



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA
DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA VEGETALE
CICLO XXI

STRESS DA CADMIO IN *Daucus carota*
E NELL'OLOPARASSITA *Cuscuta campestris*:
STUDI ISTO-ANATOMICI E FUNZIONALI

Dottoranda

Dr.ssa Emanuela Vurro

Tutor

Prof. Luigi Sanità di Toppi

Coordinatore

Prof. Marcello Tomaselli

Anno 2009

INDICE

Capitolo 1. INTRODUZIONE

I metalli pesanti	1
Il cadmio: caratteristiche generali	2
Effetti del cadmio nelle piante superiori	3
Meccanismi di risposta al cadmio	5
<i>Biosintesi di fitochelatine e loro compartimentazione</i>	6
<i>L'enzima fitochelatina sintasi</i>	9
<i>Daucus carota</i> L.: caratteri generali	11
<i>Effetti del cadmio in carota</i>	12
Il parassitismo	13
Cuscuta sp.	13
<i>Caratteristiche generali</i>	13
<i>Gli austori</i>	16
<i>Traslocazione di saccarosio, amminoacidi e minerali dall'ospite alla cuscuta</i>	19
<i>Cuscuta e i metalli pesanti</i>	20
Scopo della tesi di dottorato	22

Capitolo 2. MATERIALI E METODI

Allestimento delle colture	23
<i>Colture di carota in vitro</i>	23
<i>Colture di carota in vaso</i>	24
<i>Colture di cuscuta</i>	24
<i>Parassitizzazione</i>	25
Terreni di coltura utilizzati per gli esperimenti	25
Trattamenti con cadmio	27
<i>Trattamenti di carota in vitro</i>	27
<i>Trattamenti di carota cresciuta in vaso</i>	27
<i>Trattamenti di cuscuta</i>	28
<i>Prelievi</i>	28
Studi isto-anatomici	29
Studi ultrastrutturali	30
Determinazione dei metalli	30
Analisi del contenuto in glutatione e fitochelatine	32
Caratterizzazione delle fitochelatine in spettrometria di massa	34
Analisi delle proteine	34
<i>SDS-PAGE</i>	35
<i>Western blot</i>	36
Analisi statistica	37

Capitolo 3. RISULTATI

Morfologia delle colture <i>in vitro</i>	39
Studi isto-anatomici delle colture <i>in vitro</i>	40
<i>Radice principale: cuffia, apice e zona di differenziazione</i>	40
<i>Radice principale: zona di struttura primaria</i>	42
<i>Radice principale: zona di struttura secondaria</i>	43
<i>Ipocotile</i>	45
<i>Radici laterali</i>	46
<i>Picciolo fogliare</i>	47
<i>Lamina fogliare</i>	48
Effetti del cadmio sull'isto-anatomia delle radici di carota	50
Indagini isto-anatomiche.....	50
<i>Indagini ultrastrutturali</i>	55
Interazione carota-cuscuta	57
Isto-anatomia dell'interazione carota-cuscuta	57
Effetti del Cd su fusti e austori di cuscuta	61
Esperimenti in coltura liquida	62
Contenuto in Cd, GSH e PC in carota non parassitizzata	63
Contenuto in GSH e PC in cuscuta prima della parassitizzazione	64

Effetti dell'interazione carota-cuscuta sul contenuto in Cd, GSH e PC.....	64
<i>Contenuto in Cd.....</i>	<i>64</i>
<i>Contenuto in GSH e PC.....</i>	<i>66</i>
<i>Caratterizzazione delle fitochelatine in cuscuta.....</i>	<i>68</i>
Effetti di Zn e Cu in carota e in cuscuta.....	70
<i>Contenuto in Zn e Cu.....</i>	<i>70</i>
<i>Contenuto in GSH e PC.....</i>	<i>73</i>
Analisi dei profili proteici di carota e cuscuta.....	74
Identificazione dell'enzima fitochelatina sintasi in estratti proteici di cuscuta.....	76

Capitolo 4. DISCUSSIONE

Discussione.....	79
Conclusioni.....	91
Bibliografia.....	93

I metalli pesanti

Tra le sostanze inquinanti sempre più diffuse nell'ambiente vanno senz'altro menzionati i metalli pesanti, definiti elementi di transizione aventi densità maggiore di 5 g cm^{-3} . Tra i metalli pesanti maggiormente presenti nella biosfera, si annoverano: cadmio, cobalto, cromo, manganese, mercurio, molibdeno, nichel, piombo, rame e zinco. Per consuetudine, tra essi vengono anche ricompresi alcuni metalloidi (es.: selenio, arsenico), nonché certi metalli di minor densità (es.: alluminio) che, pur non appartenendo alla categoria dei metalli pesanti in senso stretto, hanno proprietà fisiche e chimiche simili a quelle dei "veri" metalli pesanti e pertanto possono innescare negli organismi analoghe risposte di difesa.

È stata anche proposta un'ulteriore classificazione dei metalli in "*oxygen-seeking*" (Classe A), "*nitrogen seeking*" e "*sulphur seeking*" (Classe B) e "*borderline*", a seconda della prevalente affinità degli stessi per gli atomi di ossigeno, per quelli di azoto e zolfo, o con comportamento intermedio (Nieboer e Richardson, 1980). Tale classificazione, tuttavia, presenta a sua volta alcuni punti di debolezza e pertanto si è comunque preferito mantenere, in questa tesi di dottorato, il termine tradizionale di "metalli pesanti", pur se non particolarmente rigoroso.

Le proprietà chimiche dei metalli pesanti sono particolarmente importanti poiché conferiscono loro un elevato grado di tossicità; tali proprietà si possono sinteticamente riassumere in:

- possibilità di assumere più stati d'ossidazione, con la conseguente capacità di formare composti intermedi;
- attività catalitica per molte reazioni biologiche;
- capacità di dare origine a complessi, grazie ai loro orbitali *d* per lo più incompleti;
- elevata affinità con i gruppi tiolici (SH) degli aminoacidi e delle proteine.

La contaminazione ambientale da metalli pesanti può avere sia origine esogena che endogena: la prima è sostanzialmente legata alle emissioni di scorie e fumi delle industrie siderurgiche, al traffico motorizzato, agli impianti di riscaldamento ed alle attività agricole che impiegano antiparassitari e fertilizzanti di varia natura; la seconda è generata dal substrato pedogenetico che rilascia i metalli direttamente nel suolo (Vergnano Gambi, 1992): alcuni terreni "naturalmente inquinati", come per esempio quelli serpentinosi, sono infatti ricchi di nichel (Ni), cromo (Cr), manganese (Mn) e cobalto (Co); altri, come quelli calaminosi, contengono zinco (Zn) e cadmio (Cd); ed altri ancora, come quelli seleniferi ed uraniferi, sono caratterizzati da elevata presenza di selenio (Se) ed uranio (U).

Il cadmio: caratteristiche generali

Il metallo pesante utilizzato nel presente lavoro sperimentale è stato il cadmio (Cd), appartenente al gruppo II B del sistema periodico, n° atomico = 48, PM = 112,411; densità = 8,6 g cm⁻³.

In natura, l'unico minerale contenente Cd puro è la poco diffusa *greenockite*, mentre il Cd è presente come elemento in traccia in alcuni minerali di Zn e Pb.

Il Cd è utilizzato per il rivestimento protettivo di altri metalli, come per esempio il ferro (Fe), mediante il processo industriale di cadmiatura. Unitamente al rame (Cu) è inoltre impiegato nella produzione di leghe a basso punto di fusione; tali leghe, pur mantenendo invariata la conducibilità elettrica, possiedono migliori proprietà meccaniche e quindi vengono sfruttate per la fabbricazione di cavi elettrici e telefonici. Quantità importanti di Cd sono impiegate nella costruzione di apparecchiature elettriche, piastre negative degli accumulatori a nichel-cadmio, computer portatili, cellulari, batterie, dispositivi fotovoltaici e schermi televisivi. Il Cd, infine, deriva dall'utilizzo di fertilizzanti fosfatici e di antiparassitari, dalla combustione del petrolio, carbone, carta e rifiuti urbani (Tabella 1.1).

a	
Produzione di energia	0,79
Processi industriali	0,60
Fusioni e raffinazioni	5,43
Incenerimento rifiuti	0,75
TOTALE.....	7,57

b	
Rifiuti di origine agricola	2,20
Rifiuti di origine forestale	1,10
Rifiuti urbani	4,20
Acque di scarico urbane	0,18
Scarti della lavoraz. dei metalli	0,04
Ceneri di carbone	7,20
Fertilizzanti	0,20
Scarti di prodotti industriali	1,20
“Fallout” atmosferico	5,30
TOTALE.....	21,62
TOTALE GENERALE.....	29,19

Tabella 1.1. Presenza a livello mondiale di Cd imputabile ad attività umane: (a) nell’atmosfera, (b) nel suolo. Valori in migliaia di tonnellate per anno (da Sanità di Toppi e Gabbrielli, 1999).

Effetti del cadmio nelle piante superiori

Nelle piante superiori il Cd può essere assorbito in minore o maggiore quantità a seconda della sua concentrazione, del pH del terreno, della presenza di sostanza organica, del potenziale redox, della temperatura e della co-presenza di altri ioni nel suolo quali Cu, Zn, Ni (Prasad, 1997).

Il Cd, competendo efficacemente con vari microelementi per lo stesso carrier transmembrana, può penetrare all’interno della radice attraverso il parenchima corticale (Salt *et al.*, 1995) e proseguire per via apoplastica e/o simplastica verso la stele,

probabilmente complessato con acidi organici e/o fitochelatine (Cataldo *et al.*, 1988; Przemek e Haase, 1991; Senden *et al.*, 1992, 1994).

Generalmente il Cd è trattenuto per lo più all'interno della radice e soltanto in parte traslocato nei fusti e nelle foglie.

Il Cd è responsabile dell'accartocciamento e della clorosi fogliare, nonché della riduzione dell'accrescimento, soprattutto a carico dell'apparato radicale. Questo effetto può essere dovuto in parte alla limitata distensione cellulare causata dall'inibizione esercitata dal Cd sulla pompa protonica responsabile del processo (Aidid e Okamoto, 1992; 1993).

Il Cd inoltre riduce l'assimilazione di NO_3^- ; il suo trasporto dalle radici ai germogli inibisce l'attività nitrato reductasica nei germogli stessi (Hernandez *et al.*, 1996).

Tra gli altri importanti effetti del Cd che si ripercuotono sulla pianta, si ricordano l'interferenza con il bilancio idrico e i danni all'apparato fotosintetico (Krupa, 1988; Siedleka e Krupa, 1996). Il Cd inibisce fortemente anche la fosforilazione ossidativa mitocondriale, probabilmente aumentando la permeabilità passiva ai protoni della membrana interna del mitocondrio (Kessler e Brand, 1995).

Il Cd deprime significativamente l'antiporto H^+/K^+ e l'attività dell' H^+ -ATPasi del plasmalemma (Obata *et al.*, 1996); influenza marcatamente, spesso in senso inibitorio, l'attività di diversi enzimi (Van Assche e Clijsters, 1990), tra i quali: glucosio-6-fosfato deidrogenasi, glutammato deidrogenasi, enzima malico, isocitrato deidrogenasi (Mattioni *et al.*, 1997), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, alcol deidrogenasi, ureasi e Rubisco (Kneer e Zenk, 1992). Il Cd inibisce anche l'apertura stomatica, sebbene non sia stato ancora totalmente compreso il meccanismo: è possibile che l'influenza sui movimenti stomatici sia indiretta, causata dalla forte interferenza tra il Cd ed il movimento di potassio ed acido abscissico nelle cellule di guardia (Barcelò *et al.*, 1986).

Ancora, si sono avute prove sperimentali relative all'induzione da parte del Cd di stress ossidativi (Hendry *et al.*, 1992; Somashekaraiah *et al.*, 1992). Nelle cellule vegetali l'anione superossido O_2^- è di primaria importanza nella produzione di specie reattive dell'ossigeno: l'enzima superossido dismutasi può catalizzare la trasformazione dell' O_2^- in H_2O_2 (Salin, 1988). Entrambe queste specie possono essere convertite nel radicale ossidrilico $\text{OH}\bullet$, rispettivamente mediante le reazioni di Fenton e di Haber Weiss, catalizzate da metalli pesanti ma non dal Cd. Il Cd infatti, a differenza di altri elementi,

non sembra agire direttamente sulla generazione di specie reattive dell'ossigeno, ma piuttosto pare inibire, e talvolta stimolare, l'azione dei più importanti enzimi antiossidanti: superossido dismutasi, catalasi, ascorbato perossidasi, glutazione reduttasi e deidroascorbato reduttasi (Gallego *et al.*, 1996).

Meccanismi di risposta al cadmio

Finora sono stati menzionati gli effetti del Cd a livello molecolare, fisiologico, morfologico e citologico, senza concentrarci sui meccanismi di risposta messi in atto dalle piante, le quali non subiscono passivamente lo stress da Cd - e più in generale gli stress ambientali - ma rispondono a tali sollecitazioni con un ampio ventaglio di meccanismi difensivi.

Come rappresenta il modello "fan-shaped response" o della "risposta a ventaglio" (Sanità di Toppi e Gabrielli, 1999), rappresentato in Figura 1.1, in risposta agli stress da Cd acuti e cronici, le piante mettono in atto diversi meccanismi, che pur non manifestandosi per forza contemporaneamente, possono modularsi a vicenda per attenuare gli effetti deleteri ingenerati dal metallo pesante.



Figura 1.1. Rappresentazione del modello della "risposta a ventaglio", modificato da Sanità di Toppi e Gabrielli, 1999.

Tra i meccanismi di risposta allo stress da Cd si ricordano: 1) immobilizzazione operata dalle pareti cellulari; 2) esclusione di membrana; 3) produzione di etilene da stress; 4) possibile sintesi di metallotioneine; 5) sintesi di proteine da stress del tipo delle "heat shock proteins"; 6) biosintesi di glutatione e fitochelatine; 7) compartimentazione vacuolare.

Il meccanismo (6), relativo alla sintesi di glutatione e fitochelatine, sarà trattato in maniera più ampia in quanto specifico oggetto di studio di una parte significativa di questa tesi.

Biosintesi di fitochelatine e loro compartimentazione

Le fitochelatine (PC) furono isolate e purificate per la prima volta da Grill *et al.* (1985), sebbene già dodici anni prima ne era stata pionieristicamente dimostrata la presenza in foglie di tabacco trattate con Hg (Anelli *et al.*, 1973).

Le fitochelatine sono peptidi prodotti dalle piante, da alcuni funghi e da certe alghe, a seguito di trattamento con metalli pesanti, tra cui il Cd (Tabella 1.2).

Metalli pesanti e metalloidi che inducono risposte di difesa negli organismi vegetali			
METALLO	FORMA IONICA	METALLO	FORMA IONICA
Argento	Ag ⁺	Selenio	SeO ₃ ²⁻ , SeO ₄ ²⁻
Arsenico	AsO ₂ ⁻ , AsO ₄ ³⁻	Stagno	Sn ²⁺
Cadmio	Cd ²⁺	Alluminio	Al ³⁺
Rame	Cu ²⁺	Cobalto	Co ²⁺
Mercurio	Hg ²⁺	Cromo	Cr ³⁺ , CrO ₄ ²⁻
Piombo	Pb ²⁺	Ferro	Fe ²⁺
Zinco	Zn ²⁺	Molibdeno	MoO ₄ ²⁻
Oro	Au ⁺	Manganese	Mn ²⁺
Bismuto	Bi ³⁺	Nichel	Ni ²⁺
Gallio	Ga ³⁺	Tellurio	Te ⁴⁺
Indio	In ³⁺	Wolframio	W ⁶⁺
Antimonio	Sb ³⁺		

Tabella 1.2. I metalli del primo raggruppamento (da argento a zinco) inducono rapide risposte di difesa, specie in termini di biosintesi di fitochelatine, mentre quelli del secondo raggruppamento (da oro a stagno) sono meno efficaci nell'indurre la sintesi di fitochelatine. Infine, nell'ultimo raggruppamento sono elencati i metalli che, ad oggi, non inducono la sintesi di fitochelatine.

La struttura generale delle fitochelatine è $(\gamma\text{-glutamil-cisteinil})_n$ - glicina, dove n indica il numero di ripetizioni dell'unità $\gamma\text{-Glu-Cys}$, che varia da 2 a 11, più comunemente da 2 a 5. Grazie ai gruppi tiolici (SH) della cisteina, le fitochelatine possono formare dei complessi con vari metalli pesanti, particolarmente con il Cd, chelandoli e sottraendoli così dalla libera circolazione all'interno del citosol delle cellule, possibilmente prima che i metalli stessi provochino effetti tossici. Un esempio di complesso tra atomi di Cd e gruppi SH è rappresentato in Figura 1.2.

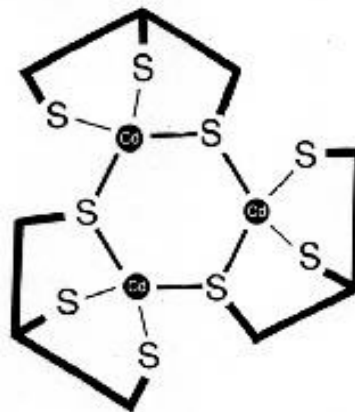


Figura 1.2. Schema di un complesso, tipico delle fitochelatine, tra atomi di Cd e gruppi SH.

Le fitochelatine sono sintetizzate direttamente a partire dal tripeptide glutatione ($\gamma\text{-glutamil-cisteinil-glicina}$), oppure da una fitochelatina a più basso grado di polimerizzazione, per mezzo dell'enzima $\gamma\text{-glutamil-cisteina}$ dipeptidil transpeptidasi (E.C. 2.3.2.15), comunemente chiamato fitochelatina sintasi (vedi oltre).

Funghi e piante mutanti, privi di glutatione o dell'enzima fitochelatina sintasi sono del tutto incapaci di produrre fitochelatine e pertanto risultano ipersensibili al Cd e ad alcuni altri metalli pesanti. In virtù di questo, i mutanti *cad1* di *Arabidopsis thaliana*, aventi normali livelli di glutatione ma deficienti nell'attività della fitochelatina sintasi, mostrarono marcati danni indotti da Cd, come ad esempio clorosi, riduzione dell'accrescimento, comparsa di anomale pigmentazioni sulle radici, e addirittura morte (Howden e Cobbet, 1992; Howdwen *et al.*, 1995). Questi effetti invece non venivano riscontrati nelle piante "wild-type".

Dopo che l'esposizione al metallo ha indotto la sintesi di fitochelatine, queste ultime formano - in particolare con il Cd - un complesso di tipo "LMW" ("low molecular weight complex", costituito da Cd e PC₃ in prevalenza). Tale complesso entra nel vacuolo (Figura 1.3), dove acquisisce gruppi solfuro acido-labili (S²⁻), e forma a sua volta un altro complesso più stabile detto "HMW" ("high molecular weight complex"). È stato riportato che, in presenza di ATP, i complessi Cd-fitochelatine vengono trasferiti dal citosol al vacuolo contro gradiente di concentrazione, da specifiche permeasi tonoplastiche (trasportatori di tipo "ABC"), e che possono accumularsi all'interno di vescicole tonoplastiche fino a 38 volte in più rispetto alla concentrazione esterna (Ortiz *et al.*, 1992; 1995). Il Cd libero, eventualmente presente, sembra entrare nel vacuolo per mezzo di un meccanismo di trasporto attivo, in particolare un antiporto Cd²⁺/2H⁺.

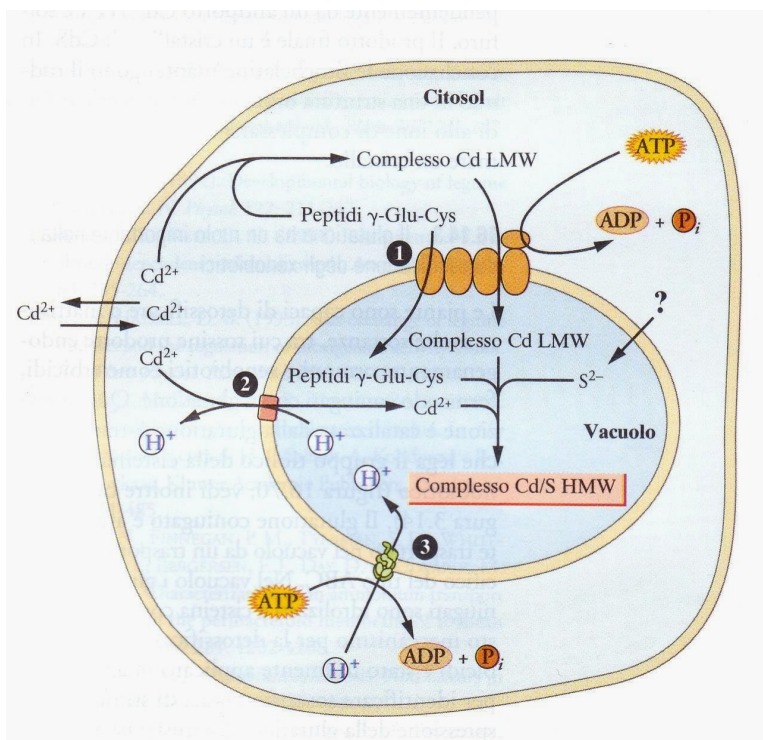


Figura 1.3. Rappresentazione della compartimentazione vacuolare del Cd. Spiegazione nel testo. Immagine tratta da Buchanan B.B., Grissem W., Jones R.L. "Biochimica e Biologia Molecolare delle Piante". Zanichelli, 2003, pag. 775.

Nel vacuolo, a causa del pH tipicamente acido, il complesso "HMW" si dissocia, ed il Cd viene in genere chelato da acidi organici (prevalentemente citrato, ossalato, malato), e forse anche da fitati, cloruro e aminoacidi. Le fitochelatine a loro volta possono essere degradate da idrolasi vacuolari e/o lasciare il vacuolo per tornare nuovamente nel citosol, dove continuano a svolgere il ruolo di "shuttle", sempre reintegrate all'occorrenza da altre fitochelatine di nuova formazione (Sanità di Toppi *et al.*, 2002).

L'enzima fitochelatina sintasi

L'enzima che catalizza la biosintesi di fitochelatine a partire dal precursore GSH, la fitochelatina sintasi, fu caratterizzato per la prima volta da Grill *et al.* nel 1989. La fitochelatina sintasi è una γ -glutamyl-cisteina dipeptidil transpeptidasi (E.C.2.3.2.15) (Grill *et al.*, 1989); essa catalizza la transpeptidazione del γ -GluCys del GSH con una seconda molecola di GSH a formare una PC₂, oppure con una molecola di PC a formare un oligomero n+1. L'enzima è stato descritto essere un tetramero di PM = 95 kDa (in cromatografia per *gel filtration*).

La fitochelatina sintasi è un enzima costitutivo, cioè è sempre presente nel citosol delle cellule vegetali, anche in assenza di metalli pesanti. Ciò è stato dimostrato coltivando cellule vegetali, radici axeniche o piante, in assenza di metallo, effettuando una parziale purificazione dell'enzima, ed aggiungendo all'enzima *in vitro* glutatione e metalli pesanti (Sanità di Toppi *et al.*, 1998). Dopo poco, infatti, la fitochelatina sintasi si attiva e comincia a produrre fitochelatine via via a più elevato grado di polimerizzazione. Oggi si sa che, affinché la fitochelatina sintasi si attivi, sono necessari due substrati: 1) uno o più metalli pesanti; 2) il glutatione o un oligomero γ -glutamyl-cisteina.

Il gene della PC sintasi fu identificato per la prima volta in *Arabidopsis thaliana*, mediante una linea mutante (*cad1*) Cd-sensibile, incapace di produrre PC ma con livelli normali di GSH (Howden *et al.*, 1995). I geni della PC sintasi furono isolati simultaneamente da diversi gruppi in *Arabidopsis* (*AtPCS1*- Vatamaniuk *et al.*, 1999 e *CAD1*- Ha *et al.*, 1999) e in frumento (*TaPCS1*- Clemens *et al.*, 1999).

Arabidopsis possiede una seconda PC sintasi (*AtPCS2-Ha et al., 1999*), espressa nella maggior parte dei tessuti a livelli molto più bassi della *AtPCS1*; presumibilmente questo enzima è predominante in qualche altro tessuto oltre quelli esaminati o in certe condizioni ambientali.

Infine, cDNA *full-length* o parziali che codificano per una putativa PC sintasi sono stati isolati in altre specie vegetali, come *Brassica juncea* (Clemens *et al., 1999*) e riso (Clemens *et al., 2001*). Il peso molecolare delle varie PC sintasi, dedotto dalla sequenza di DNA, è compreso tra i 42 e i 70 kDa.

***Daucus carota* L.: caratteri generali**

Daucus carota L. (carota) è una dicotiledone *Apiacea* biennale, coltivata come annuale per la produzione della radice edule carnosa. Esistono numerose forme spontanee diffuse dall'Europa al Medio Oriente, tutte contraddistinte dallo stesso corredo cromosomico ($2n = 18$).

Nel genere *Daucus*, Pignatti (1982) riconosce due specie in base alla distribuzione ecologica:

- 1) *Daucus carota* L., a diffusione continentale, con subspecie a portamento eretto, fiori per lo più bianchi, acheni con aculei lunghi (stessa lunghezza dell'achenio);
- 2) *Daucus gingidium* L. (= *D. gummifer* Auct.), con subspecie diffuse lungo i litorali e le scogliere, a portamento prostrato, con fiori bianco-rosei, acheni con aculei corti (1/3 della lunghezza dell'achenio).

Alla specie *D. carota* L. appartengono le seguenti subspecie: *maritimus*, *carota*, *major*, *maximus*, *sativus* (Pignatti, 1982).

La carota, originaria di climi temperati, è considerata specie a medie esigenze termiche; tuttavia dopo l'ingrossamento la radice è in grado di superare i rigori dell'inverno, con temperature minime di $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$; per la germinazione sono necessarie temperature superiori a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, con temperatura minima di $6\text{ }^{\circ}\text{C}$, ottimale tra 20 e $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ e massima di $35\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Nel primo anno di crescita, la parte aerea è formata da foglie "basali" fortemente lacinate (2-3 pennatose) e munite di lunghi piccioli. La radice, che inizia ad ingrossarsi precocemente già nel primo anno, ha dimensioni variabili e colorazione generalmente giallo-aranciata, biancastra o raramente rosso-violacea, in quest'ultimo caso per la presenza di pigmenti antocianici.

Nel secondo anno, dalla zona del colletto si sviluppa uno scapo fiorale tomentoso, ricco di ramificazioni e provvisto di foglie simili a quelle del primo anno, ma più piccole. Lo scapo principale e le ramificazioni terminano con caratteristiche infiorescenze ad ombrella composta, portanti fiori piccoli bianchi (escluso quello centrale rossastro), unisessuali o ermafroditi con spiccata proterandria. Il frutto è un diachenio costoluto marrone-brunastro di forma oblunga, munito lateralmente di peli aghiformi.

Effetti del cadmio in carota

In questo lavoro sperimentale è stata scelta carota (*Daucus carota* L.) come sistema di studio, poiché è una specie facilmente coltivabile *in vitro* ed in serra, nonché parassitizzabile da cuscuta (vedi oltre). Inoltre, in letteratura sono presenti ben pochi lavori sperimentali relativi agli effetti ed alle risposte allo stress da Cd in questa specie. Nel 1998-99 Sanità di Toppi *et al.* eseguirono i primi esperimenti in cui piante *in vitro*, radici axeniche e colture cellulari di carota venivano trattate con Cd in concentrazione di 100 μ M - 1 mM. A seguito del trattamento, fu dimostrato che piante, radici e sospensioni cellulari avevano prodotto fitochelatine, con attivazione dell'enzima fitochelatina sintasi e produzione di etilene da stress, malondialdeide e putative proteine da stress.

Successivamente, in radici di carota, altri Autori saggiarono l'attività Cd-indotta dei principali enzimi antiossidanti (catalasi, perossidasi, polifenolo ossidasi, superossido dismutasi) (Chen *et al.*, 2003), insieme ai livelli di prolina e malondialdeide. Il lavoro chiarì che tutti gli enzimi e metaboliti sopra menzionati erano in qualche modo sensibili all'aggiunta di Cd.

Recentemente, Sharma e Agrawal (2006) hanno determinato l'assorbimento ed il bioaccumulo di Cd e Zn, anche in combinazione, in piante di carota.

Mancano tuttavia completamente in letteratura dati sugli effetti del Cd per quanto attiene alla isto-anatomia di carota, con particolare attenzione agli effetti sulla radice, primo organo bersaglio di questo metallo.

Il parassitismo

Il parassitismo è una forma di associazione biologica fra una o più specie, nella quale l'una trae vantaggio (es.: nutrimento, protezione) a spese dell'altra/delle altre. La prima specie è detta parassita, la altre ospiti. Il parassita può essere un procariote, un protista, un fungo, una pianta o un animale. Nella grande maggioranza dei casi appartiene a *taxa* quali Batteri, Protozoi, Funghi ed è di piccole dimensioni; tuttavia esistono parassiti anche fra gli Artropodi (Crostei, Insetti), Vertebrati (Ciclostomi) ed Angiosperme (vischio, cuscuta, orobanche). Anche l'ospite può appartenere a qualsiasi gruppo sistematico ed è caratterizzato da dimensioni maggiori del parassita. Il parassitismo è una forma associativa molto diffusa, tanto che si può affermare che quasi tutti gli esseri viventi siano parassitizzati da un certo numero di altre specie.

I parassiti si dividono in due macro-categorie: *facoltativi*, se in grado di vivere indipendentemente dagli ospiti, e *obbligati*, se non godono di tale autonomia.

Cuscuta sp.

Caratteristiche generali

Cuscuta (in Italiano: cùscuta) è un grande genere cosmopolita (appartenente alla famiglia delle Convolvulaceae) comprendente circa 170 specie di piante erbacee parassite, originarie delle regioni tropicali e temperate. *Cuscuta* è una fanerogama oloparassita (parassita obbligato), che si attacca ai fusti e alle foglie di un ampio numero di piante ospiti, al fine di utilizzarne le sostanze nutritive, in una condizione di permanente "chemioeterotrofia".

Sebbene contenga una piccola quantità di clorofilla (Fer, 1976; Zimmerman e Milburn, 1975), *cuscuta* è un parassita obbligato e non può completare il suo ciclo vitale senza un ospite. Talvolta può sopravvivere da un anno all'altro all'interno dei tessuti di un ospite perenne (Dean, 1954; Stewart *et al.*, 1908), ma normalmente vive come pianta annuale.

I semi di cuscuta sono di forma sferica, molto piccoli (con un diametro compreso tra 0,5 e 1 mm) e possiedono un tegumento esterno ruvido molto resistente. Cambiamenti delle condizioni ambientali (quali umidità e siccità, congelamento e scongelamento) e attività microbiche possono portare alla scarificazione ed alla conseguente rottura del tegumento.

Diversamente dalle piante emiparassite (parassiti facoltativi), cuscuta non necessita di essudati prodotti dall'ospite per la germinazione dei suoi semi (Vail *et al.*, 1990); la germinazione è invece influenzata solo dalle condizioni di umidità e temperatura (Allred e Tingey, 1964). Una volta che i semi sono germinati, di solito in prossimità della superficie del suolo, le plantule si allungano ed emergono dal suolo.

Le plantule formano precocemente dei fusticini pressoché privi di foglie e di radici. La porzione basale delle plantule funge da radice per quanto concerne l'assorbimento dell'acqua e l'ancoraggio, ma non penetra ulteriormente nel terreno. Quindi, le plantule di cuscuta entrano in una fase di crescita non parassitica (Figura 1.4), dipendente per 4-9 giorni dalle riserve del seme (Kroschel, 2001); in questa fase esse si muovono nello spazio circostante per circumnutazione, alla ricerca di un ospite: il fusto si allunga rapidamente e, grazie ad un meccanismo di percezione fototropica (Haidair *et al.*, 1997), riesce prontamente a direzionarsi verso l'ospite.

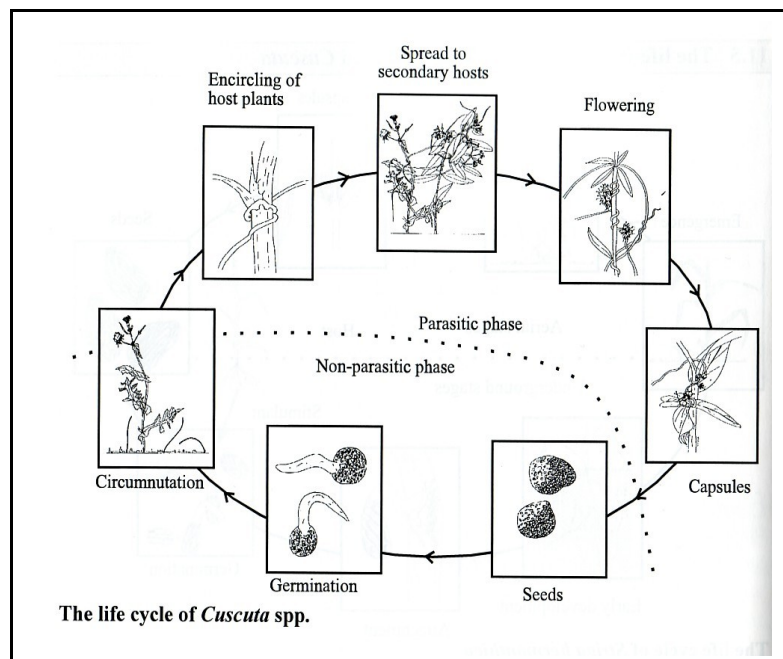


Figura 1.4. Ciclo vitale di *Cuscuta* spp. Tratto da Kroschel (2001).

Una volta preso contatto con la pianta ospite, il fusto della plantula di cuscuta si aggancia saldamente ad essa, mentre il punto di ancoraggio al suolo degenera e muore. Le plantule che si sono avvolte attorno ad un oggetto non vivente oppure ad una pianta non ospite, muoiono.

Nella fase parassitica (Figura 1.4), il fusto si avvolge per tigmotropismo in senso antiorario attorno al/i fusto/i dell'ospite (Figura 1.5), e nelle zone di contatto vengono prodotti gli austori (vedi oltre), strutture che penetrano all'interno dei tessuti delle piante ospiti. Gli austori servono per l'assorbimento di zuccheri, amminoacidi, acqua ed elementi minerali dai tessuti floematici e xilematici dell'ospite, convogliandoli verso cuscuta (Littlefield *et al.*, 1966), la quale presenta un'attività di *sink* generalmente molto elevata, paragonabile a quella esercitata da organi di riserva, frutti o giovani germogli in formazione (Jeschke, 1994 a, b; 1995).

