



Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Scienze Fisiche e Naturali
125° (2007), Vol. XXXI, P. II, t. I, pp. 157-167

MAURIZIO BADIANI* – GIOVANNI GIOVANNOZZI SERMANI**

La biochimica agraria per la comprensione delle basi molecolari della resistenza agli stress nelle piante coltivate

Riassunto – La biochimica agraria si propone di studiare, anche ai fini pratici, le multiformi, complesse e flessibili interazioni molecolari tra gli organismi vegetali di interesse agrario ed agroindustriale e l'ambiente di coltivazione. Vengono qui brevemente illustrate le principali attività di ricerca condotte nell'arco di circa un ventennio presso il Laboratorio di Biochimica Agraria dell'Università della Tuscia di Viterbo. Il loro comune denominatore è stato il tentativo costante di superare le tradizionali separazioni tra culture ed approcci diversi, in modo tale che, per ciascun tema di ricerca affrontato, le conoscenze di chimica vegetale, chimica del suolo ed agronomia, da un lato, ed i metodi della biochimica, dell'enzimologia e della biologia molecolare, dall'altro, si potessero utilmente integrare e reciprocamente valorizzare.

Abstract – Agricultural biochemistry aims at studying, also for practical purposes, the multiform, complex and flexible molecular interactions among agricultural plants and their growth environment. Two decades of research activities carried out at the Agricultural Biochemistry Laboratory, University of Tuscia, Viterbo, Italy, are briefly described here. In principle, they all aimed at overcoming the traditional separation among individual disciplines, by promoting, for each research issue, the confluence of different backgrounds and approaches, namely plant chemistry, soil chemistry and agronomy, on one side, and plant biochemistry, enzymology and molecular biology, on the other side. This allowed different view points and perspectives to reciprocally take advantage from each other.

Parole chiave: Polifenolossidasi; bioconversione; residui lignocellulosici; specie reattive dell'ossigeno; antiossidanti; stress ambientale.

* Dipartimento per il Biomonitoraggio Agroalimentare ed Ambientale, Università Mediterranea di Reggio Calabria, Facoltà di Agraria, 89129 Reggio Calabria. E-mail: mbadiani@unirc.it

** Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica, Università della Tuscia, Via S. Camillo De Lellis, 01100 Viterbo.

Introduzione.

Essendo organismi complessi ma privi della possibilità di allontanarsi dal proprio spazio vitale per procacciarsi il nutrimento, o sfuggire alle condizioni avverse, le piante sono strumenti straordinari per capire come i viventi integrano gli stimoli endogeni ed ambientali al fine di produrre risposte coerenti ed efficaci

Le manifestazioni macroscopiche della pianta, come il progredire del ciclo biologico (germinazione, crescita vegetativa, riproduzione, senescenza e morte), l'esplorazione del suolo da parte della radice, l'evoluzione di una fitopatia, sono indubbiamente la risultante dell'interazione tra un programma di sviluppo scritto *ab initio* nel genoma, e le imprevedibili (per numero, origine ed intensità) azioni esercitate sulla pianta dall'ambiente in cui essa vive. Primariamente, ed eminentemente, queste interazioni sono di natura molecolare e biochimica.

Il termine «biochimica agraria», come «costola» della chimica agraria che si propone di studiare, anche ai fini pratici, le multiformi, complesse e flessibili interazioni molecolari tra pianta ed ambiente agrario, è stato proposto per la prima volta, non senza colpo ferire negli ambienti più tradizionalisti della scienza madre, circa trenta anni or sono. Quello che segue è un breve e necessariamente schematico resoconto del lavoro svolto, nell'arco di circa un ventennio, presso il Laboratorio di Biochimica Agraria dell'Università della Tuscia di Viterbo, dove un gruppo di studiosi si sono adoperati con entusiasmo e convinzione affinché, nel tempo, gli specifici temi e metodologie della «nuova scienza», all'interfaccia tra chimica del suolo, fisiologia vegetale ed agronomia, acquisissero ragion d'essere e collocazione stabile nella ricerca e nella didattica in facoltà di agraria.

