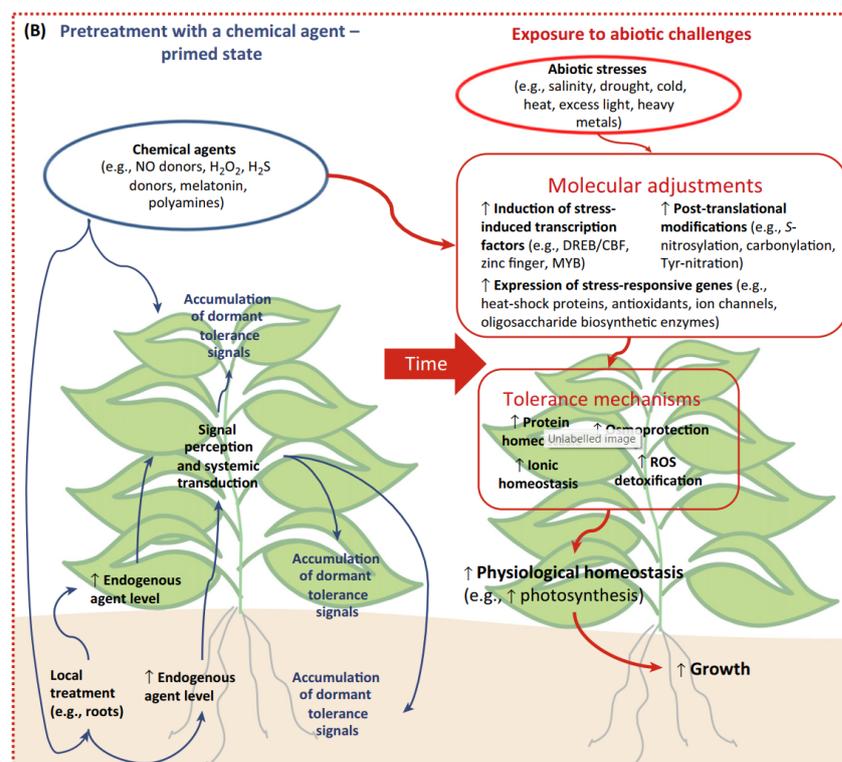


Figura 21 Esempio di pre-trattamento con induzione del biopriming e rappresentazione della risposta in caso di stress (Savvides et al. 2016)

I risultati di questo esperimento, considerati i presupposti sopra-descritti, sembrano indicare una debole attivazione della risposta di difesa, che andrebbe confermata con l'analisi dell'espressione di altri geni, in particolare coinvolti nella via dipendente dal jasmonato. Si può ipotizzare che le piante trapiantate ad ottobre 2020 e trattate in maniera regolare con acqua ozonizzata fossero meno responsive a tali trattamenti nel periodo di campionamento eseguito tra marzo e luglio 2021. Infatti, è lecito pensare che la ripetizione dei trattamenti abbia indotto un fenomeno di desensibilizzazione, processo riscontrato nelle piante per evitare un'attivazione continua dei meccanismi di difesa (Garcia-Brugger et al. 2006). Si potrebbe verificare tale ipotesi analizzando l'espressione dei geni di difesa dopo i primi trattamenti ricevuti dalle piante. In alternativa, si può ipotizzare che il trattamento con acqua ozonizzata abbia indotto un meccanismo di priming, che mette le piante in uno stato di allerta, attraverso modificazioni epigenetiche che consentono un'attivazione più veloce dei geni di difesa qualora la pianta venisse infettata da microrganismi (Beckers and Conrath 2007; Christou et al. 2014; Garcia-Brugger et al. 2006; Islam et al. 2009; Li et al. 2014). Si potrebbe verificare l'eventuale stato di priming delle piante trattate con acqua ozonizzata con esperimenti di infezione artificiale con patogeni noti della rucola, al fine di valutare se l'espressione dei geni di difesa viene anticipata e/o amplificata grazie al trattamento.

5. Conclusione

In questa tesi, sono stati studiati gli effetti dell'acqua ozonizzata su piante di *D.tenuifolia*, investigando i processi alla base di un loro maggiore sviluppo stimolati da questo trattamento. In particolare, è stato condotto uno studio sulla germinabilità dei semi in cui il trattamento con acqua ozonizzata portava la carica massima d'ozono; per la valutazione della lunghezza della radice e dell'ipocotile, invece, è stato usato un trattamento con alta carica d'ozono/ROS (O_3 , fino a 600 mV) e uno con una carica più bassa ($O_3\downarrow$, analogamente a quanto viene fatto con i trattamenti in campo). Infine, gli esperimenti e le misurazioni relativi alla parte in campo sono stati fatti su campioni trattati per irrigazione e per nebulizzazione. In quest'ultimo caso, lo studio è stato approfondito grazie all'analisi della parte del metaboloma mediamente polare e all'indagine sull'espressione di geni *marker* delle vie di difesa (presentati nel paragrafo "*Valutazione dell'espressione di geni chiave delle vie di difesa*" nei risultati).

