



Università degli Studi di Firenze

FACOLTÀ DI AGRARIA

Scuola di Dottorato “Ubaldo Montelatici” in Scienze e Tecnologie Vegetali,
Microbiche e Genetiche

Settore Scientifico disciplinare di riferimento: AGR/07 (Genetica Agraria)

Dottorato di Ricerca in Scienze Genetiche

XXIII Ciclo

**Analisi trascrizionale di geni coinvolti nella risposta agli stress
abiotici in pioppo (*Populus* spp.)**

Tutor:

Prof.ssa Milvia Luisa Racchi

Dottoranda:

Dott.ssa Grazia Pallara

Coordinatore del corso di Dottorato

Prof.ssa Milvia Luisa Racchi

Anno 2010

INDICE

RIASSUNTO DELLA TESI	4
INTRODUZIONE	7
1. Il pioppo	8
1.1 Principali caratteristiche del genere <i>Populus</i>	8
1.2 Il pioppo come modello di studio	9
2. Lo stress idrico	13
2.1 Effetti fisiologici dello stress idrico	13
2.2 Meccanismi di difesa delle piante	14
2.2.1 Accumulo di sostanze osmoticamente attive	16
2.2.2 Proteine coinvolte nella difesa dallo stress	17
2.3 Il cambio	19
2.3.1 Attività cambiale e filogenesi	19
2.3.2 Effetti della siccità sul cambio	21
2.4 Metabolismo dei carboidrati	22
2.4.1 Flusso dei carboidrati nella pianta	22
2.4.2 Enzimi coinvolti nella biosintesi della cellulosa	23
2.4.3 Enzimi coinvolti nella biosintesi e nella degradazione dell'amido	25
2.4.4 Trasportatori di zuccheri	26
3. Lo stress da metalli pesanti	28
3.1 Effetti tossici dei metalli pesanti sulle piante	28
3.2 Meccanismi molecolari di difesa dai metalli pesanti	29
3.2.1 Meccanismi di esclusione	30
3.2.2 Meccanismi omeostatici	31
3.2.3 Proteine di risposta allo stress	32
3.3 La fitoestrazione	33
3.3.1 Metodi convenzionali e biologici per il recupero dei terreni inquinati	33
3.3.2 Funghi micorrizici arbuscolari (FMA) e fitoestrazione	35
3.3.3 Utilizzo del pioppo nella fitoestrazione	37
OBIETTIVI DELLA TESI	39
CAPITOLO 1. EFFETTO DEL DEFICIT IDRICO SULL'ESPRESSIONE DEI GENI DI RISPOSTA ALLO STRESS NELLA REGIONE CAMBIALE DI DUE CLONI DI PIOPPO CON UNA DIVERSA RISPOSTA ALLA SICCIÀ	40
Introduzione	44
Materiali e metodi	47
Materiale vegetale e disegno sperimentale	47
Relazioni idriche suolo-pianta e misura dell'accrescimento	47
Isolamento della zona cambiale	48
Determinazione del contenuto in MDA	49
Determinazione dei soluti osmoticamente attivi e del contenuto di prolina	49
Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA a singolo filamento	50
Disegno dei primer e real-time qPCR	50
Analisi statistica	51
Risultati	53
Determinazione del contenuto in MDA	54
Determinazione dei soluti osmoticamente attivi e del contenuto di prolina	55
Livello di trascrizione dei geni coinvolti nella difesa dallo stress	56

Discussione	58
Conclusioni	62
CAPITOLO 2: EFFETTO DEL DEFICIT IDRICO SULL'ESPRESSIONE DEI GENI COINVOLTI NEL METABOLISMO DEI CARBOIDRATI NELLA REGIONE CAMBIALE DI DUE CLONI DI PIOPPA CON UNA DIVERSA RISPOSTA ALLA SICITÀ	63
Introduzione	64
Materiali e metodi	68
Materiale vegetale e disegno sperimentale	68
Relazioni idriche suolo-pianta e misura dell'accrescimento	69
Isolamento della zona cambiale	70
Determinazione degli zuccheri solubili totali e dell'amido	70
Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA a singolo filamento	71
Disegno dei primer e real-time qPCR	71
Analisi statistica	72
Risultati	74
Monitoraggio dei parametri morfo-fisiologici	74
Effetto dello stress idrico sulla concentrazione di zuccheri solubili totali e dell'amido	75
Livello di trascrizione dei geni coinvolti nel metabolismo dei carboidrati	76
Discussione	83
Conclusioni	88
CAPITOLO 3. ANALISI DI TRASCritti DI GENI DI DIFESA DALLO STRESS IN RADICI E FOGLIE DI UN CLONE DI PIOPPA TOLLERANTE AI METALLI PESANTI (AL35) MICORRIZATO CON <i>GLOMUS MOSSEAE</i> E CRESCIUTO SU UN SUOLO INQUINATO	89
Introduzione	90
Materiali e metodi	93
Materiale vegetale	93
Inoculo del fungo	93
Disegno sperimentale e condizioni di crescita	93
Procedura di campionamento	94
Analisi chimiche	94
Analisi della crescita e della colonizzazione micorrizica	95
Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA a singolo filamento	95
Produzione delle membrane di nylon per l'analisi macroarray	95
Real-time qPCR	97
Analisi statistica	97
Risultati	100
Profilo di espressione dei geni coinvolti nella risposta allo stress	103
Real time-qPCR	110
Discussione	111
Conclusioni	116
BIBLIOGRAFIA	117
RINGRAZIAMENTI	138

Riassunto della tesi

Il pioppo (*Populus* spp.) rappresenta un importante modello di studio per la biologia molecolare nelle specie arboree. L'interesse verso questa pianta è dovuto non solo alla sua rapidità di crescita e di propagazione, ma anche all'importanza economica che riveste per la produzione del legno. Inoltre, la capacità di accumulare metalli pesanti nella parte aerea rende il pioppo un buon candidato per la fitoestrazione. La comprensione dei meccanismi molecolari alla base della sua tolleranza agli stress ambientali può fornire utili indicazioni nella selezione di genotipi più adatti per scopi specifici.

Parte I) La siccità rappresenta un grosso limite per la produttività del pioppo e per la qualità del legno. Poiché il legno ha origine dalla divisione delle cellule del cambio, l'effetto dello stress idrico sulla zona cambiale necessita di essere maggiormente studiato, sia a livello biochimico che molecolare. In questo studio, la zona cambiale dei due cloni di pioppo 'Dvina' (tollerante al deficit idrico) e 'I-214' (sensibile) è stata analizzata per acquisire maggiori conoscenze sulle strategie messe in atto dai due cloni per proteggere dal deficit idrico questo particolare tessuto. Un gruppo di piante di 'Dvina' e di 'I-214' è stato sottoposto a deficit idrico per due settimane seguito da reidratazione, mentre un secondo gruppo è stato sottoposto ad irrigazione normale per essere utilizzato come controllo. L'analisi della perossidazione lipidica delle membrane cellulari ha mostrato che, in presenza di deficit idrico prolungato nel tempo, il clone 'Dvina' è più efficiente nel difendere la zona cambiale dallo stress ossidativo. Inoltre, le strategie di difesa dalla siccità impiegate dai due cloni appaiono diverse. 'I-214' ha mostrato un accumulo di prolina libera molto più pronunciato di 'Dvina', suggerendo un ruolo cruciale di questo aminoacido nella difesa del clone dalla siccità. L'analisi tramite real-time PCR quantitativa dei geni codificanti per enzimi antiossidanti (superossido dismutasi, catalasi, ascorbato perossidasi, glutatione reduttasi) e per metallotioneine ha evidenziato una diversa abilità

dei due cloni nel modulare tali geni di difesa dallo stress. In 'Dvina' il gene per una metallothioneina (*MT3b*) è risultato fortemente sovra-regolato dal deficit idrico a differenza di 'I-214', per cui possiamo ipotizzare il coinvolgimento di tale gene nel mantenimento dell'omeostasi intracellulare nel clone tollerante. Il deficit idrico ha inoltre influenzato in modo diverso nei due cloni la concentrazione degli zuccheri solubili e dell'amido e l'espressione dei geni coinvolti nel trasporto e nel metabolismo dei carboidrati (saccarosio, cellulosa, callosio, amido). In 'Dvina' la riduzione dell'espressione dei geni per trasportatori del saccarosio *Mst3.1* e *Suc2* e la forte induzione del gene della β -amilasi *Bam1*, parallelamente alla riduzione nel contenuto di amido, suggeriscono che, in condizioni di carenza idrica, 'Dvina' sia in grado di ridurre il trasporto del saccarosio dalle foglie alla zona cambiale e di utilizzare in parte l'amido accumulato in questo tessuto come fonte di energia alternativa per il sostegno del metabolismo. Questo non si verifica in 'I-214', per cui si può ipotizzare che il clone non mobilizzi l'amido accumulato nel cambio e che tale tessuto continui a costituire un "sink" per la pianta. La differente regolazione del rapporto *source-sink* nei due cloni potrebbe essere un'altra causa della maggior tolleranza alla siccità riscontrata in 'Dvina'. In conclusione, il *background* genetico dei due cloni appare influenzare fortemente la risposta alla siccità, sottolineando il controllo genetico della plasticità molecolare nella risposta allo stress idrico.

Parte II) La capacità delle piante di pioppo di tollerare e accumulare i metalli pesanti nella parte aerea, utile per la fitoestrazione, può essere incrementata dalla simbiosi con i funghi micorrizici arbuscolari. In questo studio è stato valutato l'effetto della simbiosi tra *Glomus mosseae* e il clone di *Populus alba* 'AL35' sulla capacità del clone di accumulare e tollerare i metalli pesanti. Piante micorrizzate e non micorrizzate di 'AL35' sono state coltivate in due tipi di terreno, il primo contaminato da elevate quantità di Cu e Zn e il secondo non contaminato in modo da costituire un controllo. L'effetto della simbiosi è

stato valutato sulla trascrizione dei geni antiossidanti e dei geni coinvolti nell'omeostasi intracellulare dei metalli, sia nelle radici che nelle foglie e discusso in relazione alla crescita delle piante e alla concentrazione dei due metalli nei tessuti. La maggiore crescita delle piante di 'AL35' micorrizzate con *G. mosseae* e coltivate sul suolo contaminato da Cu e Zn ha rivelato, rispetto alle piante non micorrizzate, una maggior tolleranza del clone nei confronti dei due metalli. Il fungo ha inoltre determinato un incremento nella concentrazione dei due metalli negli organi di 'AL35'. L'analisi mediante cDNA macroarray ha evidenziato cambiamenti significativi nell'espressione genica, causati dalla simbiosi con *G. mosseae*, sia nelle radici che nelle foglie di 'AL35'. In seguito alla crescita su suolo contaminato, sia nelle radici che nelle foglie delle piante non micorrizzate sono risultati sovraespressi la maggior parte dei geni del ciclo dell'ascorbato glutatione e numerosi geni *Sod*, principalmente nelle foglie. Anche i geni coinvolti nell'omeostasi dei metalli sono stati indotti dalla crescita sul terreno contaminato in modo particolare nelle foglie. La presenza di *Glomus mosseae* ha causato la mancata o ridotta attivazione dei geni antiossidanti nelle radici e l'induzione dei geni coinvolti nell'omeostasi dei metalli soprattutto nelle foglie. I dati ottenuti suggeriscono che la simbiosi con il fungo arbuscolare porti ad una riduzione dei livelli di ROS nelle radici di 'AL35', per cui l'assenza di stress ossidativo spiegherebbe la mancata induzione dei geni antiossidanti. Inoltre la simbiosi con *G. mosseae* appare stimolare i geni codificanti per MT nelle foglie, consentendo ad 'AL35' di evitare gli effetti tossici causati dall'elevata concentrazione dei metalli pesanti nel citosol. Il presente studio ha mostrato che il pre-inoculo di 'AL35' con *G. mosseae* costituisce un'utile strategia per aumentare l'efficienza di questo clone nel processo di fitoestrazione.

Introduzione

1. Il pioppo

1.1 Principali caratteristiche del genere *Populus*

Il genere *Populus* L. appartiene alla famiglia delle *Salicaceae* e all'ordine delle *Malpighiales*. E' un genere di piante decidue, raramente sempreverdi, ampiamente diffuso nell'emisfero nord e in modo limitato nell'Africa tropicale. Sono state suggerite molte classificazioni per il genere *Populus*, la più recente delle quali vede 29 specie raggruppate in 6 sezioni: *Abaso*, *Aigeros*, *Leucoides*, *Populus*, *Tacamahaca* e *Turanga* (Eckenwalder 1996). La collocazione di ciascuna specie all'interno di una sezione è basata tradizionalmente sui caratteri morfologici, sulla localizzazione geografica e sulla capacità di incrocio interspecifico. Le specie appartenenti alla stessa sezione hanno la capacità di incrociarsi tra loro dando origine a ibridi, mentre la compatibilità si riduce tra specie di diverse sezioni. In conseguenza dell'elevato numero delle specie, questa classificazione risulta spesso complessa e non priva di incongruenze, tali da suscitare dubbi sulla possibile ricollocazione di alcune specie in sezioni diverse o addirittura nuove. Molte di queste specie presentano una distribuzione ampia, essendo diffuse attraverso interi continenti (*P. tremuloides*, *P. tremula*) e solo poche sono geograficamente confinate (*P. ilicifolia*, *P. monticola*).