1. *Polifenolossidasi e biotrasformazione di fitomasse residue da colture di interesse agroforestale.*

Questa linea di ricerca è stata sviluppata essenzialmente attraverso la caratterizzazione chimico-fisica di fenolossidasi fungine (laccasi) [1], lo studio della regolazione dell'attività enzimatica *in vivo* ed *in vitro* da parte di sostanze fenoliche strutturali del polimero della lignina [2-4] e l'indagine sulle possibili applicazioni derivanti dall'impiego dei suddetti enzimi nei settori della fungicoltura [5], dell'alimentazione zootecnica [6], della detossificazione di residui di pesticidi di tipo fenolico nei suoli e nelle acque [7] e della produzione di sostanze chimiche utili derivanti dalla biotrasformazione di residui di coltivazione.

È stato messo in evidenza che alcuni effettori fenolici delle laccasi fungine, coinvolte nella demolizione biologica del polimero della lignina, possono svolgere un ruolo importante nei processi biochimici che regolano il compostaggio dei residui di coltivazione impiegati in fungicoltura. I miceli fungini ad elevata produzione di laccasi, inoltre, mediante attiva colonizzazione di substrati di scarso valore nutrizionale intrinseco, possono accrescere notevolmente il contenuto e la qualità pro-

teica della biomassa, rendendola potenzialmente adatta all'alimentazione zootecnica anche attraverso il miglioramento di digeribilità ed appetibilità.

Le laccasi fungine, d'altra parte, essendo fortemente aspecifiche rispetto al substrato donatore di elettroni ed utilizzando perciò come tale una ampia gamma di strutture aromatiche ed eteroatomiche, possono presentare interessanti possibilità applicative per la detossificazione di residui di pesticidi di tipo fenolico nei suoli e nelle acque.

In giovani piante di frumento tenero (*Triticum aestivum* L.) e di mais (*Zea mays* L.), inoltre, alcuni derivati dell'acido cinnamico coinvolti nel metabolismo della lignina appaiono essere attivamente assorbiti per via radicale, prontamente traslocati nelle foglie ed ivi rapidamente metabolizzati, il che sembrerebbe suggerire per queste sostanze fenoliche un ruolo metabolico più ampio e differenziato rispetto a quello noto di monomeri costitutivi del complesso molecolare della lignina [8].

Sono state infine valutate le proprietà fisico-meccaniche ed ottiche delle carte ottenute dal pulping meccanico, tal quale od in combinazione con un pre-trattamento enzimatico, di materiale lignocellulosico ottenuto da pioppi transgenici nei quali era stata indotta sottoespressione dei geni codificanti per la cinnamoil-alcol deidrogenasi o della acido-caffeico-*O*-metil trasferasi, enzimi entrambi coinvolti nella biosintesi del polimero della lignina. I prodotti cartari ottenuti esibivano proprietà fisico-meccaniche lievemente migliori rispetto a quelli ottenuti da pioppi non trasformati, sebbene le proprietà ottiche risultassero più scadenti. Peraltro, la quantità di energia necessaria per la produzione di paste cartarie risultava notevolmente minore nel caso di materiale lignocellulosico derivante da pioppi transgenici con alterata biosintesi della lignina [9].

2. *Stress idrico-osmotico, induzione di tossicità da ossigeno attivato e ruolo dei sistemi antiossidanti cellulari in piante di interesse agrario.*

Questa linea di ricerca permetteva di mettere in evidenza, già più di due decenni or sono, che alcuni degli effetti fisiometabolici dello stress idrico-osmotico sui tessuti vegetali sono probabilmente dovuti ad alterazioni dell'equilibrio cellulare che governa produzione e rimozione di specie reattive dell'ossigeno molecolare (ROS). Nei tessuti fogliari di sei specie diverse, alcune delle quali native di zone aride, infatti, un abbassamento anche lieve del potenziale osmotico induceva un rapido aumento nei livelli di attività di enzimi antiossidanti, quali superossido dismutasi (SOD), perossidasi (POX) e catalasi (CAT). Per alcune specie era osservabile anche un effetto sul polimorfismo isoenzimatico di POX e CAT, nonché una relazione tra livelli costitutivi di SOD e adattabilità complessiva ad ambienti aridi [10].