Nel complesso, le sperimentazioni prettamente agronomiche e preliminari mostrano un'induzione della germinazione e della crescita durante lo stadio di ipocotile, ossia fino alla formazione della prima "vera foglia": il tasso di germinazione delle piante trattate era maggiore e, inoltre, superavano in altezza quelle non trattate. Il maggiore sviluppo delle piante trattate è confermato dallo studio della crescita radicale su piastra; in questa occasione, infatti, è stato registrato uno sviluppo maggiore dell'ipocotile delle piante trattate due volte con acqua ozonizzata $O_3\downarrow$ a distanza di 24 ore, al contrario dei campioni trattati con acqua ozonizzata O_3 e dei non trattati, nei quali la crescita è rimasta invariata. Le radici, d'altro canto, non hanno mostrato alcuna differenza significativa al variare del tipo e del numero dei trattamenti.

In un secondo momento, le piante di rucola cresciute in campo sono state prese in esame per le successive sperimentazioni e misurazioni, valutando, così, gli esiti dei trattamenti in condizioni di crescita ordinarie. Per cominciare, lo SPAD ha restituito valori significativi per i campioni trattati con acqua ozonizzata nebulizzata che, quindi, sembrerebbero avere foglie con un maggiore assorbimento della luce; a questo si affiancano i valori dell'acqua dello studio sul calo peso, i quali permettono di affermare che le piante NEB sono in grado di assorbire e trattenere più acqua

rispetto alle altre. Come ultima analisi, i campioni raccolti dal campo sono stati processati per condurre analisi di spettrometria di massa e *Real time RT-qPCR*, le quali, però, non hanno prodotto alcun risultato significativo.

Durante l'evoluzione degli organismi per l'adattamento alle condizioni di vita aerobiche, le ROS sembrano aver cambiato spesso le loro attività biologiche. La produzione continua di ROS, una conseguenza inevitabile dei processi metabolici aerobici (come la respirazione e la fotosintesi), ha reso necessaria l'evoluzione dei composti di degradazione delle ROS per minimizzare i loro effetti citotossici. Infine, la produzione controllata di H₂O₂ (e.g. da parte delle NADPH ossidasi) è apparentemente usata dalle piante per rilasciare un segnale intracellulare che controlla una varietà di processi (Fang-Qing, Mamoru, and M 2003; S. J. Neill et al. 2002). Le informazioni riguardo come queste molecole di segnalazione interagiscono e come vengono percepite sono ancora scarse. Le questioni chiave da affrontare in futuro riguardano il modo in cui le ROS prendono parte alla cascata di segnali in una cellula, come l'identità chimica ne influenza la segnalazione e quali sono i fattori che determinano la specificità delle loro risposte.

La valutazione delle vie di trasduzione del segnale indotte da stress è vitale per migliorare la tolleranza delle piante. Nonostante ci siano diversi laboratori al lavoro, ci sono poche informazioni sui componenti coinvolti nella percezione e segnalazione durante processi di risposta a stress; alcuni esempi di componenti potrebbero essere i fattori di trascrizione e le proteine chinasi, in particolare MAPKs, coinvolti nell'adattamento allo stress nelle piante. Parte di questi studi si concentra sulla risposta fotosintetica a diversi tipi di stress. Questo processo è piuttosto intricato perché comporta l'interazione di componenti in luoghi diversi della cellula o della foglia e in diverse fasi di crescita della pianta. È evidente che i fattori di stress a seconda della loro intensità e durata possono down- o up-regolare i geni coinvolti nella fotosintesi.

Relativamente a questo argomento, diversi studi si sono concentrati sull'espressione dei geni della fotosintesi noti per essere regolati da segnali redox del cloroplasto. Molti altri geni per la fotosintesi non potrebbero essere regolati da questi segnali; l'origine esatta di questa regolazione, però, è ancora sconosciuta.

Inoltre, i cloroplasti, all'interno di una cellula vegetale, rappresentano solo una fonte di segnali redox nella cellula: i mitocondri e i perossisomi sono altre potenti fonti di tali segnali (Corpas et al. 2001; Delledonne et al. 1998; Maxwell et al. 2002). Poiché questi tre compartimenti cellulari sono funzionalmente (e forse spazialmente) collegati (per esempio durante la fotorespirazione), non sarebbe sorprendente se tutti contribuissero a una rete intracellulare di segnali redox che rileva e comunica le attività relative dei tre organelli l'uno all'altro in varie situazioni metaboliche. La connessione tra fotosintesi e respirazione è ben nota (Padmasree et al. 2002; Pfannschmidt et al. 2001), ma le influenze reciproche sono ancora solo parzialmente comprese. Inoltre, è possibile che questi segnali si colleghino ad altre importanti vie di segnalazione al fine di comunicare lo stato di produzione di carboidrati, eventuali stress esogeni (e.g. generati dall'attacco di patogeni o dalle ferite) (P. Mullineaux et al. 2000; Oswald et al. 2001) o lo stato di assorbimento della luce tramite dei fotorecettori. Allo stato attuale delle nostre conoscenze, è probabile che i segnali redox giochino un ruolo importante nell'integrazione dei segnali intracellulari di luce ed energia nelle cellule delle piante; lavori futuri potrebbero mostrare se, e fino a che punto, questo è vero.