Le piante di pioppo sono decidue, ad impollinazione anemofila, e producono grandi quantità di polline e piccoli semi contornati da ciuffi di peli cotonosi che sono dispersi tramite il vento e l'acqua all'inizio dell'estate. Capaci di invadere rapidamente suoli marginali e poco fertili, molte specie occupano le zone vicine ai fiumi dove formano una componente chiave delle foreste riparie (Braatne et al. 1996), mentre altre sono piante pioniere nella riforestazione di aree montuose interessate da incendi (Burns and Honkala 1990). Inoltre tutte le specie di pioppo hanno la capacità di riprodursi per via vegetativa, principalmente germogliando dal colletto della radice di piante tagliate o da rami spezzati

inseriti nel suolo. Il pioppo tremulo e il pioppo bianco si propagano da succhioni che spuntano dalle radici orizzontali, spesso dopo un incendio, portando alla diffusione di cloni che coprono molti ettari.

Le piante di pioppo sono caratterizzate da una elevata rapidità di crescita, raggiungendo in breve tempo grandi dimensioni. Il legno prodotto è poroso, di peso leggero e capace di sostenere piante alte fino a 40 m. Molte di queste caratteristiche hanno reso il pioppo molto interessante per l'uomo fin dall'antichità. Oggi genotipi



Figura 1.1 *Populus deltoides*

opportunamente selezionati sono coltivati in tutto il mondo in piantagioni per la produzione di polpa e carta, impiallaccature, materiali da imballaggio, legname ed energia. In particolare *P. deltoides* (Fig 1.1) e *P. nigra* della sezione Aigeros, insieme a *P. trichocarpa*, *P. balsaminifera* e *P. maximowiczii* della sezione Tacamahaca, sono le principali specie coltivate ed utilizzate per l'ottenimento di ibridi nei programmi di pioppicoltura intensiva (Zsuffa 1975; FAO 1979; Dickmann and Stuart 1983). Inoltre storicamente questo genere di piante è stato ampiamente usato come frangivento e per il controllo dell'erosione, mentre più recentemente è stato proposto il suo utilizzo per il disinquinamento dei suoli dai metalli pesanti tramite la fitoestrazione (Flathman and Lanza 1998) e come bioindicatore di inquinamento da ozono nell'ambiente (Jepsen 1994).

1.2 Il pioppo come modello di studio

Le specie arboree rivestono una grande importanza dal punto di vista economico ed ecologico. Questo ha determinato la necessità di sviluppare sistemi modello per lo studio della biologia delle specie arboree, poiché caratteristiche uniche della loro anatomia e fisiologia non possono essere studiate in altre specie modello, come *Arabidopsis*. Molte di

queste caratteristiche sono legate principalmente alla capacità di tali specie di sopravvivere su tempi di scala molto lunghi, grazie allo sviluppo del legno, o xilema secondario, dal cambio vascolare. Questo meristema secondario è essenziale per il loro sviluppo in diametro e per fornire sostegno alla crescita in altezza. Inoltre le specie arboree esibiscono un'alternanza di periodi di attività e dormienza, che coinvolgono l'interazione, ancora poco chiara, tra segnali ambientali (durata del giorno e temperatura) e meccanismi molecolari di trasduzione del segnale. Nonostante altri possibili candidati siano stati proposti come specie modello, tra cui il salice (*Salix*), l'eucalipto (*Eucalyptus*) e il pino (*Pinus*), la scelta è ricaduta sul pioppo (*Populus*), spianando la strada per lo studio dei processi di crescita, di sviluppo e di risposta agli stimoli ambientali nelle specie arboree tramite approcci molecolari.

Di seguito sono brevemente descritte le caratteristiche che hanno reso il pioppo un importante sistema modello:

- *Elevata variabilità genetica delle popolazioni naturali.* L'adattamento a diverse condizioni ambientali, determinato dall'ampio raggio di diffusione e dal polimorfismo delle popolazioni locali, offrono ai ricercatori una ricca fonte di variabilità nella morfologia, anatomia, fenologia e risposta agli stress abiotici e biotici. Gran parte di questa variabilità è sottoposta al controllo genetico (Farmer 1996).
- *Genoma di piccole dimensioni.* Il genoma apolide di pioppo è pari a 550 Mb (Bradshaw and Stettler 1994), solo quattro volte più grande di *Arabidopsis* e 40 volte più piccolo di quello delle conifere, come il pino. Il piccolo genoma del pioppo semplifica il clonaggio dei geni, il *Southern blotting* ed altre tecniche genetiche e molecolari. Il rapporto tra la distanza fisica e quella genetica per il pioppo è vicina a

200 kb/centiMorgan, quasi uguale ad *Arabidopsis*, rendendo questo genere interessante per il clonaggio posizionale dei geni basato su informazioni di mappa.

- *Facilità di propagazione sessuale e ibridazione interspecifica.* I pioppi sono incrociati in serra, fecondando piante femminili con polline che può essere conservato per molti anni. Ogni impollinazione produce centinaia di semi in 4-8 settimane. I semi germinano nel giro di 24 ore e producono piante alte 1-2 m alla fine dello stesso anno. Le specie di pioppo all'interno della stessa sezione e molte specie di sezioni diverse possono essere ibridate. Siccome tutti i membri del genere sono diploidi ($2n = 38$), gli ibridi sono fertili e possono generare progenie F_2 e di reincrocio che segregano per un'ampia varietà di tratti morfologici, biochimici e molecolari.
- *Le risposte fisiologiche alle variabili ambientali sono rapide e pronunciate.* Grazie alla rapidità di crescita delle giovani piante di pioppo, è possibile misurare le risposte a breve termine a stress biotici (malattie) e abiotici (siccità, elevata concentrazione di CO_2 , ozono). Il tempo ridotto richiesto per studi di fisiologia rende possibile usare approcci molecolari e genetici che richiedono l'analisi di molti campioni (centinaia o migliaia di misurazioni fisiologiche). Questo ha consentito l'identificazione di loci nel genoma associati a caratteri quantitativi (QTL) che controllano tratti morfologici (Bradshaw and Stettler 1995), fenologici (Frewen et al. 2000) e patologici (Cervera et al. 1996; Newcombe and Bradshaw 1996; Newcombe et al. 1996; Villar et al. 1996). Geni candidati per alcuni di questi QTL sono stati identificati (Frewen et al. 2000).
- *Clonaggio di genotipi individuali.* Le piante di pioppo possono essere propagate con facilità per via vegetativa. Questo permette di replicare un determinato genotipo nello spazio e nel tempo in esperimenti separati, di far crescere piante con un corredo genetico modificato in condizioni di campo, che sarebbe impossibile nell'ambiente competitivo di una popolazione di semi. La propagazione per talea permette inoltre

saggi distruttivi sui campioni in studi fisiologici, la divisione del materiale tra laboratori e l'accumulo di conoscenze su genotipi selezionati.

- *Elevata efficienza di trasformazione e rigenerazione per creare pioppi transgenici.* A differenza di altre specie arboree, il pioppo è particolarmente adatto per l'ottenimento di piante transgeniche. Alcuni cloni di pioppo possono essere trasformati geneticamente con *Agrobacterium* e rigenerati in modo efficiente in piante transgeniche nel giro di 6-10 mesi (Jouanin et al. 1993). La transgenesi è uno strumento fondamentale per dimostrare la funzione di specifici geni ed è cruciale per la ricerca di base nei processi fisiologici.
- *Disponibilità di strumenti genetici e molecolari.* L'intero genoma di pioppo è stato sequenziato dal Joint Genome Institute nel 2004 ed è disponibile on-line (<http://genome.jgi-psf.org/Poptr1/Poptr1.home.html>, Tuskan et al. 2004). Queste informazioni di sequenza hanno integrato ed incrementato le conoscenze derivanti dalle 125.000 EST di pioppo già disponibili nei database pubblici, rendendo possibile per la prima volta il confronto del genoma di una pianta perenne (arborea) ed una annuale (erbacea), come *Arabidopsis*. La conoscenza del genoma di pioppo rende infatti possibile studiare a livello molecolare alcune importanti caratteristiche tipiche delle piante arboree, quali la dormienza, lo sviluppo del cambio secondario e il cambiamento di fase (Tuskan et al. 2003), di isolare i geni coinvolti nell'adattamento a particolari condizioni ambientali o legati a caratteri di importanza commerciale, tipici di alcune specie di pioppo (Tuskan et al. 2003).

2. Lo stress idrico

2.1 Effetti fisiologici dello stress idrico

Il cambiamento climatico a cui stiamo assistendo fa presagire che la carenza idrica diverrà nel prossimo futuro un problema importante in numerose regioni del mondo (Petit et al. 1997). Il settore agricolo è uno dei principali consumatori di risorse idriche, per cui la crescita della popolazione globale e l'aumento contemporaneo dell'aridità dei suoli renderanno l'acqua un bene scarso e prezioso. Proprio per questa ragione lo studio degli effetti della siccità sulle specie vegetali può essere enormemente utile nella scelta dei cloni con tratti di tolleranza e per predire il destino della vegetazione naturale in seguito ai cambiamenti climatici. Sebbene la tolleranza alla siccità sia molto diversa da una specie vegetale all'altra, è possibile descrivere gli eventi che generalmente si verificano nelle piante sottoposte a stress idrico. Questa condizione si verifica quando il tasso di traspirazione supera l'assorbimento di acqua e comporta il verificarsi di numerosi cambiamenti nella pianta a livello fisiologico, biochimico e molecolare. In seguito alla riduzione nel contenuto relativo di acqua e al decremento del potenziale idrico della foglia si può osservare la riduzione della conduttanza stomatica, a cui segue una minor assimilazione della CO₂ e la conseguente riduzione del tasso fotosintetico (Cornic 2000; Lawlor and Cornic 2002). La ridotta disponibilità di carboidrati prodotti dalle foglie altera il rapporto tra i tessuti che li producono (*source*) e i tessuti che li utilizzano (*sink*) (McDowell et al. 2008). Se il periodo siccitoso è prolungato nel tempo, generalmente si osserva la riduzione della biomassa totale, dell'area fogliare, dell'altezza e del diametro del fusto (Monclus et al. 2006). Nelle piante arboree si può verificare anche il fenomeno della cavitazione, che consiste nell'ingresso di microbolle d'aria nei vasi xilematici. Questo causa un'embolia, interrompendo il flusso della linfa grezza dalle radici alle foglie e

portando al danneggiamento irreversibile dello xilema (Crombie et al. 1985; Tyree and Ewers 1991).

A livello cellulare il deficit idrico causa un cambiamento nella concentrazione di soluti, nel volume della cellula e nella forma della membrana, la perdita di turgore, la distruzione dell'integrità della membrana e la denaturazione di numerose proteine (Bray 1997). Inoltre è noto che il deficit idrico causa un incremento nella formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che possono danneggiare direttamente i lipidi di membrana oppure inattivare enzimi in seguito alla riduzione dei ponti disolfuro (Navarri-Izzo et al. 1994; Menconi et al. 1995). Questa condizione nelle foglie è causata dalla ridotta disponibilità di CO₂ e di H₂O necessarie per la fotosintesi, per cui l'energia luminosa assorbita dai pigmenti antenna non può essere utilizzata per la produzione di carboidrati e dà luogo ad un aumento della produzione di molecole ossidanti nei cloroplasti (Smirnoff and Colomé 1988). Anche le radici appaiono tra gli organi più sensibili allo stress ossidativo indotto dalla siccità (Morabito and Guerrier 2000).

2.2 Meccanismi di difesa delle piante

L'abilità di una pianta di sopravvivere a fenomeni di carenza idrica comprende meccanismi messi in atto sia a livello di intera pianta che a livello cellulare. Le risposte dipendono dalla specie, dal genotipo, dalla lunghezza e dalla severità del deficit idrico, dall'età, dallo stadio di sviluppo, dall'organo, dal tipo di cellula e dal compartimento subcellulare considerato (Bray 1997). Classicamente le strategie di resistenza sono suddivise in *escape*, *avoidance* e *tolerance* (Levitt 1972; Turner 1986), sebbene le differenze tra queste tre tipologie appaiano spesso sfumate. Per *escape* si intende la capacità della pianta di prevenire l'esposizione allo stress, ad esempio accorciando il proprio ciclo vitale. Con *avoidance* invece si fa riferimento al verificarsi di modificazioni sia a livello di intera pianta che a livello cellulare che impediscono allo stress di manifestarsi, come ad esempio la chiusura

degli stomi o l'aggiustamento osmotico. Infine i meccanismi di difesa che favoriscono la tolleranza (*tolerance*) permettono alla pianta di affrontare lo stress alleviandone gli effetti dannosi, come è il caso dell'aumento nell'attività degli enzimi antiossidanti per contrastare lo stress ossidativo. La resistenza di una pianta è comunque un fenomeno complesso, che si basa spesso sulla presenza di molte strategie combinate tra loro (Ludlow 1989).