Questi studi, rivelando le attitudini ossidative dello stress idrico-osmotico a carico dei tessuti vegetali, lasciavano intuire già all'epoca l'esistenza di un denominatore metabolico comune ad un'ampia gamma di avversità ambientali di differente origine, sia biotica che abiotica (oltre allo stress idrico, eccessi termici, congela-

mento, presenza di inquinanti atmosferici, danno meccanico, infezioni da virus e crittogame), suggerendo nel contempo implicazioni di natura applicativa per quanto riguarda, ad esempio, la diagnosi biochimica precoce di stati di stress, lo screening biochimico di materiale vegetale resistente o adattabile ed il trasferimento di tratti biochimici utili al conferimento di resistenza crociata o multipla in specie/varietà di interesse agrario [11].

Nel corso degli studi sul polimorfismo isoenzimatico della POX da semenzali di frumento tenero, si osservava che queste isoforme sembrano in grado di ossidare substrati di tipo fenolico anche in assenza di perossido d'idrogeno, comportandosi quindi come fenolossidasi. [4, 12, 13]. Di queste isoforme bifunzionali è stata successivamente dimostrata la localizzazione prevalentemente apoplastica, il che consente di ipotizzarne il coinvolgimento in numerosi processi fisiologici [14].

3. *Variazioni cicliche di antiossidanti in specie di interesse agrario.*

È oramai accertato che gli antiossidanti contenuti nei tessuti vegetali sono coinvolti nella risposta ad una grande varietà di situazioni avverse, di origine sia biotica che abiotica. Solo molto recentemente l'attenzione è stata rivolta al coinvolgimento delle ROS nel normale metabolismo (segnalazione e comunicazione intercellulare). In una serie di studi condotti su fagiolo (*Phaseolus vulgaris* L.) e su frumento tenero, si riusciva a dimostrare che i livelli fogliari dei principali metaboliti ed enzimi antiossidanti mostrano ampie variazioni cicliche sia durante il fotoperiodo giornaliero [15] che durante l'intera stagione di crescita [16]. Le fluttuazioni di periodicità giornaliera potrebbero essere associate alla produzione intermittente di ROS, stimolata dalla naturale ciclicità diurna dei principali fattori climatici, quali radiazione luminosa e temperatura, capaci di promuovere episodi transienti di stress ossidativo. A riprova di ciò, le predette variazioni giornaliere risultavano qualitativamente e quantitativamente alterate dalla presenza di fattori ambientali ad attitudine ossidativa conclamata, quali l'ozono [17], ma anche dalla presenza di elevati livelli di CO₂ [18; vedi oltre, punto 5].

4. *Effetti degli inquinanti fotochimici sulla biologia delle piante agrarie.*

Nell'ambito di questa attività pluriennale, condotta in collaborazione con il Servizio Ambiente dell'Ente Nazionale per l'Energia Elettrica, è stato progettato, realizzato ed utilizzato a fini sperimentali, presso l'Azienda Agraria Didattico-Sperimentale dell'Università della Tuscia, un impianto di serre sperimentali a cielo aperto (*open-top chambers*, OTC) per lo studio degli effetti dell'inquinamento da ozono sulla biologia e produttività di piante agrarie erbacee ed arboree allevate in pieno campo. Per lungo tempo questo è stato l'unico impianto di OTC in Italia e, per quanto consta, nell'intero settore meridionale della UE, con il quale sia stato possibile praticare la somministrazione attiva di ozono, cioè la modulazione *ad libi-*

tum della dose di inquinante ricevuta dal materiale vegetale sperimentale. Tra le rilevanti potenzialità sperimentali consentite da tale approccio, si sottolinea la possibilità di simulare contemporaneamente diversi scenari realistici di inquinamento, il che ha consentito di predire gli effetti derivanti da variazioni di medio-lungo periodo nei livelli di inquinamento. Inoltre, diveniva possibile ottenere curve dose-risposta in grado di predire quale sia il livello massimo di inquinante che una data specie agraria può sopportare senza che si manifesti danno biologico-produttivo (determinazione del cosiddetto livello critico di ozono). Le specie agrarie considerate sono state sia di tipo erbaceo, quali orzo (*Hordeum vulgare* L.), frumento duro [*Triticum turgidum* (Desf.) ssp. durum] e peperone (*Capsicum annuum* L.), che arboreo, quali pesco [*Prunus persica* (L.) Batsch] ed olivo (*Olea europaea* L.).