Il *biopriming*, inoltre, si è rilevato essere un importante meccanismo di resistenza indotta in pianta. Negli scorsi decenni, il *biopriming* è emerso come strategia promettente nella gestione delle malattie perché è in grado di proteggere da stress abiotici e patogeni senza intaccare la fisiologia e lo sviluppo (van Hulst et al. 2006). Nonostante la natura protettiva, questi composti, antimicrobici e induttori del *biopriming*, non hanno ancora ricevuto consensi tra gli agricoltori.

È stato proposto un meccanismo per cui le molecole segnale per il *biopriming* (e.g. H_2O_2) si accumulano e rimangono latenti fino a quando la pianta non riceve una pre-esposizione ad uno specifico stress biotico/abiotico; a questo punto, in caso di una successiva esposizione allo stress, la pianta potrebbe attivare delle risposte di difesa più veloci e forti rispetto alle piante non-pretrattate (Pastor et al. 2013). Recentemente, è stato proposto anche un meccanismo di modificazioni epigenetiche che sarebbe coinvolto in questo fenomeno di *biopriming* (Sani et al. 2013). Queste modificazioni potrebbero indurre una “memoria a lungo termine” e, potenzialmente, essere tramandate geneticamente attraverso modifiche degli istoni

(Pastor et al. 2013). Gli studi epigenetici, però, sono una nuova direzione di ricerca che potrebbe essere perseguita nei prossimi anni. In aggiunta a questi, sarebbero importanti studi di evoluzione dei processi metabolici nel corso del tempo in combinazione con analisi proteomiche, trascrittomiche e metabolomiche; tutto ciò al fine di mettere in luce il complesso macchinario per il *priming* e l'adattamento sistemico acquisito (SAA). Inoltre, il basso costo, la bassa concentrazione necessaria e il basso impatto ambientale indicano un rapporto costi/benefici estremamente basso.

Esistono ancora molti attori sconosciuti nella segnalazione delle ROS. Il vacuolo, per esempio, potrebbe avere un ruolo chiave di buffering/segnalazione nel metabolismo delle ROS. Inoltre, il movimento degli organelli e il citoscheletro potrebbero avere un ruolo centrale nella distribuzione dei segnali ROS. Potrebbero esistere meccanismi di produzione di ROS ancora sconosciuti all'interno delle cellule vegetali, così come nuovi antiossidanti. È probabile che l'aumento dello sforzo per sequenziare molti genomi di piante diverse, insieme a una ricerca più diretta sulla funzione dei geni e sul metabolismo delle ROS, svelerà molti di questi meccanismi. Poiché le ROS sono collegate a molte risposte sia biotiche che abiotiche, la decifrazione dei segnali attivati dalle ROS avrà probabilmente un impatto significativo sull'agricoltura e la biotecnologia in molti Paesi e potrebbe portare allo sviluppo di colture con una resa maggiore in condizioni non ottimali. Il futuro della ricerca sulle ROS è molto promettente!

6. Bibliografia

- Aggarwal, Bharat B., and Shishir Shishodia. 2006. "Molecular Targets of Dietary Agents for Prevention and Therapy of Cancer." *Biochemical Pharmacology* 71(10): 1397–1421.
- Al-Khatib, Kassim, and Gary M Paulsen. 1989. 90 Plant Physiol *Enhancement of Thermal Injury to Photosynthesis in Wheat Plants and Thylakoids by High Light Intensity*1.
- Anjum, Naser A. et al. 2016. "Catalase and Ascorbate Peroxidase—Representative H₂O₂-Detoxifying Heme Enzymes in Plants." *Environmental Science and Pollution Research* 23(19): 19002–29.
- Ashraf, M., and P. J.C. Harris. 2013. "Photosynthesis under Stressful Environments: An Overview." *Photosynthetica* 51(2): 163–90.
- Baggio, C., and F. Pimpini. 1995. *Preliminary Results of Agronomic Trials on Rocket Conducted by the ESAV (Agency for the Rural Development of the Veneto Region): Rocket Genetic Resources Network, Report of the First Meeting, 13-15 November 1994, Lisbon, Portugal*. Rome, Italy.
- Baxter-Burrell, Airica, Zhenbiao Yang, Patricia S Springer, and Julia Bailey-Serres. 2002. "RopGAP4-Dependent Rop GTPase Rheostat Control of *Arabidopsis* Oxygen Deprivation Tolerance." *Science* 296(5575): 2026–28.
- Beckers, Gerold J M, and Uwe Conrath. 2007. "Priming for Stress Resistance: From the Lab to the Field." *Current Opinion in Plant Biology* 10(4): 425–31.
- Bell, Luke et al. 2016. "Use of TD-GC-TOF-MS to Assess Volatile Composition during Post-Harvest Storage in Seven Accessions of Rocket Salad (*Eruca Sativa*)." *Food chemistry* 194: 626–36.
- Bell, Luke, and Carol Wagstaff. 2014. "Glucosinolates, Myrosinase Hydrolysis Products, and Flavonols Found in Rocket (*Eruca Sativa* and *Diplotaxis Tenuifolia*)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(20): 4481–92.
- Bell, Luke, and Carol Wagstaff. 2019. "Rocket Science: A Review of Phytochemical & Health-Related Research in *Eruca* & *Diplotaxis* Species." *Food Chemistry: X* 1.
- Bianco, V.V. 1995. *Rocket, an Ancient Vegetable Crop and Its Potential. Rocket Genetic Resources Network : Report of the First Meeting, 13-15 November 1994, Lisbon, Portugal*. Rome, Italy: IPGRI.
- Bianco, V.V., and F. Boari. 1997. "Up-to-Date Developments on Wild Rocket Cultivation." : 41–49.
- Bindschedler, Laurence v. et al. 2006. "Peroxidase-Dependent Apoplastic Oxidative Burst in *Arabidopsis* Required for Pathogen Resistance." *Plant Journal* 47(6): 851–63.