La chiusura degli stomi rappresenta uno dei primi eventi che avvengono in presenza di scarsa disponibilità idrica, poiché in tal modo il potenziale idrico è mantenuto il più alto possibile (Jarvis and McNaughton 1986). Inoltre l'assorbimento della luce può essere ridotto attraverso l'arrotolamento delle foglie o modificando l'angolo tra il picciolo e il fusto (Ehleringer and Cooper 1992). Le modificazioni descritte sono probabilmente indotte in seguito al riconoscimento di un segnale inviato dalle radici alle foglie. La molecola segnale implicata potrebbe essere l'ABA poiché è stata osservata una correlazione tra il contenuto di ABA nello xilema e la conduttanza stomatica (Socias et al. 1997). La tolleranza a bassi potenziali idrici può coinvolgere anche l'aggiustamento osmotico sia a livello di foglie che di radici, che consiste nell'accumulo di soluti osmoticamente attivi nelle cellule (Morgan 1984). Molecole segnale causano anche cambiamenti a livello trascrizionale per aumentare la disponibilità di prodotti proteici coinvolti in diversi processi cellulari di difesa dallo stress idrico: enzimi implicati nella sintesi dei soluti necessari all'aggiustamento osmotico, enzimi antiossidanti, chaperon molecolari in grado di preservare la struttura e la funzionalità di proteine e membrane cellulari (Bray 1997). In presenza di deficit idrico prolungato nel tempo le piante possono rallentare o arrestare la crescita, utilizzando i carboidrati accumulati nei tessuti di riserva. Un più efficace controllo delle perdite di acqua può essere ottenuto grazie alla riduzione dell'area fogliare e alla produzione di foglie più piccole (Jarvis and McNaughton 1986), mentre un maggior

approvvigionamento idrico può essere garantito dall'estensione del sistema radicale (Jackson et al. 2000).

2.2.1 Accumulo di sostanze osmoticamente attive

L'aggiustamento osmotico attivo è ritenuto uno dei processi cruciali nell'adattamento delle piante alla siccità (Bray 1997). Tale fenomeno consiste nell'accumulo di soluti nelle cellule in modo da abbassare il potenziale osmotico, favorendo l'ingresso di acqua e il mantenimento del turgore. Si tratta solitamente di un processo lento (almeno nella parte aerea della pianta) e si manifesta dopo una determinata soglia di deficit idrico cellulare. I soluti che si accumulano nelle cellule includono ioni, come K^+ , Na^+ e Cl^- , soluti organici contenenti azoto, come prolina e altri aminoacidi, poliamine (Samuel et al. 2000; Hamilton and Heckathorn 2001) e composti metilati dell'ammonio quaternario come la glicina betaina (Tamura et al. 2003). Altri osmoliti prodotti in risposta allo stress includono saccarosio, polioli, alcoli degli zuccheri e oligosaccaridi. I soluti organici sono compatibili con i processi cellulari, hanno un ruolo di stabilizzazione delle membrane e favoriscono il mantenimento della conformazione delle proteine a bassi potenziali idrici (Bohnert et al. 1995). E' stata riscontrata una grande variabilità tra le diverse specie di piante e anche tra cultivar della stessa specie per quanto riguarda sintesi e accumulo di osmoliti.

Uno dei soluti compatibili più studiati è la prolina, sintetizzata nel citosol e nei mitocondri a partire dal glutamato (Hare et al. 1999). I geni codificanti per gli enzimi coinvolti nella sintesi di questo aminoacido sono risultati up-regolati in presenza di stress idrico e osmotico (Hare et al. 1999). Inoltre è noto che l'accumulo di prodotti intermedi della sintesi e della degradazione della prolina possono aumentare l'espressione di diversi geni regolati dallo stress (Iyer and Caplan 1998). Accanto al ruolo di protezione delle proteine dalla denaturazione, alla prolina è stato anche attribuito un ruolo nella protezione delle

membrane dai danni provocati dai ROS prodotti in presenza di deficit idrico e di elevata luminosità (Saradhi et al. 1995; Hamilton and Heckathorn 2001).

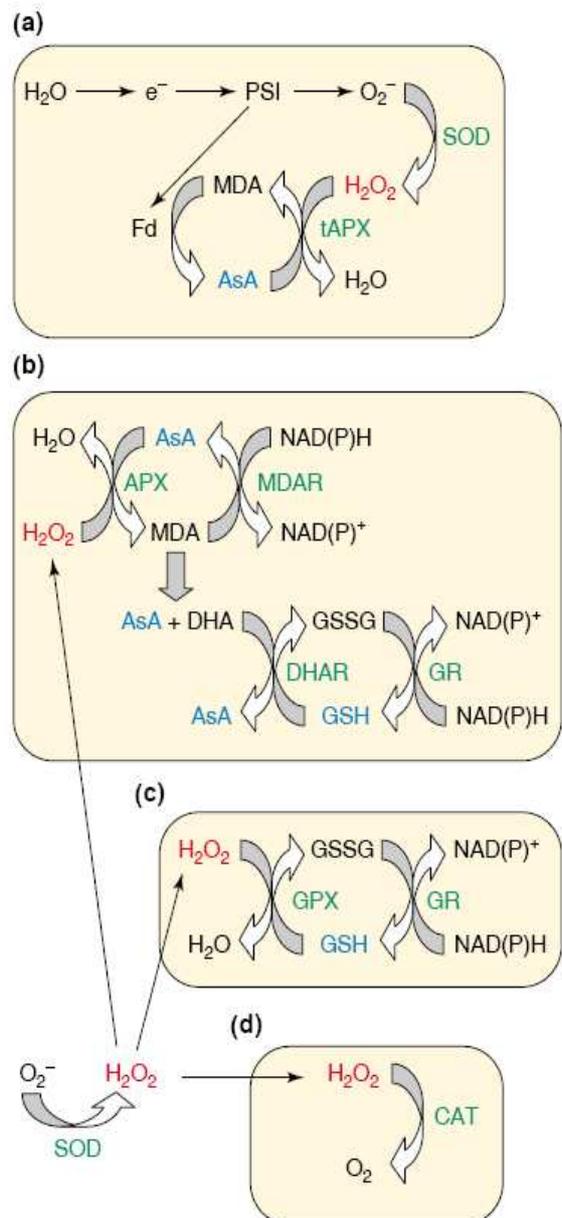
2.2.2 Proteine coinvolte nella difesa dallo stress

É noto che la carenza d'acqua nei tessuti è associata ad un aumento nelle cellule della produzione di specie reattive dell'O₂ (ROS) in molte specie di piante (Foyer et al. 2005; Mittler et al. 2006; Meyer 2008; Miller et al. 2008). Il mancato equilibrio tra molecole ossidanti e antiossidanti può determinare l'ossidazione indiscriminata dei lipidi di membrana delle proteine e danni al DNA, per cui l'abilità delle piante di controllare i livelli di molecole ossidanti è altamente correlata con la tolleranza agli stress (Cheeseman 2007). La protezione delle cellule dallo stress ossidativo avviene tramite sistemi antiossidanti enzimatici e non enzimatici. Gli antiossidanti non enzimatici comprendono piccole molecole idrofiliche (ascorbato, glutazione), lipofiliche (α -tocoferolo e carotenoidi), composti fenolici e flavonoidi. I sistemi antiossidanti enzimatici comprendono numerosi enzimi, tra cui la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT), l'ascorbato perossidasi (APX), la glutazione reduttasi (GR), la glutazione perossidasi (GPX), la deidroascorbato reduttasi (DHAR) e la monodeidroascorbato reduttasi (MDAR) (Fig 2.1). Le SOD catalizzano la dismutazione dell'anione superossido a perossido di idrogeno, mentre CAT, APX e GPX permettono la detossificazione del perossido di idrogeno ad acqua ed ossigeno. Inoltre gli enzimi del ciclo dell'ascorbato-glutazione sono in grado di mantenere nello stato ridotto il *pool* di ascorbato e glutazione presente nella cellula usando il NADPH come cofattore.

Recentemente ai ROS è stato anche riconosciuto il ruolo di molecole segnale nell'attivazione dei processi di difesa e di risposta allo stress (Desikan et al. 2001; Knight and Knight 2001). Infatti, la modificazione dello stato redox di composti redox-attivi ha effetto sull'espressione di numerosi geni legati alla fotosintesi, sia nei cloroplasti che nel

nucleo, regolando in tal modo la produzione e il consumo di energia in risposta all'ambiente (Pfannschmidt 2003). Glutazione e ascorbato sono composti implicati nella trasduzione del segnale redox, agendo come secondi messaggeri nelle risposte mediate da ormoni (Foyer and Noctor 2003). Infine l' H_2O_2 agisce come segnale locale e sistemico per la chiusura degli stomi, l'acclimatazione delle foglie ad elevati livelli di radiazione luminosa e l'induzione delle *heat shock proteins* (Karpinska et al. 2000; Pastori and Foyer 2002).

Figura 2.1: Vie metaboliche responsabili della detossificazione dei ROS nelle piante (Mittler 2002). (a) Detossificazione dell'anione superossido (O_2^-) ad acqua ad opera della superossido dismutasi (SOD) e dell'ascorbato per ossidasi (APX). (b) Il ciclo dell'ascorbato-glutazione. (c) Il ciclo della glutazione perossidasi (GPX). (d) Catalasi (CAT). La superossido dismutasi agisce nella prima linea di difesa convertendo O_2^- in H_2O_2 . Successivamente ascorbato per ossidasi, glutazione perossidasi e catalasi trasformano H_2O_2 in H_2O . A differenza di CAT (d), APX e GPX richiedono un ciclo che rigeneri l'ascorbato (AsA) e/o il glutazione (GSH) (a-c). Questi cicli utilizzano direttamente gli elettroni dall'apparato fotosintetico (a) o il NAD(P)H (b,c) come potere riducente. Abbreviazioni: DHA, deidroascorbato; DHAR, deidroascorbato reductasi; Fd, ferredossina; GR, glutazione reductasi; GSSG, glutazione ossidato; MDA, monodeidroascorbato; MDAR, MDA reductasi; PSI, fotosistema I; tAPX, APX legata alla membrana dei tilacoidi.



Oltre agli enzimi antiossidanti anche altri prodotti proteici intervengono nella difesa delle cellule vegetali dagli stress ambientali. Tra essi ci sono le metallotioneine (MT), proteine a basso peso molecolare contenenti numerosi residui di cisteina (Cobbett and Goldsbrough 2002). Sulla base dell'arrangiamento dei residui di cisteina le MT sono state suddivise in due classi: le MT di classe I, diffuse nei vertebrati, e le MT di classe II, che includono tutte quelle di piante, funghi e invertebrati. Queste ultime sono state ulteriormente suddivise in quattro tipi, indicati come MT1, MT2, MT3 e MT4 (Cobbett and Goldsbrough 2002). Nelle piante i geni che codificano per le diverse isoforme sono espressi sia in modo tessuto-specifico (Cobbett and Goldsbrough 2002), che in relazione allo stadio di sviluppo (Buchanan-Wollaston 1994; Chen et al. 2003; Brkljačić et al. 2004). Le MT hanno mostrato un ruolo importante nella difesa delle piante dagli stress ambientali, come l'eccesso di metalli pesanti nel suolo (Cobbett and Goldsbrough 2002). Recentemente è stato anche evidenziato il coinvolgimento di alcune isoforme nella protezione dallo stress idrico (Akashi et al. 2004; Watkinson et al. 2006; Berta et al. 2010). Sebbene la loro esatta funzione in questo tipo di stress non sia stata ancora completamente chiarita, appare probabile una funzione di detossificazione dei radicali dell'ossigeno nella difesa dallo stress ossidativo (Akashi et al. 2004; Domenech et al. 2006).

2.3 Il cambio

2.3.1 Attività cambiale e xilogenesi

Il cambio è un meristema secondario derivante dal procambio, che a sua volta deriva dal meristema apicale (Larson 1994). Esso è responsabile dell'accrescimento in diametro del fusto e delle radici delle Gimnosperme e delle Angiosperme. Il cambio comprende due tipi di cellule: il primo tipo è rappresentato dalle iniziali del raggio, cellule giovanili che danno luogo ai raggi, essenziali per la traslocazione dei nutrienti tra floema e xilema; il secondo tipo comprende le iniziali allungate e fusiformi che producono sul lato interno gli elementi

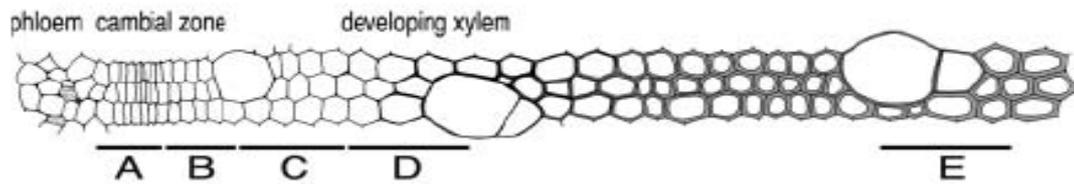


Figura 2.2: Disegno schematico della regione cambiale (Schrader et al. 2004). (A) Iniziali del cambio. (B) Cellule madri dello xilema. (C) Zona di espansione. (D) Zona di formazione della parete secondaria. (E) Tarda maturazione cellulare.

del legno e sul lato esterno le cellule del floema. Il processo che porta ai due tessuti vascolari comprende diverse fasi (Fig 2.2). L'iniziale del cambio si divide producendo una cellula madre dello xilema o del floema e un'altra cellula figlia che mantiene le caratteristiche e le funzioni dell'iniziale cambiale. Le cellule madri del floema e dello xilema possono dividersi molte volte prima del differenziamento. Molti autori concordano nell'utilizzare il termine "zona cambiale" per far riferimento al cambio in senso stretto, alle cellule madri del floema e alle cellule madri dello xilema poiché a livello microscopico non è possibile distinguere tra questi diversi tipi cellulari (Larson 1994; Barnett et al. 1981; Chaffey et al. 1997).