In estrema sintesi, dagli studi condotti è emerso che dosi realistiche di ozono, di poco superiori a quelle comunemente osservabili anche presso siti rurali remoti da aree di forte emissione di inquinanti primari, semplicemente esasperano effetti potenzialmente indesiderabili o addirittura fitotossici già presenti in materiale vegetale allevato in piena aria. Ciò da un lato prova che gli effetti sono dovuti all'ozono e dall'altro implica che i livelli normalmente presenti durante la stagione estiva presso siti rurali possono interferire con i processi vegetativi e riproduttivi delle colture [19, 20]. Un ulteriore aspetto di rilevanza generale, soprattutto per l'area Mediterranea, è stata l'individuazione degli specifici «carichi critici» di inquinante che possono essere sopportati dal materiale vegetale senza che si manifestino effetti avversi, il che consente da un lato di predire l'impatto potenziale dell'inquinamento fotochimico sulle colture agrarie e dall'altro è utile nella definizione di strategie di abbattimento delle emissioni di inquinanti primari [21].

Nell'ambito del Reg. 2081/93 DOCUP Ob. 5/b dell'Unione Europea, «Sviluppo Rurale nella Regione Lazio», ed in collaborazione con l'Amministrazione Provinciale, è stata realizzata e gestita una rete di monitoraggio biologico dell'inquinamento da ozono a mezzo di piante indicatrici (cultivar di tabacco Bel-W3) in aree rurali della Provincia di Viterbo [22]

5. Aumento della CO₂ e stato antiossidante fogliare.

L'aumento tendenziale della CO₂, avvantaggiando l'attività carbossilica su quella ossigenasica della carbossilasi primaria RubisCO, e quindi riducendo la fotorespirazione, potrebbe attenuare sia il rischio imminente di diversione del flusso elettronico fotosintetico verso la produzione di ROS, sia ridurre la formazione di perossido d'idrogeno di origine fotorespiratoria. Ambedue questi effetti, deprimendo la formazione totale di ROS, potrebbero rendere ridondante il normale livello di difesa antiossidante nella foglia. Tale eventualità, pur se vantaggiosa in termini energetici, potrebbe nel contempo indurre nei tessuti vegetali sviluppati in alta CO₂ una minore reattività e tolleranza nei confronti dello stress ossidativo causato da agenti biotici o abiotici.

I risultati ottenuti dalla partecipazione alla campagna 1993/1994 dell'esperimento «*Free-Air CO₂ Enrichment*», presso lo U.S. Water Conservation Laboratory, Phoenix, Arizona, USA, indicavano che lo stato antiossidante della foglia di frumento è una condizione altamente dinamica sia durante lo sviluppo della pianta che durante il fotoperiodo giornaliero (vedi sopra, punto 3). Il fatto che i livelli di alcuni antiossidanti fogliari fossero depressi nelle piante allevate in alta CO₂ supportava, anche se in modo indiretto, l'ipotesi di partenza (vedi sopra). [18, 23].

Nell'ambito di un progetto di ricerca sull'adattamento microevolutivo delle piante alla condizione di elevata CO₂ (MAPLE), patrocinato dalla Unione Europea e condotto da scienziati di cinque diversi Paesi, è stato studiato il metabolismo antiossidante di specie vegetali sia agrarie [soia (*Glycine max* Merrill cv. Cresir) e frumento tenero (cv. Mercia)] che non (*Agrostis* spp., *Phragmites* spp. e *Quercus* spp.), allevate presso siti naturali di origine geotermica le cui emissioni gassose sono costituite per più del 99% da CO₂.