- Blažević, Ivica, and Josip Mastelić. 2008. "Free and Bound Volatiles of Rocket (*Eruca Sativa* Mill.)." *Flavour and Fragrance Journal* 23(4): 278–85.
- Blomster, Tiina et al. 2011. "Apoplastic Reactive Oxygen Species Transiently Decrease Auxin Signaling and Cause Stress-Induced Morphogenic Response in Arabidopsis." *Plant physiology* 157(4): 1866–83.
- Bowler, Chris, Marc van Montagu, and Dirk Inze. 1992. 43 Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bioi *SUPEROXIDE DISMUTASE AND STRESS TOLERANCE*.
- Campayo, Ana et al. 2020. "Novel Endotherapy-Based Applications of Ozonated Water to Bobal Grapevines: Effect on Grape Quality." *Agronomy* 10(9).
- Cavaiuolo, Marina et al. 2017. "Gene Expression Analysis of Rocket Salad under Pre-Harvest and Postharvest Stresses: A Transcriptomic Resource for *Diplotaxis Tenuifolia*." *PLoS ONE* 12(5).
- Caverzan, Andréia, Alice Casassola, and Sandra Patussi Brammer. 2016. "Antioxidant Responses of Wheat Plants under Stress." *Genetics and Molecular Biology* 39(1): 1–6.
- Christou, Anastasis, Panagiota Filippou, George A Manganaris, and Vasileios Fotopoulos. 2014. "Sodium Hydrosulfide Induces Systemic Thermotolerance to Strawberry Plants through Transcriptional Regulation of Heat Shock Proteins and Aquaporin." *BMC Plant Biology* 14(1): 42.
- Christou, Anastasis, George A Manganaris, Ioannis Papadopoulos, and Vasileios Fotopoulos. 2013. "Hydrogen Sulfide Induces Systemic Tolerance to Salinity and Non-Ionic Osmotic Stress in Strawberry Plants through Modification of Reactive Species Biosynthesis and Transcriptional Regulation of Multiple Defence Pathways." *Journal of Experimental Botany* 64(7): 1953–66.
- Corpas, Francisco J., Juan B. Barroso, and Luis A. del Rio. 2001. "Peroxisomes as A source of Reactiveoxygen Species Andnitric Oxide Signalmolecules in Plantcells." *Trend in Plant Science* 6(4): 145–50.
- Das, Kaushik, and Aryadeep Roychoudhury. 2014a. "Reactive Oxygen Species (ROS) and Response of Antioxidants as ROS-Scavengers during Environmental Stress in Plants." *Frontiers in Environmental Science* 2(DEC).
- Das, Kaushik, and Aryadeep Roychoudhury. 2014b. "Reactive Oxygen Species (ROS) and Response of Antioxidants as ROS-Scavengers during Environmental Stress in Plants." *Frontiers in Environmental Science* 2(DEC).
- Delledonne, Massimo, Yiji Xia, Richard A Dixon, and Chris Lamb. 1998. "Nitric Oxide Functions as a Signal in Plant Disease Resistance." *Nature* 394(6693): 585–88.

- Dumanović, Jelena et al. 2021. "The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview." *Frontiers in Plant Science* 11.
- Fang-Qing, Guo, Okamoto Mamoru, and Crawford Nigel M. 2003. "Identification of a Plant Nitric Oxide Synthase Gene Involved in Hormonal Signaling." *Science* 302(5642): 100–103.
- Farmer, Edward E, and Martin J Mueller. 2013. "ROS-Mediated Lipid Peroxidation and RES-Activated Signaling." *Annual Review of Plant Biology* 64(1): 429–50.
- Farooq, S, E S K Chian, and R S Engelbrecht. 1977. 49 Journal (Water Pollution Control Federation) *Basic Concepts in Disinfection with Ozone*.
- Filippou, Panagiota et al. 2016. "Kresoxim-Methyl Primes *Medicago truncatula* Plants against Abiotic Stress Factors via Altered Reactive Oxygen and Nitrogen Species Signalling Leading to Downstream Transcriptional and Metabolic Readjustment." *Journal of experimental botany* 67(5): 1259–74.
- Fischer, Beat B, Éva Hideg, and Anja Krieger-Liszkay. 2013. "Production, Detection, and Signaling of Singlet Oxygen in Photosynthetic Organisms." *Antioxidants & Redox Signaling* 18(16): 2145–62.
- Foegeding, P M. 1985. "Ozone Inactivation of *Bacillus* and *Clostridium* Spore Populations and the Importance of the Spore Coat to Resistance." *Food Microbiology* 2(2): 123–34.
- Foyer, Christine H., and Graham Noctor. 2011. "Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub." *Plant Physiology* 155(1): 2–18.
- Garcia-Brugger, Angela et al. 2006. 19 Leister and Katagiri *Early Signaling Events Induced by Elicitors of Plant Defenses*.
- Garcia-Mata, Carlos et al. 2010. "A Minimal Cysteine Motif Required to Activate the SKOR K⁺ Channel of *Arabidopsis* by the Reactive Oxygen Species H₂O₂." *Journal of Biological Chemistry* 285(38): 29286–94.
- Goh, Chang-Hyo et al. 2009. "Rice Phot1a Mutation Reduces Plant Growth by Affecting Photosynthetic Responses to Light during Early Seedling Growth." *Plant Molecular Biology* 69(5): 605–19.
- Grene, Ruth. 2002. "Oxidative Stress and Acclimation Mechanisms in Plants." *The Arabidopsis Book* 1: e0036.
- Griebel, Thomas, and Jürgen Zeier. 2008. "Light Regulation and Daytime Dependency of Inducible Plant Defenses in *Arabidopsis*: Phytochrome Signaling Controls Systemic Acquired Resistance Rather than Local Defense." *Plant Physiology* 147(2): 790–801.