La xilogenesi è un processo di differenziamento cellulare estremamente complesso, che avviene in cinque fasi: la divisione cellulare, l'espansione cellulare (allungamento e allargamento radiale), l'ispessimento della parete cellulare (cellulosa, emicellulosa, proteine della parete, biosintesi e deposizione della lignina), la morte cellulare programmata e la formazione del durame (Plomion et al. 2001). Zuccheri e ormoni controllano tale processo. Ad esempio è stato osservato che le auxine promuovono e controllano il differenziamento dello xilema, formando un gradiente di concentrazione nei tessuti in via di sviluppo con un picco intorno al cambio (Tuominen et al. 1997). I carboidrati solubili necessari per la divisione cellulare e il differenziamento sono

sintetizzati a livello fogliare tramite la fotosintesi, per cui le caratteristiche intrinseche delle foglie giocano un ruolo chiave nella produzione del legno (Monclus et al. 2005). Allo stesso modo, il rapido accrescimento di specie arboree come pioppo ed eucalipto, sia in diametro che in altezza, è legato fortemente all'elevato utilizzo dei carboidrati nei meristemi e in particolar modo nel cambio (Kozlowsky 1992).

2.3.2 Effetti della siccità sul cambio

Varietà e cloni diversi di una stessa specie arborea presentano grande variabilità nella fenologia, nella produttività e nel tasso di crescita, che determina grandi differenze nella produzione di biomassa e nelle proprietà del legno (Monclus et al. 2005). Inoltre la xilogenesi è fortemente influenzata dalle condizioni ambientali, come la disponibilità di nutrienti, di CO₂, e di acqua (Deslauriers and Morin 2005, Rossi et al. 2006). La siccità può avere un effetto sul processo di sviluppo del legno sia indirettamente, attraverso effetti sulla fotosintesi e sulla traslocazione degli assimilati (Denne and Dodd 1981), che direttamente, attraverso effetti sulle cellule cambiali. A livello cellulare, infatti, molti processi collegati alla crescita, come l'espansione cellulare e la sintesi della parete cellulare, sono fortemente influenzati dallo stato idrico della cellula (Passioura and Fry 1992; Langer et al. 2002). Nelle specie arboree sottoposte a stress idrico, la ridotta espansione delle cellule xilematiche è stata frequentemente attribuita ad una ridotta pressione di turgore nella fase di espansione cellulare della xilogenesi (Abe et al. 2003). Questo effetto ha un importante ruolo biologico, dal momento che vasi xilematici con un diametro minore e più densi assicurano una minor sensibilità alla cavitazione (Deslauriers and Morin 2005; Escalante-Pérez 2009).

Negli ultimi anni sono stati fatti molti passi avanti sulla regolazione dell'espressione genica in risposta alla siccità (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2007). Il principale problema è quello di collegare i cambiamenti a livello trascrizionale con effetti significativi

a livello fisiologico (Munns 2005). Inoltre, nonostante molti studi riguardanti foglie e radici, altri tessuti non hanno ancora ricevuto la dovuta considerazione. Infatti, sono ancora scarse le conoscenze sugli effetti del deficit idrico a livello molecolare sulla zona cambiale e sul processo di formazione del legno. Maggiori conoscenze su questo tessuto potrebbero aiutare a migliorare la produzione e la qualità del legno. Un recente lavoro condotto su *P. alba* sottoposto a stress idrico ha evidenziato cambiamenti nell'espressione di geni codificanti per enzimi coinvolti nel metabolismo dei carboidrati complessi, come la cellulosa e il callosio, nell'espansione cellulare e nella modificazione della parete (Berta et al. 2010). Il confronto tra i pattern trascrizionali di genotipi che manifestano risposte diverse a livello fisiologico potrebbe fornire un quadro più chiaro sui network di geni coinvolti nella risposta al deficit idrico durante la formazione del legno.

2.4 Metabolismo dei carboidrati

2.4.1 Flusso dei carboidrati nella pianta

Le piante arboree assimilano il carbonio nel clorenchima (tessuto *source*), situato nelle foglie e nella giovane corteccia (Kozlowski 1992) (Fig 2.3). In tale tessuto il carbonio è incorporato in triosi-fosfati e successivamente utilizzato per la biosintesi di amido nei cloroplasti (Fig 2.3). Il carbonio presente nell'amido e nei triosi-fosfati è utilizzato per sintetizzare esosi e saccarosio nel citosol della cellula *source* (Fig 2.3). Il saccarosio viene successivamente trasportato nel floema dai tessuti produttori di carboidrati ai tessuti non fotosintetici, per essere utilizzato come fonte di energia e scheletro per la costruzione di nuove molecole durante la crescita e la respirazione (Konishi et al. 2004) (Fig 2.3). Una grossa percentuale di carbonio è utilizzata per l'attività cambiale e per la differenziazione dello xilema secondario. Una volta che il carbonio è allocato nella cellulosa, emicellulosa e lignina della parete secondaria, esso è immobilizzato in modo permanente per tutta la vita della pianta. Le risorse di carbonio sono anche immagazzinate come amido, sia

transientemente nei tessuti *source*, sia come riserve stagionali e di emergenza nei tessuti *sink* (Fig 2.3). Tali riserve possono essere mobilizzate successivamente per i processi di crescita e sviluppo o in risposta a stress ambientali che causano una interruzione del flusso di carboidrati dalle foglie al resto della pianta.

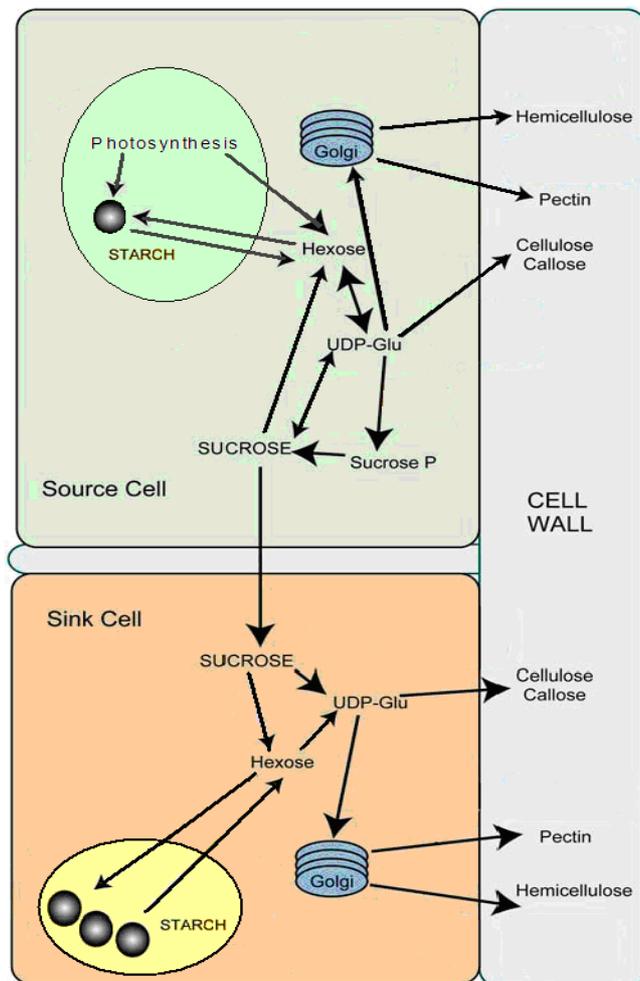


Figura 2.3: Schema generale del flusso di carbonio dalla fotosintesi (nella cellula *source*) o dalla mobilizzazione delle riserve di amido (nella cellula *sink*) alla produzione dei carboidrati di parete cellulare (Gisler-Lee et al. 2006).

2.4.2 Enzimi coinvolti nella biosintesi della cellulosa

L'UDP-D-glucosio è il precursore di tutti i carboidrati della parete cellulare (Reiter and Vanzin 2001). Esso è prodotto sia dalla reazione saccarosio + UDP \rightarrow UDP-D-glucosio + fruttosio, catalizzata dalla saccarosio sintasi (SuSy), o dalla reazione glucosio-1-P + UTP \rightarrow UDP-D-glucosio + PP, catalizzata dalla UDP-glucosio pirofosforilasi (UGPasi).

L'attività enzimatica della SuSy è correlata con l'intensità della formazione della parete dello xilema sia in pioppo (Sauter 2000) che in *Robinia pseudoacacia* L. (Hauch and Magel 1998). Il pattern di attività osservato per questo enzima supporta l'ipotesi del suo diretto coinvolgimento nell'approvvigionamento di UDP-D-glucosio da parte della cellulosa sintasi (Winter and Huber 2000) (Fig 2.4). L'UGPasi sembra giocare un ruolo importante nel metabolismo del saccarosio (Coleman et al. 2006). Nei tessuti *sink*, come il cambio, l'UGPasi lavora in coordinazione con gli enzimi saccarosolitici (SuSy, fruttochinasi e saccarosiofosfato fosfatasi) e nel metabolismo del saccarosio e degli esosi fosfati, mentre nei tessuti *source* l'UGPasi lavora in coordinazione con la saccarosiofosfato sintasi nel processo di sintesi del saccarosio (Kleczkowski 1994).

La cellulosa costituisce il 40-50% del legno ed è composta da catene di β -1,4-D-glucano organizzate in microfibrille. La cellulosa è sintetizzata dalla cellulosa sintasi (CES), un complesso enzimatico esagonale presente sulla membrana

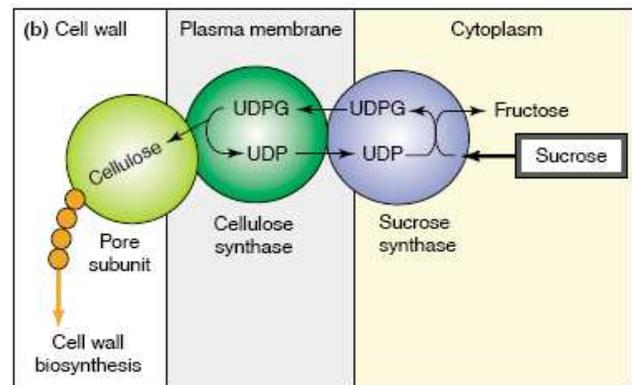


Figura 2.4: Associazione tra la saccarosio sintasi e le rosette del complesso della cellulosa sintasi localizzato sulla membrana plasmatica (Koch 2004).

plasmatica a forma di rosetta (Mueller and Brown 1980; Brett 2000). Le rosette sono state osservate anche nello xilema primario e secondario in sviluppo (Haigler and Brown 1986; Fujino and Itoh 1998). In *Arabidopsis* sono presenti almeno 10 geni codificanti per CES (Doblin et al. 2002). L'analisi dell'espressione ha evidenziato che alcuni di essi sono coinvolti nella biosintesi della parete primaria (Fagard et al. 2000), mentre altri sono attivi nella biosintesi di quella secondaria (Taylor et al. 1999).

2.4.3 Enzimi coinvolti nella biosintesi e nella degradazione dell'amido

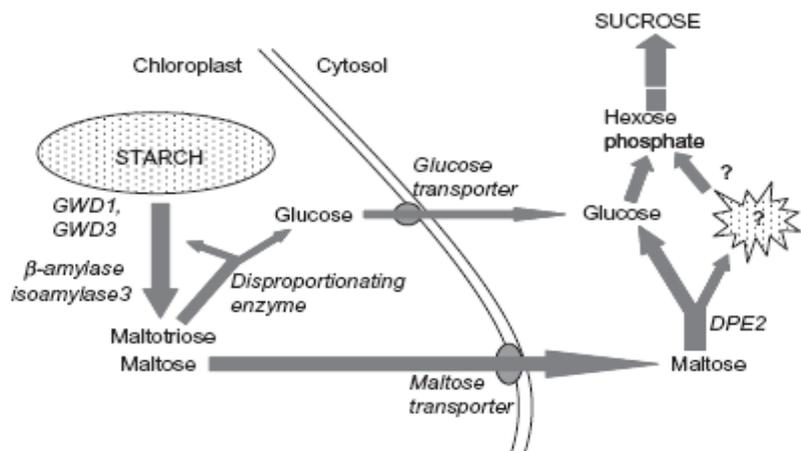
L'amido è il principale e più abbondante polisaccaride di riserva nelle piante. Il granulo di amido contiene due distinti tipi di polisaccaridi: l'amilosio e l'amilopectina. L'amilosio è essenzialmente un polimero lineare formato da residui di glucosio connessi tra loro tramite un legame α -(1-4) glicosidico, mentre l'amilopectina è una molecola ramificata formata principalmente da residui di glucosio connessi tra loro tramite un legame α -(1-4) e nei punti di ramificazione da un legame α -(1-6), mediamente ogni 24-30 residui di glucosio (Hizukuri 1986). Gli eventi che accompagnano il flusso di carbonio in amido e la loro regolazione è stato ben definito per i cloroplasti (Preiss 1991). Al contrario meno informazioni sono disponibili per quanto riguarda gli eventi biochimici che portano alla sintesi dell'amido negli amiloplasti degli organi *sink* in via di sviluppo.