È stato evidenziato che, in un intervallo di regimi di esposizione comprendente anche scenari di lungo termine, l'alta CO₂ potrebbe ridurre il rischio imminente di tossicità da ROS a carico del cloroplasto. Tuttavia, è stato messo in evidenza che un incremento significativo del livello di glutazione disolfuro, e la conseguente riduzione del rapporto glutazione/ glutazione disolfuro, così come un'accresciuta attività fogliare dell'ascorbico perossidasi, erano quasi invariabilmente associate alla crescita delle piante in condizioni di elevata CO₂, suggerendo, in modo alquanto inatteso, che in tali condizioni si abbia un aumentato consumo di antiossidanti non enzimatici ed una più elevata necessità di smaltimento di perossido d'idrogeno [24-27].

6. *Temperature non ottimali, capacità fotosintetica e stato antiossidante in specie agrarie di tipo C3 e C4.*

Nell'ambito di Progetti Finalizzati del Consiglio Nazionale delle Ricerche, sono stati studiati gli effetti subsintomatici di temperature di allevamento non ottimali sulle relazioni tra efficienza fotosintetica e modulazione del metabolismo delle ROS in specie di interesse agrario di tipo C3, frumento duro, e C4, sorgo (*Sorghum bicolor* Moensch.). Tale approccio poteva rivelarsi da un lato più «realistico» per ambienti agrari a clima temperato, quale il nostro; dall'altro, poteva contribuire a porre in luce, e permettere l'eventuale sfruttamento ai fini agronomici e del miglioramento genetico, dei processi di aggiustamento che permettono al metabolismo vegetale, in assenza di fenomeni di stress termico conclamato, di percepire a livello molecolare la condizione ambientale avversa e di predisporre ad affrontarla.

In sintesi, il lavoro svolto ha consentito di ipotizzare che il processo fisiometabolico vero e proprio di adattamento o indurimento dei vegetali alla condizione termica avversa sia preceduto e funzionalmente sorretto da una serie di aggiustamenti preparatori precoci a carico dello stato antiossidante fogliare, che si manifestano in modo evidente e misurabile, in assenza di sintomi visibile di alterazione e/o soffe-

renza, già in presenza di scostamenti lievi e graduali dall'*optimum* termico e che permangono anche quando il regime termico ottimale viene ripristinato. In particolare, è stato posto in evidenza il ruolo centrale di acido ascorbico, glutatione ed enzimi di rimozione del perossido d'idrogeno nella risposta precoce ed asintomatica allo stress ossidativo temperatura-dipendente.

I risultati ottenuti suggeriscono inoltre che non sia tanto il contenuto assoluto ma piuttosto la pronta reattività dei sistemi di difesa antiossidante, una delle caratteristiche che può concorrere a determinare l'adattabilità di un dato genotipo vegetale al proprio ambiente termico [28, 29]

Nel corso degli studi in oggetto è stata caratterizzata per la prima volta l'organizzazione genomica della SOD in *S. bicolor*, utilizzando una sonda eterologa amplificata di cDNA, p*Sod2.1*, contenente la sequenza codificante completa di uno dei quattro isoenzimi citosolici a rame-zinco (SOD-2) presenti nella foglia di mais. L'analisi Southern ha confermato le prevedibile similarità nell'organizzazione dei geni per la SOD tra sorgo e mais ed ha suggerito la presenza di un più elevato numero di sequenze codificanti nella prima specie.

L'analisi Northern dello mRNA per la SOD di sorgo, ottenuto previa purificazione dell'RNA totale, ha mostrato che la presenza di temperature di allevamento non ottimali può sia influenzare l'abbondanza dei trascritti genici che regolare l'attività dell'enzima a livello post-traduzionale [30]

La complementarietà delle tecniche di biologia molecolare nei confronti dell'approccio enzimologico è stata messa a profitto nell'ambito di una Borsa di Studio OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), dalla quale è scaturita una collaborazione scientifica sfociata nell'ottenimento di piante di tabacco transgeniche in grado di sovraesprimere enzimi antiossidanti e dotate di una accresciuta tolleranza nei confronti dello stress ossidativo [31].

Conclusioni.