- Guerin, B. 1963. "Inhibition and Destruction of the Microbial Cell."
- Gugel, R K, and K C Falk. 2006. *Can. J. Plant Sci Agronomic and Seed Quality Evaluation of Camelina Sativa in Western Canada.*
- Hasanuzzaman, Mirza, M. H.M.Borhannuddin Bhuyan, Faisal Zulfiqar, et al. 2020. "Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator." *Antioxidants* 9(8): 1–52.
- Hasanuzzaman, Mirza, M. H.M.Borhannuddin Bhuyan, Khursheda Parvin, et al. 2020. "Regulation of Ros Metabolism in Plants under Environmental Stress: A Review of Recent Experimental Evidence." *International Journal of Molecular Sciences* 21(22): 1–44.
- Havaux, Michel, and Florence Tardy. 1999. "Loss of Chlorophyll with Limited Reduction of Photosynthesis as an Adaptive Response of Syrian Barley Landraces to High-Light and Heat Stress." *Australian Journal of Plant Physiology* 26(6): 569–78.
- Hu, Xiaohui et al. 2012. "Effect of Exogenous Spermidine on Polyamine Content and Metabolism in Tomato Exposed to Salinity-Alkalinity Mixed Stress." *Plant Physiology and Biochemistry* 57: 200–209.
- van Hulten, Marieke et al. 2006. *Costs and Benefits of Priming for Defense in Arabidopsis.*
- Islam, Mohammad Muzahidul et al. 2009. "Exogenous Proline and Glycinebetaine Increase Antioxidant Enzyme Activities and Confer Tolerance to Cadmium Stress in Cultured Tobacco Cells." *Journal of Plant Physiology* 166(15): 1587–97.
- Jeong, Jaeho et al. 2011. "Novel Oxidative Modifications in Redox-Active Cysteine Residues* □ S."
- Jones, Jonathan D. G., and Jeffery L. Dangl. 2006. "The Plant Immune System." *Nature* 444: 323–29.
- Kangasjärvi, Jaakko, Pinja Jaspers, and Hannes Kollist. 2005. 28 *Plant, Cell and Environment Signalling and Cell Death in Ozone-Exposed Plants.*
- Karpinski, Stanislaw et al. 1999. "Systemic Signaling and Acclimation in Response to Excess Excitation Energy in *Arabidopsis*." *Science* 284(5414): 654–57.
- Kaurilind, Eve, Enjun Xu, and Mikael Brosché. 2015. "A Genetic Framework for H₂O₂ Induced Cell Death in *Arabidopsis Thaliana*." *BMC Genomics* 16(1).
- Khoobchandani, M et al. 2011. "Phytochemical Potential of *Eruca Sativa* for Inhibition of Melanoma Tumor Growth." *Fitoterapia* 82(4): 647–53.