Una volta connessa ad un ospite tramite gli austori, lo sviluppo di cuscuta è ulteriormente influenzato da temperatura e luce (Allred e Tingey, 1964; Dawson, 1966): in condizioni di caldo e forte illuminazione, cuscuta cresce rapidamente, si ramifica in numerosi viticci e produce un'abbondante massa intrecciata di fusti. In alcune specie le parti terminali dei fusti primari e delle branche laterali si avvolgono e aderiscono nuovamente sull'ospite, mentre in altre specie (ad esempio *Cuscuta campestris*) speciali viticci assolvono a questa funzione (Dawson *et al.*, 1994) (Figura 1.5).

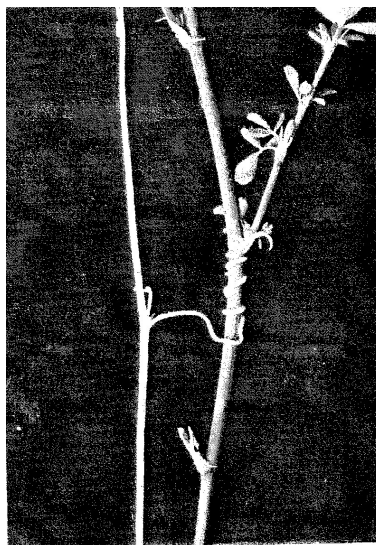


Figura 1.5. Fusto di *Cuscuta campestris* con un viticcio avvolto su un fusto di *Medicago sativa*. Da Dawson *et al.*, 1984.

Durante la crescita, cuscuta può diffondersi su ospiti secondari, a volte diversi (come genere o specie) dall'ospite primario. Al termine del ciclo vitale, questa fanerogama parassita produce fiori vestigiali, con tre-cinque petali bianchi, gialli o rosati ed altrettanti sepali riuniti in minuscole infiorescenze quasi sferiche e prive di peduncolo; infine vengono prodotti piccoli frutti a capsula, ciascuna contenente quattro semi.

Gli austori

La struttura che connette cuscuta con la pianta ospite è l'austorio. Il termine "austorio" è ampiamente utilizzato nel regno *Plantae* per indicare ogni speciale ponte anatomico attraverso cui le sostanze sono trasportate da un organismo ad un altro. Questo termine, riferito a cuscuta, è stato utilizzato per la prima volta da De Candolle nel 1813.

La formazione dell'austorio in cuscuta avviene in diverse fasi ben distinte, descritte dettagliatamente da Dawson *et al.* (1994). In breve, a seguito dell'iniziale contatto con l'ospite ed al conseguente avvolgimento in senso antiorario, si verificano nel fusto di cuscuta accumuli di amido nel parenchima corticale e varie divisioni cellulari dell'epidermide (Figura 1.6 A). Questi eventi avvengono solo su quella parte del fusto di cuscuta che è a diretto contatto con l'ospite, portando alla formazione del preaustorio. Le cellule del preaustorio si dividono su un piano anticlinale e si allungano, andando così ad aderire intimamente sull'ospite; quindi producono e secernono materiale elettronduco con funzione adesiva che lega saldamente il preaustorio alla superficie dell'ospite.

L'accumulo di amido nel parenchima corticale porta alla formazione di un disco di cellule meristematiche, da cui differenzieranno le cellule dell'austorio (Figura 1.6 B, C).

La forma tridimensionale dell'austorio è simile ad un cono, con una punta "a cuneo" (Lee e Lee, 1989) che penetra nell'epidermide e in alcuni strati del parenchima corticale dell'ospite (Figura 1.6 D). La punta dell'austorio si ramifica poi in numerose "ife esploratrici" unicellulari (Figura 1.6 E) che si biforcano, spesso ripetutamente, e diventano piuttosto lunghe (in certi casi anche più di 2 mm, Bennet, 1944).

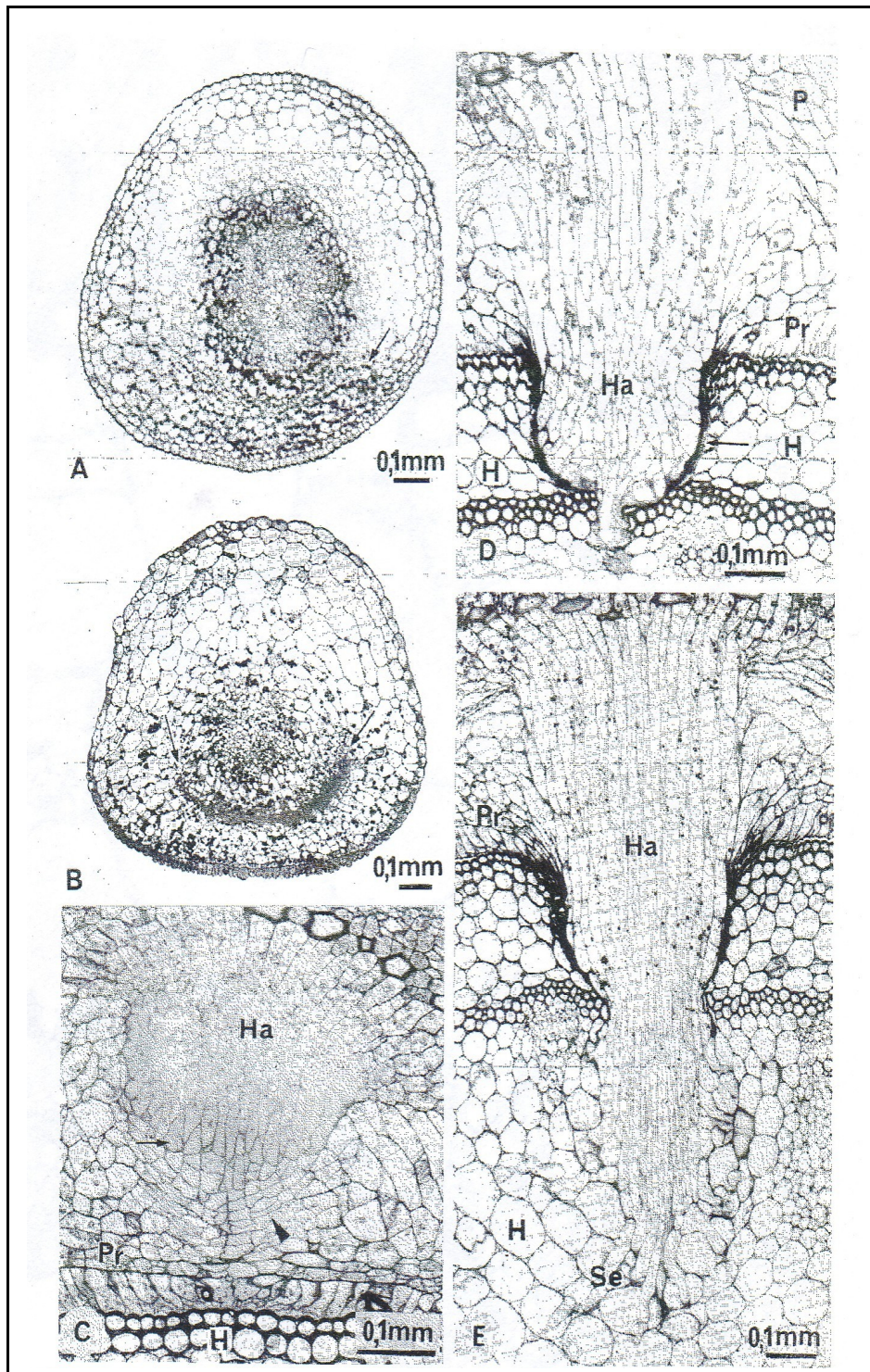


Figura 1.6. Stadi di formazione dell'austorio in cuscuta. A) Accumulo di amido nella corteccia (freccia); B) disco di cellule meristematiche che si sviluppa nella parte interna del parenchima corticale (freccia); in questa fase cuscuta si appiattisce contro l'epidermide dell'ospite e le cellule epidermiche di cuscuta si allungano radialmente; C) quando il preaustorio (Pr) è strettamente appressato all'epidermide dell'ospite (H), l'austorio (Ha) cresce attraverso la corteccia di cuscuta per mezzo di larghe cellule apicali (freccia); D) l'austorio (Ha) cresce oltre il preaustorio (Pr) e penetra nei tessuti dell'ospite (H); E) le "ife esploratrici" (Se) si sviluppano dall'austorio (Ha) e si approfondiscono nell'ospite (H) alla ricerca di tessuti floematici e xilematici.

Nel momento in cui contattano un ospite completamente compatibile, le "ife esploratrici" si espandono sia intercellularmente (lungo le lamelle mediane delle pareti cellulari dell'ospite), sia intracellularmente (con invaginazione o scollamento - ma mai rottura - del plasmalemma dell'ospite).

Durante il loro allungamento, le "ife esploratrici" incontrano casualmente i fasci cribro-vascolari dell'ospite. In questo caso, se esse entrano in contatto con lo xilema dell'ospite, possono "trasformarsi" in elementi xilematici, prevalentemente tracheidi anulate o spiralate (Penot, 1986; Dörr, 1987; Bäumel *et al.*, 1993); se invece le "ife esploratrici" entrano in contatto con il floema dell'ospite, esse possono formare una struttura "hand-like" che afferra i tubi cribrosi dell'ospite con delle protrusioni "finger like" (Figura 1.7 A). L' "ifa esploratrice" può in questo caso differenziarsi a sua volta in un elemento cribroso, stabilendo una stretta connessione con un tubo cribroso dell'ospite, e divenendo così un' "ifa assorbente" o cellula di trasferimento (Dörr, 1968, 1972). Nel floema di cuscuta possono anche differenziarsi cellule compagne, addossate ai tubi cribrosi.

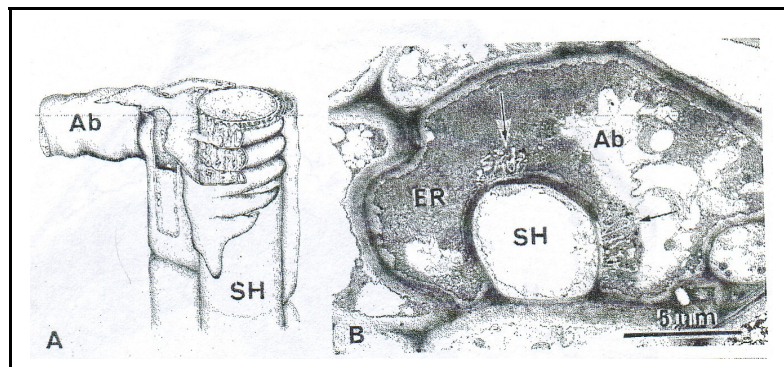


Figura 1.7. Connessione tra floema di cuscuta e floema dell'ospite. A) Disegno schematico di una "ifa assorbente" (Ab) in contatto con un tubo cribroso dell'ospite (SH). L'ifa avvolge strettamente il tubo cribroso con le "finger-like protrusions". Tratto da Dörr, 1972. B) Micrografia di un tubo cribroso dell'ospite (SH), tagliato trasversalmente e circondato da protrusioni di un' "ifa assorbente" (Ab), con in evidenza il reticolo endoplasmatico (ER) che ne rappresenta la struttura sub-cellulare dominante. Tratto da Dörr, 1990.

Traslocazione di saccarosio, amminoacidi e minerali dall'ospite alla cuscuta

Come riportato precedentemente, le cellule dell'austorio formano un ponte tra il floema dell'ospite ed il floema del parassita, e tra lo xilema dell'ospite e lo xilema del parassita.

La principale via di traslocazione dei nutrienti in cuscuta è rappresentata dal floema, facendo di questo parassita un tipico "phloem feeder" (Ziegler, 1975). Cuscuta estrae principalmente i soluti presenti nel floema dell'ospite per via apoplastica (Wolswinkel, 1974 a, b; 1978; Wolswinkel e Amerlaan, 1983) e, come di recente dimostrato, anche per via simplastica mediata da plasmodesmi (Birschwilks *et al.*, 2006); i soluti vengono poi assorbiti per mezzo delle cellule di trasferimento dell'austorio (Kollmann e Dörr, 1969; Wolswinkel e Amerlaan, 1983). L'importanza del trasferimento floematico dei soluti dall'ospite a cuscuta è ulteriormente avvalorata dal fatto che la velocità di traspirazione (e quindi del movimento xilematico) in cuscuta è molto bassa (Fer, 1984).

Primo fra tutti, il saccarosio è trasferito molto efficientemente via floema dall'ospite a cuscuta, con un meccanismo saccarosio-specifico (Tsivion, 1978; Fer, 1978, 1979, 1981) simile a quello attuato durante la normale movimentazione floematica di questo disaccaride all'interno della foglia.

Il trasferimento degli amminoacidi presenta modalità analoghe a quello degli zuccheri, sebbene in questo caso sia stato dimostrato anche un contributo xilematico (Pate, 1980).

Tra i soluti presenti nelle correnti xilematica e floematica dell'ospite, vi sono anche gli elementi minerali, che possono arrivare a cuscuta non solo via floema, ma anche via xilema, mediante trasferimento apoplastico (Ashton e Santana, 1976; Penot, 1986; Kollmann e Dörr, 1987; Dörr, 1990; Dawson *et al.*, 1994). Dallo xilema vengono estratti principalmente acqua e Ca^{2+} (Fer, 1981; Penot, 1986), quest'ultimo generalmente assai poco presente e/o immobile nel floema.

Jeschke *et al.* (1994 a, b) riuscirono per la prima volta a determinare quantitativamente la dipendenza nutrizionale di *Cuscuta reflexa* dal suo ospite *Lupinus albus* (lupino) in termini di trasferimento di carbonio, azoto e potassio dall'ospite al

parassita. Circa il 99,5% del carbonio, il 93,6% dell'azoto e il 74% del potassio venivano estratti dall'ospite via floema; una rimanente parte di questi nutrienti era presumibilmente estratta via xilema. Inoltre, il parassita costituiva il *sink* dominante, estraendo l'81% dei fotosintati dell'ospite, tutto l'azoto fissato e una grossa quantità di azoto libero (che veniva mobilizzata dal parassita dalle riserve di azoto precedentemente accumulate dall'ospite). Come risultato dell'attività competitiva di *sink* esercitata da *Cuscuta*, la fotosintesi in lupino appariva essere stimolata, mentre la fissazione dell'azoto era seriamente inibita (Jeschke *et al.*, 1994 b).

Successivamente, nel medesimo sistema sperimentale, e sulla base di un primo pionieristico lavoro sull'argomento (Wolswinkel, 1978), Jeschke *et al.* (1995) effettuarono ulteriori studi sui flussi di K^+ , Na^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} . Il pattern del flusso di K^+ era molto simile a quello dell'N, ma solo il 68% del K^+ totale veniva prelevato dal parassita (Tabella 1.3); di questo, il 74% veniva estratto dal floema ed il 26% dallo xilema, insieme all'acqua. Anche Na^+ e Mg^{2+} erano prelevati dal parassita, prevalentemente via floema, mentre il Ca^{2+} era presente in misura minore e comunque derivava solo dallo xilema (Tabella 1.3).

	K^+	Na^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	N
% di uptake	68	51	73	26	223
% di dipendenza dal floema dell'ospite	74	73	78	0	94

Tabella 1.3. Partizione dei nutrienti in *Cuscuta reflexa* cresciuta su *Lupinus albus* (tratto da Jeschke *et al.*, 1995).

Cuscuta e i metalli pesanti

Le ricerche sopra menzionate sul trasferimento floematico e xilematico degli elementi minerali dall'ospite a *Cuscuta* non prendono in considerazione né i microelementi metallici né i metalli pesanti xenobiotici. In generale, infatti, in letteratura esistono pochissimi dati relativi allo stress da metalli pesanti nel genere *Cuscuta*, riportati qui di seguito.

La specie *Cuscuta californica* può impiegare come pianta ospite anche un'iperaccumulatrice di nichel (Ni), *Streptanthus polygaloides* (Boyd *et al.*, 1999), la quale, mediante iperaccumulo di Ni nelle parti aeree, ingenera tossicità acuta in diversi invertebrati fitofagi (Boyd e Moar, 1999; Martens e Boyd, 1994) ed effetti negativi su batteri e funghi fitopatogeni (Boyd *et al.*, 1994). L'iperaccumulo di Ni, però, non costituisce una protezione di *S. polygaloides* verso la parassitizzazione da parte di *Cuscuta californica*, e il parassita risulta in grado di prelevare dall'ospite una consistente quantità di Ni (Boyd *et al.*, 1999). Gli afidi, tipici insetti "phloem-feeder", non sono danneggiati quando si nutrono di *S. polygaloides*, poiché nella loro emolinfa (e più in generale, nei loro tessuti) si rinvencono bassissime quantità di Ni; ciò suggerisce che i livelli di Ni nel floema di *S. polygaloides* siano molto bassi (Boyd e Martens, 1999). *Cuscuta californica*, invece, che possiede sia connessioni floematiche che xilematiche con *S. polygaloides* (Lee e Lee, 1989), accumula come detto alte concentrazioni di Ni, suggerendo quindi un prelievo prevalentemente xilematico del metallo (Boyd *et al.*, 1999). Questa ipotesi è avvalorata dalle osservazioni effettuate su un altro iperaccumulatore di Ni, *Alyssum lesbiacum*, in cui si è osservato un trasporto di Ni via xilema mediante un complesso tra Ni e istidina (Kramer *et al.*, 1996).

Poiché *Cuscuta californica* accumula Ni in funzione dell'attitudine al bioaccumulo dell'ospite (circa 80 volte in più quando parassitizza un ospite Ni-iperaccumulatore) (Boyd *et al.*, 1999), Srivastava *et al.* (2004) hanno ritenuto potenzialmente interessante l'utilizzo di cuscuta per la rimozione dei metalli pesanti dall'ambiente. Per questo motivo, tali Autori hanno studiato alcuni effetti del Cd nella specie *Cuscuta reflexa*, sia durante la germinazione dei semi sia in colture di calli (Srivastava *et al.*, 2004). L'esposizione al Cd ha portato all'inibizione concentrazione-dipendente della crescita dei calli e dei germinelli, e, inoltre, il Cd, provocando la formazione di specie reattive dell'ossigeno, ha influenzato le attività di enzimi antiossidanti quali catalasi, guaiacolo perossidasi e glutatione reduttasi. Il lavoro sperimentale tuttavia non ha dato indicazioni di particolare interesse né per quanto riguardava il bioaccumulo del Cd in cuscuta, né sulla presenza di tale metallo nello xilema o nel floema di questo parassita.

Ad oggi, nessun dato è presente in letteratura sullo stress da metalli - in particolare da Cd - in *Cuscuta campestris*.

Scopo della tesi di dottorato

Lo scopo di questa tesi è stato quello di studiare gli effetti dello stress da cadmio (Cd) in piante di *Daucus carota* L. (carota), nella fanerogama oloparassita *Cuscuta campestris* (cuscuta), e nella loro reciproca interazione, mancando pressoché completamente un'adeguata letteratura a riguardo.

Il lavoro sperimentale è stato schematicamente suddiviso in due fasi: nella prima, gli studi hanno riguardato gli effetti del Cd dal punto di vista isto-anatomico ed ultrastrutturale; nella seconda, coerente con la prima, gli studi hanno preso in considerazione aspetti funzionali della risposta al Cd.

Nella prima fase, le piante di carota sono state coltivate *in vitro* e trattate con Cd in concentrazione pari a 36 μM per vari tempi di esposizione (max 14 giorni); al termine dei vari trattamenti, le piante sono state studiate dettagliatamente nella loro isto-anatomia, con lo scopo di evidenziare le zone preferenziali di accumulo del Cd nei tessuti, nonché i danni da esso provocati. La concentrazione di 36 μM Cd è stata scelta poiché rappresentava un ragionevole compromesso tra la possibilità di studiare, da una parte, effetti e risposte ai trattamenti, in termini isto-anatomici e funzionali; dall'altra, essere comunque realistica da un punto di vista ambientale, almeno in aree con notevole impatto antropico (Sanità di Toppi e Gabbrielli, 1999).

Nella seconda fase del lavoro sperimentale, le piante di carota sono state parassitizzate da *Cuscuta campestris*. Si è studiata in questo caso l'interazione tra piante ospiti e parassite, esposte entrambe a stress da Cd in concentrazione pari a 36 μM (come sopra) e tempi di trattamento fino a 4 giorni. In particolare, il Cd è stato somministrato alla cuscuta per mezzo dell'ospite carota, con lo scopo di valutare la capacità di accumulo del metallo sia nella carota parassitizzata che in cuscuta, nonché le risposte Cd-indotte in questo parassita in termini di metabolismo tiolico ed espressione *in vivo* dell'enzima fitochelatina sintasi. Collateralmente, si sono studiati anche l'accumulo e le risposte funzionali di carota e cuscuta ad altri metalli, quali zinco e rame, in presenza o meno di Cd.

Allestimento delle colture

Nel presente lavoro di dottorato sono state utilizzate piante di *Daucus carota* L. (carota) e di *Cuscuta campestris* Yuncker (cuscuta) ottenute da seme. I semi di carota della varietà Berlicum sono stati acquistati presso la Magnani Sementi (Vimercate, Milano, Italia) mentre i semi di cuscuta sono stati gentilmente forniti dal Dr. Massimo Biagioni del Centro Interdipartimentale di Ricerche Agroambientali "E. Avanzi" dell'Università degli Studi di Pisa.

Colture di carota *in vitro*

I semi di carota sono stati sterilizzati per immersione in una soluzione di etanolo 70% per 2 min e successiva immersione in ipoclorito di sodio (NaOCl) al 5% per 20 min. I semi sono stati poi sciacquati per cinque volte con acqua sterile e posti a germinare in piastre Petri contenenti terreno di Gamborg (B5) sterilizzato e agarizzato, a pH 5,5 (Gamborg *et al.*, 1968) (Sigma, Milano, Italia). La composizione del terreno B5 è riportata in Tabella 2.2.

Le piastre sono state poste al buio in cella climatica alla temperatura di 25 °C per 5 giorni. I semi germinati sono stati trasferiti in condizioni di sterilità all'interno di vasi Microbox (Micropoli, Milano, Italia) contenenti terreno sterile B5 agarizzato, a pH 5,5; le piante sono state fatte crescere per 30 giorni in cella climatica a 25 °C con fotoperiodo luce/buio di 16/8 h.

Colture di carota in vaso

I semi di carota sono stati fatti germinare in piastre Petri, contenenti carta da filtro imbibita con acqua distillata, poste al buio in cella climatica alla temperatura di 25 °C per 7 giorni. I semi germinati sono stati quindi trasferiti in vasi di plastica contenenti una miscela di terriccio torboso composto (Vigoplant Italia, Lodi, Italia) e sabbia in proporzione 2:1. La composizione del terriccio è riportata in Tabella 2.1; la miscela con sabbia è servita a facilitare lo sviluppo regolare delle radici e la successiva raccolta delle piante senza provocarne danni meccanici. Durante il periodo primaverile-estivo degli anni 2006, 2007 e 2008 i vasi contenenti le piantine di carota sono stati collocati in serra presso il Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale dell'Università di Parma.

C organico	ss 30%
Acidi umici e fulvici	ss 7%
N organico	ss 0,6%
C/N	50
Cu totale	150 ppm
Zn totale	500 ppm
Torba	80%
Salinità	500-1500 μ s

Tabella 2.1. Composizione del terriccio torboso composto utilizzato per la coltura delle piante di carota in vaso. ss= sostanza secca.

Colture di cuscuta

Per aumentare la percentuale di germinazione, i semi di cuscuta sono stati scarificati con acido solforico concentrato (H_2SO_4 al 36%), seguendo la procedura indicata da Benvenuti *et al.* (2004): i semi sono stati immersi in acido solforico per 10 min e mantenuti in agitazione; sono poi stati effettuati tre lavaggi con abbondante acqua distillata al fine di rimuovere le tracce di acido ed i tegumenti seminali. I semi sono stati quindi fatti germinare in piastre Petri, contenenti carta da filtro imbibita con acqua distillata, poste in cella climatica al buio alla temperatura di 25 °C per 5 giorni.

Parassitizzazione

Piante di carota dell'età di 30 giorni sono state divise in due gruppi, separati spazialmente all'interno della serra. Il primo gruppo è stato mantenuto come controllo (denominato "carota"), mentre al secondo gruppo (denominato "carota parassitizzata") sono stati aggiunti i germinelli di cuscuta: in particolare, tre germinelli di cuscuta sono stati posizionati direttamente sul terriccio ad una distanza non superiore a 2 cm da ogni fusto di carota.

Il processo di parassitizzazione è stato considerato riuscito quando la cuscuta ha cominciato ad avvolgersi tigmotropicamente attorno al fusto di carota, formando gli austori.

Tutte le piante di carota (parassitizzate e non) sono state lasciate in serra per ulteriori 30 giorni.

Terreni di coltura utilizzati per gli esperimenti

Il terreno di coltura utilizzato per gli esperimenti *in vitro* e in coltura liquida è stato il mezzo di Gamborg, denominato "B5", la cui composizione è mostrata in Tabella 2.2.

Terreno B5 (Gamborg, 1968)			
	mg/l		mg/l
KNO ₃	2500	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0.25
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	CoCl ₂ *6H ₂ O	0.025
MgSO ₄ *7H ₂ O	250	FeSO ₄ *7H ₂ O	27.8
CaCl ₂ *2H ₂ O	150	Na ₂ EDTA	37.3
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	150	Acido nicotinico	1.0
MnSO ₄ *H ₂ O	10	Piridossina-HCl	1.0
KI	0.75	Tiamina-HCl	10.0
H ₃ BO ₃	3.0	Mio-inositolo	100
ZnSO₄*7H₂O	2.0		
CuSO₄*5H₂O	0.025		

Tabella 2.2. Composizione del terreno B5 utilizzato per gli esperimenti *in vitro* e in coltura liquida delle piante di carota.

In alcuni casi, gli esperimenti sono stati condotti utilizzando un terreno B5 privo di rame (Cu) e zinco (Zn), denominato "mB5", la cui composizione è mostrata in Tabella 2.3.

Terreno B5 modificato (m B5)			
	mg/l		mg/l
KNO ₃	2500	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0.25
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	CoCl ₂ *6H ₂ O	0.025
MgSO ₄ *7H ₂ O	250	FeSO ₄ *7H ₂ O	27.8
CaCl ₂ *2H ₂ O	150	Na ₂ EDTA	37.3
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	150	Acido nicotinico	1.0
MnSO ₄ *H ₂ O	10	Piridossina-HCl	1.0
KI	0.75	Tiamina-HCl	10.0
H ₃ BO ₃	3.0	Mio-inositolo	100
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0		
CuSO ₄ *5H ₂ O	0		

Tabella 2.3. Composizione del terreno B5 modificato (mB5) utilizzato per la coltura di carota in alcuni esperimenti.

Entrambi i mezzi di coltura sono stati portati a pH 5,5 e sterilizzati in autoclave. Le vitamine termolabili (acido nicotinico, piridossina, tiamina, mio-inositolo) sono state aggiunte dopo la sterilizzazione, previa filtrazione con filtro da siringa MILLEX-FG 0,2 µm (Millipore S.A., Molsheim, Francia).

Trattamenti con cadmio

Trattamenti di carota in vitro

Piante di carota sterili dell'età di 30 giorni sono state trasferite, sotto cappa sterile, in beute contenenti 150 ml di terreno liquido B5, pH 5,5, con 36 μM cadmio (Cd) ($3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, Sigma, Milano, Italia). Le piante di controllo sono state trasferite in beute contenenti un identico terreno privo di Cd (0 μM Cd). Tutte le beute sono state quindi poste in cella climatica a 25 °C con fotoperiodo luce/buio di 16/8 h.

Dopo 2, 3, 4, 7 e 14 giorni, le piante di carota trattate con Cd e di controllo sono state suddivise nei vari organi per le analisi isto-anatomiche ed ultrastrutturali.

Trattamenti di carota cresciuta in vaso

Piante di carota dell'età di 60 giorni, parassitizzate e non, sono state prelevate dalla serra ed estratte delicatamente dai vasi. Le radici sono state lavate accuratamente con acqua per rimuovere il terriccio residuo. Dopo la pulizia, le piante sono state trasferite, a gruppi di tre, in beute di vetro contenenti 150 ml di mezzo liquido B5, o in alcuni casi mB5; le beute sono state poste in cella climatica a 25 °C con fotoperiodo luce/buio di 16/8 h (Figura 2.1).



Figura 2.1. Piante di carota parassitizzate con cuscuta (fila anteriore) o non parassitizzate (fila posteriore), poste in cella climatica in beute contenenti mezzo di coltura B5 liquido.

I trattamenti con Cd sono stati effettuati direttamente in beuta solo su metà delle piante, somministrando il metallo sottoforma di $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, Milano, Italia) in concentrazione pari a $36 \mu\text{M}$, per 2 e 4 giorni. L'altra metà delle piante (controlli) è stata trattata in maniera del tutto simile aggiungendo al mezzo B5 (o mB5) solo acqua distillata ($0 \mu\text{M Cd}$).

Trattamenti di cuscuta

Plantule di cuscuta dell'età di 5 giorni sono stati trasferite in piastre Petri contenenti 5 ml di terreno liquido B5 a pH 5,5 contenente $36 \mu\text{M Cd}$ (trattati) o $0 \mu\text{M Cd}$ (controlli). Il trattamento è durato 2 giorni.

Prelievi

Al termine dei trattamenti, le piante sono state escisse nelle diverse strutture e/o organi (Tabella 2.4) e i campioni di ciascun organo sono stati preparati per le varie analisi oppure refrigerati a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

	Controllo ($0 \mu\text{M Cd}$)	Trattato ($36 \mu\text{M Cd}$)
Carota	Radici	Radici
	Piccioli	Piccioli
	Lamine fogliari	Lamine fogliari
Carota parassitizzata	Radici	Radici
	Piccioli	Piccioli
	Lamine fogliari	Lamine fogliari
	Fusto di cuscuta	Fusto di cuscuta
Cuscuta	Fusto	Fusto

Tabella 2.4. Schema di prelievo dei vari organi delle piante di carota e cuscuta utilizzate negli esperimenti.

Inoltre, prima del trasferimento delle piante di carota parassitizzate in coltura liquida, alcuni fusti di cuscuta sono stati prelevati al fine di stabilirne lo stato metabolico prima di ogni trattamento e/o manipolazione; questi campioni verranno indicati come "t 0".

Studi isto-anatomici

Per gli studi isto-anatomici sono stati prelevati i seguenti campioni:

- radici, piccioli fogliari e lamine fogliari di carota *in vitro*;
- fusti di cuscuta parassitizzante carota;
- piccioli fogliari di carota parassitizzati da cuscuta.

Tali campioni, ottenuti mediante l'utilizzo di un bisturi con lama sterile e della lunghezza di circa 5 mm, sono stati immediatamente fissati in una soluzione di alcol etilico al 70%.

Di seguito si è proceduto alle preparazioni per la microscopia ottica come segue:

- immersione dei campioni in alcol etilico assoluto per 12 h. Questo passaggio è stato ripetuto una seconda volta e al termine si è eseguita una infiltrazione sotto vuoto per 15 min;
- eliminazione dell'etanolo assoluto e aggiunta di una soluzione 1:1 di alcol etilico assoluto-resina Technovit 7100 (Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Germania) per 3 h; infiltrazione sotto vuoto per 15 min;
- eliminazione della soluzione alcol-resina ed aggiunta di resina con indurente per 12 h; infiltrazione sotto vuoto per 15 min;
- eliminazione della resina.

Al termine dei precedenti passaggi, i campioni sono stati posizionati all'interno di appositi stampi, dove è stata aggiunta la resina per l'inclusione (resina+indurente+hardener II); la resina è stata lasciata polimerizzare per almeno 24 h.

I blocchetti di resina così ottenuti sono stati successivamente montati su supporti di plexiglass e tagliati utilizzando un microtomo semifine Leitz 1512 (Hexagon Metrology GmbH, Wetzlar, Germania) dotato di lama monouso Histoknife H (Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Germania). Sono state ottenute sezioni dello spessore di 3 μm .

I vetrini con le sezioni dei campioni sono stati poi colorati con una soluzione acquosa di Blu di Toluidina O (TBO) allo 0.05%, per un tempo di 30 min relativamente ai campioni di sola cuscuta e per 10 min nel caso dei campioni di carota con cuscuta. Le sezioni sono state osservate con il microscopio ottico in campo chiaro Leica DM4000 B (Leica Microsystems, Wetzlar, Germania) e le immagini sono state acquisite mediante fotocamera digitale Leica DC100, gestita dal software Leica IM50 Image Manager, versione 1.20.

Studi ultrastrutturali

Per individuare nelle cellule e nei tessuti delle piante studiate gli eventuali precipitati di Cd ed i possibili danni ad esso imputabili, è stata utilizzata la microscopia elettronica a trasmissione (TEM).

Campioni di radici, piccioli e lamine fogliari di piante di carota *in vitro*, di controllo ed esposte al Cd, sono stati fissati per immersione in glutaraldeide 1,5% solubilizzata in tampone fosfato 0,15 M, pH 6,9, per 2 h a 4 °C. I campioni sono stati quindi post-fissati in 1% osmio tetrossido in tampone fosfato 0.1 M per 2 h a 4 °C e successivamente disidratati mediante immersione in etanolo a concentrazioni crescenti (25, 50, 75, 100%).

I campioni sono poi stati inclusi in resina composta da Araldite M, Epon 812 e DDSA (Sigma, Milano, Italia) in rapporto 1:1,25:3. Come accelerante della polimerizzazione è stato usato il DMP-30 0.02% (Sigma, Milano, Italia). La resina è stata fatta polimerizzare in stufa a 40 °C per 24 h e poi a 60 °C per 3 giorni.

Sezioni ultrafini dei campioni inclusi in resina sono state ottenute mediante ultramicrotomo (Reichter Jung, Vienna, Austria) con lama di diamante (Drukker International, Cuijk, Paesi Bassi). Le sezioni ultrafini sono state montate su retini in rame (SPI, West Chester, PA, USA) e osservate, senza trattamenti di contrasto, al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) Philips CM 10 (Philips Industries, Eindhoven, Olanda) operante a 80 kV.

Determinazione dei metalli

Circa 400 mg di campione essiccato e pesato come sopra sono stati polverizzati in un mortaio e trasferiti in apposito contenitore di TMF (Tetrafluorormethaxil[®], materiale simile al Teflon ma ad alto potere isolante, resistente ad alte temperature e ad attacchi acidi). Nel contenitore sono stati aggiunti 2,5 ml di HNO₃ al 65% e 0,5 ml di H₂O₂ al 30% (v/v); il tutto è stato poi racchiuso in un mantello di protezione su cui è stato posizionato un coperchio in TMF.

I contenitori pieni sono stati inseriti in un blocco rotore che a sua volta è stato posizionato in un apposito forno a microonde, modello MLS-1200 MEGA (Milestone Inc.,

Shelton, CT, USA), in cui si è effettuato un ciclo completo di mineralizzazione (Tabella 2.5), dove alla digestione operata dall'acido nitrico e dal perossido di idrogeno si abbina il potere di penetrazione delle microonde.