Nel ventennio in cui sono stati condotte le ricerche qui riportate in sintesi, la biologia di base e le sue applicazioni hanno compiuto enormi progressi, dallo sviluppo delle tecniche di biologia molecolare, alle biotecnologie, dall'avvento della chimica analitica strumentale a livello submicromolare, alle nanotecnologie basate sull'uso di molecole d'interesse biologico. Parallelamente, si è definitivamente affermata la consapevolezza che, in qualunque settore, non esiste futuro per una scienza che non ponga permanentemente al centro del suo operare le tematiche della protezione e conservazione delle risorse naturali e della riduzione dell'inquinamento globale di origine antropica.

Pur da un angolo visuale necessariamente limitato, gli autori del contributo presente hanno avuto il privilegio di essere stati testimoni attivi di un'epoca di straordinaria e tumultuosa innovazione, durante il quale, come del resto impone la natura stessa della scienza, principi, teorie e metodi ritenuti consolidati sono stati

prima messi in discussione, quindi abbandonati, ed infine riproposti sulla base portante di un livello più elevato di conoscenza. Nello specifico di questa breve rassegna, abbiamo imparato che è possibile biotrasformare residui lignocellulosici di coltivazione potenzialmente inquinanti in materiali e prodotti ad elevato valore d'uso; abbiamo constatato come, studiando le risposte delle piante alle avversità, si possa imparare molto su come funzionano in condizioni normali; abbiamo preso coscienza che quelli che erano ritenuti i peggiori nemici del metabolismo aerobico, cioè le specie reattive dell'ossigeno, si rivelino in realtà i migliori garanti del suo equilibrio.

«...There are more things in heaven and earth, Horatio, than are dreamt of in your philosophy...» (Hamlet, Atto I, Scena V).