- Kim, Jin-Gab, Ahmed E Yousef, and Sandhya Dave. 1999. 62 *Journal of Food Protection*
Application of Ozone for Enhancing the Microbiological Safety and Quality of Foods: A Review.
- Kobayashi, F. et al. 2011. "Disinfection Using Ozone Microbubbles to Inactivate *Fusarium Oxysporum* f. Sp. *Melonis* and *Pectobacterium Carotovorum* Subsp. *Carotovorum*." *Crop Protection* 30(11): 1514–18.
- Konica Minolta Sensing. 2009. *Chlorophyll Meter SPAD-502Plus - Manual.*
- Kordrostami, Mojtaba, Babak Rabiei, and Ali Akbar Ebadi. 2019. "Oxidative Stress in Plants." In *Handbook of Plant and Crop Stress, Fourth Edition*, CRC Press, 85–92.
- Kovalchuk, I, J Filkowski, K Smith, and O Kovalchuk. 2003. 26 *Plant, Cell and Environment* *Reactive Oxygen Species Stimulate Homologous Recombination in Plants.*
- Kreslavski, Vladimir D. et al. 2013. "Molecular Mechanisms of Stress Resistance of Photosynthetic Machinery." In *Molecular Stress Physiology of Plants*, Springer India, 21–51.
- Kurusu, Takamitsu, Kazuyuki Kuchitsu, and Yuichi Tada. 2015. "Plant Signaling Networks Involving Ca²⁺ and Rboh/Nox-Mediated ROS Production under Salinity Stress." *Frontiers in Plant Science* 6(June).
- Laloi, Christophe, Klaus Apel, and Antoine Danon. 2004. "Reactive Oxygen Signalling: The Latest News." *Current Opinion in Plant Biology* 7(3): 323–28.
- Laloi, Christophe, and Michel Havaux. 2015. "Key Players of Singlet Oxygen-Induced Cell Death in Plants." *Frontiers in Plant Science* 6.
- Li, Tingting et al. 2014. "Salicylic Acid Alleviates the Adverse Effects of Salt Stress in *Torreyia Grandis* Cv. *Merrillii* Seedlings by Activating Photosynthesis and Enhancing Antioxidant Systems." *PLOS ONE* 9(10): e109492-.
- Life Technologies Corporation. 2012. *TURBO™ DNase - Procedural Guidelines.*
[www.lifetechnologies.com/termsandconditions.](http://www.lifetechnologies.com/termsandconditions)
- Martínez-Sánchez, Ascensión et al. 2006. "Controlled Atmosphere Preserves Quality and Phytonutrients in Wild Rocket (*Diplotaxis Tenuifolia*)." *Postharvest Biology and Technology* 40(1): 26–33.
- Maxwell, D.P., R. Nickels, and L. McIntos. 2002. "Evidence of Mitochondrial Involvement in the Transduction of Signals Required for the Induction of Genes Associated with Pathogen Attack and Senescence." *Plant Journal* 29(3): 269–79.

- Mhamdi, Amna et al. 2010. "Catalase Function in Plants: A Focus on Arabidopsis Mutants as Stress-Mimic Models." *Journal of Experimental Botany* 61(15): 4197–4220.
- Miller, Gad et al. 2009. "The Plant NADPH Oxidase RBOHD Mediates Rapid Systemic Signaling in Response to Diverse Stimuli." *Plant Biology* 2(84 ra45).
- Mishra, Ranjit K, and Gauri S Singhal. 1992. 98 Plant Physiol *Function of Photosynthetic Apparatus of Intact Wheat Leaves under High Light and Heat Stress and Its Relationship with Peroxidation of Thylakoid Lipids*1.
- Mittler, Ron et al. 2011. "ROS Signaling: The New Wave?" *Trends in Plant Science* 16(6): 300–309.
- Møller, Ian M., and Lee J. Sweetlove. 2010. "ROS Signalling - Specificity Is Required." *Trends in Plant Science* 15(7): 370–74.
- Montillet, Jean Luc et al. 2004. "The Upstream Oxylipin Profile of Arabidopsis Thaliana: A Tool to Scan for Oxidative Stresses." *Plant Journal* 40(3): 439–51.
- Moon, Haejeong et al. 2003. "NDP Kinase 2 Interacts with Two Oxidative Stress-Activated MAPKs to Regulate Cellular Redox State and Enhances Multiple Stress Tolerance in Transgenic Plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(1): 358–63.
- Mori, Izumi C., and Julian I. Schroeder. 2004. "Reactive Oxygen Species Activation of Plant Ca²⁺ Channels. A Signaling Mechanism in Polar Growth, Hormone Transduction, Stress Signaling, and Hypothetically Mechanotransduction." *Plant Physiology* 135(2): 702–8.
- Mou, Zhonglin, Weihua Fan, and Xinnian Dong. 2003. *Inducers of Plant Systemic Acquired Resistance Regulate NPR1 Function through Redox Changes*. Durham, North Carolina.
- Mühlenbock, Per et al. 2008. "Chloroplast Signaling and LESION SIMULATING DISEASE1 Regulate Crosstalk between Light Acclimation and Immunity in Arabidopsis." *The Plant cell* 20(9): 2339–56.
- Müller-Moulé, Patricia, Patricia L Conklin, and Krishna K Niyogi. 2002. "Ascorbate Deficiency Can Limit Violaxanthin De-Epoxidase Activity in Vivo." *Plant physiology* 128(3): 970–77.
- Mullineaux, P. et al. 2000. "Are Diverse Signalling Pathways Integrated in the Regulation of Arabidopsis Antioxidant Defence Gene Expression in Response to Excess Excitation Energy?" In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Royal Society, 1531–40.