Step	Tempo [min]	Potenza [W]
1	2:00	250
2	2:00	0
3	6:00	250
4	5:00	400
5	5:00	600

Tabella 2.5. Condizioni operative del ciclo di mineralizzazione

Ogni campione mineralizzato è stato quindi trasferito in un matraccio da 10 ml e portato a volume con acqua distillata e deionizzata: questa soluzione è stata analizzata mediante uno spettrofotometro ad emissione atomica con sorgente al plasma ad accoppiamento induttivo (ICP-AES) in configurazione radiale, modello JY ULTIMA 2 (HORIBA Jobin Yvon Inc., Edison, NJ, USA), le cui caratteristiche sono elencate in Tabella 2.6. Le condizioni operative per l'utilizzo sono evidenziate in Tabella 2.7.

Monocromatore:	
Modello	JY Ultima 2
Lunghezza focale	1 m
Reticolo	2400 grooves/mm
Fenditura d'entrata, regolabile	10 μm , 20 μm
Fenditura d'uscita, regolabile	15 μm , 80 μm
Risoluzione	5 pm
Flusso d'azoto	2 l/min
Sorgente ICP:	
Nebulizzatore	Meinhard
Camera di nebulizzazione	Ciclonica modificata per idruri (CMA)
Flusso d'argon	12 l/min
Intervallo di lunghezze d'onda	160-785 nm
Temperatura banco ottico	32 °C

Tabella 2.6. Caratteristiche strumentali dello spettrofotometro JY ULTIMA 2

Power generator (normal condition)	1000 W
Plasma Gas Flow rate	12 l/min
Auxiliary Flow rate	0
Nebulization Pressure	3 bar
Nebulization Flow rate	0.50 l/min
Pump speed	20 rpm

Tabella 2.7. Condizioni operative dello spettrofotometro

La scelta delle lunghezze d'onda è stata effettuata prendendo in esame per ciascun metallo la riga di emissione con intensità relativa maggiore, dopo aver stabilito che non vi fossero interferenze spettrali tra gli i vari metalli, né con le righe di emissione dell'argon. Le lunghezze d'onda utilizzate per i metalli analizzati in questo lavoro sono state: Cd: 228,802 nm, Cu: 224,700 nm, Zn: 213,856 nm.

Analisi del contenuto in glutazione e fitochelatine

Circa 400 mg di ogni campione sono stati omogenati a freddo per 10 min in un mortaio contenente un filtro GF/C (Whatman International Ltd., Maidstone, UK), in presenza di 400 μ l di una soluzione composta da 5% (v/w) acido 5-solfosalicilico (SSA) e da 6.3 mM acido dietilentriaminopentacetico (DTPA), secondo il protocollo descritto da de Knecht *et al.* (1994). L'omogenato, addizionato di 600 μ l di acqua distillata, è stato trasferito in una provetta precedentemente pesata; la provetta piena è stata a sua volta pesata.

Le provette sono state quindi centrifugate due volte per 10 min a 18000 X *g*; il supernatante è stato filtrato con filtri Minisart RC4 (Sartorius, Goettingen, Germania), riposto in altre provette e mantenuto in ghiaccio e al buio.

Tali supernatanti (denominati "estratti") sono stati analizzati mediante un sistema HPLC schematicamente rappresentato in Fig. 2.2, munito di un "loop" di iniezione da 200 μ l.

I peptidi tiolici contenuti negli estratti sono stati separati per mezzo di una colonna C₁₈ a fase inversa, munita di pre-colonna. La separazione è stata condotta in gradiente lineare, utilizzando acido trifluoroacetico allo 0.05% (v/v) in 0-26% acetonitrile/acqua, con flusso pari 0,7 ml min⁻¹. I peptidi tiolici sono stati rilevati ad una

lunghezza d'onda di 412 nm, a seguito di derivatizzazione post-colonna con il reagente di Ellman (DTNB, acido 5,5'-ditio(2-nitrobenzoico) (Sigma, Milano, Italia) ad una concentrazione di 300 μM e ad un flusso di 0,35 ml min^{-1} . La derivatizzazione è stata effettuata in una "camera" avente un volume totale di circa 2,0 ml, termostata a 50 °C.

Come standard di ritenzione sono stati impiegati i seguenti prodotti: glutatione ridotto (GSH, Merck, Darmstadt, Germania) e standard di fitochelatine da *Silene vulgaris* (Moench) Garcke, gentilmente forniti dal Prof. M.H. Zenk, Halle-Saale, Germania. La determinazione quantitativa dei peptidi tiolici (espressa in nmol SH g^{-1} peso fresco) è stata effettuata basandosi su una curva di calibrazione costruita utilizzando concentrazioni note di GSH standard.

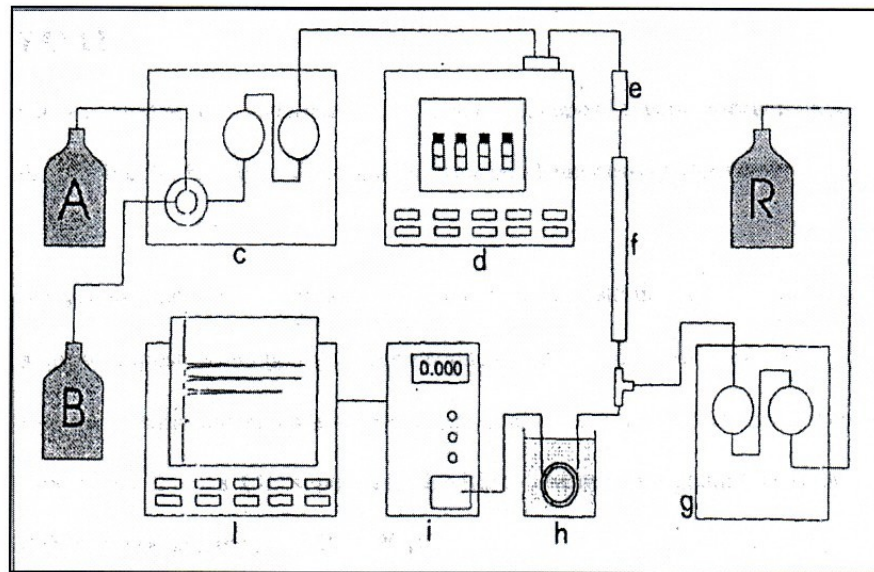


Figura 2.2. Rappresentazione del sistema HPLC: A) $\text{H}_2\text{O}+0.05\%$ TFA; B) 50% acetonitrile-50% $\text{H}_2\text{O} +0.05\%$ TFA; c) pompa per gradiente, modello 200 (Perkin Elmer Waltham, MA, USA); d) autocampionatore; e) pre-colonna; f) colonna cromatografica LiChroCART® 125-3 Purospher® (Merck KGaA, Darmstadt, Germania); g) pompa isocratica, modello 322 (Kontron Instruments Ltd, Bletchley, UK); h) bagno termostatico, modello RT 2000 (Regatorm, Milano, Italia); i) rivelatore, modello 430 (Kontron Instruments Ltd, Bletchley, UK); l) computer; R) reagente di Ellman. Modificato da Kneer, 1993.

Caratterizzazione delle fitochelatine in spettrometria di massa

Per l'analisi delle fitochelatine di cuscuta, gli estratti sono stati ottenuti con lo stesso procedimento usato per l'analisi in HPLC. Le fitochelatine presenti negli estratti sono state preventivamente separate mediante un cromatografo liquido Alliance 5640 (Waters) dotato di colonna Gemini C18 110Å (Phenomenex, Torrance, CA, USA), usando lo stesso gradiente per la separazione in HPLC, con flusso pari a 200 $\mu\text{l min}^{-1}$.

Le fitochelatine separate sono poi state analizzate mediante uno spettrometro di massa Quattro LC con analizzatore a triplo quadrupolo (Micromass, Manchester, UK), dotato di sorgente *electrospray* e assistito pneumaticamente. I parametri operativi utilizzati sono stati i seguenti: voltaggio ESI 3.5 kV, voltaggio del cono 30 V, lenti rf 0.2 V, temperatura della sorgente 130 °C, temperatura di desolvatazione 250 °C. L'acquisizione del segnale degli ioni positivi è stata effettuata in modalità full-scan e Selected Ion Monitoring. Gli esperimenti MS/MS sono stati condotti in una cella di collisione con una pressione di 2.3×10^{-3} mbar e un range di m/z settato in funzione della massa molecolare della fitochelatina.

Analisi delle proteine

I campioni di cuscuta e di carota trattati con Cd e di controllo sono stati polverizzati in mortaio mediante azoto liquido. Per l'estrazione delle proteine sono stati utilizzati circa 200 mg di ogni campione polverizzato e 500 μl di tampone di estrazione. Al fine di individuare il miglior tampone per estrarre le proteine contenute nei vari campioni di cuscuta e di carota, sono stati saggiati tamponi di diversa composizione (Tabella 2.8).

A seguito di tutte le prove condotte, il Tampone 3 si è dimostrato il più idoneo per l'estrazione delle proteine dai campioni di cuscuta, mentre il Tampone 6 si è rivelato il migliore per le foglie e per le radici di carota.

Tampone 1		Tampone 2		Tampone 3	
Hepes pH 8	100 mM	Tris HCl pH 8	60 mM	Tris HCl pH 8	20 mM
Sorbitolo	250 mM	Glicerolo	10%	Sodio ascorbato	100 mM
MgCl ₂	10 mM	PMSF	2 mM	PMSF	1 mM
KCl	10 mM	Benzamidina	1 mM	Benzamidina	1 mM
EDTA	1 mM	Leupeptina	1 μM	Leupeptina	1 μM
DTT	2 mM				
PMSF	1 mM				
Benzamidina	1 mM				
Leupeptina	1 μM				

Tampone 4		Tampone 5		Tampone 6	
Tris HCl pH 8	100 mM	Tris HCl pH 8	50 mM	Tris HCl pH 8	50 mM
Na-EDTA	50 mM	NaCl	10 mM	MgSO ₄	10 mM
KCl	100 mM	DTT	1 mM	β-mercaptoetanolo	0.1%
β-mercaptoetanolo	2%	PMSF	2 mM	PMSF	2 mM
DTT	1 mM	Benzamidina	1 mM	Benzamidina	1 mM
PMSF	0.1 mM	Leupeptina	1 μM	Leupeptina	1 μM
Benzamidina	1 mM				
Leupeptina	1 μM				

Tabella 2.8. Tamponi utilizzati nelle prove di estrazione delle proteine da cuscuta e carota e relativi riferimenti bibliografici. Tampone 3: Sanità di Toppi *et al.*, 1999; Tampone 4: Hawkesford e Belcher, 1991; Tampone 5: Thierry *et al.*, 1999; Tampone 6: Pirondini *et al.*, 2006.

SDS-PAGE

Le proteine estratte dai campioni di cuscuta e carota sono state analizzate mediante SDS-PAGE su gel di poliacrilammide all'11%.

Poiché la resa in proteine dei campioni di radici e lamine fogliari di carota si è rivelata nel complesso bassa, è stato necessario effettuare una precipitazione di proteine con acetone-TCA 10% (v/w). Quattro volumi di acetone-TCA sono stati aggiunti ad ogni volume di campione e la precipitazione è stata fatta avvenire a -20 °C per tutta la notte; i campioni sono stati centrifugati per 15 min a 4 °C, lavati con acetone e risospesi in Tris-HCl 20 mM, pH 8,0.

La corsa elettroforetica è stata condotta nell'apparato Mini-PROTEAN® 3 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) per 45 min a 30 mA (gel singolo) oppure a 60 mA (due gel), con corrente costante (alimentatore PS 305 della Apelex, Massy Cedex, Francia). Al termine della corsa, i gel sono stati colorati per 2 h con il colorante PhastGel™ Blue R (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Svezia) e decolorati

overnight con una soluzione acido acetico 10%-etanolo 20% (v/v). Le immagini dei gel sono state acquisite mediante scanner CanoScan LIDE 60 (Canon Italia S.p.A., Milano, Italia).

Western blot

Campioni di cuscuta sono stati analizzati tramite *western blot*. Come controllo positivo è stata utilizzata la proteina *AtPCS1* ottenuta da Ruotolo *et al.* (2004). Il procedimento del *western blot* è rappresentato in Figura 2.3.

Tutti i campioni sono stati separati mediante SDS-PAGE e le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa Hybond-ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Inc. Uppsala, Svezia) per 1 h a 100 mA, mediante l'apparato Mini-PROTEAN® 3 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) munito degli opportuni accessori per il trasferimento.

Le membrane sono state colorate con Ponceau S per controllare la corretta separazione elettroforetica e successivamente decolorate con acqua distillata.

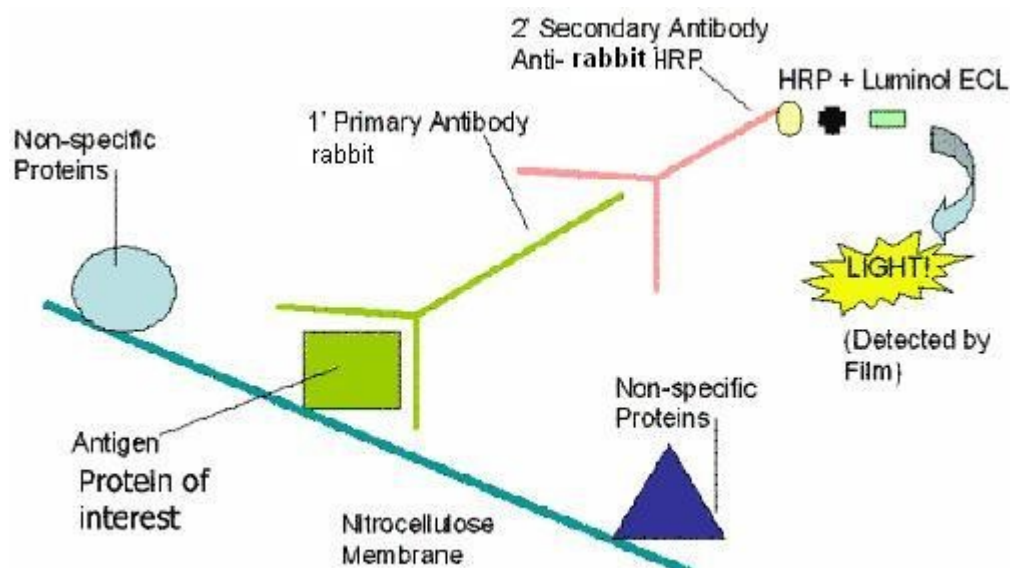


Figura 2.3. Rappresentazione della tecnica "*western blot*" impiegata. La proteina di interesse che deve essere riconosciuta ("antigen") è legata insieme a tutte le altre proteine ("non-specific proteins") ad una membrana di nitrocellulosa. L'anticorpo primario, prodotto in coniglio, si lega solo al suo corretto antigene. L'anticorpo secondario, prodotto contro la porzione FC dell'anticorpo di coniglio, si lega al primario. L'anticorpo secondario è coniugato con la perossidasi di rafano (HRP) che, reagendo con gli opportuni substrati, produce un segnale luminoso registrabile da una lastra fotografica.

Le membrane sono state poi bloccate con TTBS (10 mM Tris-base, 200 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,4), contenente 5% BSA (Sigma, Milano, Italia) e 0,05% Fish skin gelatin, per 120 min a temperatura ambiente. Successivamente è stato aggiunto, a 4 °C per tutta la notte, l'anticorpo primario anti-fitochelatina sintasi 1 di *Brassica juncea* ("anti-*Bj*PCS1", Heiss *et al*, 2003), prodotto in coniglio, alla diluizione 1:10000. Dopo il lavaggio delle membrane per quattro volte con TTBS, è stato aggiunto per 60 min a temperatura ambiente l'anticorpo secondario Goat anti-rabbit IgG H+L (Biomeda Corporation, Foster City, CA, USA), coniugato con la perossidasi di rafano (HRP), alla diluizione 1:10000. Le membrane sono state poi lavate con TTBS ed immerse nella soluzione SuperSignal West Pico (Pierce, Rockford, IL, USA) che, reagendo con l'HRP, produce un segnale luminoso in corrispondenza della banda specifica.

Le membrane sono state infine esposte ad una lastra fotografica Biomax (Kodak, Milano, Italia) a tempi diversi, per registrare il segnale luminoso emesso.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta tramite il software SPSS Statistic 17.0. I confronti tra due campioni sono stati eseguiti mediante *t*-test per campioni indipendenti ($P < 0,05$), preceduto dalla verifica delle omogeneità delle varianze con il test di Levene. S= differenza statisticamente significativa; NS= differenza non significativa.

Il confronto delle medie tra più di due campioni è stato effettuato mediante ANOVA univariata ($P < 0,05$), seguita dal test *a posteriori* di Tukey. A campioni con differenze statisticamente significative sono state associate lettere diverse nelle Figure.

Morfologia delle colture *in vitro*

Le piante di carota allevate *in vitro* utilizzate in questo lavoro di dottorato sono state ottenute a partire da semi della varietà Berlicum. Tale varietà è definita dai testi di botanica orticola "a radice grossa e lunga, cilindrica, con punta ottusa e di colore rosso-arancione". Dopo 30 giorni di coltura *in vitro*, le piante della varietà Berlicum si presentavano come in Figura 3.1.

In particolare, si osservava una parte aerea formata da foglie basali laciniate, munite di lunghi e robusti piccioli convergenti nel colletto (fascicolati). Tali piccioli, di colore verde, presentavano talora sfumature rosso-violacee, probabilmente attribuibili a pigmenti antocianici. Sempre dal colletto dipartivano le due foglie cotiledonari, generalmente abbastanza persistenti. L'ipocotile si presentava di colore rosso-brunastro ed era distinguibile dalla radice principale per l'assenza di radici laterali (salvo eccezioni). La radice principale fittonante si ingrossava subito al di sotto dell'ipocotile ed era caratterizzata dalla presenza di numerose radici laterali.

Nel 1940, Katherine Esau descrisse dettagliatamente l'anatomia della radice di carota, utilizzando la varietà Imperatore. Sebbene la maggior parte delle caratteristiche morfologiche delle due varietà siano simili, la principale differenza risiede nella potenzialità morfogenetica dell'ipocotile: nella varietà Berlicum, l'ipocotile funziona da struttura di collegamento tra radice principale e colletto, e non prende parte alla formazione della radice carnosa commestibile; nella varietà Imperatore, invece, a maturità l'ipocotile si ingrossa come la radice principale e contribuisce a formare la parte superiore della radice carnosa.

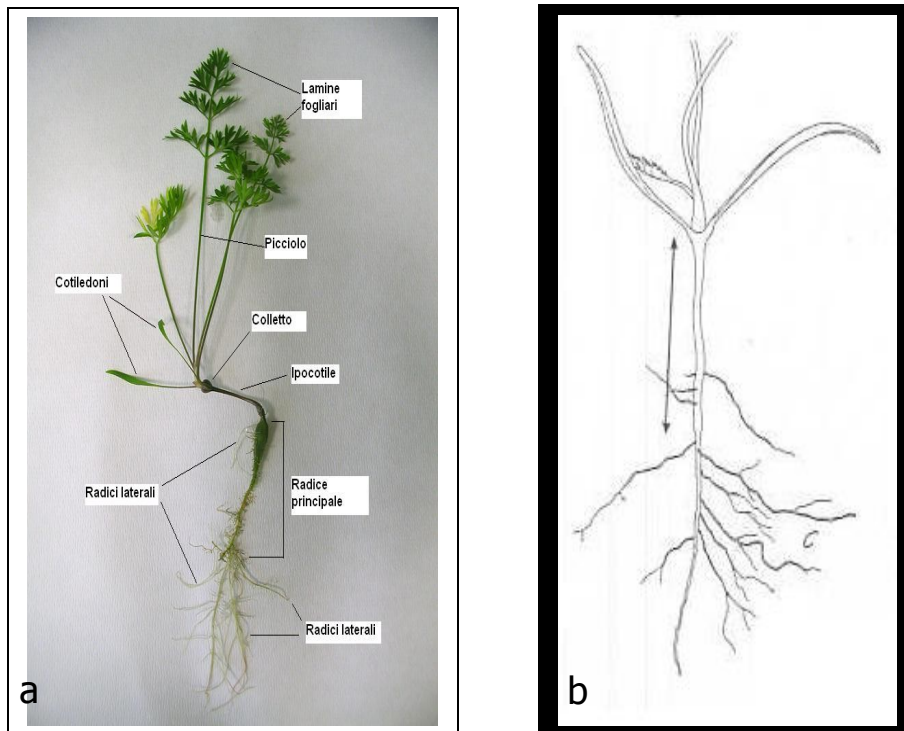


Figura 3.1. a) Pianta di carota, varietà Berlicum, dell'età di 30 giorni cresciuta *in vitro*. b) Rappresentazione di una pianta di carota, varietà Imperatore, dell'età di 25 giorni (Esau, 1940). La freccia indica l'ipocotile.

Studi isto-anatomici delle colture *in vitro*

Radice principale: cuffia, apice e zona di differenziazione

L'apice della radice si presentava protetto da una cuffia (Figura 3.2), nella quale era possibile distinguere una columella caratterizzata da cellule contenenti un certo numero di statoliti. Dall'osservazione sembrava plausibile che la cuffia fosse originata da un dermatocaliptrogeno. La cuffia si estendeva lateralmente mediante cellule periferiche fino a contornare l'apice e raggiungere la zona di differenziazione (Figura 3.2).

Nell'apice meristemato (Figura 3.2), ad organizzazione aperta, era possibile riconoscere le cellule meristematiche primarie, piuttosto poliedriche, appressate (senza spazi intercellulari) e con parete sottile.

Nella zona di differenziazione (Figura 3.2 a, b, c) si distinguevano due tessuti meristemati che poi andavano a differenziare i tessuti adulti tipici della zona di struttura primaria: il meristema fondamentale che formava i tessuti parenchimatici della corteccia, ed il meristema procambiale da cui derivava il tessuto vascolare del cilindro centrale. Tali tessuti meristemati primari si presentavano regolarmente conformati e la

distensione delle loro cellule procedeva regolarmente via via che li si osservava sempre più prossimalmente. Per quanto riguardava invece il protoderma, questo – poiché derivato da un dermatocaliptrogeno – non era facilmente distinguibile dalle porzioni laterali della cuffia (Esau, 1940) (Fig. 3.2 a, b, c), come peraltro confermato da Evert (2006) per altre dicotiledoni.

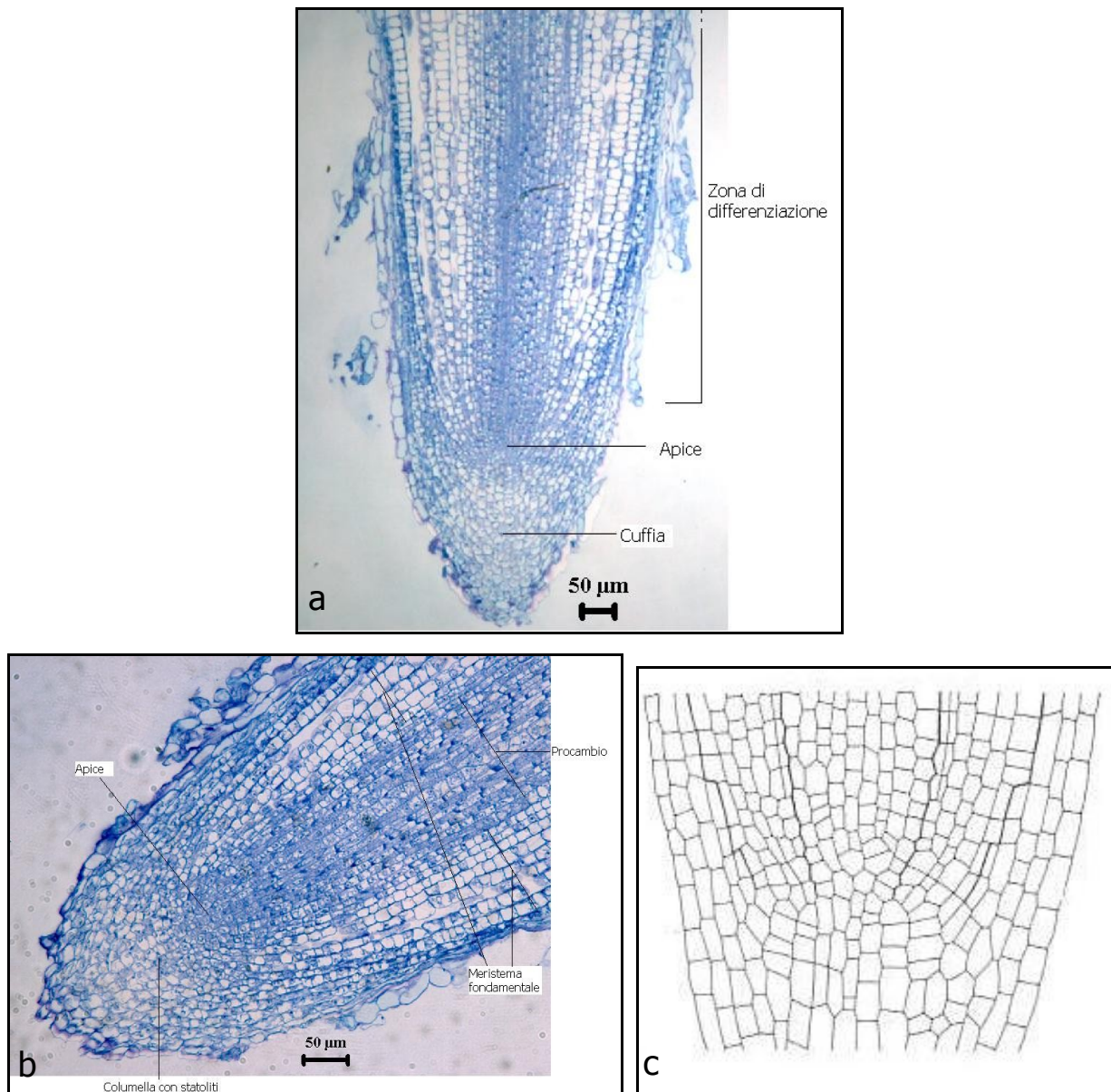


Figura 3.2. Struttura della porzione terminale della radice principale di carota. a) Sezione longitudinale della radice comprendente la cuffia, l'apice meristematico e la zona di differenziazione. b) particolare in sezione longitudinale della cuffia, dove sono visibili gli statoliti, dell'apice, e dei meristemi fondamentale e procambiale; c) illustrazione dell'apice radicale di carota in sezione longitudinale. Le linee nere marcate indicano i limiti del cilindro centrale e della corteccia (da Esau, 1940).

Radice principale: zona di struttura primaria

In sezione trasversale, si osservavano il rizoderma, la corteccia ed il cilindro centrale (stele) (Figura 3.3).

Il rizoderma non si presentava in generale ben evidente, cosa che invece avveniva nell'ipocotile (Figura 3.5); quando visibile, era generalmente monostratificato e possedeva un numero esiguo di peli radicali.

Il parenchima corticale, nei suoi strati più esterni presentava cellule più piccole e di forma tendenzialmente poliedrica (Figura 3.3 a), mentre nella parte più interna era caratterizzato da cellule più grandi, di forma irregolare e con ampi spazi intercellulari (Figura 3.3 a). L'ultimo strato di cellule della corteccia, quello più interno a contatto con il periciclo, formava un endoderma (Figura 3.3 a, b), che secondo Esau (1940), nella radice primaria di carota è munito di una ben differenziata banda del Caspary.

Per quanto riguarda il cilindro centrale, il periciclo formava un continuo monostrato nelle zone adiacenti al floema; negli altri punti si presentava bistratificato, come osservato anche da Esau (1940). Xilema e floema erano localizzati internamente al periciclo e centralmente, disposti in modo da formare un'actinostele diarca, con due arche xilematiche e due arche floematiche ed interposto del parenchima (Figura 3.3 a). Nella porzione esterna dell'arca xilematica gli elementi di conduzione erano di diametro più piccolo (protoxilema), mentre verso il centro della stele il diametro degli elementi di conduzione aumentava notevolmente (metaxilema) (Figura 3.3 a).

I primi eventi del passaggio da struttura primaria a struttura secondaria, osservati in alcune radici, avevano evidenziato la formazione di un sottile strato cambiale attivo e conseguentemente di alcuni tessuti secondari di conduzione (Figura 3.3 b,c).

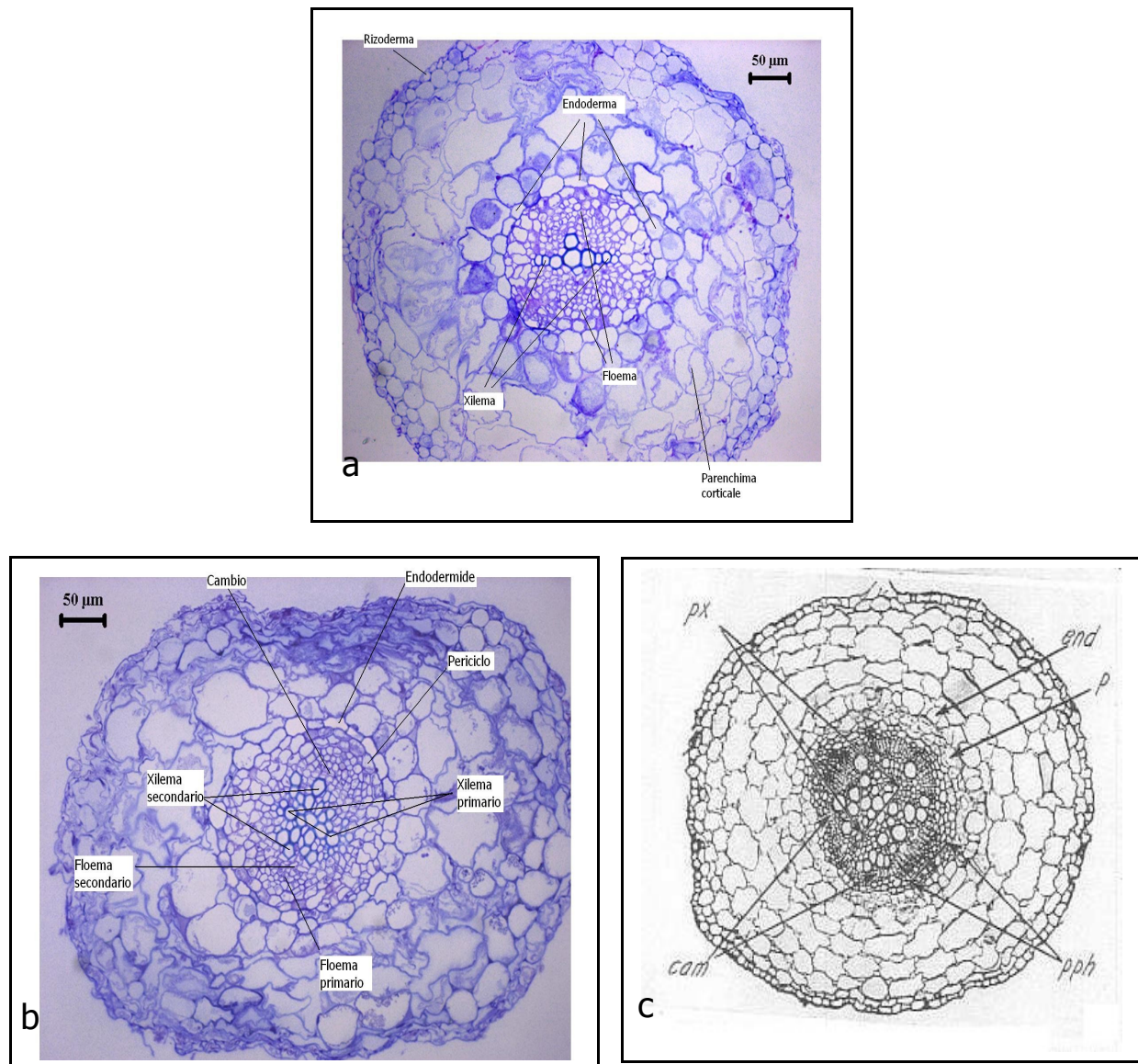


Figura 3.3. Sezioni trasversali della radice principale di carota, prevalentemente in struttura primaria. a) Zona distale; b) zona più prossimale; c) transizione da struttura primaria a secondaria in radice di 25 giorni. Alcuni tessuti vascolari secondari sono stati prodotti, ma la corteccia è ancora intatta (da Esau, 1940). end= endoderma, p= periciclo, px= xilema primario, cam= cambio, pph= floema primario..

Radice principale: zona di struttura secondaria

In alcune radici, in zona più prossimale rispetto alla zona di struttura primaria, l'attività del cambio cribro-vascolare aveva determinato l'ingrossamento diametrico della regione centrale a scapito della corteccia (Figura 3.4 a, b); l'accrescimento in spessore era dovuto soprattutto alla formazione di un abbondante parenchima di origine secondaria (generato dal cambio cribro-vascolare, Esau, 1940), che separava il floema

secondario dal periciclo. Quest'ultimo, attraverso attive divisioni, dava origine ad alcuni strati di parenchima da cui prendeva origine il cambio subero-fellodermico (Figura 3.4 b), che avrebbe alla fine portato alla formazione di un periderma.

Al termine del completamento della struttura secondaria (dopo circa 40-50 giorni), la radice di carota si sarebbe presentata come in Figura 3.4 c; tuttavia, ciò non è stato mai direttamente osservato poiché le piante utilizzate negli esperimenti qui condotti avevano un età di 30 giorni. In generale, comunque, un fittone di carota maturo presenta due distinte regioni, una centrale costituita principalmente da xilema secondario, ed una periferica costituita da floema secondario, parenchima e periderma.