L'amido prodotto nelle foglie dalla fotosintesi è depositato transientemente nei cloroplasti sottoforma di granuli insolubili. L'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase), catalizza il primo passaggio della sintesi dell'amido nei tessuti delle piante, catalizzando la reazione $\text{glucosio-1-P} + \text{ATP} \rightarrow \text{ADP-glucosio} + \text{PP}$. Tale reazione appare essere importante nella regolazione dell'accumulo di amido (Kleczkovsky et al. 1991; Preiss 1991). La formazione del granulo di amido è un processo molto complesso, in cui intervengono numerosi enzimi. Il più importante di essi è l'amido sintasi (SS), che aggiunge unità di glucosio, derivanti dal precursore solubile ADP-glucosio, all'estremità non riducente di una catena di glucano formando legami α -(1,4). La distribuzione regolare dei punti di ramificazione dell'amido è l'effetto dell'azione degli enzimi ramificante e deramificante (Kleczkovsky et al. 1991).

Tutti i granuli transienti di amido sintetizzati durante il giorno vanno incontro a degradazione durante la notte, fornendo gli zuccheri necessari per il metabolismo dell'intera pianta. L'idrolisi dei granuli di amido è catalizzata principalmente dalla β -

amilasi e da un enzima deramificante (isoamilasi 3) (Fig 2.5). Questi due enzimi idrolizzano rispettivamente i legami α -(1,4) e α -(1,6) glicosidici. Il principale prodotto della loro attività combinata è il maltosio, che è trasportato dal cloroplasto al citosol (Fig 2.5). Il secondo prodotto della degradazione dell'amido è il glucosio, anch'esso esportato nel citoplasma (Smith and Stitt 2007; Zeeman et al. 2007) (Fig 2.5).

Figura 2.5: Processo di degradazione dell'amido nelle foglie di *Arabidopsis*. GWD1, GWD3, glucano acqua dicinasi, DPE, transglucosidasi (Smith and Stitt 2007).



2.4.4 Trasportatori di zuccheri

I tessuti eterotrofi della pianta, come il cambio, utilizzano il carbonio organico prodotto nei tessuti fotosinteticamente attivi, che è scaricato nelle cellule dei *sink* attraverso trasportatori degli zuccheri localizzati sulla membrana plasmatica dei vasi floematici. Sono state identificate due famiglie distinte di trasportatori: i trasportatori di disaccaridi che permettono principalmente il trasporto attivo del saccarosio (SUC) e i trasportatori di monosaccaridi (MST) che permettono il trasporto di un'ampia varietà di monosaccaridi, tra cui glucosio, fruttosio e mannosio, derivanti dall'idrolisi del saccarosio catalizzata dalle invertasi associate alla membrana plasmatica (Sturm and Chrispeels 1990; Weber et al. 1995). I trasportatori di monosaccaridi e del saccarosio sono stati identificati in molte specie di piante (Maynard and Lucas 1982; Giaquinta 1983; Getz et al. 1987; Gogarten and Bentrup 1989; Tubbe and Buckhout 1992; Ward et al. 1998). Dal momento che i trasportatori degli zuccheri svolgono un ruolo chiave nelle interazioni *source-sink*, la loro

attività è finemente regolata sia in relazione allo stadio di sviluppo, sia in risposta a fattori ambientali, permettendo una riallocazione flessibile del carbonio fissato (Delrot et al. 2000; Noiraud et al. 2000). Inoltre è stato proposto anche un ruolo di queste proteine nella percezione di concentrazioni alterate di zuccheri e quindi nella capacità della pianta di modulare il suo metabolismo nei tessuti *source* in base alla domanda dei *sink* (Lorraine et al. 2000).

3. Lo stress da metalli pesanti

3.1. Effetti tossici dei metalli pesanti sulle piante

I metalli pesanti sono componenti naturali della crosta terrestre. Essi sono caratterizzati da elevata massa atomica, elevata densità ($>5\text{g/cm}^3$), forma cationica, bassa densità dei loro idrati, capacità di formare complessi e alta affinità per i solfuri (Holleman and Wiberg 1985). Alcuni di essi svolgono un ruolo fondamentale per il metabolismo delle piante, essendo dei nutrienti essenziali, come Cu, Fe, Ni, Mn, Mo e Zn, mentre altri non hanno un ruolo biologico, come As, Cd, Cr, Hg e Pb. Molti fattori, specie di natura antropica, come le estrazioni minerarie, gli impianti di combustione, gli scarichi industriali e l'uso dei fertilizzanti chimici in agricoltura, causano l'accumulo dei metalli pesanti nei suoli e nei sedimenti acquatici, per cui essi possono raggiungere livelli tossici per le piante e gli altri organismi (Briat and Lebrun 1999). I metalli pesanti non possono essere degradati da processi biologici o chimici, per cui il loro accumulo nei suoli rappresenta attualmente uno dei principali problemi per la salute umana ed ambientale. Il tipo di metallo influenza fortemente la soglia minima di tossicità: i metalli non essenziali sono solitamente tossici a basse concentrazioni, a differenza di quelli essenziali (Clemens 2006); inoltre la tossicità esercitata dipende dalla mobilità dei metalli nella pianta, dalla forma chimica del metallo (ione libero, idrossido, sale, ecc...), dallo stato di ossidazione e dalle caratteristiche del suolo (pH, potenziale redox della superficie assorbente, contenuto in sostanza organica e in argilla) (Burken 2003).

Nelle piante lo stress da metalli pesanti causa numerosi cambiamenti a livello morfologico, fisiologico, biochimico e molecolare. Gli effetti macroscopici della tossicità da metalli pesanti sono rappresentati dalla riduzione della crescita della pianta (sia dell'apparato radicale che della parte aerea), da clorosi e necrosi fogliare, dalla perdita di turgore, dalla riduzione nel tasso di germinazione dei semi e infine dalla morte della pianta (Foy et al.

1978; Bingham et al. 1986). A livello cellulare la tossicità da metalli pesanti si accompagna spesso all'aumento nel livello di etilene, un ormone gassoso coinvolto in diversi processi di sviluppo e nella senescenza. Durante lo stress da metalli pesanti l'etilene inibisce la crescita cellulare, aumenta la rigidità della parete e induce la risposta di senescenza (Deikman, 1997). Inoltre l'eccesso di metalli pesanti può causare l'aumento nella produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), sia direttamente tramite autossidazione e reazione di Fenton (metalli redox-attivi come Cu e Fe) che indirettamente in seguito all'inattivazione degli enzimi che costituiscono il sistema di difesa antiossidante (metalli non redox, come Cd e Hg). In entrambi i casi l'aumento incontrollato dei ROS causa effetti dannosi su diversi componenti cellulari, inattivando le proteine e danneggiando i lipidi di membrana e il DNA (Schützendübel and Polle 2002). La membrana plasmatica è particolarmente vulnerabile alla tossicità dei metalli pesanti poiché essi ne alterano sia la permeabilità che la funzionalità, danneggiando importanti proteine di membrana come le H⁺-ATPasi (Hall 2002). Sono stati anche rilevati effetti sull'apparato fotosintetico, sulla trascrizione e sulla replicazione del DNA e sull'assemblaggio dei microtubuli durante la divisione cellulare (Krupa and Moniak 1998; Hsu and Kao 2004; Fusconi et al. 2006; Bačkor et al. 2007).

3.2 Meccanismi molecolari di difesa dai metalli pesanti

Le piante posseggono numerosi meccanismi coinvolti nella tolleranza allo stress da metalli pesanti. Tali strategie appaiono finalizzate principalmente ad evitare la formazione di concentrazioni tossiche di metalli pesanti in siti sensibili della cellula, prevenendo gli effetti dannosi sopradescritti. Le principali strategie osservate in diversi tipi di piante sono le seguenti: i) esclusione dei metalli pesanti dalle radici; ii) attivazione di meccanismi di difesa che mantengono l'omeostasi cellulare dei metalli; iii) produzione di proteine di difesa dallo stress (Hall 2002).

3.2.1 Meccanismi di esclusione

Le strategie di esclusione servono a ridurre l'ingresso dei metalli pesanti nelle cellule. Un ruolo importante in questo meccanismo sembra essere svolto dagli essudati prodotti dalle radici di alcune piante, che possono modificare la mobilità di alcuni metalli alterando il pH del suolo oppure chelandolo e rendendolo così meno biodisponibile (Bi et al. 2003) (Fig

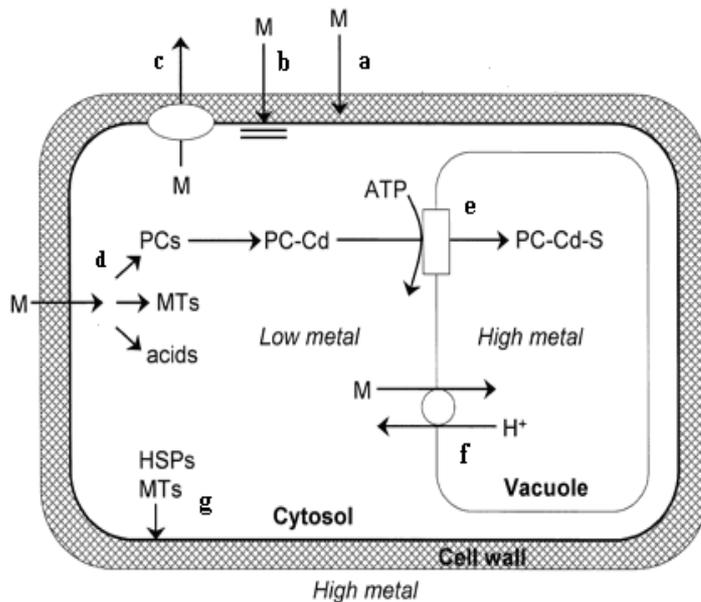


Figura 3.1: Meccanismi cellulari che favoriscono la tolleranza ai metalli pesanti nelle piante. (a) Legame alla parete cellulare e/o agli essudati. (b) Ridotto ingresso attraverso la membrana plasmatica. (c) Efflusso attivo nell'apoplasto. (d) Legame nel citosol a molecole chelanti. (e) Trasporto del complesso fitochelatina-metallo nel vacuolo. (f) Trasporto e accumulo dei metalli nel vacuolo. (g) Protezione e riparazione della membrana plasmatica.

3.1a). In presenza di elevate concentrazioni di Ni, è stata osservata la produzione di grandi quantità di istidina e citrato da parte di piante non accumulatrici, per cui è stato proposto che i due composti riducano l'assorbimento del Ni e giochino un ruolo importante nelle strategie di detossificazione da questo metallo (Salt et al. 2000). La membrana plasmatica può contribuire a mantenere la concentrazione dei metalli nelle cellule a livelli non tossici tramite la regolazione del loro ingresso nel protoplasto (Fig 3.1b). Un ruolo importante in tale strategia di tolleranza appare svolto dalla regolazione negativa dell'espressione di geni codificanti per trasportatori che mediano l'ingresso dei metalli nelle cellule radicali, come i membri della famiglia *NRamp* (Natural resistance associated macrophage protein) (Thomine et al. 2000). In alternativa l'esclusione può essere ottenuta grazie ad un aumento

dell'efflusso dei metalli dall'interno all'esterno della radice (Fig 3.1c), realizzato anche in questo caso attraverso la regolazione di geni per trasportatori, come il gene *Zat1*, clonato in *Arabidopsis thaliana* (Van der Zaal et al. 1999).

3.2.2 Meccanismi omeostatici

Alcune piante non escludono i metalli pesanti dai tessuti, ma sono in grado di mantenerne la concentrazione nelle cellule nei limiti fisiologici e minimizzarne gli effetti tossici tramite un complesso network di meccanismi omeostatici. Tali meccanismi prevedono il legame a specifici ligandi ad elevata affinità, come le fitochelatine e le metallotioneine (Fig 3.1d) ed il sequestro nei vacuoli (Clemens 2001; Hall 2002) (3.1e-f). Le fitochelatine (PC) sono piccoli peptidi con struttura generale $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n=2-11$), sintetizzate dal glutatione ridotto tramite una reazione di transpeptidazione effettuata dall'enzima fitochelatina sintasi (PCS) (Gril et al. 1989). Il loro ruolo nella tolleranza nei confronti del Cd è stato ampiamente dimostrato (Howden et al. 1995; Xiang and Oliver 1998; Zhu et al. 1999). Tuttavia un possibile ruolo delle PC è stato proposto anche nella tolleranza al Cu, all'As e allo Zn (Salt et al. 1989; Hartley-Withaker et al. 2001). Le metallotioneine (MT) rappresentano la seconda importante categoria di molecole chelanti coinvolte nell'omeostasi e nella detossificazione dei metalli. Si tratta di proteine a basso peso molecolare ricche in residui di cisterna, la cui biosintesi è regolata a livello trascrizionale da numerosi fattori, come ormoni, agenti citotossici e metalli come Cu, Zn e Cd (Tomsett and Turman 1988; Robinson et al. 1993; Goldsbrough 2000). Sebbene appaia chiaro l'importante ruolo delle MT nel metabolismo dei metalli, la loro esatta funzione non è ancora del tutto chiara; esse potrebbero avere ruoli diversi per diversi metalli (Hamer 1986) e funzionare come molecole antiossidanti (Dietz et al. 1999). Il trasporto dei metalli in specifici compartimenti cellulari favorisce la regolazione della loro concentrazione nel citosol. Un esempio ben documentato è rappresentato dall'accumulo dei complessi PC-Cd

nei vacuoli grazie a trasportatori ABC ATP-dipendenti localizzati nel tonoplasto (Salt and Wagner 1993; Rea et al. 1998). Il Fe è invece accumulato nei cloroplasti legato alla ferritina (Shingles et al. 2002) e non è escluso che altri tipi di metalli siano accumulati nel ER (Clemens et al. 2002).