- Mullineaux, Philip M., and Neil R. Baker. 2010. "Oxidative Stress: Antagonistic Signaling for Acclimation or Cell Death?" *Plant Physiology* 154(2): 521–25.
- Najarian, Mahboubeh, Ahmad Mohammadi-Ghehsareh, Jaber Fallahzade, and Elaheh Peykanpour. 2018. "Responses of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) to Ozonated Water under Varying Drought Stress Intensities." *Journal of Plant Nutrition* 41(1): 1–9.
- Neill, Steven, Radhika Desikan, and John Hancock. 2002. *Hydrogen Peroxide Signalling*.
- Neill, Steven J et al. 2002. "Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide as Signalling Molecules in Plants." *Journal of Experimental Botany* 53(372): 1237–47.
- Ochsenbein, Christian et al. 2006. "The Role of EDS1 (Enhanced Disease Susceptibility) during Singlet Oxygen-Mediated Stress Responses of Arabidopsis." *The Plant Journal* 47(3): 445–56.
- Ooi, Hong-Kean, Ching-Lung Lin, and Jiunn-Shiow Wang. 1998. 60 *J. Vet. Med. Sci Effect of Ozone Treatment on Toxocara Canis Eggs*.
- op den Camp, Roel G L et al. 2003. "Rapid Induction of Distinct Stress Responses after the Release of Singlet Oxygen in Arabidopsis." *The Plant cell* 15(10): 2320–32.
- Orozco-Cárdenas, Martha L, Javier Narváez-Vásquez, and Clarence A Ryan. 2001. 13 *The Plant Cell Hydrogen Peroxide Acts as a Second Messenger for the Induction of Defense Genes in Tomato Plants in Response to Wounding, Systemin, and Methyl Jasmonate*.
- Oswald, Oliver, Thomas Martin, Peter J. Dominy, and Ian A. Graham. 2001. "Plastid Redox State and Sugars: Interactive Regulators of Nuclear-Encoded Photosynthetic Gene Expression." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(4): 2047–52.
- Padmanabhan, Meenu S., and S. P. Dinesh-Kumar. 2010. "All Hands on Deck - The Role of Chloroplasts, Endoplasmic Reticulum, and the Nucleus in Driving Plant Innate Immunity." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23(11): 1368–80.
- Padmasree, K, L Padmavathi, and A S Raghavendra. 2002. "Essentiality of Mitochondrial Oxidative Metabolism for Photosynthesis: Optimization of Carbon Assimilation and Protection Against Photoinhibition." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 37(2): 71–119.
- Padulosi, S., and D. Pignone. 1997. *Rocket : A Mediterranean Crop for the World*. 2nd ed. eds. S. Padulosi and D. Pignone. Legnaro, Padova, Italy.
- Pastor, V et al. 2013. "Primed Plants Do Not Forget." *Environmental and Experimental Botany* 94: 46–56.

- Pfannschmidt, Thomas. 2003. "Chloroplast Redox Signals: How Photosynthesis Controls Its Own Genes." *Trends in Plant Science* 8(1): 33–41.
- Pfannschmidt, Thomas, John F Allen, and Ralf Oelmüller. 2001. "Principles of Redox Control in Photosynthesis Gene Expression." *Physiologia Plantarum* 112(1): 1–9.
- Pospíšil, Pavel. 2009. "Production of Reactive Oxygen Species by Photosystem II." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1787(10): 1151–60.
- Ramel, Fanny et al. 2013. "Light-Induced Acclimation of the Arabidopsis Chlorina1 Mutant to Singlet Oxygen ." *The Plant Cell* 25(4): 1445–62.
- Roden, Laura C., and Robert A. Ingle. 2009. "Lights, Rhythms, Infection: The Role of Light and the Circadian Clock in Determining the Outcome of Plant-Pathogen Interactions." *Plant Cell* 21(9): 2546–52.
- Rossel, Jan Bart et al. 2007. "Systemic and Intracellular Responses to Photooxidative Stress in Arabidopsis." *Plant Cell* 19(12): 4091–4110.
- Sabater, Bartolomé, and Mercedes Martín. 2013. "Hypothesis: Increase of the Ratio Singlet Oxygen plus Superoxide Radical to Hydrogen Peroxide Changes Stress Defense Response to Programmed Leaf Death." *Frontiers in Plant Science* 4(NOV).
- Saleethong, Paweena, Jirawat Sanitchon, Kanlaya Kong-Ngern, and Piyada Theerakulpisut. 2013. 7 *AJCS Effects of Exogenous Spermidine (Spd) on Yield, Yield-Related Parameters and Mineral Composition of Rice (Oryza Sativa L. Ssp. Indica) Grains under Salt Stress*.
- Sani, Emanuela et al. 2013. "Hyperosmotic Priming of Arabidopsis Seedlings Establishes a Long-Term Somatic Memory Accompanied by Specific Changes of the Epigenome." *Genome biology* 14(6): R59–R59.
- Savvides, Andreas, Shawkat Ali, Mark Tester, and Vasileios Fotopoulos. 2016. "Chemical Priming of Plants Against Multiple Abiotic Stresses: Mission Possible?" *Trends in Plant Science* 21(4): 329–40.
- Schmidt, Renate, and Ian Bancroft. 2011. 9 *Genetics and Genomics of the Brassicaceae Genetics and Genomics of the Brassicaceae*. Springer New York.
- Shi, Jie et al. 2010. "Spermine Pretreatment Confers Dehydration Tolerance of Citrus in Vitro Plants via Modulation of Antioxidative Capacity and Stomatal Response." *Tree Physiology* 30(7): 914–22. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq030>.
- Sloan, John J., and M.C. Engelke. 2005. *Effect of Ozonated Water on Creeping Bentgrass Growth in a Sand Medium*.
- Sofo, Adriano, Antonio Scopa, Maria Nuzzaci, and Antonella Vitti. 2015. "Ascorbate Peroxidase and Catalase Activities and Their Genetic Regulation in Plants Subjected