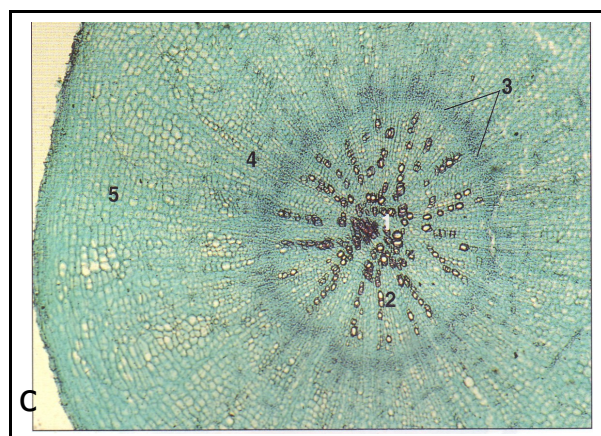
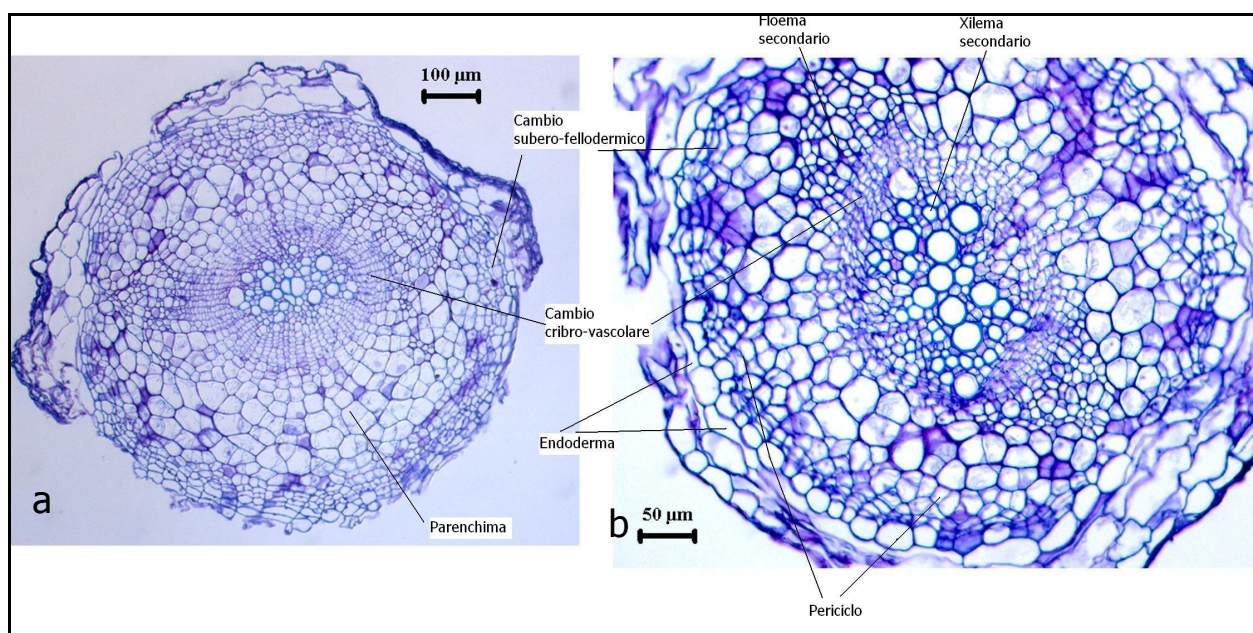


Figura 3.4. Sezioni trasversali della radice principale di carota. a) A seguito del differenziamento dei due cambi, alcuni tessuti secondari si sono sviluppati a scapito della corteccia; b) il cambio cribro-vascolare ha differenziato xilema e floema secondari, mentre il fellogeno si è attivato, ma non ha ancora prodotto strati significativi di felloderma e sughero; c) radice di carota a maturità: 1- xilema primario, 2- xilema secondario, 3- cambio cribro-vascolare, 4,5- floema secondario (tratto da Bowes, 1996).

Ipocotile

In sezione trasversale si osservava un'epidermide continua (più regolare e distinguibile rispetto al rizoderma della radice), un parenchima corticale ben sviluppato e, più all'interno, una regione centrale (Figura 3.5 a, b). Le cellule della corteccia erano di forma tondeggiate o schiacciata, con esigui spazi intercellulari. Nella regione centrale era visibile un cambio cribro-vascolare attivo, che produceva tessuti secondari (Figura 3.5 b, c). Nell'ipocotile, a differenza della radice, il passaggio da struttura primaria a struttura secondaria non aveva causato, almeno nei casi osservati, la quasi completa distruzione del parenchima corticale (Fig. 3.5 c).

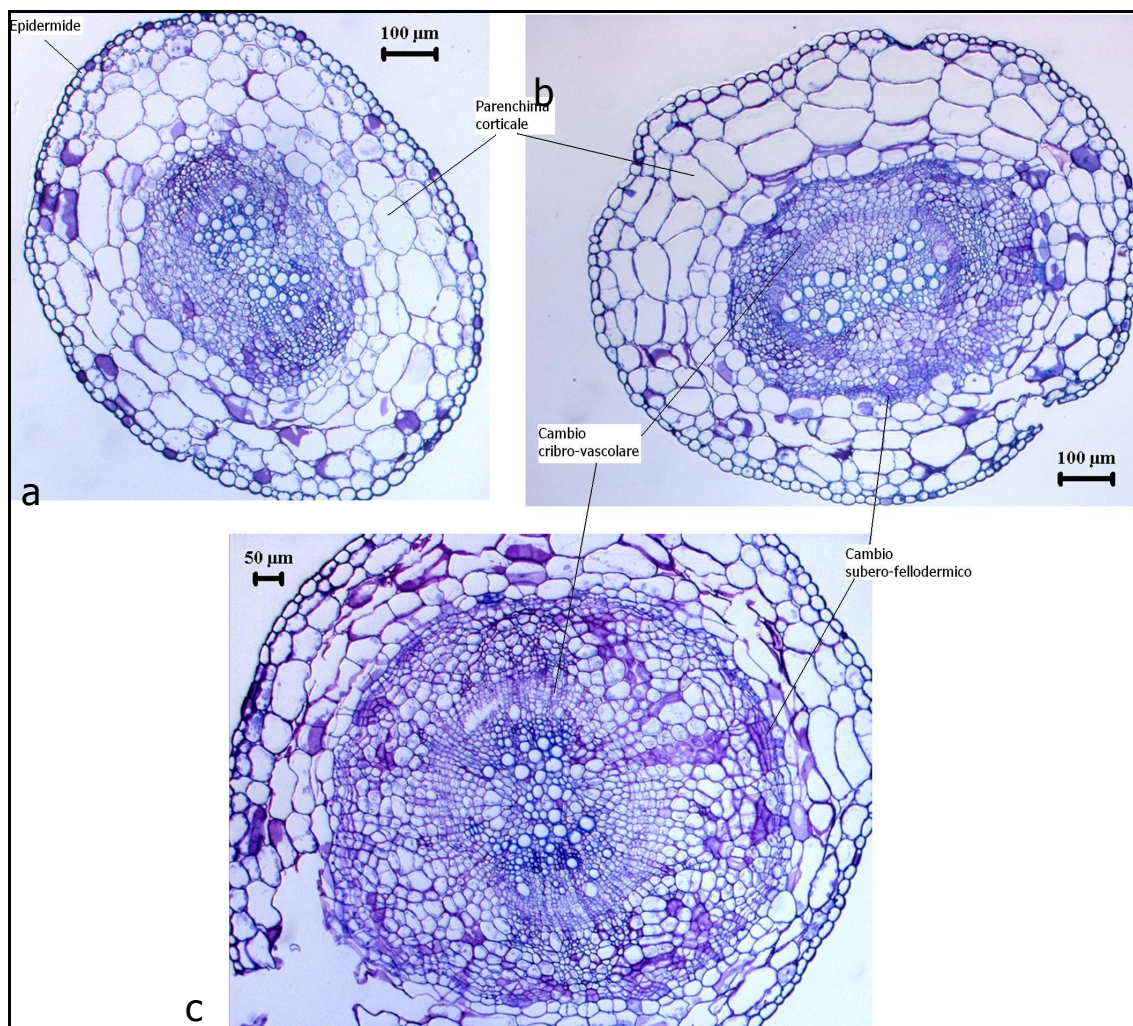


Figura 3.5. Sezione trasversale dell'ipocotile di carota. a, b) Fase di transizione precoce ed intermedia a struttura secondaria; c) ipocotile in struttura secondaria ben differenziata.

Radici laterali

Le radici laterali (Figura 3.6 a, b, c) non differivano significativamente, dal punto di vista isto-anatomico, dalla radice principale sopra mostrata. È interessante notare, tuttavia, che in alcuni casi sono state osservate radici laterali triarche (Fig. 3.6 d).

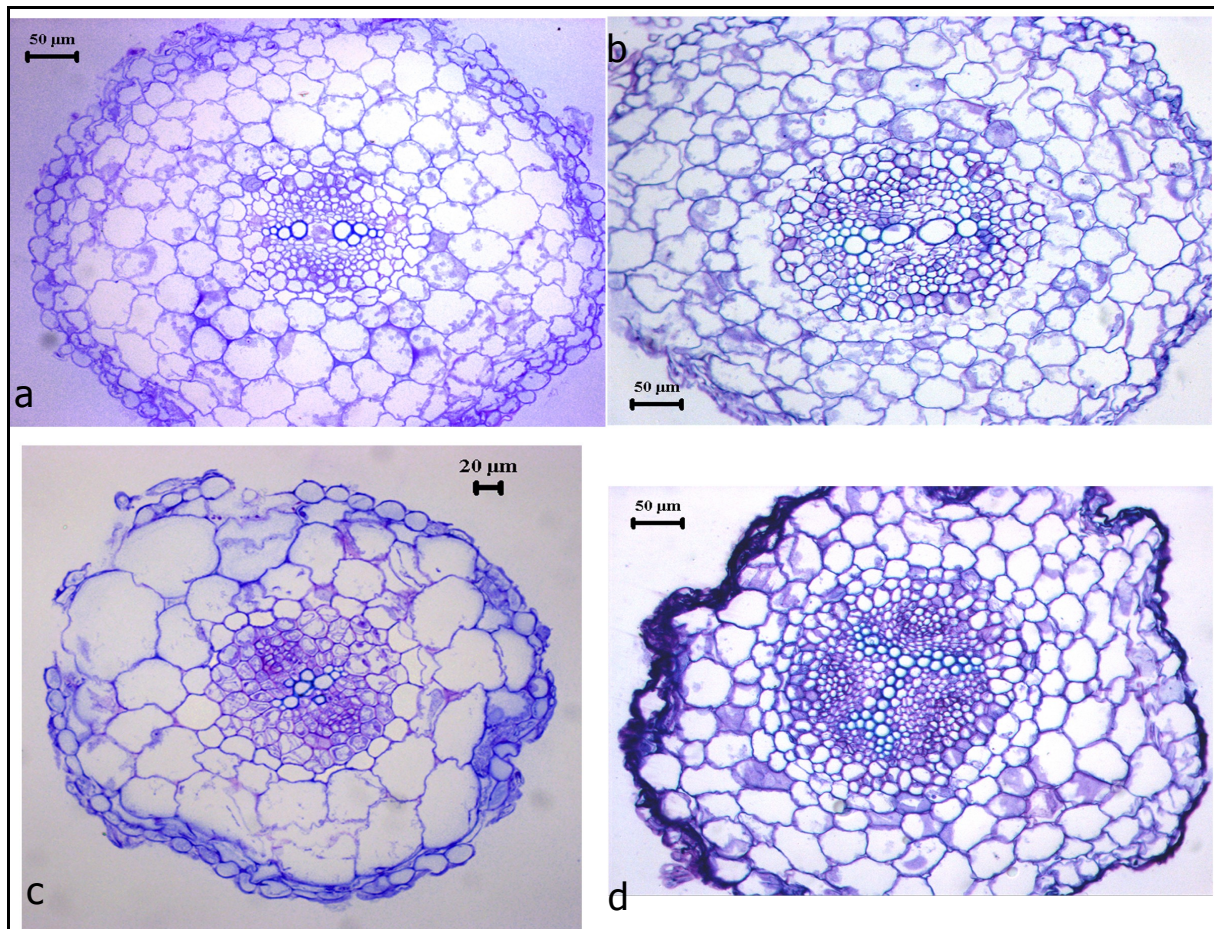


Figura 3.6. Sezioni trasversali di radici laterali di carota. a, b, c) Sequenza di sezioni da distale a prossimale. È possibile notare gli stadi di formazione delle arche xilematiche e floematiche; d) radice laterale triaca. Per la descrizione delle varie strutture, fare riferimento ai paragrafi relativi alla radice principale.

Picciolo fogliare

Come sopra richiamato, carota è una dicotiledone biennale che nel primo anno non sviluppa un fusto, ma soltanto una rosetta di foglie lungamente picciolate, direttamente connesse con la parte alta della regione del colletto. Pertanto, da un punto di vista strettamente botanico, nel primo anno di crescita della pianta non è corretto parlare di "fusto", sebbene i piccioli fogliari si comportino funzionalmente a tutti gli effetti come fusti, permettendo la movimentazione dei soluti dalle radici alle foglie e viceversa.

Ciò detto, i piccioli osservati si presentavano di colore verde (talora con sfumature rossastre per la possibile presenza di antociani), di forma poliedrica e con diverse costole sporgenti piuttosto rigide (Figura 3.7 a).

In sezione trasversale, procedendo dall'esterno verso l'interno si riconosceva chiaramente un'epidermide monostratificata, seguita da un parenchima fondamentale costituito più esternamente da un doppio strato di cellule ricche di cloroplasti, a formare un vero e proprio clenchima, con numerosi spazi intercellulari. Più all'interno, il parenchima fondamentale era caratterizzato da cellule tondeggianti di grosse dimensioni, con pareti sottili e ridotti spazi intercellulari. In posizione subepidermica, a formare le costole, ben rappresentati erano i cordoni di tessuti meccanici, soprattutto collenchimi e, talvolta, anche sclerenchimi (a seconda delle dimensioni e dell'età dei piccioli fogliari) (Figura 3.7 b). Inoltre, nel parenchima fondamentale erano visibili anche i dotti oleiferi, localizzati prevalentemente in corrispondenza di ogni cordone meccanico, appena più all'interno (Figura 3.7 b).

Ancora, sempre immersi nel parenchima fondamentale, vi erano i fasci cribrovascolari, in numero variabile (6 o 8) a seconda del campione osservato; la distribuzione dei fasci appariva essere simmetrica rispetto ad un piano di divisione mediano.

In ogni fascio, di tipo collaterale aperto (Fig. 3.7 c,d), si distinguevano una porzione xilematica ed una porzione floematica, separate dal procambio oppure, spesso, da un cambio precocemente attivo.

Nel fascio era possibile distinguere da una parte abbondante xilema, costituito per lo più da trachee, fibre e cellule parenchimatice. Le pareti longitudinali dei vasi

erano fortemente irrobustite per la presenza di una spessa parete secondaria che appariva lignificata. Più internamente rispetto allo xilema primario, il cambio sembrava aver differenziato un piccolo strato di xilema secondario, costituito da tracheidi a cui erano associate alcune cellule parenchimatiche.

Come atteso, dalla parte opposta rispetto allo xilema, il fascio presentava il floema primario. Inoltre, anche se non ben distinguibile, era probabile che il cambio avesse prodotto anche un piccolo strato di floema secondario un po' più all'interno rispetto al floema primario.

A ridosso e un po' più esternamente del floema, i fasci presentavano una zona di tessuto meccanico (sclerenchimi e/o collenchimi) più o meno estesa. Inoltre, dalla parte opposta e a ridosso dello xilema, nei fasci più grandi era presente una calotta meccanica (prevalentemente sclerenchimatica), mentre nei fasci più piccoli si osservava solo qualche cellula sclerenchimatica, e non una vera e propria calotta (Fig. 3.7 d).

Lamina fogliare

La foglia di carota è fortemente laciniata e, per quanto riguarda la sua anatomia microscopica, in sezione trasversale appariva come una tipica foglia dorso-ventrale ipostomatica, composta da un'epidermide superiore più cutinizzata rispetto all'epidermide inferiore e da un mesofillo caratterizzato da "classici" parenchimi a palizzata e lacunoso. Era inoltre possibile riconoscere anche dei fasci conduttori immersi nel mesofillo. Nel fascio, di tipo collaterale chiuso, lo xilema si presentava rivolto verso la superficie adassiale della lamina, mentre il floema verso quella abassiale.

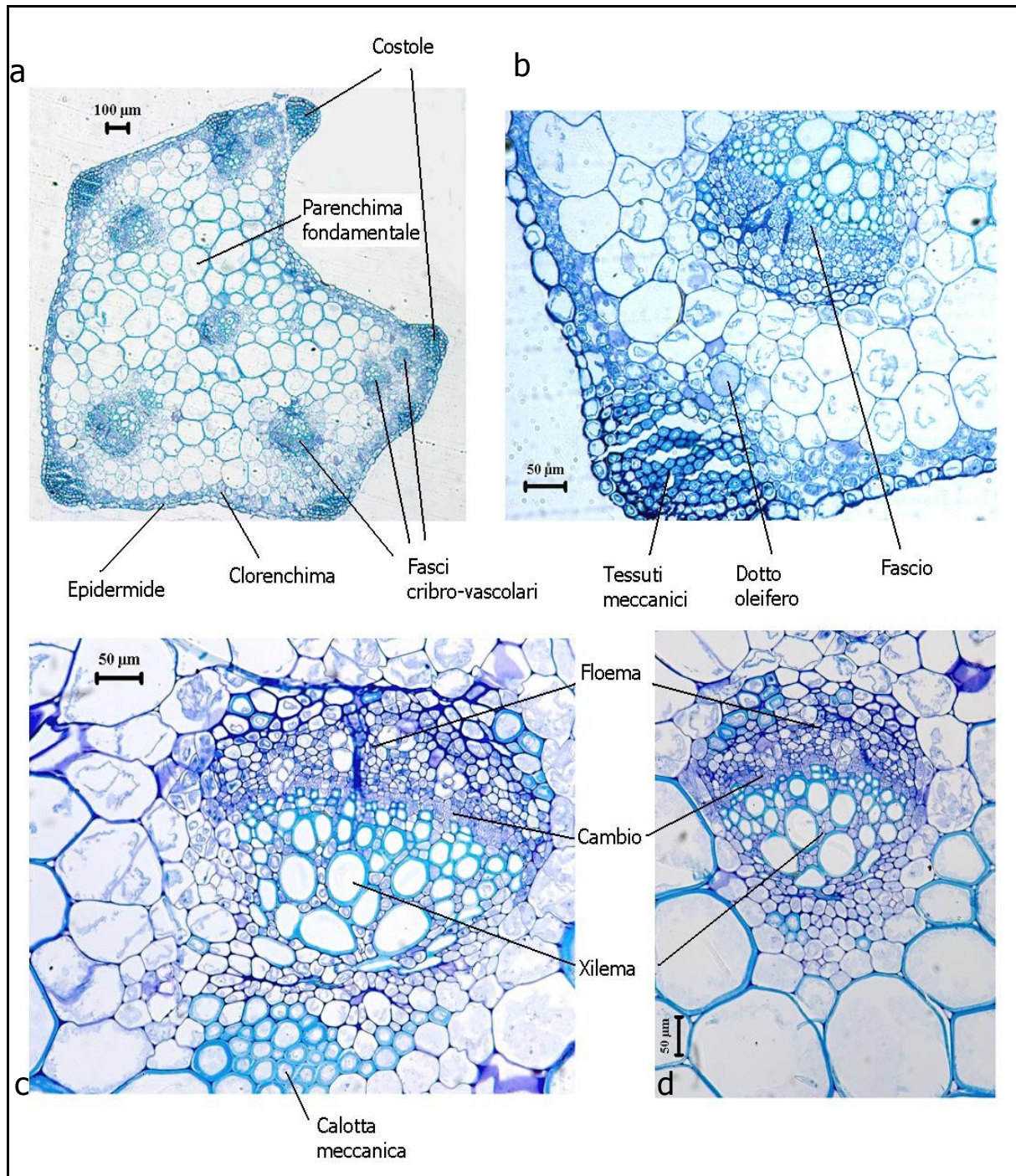


Figura 3.7. Sezioni trasversali del picciolo fogliare di carota. a) Immagine d'insieme a basso ingrandimento; b) costola, doppio strato di cellule del clorenchima, dotto oleifero e fascio cribro-vascolare; c) nel fascio cribro-vascolare di grosse dimensioni si nota uno xilema molto esteso, separato dal floema per mezzo del cambio. Al di sotto dello xilema è presente una calotta meccanica; d) fascio vascolare di piccole dimensioni.

Effetti del cadmio sull' isto-anatomia delle radici di carota

Tali effetti sono stati studiati su piante dell'età di 30 giorni cresciute *in vitro* e trattate con la concentrazione di 36 μM Cd per 2, 3, 4, 7, 14 giorni.

Indagini isto-anatomiche

A tempi brevi di trattamento, quali 2-3 giorni, gli effetti del Cd sulla radice principale e sulle radici laterali non erano particolarmente evidenti. Effetti più marcati si sono invece riscontrati a partire dal quarto giorno di trattamento.

Gli effetti del Cd nelle radici laterali erano visibili già a carico della regione in cui la zona di differenziazione "sconfinava" nella zona di struttura primaria; qui si osservava lo scollamento del meristema fondamentale (o del parenchima corticale neo-formato) dal procambio (o dal cilindro centrale neo-formato, Figura 3.8 a, b), con formazione di vere e proprie lacune. In più, macroscopicamente la regione di cui sopra appariva di colore grigio-nero, probabilmente necrotica.

In zone più prossimali della radice laterale, tuttavia, non si osservavano ulteriori danni.

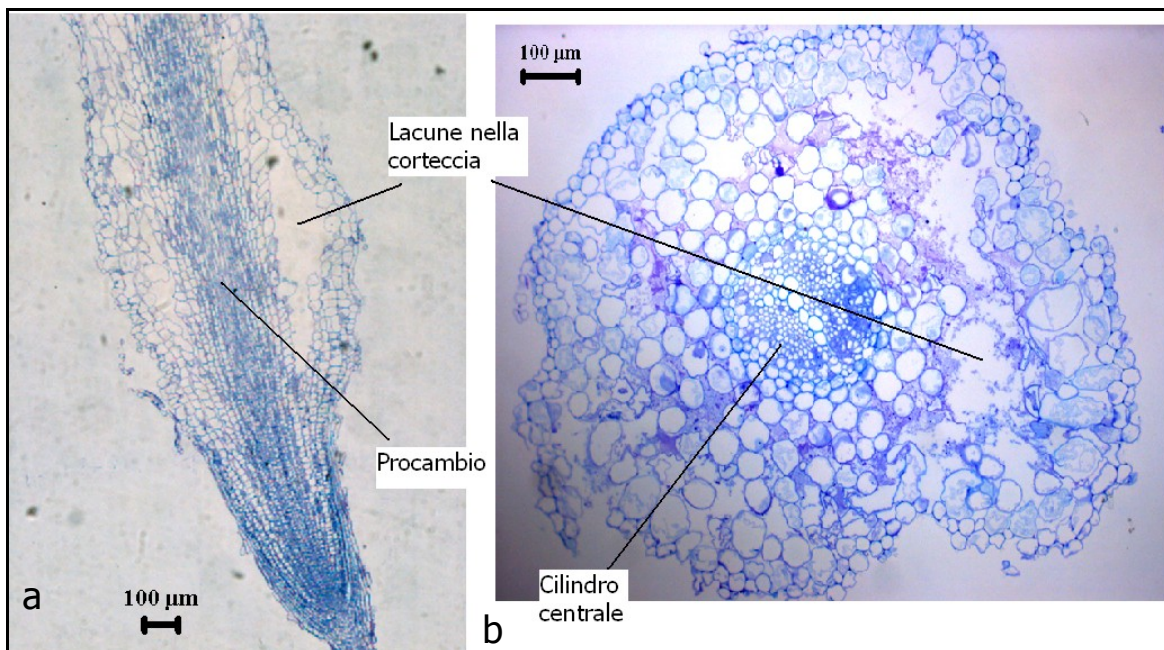


Figura 3.8. a) Sezione longitudinale e b) sezione trasversale della radice laterale di carota dopo 4 giorni di trattamento con Cd.

Nella radice principale, invece, dopo 4 giorni di trattamento con Cd si osservava una degenerazione delle cellule del parenchima corticale, con formazione di grossi spazi intercellulari e perdita di adesione cellulare (Figura 3.9 b), a differenza del controllo (Figura 3.9 a). L'endoderma si presentava ancora ben conformato ed era visibile già una certa attività del cambio cribro-vascolare (Figura 3.9 d), paragonabile a quella del controllo (Figura 3.9 c). Sia nella radice di controllo che in quella trattata si osservavano divisioni nel periciclo che successivamente avrebbero portato alla formazione del cambio subero-fellodermico (Figura 3.9 c, d).

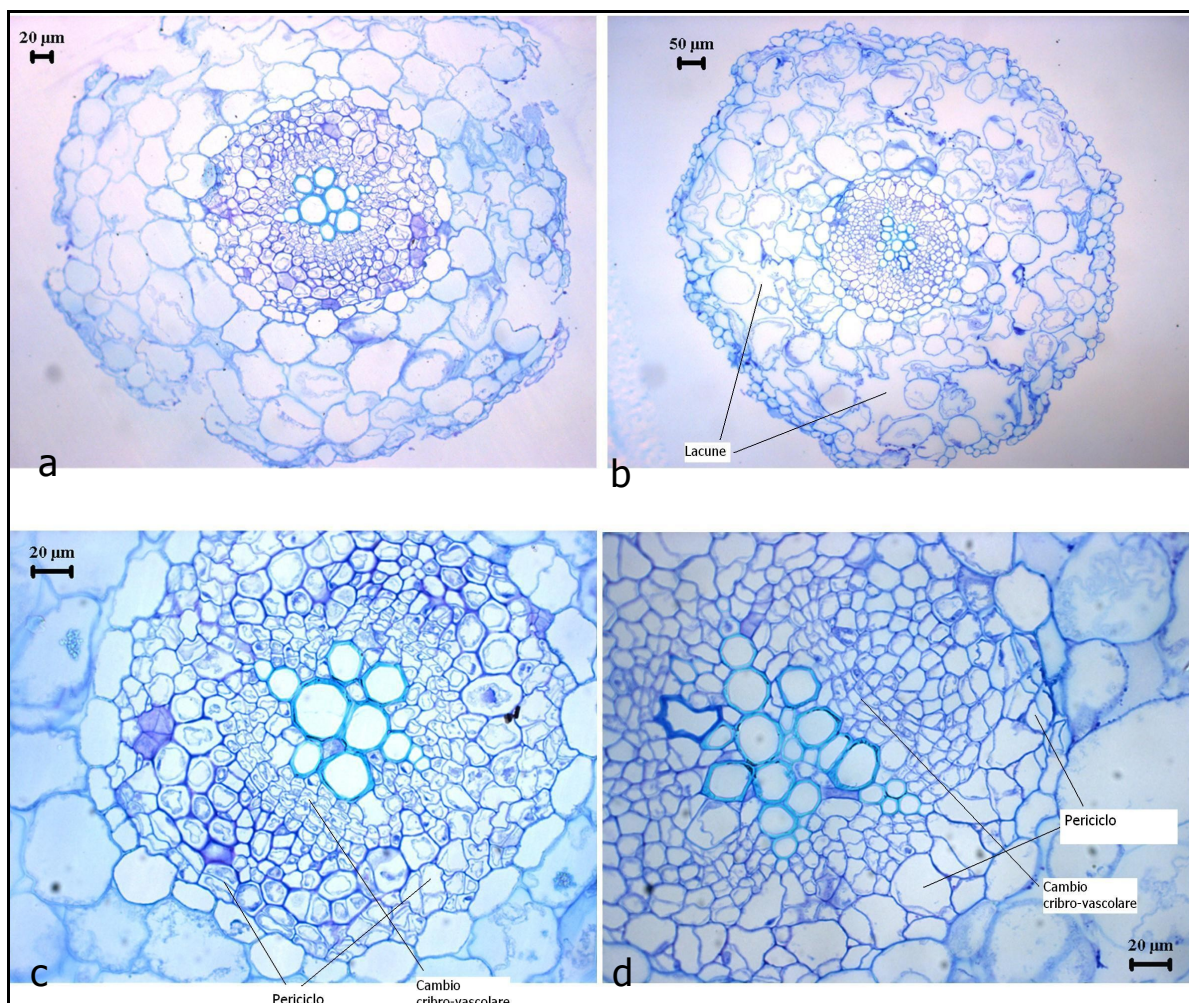


Figura 3.9. Sezioni trasversali della radice principale di piante di carota di controllo (a, c) e trattate con Cd per 4 giorni (b, d).

In sezione longitudinale, dopo 7 giorni di trattamento con Cd il procambio nella zona di differenziazione si presentava necrotico e collassato (Figura 3.10 a); nella zona di struttura primaria, invece, erano presenti alcuni primordi delle radici laterali (Figura 3.10 b) formati in posizione più distale rispetto alle radici di controllo.

In sezione trasversale, oltre all'alterazione del cambio subero-fellodermico che risultava addirittura collassato e necrotico (Figura 3.11 b), si osservavano anche effetti negativi sull'attività del cambio cribro-vascolare (Figura 3.11 d). In questa condizione, sia il parenchima corticale che il parenchima della regione centrale erano degenerati, con cellule ipertrofiche e grossi spazi intercellulari (Figura 3.11 b). L'endoderma in alcuni punti non era più riconoscibile (Figura 3.11 b, d), a differenza di ciò che avveniva nella radice di controllo; in altri punti, invece, l'endoderma appariva schiacciato contro il parenchima corticale (Figura 3.11 f).

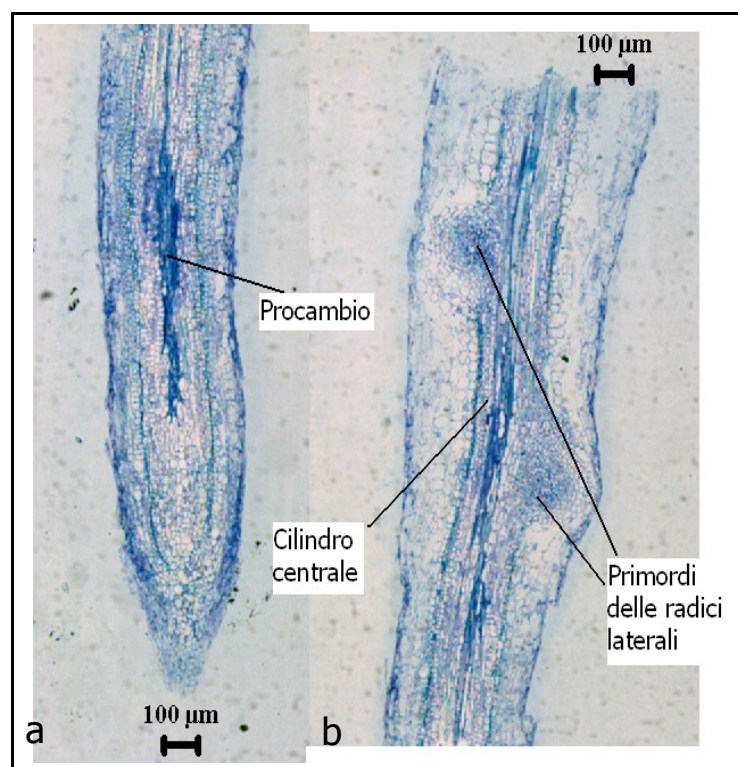


Figura 3.10. Sezioni longitudinali della radice principale di carota dopo 7 giorni di trattamento con Cd. a) Cuffia, apice e zona di differenziazione; b) zona di struttura primaria.

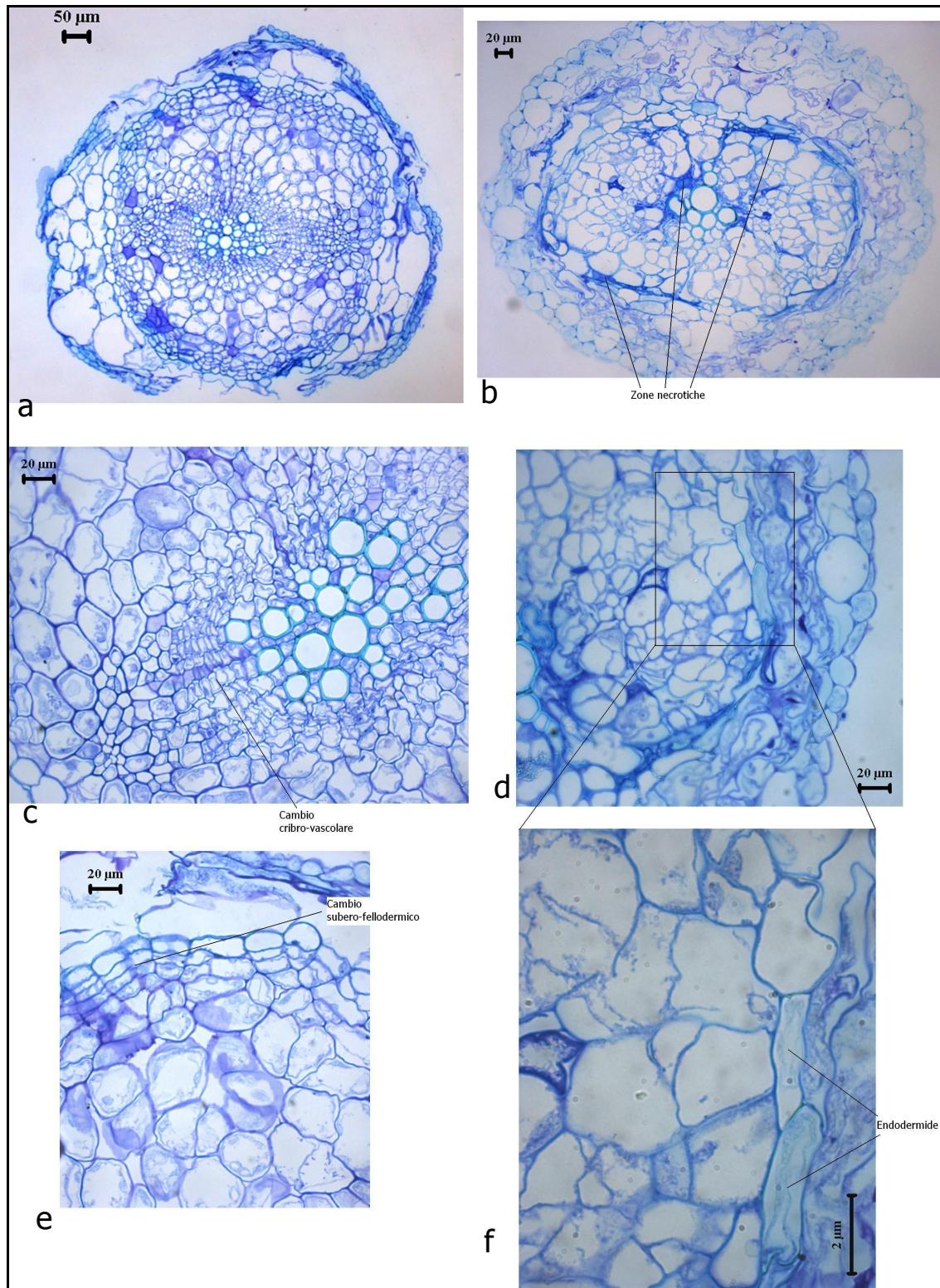


Figura 3.11. Sezioni trasversali della radice principale di piante di carota di controllo (a, c, e) e trattate con Cd per 7 giorni (b, d, f). a) Nella radice di controllo, alcuni tessuti secondari hanno cominciato ad essere prodotti a seguito dell'attivazione (c) del cambio cribro-vascolare e (e) del cambio subero-fellodermico. b) Nella radice trattata, l'attività dei due cambi è stata bloccata e in corrispondenza della loro presunta localizzazione sono visibili estese aree necrotiche; d, e) l'endoderma appare deformato e schiacciato contro la corteccia.