3.2.3 Proteine di risposta allo stress

Come già accennato la funzionalità della membrana plasmatica è fortemente influenzata dai metalli pesanti (Hall 2002). Proteine che aiutano a preservare l'integrità delle membrane o riparano i danni sono quindi in grado di favorire la tolleranza della pianta nei confronti dei metalli pesanti (Fig 3.1g). Le heat shock proteins (HSP) sono tra le principali proteine di risposta allo stress. Esse svolgono un importante ruolo di *chaperon* molecolari nel processo di *folding* e assemblaggio delle proteine in condizioni fisiologiche normali e di riparazione delle proteine danneggiate quando la pianta è sottoposta a stress (Vierling 1991; Lewis 1999). Molti studi hanno evidenziato l'aumento nell'espressione delle HSP in presenza di stress da metalli pesanti, sia in risposta al Cu (Neumann et al. 1995; Lewis et al. 2001) che in risposta al Cd (Neumann et al. 1994). L'immuno-localizzazione di HSP70 nel nucleo, nel citoplasma e in prossimità della membrana plasmatica di *L. peruvianum* suggerisce il ruolo di questa proteina nella prevenzione del danno alle membrane (Neumann et al. 1994).

Eccessive concentrazioni di metalli pesanti redox attivi come Fe e Cu nel citosol possono portare a danno ossidativo (De Vos et al. 1992; Gallego et al. 1996; Yamamoto et al. 1997). Le piante posseggono un complesso sistema di difesa per contrastare l'eccesso di ROS, composto sia da molecole antiossidanti enzimatiche che non enzimatiche (Noctor and Foyer 1998; Asada 1999). La capacità della pianta di difendersi tramite l'attivazione dei sistemi antiossidanti sembra dipendere dal livello dei contaminanti, poiché oltre una certa soglia di tossicità è stata osservata una riduzione e non un aumento nell'attività degli

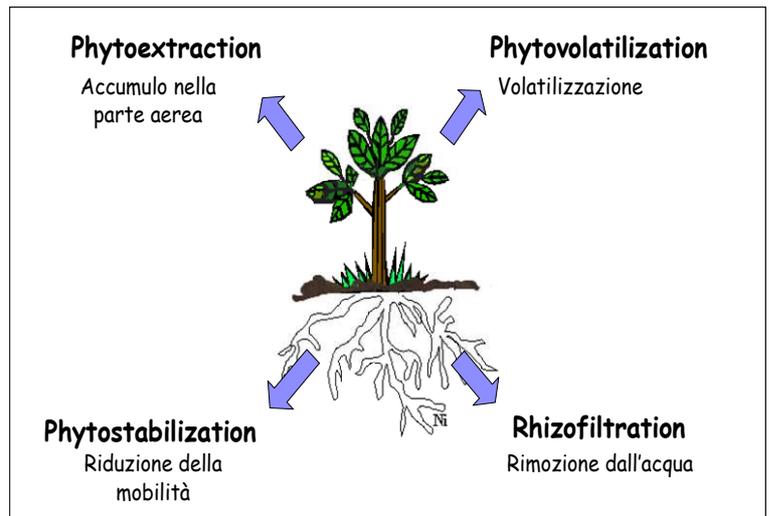
enzimi antiossidanti, probabilmente in seguito al danneggiamento degli enzimi stessi causato dai ROS (Kono and Fridovich 1982; Casano et al. 1997). Pertanto, sebbene l'attivazione delle difese antiossidanti può essere uno dei meccanismi coinvolti nella tolleranza della pianta allo stress da metalli pesanti, appaiono più efficaci quelle strategie di difesa che prevengono il manifestarsi dello stress ossidativo, come meccanismi di esclusione ed omeostatici (Hall 2002; Schützendübel and Polle 2002).

3.3 La fitoestrazione

3.3.1 Metodi convenzionali e biologici per il recupero dei terreni inquinati

Negli ultimi 20 anni sono stati compiuti molti progressi nelle tecniche di recupero dei suoli e delle acque contaminate. Alle metodiche tradizionali, molto costose e di limitata efficienza, si sono recentemente affiancati metodi basati sull'uso di piante e microrganismi, più economici e a minor impatto ambientale, indicati con il termine *fitorimedia*. Per quanto riguarda le metodiche tradizionali, una strategia è rappresentata dalla rimozione del terreno contaminato e nel suo trasferimento in siti di accumulo, a cui può seguire l'incenerimento. Questa strategia non risolve completamente il problema, poiché i metalli trasportati e accumulati in un altro luogo non vengono completamente distrutti; anche l'incenerimento non è uno strumento efficace dal momento che i composti generati dalla combustione possono risultare ancora più nocivi. In altri casi il terreno può essere trattato *in situ* con trattamenti fisici e chimici. I trattamenti fisici non distruggono i contaminanti, ma li trasferiscono solo in una fase liquida o gassosa da smaltire in un secondo tempo. I trattamenti chimici servono a distruggere le sostanze contaminanti piuttosto che trasformarle in composti meno pericolosi, per cui sono applicabili solo nel caso di inquinanti organici e a volte producono sostanze la cui tossicità non deve essere sottovalutata.

Figura 3.2: Principali metodiche utilizzate per la rimozione dei metalli pesanti tramite il fitorimediazione.



Il fitorimediazione rappresenta una tecnologia emergente per la rimozione degli inquinanti dai suoli contaminati. Essa consiste nell'utilizzo di piante verdi, della fauna microbica e delle tecniche agronomiche associate, per rimuovere, contenere o rendere inoffensivi diversi contaminanti ambientali (Cunningham and Ow 1996). In particolare, questa tecnologia comprende diverse metodiche di disinquinamento: la *fitoestrazione*, la *fitostabilizzazione*, la *fitovolatilizzazione* e la *rizofiltrazione* (Arru et al. 2004) (Fig 3.2). La *fitoestrazione* prevede l'impiego di piante per rimuovere i contaminanti dal suolo e concentrarli nella parte aerea affinché possano essere raccolti ed inceneriti o impiegati per il recupero di metalli utili (Wong 2003). La *fitostabilizzazione* riduce la mobilità degli inquinanti e quindi la loro biodisponibilità ad entrare nella catena alimentare (Vangronsveld et al. 1995). Essa si basa sulla capacità delle piante di accumulare i metalli nelle radici, prevenendo l'erosione provocata da pioggia e vento, oppure di favorire la precipitazione o il sequestro dei metalli nelle particelle di suolo, grazie anche al contributo dei microrganismi (Cunningham et al. 1995). La *fitovolatilizzazione* comprende meccanismi di "volatilizzazione" nell'atmosfera di alcuni metalli, come Hg o Sn (Zayed et al. 2000). Infine la *rizofiltrazione* consiste nella rimozione dei contaminanti dalle acque, sfruttando piante acquatiche che assorbono i metalli nei propri tessuti per riportarne i valori sotto ai limiti comunemente accettati (Raskin et al. 1997).

3.3.2 Funghi micorrizici arbuscolari (FMA) e tolleranza delle piante ai metalli pesanti

In condizioni naturali, l'80-90% delle piante sono colonizzate da funghi micorrizici arbuscolari (FMA), con cui formano associazioni mutualistiche (Read 1991; Nielsen et al. 2004; Rosendhal 2008). Le piante micorrizzate beneficiano di una maggiore disponibilità di acqua e di nutrienti rispetto a quelle non micorrizzate, poiché la fitta rete di ife prodotta dal fungo permette alla pianta di disporre di un volume di suolo maggiore (Berta et al. 2002; Giovannetti et al. 2002) (Fig 3.3). Generalmente i metalli pesanti hanno un effetto negativo sullo stabilirsi della simbiosi, ritardandola o eliminandola del tutto (Citterio et al. 2005; Lingua et al. 2008). Tuttavia nei suoli contaminati sono stati identificati ceppi di FMA autoctoni adattati a queste condizioni sfavorevoli (Hildebrandt et al. 1999; Vallino et al. 2006) e in grado di conferire una maggior

tolleranza alla pianta con cui stabiliscono la simbiosi (Leyval et al. 2002). I FMA appaiono influenzare la crescita della pianta nei suoli contaminati tramite un effetto sulla quantità di metallo accumulata nei tessuti del fitobionte. Sono stati osservati casi in cui il fungo riduce (Weissenhorn et al. 1995; Zhu et al. 2001; Lin et al. 2007) aumenta (Tonin et al. 2001; Jamal et al. 2002; Lingua et al. 2008) o non modifica (Dueck et al.

1986; Galli et al. 1995) la concentrazione dei metalli pesanti nella pianta e questo dipende molto dalla specie della pianta e del fungo e dal tipo di metallo considerato. E' stato inoltre osservato che i FMA possono anche influenzare l'allocazione dei metalli, favorendo un

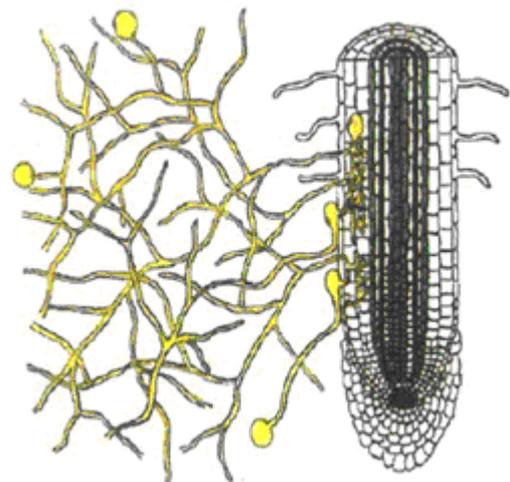


Figura 3.3: Rappresentazione schematica della fase simbiotica del fungo micorrizico arbuscolare (Balestrini and Lanfranco 2006).

maggior accumulo in un particolare organo della pianta piuttosto che in un altro (Lingua et al. 2008).

Un'importante applicazione delle nuove conoscenze relative all'interazione tra piante e FMA in suoli contaminati dai metalli pesanti è rappresentata dalla *fitoestrazione assistita da microrganismi*. Infatti la naturale abilità delle piante accumulatrici nel rimuovere i contaminanti dal terreno può essere resa più efficiente grazie a ceppi di FMA che sono in grado di incrementare la quantità di metallo depositata nella parte aerea. Due parametri importanti che permettono di giudicare l'efficienza del sistema sono l'effetto dei FMA sulla biomassa della pianta e sulla concentrazione del metallo nei tessuti. L'associazione con FMA può aumentare la concentrazione del metallo nella parte aerea, rispetto alle piante non micorrizzate, fino a 4 volte nelle radici e fino a 3 volte nelle foglie; è stato anche evidenziato un effetto positivo dei FMA sulla biomassa della pianta, che può essere più alta nelle piante micorrizzate fino a 7 volte nelle radici e fino a 5 nella parte aerea (Lebeau et al. 2008). Entrambi i parametri devono essere tenuti in considerazione nella valutazione di una particolare associazione pianta-fungo, poiché un aumento della biomassa spesso si accompagna ad un decremento della concentrazione del metallo e viceversa. I casi più favorevoli sono ovviamente rappresentati dall'aumento di entrambi i fattori in seguito alla simbiosi.

I meccanismi che favoriscono un maggior accumulo e/o tolleranza ai metalli pesanti nell'interazione pianta-FMA sono ancora poco noti. Uno dei fattori coinvolti potrebbe essere l'aumento nella biodisponibilità del metallo nel suolo grazie alla produzione di siderofori e acidi organici prodotti dal fungo, che facilitano l'assorbimento da parte della pianta (Galli et al. 1995). Come già accennato, anche la produzione di una maggiore biomassa è un carattere favorevole per la fitoestrazione se non si verifica un contemporaneo decremento della concentrazione del metallo nei tessuti. La maggiore

biomassa prodotta da alcune piante micorrizzate rispetto a quelle non micorrizzate appare legata al miglior stato nutrizionale determinato dalla simbiosi (Leyval et al. 2002). E' probabile inoltre che la simbiosi causi notevoli cambiamenti nell'espressione genica della pianta, in particolare per quanto riguarda il processo di regolazione dell'omeostasi intracellulare dei metalli e la protezione dallo stress ossidativo. Alcuni studi hanno evidenziato, in piante micorrizzate e non micorrizzate con FMA, una diversa regolazione dei geni coinvolti nella sintesi di ligandi dei metalli pesanti, come metallotioneine e fitochelatine (Ouziad et al. 2005) e di trasportatori di membrana (Burleigh et al. 2003). La simbiosi micorrizica appare anche modulare enzimi coinvolti nella biosintesi di composti contenenti S, come osmoliti con ruolo di protezione, oppure enzimi antiossidanti come tioredossina perossidasi e glutatione perossidasi (Berta et al. 2008).