Ringraziamenti

Si ringraziano MPI/MURST/MIUR, CNR, CRUI, Regione Lazio, Provincia e Comune di Viterbo, ENEL, ed Unione Europea, che hanno reso possibile gli studi qui riportati attraverso il loro supporto finanziario. Un ringraziamento affettuoso e commosso a F. Artemi, C. Calfapietra, M. Colognola, A. D'Annibale, M.G. De Biasi, R. D'Ovidio, G. Falesiedi, M. Felici, A. Fusari, M. Luna, A. Maggini, G. Matteucci, A.R. Paolacci, C. Perani ed A. Porri, i quali, a titolo diverso ed in tempi diversi, ma con identico entusiasmo e dedizione, hanno collaborato con gli autori all'Università della Tuscia.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Luna M., E. Poerio, M. Badiani, 1983. Phenol removal during laccase purification. *Agrochimica*, 27, 44-50.
- [2] Giovannozzi Sermanni G., M. Badiani, 1981. Laccase: a probable gateway from lignin to protein. *L'Agricoltura Italiana*, 110, 459-467.
- [3] Giovannozzi Sermanni G., M. Luna, M. Badiani, 1982. The phenols: inhibitors and activators of the laccase. *Agrochimica*, 26, 530-536.
- [4] Badiani M., M. Felici, M. Luna, F. Artemi, 1983. Laccase assay by means of high performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 133, 275-276.
- [5] Giovannozzi Sermanni G., M. Badiani, M. Luna, 1982. Protein production and lignin biodegradation in *Agaricus bisporus*. *Biotechnology Letters*, 4, 507-512.
- [6] Giovannozzi Sermanni G., M. Luna, M. Felici, F. Artemi, M. Badiani, 1986. Enzyme activities during *Pleurotus ostreatus* growth on wheat straw under controlled conditions. In: *Microbial Biomass Protein* (M. Moo-Young, K.F. Gregory, ed.), Elsevier Applied Science, London, UK, 79-91.
- [7] Giovannozzi Sermanni G., M. Felici, F. Artemi, M. Badiani, M. Luna, M. The laccase and the turnover of organic matter in soil. In: *Abstracts, 7th International Symposium on Environmental Biogeochemistry*, September 8-13, 1985, Viterbo-Roma, Italy.
- [8] Speranza M., G. Giovannozzi Sermanni, G. Angelini, F. Artemi, M. Badiani, M., 1985. ³H-Cinnamic acids uptake and translocation in C3- and C4 plants seedlings. *L'Agricoltura Italiana*, 1-2, 67-75.
- [9] Giovannozzi Sermanni G., P.L. Cappelletto, A., D'Annibale, M. Badiani, C. Perani, A.R. Paolacci, S.R. Stazi, R. Marabottini, M. Brizzi, 2002. Valutazione delle proprietà tecnologiche di paste ad alta resa ottenute da pioppi transgenici. In: *Atti del XIX Convegno Nazionale della Società Italiana di Chimica Agraria* (G. Cacco, M.R. Abenavoli, E. Attinà, M. Badiani, A. Gelsomino, A. Muscolo, M.R. Panuccio, ed.), Iiriti, Reggio Calabria, Italy, 237-244.
- [10] Luna M., M. Badiani, M. Felici, F. Artemi, G. Giovannozzi Sermanni, 1985. Selective enzyme inactivation under water stress in maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 25, 153-156.
- [11] Giovannozzi Sermanni G., M. Badiani, 1988. Possibili meccanismi primari di reazione a condizioni di stress in vegetali superiori. In: *La Crescita e lo Sviluppo della Pianta: Fattori Endogeni ed Esogeni* (S.M. Cocucci, ed.), Progetto Finalizzato Incremento Produttività Risorse Agricole, Monografia n. 19, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma, 119-145.
- [12] Badiani M., M.G. De Biasi, M. Felici, 1990. Soluble peroxidase from winter wheat seedlings with phenoloxidase-like activity. *Plant Physiology*, 92, 489-494.
- [13] De Biasi M.G., M Badiani, 1990. The phenoloxidase-like activity of purified peroxidase from *Triticum aestivum* L. seedlings leaves. *Plant Science*, 67, 29-37.
- [14] Badiani M., 1991. The phenoloxidase-like activity of apoplastic isoperoxidases from wheat seedlings leaves. In: *Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases* (J. Lobarzewski, H. Greppin, C. Penel, Th. Gaspar, ed.), University M. Curie-Sklodowska, Lublin, Poland, and University of Geneva, Geneva, Switzerland, 221-224.
- [15] Badiani M., G. Schenone, A.R. Paolacci, I. Fumagalli, 1994. Daily fluctuations of antioxidants in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves. The influence of climatic factors. *Agrochimica*, 38, 25-36.
- [16] Badiani M., A.R. Paolacci, F. Miglietta, B.A. Kimball, P.J. Pinter, Jr., R.L. Garcia, D.J., Hunsaker, R.L. Lamorte, G.W., Wall, 1996. Seasonal variations of antioxidants in wheat (*Triti-*