Dopo 14 giorni di trattamento, il cambio subero-fellodermico, il cambio cribro-vascolare ed il parenchima della regione centrale erano completamente compromessi e necrotici (Figura 3.12 b, d); l'endoderme si presentava falciforme e in parecchi punti era scollata dal resto della corteccia, portando alla formazione di vere e proprie lacune nel parenchima corticale (Figura. 3.12 b). Nel controllo, invece, le attività dei due cambi erano normali (Figura 3.12 a, c, e), così come la forma e la dimensione delle cellule dell'endoderme (Figura 3.12 f).

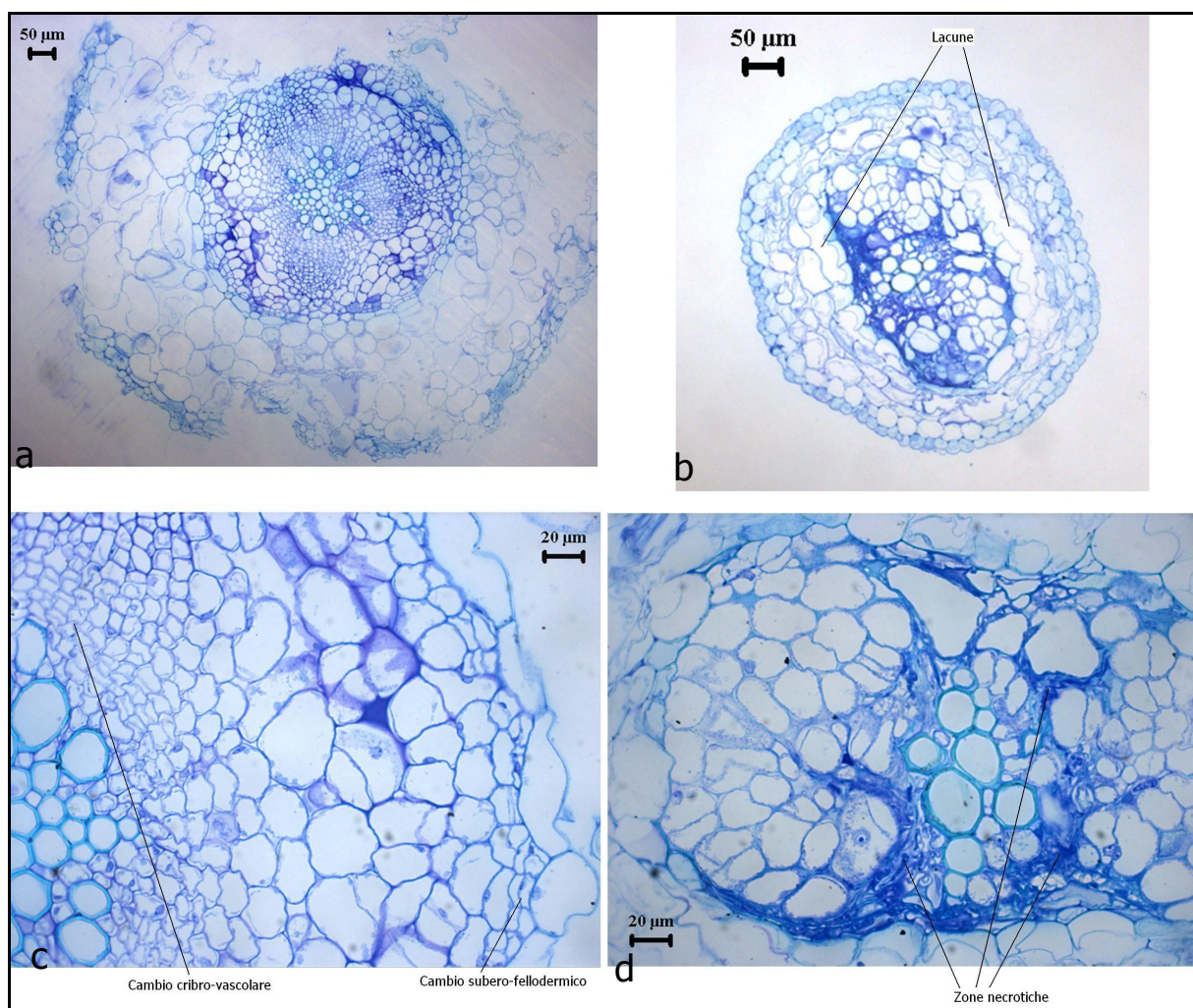


Figura 3.12. Sezioni trasversali della radice principale di piante di carota di controllo (a, c) e trattate con Cd per 14 giorni (b, d). a) Nella radice di controllo, il differenziamento della struttura secondaria sta procedendo normalmente grazie all'attività dei cambi cribro-vascolare e subero-fellodermico (c). b) Nella radice trattata, l'endoderme è scollata dal parenchima corticale e (d) la regione centrale presenta una estesa necrosi.

Nelle radici laterali non è stato possibile osservare un'evidente correlazione tra danni da Cd e cambiamenti dell'organizzazione tissutale, in quanto questi organi vengono generalmente prodotti in carota in tempi diversi e quindi, al momento dei trattamenti con Cd, essi si trovavano in fasi di sviluppo molto differenti. Per questo motivo, non tutte le radici laterali sono risultate danneggiate dal Cd e non si è ritenuto opportuno proseguire con ulteriori indagini.

Macroscopicamente tutte le piante utilizzate per gli esperimenti, anche dopo 14 giorni di trattamento con Cd, non mostravano nelle parti aeree segni evidenti di tossicità da Cd, quali clorosi ed accartocciamento fogliare.

Indagini ultrastrutturali

Dall'analisi isto-anatomica è apparso evidente che il Cd era entrato nei tessuti e nelle cellule delle radici di carota. In particolare, nella radice principale il Cd aveva causato seri danni soprattutto ai due meristemi secondari, al parenchima corticale, all'endoderma ed al parenchima della regione centrale.

Un'ulteriore indagine è stata quindi condotta al TEM, con il fine di osservare i precipitati di Cd all'interno delle cellule.

Granuli elettrondensi sono stati ritrovati nelle radici laterali e, soprattutto, nella radice principale delle piante trattate con Cd. In ogni caso, i granuli elettrondensi osservati in questi campioni dovranno essere analizzati con la microanalisi a raggi X, per poter confermare in via assoluta la presenza di Cd (presenza che tuttavia appare molto probabile).

Nella radice principale, numerosi granuli elettrondensi sono stati trovati già dopo 7 giorni di trattamento, sia nel parenchima corticale che nel parenchima dello xilema. In dettaglio, i granuli sono stati osservati nel citoplasma (Figura 3.13 a) e nei plastidi (Figura 3.13 b, c) di alcune cellule della corteccia; nella parete interna di un vaso (Figura 3.13 d); in uno spazio intercellulare tra un vaso e una cellula parenchimatica (Figura 3.13 f). Inoltre, numerose cellule necrotiche sono state osservate a livello del parenchima dello xilema (Figura 3.13 e).

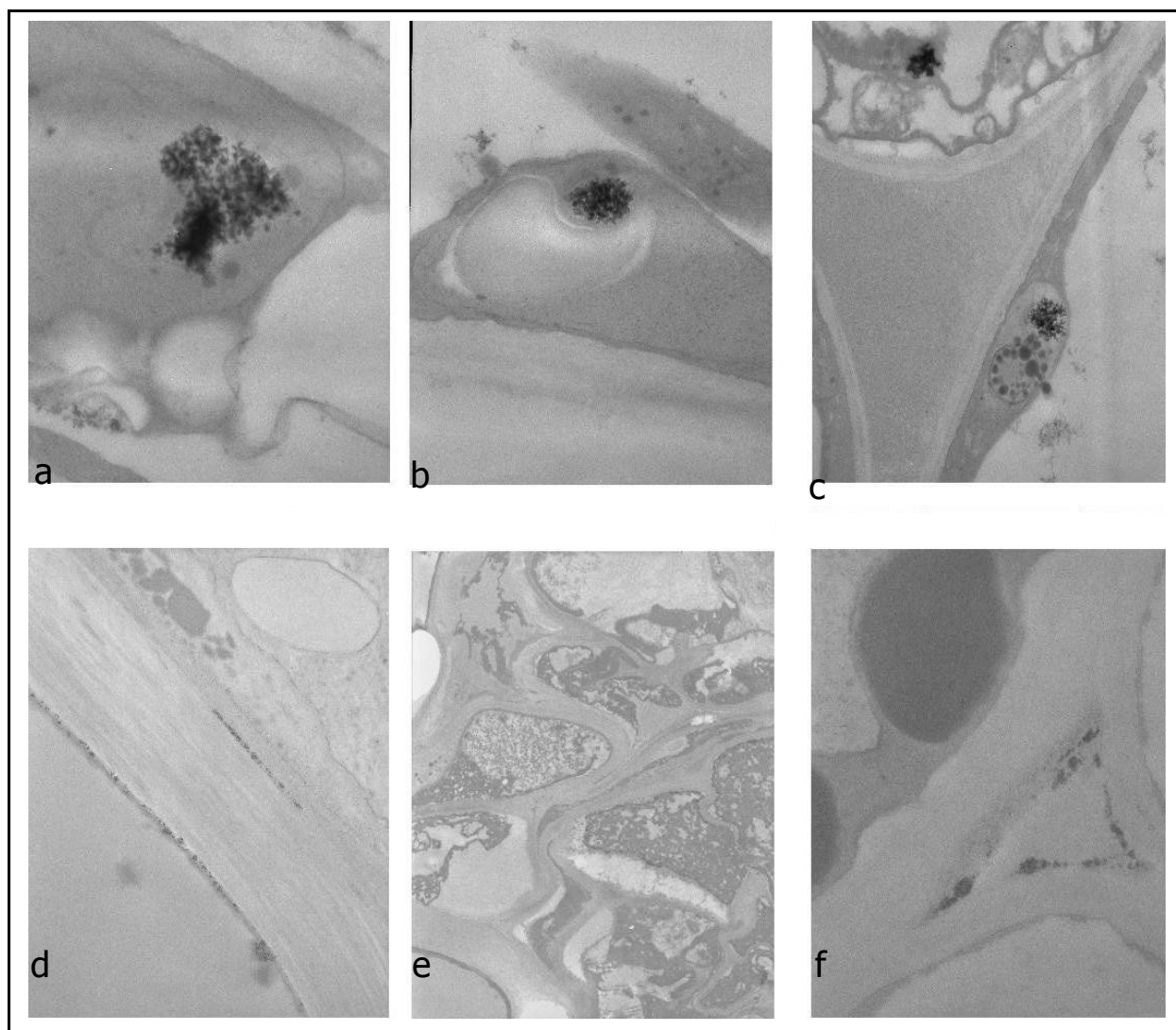


Figura 3.13. Micrografie al TEM delle sezioni di radice principale di carota trattata con Cd per 7 giorni: a) cellula del parenchima corticale (ingrandimento 35000X); b) amiloplasto di una cellula del parenchima corticale (ingrandimento 35000X); c) plastidio (possibilmente un cromoplasto) di una cellula del parenchima corticale (ingrandimento 18000X); d) parete di un vaso (ingrandimento 14000X); e) cellule necrotiche del parenchima dello xilema (ingrandimento 3810X); f) spazio intercellulare tra un vaso e una cellula parenchimatrica (ingrandimento 27500X).

Interazione carota-cuscuta

I germinelli di cuscuta posizionati sul terriccio ad una distanza non superiore a 2 cm da ogni picciolo fogliare di carota cominciarono a crescere attivamente mostrando circumnutazione e, nell'arco di 3 giorni, a direzionarsi verso l'ospite. La prima evidenza dell'interazione diretta tra cuscuta e carota in termini di risposta tigmotropica si osservava dopo circa 5 giorni; in seguito si formavano gli austori nelle zone di contatto tra cuscuta e carota, avviando così il processo di parassitizzazione vero e proprio. Entrambe le specie sono state fatte crescere insieme per altri 30 giorni, al termine dei quali le piante di carota non erano ancora visibilmente sofferenti e la cuscuta aveva preso vigore e mostrato una crescita consistente. In particolare, in questo arco di tempo si osservava che cuscuta, dopo aver avvolto per 2-3 giri in senso antiorario il picciolo di carota, continuava ad allungarsi verso altre zone dell'ospite (o verso altre piante). Tali eventi erano caratterizzati dalla produzione di branche laterali o viticci che andavano ad avvolgersi ulteriormente, sempre in senso antiorario, intorno ad altri piccioli di carota, formando nuovi austori del tutto identici a quelli sopra menzionati.

Isto-anatomia dell'interazione carota-cuscuta

Cuscuta risultava costituita, partendo dall'esterno, da un'epidermide cutinizzata che proteggeva un parenchima corticale ben sviluppato (Figura 3.14), con cellule di dimensioni mediamente più piccole verso l'epidermide e più grandi verso l'interno. Nella corteccia erano visibili numerose cellule contenenti granuli di amido, il quale, accumulandosi, sembrava stimolare proprio in quel punto la formazione dell'austorio (Dawson *et al.*, 1994). Più internamente si osservava un cilindro centrale con 4 fasci cribro-vascolari (possibilmente di tipo bicollaterale aperto) e un'endodermoide non sempre ben distinguibile.

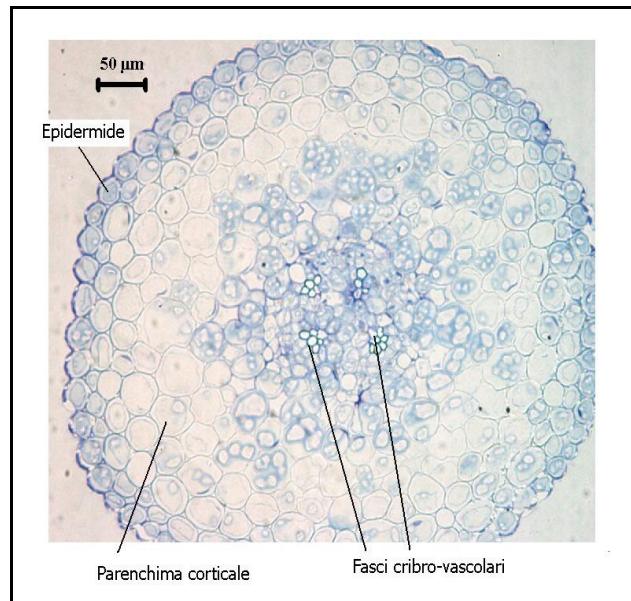


Figura 3.14. Sezione trasversale di cuscuta. Il campione è stato prelevato lontano dall'austorio.

Nelle zone di contatto tra cuscuta e piccioli di carota venivano formati gli austori, visibili in Figura 3.15. Gli austori penetravano nei piccioli in zone adiacenti alle costole sporgenti senza mai entrare all'interno delle costole stesse (Figura 3.15 a).

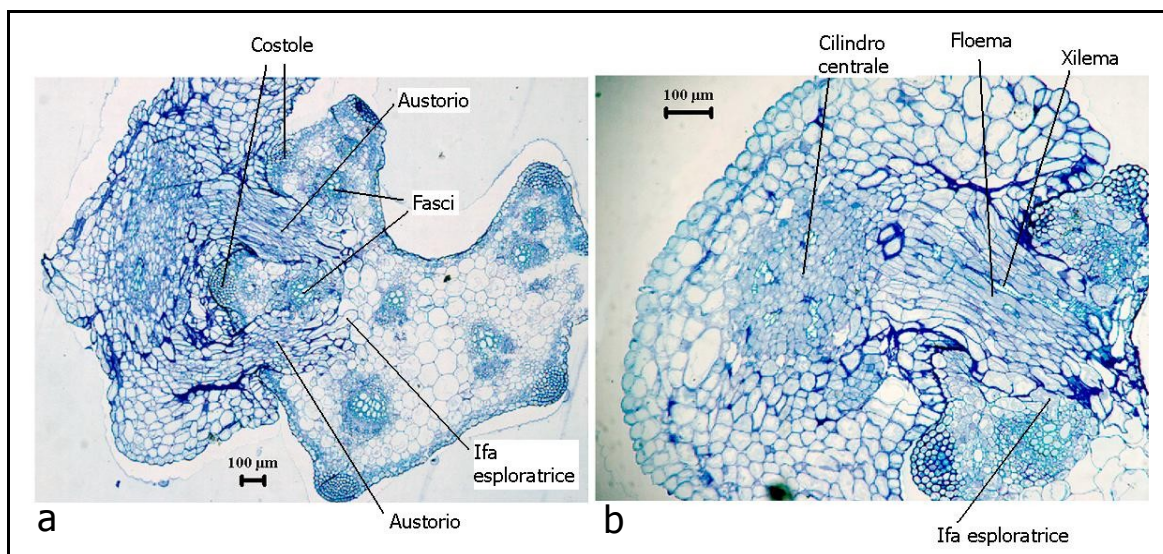


Figura 3.15. Sezioni trasversali di una zona di contatto tra cuscuto (a sinistra) e picciolo di carota (a destra), dove sono stati formati due austori. a) Austori penetrati in zone adiacenti alle costole del picciolo di carota; b) austorio in cui sono presenti, più al centro, i tessuti xilematici e, più in periferia, i tessuti floematici.

Gli austori si presentavano nella tipica forma tridimensionale "a cono", con la parte terminale a forma di "cuneo" (Figura 3.15 a, b), che si ramificava in numerose "ife esploratrici" unicellulari; ciascuna "ifa esploratrice" attraversava il meristema fondamentale del picciolo di carota fino al raggiungimento dei fasci cribro-vascolari. L'austorio di cuscuta appariva essere costituito da cellule parenchimatiche (Figura 3.15 b) e, al centro, da xilema e floema che si connettevano agli omologhi tessuti dell'ospite. Nell'austorio la presenza di elementi vasali si apprezzava con maggior facilità rispetto agli elementi floematici, così come più evidente era la continuità tra xilema dell'ospite e xilema del parassita (Figura 3.16 b, c).

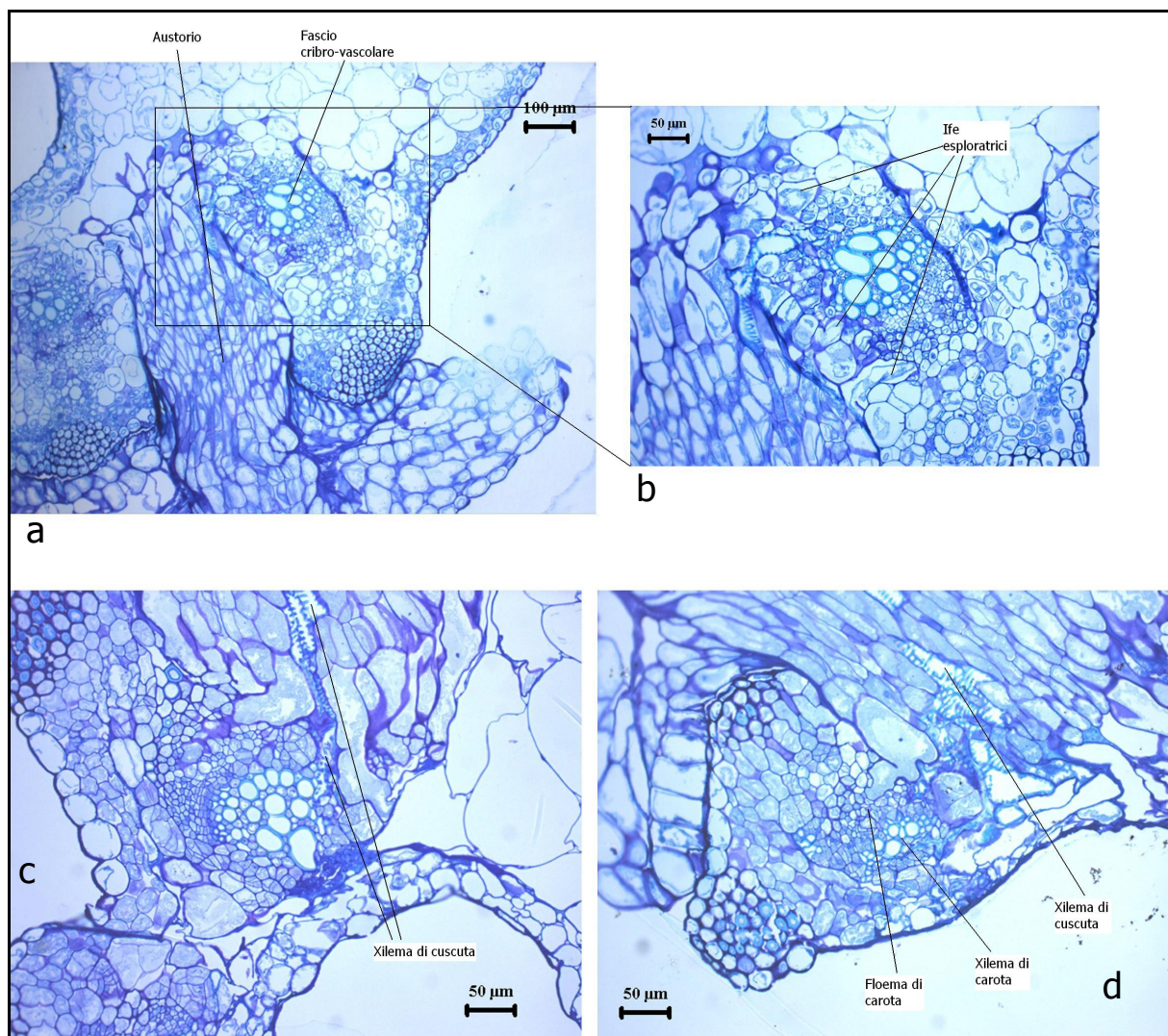


Figura 3.16. Sezioni trasversali della zona di adesione tra cuscuta e carota dove sono stati formati gli austori. a) Austorio di cuscuta e fascio cribro-vascolare di carota. b) Ingrandimento della zona evidenziata in a): le "ife esploratrici" si ripiegano verso il fascio cribro-vascolare di carota, entrando in contatto con lo xilema (al centro) e con il floema (più in basso). c, d) Allorché le "ife esploratrici" si connettono con lo xilema di carota, esse vanno a differenziarsi in elementi xilematici (in prevalenza vasi anulati); quando invece entrano in contatto con il floema dell'ospite, si differenziano in elementi floematici.

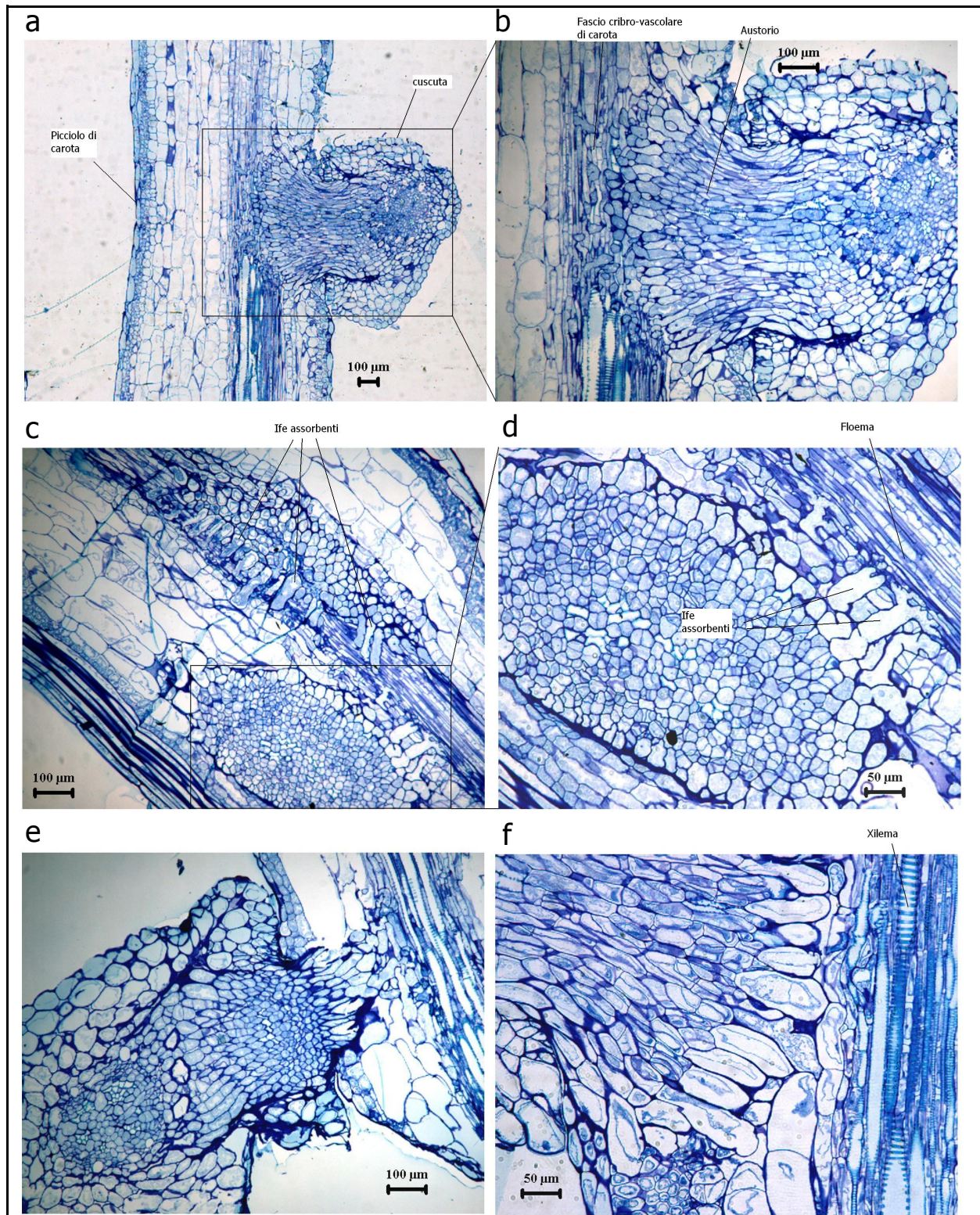


Figura 3.17. Sezioni longitudinali della zona di adesione di cuscuta sui piccioli di carota. a) Cuscuta ha prodotto un austorio nel picciolo di carota; b) l'austorio è penetrato nei tessuti del picciolo raggiungendo con le "ife esploratrici" il fascio cribro-vascolare; c, d) le "ife esploratrici" che hanno raggiunto il fascio sono diventate "ife assorbenti" a contatto con il floema dell'ospite; e, f) ulteriori particolari delle "ife esploratrici".

Per quanto riguardava il floema, non era stato possibile evidenziare nettamente la presenza di questo tessuto in cuscuta, pur avendo osservato numerose "ife esploratrici" ed "assorbenti" a contatto con il tessuto floematico del picciolo di carota (Figura 3.17). Le "ife assorbenti" si presentavano conformate come in Figura 3.18, con le tipiche "finger-like protrusions" (Dörr, 1972). Di fatto, furono Israel *et al.* (1980) che visualizzarono per la prima volta la presenza di una definita continuità floematica tra cuscuta ed ospite.

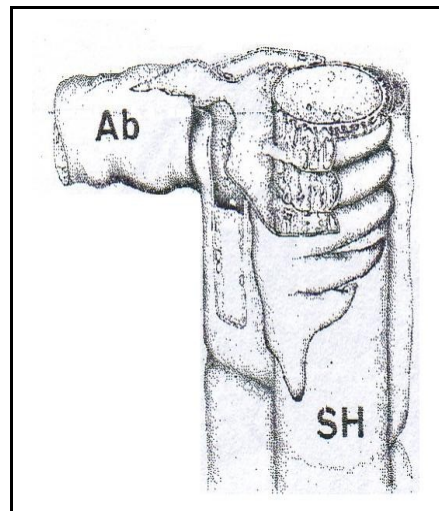


Figura 3.18. Schematizzazione di una "ifa assorbente" (Ab) in contatto con un tubo cribroso dell'ospite (SH). L'ifa avvolge strettamente il tubo cribroso con le "finger-like protrusions". Tratto da Dörr, 1972.

Effetti del cadmio su fusti e austori di cuscuta

Per quanto concerne gli effetti del Cd sulla isto-anatomia di cuscuta, osservazioni preliminari non hanno evidenziato particolari danni ai fusti e agli austori di questa specie. È da considerare, tuttavia, che il trattamento con 36 μM Cd, mediante il "vettore" carota, è stato condotto per soli 2 e 4 giorni; saranno quindi necessarie ulteriori indagini sperimentali impiegando tempi di trattamento più lunghi.

Esperimenti in coltura liquida

Gli esperimenti sulle piante di carota parassitizzate o meno da cuscuta sono stati allestiti in coltura liquida, come mostrato in Figura 3.19.

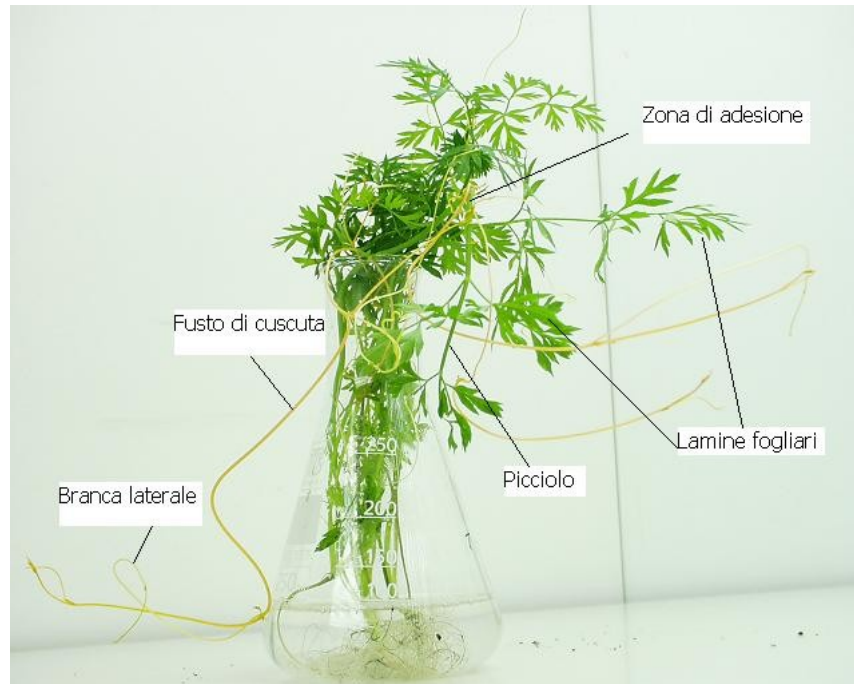


Figura 3.19. Piante di carota parassitizzate da cuscuta in mezzo liquido B5, pH 5,5. La cuscuta si era avvolta ai piccioli di carota, producendo austeri nelle zone di adesione. I lunghi fusti di cuscuta esploravano l'ambiente esterno in cerca di un nuovo ospite, formando anche branche laterali più sottili rispetto al fusto principale.

Contenuto in Cd, GSH e PC in carota non parassitizzata

La presente analisi ha riguardato soltanto le piante di carota di 60 giorni allevate in vaso e trattate con Cd 0 e 36 μM per 2 giorni. In questo caso, nelle radici delle piante trattate si è rinvenuta la concentrazione di Cd più alta ($1015 \pm 132 \mu\text{g g}^{-1}$), seguita dalle lamine fogliari ($21,45 \pm 0,20 \mu\text{g g}^{-1}$) e infine dai piccioli ($5,87 \pm 3,72 \mu\text{g g}^{-1}$).

Il contenuto in GSH, dopo 2 giorni di trattamento con 36 μM Cd, ha presentato un aumento significativo nelle radici e nelle lamine fogliari (Figura 3.20).

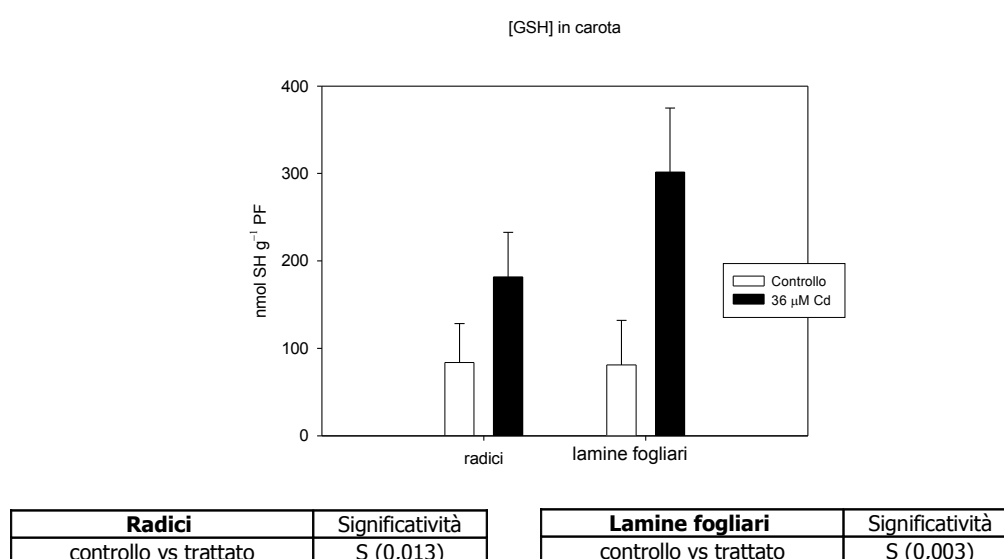


Figura 3.20. Contenuto in GSH in radici e lamine fogliari di carota. n=5.

Le PC sono state rinvenute solo nelle piante trattate con Cd e, come atteso, non nei controlli. In particolare, nelle radici le PC riscontrate sono state i due oligomeri PC₂ e PC₃, con un contenuto medio in PC totali di $23,98 \pm 17,79 \text{ nmol SH g}^{-1} \text{ PF}$; nelle lamine fogliari, invece, si sono trovate solo tracce di PC₂.

Contenuto in GSH e PC in cuscuta prima della parassitizzazione

A seguito del trattamento con 36 μM Cd per 2 giorni, il contenuto di GSH nelle plantule di cuscuta è risultato essere pressoché invariato rispetto ai controlli ($82,63 \pm 33,67$ nmol SH g^{-1} PF nei trattati; $74,99 \pm 25,82$ nmol SH g^{-1} PF nei controlli).

Inoltre, nella cuscuta di controllo non si è osservata sintesi di PC, a differenza di quella trattata con Cd. Le PC riscontrate in questo caso sono state principalmente PC₂ e PC₃, con un contenuto medio di PC totali pari a $9,01 \pm 4,91$ nmol SH g^{-1} PF.

Effetti dell'interazione carota-cuscuta sul contenuto in Cd, GSH e PC

Poiché la formazione degli austori di cuscuta interessava esclusivamente i piccioli e le lamine fogliari (in queste ultime soprattutto la zona localizzata alla base della nervatura principale) di carota, le analisi sotto riportate sono state condotte solo su tali strutture, tralasciando le radici, mai interessate direttamente dalla parassitizzazione.

Contenuto in Cd

Come atteso, il Cd è stato ritrovato solo nei piccioli e nelle lamine fogliari delle piante di carota trattate, e non nei controlli; nelle lamine fogliari si è osservata una concentrazione di Cd superiore rispetto ai piccioli.