3.3.3 Utilizzo del pioppo nella fitoestrazione

Come già accennato nei precedenti paragrafi, la fitoestrazione si basa sulla disponibilità di piante dotate di caratteristiche genetiche e fisiologiche che consentono loro di accumulare nella parte aerea grandi quantità di metallo. Per questa finalità sono auspicabili le seguenti caratteristiche: rapidità di crescita, produzione di molta biomassa, un sistema radicale esteso, capacità di crescere in suoli poveri di nutrienti, tolleranza ai metalli pesanti e possibilmente un utilizzo secondario utilizzabile dal punto di vista economico (Punshon and Dickinson 1997). Tra le specie arboree, il pioppo è considerato un buon candidato per la fitoestrazione, poiché possiede tutte queste caratteristiche (Di Baccio et al. 2003; Sebastiani et al. 2004). L'elevata variabilità clonale per quanto riguarda l'accumulo e la tolleranza ai metalli può favorire l'identificazione di genotipi con una maggior capacità di accumulo/tolleranza nei confronti di specifici metalli pesanti. Ad esempio cloni di pioppo sono stati selezionati per la rimozione dello Zn (Di Baccio et al. 2003; Laureysens et al.

2004; Castiglione et al. 2009), del Cd e dell'Al (Laureysens et al. 2004; Laureysens et al. 2005; Wu et al. 2009).

La simbiosi tra cloni di pioppo e FMA appare un valido strumento per incrementare l'abilità delle piante di estrarre i metalli dal terreno. Nonostante l'importante ricaduta pratica, ancora pochi studi sono stati condotti per identificare le associazioni tra cloni di pioppo e FMA più favorevoli per la fitoestrazione. Lingua et al. 2008 hanno messo in evidenza che l'effetto dei FMA sull'accumulo e sulla traslocazione del metallo nella pianta sia fortemente dipendente dal clone della pianta e dalla specie di fungo considerata. Due cloni di pioppo (*P. alba* cv. 'Villafranca' e *P. nigra* cv. 'Jean Pourtet') sono stati inoculati con due diversi FMA (*Glomus mosseae* e *Glomus intraradices*) e fatti crescere in presenza di un'elevata concentrazione di Zn nel suolo. Lo studio ha rivelato che le performance del clone 'Villafranca' erano aumentate dalla presenza di *G. mosseae* mentre il clone 'Jean Pourtet' accumulava più Zn in assenza di micorrizzazione. La diversa risposta dei due cloni appare legata alle loro diverse strategie di difesa nei confronti dello Zn (Lingua et al. 2008). Una maggior comprensione degli effetti a livello molecolare dei FMA sui diversi cloni di pioppo potrebbe costituire un valido supporto nella scelta di associazioni pianta-fungo più convenienti per la fitoestrazione.

Obiettivi della tesi

L'obiettivo della presente tesi è stato quello di acquisire maggiori conoscenze sulle risposte molecolari del pioppo a due stress ambientali che riducono notevolmente la crescita delle piante: lo stress idrico e lo stress da metalli pesanti. Per questo motivo abbiamo considerato due casi di studio:

- 1) La risposta al deficit idrico è stata studiata in due cloni di pioppo, 'Dvina' (*Populus deltoides*) e 'I-214' (*Populus x canadensis*), caratterizzati da un diverso grado di sensibilità alla carenza idrica. Lo scopo è stato quello di evidenziare, se esistono, differenze tra i cloni in termini di risposta allo stress e la presenza di una diversa strategia di adattamento al deficit idrico nel cambio, tessuto cruciale per la produzione del legno. I cloni sono stati sottoposti a 15 giorni di intenso deficit idrico, e successivamente reidratati per 15 giorni. Lo stress è stato valutato con parametri fisiologici e la zona cambiale dei due cloni è stata analizzata per verificare eventuali cambiamenti nell'espressione di importanti geni di difesa dallo stress e di geni coinvolti nel metabolismo e nel trasporto degli zuccheri.
- 2) L'interazione tra micorrize e sistemi di difesa dai metalli pesanti nel pioppo è stata studiata nel clone di *Populus alba* 'AL35', tollerante ai metalli pesanti. Le piante micorrizzate, oppure no, con il fungo micorrizico arbuscolare *Glomus mosseae* sono state fatte crescere per 16 mesi in un terreno contenente elevati livelli di metalli pesanti o in terreno non inquinato. Le piante cresciute nelle diverse condizioni sono state analizzate per verificare l'effetto del fungo sulla crescita degli organi, sull'accumulo dei metalli pesanti e sull'espressione dei geni antiossidanti e dei geni coinvolti nella regolazione dell'omeostasi dei metalli, sia nelle radici che nelle foglie.

Capitolo 1

Effetto del deficit idrico sull'espressione dei geni di risposta allo stress nella regione cambiale di due cloni di pioppo con una diversa risposta alla siccità

Lo studio descritto in questo capitolo si propone di acquisire maggiori conoscenze sulle risposte molecolari di difesa del pioppo nei confronti del deficit idrico. Per tale motivo è stato analizzato l'effetto di un periodo di deficit idrico di 15 giorni seguito da reidratazione, sulla trascrizione di alcuni geni con un ruolo importante nella difesa dallo stress nella regione cambiale di due cloni di pioppo, 'Dvina' (*Populus deltoides*) e 'I-214' (*Populus x canadensis*), che differiscono per la loro risposta alla carenza idrica. I parametri di crescita delle piante di 'Dvina' e di 'I-214' sono stati monitorati nelle condizioni di irrigazione normale e in quella di stress idrico, ed è stato analizzato il contenuto di malondialdeide (MDA) e di prolina e il livello di espressione di geni codificanti per enzimi antiossidanti (superossido dismutasi, SOD; catalasi, CAT; ascorbato perossidasi, APX; glutazione reduttasi, GR) e metallotioneine (MT) tramite real time RT-PCR (RT-qPCR). Nelle seguenti pagine è riportato l'articolo, sottoposto alla rivista *Plant Cell Reports*, in cui sono descritti e discussi i risultati ottenuti nel presente lavoro.

EFFECT OF WATER DEFICIT ON EXPRESSION OF STRESS RELATED GENES IN THE CAMBIAL REGION OF TWO CONTRASTING POPLAR CLONES

PALLARA G., GIOVANNELLI A.*, TRAVERSI M. L.*, CAMUSSI A., RACCHI M. L.^o.

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Sezione di Genetica, Università di Firenze, Via Maragliano, 77, 50144 Firenze, Italia.

*) Laboratorio di Xilogenesi, Istituto Valorizzazione Legno e Specie Arboree, CNR, Via Madonna del Piano, Sesto Fiorentino, 50019 Firenze, Italia.

^o) **corresponding author**

Tel.: +39 55 3445043; fax: +39 553445044

E-mail address: milvia.racchi@unifi.it

Keywords: Poplar, Drought tolerance, Cambium, Antioxidant genes, Metallothionein

Abbreviations: APX, ascorbate peroxidase; CAT, catalase; ΔR , daily stem radius increment; GR, glutathione reductase; LPI, leaf plastochrone index; MDA, malondialdehyde; MDS, maximum daily shrinkage; MT, metallothionein; ROS, reactive oxygen species; RWC, relative water content; SOD, superoxide dismutase; SWC, soil water content; Ψ_{pd} , pre-dawn leaf water potential.

Abstract

In this study we investigated the effect of prolonged water-shortage in the cambial region of two poplar clones, 'Dvina' (*Populus deltoides*) and 'I-214' (*Populus x canadensis*) that differ for their response to water deficit. For this purpose we monitored growth parameters in 'Dvina' and 'I-214' plants under well-watered and water-stress conditions and after re-watering and analyzed the content of malondialdehyde (MDA), proline and the expression level of genes coding for antioxidant enzymes (superoxide dismutase, SOD; catalase, CAT; ascorbate peroxidase, APX; glutathione reductase, GR) and metallothioneins (MT) by quantitative real time RT-PCR (RT-qPCR). Water deficit resulted a significant increase of osmotically active solutes in both clones. No significant increase of MDA level was observed in 'Dvina', whereas a significant enhancement of lipid peroxidation was detected in 'I-214', in which also a strong fivefold increase of proline was detected. Transcript analysis of stress related genes evidenced a different ability of the two clones to modulate antioxidant genes under stress. In particular *MT3b* was strongly up-regulated by water deficit in 'Dvina' thus suggesting an important role of this gene in the maintenance of cellular redox homeostasis of the clone. On the whole, the two clones exhibited changes at transcription and physiological level in cambial region that suggest the occurrence of different strategies of plant protection from prolonged water deficit.

Introduction

Poplar (*Populus sp.*) is of primary economic importance for the production of wood in temperate regions of the world. Long-lasting periods of drought strongly limit radial growth of plants, decreasing productivity of poplar plantations and wood quality (Giovannelli et al. 2007). Although poplars are usually known as one of the most drought-sensitive woody plant groups (Tschaplinski and Tuskan 1994), their drought tolerance varies greatly among species, populations and clones due to their high genetic diversity (Monclus et al. 2006; Zhang et al. 2004). The adaptive responses to water deficit of different poplar genotypes include morphological, physiological and biochemical changes, such as changes in growth rate, stomatal conductance, tissue osmotic potential and antioxidant defence (Kozłowski and Pallardy 2002; Yin et al. 2005; Zhang et al. 2005). In a previous study the two poplar clones ‘Dvina’ (*Populus deltoides*) and ‘I-214’ (*Populus x canadensis*) displayed different responses to water deficit. Under limited water availability ‘Dvina’ maintained stem growth for longer than ‘I-214’ and had lower leaf abscission at the end of the drought period. After irrigation resumed, ‘Dvina’ showed higher ability to restore stem growth (Giovannelli et al. 2007). These two poplar clones, distinct for their response to water deficit, appear a suitable model to improve knowledge of the molecular mechanisms underlying drought tolerance.

Several recent studies have dealt with the identification of genes induced under drought stress in specific poplar clones. They focused primarily on transcriptome and proteome changes in roots and leaves (Brosché et al. 2005; Plomion et al. 2006; Bogeat-Triboulot et al. 2007; Caruso et al. 2008; Xiao et al. 2008; Bonhomme et al. 2009; Regier et al. 2009; Xiao et al. 2009) whereas, with a few exceptions, the regulation of genes in poplar cambial region under water deficit has received little attention (Berta et al. 2006; Berta et al. 2009; Berta et al. 2010). The vascular cambium is a secondary meristem that plays a major role

in the radial growth of gymnosperm and angiosperm stems and roots. It produces secondary phloem on the outside and secondary xylem, or wood, on the inside. Cambial activity ensures the perennial life of trees through the regular renewal of functional xylem and phloem. Wood characteristics are due to cambium division, cell expansion and secondary wall production. Drought strongly affects radial increment and xylem anatomy (Abe et al. 2003; Corcuera et al. 2004; Arend and Fromm 2007). Until now no study has dealt with the effect of genotype on the regulation of genes involved in drought tolerance in the cambial region of poplar.

Osmotically active substances play a crucial role in plant adaptation to water stress, limiting cell dehydration (Kozlowsky and Pallardy 2002) and preserving enzyme structure and activity (Rajendrakumar et al. 1994; Samuel et al. 2000). Osmotic adjustment involves the synthesis and accumulation of small solutes (osmolytes), such as proline, glycine betaine, sugars and some inorganic anions (Bray 1997; Chaves et al. 2003; Hare et al. 1998). In poplar leaves and roots osmotically active substances accumulate under water-limited conditions (Marron et al. 2002; Lei et al. 2006; Regier et al. 2009). In addition, drought may induce oxidative stress through the production of reactive oxygen species (ROS) (Foyer and Noctor 2005; Sofu et al. 2005; Mittler 2006; Selote and Khanna-Chopra 2006; Meyer 2008; Miller et al. 2008). ROS are highly toxic and can damage many important cellular components, such as lipids, proteins, DNA, and RNA (Smirnoff 1993; Foyer et al. 1994). The main scavengers of oxygen radicals are SOD, CAT, and the enzymes of the ascorbate-glutathione pathway, such as APX and GR (Foyer and Halliwell 1976; Noctor and Foyer 1998; Asada 1999). Recently a putative role in defence against oxidative stress has been suggested also for MTs, a family of low-molecular-weight cystein-rich proteins (Wong et al. 2004; Akashi et al. 2004). Until now the importance of

the osmotic adjustment as well as the contribution of antioxidant and MT genes to drought tolerance in poplar cambial region is still unknown and remains to be clarified.

In previous studies on white poplar (Berta et al. 2006; Berta et al. 2009; Berta et al. 2010) genes coding for antioxidant enzymes, like SOD, CAT, APX and GR, and for MT type 3 resulted differentially stress regulated within the cambial region under water deficit.

In this work we analysed the effect of a two-weeks water deficit on plant eco-physiological performances, cellular membrane injury; occurrence of active osmotic adjustment, proline content and expression patterns of stress defence genes (*Sod*, *Cat*, *Apx*, *Gr*, *MT*) in the cambial region of the two clones 'Dvina' and I-214', with different responses to water deficit, to highlight differences that could account for their different sensitivity to stress.