- to Drought and Salinity Stresses." *International Journal of Molecular Sciences* 16(6): 13561–78.
- Soto, Gabriela et al. 2012. "New Insight into the Evolution of Aquaporins from Flowering Plants and Vertebrates: Orthologous Identification and Functional Transfer Is Possible." *Gene* 503(1): 165–76.
- Souza, Lauana Pellanda de et al. 2018. "Ozone Treatment for Pesticide Removal from Carrots: Optimization by Response Surface Methodology." *Food Chemistry* 243: 435–41.
- Spadafore, N. et al. 2016. "Multi-Trait Analysis of Post-Harvest Storage in Rocket Salad (*Diplotaxis tenuifolia*) Links Sensorial, Volatile and Nutritional Data." *Food Chemistry*.
- Straus, Marco R. et al. 2010. "Salicylic Acid Antagonism of EDS1-Driven Cell Death Is Important for Immune and Oxidative Stress Responses in Arabidopsis." *Plant Journal* 62(4): 628–40.
- Suzuki, Nobuhiro et al. 2011. "Respiratory Burst Oxidases: The Engines of ROS Signaling." *Current Opinion in Plant Biology* 14(6): 691–99.
- ThermoFisher Scientific. 2004. *SuperScript™ III Reverse Transcriptase - Procedural Guidelines*. www.invitrogen.com/oligos.
- ThermoFisher Scientific. 2020. *TRIZOL™ Reagent - Procedural Guidelines*. <https://www.thermofisher.com/trizolfaqs>.
- Tian, Rongrong, Tianhong Zhao, Hongyan Wu, and Lin Mu. 2018. *Effects of Spraying Ozone Water on Resistance Physiology and Yield of Vegetables*.
- Tlačka, Monika, Mårten Runquist, and Mark Fricker. 1999. "Light Perception and the Role of the Xanthophyll Cycle in Blue-Light-Dependent Chloroplast Movements in *Lemna Trisulca* L." *The Plant Journal* 20(4): 447–59.
- Torres, Miguel Angel et al. 2013. "Functional Interplay between Arabidopsis NADPH Oxidases and Heterotrimeric G Protein." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26(6): 686–94.
- Tsai, Yu Chang, Chwan Yang Hong, Li Fei Liu, and Ching Huei Kao. 2005. "Expression of Ascorbate Peroxidase and Glutathione Reductase in Roots of Rice Seedlings in Response to NaCl and H₂O₂." *Journal of Plant Physiology* 162(3): 291–99.
- Vahisalu, Triin et al. 2010. "Ozone-Triggered Rapid Stomatal Response Involves the Production of Reactive Oxygen Species and Is Controlled by SLAC1 and OST1." *The Plant Journal* 62(3): 442–53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2010.04159.x>.

- Vainonen, Julia P., and Jaakko Kangasjärvi. 2015. "Plant Signalling in Acute Ozone Exposure." *Plant Cell and Environment* 38(2): 240–52.
- Wahid, Abdul, Mubarak Perveen, Sadia Gelani, and Shahzad M A Basra. 2007. "Pretreatment of Seed with H₂O₂ Improves Salt Tolerance of Wheat Seedlings by Alleviation of Oxidative Damage and Expression of Stress Proteins." *Journal of Plant Physiology* 164(3): 283–94.
- Warwick, S. I., A. Francis, and I. A. Al-Shehbaz. 2006. "Brassicaceae: Species Checklist and Database on CD-Rom." In *Plant Systematics and Evolution*, , 249–58.
- Warwick, Suzanne I, and Richard K Gugel. 2003. 50 Genetic Resources and Crop Evolution *Genetic Variation in the Crambe Abyssinica-C. Hispanica-C. Glabrata Complex*.
- Wei, Wei et al. 2015. "Melatonin Enhances Plant Growth and Abiotic Stress Tolerance in Soybean Plants." *Journal of experimental botany* 66(3): 695–707.
- Winkler, Sonja et al. 2007. "Glucoraphanin and Flavonoid Levels Remain Stable during Simulated Transport and Marketing of Broccoli (*Brassica Oleracea* Var. *Italica*) Heads." *Postharvest Biology and Technology* 43(1): 89–94.
- Yu, Yanwen et al. 2019. "Ascorbic Acid Integrates the Antagonistic Modulation of Ethylene and Abscisic Acid in the Accumulation of Reactive Oxygen Species." *Plant Physiology* 179(4): 1861–75.
- Zheng, Chunfang et al. 2009. "Exogenous Nitric Oxide Improves Seed Germination in Wheat against Mitochondrial Oxidative Damage Induced by High Salinity." *Environmental and Experimental Botany* 67(1): 222–27.
- Zhu, Fan. 2018. "Effect of Ozone Treatment on the Quality of Grain Products." *Food Chemistry* 264: 358–66.
- Zurbriggen, Matia D., Nestor Carrillo, and Mohammad-Reza Hajirezaei. 2010. "ROS Signaling in the Hypersensitive Response." *Plant Signaling & Behavior* 5(4): 393–96.
- Zurbriggen, Matias D. et al. 2009. "Chloroplast-Generated Reactive Oxygen Species Play a Major Role in Localized Cell Death during the Non-Host Interaction between Tobacco and *Xanthomonas Campestris* Pv. *Vesicatoria*." *Plant Journal* 60(6): 962–73.