Inoltre, nei piccioli delle piante di carota non parassitizzate, il contenuto in Cd è aumentato col tempo (Figura 3.21 a). Nei piccioli delle piante parassitizzate il contenuto in Cd era paragonabile a quello delle piante non parassitizzate, e non si è osservato aumento nel tempo.

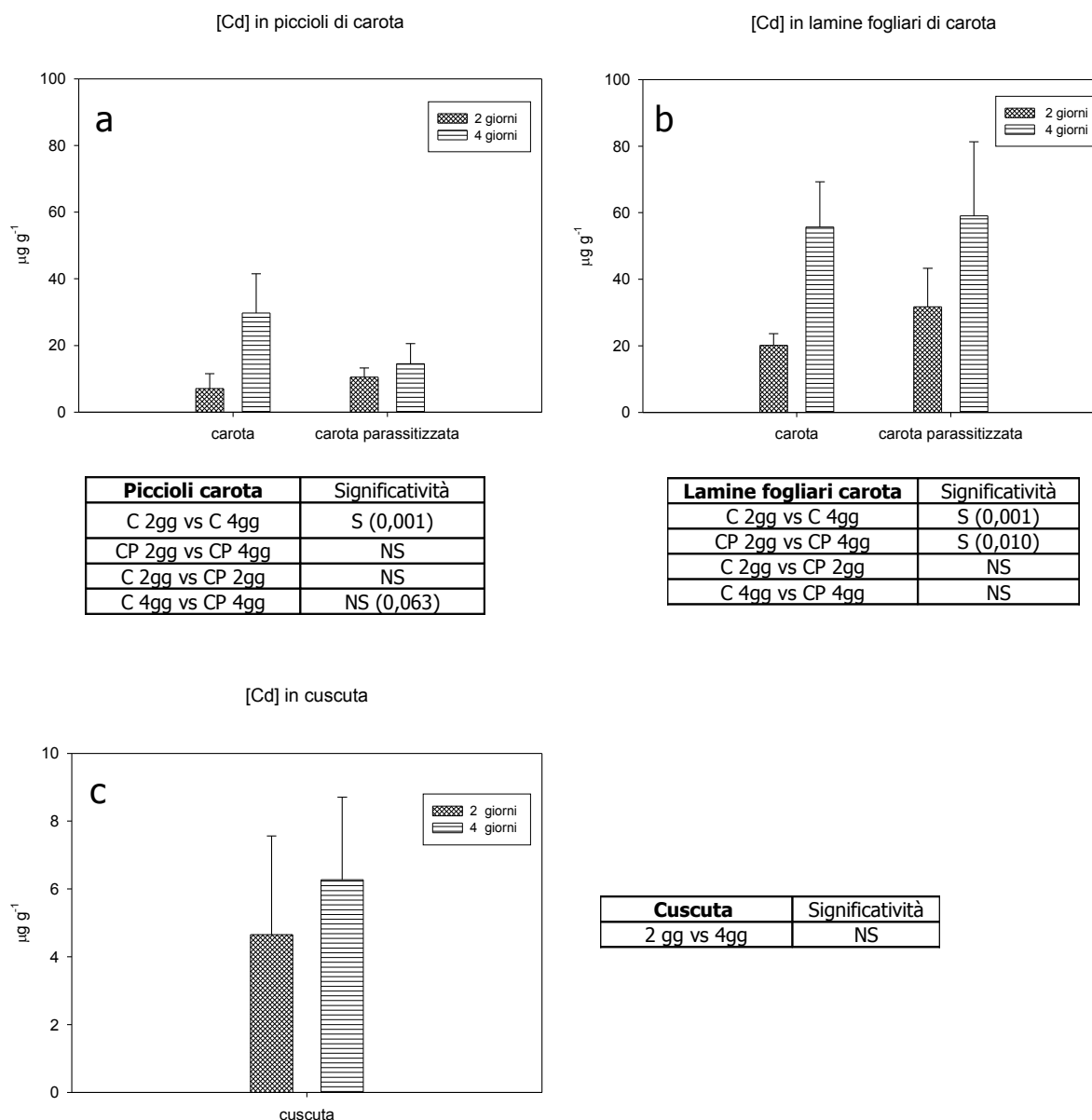


Figura 3.21. Contenuto in Cd di: a) piccioli di carota; b) lamine fogliari di carota; c) cuscuta. C= carota; CP= carota parassitizzata. n=5.

Va tuttavia sottolineato che nei piccioli di carota parassitizzata, dopo 4 giorni di trattamento con il metallo, si è trovato un trend di diminuzione del contenuto in Cd rispetto ai piccioli non parassitizzati (fig. 3.21 a).

Nelle lamine fogliari (Figura 3.21 b) delle piante non parassitizzate, il contenuto in Cd ha mostrato un analogo trend di quello osservato nei piccioli, ovvero è aumentato nel tempo. Nelle lamine fogliari delle piante parassitizzate l'aumento del Cd nel tempo è stato statisticamente significativo, a differenza di quanto osservato nei piccioli. Inoltre, dopo 2 giorni di trattamento, si è osservato un trend di aumento di Cd nelle lamine fogliari a seguito della parassitizzazione.

Il Cd è stato ritrovato anche in cuscuta, in concentrazioni pari a circa il 40% ed il 10%, rispettivamente, del contenuto in Cd rinvenuto nei piccioli e nelle lamine fogliari di carota (Figura 3.21 c). Il contenuto in Cd in cuscuta non è aumentato significativamente all'aumentare del tempo di trattamento.

Contenuto in GSH e PC

Nelle piante di carota non parassitizzate, il Cd ha indotto un aumento di GSH nelle lamine fogliari (Figura 3.22 a) dopo 2 giorni di trattamento. Nelle lamine fogliari delle piante parassitizzate il contenuto in GSH è risultato essere più elevato rispetto a quello delle non parassitizzate, e il trattamento con il Cd non ha indotto un ulteriore aumento di GSH (Figura 3.22 a).

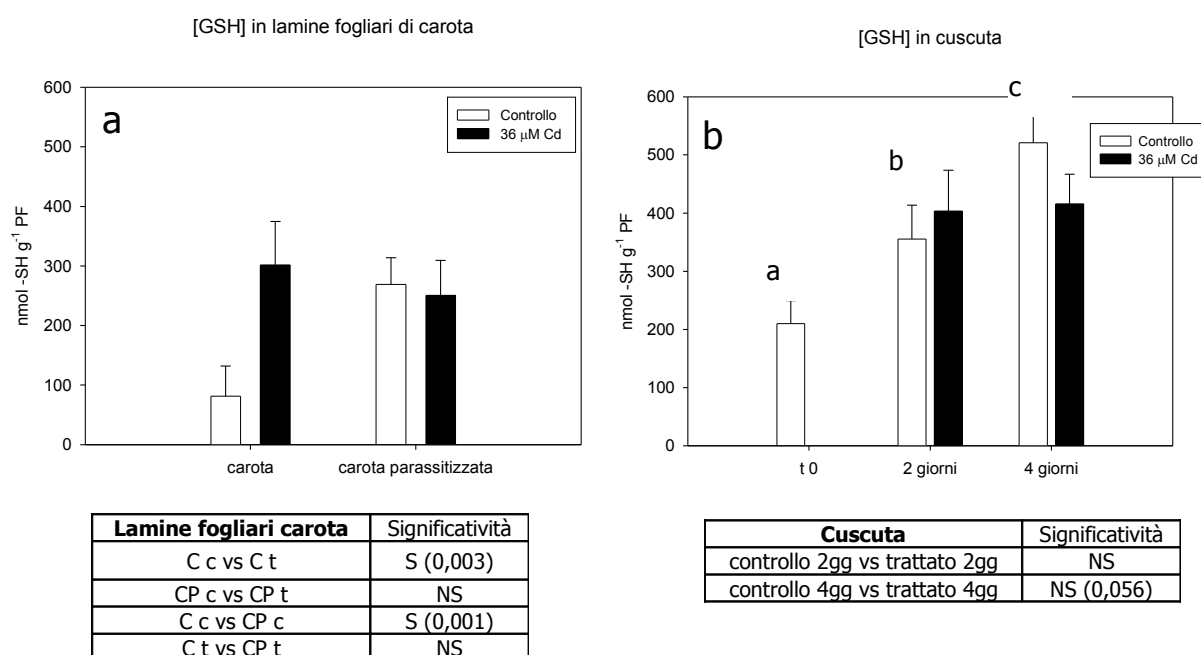


Figura 3.22. Contenuto in GSH nelle lamine fogliari di piante di carota parassitizzate e non (a), e in cuscuta (b). C c= carota controllo; C t= carota trattato; CP c= carota parassitizzata controllo; CP t= carota parassitizzata trattato. n=5.

Prima del trasferimento delle piante di carota parassitizzate in coltura liquida, sono stati effettuati prelievi di cuscuta (indicati con "t0"), al fine di valutare la condizione iniziale di quest'ultima (prima dei trattamenti in cella climatica).

In cuscuta, i livelli di GSH presenti al t0 sono risultati simili a quelli delle lamine fogliari di carota parassitizzata (Figura 3.22 a, b). Successivamente, con il prosieguo della parassitizzazione in cella, cuscuta ha evidenziato un aumento rilevante di GSH nel tempo, con valori superiori a quelli riscontrati in carota; il trattamento con Cd, invece, non ha indotto ulteriori significative variazioni del contenuto in GSH (Figura 3.22 b).

Infine, a seguito del trattamento per 2 giorni con il Cd, nelle lamine fogliari delle piante di carota non parassitizzate sono state prodotte PC, in particolare il dipeptide PC₂. Nelle lamine fogliari delle piante parassitizzate, invece, si è ritrovata anche la PC₃ ed un contenuto totale di PC maggiore rispetto alle non parassitizzate (Figura 3.23 a).

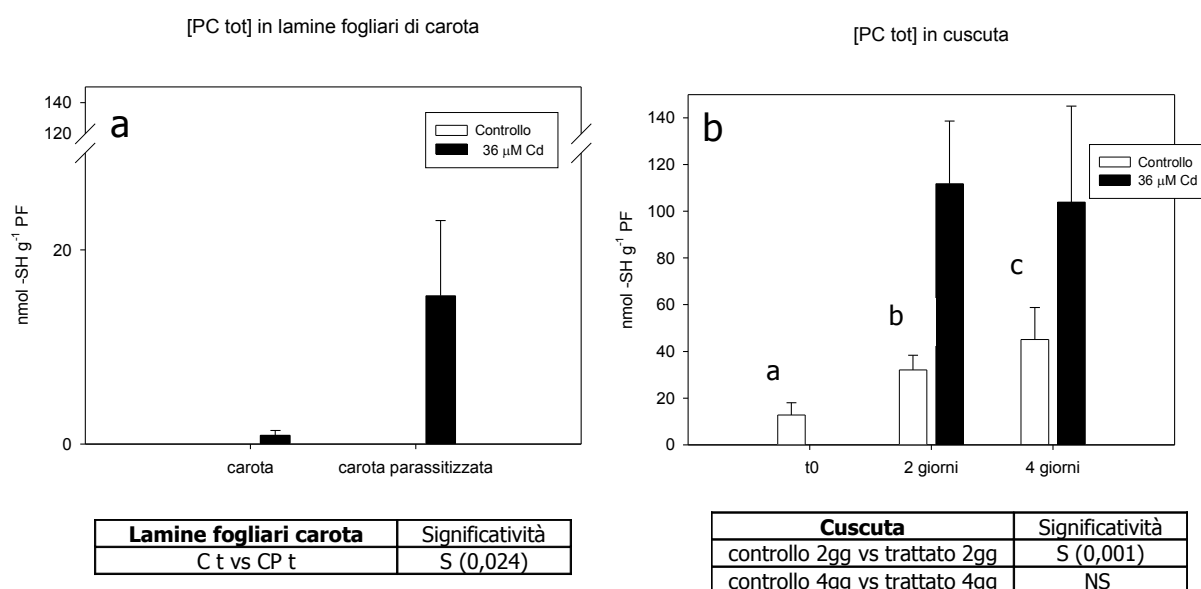


Figura 3.23. Contenuto in PC totali di (a) lamine fogliari di carota e (b) cuscuta. C t= carota trattato; CP t= carota parassitizzata trattato. n=5.

La cuscuta ha mostrato un certo contenuto di PC già al t0, in termini di PC₂ e tracce di PC₃. Il contenuto di PC nella cuscuta di controllo è aumentato con il tempo (Fig. 3.23 b), e il trattamento con il Cd ne ha provocato un ulteriore significativo aumento, indipendentemente dal tempo di trattamento (Fig. 3.23 b).

Per confermare la presenza di PC nei campioni di controllo di cuscuta, gli stessi sono stati caratterizzati in spettrometria di massa (HPLC-ESI-MS).

Caratterizzazione delle fitochelatine in cuscuta

L'analisi dei campioni di cuscuta in spettrometria di massa ha dimostrato che nei controlli sono presenti PC₂ (ione a $m/z=540$, Figura 3.24 a) e tracce di PC₃ (ione a $m/z=772$, Figura 3.24 c). Nei campioni trattati con Cd si è osservato un aumento sia di PC₂ (Figura 3.24 b) che di PC₃ (Figura 3.24 d).

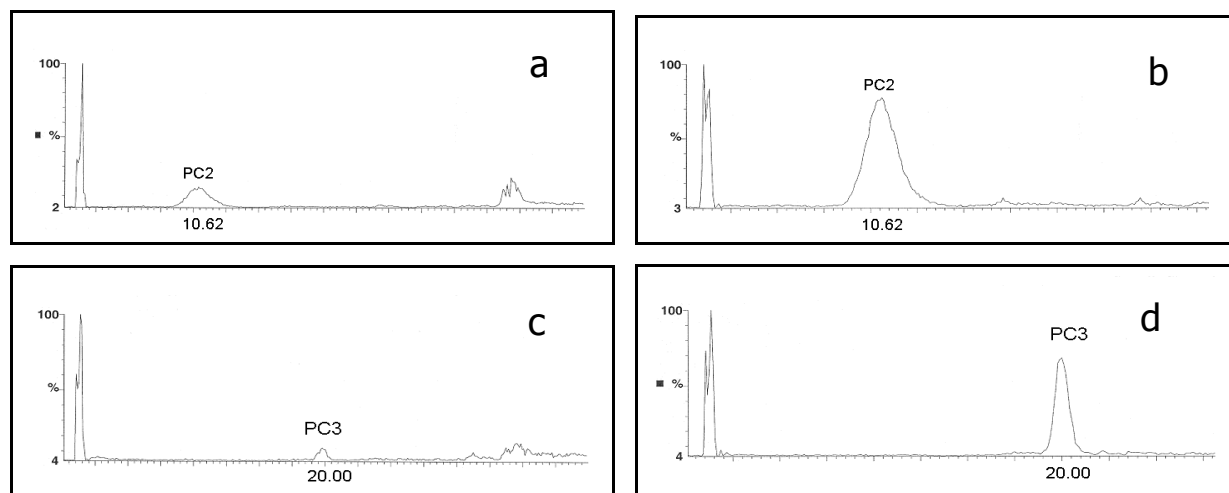


Figura 3.24. Cromatogrammi HPLC-ESI-MS di cuscuta di controllo (a, c) e trattata con Cd (b, d).

Le PC presenti in cuscuta sono state caratterizzate anche mediante il loro spettro di frammentazione. In Figura 3.25 sono riportati gli spettri di frammentazione di PC₃: pur essendo l'oligopeptide meno abbondante in soluzione, è stato possibile isolarlo sia in forma ossidata che ridotta, e ottenerne una buona frammentazione in accordo con la caratterizzazione di PC₃ riportata in Ranieri *et al.* (2005). Risultati analoghi sono stati ottenuti con l'oligopeptide più abbondante, cioè PC₂ (dati non mostrati).

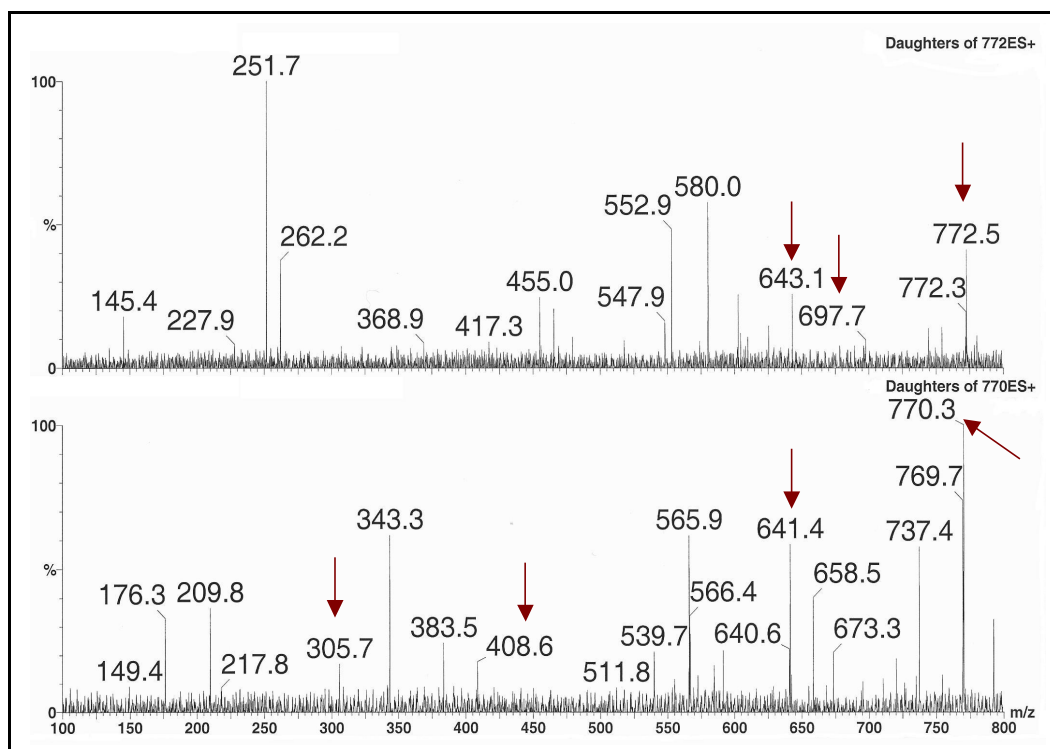


Figura 3.25. Spettro di frammentazione di PC₃ ridotta (ione a $m/z=772$) e PC₃ ossidata (ione a $m/z=770$). Le frecce indicano i frammenti caratteristici delle due specie.

Oltre al Cd, altri metalli possono indurre nelle piante la sintesi di PC; tra questi vi sono alcuni micronutrienti, quali Zn e Cu, che raggiungono tuttavia facilmente la soglia di tossicità e possono essere pertanto chelati dai peptidi tiolici (Grill *et al.*, 1985). Poiché Zn e Cu erano presenti sia nel terriccio utilizzato per le colture di carota in serra (rispettivamente 150 e 500 mg kg⁻¹)¹, sia nel mezzo liquido B5 in cui venivano effettuati gli esperimenti (rispettivamente 0,025 e 2 mg l⁻¹), al fine di indagare il coinvolgimento diretto di questi due metalli nella sintesi di PC nella cuscuta mai esposta al Cd, gli esperimenti successivi sono proseguiti utilizzando un terreno B5 modificato, privo cioè di Zn e Cu.

¹ Lo Zn presente nei suoli è disponibile per le piante solo se in forma solubile e chelata; tale forma ammonta a meno dell'1% del contenuto totale di Zn nel suolo (Petronici, 1989). È ragionevole quindi stimare che lo Zn biodisponibile nel terriccio utilizzato sia stato pari a circa 5 mg kg⁻¹, concentrazione paragonabile a quella presente nel mezzo liquido.

Effetti di Zn e Cu in carota e in cuscuta

Prima di evidenziare gli effetti della deprivazione di Zn e Cu in carota e cuscuta, è stato indagato il contenuto di questi metalli nei campioni di tali specie cresciuti prima su terriccio e poi trasferiti in coltura liquida, nella quale erano presenti, rispettivamente, 7,0 μM Zn e 0,1 μM Cu.

Contenuto in Zn e Cu

Nei piccioli delle piante di carota non parassitizzate, il contenuto di Zn non è variato nel tempo, mentre nei piccioli delle piante parassitizzate si è osservato un aumento significativo di tale contenuto all'aumentare del tempo di permanenza in coltura liquida (Figura 3.26 a). È da notare inoltre che dopo 2 giorni la concentrazione di Zn nei piccioli delle piante parassitizzate era più bassa rispetto ai piccioli delle non parassitizzate (Figura 3.26 a), possibilmente a causa del trasferimento dello Zn da carota a cuscuta.

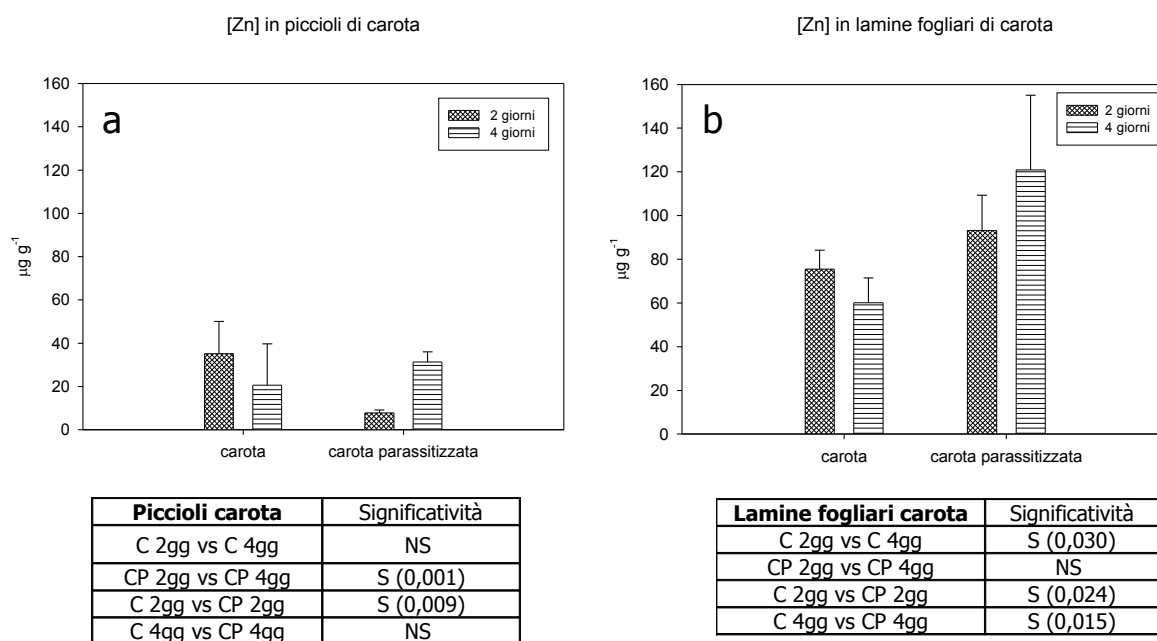


Figura 3.26. Contenuto di Zn in piccioli (a) e lamine fogliari (b) di piante di carota parassitizzate o meno da cuscuta, in coltura liquida per 2 e 4 giorni. C= carota; CP= carota parassitizzata. n=5.

Nelle lamine fogliari delle piante di carota non parassitizzate, il contenuto di Zn è diminuito significativamente nel tempo, mentre nelle parassitizzate non si è osservata variazione (Figura 3.26 b); in generale, si è riscontrato un contenuto di Zn superiore nelle lamine fogliari delle piante parassitizzate rispetto alle non parassitizzate.

L'utilizzo del mezzo B5 modificato, rispetto al B5 normale, ha indotto una tendenziale diminuzione del contenuto di Zn nei piccioli di carota non parassitizzata dopo 2 giorni di coltura, mentre nei piccioli delle piante parassitizzate la carenza di Zn nel mezzo ne ha determinato addirittura un aumento (Figura 3.27 a).

A 4 giorni, invece, a seguito dell'utilizzo del terreno B5 modificato si è osservato un aumento significativo di Zn solo nei piccioli delle piante parassitizzate (Figura 3.27 b).

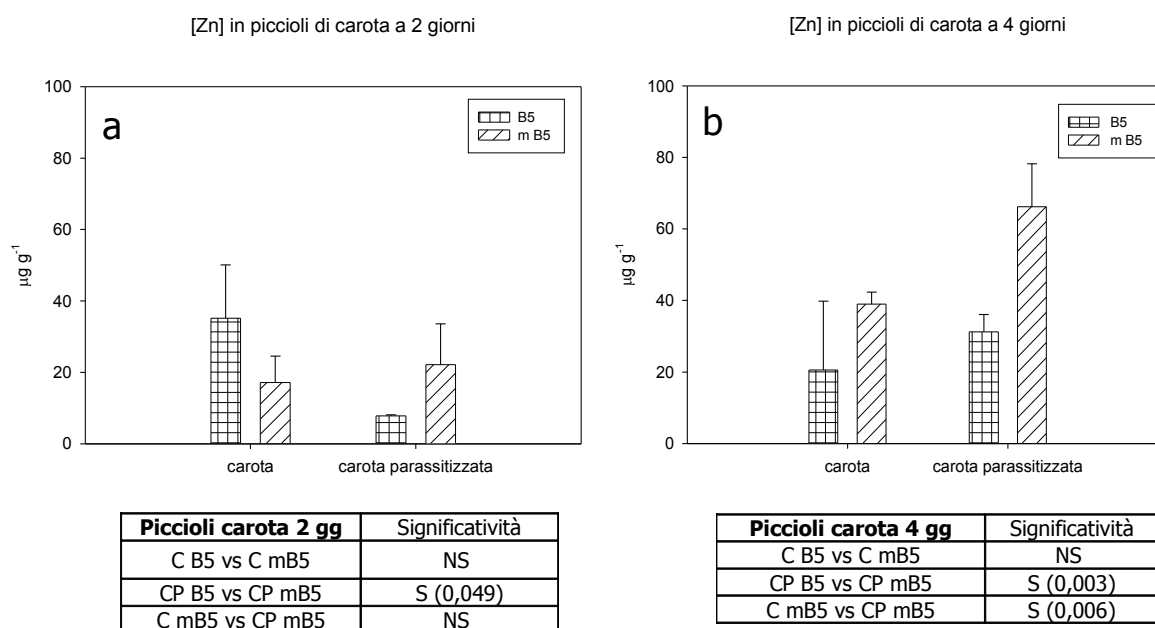


Figura 3.27. Contenuto di Zn in piccioli di piante di carota parassitizzate o meno da cuscuta, in coltura liquida per 2 (a) e 4 (b) giorni. C= carota; CP= carota parassitizzata. n=5.

Nelle lamine fogliari, a differenza di quanto rilevato nei piccioli, si è osservata una diminuzione del contenuto di Zn nel B5 modificato, almeno a 2 giorni (Figura 3.28 a); a 4 giorni, invece, non si sono osservate differenze nel contenuto di Zn, sia nelle piante non parassitizzate che in quelle parassitizzate (Figura 3.28 b).

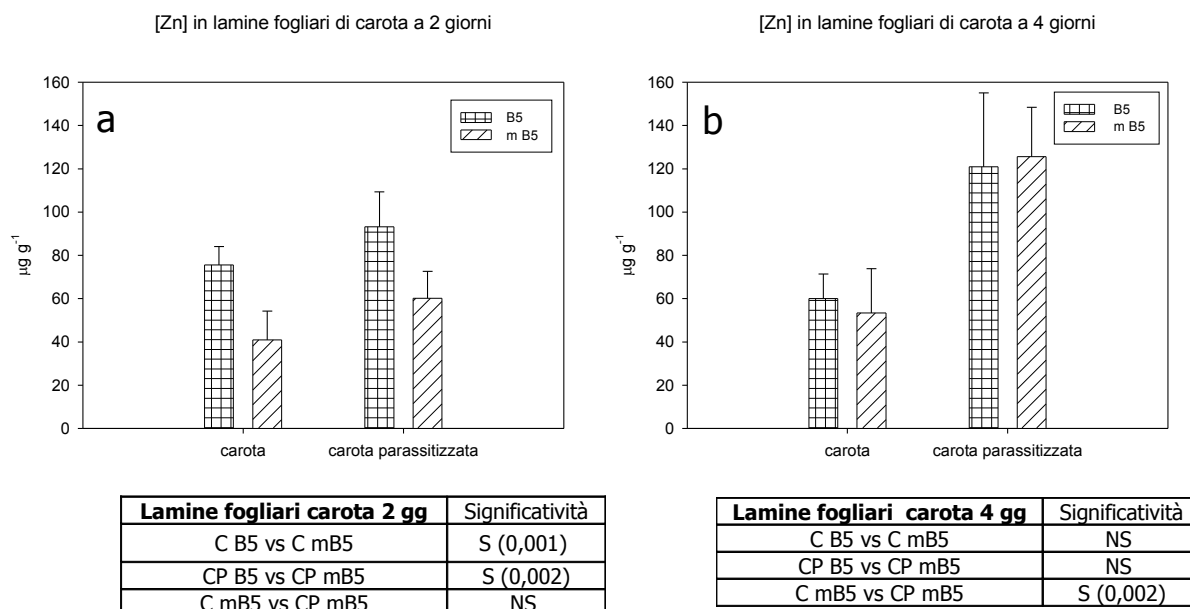


Figura 3.28. Contenuto di Zn in lamine fogliari di piante di carota parassitizzate o meno da cuscuta, in coltura liquida per 2 (a) e 4 (b) giorni. C= carota; CP= carota parassitizzata. n=5.

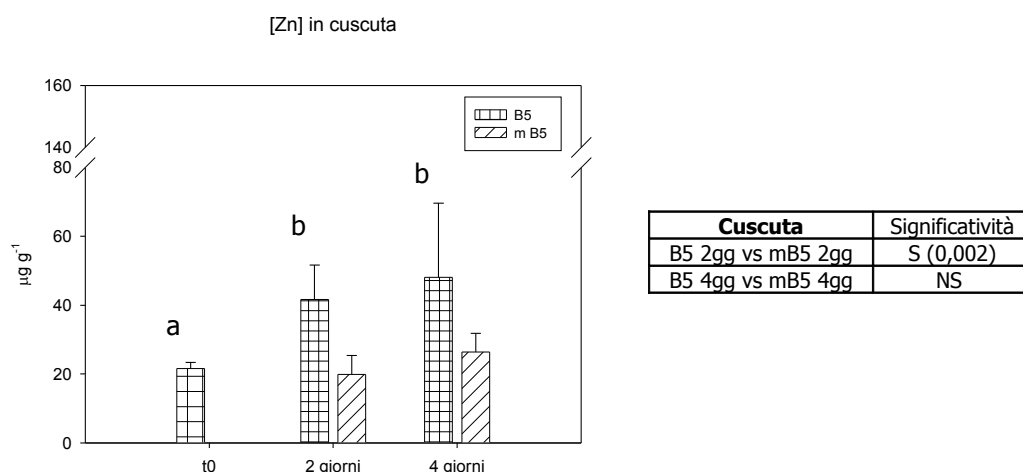


Figura 3.29. Contenuto di Zn in cuscuta. n=5.

In cuscuta il contenuto in Zn è aumentato con il trasferimento delle piante di carota in coltura liquida, e nel tempo (Fig 3.29). L'utilizzo del B5 modificato ha fatto rilevare un contenuto di Zn costante nel tempo, e inferiore rispetto al B5 normale, cioè paragonabile al t0.

Il Cu è stato ritrovato sia in carota che in cuscuta in concentrazioni molto basse, talvolta al di sotto del limite di rilevabilità strumentale. In particolare, in cuscuta il Cu è stato rinvenuto in un *range* di concentrazioni tra 0 e 4 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Contenuto in GSH e PC

In cuscuta, il contenuto di GSH dopo 2 giorni di coltura liquida nel B5 modificato non è variato, mentre dopo 4 giorni è diminuito (Figura 3.30 a). Il contenuto di PC a 2 e 4 giorni non ha risentito della carenza di Cu e Zn nel mezzo B5 (Figura 3.30 b).

Il minor contenuto di Zn in cuscuta mostrato in Figura 3.29, quindi, non ha avuto come conseguenza una diminuzione in contenuto in PC.

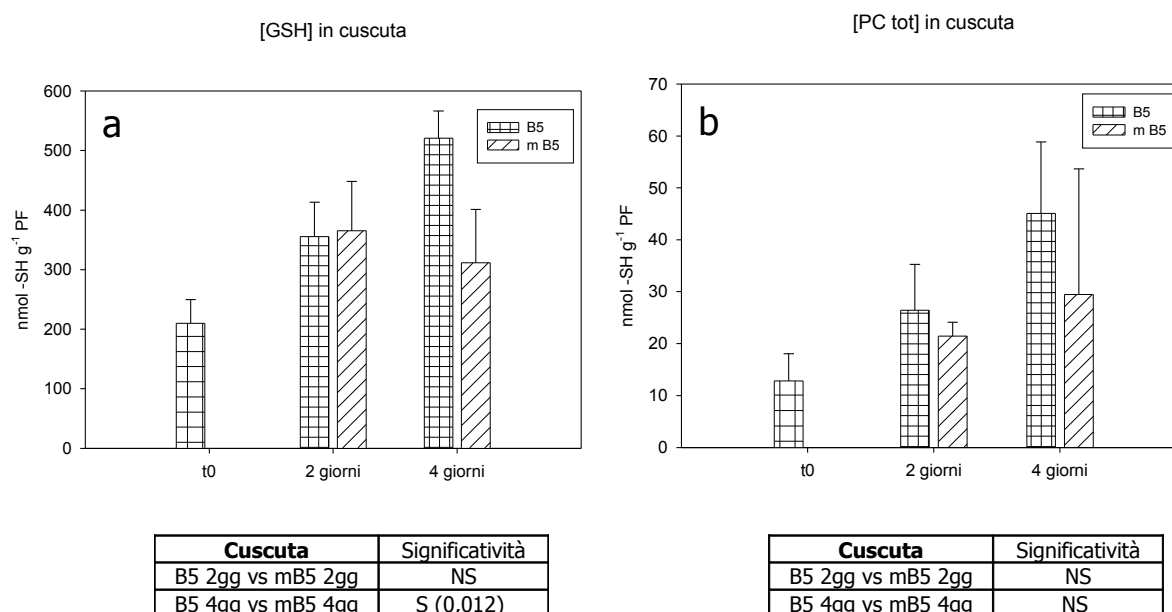


Figura 3.30. Contenuto di GSH (a) e PC (b) in cuscuta cresciuta su piante di carota allevate per 2 e 4 giorni in coltura liquida contenenti mezzo B5 o B5 modificato.

Analisi dei profili proteici di carota e cuscuta

Per osservare eventuali differenze nei *pattern* proteici tra controlli e trattati con Cd, piante di carota parassitizzate da cuscuta sono state esposte a 0 e 36 μM Cd per 2 e 4 giorni, in coltura liquida. Gli estratti proteici ottenuti dai diversi campioni di lamine fogliari sono stati analizzati mediante SDS-PAGE (Figura 3.31). Nei campioni trattati con Cd, risultano ben evidenti due bande che corrispondono a proteine di circa 52 e 34 kDa. Inoltre, sempre nei campioni trattati, si osserva una banda di colorazione meno intensa di circa 160 kDa (Figura 3.31).