- cum aestivum* L.) leaves grown under field conditions. Australian Journal of Plant Physiology, 23, 687-698.
- [17] Badiani M., G. Schenone, A.R. Paolacci, I. Fumagalli, 1993. Daily fluctuations of antioxidants in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves as affected by the presence of ambient air pollutants. Plant and Cell Physiology, 34, 271-279.
- [18] Badiani M., A.R. Paolacci, F. Miglietta, B.A. Kimball, P.J. Pinter, Jr., R.L. Garcia, G.W. Wall, 1995. Fotosintesi ed antiossidanti in foglie di frumento tenero esposto ad alta CO₂ in condizioni di campo. In: *Atti del XII Convegno Nazionale della Societa' Italiana di Chimica Agraria*, Patron Editore, Bologna, Italy, 183-188.
- [19] Paolacci A.R., M. Badiani, A. D'Annibale, C. Bignami, I. Fumagalli, A. Fusari, G. Lorenzini, G. Matteucci, L. Mignanego, F. Rossini, G. Schenone, G. Giovannozzi Sermanni, 1995. The effects of realistic ozone exposure on the biology and productivity of peach trees and durum wheat grown in open-top chambers in Central Italy. *Agricoltura Mediterranea, Special Issue Responses of Plants to Air Pollution. Biologic and Economic Aspects*, 125-139.
- [20] Badiani M., 1990. The effects of the main gaseous pollutants on the promotion of oxygen toxicity in plants. *Chimica Oggi/Chemistry Today*, 8, 41-47.
- [21] Badiani M., J. Fuhrer, A.R. Paolacci, G. Giovannozzi Sermanni, 1996. Deriving critical levels for ozone effects on peach trees [*Prunus persica* (L.) Batsch] grown in open-top chambers in Central Italy. *Fresenius Environmental Bulletin*, 5, 592-597.
- [22] Badiani M., C. Calfapietra, A.R. Paolacci, M. Ciambella, A. Burinello, 1998. *Monitoraggio dell'inquinamento da ozono a mezzo di piante indicatrici in aree rurali della Provincia di Viterbo*. Unione Europea - Regione Lazio - Reg. 2081/93 DOCUP Ob. 5b 1994/99, Amministrazione Provinciale di Viterbo, 39 pp.
- [23] Badiani M., A.R. Paolacci, F. Miglietta, B.A. Kimball, P.J. Pinter, Jr., R.L. Garcia, D. Hunsaker, R. Lamorte, G.W. Wall, 1995. Free-air CO₂ enrichment on wheat: the foliar antioxidant status. *Journal of Experimental Botany*, 46 (Suppl.), 5.
- [24] Badiani M., A. D'Annibale, A.R. Paolacci, F. Miglietta, A. Raschi, 1993. The antioxidant status of soybean (*Glycine max* Merrill) leaves grown under natural CO₂ enrichment in the field. *Australian Journal of Plant Physiology*, 20, 275-284.
- [25] Miglietta F., M. Badiani, I. Bettarini, P.R. van Gardingen, F. Selvi, A. Raschi, 1995. Preliminary Studies of the Long-Term CO₂ Response of Mediterranean Vegetation Around Natural CO₂ Vents. In: *Global Change and Mediterranean-type Ecosystems* (J.M. Moreno, W.C. Oechel, ed.), Springer Verlag, New York, USA, 102-120.
- [26] Badiani M., A.R. Paolacci, A. D'Annibale, F. Miglietta, A. Raschi, 1997. Can rising CO₂ alleviate oxidative risk for the plant cell? Testing the hypothesis under natural CO₂ enrichment. In: *Plant Responses to Elevated Carbon Dioxide: Evidence from Natural Springs* (A. Raschi, F. Miglietta, R. Tognetti, P. R. van Gardingen, ed.), Cambridge University Press, Cambridge, UK, 221-241.
- [27] Podila G.K., A.R. Paolacci, M. Badiani, 2001. The impact of greenhouse gases on antioxidants and foliar defence compounds. In: *The Impact of Carbon Dioxide and Other Greenhouse Gases on Forest Ecosystems* (D. Karnosky, R. Ceulemans, G. Scarascia Mugnozza, J.L. Innes, ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK, 57-125.
- [28] Badiani M., A.R. Paolacci, A. Fusari, R. D'Ovidio, J.G. Scandalios, E. Porceddu, G. Giovannozzi Sermanni, 1997. Non-optimal growth temperatures and antioxidants in the leaves of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. II. Short-term acclimation. *Journal of Plant Physiology*, 151, 409-421.
- [29] Paolacci A.R., M. Badiani, A. D'Annibale, A. Fusari, G. Matteucci, 1997. Antioxidants and photosynthesis in the leaves of *Triticum durum* Desf seedlings acclimated to non-stressing high temperature. *Journal of Plant Physiology*, 150, 381-387.

- [30] Fusari A., A.R. Paolacci, M. Badiani, R. D'Ovidio, J.G. Scandalios, E. Porceddu, G. Giovannozzi Sermanni, 1997. Non-optimal growth temperatures and antioxidants in the leaves of *Sorghum bicolor* Moench. I. Long term acclimation. *Phyton* (Horn), 37, 71-80.
- [31] Badiani M., A. D'Annibale, A.R. Paolacci, A. Fusari, 1996. Modifying the expression of antioxidant systems in transgenic plants. *Agro-Food Industry Hi-Tech*, 3/4, 21-26.