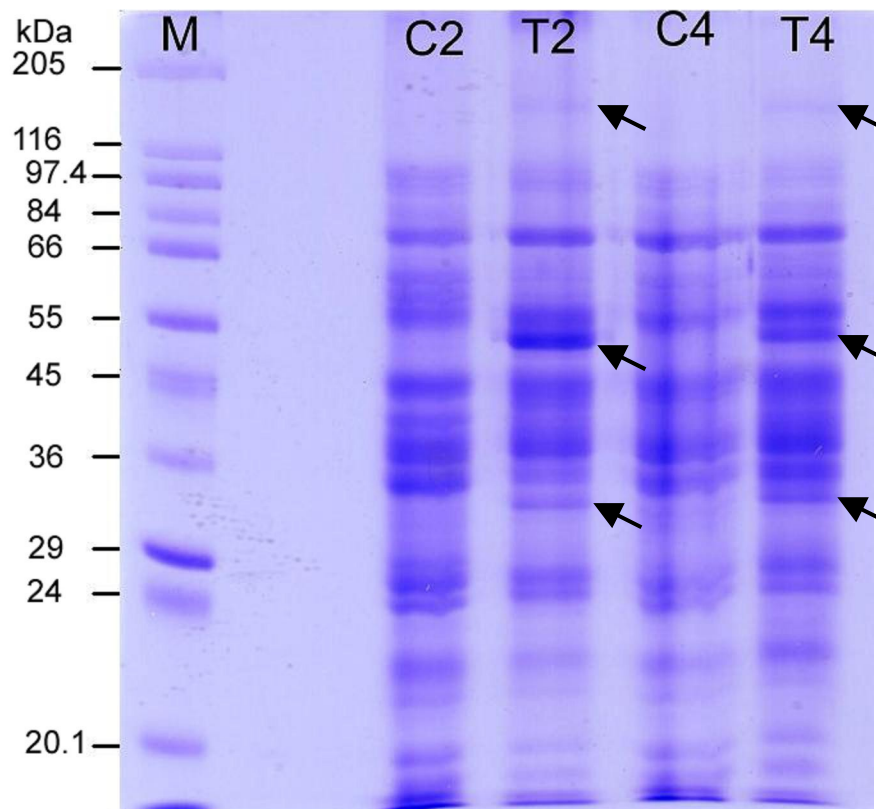


Figura 3.31. SDS-PAGE degli estratti proteici ottenuti da lamine fogliari di carota: M= *marker*, C2= controllo 2 giorni, T2= trattato con 36 μM Cd per 2 giorni, C4= controllo 4 giorni, T4= trattato con 36 μM Cd per 4 giorni.

Anche nei campioni di cuscuto che aveva parassitizzato carota si osserva una qualche differenza nei profili proteici tra controllo e trattato (Figura 3.32). In particolare, una banda di massa molecolare di circa 53 kDa risulta evidente nel campione esposto al Cd per 2 giorni; tale banda manca tuttavia (almeno apparentemente) nel trattato per 4 giorni.

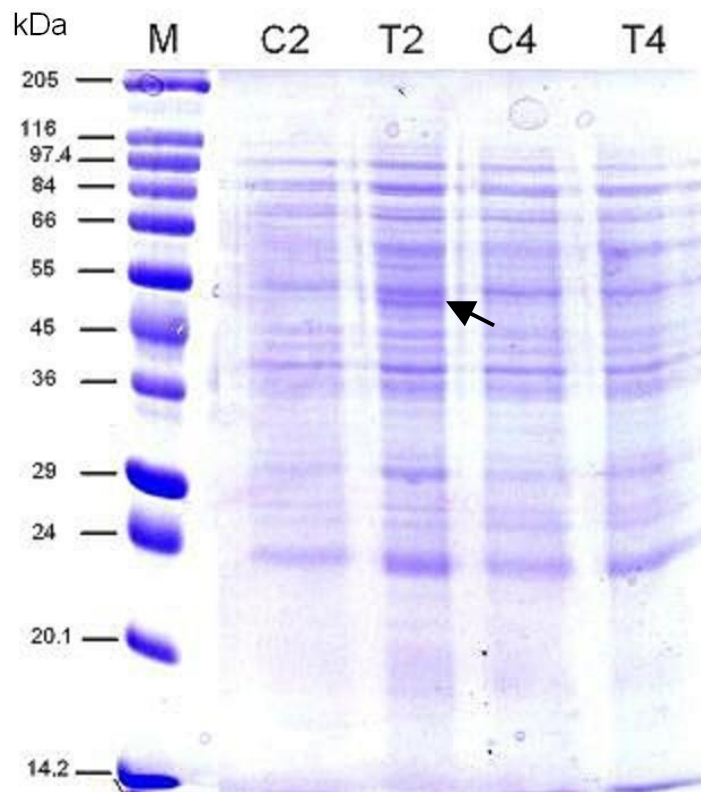


Figura 3.32. SDS-PAGE degli estratti proteici ottenuti da campioni di cuscuto: M= *marker*, C2= controllo 2 giorni, T2= trattato con 36 μ M Cd per 2 giorni, C4= controllo 4 giorni, T4= trattato con 36 μ M Cd per 4 giorni.

Identificazione della fitochelatina sintasi in estratti proteici di cuscuta

Considerando l'importanza del ruolo svolto dall'enzima fitochelatina sintasi (PCS) nei processi di disintossicazione del Cd, gli estratti proteici ottenuti dai campioni di cuscuta che aveva parassitizzato carota sono stati analizzati mediante *western blotting*, utilizzando un anticorpo policlonale anti-PCS di *Brassica juncea* (*Bj*PCS1, Heiss *et al.*, 2003). L'esperimento è stato condotto utilizzando i campioni di cuscuta trattati per 4 giorni con 0 e 36 μ M Cd. Considerando che la PCS sembra essere ubiquitaria e costitutiva nelle piante, come controllo positivo è stato utilizzato l'enzima *At*PCS1 ottenuto in forma ricombinante come descritto da Ruotolo *et al.* (2004).

Dopo trasferimento dei campioni su filtro di nitrocellulosa e colorazione con Ponceau S, si è osservato che i profili proteici dei vari campioni apparivano confrontabili (Figura 3.33). La banda corrispondente al controllo positivo (PCS) non risultava visibile a causa della bassa quantità di proteina utilizzata (100 ng), ma tale quantità si è rivelata comunque sufficiente per il corretto riconoscimento della *At*PCS1 da parte dell'anticorpo (vedi oltre).

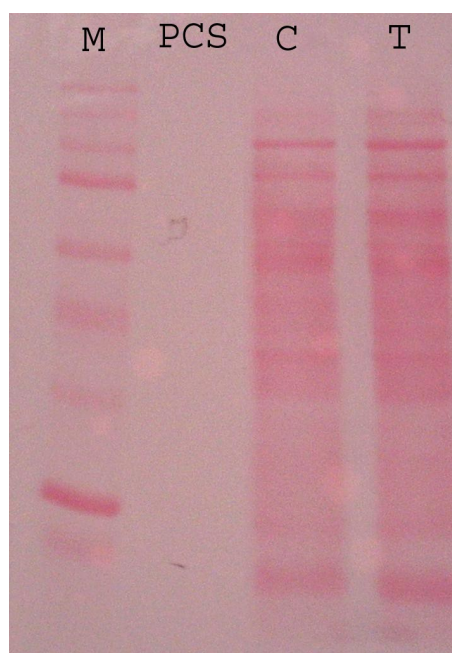


Figura 3.33. Membrana di nitrocellulosa colorata con Ponceau S, ottenuta dopo trasferimento dei campioni proteici separati mediante SDS-page. M= *marker*, PCS= proteina *At*PCS1 ricombinante, C= cuscuta controllo, T= cuscuta trattato.

Il *western blot* ha permesso di evidenziare la presenza di una banda specifica sia nei campioni di cuscuta di controllo che nei campioni trattati con Cd (Figura 3.34), dimostrando inequivocabilmente la presenza in cuscuta di una fitochelatina sintasi costitutiva, presente anche nei campioni privi di Cd.

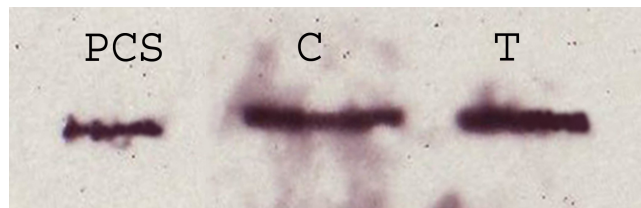


Figura 3.34. Analisi mediante *western blot* dell'espressione della PCS in diversi campioni di cuscuta: PCS= *AtPCS1* ricombinante, C= cuscuta controllo, T= cuscuta trattato.

Discussione

Le piante mostrano una capacità naturale di estrarre gli elementi minerali dal suolo e di distribuirli tra le radici e le parti aeree, a seconda dei processi biologici in cui gli elementi stessi sono coinvolti (Ximénez-Embún *et al.*, 2002). Alcuni metalli pesanti, come Zn e Cu, in concentrazioni opportune, hanno ruoli fondamentali nel metabolismo delle piante e sono infatti micronutrienti; altri metalli come il Cd, invece, pur essendo xenobiotici tossici, vengono comunque estratti dal suolo ed immessi all'interno della pianta, *in primis* nelle radici, dove possono causare danni più o meno gravi.

Il trasporto e la movimentazione dei metalli pesanti *in planta* sono stati studiati in numerose specie, con disparate tecniche analitiche. L'accumulo del Cd nelle radici e nelle foglie, in particolare, è stato investigato in varie piante quasi esclusivamente in termini di analisi spettrofotometrica ad assorbimento/emissione atomici, rivelando che esistono differenze nelle strategie di accumulo di questo metallo tra specie tolleranti e non tolleranti (Seregin e Ivanov, 2001). Tuttavia, poco numerosi sono i lavori in cui è stata effettuata una dettagliata e puntuale analisi degli effetti del Cd in termini isto-anatomici ed ultrastrutturali e, possibilmente, una localizzazione del metallo *in planta*.

Un primo obiettivo di questa tesi di dottorato, pertanto, è stato quello di colmare almeno in parte tale lacuna, in una specie (*Daucus carota* L.) della quale, nonostante l'importanza per il consumo umano ed animale, poco-nulla si conosce da un punto di vista isto-anatomico, né in condizioni normali, né tantomeno in condizioni di esposizione al Cd. In proposito, va detto per inciso che il Cd è contenuto come impurità nei fertilizzanti fosfatici, nei quali può essere presente in concentrazioni che vanno da 70 ad addirittura 300 mg per kg di P₂O₅ (Alloway e Steinnes, 1999); di conseguenza tali fertilizzanti, impiegati anche nelle coltivazioni di carota, sono stati identificati come un'importante fonte di Cd, con l'ulteriore aggravante della tendenziale immobilità di questo metallo nel suolo (Sanità di Toppi e Gabbrielli, 1999).

In generale, in *Triticum* sp. e *Thlaspi caerulescens* è stato osservato che l'accumulo di Cd da parte della radice era positivamente correlato con il numero di apici radicali presenti (Piñeros *et al.*, 1998; Berkelaar e Hale, 2000), supportando l'osservazione che essi sono più attivi nell'*uptake* del Cd rispetto a zone più prossimali della radice. Ciò è stato in buona parte confermato anche nella nostra specie modello, carota, che presentava una ben sviluppata radice principale con numerose radici laterali. Infatti, in carota, nelle radici laterali - al di sopra dell'apice e precisamente nella regione in cui la zona di differenziazione "sconfinava" nella zona di struttura primaria - si osservavano precocemente (già dopo 4 giorni di trattamento) seri danni da Cd, con ampie aree rigonfie, caratterizzate da cellule tra loro scollate e vere e proprie lacune. Sempre nelle radici laterali, anche aumentando il tempo di trattamento, non si osservavano tuttavia evidenti effetti negativi del Cd a livello di zona di struttura primaria e secondaria.

Nella radice principale, soprattutto con tempi di esposizione al Cd di 7 e 14 giorni, si notavano danni marcati sempre nella regione in cui la zona di differenziazione "sconfinava" nella zona di struttura primaria, con effetti quali plasmolisi e necrosi cellulare e tissutale. Ciò in analogia con quanto osservato in radici di *Arabidopsis thaliana* esposte alla concentrazione di 50 μM Cd per 21 giorni (Van Belleghem *et al.*, 2007). Inoltre, sempre nella radice principale di carota, si osservavano danni anche alle zone di struttura primaria e secondaria, soprattutto a carico del parenchima corticale, dell'endoderma, del periciclo, del parenchima della stele, del cambio cribro-vascolare e del fellogeno.

In base agli studi isto-anatomici ed ultrastrutturali condotti in questa tesi, si può ipotizzare, quindi, che il Cd sia entrato nella radice principale (e in parte anche in quelle laterali) dalla zona di differenziazione e, più prossimalmente, dal rizoderma. Dal rizoderma il Cd è transitato nella corteccia, causando seri danni in particolare all'endoderma, e riuscendo così a superare la banda del Caspary fino ad arrivare al periciclo ed al resto della stele. Anche nel corso della differenziazione della struttura secondaria, il Cd è riuscito a penetrare e a danneggiare sia il fellogeno, sia il periciclo (che in carota perdura anche nella zona di struttura secondaria, Esau, 1940), sia più all'interno, il cambio cribro-vascolare e ad accedere al neo-formato xilema secondario.

L'osservazione al TEM ha sostanzialmente confermato le analisi in microscopia ottica, in quanto è stato possibile individuare, soprattutto nella radice principale, numerosi granuli elettrondensi sia nel parenchima corticale che nel parenchima dello xilema. In

quest'ultimo tessuto sono state osservate diverse cellule necrotiche, contribuendo così ad avvalorare l'ipotesi di un danno diffuso in larga parte della radice.

In particolare, nel parenchima corticale i granuli elettrondensi sono stati localizzati nel citoplasma, in alcuni plastidi e talora nei vacuoli, indicando un movimento o, quantomeno, un accumulo simplastico del Cd; nella regione centrale della radice, invece, i granuli sono stati osservati a livello della parete cellulare dei vasi e negli spazi intercellulari, indicando un possibile movimento apoplastico (e/o un'immobilizzazione di parete) del metallo, sebbene le necrosi delle cellule parenchimatriche dello xilema possano indicare nel contempo, visto l'effetto, anche una presenza simplastica di Cd.

Di recente Van Belleghem *et al.* (2007) hanno utilizzato una nuova tecnica di fissazione del materiale, sostituendo alla normale fissazione chimica con glutaraldeide la procedura "high-pressure freezing/freeze-substitution". Con questa procedura, tali Autori sono stati in grado di osservare, in radici di *Arabidopsis thaliana*, precipitati di Cd anche utilizzando concentrazioni relativamente basse, pari a 1 e 5 μM , nonché una concentrazione alta di 50 μM . In questo modo, a basse concentrazioni, nelle pareti cellulari e negli spazi intercellulari della corteccia sono stati individuati numerosi depositi di Cd associati con fosfato; con la più alta concentrazione di Cd, invece, i precipitati sono stati osservati anche nel citoplasma delle cellule della corteccia (come si è osservato in carota), associati per la maggior parte con zolfo, indicando pertanto una complessazione del Cd con molecole contenenti zolfo, cioè molto probabilmente complessi Cd-fitochelatine, Cd-fitochelatine-zolfo e Cd-zolfo (Vögeli-Lange e Wagner, 1996). Poiché in questi esperimenti la via di trasporto del Cd attraverso il parenchima corticale della radice era prevalentemente apoplastica - osservazione confermata anche in altre specie (Wagner, 1993; Küpper *et al.*, 2000; Vázquez *et al.*, 1992 a) - l'accumulo di complessi Cd/P potrebbe essere considerato come un meccanismo di sequestro rapido per il Cd a concentrazioni basse, mentre l'accumulo nel citoplasma delle cellule della corteccia potrebbe essere interpretato come un meccanismo per trattenere il Cd in concentrazioni più alte, al fine di ridurre l'afflusso al cilindro centrale. Ancora, depositi di Cd associati con S sono stati trovati nei vacuoli delle cellule dell'endoderme e, ad alte concentrazioni di Cd, anche nel citoplasma. Anche in questo caso, la presenza di granuli di Cd associati a S portava ad ipotizzare la formazione di complessi Cd-fitochelatina, sia nel citosol che nel vacuolo (Van Belleghem *et al.*, 2007). Inoltre, depositi di Cd sono stati osservati nella lamella mediana delle pareti cellulari tra l'endoderme ed il periciclo, e tra le cellule del periciclo (Khan *et*

al., 1984; Wójcik e Tukiendorf, 2004). L'accumulo di Cd simplastico nel periciclo è stato invece osservato da Van Belleghem *et al.* (2007); ciò ha confermato l'importanza di questa struttura nella riduzione della quantità di Cd che potrebbe potenzialmente affluire ai vasi. Infine, come negli esperimenti di questa tesi, anche in *Arabidopsis* il sequestro (e di conseguenza anche il trasporto) del Cd nella regione centrale della radice sembrava essere prevalentemente apoplastico, con accumulo di metallo nel citoplasma solo quando veniva impiegata la più elevata concentrazione di Cd (Van Belleghem *et al.*, 2007).

Pertanto, come già ipotizzato per il parenchima corticale, l'accumulo simplastico di Cd nel parenchima dello xilema e la sua immobilizzazione di parete potrebbero essere visti come un meccanismo di ritenzione dell'eccesso di metallo nella radice, volto a ridurre l'entrata del metallo nei vasi e, quindi, la sua traslocazione ai fusti e alle foglie. Ciò è in linea anche con i risultati di altri esperimenti condotti di questa tesi, quali quelli di accumulo effettuati in emissione atomica, in quanto la radice di carota ha mostrato accumulare molto più Cd, da un punto di vista quantitativo, rispetto alle parti aeree; inoltre nelle radici, gli effetti del Cd sono stati molto evidenti, a differenza delle parti aeree, in cui invece non si sono riscontrati particolari danni.

Una frazione di Cd è stata comunque traslocata alle parti aeree di carota, come indicato dai dati analitici; tuttavia, nessun deposito è stato osservato nei piccioli e nelle lamine fogliari delle piante di carota esposte al Cd, che, inoltre, non presentavano nessun danno macro-microscopico. Questo risultato potrebbe far supporre che il Cd arrivato alle foglie di carota via xilema (comunque in quantità non elevata) sia stato solo in parte lì trattenuto, e in parte ritraslocato alla radice via floema. Una traslocazione floematica dalle foglie alle radici, infatti, è già stata osservata in precedenti lavori effettuati, rispettivamente, in *Solanum tuberosum* e *Triticum* sp. (Reid *et al.*, 2003; Cakmak *et al.*, 2000) e, a maggior ragione, potrebbe aver avuto luogo in carota, poiché com'è noto questa pianta investe gran parte della sua energia e dei suoi prodotti per lo sviluppo della radice fittonante.

In *Arabidopsis*, un notevole accumulo di Cd nella radice è stato rinvenuto nel citoplasma delle cellule del parenchima floematico e delle cellule compagne (Van Belleghem *et al.*, 2007). Poiché invece le altre cellule parenchimatiche del cilindro centrale non mostravano un così elevato accumulo di metallo, la sua elevata presenza nel floema non poteva essere imputata al trasporto del Cd intraradicale, ma piuttosto alla ritraslocazione floematica dalle foglie e dai fusti. Infatti, è stato dimostrato che il Cd può

essere rapidamente ridistribuito via floema a tutti i tessuti (Reid *et al.*, 2003), così come alla radice (Cakmak *et al.*, 2000).

La presenza di Cd nella radice di carota sembrerebbe quindi essere ulteriormente incrementata dalla sua ritraslocazione dalle parti aeree, tanto più che il Cd viene traslocato nel floema per lo più complessato con i tioli (Gong *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006; Mendoza-Cozatl *et al.*, 2008), quali glutatione e fitochelatine, rinvenuti anche negli esperimenti su carota condotti in questa tesi.

Combinando le osservazioni isto-anatomiche con quelle ultrastrutturali, e tenendo in debita considerazione anche la pertinente letteratura, è stato possibile delineare le sotto rappresentate vie di trasporto/accumulo del Cd in carota, con particolare riferimento alla sua radice (Figura 4.1).

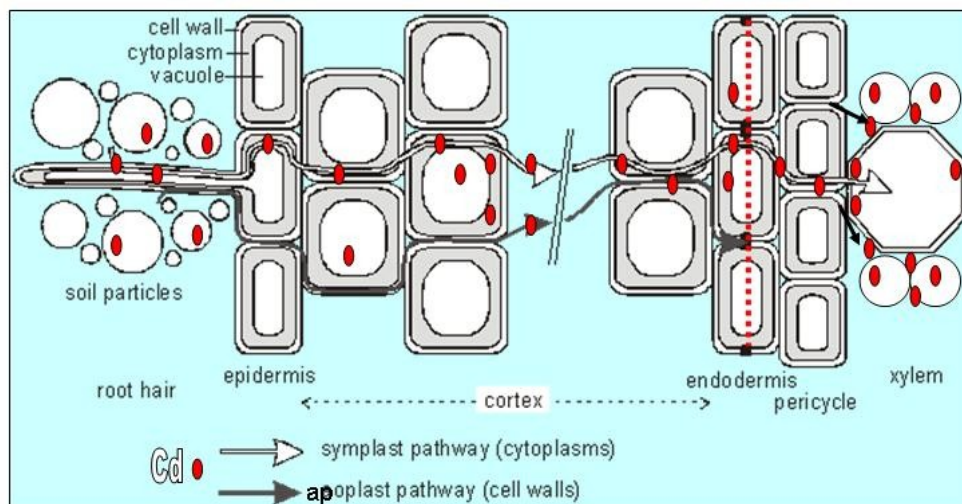


Figura 4.1. Rappresentazione schematica delle vie di trasporto/accumulo del cadmio nella radice di carota. Per la descrizione, fare riferimento al testo.

È stata inoltre ipotizzata una traslocazione floematica del Cd dalle parti aeree della carota verso la radice (Figura 4.2), con conseguente ulteriore accumulo del Cd in quest'organo.

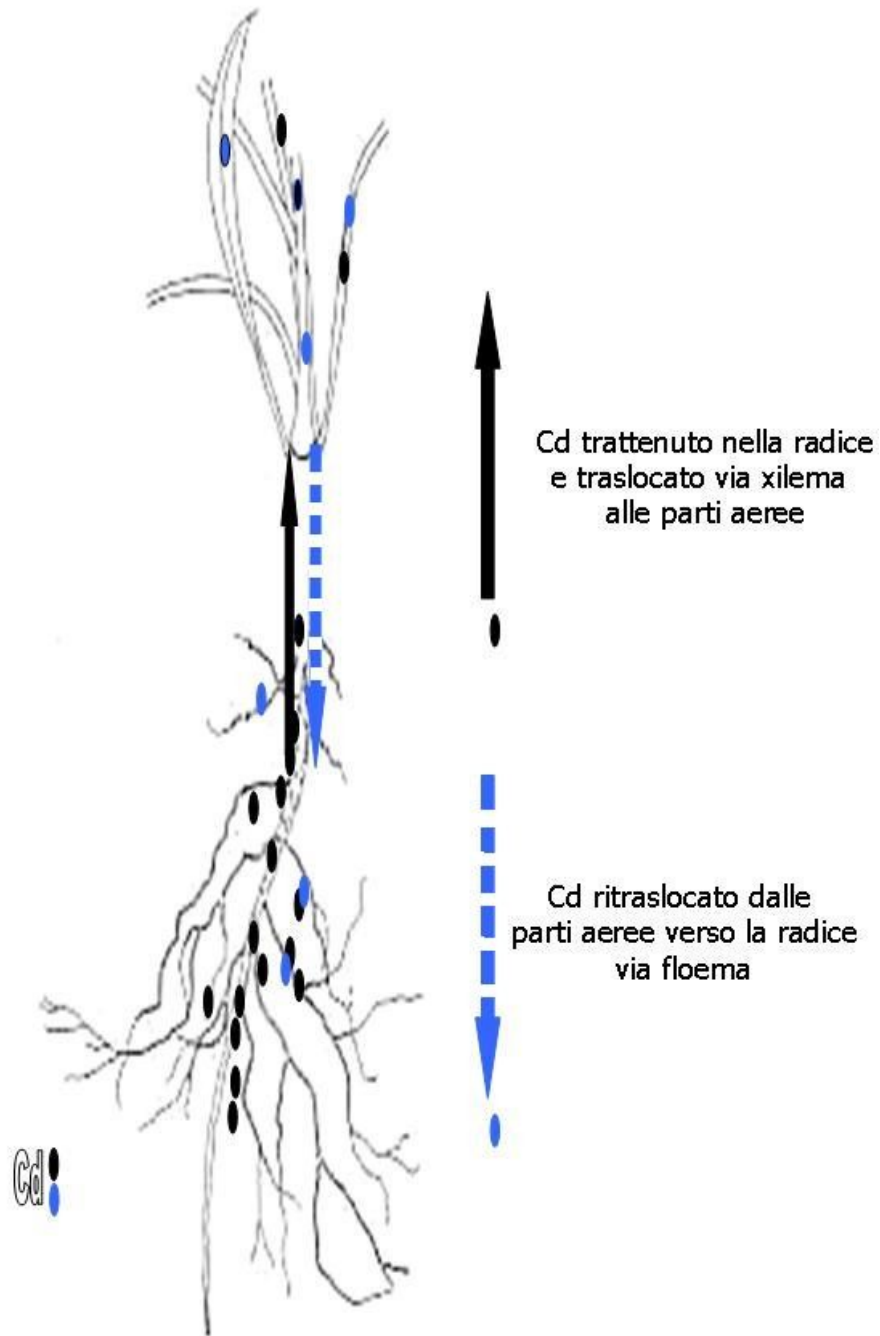


Figura 4.2. Rappresentazione schematica delle vie di trasporto/accumulo del cadmio nella pianta di carota. Per la descrizione, fare riferimento al testo.

Nel presente lavoro, carota è stata utilizzata anche come pianta ospite della fanerogama oloparassita *Cuscuta campestris* (cuscuta). È stata condotta un'accurata indagine isto-anatomica dell'interazione tra ospite e parassita, a livello delle zone di contatto, e più in dettaglio a livello degli austori, al fine di valutare *in primis* il tipo di connessioni cribro-vascolari tra le due specie. Le connessioni xilematiche tra ospite e parassita sono state chiaramente osservate, mentre le connessioni floematiche, più difficili da individuare con la sola microscopia ottica, sono state desunte grazie all'identificazione di "ife esploratrici" ed "ife assorbenti" a diretto contatto con il floema dell'ospite. Va comunque ricordato che cuscuta è un tipico parassita "phloem feeder" (Ziegler, 1975) e che una definita continuità floematica tra cuscuta e ospite era già stata messa in evidenza da Israel *et al.* nel 1980.

Uno degli scopi di questo lavoro di dottorato è stato quello di studiare gli effetti dello stress da Cd in cuscuta, impiegando carota come "vettore" del metallo. Per questo, alcune piante di carota sono state parassitizzate da cuscuta in condizioni controllate e poi trattate con 36 μM Cd per 2 e 4 giorni in coltura liquida. Come sopra discusso, le radici di carota hanno dimostrato essere il principale sito di accumulo del Cd, seguite dalle lamine fogliari e infine dai piccioli fogliari; ciò sia in piante di carota parassitizzate che non parassitizzate. Anche in cuscuta, che ha formato gli austori prevalentemente a livello dei piccioli di carota, è stato ritrovato Cd, in concentrazione tuttavia molto inferiore rispetto al suo ospite. Nelle piante parassitizzate la presenza di cuscuta ha determinato un trend di diminuzione (quasi significativo, $P = 0,063$) della quantità di Cd presente nei piccioli, facendo ipotizzare una traslocazione di Cd dal picciolo dell'ospite ai tessuti di cuscuta. Nelle lamine fogliari, invece, si è osservato un trend di aumento del Cd a seguito della parassitizzazione, facendo supporre un pronto effetto di *sink* operato dalla cuscuta. Se la cuscuta avesse prelevato il Cd dai piccioli per via xilematica, si sarebbe dovuta osservare una diminuzione di Cd nelle lamine fogliari delle piante parassitizzate. Invece in tali strutture non si è mai osservata una diminuzione di Cd, ma addirittura un trend di aumento.

Queste osservazioni indicano che il Cd trovato in cuscuta sembra provenire solo in percentuale esigua dallo xilema dei piccioli di carota; si può invece ipotizzare che il Cd di carota arrivi dalla radice nelle lamine fogliari via xilema, e che non venga "intercettato" significativamente dalla cuscuta a livello dei piccioli. Successivamente, nella lamina fogliare il Cd potrebbe entrare nella corrente floematica, essere solo in parte minima assorbito da

cuscuta attraverso i rari austeri fogliari lì formati, e far ritorno al picciolo, dove il metallo potrebbe a questo punto (almeno in parte) passare a cuscuta via connessioni floematiche tra ospite e parassita. Ciò è supportato anche dal fatto che il calo del contenuto in Cd nei piccioli di carota parassitizzata si riscontra soltanto dopo 4 giorni di trattamento con il metallo, cioè dopo un significativo lasso di tempo tra assunzione del metallo in carota e possibile transito dello stesso a cuscuta.

Il Cd, infatti, è mobile nel floema (Reid *et al.*, 2003; Riesen e Feller, 2005) e la possibilità di una sua traslocazione floematica dalle foglie alle radici di carota è già stata discussa in precedenza.

La percentuale di *uptake* del Cd da parte di cuscuta è stata di circa il 40% rispetto al contenuto in Cd dei piccioli di carota, e di circa il 10% rispetto al contenuto delle lamine fogliari. Queste percentuali risultano basse se confrontate con quelle di *uptake* di macronutrienti quali K^+ e Mg^{2+} (Tabella 1.3; Jeschke *et al.*, 1995). Va tuttavia ricordato che il Cd non è un nutriente e che, quindi, cuscuta potrebbe possedere meccanismi di esclusione di questo metallo, sulla qual cosa varrebbe la pena di esperire ulteriori e più approfondite indagini. Boyd *et al.* (1999), infatti, osservarono che *C. californica* possedeva concentrazioni di alcuni metalli pesanti molto inferiori rispetto a quelle rinvenute nel suo ospite *S. polygaloides*: circa il 26% di Ni, il 19% di Co e il 9% di Pb; in più ipotizzarono che il parassita fosse meno efficiente nell'escludere il Ni rispetto a Co e Pb.

Oltre all'ipotesi dell'esclusione del Cd da parte di cuscuta, ritenuta più probabile, si può anche supporre che il tempo di trattamento con Cd (2 e 4 giorni) sia stato troppo esiguo per poter registrare un significativo trasferimento di metallo da carota a cuscuta, sebbene in questo caso si sarebbero dovute osservare differenze significative nel contenuto in Cd tra i due tempi di trattamento, cosa che invece non si è registrata (Fig. 3.21 c).

Il trattamento delle piante di carota con Cd ha indotto nelle radici e nelle lamine fogliari un aumento dei livelli di glutatione (GSH) e la biosintesi di fitochelatine (PC). In carota, fitochelatine Cd-indotte erano già state individuate sia in piante coltivate *in vitro* e colture cellulari (Sanità di Toppi *et al.*, 1998) che in radici trasformate con *Agrobacterium rhizogenes* (Sanità di Toppi *et al.*, 1999). Oltre al ruolo protettivo e di disintossicazione, le fitochelatine sembrano contribuire al trasporto xilematico del Cd in *Arabidopsis thaliana* (Gong *et al.*, 2003), sebbene in *Brassica juncea* e *Nicotiana tabacum* ciò non sia stato confermato (Kumar *et al.*, 1995; Pomponi *et al.*, 2006). Bisogna ricordare, infatti, che il Cd

potrebbe essere trasportato attraverso lo xilema anche come ione libero (Leita *et al.*, 1996) o chelato da citrato, istidina o nicozianamina (Cataldo *et al.*, 1988; Krämer *et al.*, 1996; Pich e Scholz, 1996).

In questa tesi, nelle piante parassitizzate non trattate con Cd, il contenuto in GSH delle lamine fogliari è risultato essere superiore rispetto alle non parassitizzate, facendo ipotizzare la presenza di una condizione di stress generale della pianta causata dalla presenza di cuscuta; in aggiunta, data la straordinaria capacità di *sink* della cuscuta, metalli induttori della sintesi di GSH (quali Cu e Zn) e GSH localizzato in altre parti della pianta potrebbero essere stati richiamati nelle lamine fogliari di carota.

Nelle lamine fogliari delle piante parassitizzate trattate con Cd, inoltre, le PC sono aumentate rispetto alle non parassitizzate. La presenza di cuscuta, quindi, ha influito anche sul contenuto di PC; a 2 giorni di esposizione al Cd, infatti, si era osservata nelle lamine fogliari delle piante parassitizzate una maggior concentrazione di Cd. Ciò, insieme ad un maggior contenuto di GSH nelle lamine fogliari, potrebbe spiegare la maggior quantità di PC prodotta a seguito del trattamento.

In cuscuta, prima del trasferimento delle piante in coltura liquida, il contenuto di GSH si è dimostrato essere paragonabile a quello delle lamine fogliari delle piante di carota parassitizzate, indicando un certo equilibrio nei livelli di questo peptide tiolico tra ospite e parassita; a seguito del trasferimento delle piante in coltura liquida, il contenuto in GSH di cuscuta è aumentato. La cuscuta, quindi, potrebbe aver sintetizzato più GSH in risposta alle diverse condizioni colturali in cui si è trovata carota. Infatti, oltre al trasferimento delle piante dalla serra alla cella climatica, anche il mezzo di coltura è stato cambiato: dal terriccio torboso, le piante sono state trasferite nel mezzo liquido; molto probabilmente la biodisponibilità di alcuni elementi è così notevolmente variata. In particolare, il contenuto in Zn di cuscuta è aumentato con lo stesso trend del GSH; per questo motivo si può ipotizzare che un aumento di Zn nei tessuti di cuscuta abbia portato ad un aumento del contenuto in GSH.

Non è tuttavia da escludere, nel contempo, che un certo pool di GSH sia stato prelevato da cuscuta direttamente da carota per effetto *sink*, poiché dalle lamine fogliari di carota il GSH potrebbe essere ridistribuito via floema verso la radice, ed essere stato intercettato da cuscuta a livello dei piccioli. Il trasporto "long-distance" dei tioli attraverso il floema è già stato osservato in *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum* (Lappartient e Touraine, 1996; Li *et al.*, 2006; Rennenberg *et al.*, 1979); in particolar

modo, il GSH sembrava essere il composto tiolico più abbondante nel floema di *B. napus* (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2008). Nella carota, pianta biennale che investe durante il primo anno di crescita la maggior parte del suo metabolismo nello sviluppo della radice carnosa, si potrebbe postulare un comportamento simile.

Le PC sono state rinvenute in cuscuta che parassitizzava carota anche in assenza di trattamenti con Cd, mentre plantule di cuscuta che non avevano ancora parassitizzato carota sintetizzavano PC soltanto in presenza di Cd. Pertanto si è ipotizzato che altri metalli, quali Zn e Cu presenti sia nel terriccio che nel mezzo liquido, potessero aver indotto la sintesi di PC nella cuscuta mai trattata con Cd; di conseguenza, si sono effettuati esperimenti in condizione di deprivazione di Zn e Cu nel mezzo di coltura.

In condizioni normali (presenza di Zn e Cu nel mezzo di coltura), le lamine fogliari delle piante di carota parassitizzate hanno mostrato un maggior contenuto di Zn rispetto alle non parassitizzate, di nuovo a causa all'azione di *sink* della cuscuta. I piccioli delle piante parassitizzate, invece, a 2 giorni hanno mostrato un contenuto di Zn inferiore rispetto alle non parassitizzate, indicando sia un prelievo di Zn da parte della cuscuta di tipo xilematico, perché apparentemente rapido (2 giorni), sia nel contempo floematico, per il fatto che nelle lamine fogliari non si è registrato calo di Zn, bensì aumento.

Utilizzando un mezzo privo di Zn e Cu, invece, il contenuto in Zn delle lamine fogliari è effettivamente diminuito, almeno a 2 giorni, anche in presenza di cuscuta. L'azione di *sink* di cuscuta è stata determinante nell'aumentare il contenuto di Zn nei piccioli, sia a 2 giorni che a 4 giorni, in condizioni di carenza di Zn. Questo deporrebbe ulteriormente in favore di una redistribuzione floematica di un certo *pool* di Zn dalle lamine fogliari verso i piccioli, dove si è osservato aumento a causa dell'azione di *sink* della cuscuta.

La traslocazione dello Zn nel floema è stata oggetto di studi recenti: ad esempio, nel frumento si è rilevato che lo Zn può essere trasportato rapidamente nel floema (Herren e Feller, 1994; Haslett *et al.*, 2001; Page e Feller, 2005; Riesen e Feller, 2005), e la sua redistribuzione può dipendere dall'età della pianta e dal contenuto di Zn dell'organo "source" (Herren e Feller, 1996). In *Lupinus albus*, lo Zn è probabilmente trasportato via xilema alle foglie che traspirano (foglie vecchie) e poi ritraslocato via floema alle foglie di nuova formazione (foglie nuove) (Page *et al.*, 2006 a, b).

Nonostante l'aumento del contenuto in Zn dei piccioli di carota in condizioni di carenza di Zn, il contenuto di Zn in cuscuta è effettivamente diminuito dopo 2 giorni,

indicando un prelievo di questo metallo in parte di tipo xilematico, perché apparentemente rapido; tuttavia a 4 giorni i livelli di Zn sembrano essere ripristinati in cuscuta, deponendo in questo caso a favore del prelievo floematico.

Infine, in condizioni di Zn-carezza, non si sono osservate in cuscuta variazioni significative del suo contenuto in GSH e PC.

Nelle piante la sintesi delle PC è indotta dai metalli a seguito dell'attivazione dell'enzima fitochelatina sintasi (PCS) (Grill *et al.*, 1989); tuttavia, in alcuni lieviti è stato osservato che le PC possono essere prodotte anche attraverso altri meccanismi biosintetici (Al-Lahham *et al.*, 1999) o proteolitici (Wünschmann *et al.*, 2007), indipendenti dalla PCS. Poiché in cuscuta non esistono ancora dati relativi alla presenza/assenza di PCS e al meccanismo di biosintesi delle PC, in essa sono stati effettuati *western blotting* con un anticorpo specifico contro la PCS. L'analisi ha rivelato che cuscuta, trattata o meno con Cd, possiede costitutivamente la PCS; questo dato è in accordo con i risultati ottenuti in HPLC, dove si osservava biosintesi di fitochelatine in cuscuta sia nei controlli che nei trattati con Cd.

In HPLC, tuttavia, si osservava un aumento di PC Cd-indotta, mentre l'analisi *western* non rivelava un incremento di espressione della PCS a seguito del trattamento delle piante con Cd. In proposito, vi sono studi che indicano un'espressione costitutiva della PCS e dimostrano che i livelli dell'enzima non sono generalmente influenzati dall'esposizione al Cd, suggerendo che l'induzione dell'espressione del/i gene/i che codificano per la PCS non giochi un ruolo significativo nella regolazione della biosintesi di PC (Cobbett e Goldsbrough, 2002). Questo è supportato dalle analisi di espressione di *AtPCS1/CAD1*, dove era mostrato che i livelli di mRNA non erano influenzati dall'esposizione delle piante al Cd e ad altri metalli, suggerendo quindi l'assenza di una regolazione a livello trascrizionale (Ha *et al.*, 1999; Vatamaniuk *et al.*, 1999).

Infine, sempre nell'ambito dello studio della risposta al Cd delle lamine fogliari di carota, in questa tesi sono state osservate alcune bande, possibilmente Cd-indotte, del peso molecolare apparente di circa 160, 52, e 34 kDa. Le proteine Cd-indotte riportate in letteratura possono essere "stress-related proteins", "heat shock proteins" e "pathogenesis-related proteins", aventi un peso molecolare che va da 10 a 70 kDa (Sanità di Toppi e Gabbrielli, 1999; e referenze ivi contenute). Singolare sembra essere la presenza negli estratti di carota della banda ad alto peso molecolare, di cui non esistono informazioni in letteratura. Una banda di 52 kDa Cd-indotta era stata osservata in *Pisum*

sativum (Marchetti e Leita, 1995), mentre in radici trasformate di carota esposte al Cd erano state individuate due putative bande Cd-indotte del peso molecolare di 30 e 35 kDa (Sanità di Toppi *et al.*, 1999). Poiché nei campioni di carota le tre bande apparentemente Cd-indotte sono state individuate e separate mediante elettroforesi monodimensionale, una più approfondita analisi sarà necessaria per confermare il peso molecolare di queste bande, la funzione di tali proteine e il loro possibile ruolo nella disintossicazione del Cd.

Conclusioni

La presente tesi di dottorato si è proposta di studiare alcuni aspetti isto-anatomici, ultrastrutturali e funzionali della risposta al cadmio (Cd) in carota (*Daucus carota* L.), cuscuta (*Cuscuta campestris* Yuncker) e nella loro mutua interazione. Le piante di carota trattate con 36 μ M Cd fino a 14 giorni, hanno evidenziato danni pesanti a livello di radice, in particolare alla corteccia, ai parenchimi dei tessuti conduttori, al fellogeno ed al cambio cribro-vascolare, mentre non hanno mostrato particolari danni ai piccioli ed alle lamine fogliari. A conferma di ciò, l'analisi spettrofotometrica ad emissione atomica (ICP-AES) ha misurato un contenuto di Cd più alto nelle radici, seguito dalle lamine e dai piccioli fogliari. Il Cd, arrivato ai piccioli e alle lamine fogliari via xilema potrebbe essere stato in parte ritraslocato alla radice via floema complessato con i tioli, quali glutatione e fitochelatine, rinvenuti negli esperimenti. Una quantità di Cd significativa è stata trovata anche in cuscuta, a dimostrare l'avvenuta traslocazione del metallo da ospite a parassita. A questo proposito, la microscopia ottica ha permesso di osservare evidenti connessioni austoriali tra cuscuta e carota; tali connessioni, formate nei punti di contatto tra cuscuta ed i piccioli fogliari di carota, erano caratterizzate da protrusioni "finger-like" ed elementi vasali anulati. Come determinato in HPLC abbinata a spettrometria di massa, sia carota che cuscuta hanno risposto ai trattamenti con Cd sintetizzando fitochelatine; tuttavia, inaspettatamente, cuscuta ha prodotto fitochelatine anche in assenza di Cd, facendo ipotizzare in questo senso una sintesi di fitochelatine indotta da altri metalli, quali il rame (Cu) e lo zinco (Zn), presenti nel mezzo di coltura liquido e nei tessuti di carota. In effetti, la presenza costitutiva dell'enzima fitochelatina sintasi, attivata anche da altri metalli oltre al Cd, è stata confermata in cuscuta mediante *western blotting*, impiegando un anticorpo policlonale contro la fitochelatina sintasi di *Brassica juncea* (BjPCS1).

Bibliografia

Aidid, S.B., Okamoto, H. (1992). Effects of lead, cadmium and zinc on the electric membrane potential at the xylem/ symplast. Interface and cell elongation of *Impatiens balsamina*. Environ. Exp. Bot., 32(4) : 439-448.

Aidid, S.B., Okamoto, H. (1993). Responses of elongation rate, turgor pressure and cell wall extensibility of stem cells of *Impatiens balsamina* to lead, cadmium and zinc. BioMetals, 6: 245-249

Al-Lahham A, Rohde V, Heim P, Leuchter R, Veeck J, Wunderlich C, Wolf K, Zimmermann M. (1999) Biosynthesis of phytochelatins in the fission yeast. Phytochelatin synthesis: a second role for the glutathione synthetase gene of *Schizosaccharomyces pombe*. Yeast. 15(5): 385-96.

Alloway B.J., Steinnes E. (1999). Anthropogenic additions of Cd to soils. In: McLaughlin MJ, Singh BR (eds). Cd in Soils and Plants. Kluwer Academic Publishers, pp 97– 123.

Allred K.R. e Tingey D.C. (1964). Germination and spring emergence of dodder as influenced by temperature. Weeds 12:45-48.

Anelli, G., Pelosi, P., Galoppini, C. (1973). Influence of mercury on the amino acidic composition of tobacco leaves. Agr. Biol. Chem., 37(7): 1579-1582.

Aston F.M. e Santana D. (1976). *Cuscuta* spp. (dodder): a literature review of its biology and control. Div. Agric., Univ. California Bull. 1880: pag. 24.

Barcelò, J., Poschenrieder, C., Andreu, I., Gunsè, B. (1986). Cadmium-induced decrease of water stress resistance in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender). I. Effects of Cd on water potential, relative water content and cell wall elasticity. J. Plant Physiol., 125: 17-25.

Bäumel P., Jeschke W.D., Witte L., Czygan F.C., Proksch P. (1993). Uptake and transport of quinolizidine alkaloids in *Cuscuta reflexa* parasitizing on *Lupinus angustifolius*. Zeitschrift für Naturforschung 48c:436-443.

Benvenuti S., Dinelli G., Bonetti A., Catione P. (2005). Germination ecology, emergence and host detection in *Cuscuta campestris*. Weed Research, 45: 270-278.

Bennett C.W. (1944). Studies of dodder transmission of plant viruses. Phytopatology 34:905-932.

- Berkelaar E. e Hale B. (2000). The relationship between root morphology and cadmium accumulation in seedlings of two durum wheat cultivars. *Canadian Journal of Botany* 78: 381-387.
- Bewick T.A., Binning L.K., Dana M.N. (1988). Postattachment control of swamp dodder (*Cuscuta gronovii*) in cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) and carrot (*Daucus carota*). *Weed Technol.* 2:166-169.
- Birschwilks M., Haupt S., Hofius D., Neumann S. (2006). Transfer of phloem-mobile substances from the host plants to the holoparasite *Cuscuta* sp. *Journal of Experimental Botany* 57:911-921.
- Boyd R.S e Martens S.N. (1999). Aphids are unaffected by the elemental defense of the nickel hyperaccumulator *Streptanthus polygaloides* (Brassicaceae). *Chemoecology* 9:1-7.
- Boyd R.S., Martens S.N., Davis M.A. (1999). The nickel hyperaccumulator *Streptanthus polygaloides* (Brassicaceae) is attacked by the parasitic plant *Cuscuta californica* (Cuscutaceae). *Madroño*, 46(2): 92-99.
- Boyd R.S e Moar J. (1999). The defensive function of Ni in plants: response of the polyphagous herbivore *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) to hyperaccumulator and accumulator species of *Streptanthus* (Brassicaceae). *Oecologia* 118:218-224.
- Boyd R.S, Shaw J., Martens S.N. (1994). Nickel hyperaccumulation defends *Streptanthus polygaloides* (Brassicaceae) against pathogens. *American Journal of Botany* 81:294-300.
- Bowes B.G. (1996). *A Colour Atlas of Plant Structure*. Manson Publishing Ltd, London, UK. pag. 144
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Buchanan B.B., Grisse W., Jones R.L. (2003). *Biochimica e Biologia Molecolare delle Piante*. Zanichelli. pag. 775.
- Cakmak J., Welch R.M., Hart J., Norvell W.A., Oztürk I., Kochian L.V. (2000). Uptake and retranslocation of leaf-applied cadmium (¹⁰⁹Cd) in diploid, tetraploid and hexaploid wheats. *Journal of Experimental Botany* 51: 221-226.
- Cataldo, D.A., McFadden, K.M., Garland, T.R., Wildung, R.E. (1988). Organic constituents and complexation of nickel, iron, cadmium and plutonium in soybean xylem Exudates *Plant. Physiol.*, 86: 734-739.
- Chen Y.X., He Y.F., Luo Y.M., Yu Y.L., Lin Q., Wong M.H. (2003). Physiological mechanism of plant roots exposed to cadmium. *Chemosphere*, 50: 789-793.

- Chen A., Komives E.A., Schroeder J.I. (2006). An improved grafting technique for mature *Arabidopsis* plants demonstrates long-distance shoot-to-root transport of phytochelatin in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 141: 108-120.
- Clemens S., Kim E.J., Neumann D., Schroeder J.I. (1999). Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthase from plant and yeast. *EMBO J.* 18: 3325-3333.
- Clemens S., Schroeder J.I., Degenkolb T. (2001). *Caenorhabditis* expresses a functional phytochelatin synthase. *Eur. J. Biochem* 268: 3640-3643.
- Cobbet C. e Golsborough P. (2002). Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annu. Rev.Plant Biol.* 53:159-182.
- Dawson J.H. (1966). Response of field dodder to shade. *Weeds* 14:4-5.
- Dawson J.H., Ashton F.M., Welker W.V., Franf J.R., Buchanan G.A. (1984). Dodder and its control. U.S.Dept. Agric. Farmers' Bull. 2276. pag. 24.
- Dawson J.H., Musselman L.J., Wolswinkel P. (1994). Biology and control of *Cuscuta*. *Rev Weed Sci.* 6: 265-317.
- Dean H.L. (1954). Dodder overwintering as haustorial tissue within *Cuscuta*-induced galls. *Iowa Acad Sci.* 61:99-106.
- De Candolle A.P. (1813). *Théorie élémentaire de la botanique*. Paris.
- de Knecht, J.A., van Dillen, M., Koevoets, P.L.M., Schat, H., Verkleij, J.A.C., Ernst, W.H. (1994). Phytochelatin in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Physiol.*, 104: 255-261.
- Dörr I. (1968). Zur Lokalisierung von Zellkontakten zwischen *Cuscuta odorata* und verschiedenen höheren Wirtspflanzen. *Protoplasma* 65:435-448.
- Dörr I. (1972). Der Anschluß der *Cuscuta*-Hyphen an die Siebröhren ihrer Wirtspflanzen. *Protoplasma* 75:167-184.
- Dörr I. (1987). The haustorium of *Cuscuta*- new structural results. In: Weber H.C., Forstreuter W., eds. *Parasitic flowering plants. Proceedings of the 4th ISPPF, Marburg.*
- Dörr I. (1990). Sieve elements in haustoria of parasitic angiosperms. In Behnke H.D. and Sjolund R.D., eds. *Sieve Elements*. Springer-Verlag, Berlin. Pag. 239-256.
- Esau K. (1940). Developmental anatomy of the fleshy storage organ of *Daucus carota*. *Hilgardia* 13: 175-226.
- Evert Ray F. (2006). *Esau's Plant Anatomy. Meristems, Cells, and Tissue of the Plant Body-Their Structure, Function, and Development*. Wiley-Interscience, New Jersey, US.

- Fer A. (1978). Importance du saccharose dans les échanges trophiques entre l'hôte (*Pelargonium zonale* L. Aiton) et le parasite (*Cuscuta lupuliformis* Krock.). C.R. Acad. Sci. Paris 286 :863-866.
- Fer A. (1979). Contributo à la physiologie de a nutrition des Phanérogames parasites: étude du genre *Cuscuta* L. (Convolvulaceae). Thèse de Doctorat d'État, Université de Grenble, Franc. 105 pp.
- Fer A. (1981). Rcherches sur les voies de transprt impliquées ans l'absorption d'une phaérogame parasite. Étude sur des feuilles isolées parasitées par *Cuscuta*. *Physiol. Veg.* 19 :177-196.
- Fer A. (1984). Physiological approach to the chemical control of *Cuscuta*: experiments with ¹⁴C-labelled herbicides. In Parker C., Musselman L.J., Polhill R.M., Wilson A.K., eds. Proc. Third Int. Symp. on Parasitic Weeds. Aleppo, Syria. Pag. 164-174.
- Gamborg, O.L., Miller R.A., Ojima K., (1968). Nutrient requirement of suspensions cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50, 151- 158.
- Gallego, S.M., Benavides, M.P., Tomaro, M.L. (1996). Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci.*, 121: 151-159.
- Gong J.M., Lee D.A., Schroeder J.I. (2003). Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatins and cadmium in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 100: 10118-10123.
- Grill, E., Winnacker, E.-L., Zenk, M.H. (1985). Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*, 230: 674-676.
- Grill E., Löffler S., Winnaker E.L., Zenk M.H. (1989). Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86:6838-6842.
- Ha S.B., Smith A.P., Howden R., Dietrich W.M., Bugg S., et al. (1999). Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* 11:1153-1164.
- Haidair M.A., Orr G.L., Westra P. (1997). Effects of light and mechanical stimulation on coiling and prehaustoria formation in *Cuscuta* spp. *Weed Research*, 37: 219-228.
- Haslett B.S., Reid R.J., Rengel Z. (2001). Zinc mobility in wheat: uptake and distribution of zinc applied to leaves and root. *Annals of Botany* 87: 379-386.
- Hawkesford M.J. and Belcher A.R. (1991). Protein synthesis in response to S and P deprivation in roots. *Planta* 185:323-329.

- Heiss S., Wachter A., Bogs J., Cobbett C., Rausch T. (2003). Phytochelatin synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure. *Journal of Experimental Botany* 54: 1833-1839.
- Hendry, G.A.F., Baker, A.J.M., Ewart, C.F. (1992). Cadmium tolerance and toxicity, oxygen radical processes and molecular damage in cadmium tolerant and cadmium-sensitive clones of *Holcus lanatus*. *Acta Bot. Neerl.*, 41: 271-281.
- Hernandez, L.E., Carpena-Ruiz, R., Garate, A. (1996). Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *J. Plant Nutr.*, 19(12): 1581-1598.
- Herren T., Feller U. (1994). Transfer of zinc from xylem to phloem in the peduncle of wheat. *Journal of Plant Nutrition* 17: 1587-1598.
- Herren T., Feller U. (1996). Effects of locally increased zinc contents on zinc transport from the flag lamina to the maturing grains of wheat. *Journal of Plant Nutrition* 19: 379-387.
- Howden R e Cobbett C.S. (1992). Cadmium-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 100: 100-107.
- Howden R., Goldsbrough P.B., Andersen C.R., Cobbett C.S. (1995). Cadmium-sensitive, *cad1*, mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiology* 107: 1059-1066.
- Israel S., Dörr I., Kollmann R. (1980). Das Phloem der Haustorien von *Cuscuta*. *Protoplasma* 103: 309-321.
- Jeschke W.D., Räth N., Bäumel P., Czygan F.C., Proksch P. (1994 a). Modelling of the flows and partitioning of carbon and nitrogen in the holoparasite *Cuscuta reflexa* Roxb. and its host *Lupinus albus* L. I. Methods for estimating net flows. *Journal of Experimental Botany* 45:791-800.
- Jeschke W.D., Bäumel P., Räth N., Czygan F.C., Proksch P. (1994 b). Modelling of the flows and partitioning of carbon and nitrogen in the holoparasite *Cuscuta reflexa* Roxb. and its host *Lupinus albus* L. II. Flows between host and parasite and within the parasitized host. *Journal of Experimental Botany* 45:801-812.
- Jeschke W.D., Bäumel P., Räth N. (1995). Partitioning of nutrients in the *Cuscuta reflexa*-*Lupinus albus* association. *Aspects of Applied Biology* 42:71-79.
- Kessler, A., Brand, M.D. (1995). The mechanism of the stimulation of state 4 respiration by cadmium in potato tuber (*Solanum tuberosum*) mitochondria. *Plant Physiol. Biochem.*, 33: 519-528.
- Khan D.H., Duckett J.G., Frankland B., Kirkham J.B. (1984). An X-ray microanalytical study of the distribution of cadmium in roots of *Zea mays* L. *Journal of Plant Physiology* 115: 19-28.

- Kneer, R. (1993). Phytochelatine Analytik, Komplexstruktur, Schwermetalltoleranz, Verbreitung im Pilzreich und preparative, enzymatische Synthese. Ph.D. Thesis, Munchen, Germany.
- Kneer, R., Zenk, M.H (1992). Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metals poisoning. *Phytochem.*, 31(8): 2663-2667.
- Kollmann R, Dörr I. (1969). Strukturelle Grundlagen des zürischezelligen Stoffaustausches. *Ber. dt. bot. Ges.* 82. 415-25.
- Kollmann R, Dörr I. (1987). Parasitische Blütenpflanzen. *Naturwissenschaften* 74: 12-21.
- Krämer U., Cotter-Howells J.D., Charnock J.M., Baker A.J.M., Smith J.A.C. (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379: 635-638.
- Kroschel J. (2001). A technical manual for parasitic weed research and extension. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- Krupa, Z. (1988). Cadmium-induced changes in the composition and structure of the light-harvesting complex II in radish cotyledons. *Physiol. Plant.*, 73: 518-524.
- Kumar P.B.A.N., Dushenkov V., Motto H., Raskin I. (1995). Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soil. *Environmental Science and Technology* 29: 1232-1238.
- Küpper H., Lombi E., Zhao F.J., McGrath S.P. (2000). Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta* 212: 75-84.
- Lappartient A.G., e Touraine B. (1996). Demand-driven control of root ATP sulfurylase activity and SO₄²⁻ uptake in intact canola (The role of phloem-translocated glutathione). *Plant Physiology* 111: 147-157.
- Lee K.B. and Lee C.D. (1989). The structure and development of the haustorium in *Cuscuta australis*. *Can. J. Bot.* 67:2975-2982.
- Leita L., De Nobili M., Cesco S., Mondini C. (1996). Analysis of intercellular cadmium forms in roots and leaves of bush bean. *Journal of Plant Nutrition* 19: 527-533.
- Li Y., Dankher O.P., Carreira L., Smith A.P., Meagher R.B. (2006). The shoot-specific expression of gamma-glutamylcysteine synthetase directs the long-distance transport of thiol-peptides to roots conferring tolerance to mercury and arsenic. *Plant Physiology* 14: 288-298.
- Littlefield N.A., Patee H.E., Allred K.R. (1966). Movement of sugars in the alfalfa-dodder association. *Weeds* 14:52-54.

- Marchetti S., Leita L. (1995). Risposta sporofitica e gametofitica allo stress da cadmio in *Pisum sativum*. In: Atti XXXIX Convegno Annuale Societa` Italiana di Genetica Agraria, Vasto Marina, Italy, pp. 207–208.
- Martens S.N. e Boyd R.S. (1994). The ecological significance of nickel hyperaccumulation: a plant chemical defense. *Oecologia* 98: 379-384.
- Mattioni, C., Gabbrielli, R., Vangronsveld, J., Clijsters, H. (1997). Nickel and cadmium toxicity and enzymatic activity in Ni-tolerant and non-tolerant populations of *Silene italica* Pers. *J. Plant Physiol.* 150: 173-177.
- Mendoza-Cózatl D., Butko E., Sprinter F., Torpey J.W., Komives E.A., Kehr J., Schroeder J.I. (2008). Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *The Plant Journal* 54: 249-259.
- Nieboer E. e Richardson D.H.S. (1980). The replacement of the non-descriptive term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution Ser B* 1:3-26.
- Obata, H., Inoue, N., Umebayashi, M. (1996). Effect of cadmium on plasma membrane ATPase from plant roots differing in tolerance to cadmium. *Soil Sci. Plant Nutr.* 42(2): 361-366.
- Ortiz, D.F., Kreppel, L., Speiser, D.M., Scheel, G., McDonald, G., Ow, D.W. (1992). Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *EMBO J.* 11, 3491–3499.
- Ortiz D.F., Ruscitti T., McCue K.F., Ow D.W. (1995). Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *Journal of Biological Chemistry* 270: 4721-4728.
- Page V. e Feller U. (2005). Selective transport of zinc, manganese, nickel, cobalt and cadmium in the root system and transfer to the leaves in young wheat plants. *Annals of Botany* 96: 425-434.
- Page V., Weiskopf L., Feller U. (2006a). Heavy metals in white lupin: uptake, root-to-shoot transfer and redistribution with the plant. *New Phytologist* 171: 329-341.
- Page V., Le Bayon R.C., Feller U. (2006b). Partitioning of zinc, cadmium, manganese and cobalt in wheat (*Triticum aestivum*) and lupin (*Lupinus albus*) and further release into the soil. *Environmental and Experimental Botany* 58: 269-278.
- Pate J.S. (1980). Transport and portioning of nitrogenous solutes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:313-340.
- Penot M. (1986). L'importance de la voie ligneuse dans l'alimentation de la *Cuscuta*. *Physiol. Veg.* 24:333-338.

- Petronici C. (1989). Gli elementi nutritivi. In: Sequi P., ed. Chimica del suolo. Patron Editore, Bologna, Italia. Pag. 357-386.
- Pich A. e Scholz G. (1996). Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem. *Journal of Experimental Botany* 47: 41-47.
- Piñeros M.A., Schaff J.E., Kochian L.V. (1998). Development, characterization and application of a cadmium-selective micro-electrode for the measurement of cadmium fluxes in roots of *Thlaspi* species and wheat. *Plant Physiology* 116: 1393-1401.
- Pignatti, S. (1982). "Flora d'Italia" vol. 2. ed. Edagricole. Pag. 249-252.
- Pirondini A., Visioli G., Malcevski A., Marmioli N. (2006). A 2-D liquid-phase chromatography for proteomic analysis in plant tissues. *Journal of Chromatography B* 833: 91-100.
- Pomponi M., Censi V., Di Girolamo V., De Polis A., Sanità di Toppi L., Aromolo R., Costantino P., Cardarelli M. (2006). Overexpression of Arabidopsis phytochelatin synthase in tobacco plants enhances Cd²⁺ tolerance and accumulation but not translocation to the shoot. *Planta* 223: 180-190.
- Prasad, M.N.V. (1997). Trace metals. In: *Plant ecophysiology*, pp.207-249. M.N.V. Prasad (Ed.) John Wiley & Sons, New York.
- Przemeck, E., Haase, N.U. (1991). On the binding of manganese, copper and cadmium to peptides of the xylem sap of plant roots. *Water Air Soil Pollut.* 57-58 : 844-848.
- Ranieri, A., Castagna, A., Scebba, F., Careri, M., Zagnoni, I., Predieri, G., Pagliari, M., Sanità di Toppi, L., (2005). Oxidative stress and phytochelatin characterisation in bread wheat exposed to cadmium excess. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 45-54.
- Reid R.J., Dunbar K.R., McLaughlin M.J. (2003). Cadmium loading into potato tubers: the role of periderm, xylem and phloem. *Plant, Cell & Environment* 26: 201-206.
- Rennenberg H., Schmitz K., Bergamnn L. (1979). Long-distance transport of sulfur in *Nicotiana tabacum*. *Planta* 147: 57-62.
- Riesen O. e Feller U. (2005). Redistribution of Nickel, Cobalt, Manganese, Zinc, and Cadmium via the Phloem in Young and Maturino Wheat. *Journal of Plant Nutrition* 28: 421-430.
- Ruotolo R., Peracchi A., Bolchi A., Infusini G., Amoresano A., Ottonello S. (2004). Domain organization of phytochelatin synthase – Functional properties of truncated enzyme species identified by limited proteolysis. *Journal of Biological Chemistry* 279:14686-14693.
- Salin, M.L. (1988). Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplasts. *Physiol. Plant.* 72: 681-689.

- Salt D.E. Blaylock M., Kumar N.P.B.A., Dushenkov V., Ensley B.D., Chet I., Raskin I. (1995). Phytoremediation: a novel strategy for removal of toxic metal from the environment using plants. *Bio/Technol.* 13: 468-474.
- Sanità di Toppi, L., Gabbrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 41: 105-130.
- Sanità di Toppi L., Gabbrielli, R., Lombardi, M., Pazzagli, L., Cappugi, G., Durante, M. (1998). Response to cadmium in carrot *in vitro* plants and cell suspension cultures. *Plant Science* 137: 119-129.
- Sanità di Toppi L., Lambardi M., Pecchioni N., Pazzagli L., Durante M., Gabbrielli R. (1999). Effects of cadmium stress on hairy roots of *Daucus carota*. *Journal of Plant Physiology* 154:385-391.
- Sanità di Toppi, L., Prasad, M.N.V. Ottonello S. (2002). Metal chelating peptides and proteins in plants. In: Prasad M.N.V. Strzalka K, eds. *Physiology and biochemistry of heavy-metal detoxification and tolerance in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Pag. 59-93.
- Senden, M.H.M.N., Van Paassen, F.J.M., Van der Meer, A.J.G.M., Wolterbeek, H.T. (1992) Cadmium-citric acid-xylem cell wall interactions in tomato plants. *Plant Cell Environ* 17: 71-79.
- Senden, M.H.M.N. Van der Meer, A.J.G.M., Verburg, T.G. Wolterbeek, H.T. (1994). Effect of cadmium on the behaviour of citric acid in isolated tomato xylem cell walls *J. Exp. Bot.*, 45(274): 597-606.
- Seregin I.V. e Ivanov V.B. (2001). Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 48: 523-544.
- Sharma R.K., Agrawal M. (2006). Single and combined effects of cadmium and zinc on carrots: uptake and bioaccumulation. *Journal of Plant Nutrition*, 29 (10): 1791-1804.
- Siedleka, A., Krupa, Z. (1996). Interaction between cadmium and iron and its effects on photosynthetic capacity of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol. Biochem.* 34(6): 833-841.
- Somashekaraiah, B.V., Padmaja, K. Prasad, A.R.K. (1992). Phytotoxicity of cadmium ions of germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation *Physiol. Plant.* 85: 85-89.
- Srivastava S., Tripathi R.D., Dwivedi U.N. (2004). Synthesis of phytochelatin and modulation of antioxidants in response to cadmium stress in *Cuscuta reflexa* – an angiospermic parasite. *J. Plant Physiol.* 161. 665-674.
- Stewart F.C., French G.T., Wilson J.K. (1908). Troubles of alfalfa in New York. N.Y. (Geneva) *Agric. Exp. Sta. Bull.* No. 305.

- Thierry C., Florin B., Pétiard V. (1999). Changes in protein metabolism during the acquisition of tolerance to cryopreservation of carrot somatic embryos. *Plant Physiology and Biochemistry* 37:145-154.
- Tsivion Y. (1978). Loading of assimilates and some sugars into the translocation system of *Cuscuta*. *Aust. J. Plant Physiol.* 5:581-587.
- Van Assche, F., Clijsters, H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.*, 13: 195-206.
- Vail S.L., Dailey O.D., Blanchard E.J., Pepperman A.B., Riopel J.L. (1990). Terpenoid precursors of strigol as a seed germination stimulant of broomrape (*Orobancha ramosa*) and witchweed (*Striga asiatica*). *Journal of Plant Regulation*, 9: 77-83.
- Van Belleghem F., Cuypers A., Semane B., Smeets K., Vangronsveld J., Haen J., Valcke R. (2007). Subcellular localization of cadmium in roots and leaves of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 173: 495-508.
- Vatamaniuk O.K., Mari S., Lu Y-P., Rea P.A. (1999). AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and *in vitro* reconstitution. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7110-7115.
- Vázquez M.D., Barceló J., Poschenrieder C., Mádico J., Hatton P., Baker A.J.M., Cope G.H. (1992a). Localization of zinc and cadmium in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae), a metallophyte that can hyperaccumulate both metals. *Journal of Plant Physiology* 140: 350-355.
- Vergnano Gambi O. (1992). The distribution and ecology of the vegetation of ultramafic soils in Italy. In: Roberts BA, Proctor J. eds. *The ecology of areas with serpentinized rocks – a world view*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academy Publishers, 217-247.
- Vögeli-Lange R. e Wagner G.J. (1996). Relationship between cadmium, glutathione and cadmium-binding peptides (phytochelatins) in leaves of intact tobacco seedlings. *Plant Science* 114: 11-18.
- Wagner G.J. (1993). Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Advances in Agronomy* 51: 173-212.
- Wallace A., Romney E.M., Alexander G.V. (1978). Mineral composition of *Cuscuta nevadensis* Johnston (dodder) in relationship to its host. *Plant Soil* 50:227-231.
- Wójcik M. e Tukiendorf A. (2004). Phytochelatin synthesis and cadmium localization in wild type of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* 44: 71-80.
- Wolswinkel P. (1974 a). Complete inhibition of setting and growth of fruits of *Vicia faba* L., resulting from the draining of the phloem system by *Cuscuta* species. *Acta Botanica Neerlandica* 23:48-60.

- Wolswinkel P. (1974 b). Enhanced rate of ^{14}C -solute release to the free space by the phloem of *Vicia faba* stems parasitized by *Cuscuta*. *Acta Botanica Neerlandica* 23:177-188.
- Wolswinkel P. (1978). Accumulation of Phloem-Mobile Mineral Elements at the Site of Attachment of *Cuscuta europaea* L. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 86: 77-84.
- Wolswinkel P. e Amerlaan A. (1983). Sucrose and hexose release by excised stem segments of *Vicia faba* L. The sucrose-specific stimulating influence of *Cuscuta* on sugar release and the activity of acid invertase. *Journal of Experimental Botany* 34:1516-1527.
- Wünschmann J, Beck A, Meyer L, Letzel T, Grill E, Lenzian KJ. (2007). Phytochelatins are synthesized by two vacuolar serine carboxypeptidases in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 581(8):1681-7.
- Ximénez-Embún P., Rodríguez-Sanz B., Madrid-Albarrán Y., Cámara C. (2002). Uptake of heavy metals by lupin plants in artificially contaminated sand: preliminary results. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 82: 805-813.
- Ziegler H. (1975). Nature of transported substances. In Zimmermann M.H. and Milburn J.A., eds. *Phloem Transport. Encyclopedia of Plant Physiology New Series. Vol I.* Springer-Verlag, Berlin. Pag. 59-100.
- Zimmermann M.H. e Milburn J.A. (1975). *Phloem Transport. Encyclopedia of Plant Physiology New Series, Vol. I.* Springer-Verlag, Berlin.