Materials and methods

Plant material and experimental design

In early June 2009, 32 2-years-old plants of *Populus deltoides* clone 'Dvina' and *Populus x canadensis* Moench clone 'I-214' were selected for dimensional uniformity (mean height 144.6 ± 12.3 cm for 'I-214' and 133.5 ± 10.5 cm for 'Dvina', mean stem diameter at $\frac{1}{4}$ of stem height, 17.1 ± 0.6 mm for 'I-214' and 16 ± 1.1 mm for 'Dvina', average total leaf area per plant 77.36 ± 3.8 dm² for 'I-214' and 72.2 ± 3.2 dm² for 'Dvina'). For each clone, plants were divided into two homogeneous groups of 16 plants each. (T0) plants were submitted to different watering regimes for 30 days. In watered plants (Pw), soil moisture was maintained to field capacity (SWC = 28-30%), while in stressed plants (Pst) watering was suspended for 15 days (Tmax) and then resumed up to 30 days (Trec). During the experiment, plants were maintained in a nursery at open air. In order to avoid soil rehydration by rainfall, the pots of Pst plants were covered with hydrophilic plastic covers. During the experiment the mean temperature ranged between 16 and 26°C, with a value of 34°C as the maximum recorded at midday (15.00 p.m.) on day 20 (air temperature recorded at LAMMA, Laboratory of monitoring and environmental modeling for the sustainable development, Florence, [http:// www.lamma.rete.toscana.it/eng/index.html](http://www.lamma.rete.toscana.it/eng/index.html)). The daily mean of vapor pressure deficit ranged between 0.6 and 2 KPa while the daily global radiation ranged between 13 and 30 MJ/m².

Soil-plant water relations and growth measurements

Predawn leaf water potential (Ψ_{pd} , MPa) was measured with a pressure chamber (PMS Instruments Co., Corvallis, OR, USA) on two to three fully expanded leaves (leaf plastochrone index, LPI, between 5 and 7) collected from randomly selected shoots. At the beginning of experiment days 0, 15 and 30, four plants from each clone and treatment were used to determine stem water content (WC_{stem}), calculated following the procedure

described in Deslauriers et al. (2009). Stem pieces 10 cm long were immediately weighed within 15 min after harvest to determine the fresh mass (g). The fresh volume of samples (cm^3) was assessed by water displacement (Borghetti et al. 1991). The dry mass (g) was measured after the samples were maintained at 72°C for 96 h. Relative stem water content (RWC_{stem}) was calculated following Domec and Gartner (2001):

$$\text{RWC}_{\text{stem}} = (\text{Mf} - \text{Md}) / (\text{Vf} - \text{Vs}) \times 100$$

where Mf and Md are the fresh and dry mass of the wood (g), respectively, and Vf and Vs are the volumes of fresh and solid material (cm^3), respectively. The Vs was estimated by dividing Md by 1.53 assuming a density of 1.53 g cm^{-3} for dry cell wall material (Skaar 1988).

Soil water content (SWC) was measured each two days within each replicate in the Pw and Pst plants by Hydro-sense probes (Campbell scientific Inc., USA) based on time domain reflectometry (TDR). The stem radial growth was determined by point dendrometers as already reported elsewhere Giovannelli et al. (2007). Raw data were recorded every 15 min and hourly averages were calculated. The extraction of maximum daily shrinkage (MDS) and daily stem increment (ΔR) was performed dividing the stem cycle in three distinct phases (Downes et al. 1999; Deslauriers et al. 2003) and identifying (i) expansion phase, total period from the minimum to the following morning maximum; (ii) stem radius increment phase, part of the expansion phase from the time when the stem radius exceeds the morning maximum until the subsequent maximum; (iii) the contraction phase or MDS, period between morning maximum and afternoon minimum.

Cambial region collection

Cambial region was extracted following the procedure according to Berta et al. (2010). Stems are cut at the collar, divided into logs of 10-15 cm in length, immediately immersed in liquid nitrogen and freeze-dried at a constant temperature of -50°C under vacuum (0.15

mbar or less). The cambial region with the differentiating phloem was gently scrapped with a razor blade from the inner side of the bark. From 200 to 500 mg of dried powder was collected from each sample.

Determination of malondialdehyde content

Lipid peroxidation in the cambial region of Pst and Pw plants was determined by measuring the amount of MDA using the thiobarbituric acid (TBA) method described by Zhang et al. (2007) with modifications to the original protocol. Powdered cambial region (10 mg) was homogenized in 1 ml of 20% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) and 0.5% (w/v) thiobarbituric acid solution. The mixture was incubated in boiling water for 30 min, and the reaction was stopped by placing the reaction tubes in an ice bath. The cooled mixture was centrifuged at 5000 g for 10 min and the absorbance of the supernatant was measured at 532 nm, subtracting the value for non-specific absorption at 600 nm. The amount of MDA-TBA complex (red pigment) was calculated from the extinction coefficient $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Kosugi and Kikugawa 1985).

Determination of osmotically active solutes and proline content

The concentration of osmotically active solutes in cambial region was determined following the procedure proposed by Arend and Fromm (2007). Four mg dried powder of cambial region were extracted with 0.25 ml of double distilled water. After centrifugation at 20000 g for 3 min, the concentration of osmotically active solutes was measured with a freezing point osmometer equipped with a 15 μl measuring cell (Osmomat 030, Gonatec, Germany).

Proline content was assessed colorimetrically using the protocol of Bates et al. (1973). Lyophilized powdered cambial region (30 mg) was homogenized in 1 ml of 3% (w/v) aqueous sulfosalicylic acid solution and the homogenate was centrifuged at 5000 g for 5 min. The supernatant was reacted with 1 ml acid ninhydrin (2.5 g ninhydrin/100 ml of a

solution containing glacial acetic acid, distilled water and *ortho*-phosphoric acid 85% at a ratio of 6:3:1) and 1 ml of glacial acetic acid in a test tube for 1 h at 100°C and the reaction was terminated in an ice bath for 5 min. The reaction mixture was extracted with 1 ml toluene. The chromophore containing toluene was warmed to room temperature and its optical density was measured at 520 nm. The proline concentration was determined from a standard curve and calculated on a dry weight basis ($\mu\text{mol g}^{-1}$ DW).

RNA extraction and first-strand cDNA synthesis

Total RNA was extracted from 100 mg of powdered cambial region according to the extraction protocol of Kolosova et al. (2004), treated with Rnase-Free Dnase Set (Qiagen, Hilden, Germany) and purified using columns from RNase Clean-up kit (Qiagen). RNA concentration was spectrophotometrically measured using Gene Quant Pro (Amersham Biosciences, Milan, Italy) and RNA quality was verified by visualization on ethidium bromide agarose gel. First-strand cDNA synthesis was performed from 5 μg total RNA using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and priming the reaction with oligo(dT)₁₅. The quality of first-strand cDNA and the absence of genomic DNA in the samples were tested via PCR using primers for elongation factor 1 beta subunit, and for eukaryotic initiation factor 4B (Table 1).

Primer design and quantitative real time RT-PCR (RT-qPCR)

All primer sequences used in this study are listed in Table 1. Primers for *CuZnSod*, *MnSod*, *Cat1* and *Gr* were designed using the Primer3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>; Rozen and Skaletzki 2000), downloading gene sequences from the *Populus trichocarpa* v1.1 database (http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html; Tuskan et al. 2006). For the amplification of *Cat3*, *Apx*, *MT3a*, *MT3b* and for the reference genes *EF1*, *EIF4B* and *GαS* we used previously published primer pairs (Berta et al. 2006; Berta et al. 2009; Berta et al. 2010; Brunner et al. 2004; Bogeat-Triboulot et al. 2007; Regier et al.

2009). Identity of amplicons was verified by non-quantitative PCR and by sequencing on an ABI 3130XL instrument (Applied Biosystems Inc., Division, Foster City, CA, USA). Samples were diluted to a final volume of 100 μ l and 1 μ l was used as a template for the RT-qPCR in a reaction of 15 μ l total volume. Reactions were carried out using the iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) on an iCycler iQ Real Time PCR System (Bio-Rad). One cDNA sample diluted 1/5, 1/25, 1/125, 1/625, and 1/3125, was employed as a standard to calculate the amplification efficiency for each primer pair. PCR reactions were performed under the following conditions: 2 min at 95°C, 40 cycles of 30 s at 95°C, 20 s at 60°C and 20 s at 72°C. Melting curve analysis confirmed the specificity of amplification. The relative mRNA levels for each gene were calculated with qBase software (Hellemans et al. 2007) with respect to the internal standards *EF1*, *EIF4B* and *GaS*. The gene expression stability of reference genes was previously evaluated using geNorm software (Vandesompele et al. 2002) and qBase software (data not shown).

Statistical analysis

The hypotheses testing was performed by ANOVA using STATA 9 software (STATA Corp, College Station, TX). A linear regression model and a quadratic model were fitted to the experimental data on time (T0, Tmax and Trec) to test the hypotheses of no differences between average values within each treatment and clone.

Table 1. Sequences of the primers used for qRT-PCR

Gene	Abbr.	Forward primer	Reverse primer	JGI gene model ID
CuZn Superoxide dismutase	<i>CuZnSod</i>	CCTGAGAAGCATAAGGAACAGTG	TCCATGGTCCTTCTTTAATGG	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIII1983
Mn Superoxide dismutase	<i>MnSod</i>	ACTCCAAGCACACCTGCTCT	CGGCGGAACAAATAGGAGTA	grail3.0095006301
Catalase 1	<i>Cat1</i>	TGAAGACGACACCAAAGCTC	AACTGCAAACCACACAGCAG	eugene3.00020082
Catalase 3	<i>Cat3</i>	GTCTCAGGCTGATAAATCTTTG	ATTCAGTTTGGTGTCATCTTC	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_V0695
Ascorbate peroxidase	<i>Apx</i>	AGCTCTCCGAACTGGGATTT	CTCTTCCACCCATCATGAGC	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_IX1399
Glutathione reductase	<i>Gr</i>	GATGCACCTGAAATCGTGCGAG	GGTTTGCCACCAGCAGTAAC	grail3.0008003701
Metallothionein 3a	<i>MT3a</i>	TGTCTAGCACCTGCGACAAC	CACATGACGGTTTACGTGCT	eugene3.00110909
Metallothionein 3b	<i>MT3b</i>	CTGCACATGCGGTCATTAAG	GTTCACTCCACACCCACAAGT	eugene3.01070053
Elongation factor 1, β -subunit	<i>EF1</i>	AAGCCATGGGATGATGAGAC	ACTGGAGCCAATTTTGATGC	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_I1178
Eucaryotic translation factor 4B	<i>EIF4B</i>	AAAAAGGGGATTTGGGATTG	AACTTCGTCTCGGTAGCAA	grail3.0001032101
Glucosidase II α -subunit	<i>GαS</i>	CTCTCATTGAGCCGGCAAAT	CCCCCTTCAAGCATAAGG	gw1.VII.1603.1

Results

In the present study, water deficit was imposed for 15 days, followed by a re-watering period of 15 days. The decrease of soil water content (80% of water content reduction respect to the field capacity) significantly affected the leaf and stem water status and growth of Pst plants. However a complete recovery of plant water status and stem growth were reached after 15 days after the resumption of irrigation, as the stress given, even if severe, was not sufficient to induce irreversible damage (Table 2). After 15 days (Tmax) of withholding irrigation, treated plants leaf Ψ_{pd} decreased to values below -1.5 MPa. The leaf Ψ_{pd} decrease was associated with a significant increase in stem water loss (> 10% of RWC reduction in Pst respect to Pw plants in both clones) that gave rise to an increase in

Table 2. Pre-dawn leaf water potential (Ψ_{pd}), soil water content (SWC), relative stem water content (RWCstem), daily radial stem variation (ΔR), maximum daily shrinkage (Stem MDS) measured at the beginning of the experiment (T₀), 15 days after withholding irrigation (Tmax) and 15 days after resumption of the irrigation (Trec). Means of four replicates, SE into brackets.

	T0		Tmax		Trec	
	Control (Pw)	Control (Pw)	Stress (Pst)	§	Control (Pw)	Stress (Pst)
I-214						
Leaf Ψ_{pd} (MPa)	-0.28 (0.02)	-0.23 (0.02)	-1.45 (0.7)	**	-0.3 (0.04)	-0.25 (0.05)
SWC (%)	31.0	29.0	5.5	**	29.0	28.0
Stem RWC (%)	67.2	64.4	57.6	**	56.9	56.3
Stem ΔR (μm)	25.3 (1.7)	27.8 (1.1)	-24.6 (2)	**	20.2 (2.3)	21.7 (3.4)
Stem MDS (μm)	-5.4 (0.4)	-6.2 (1.3)	-48.2 (3.5)	**	-5.2 (2.5)	-9.7 (1.2)
DVINA						
Leaf Ψ_{pd} (MPa)	-0.40 (0.08)	-0.18 (0.02)	-1.36 (0.17)	**	-0.20 (0.03)	-0.30 (0.03)
SWC (%)	33.7	27.7	5.3	**	31.0	29.7
Stem RWC (%)	64.7	67.0	62.2	**	57.7	58.6
Stem ΔR (μm)	20.0 (1.3)	19.4 (3.8)	-26.5 (1.4)	**	16.3 (2.1)	18.8 (1.4)
Stem MDS (μm)	-5.5 (0.8)	-4.2 (0.9)	-50.0 (4.6)	**	-4.1 (0.1)	-5.1 (0.4)

§The test of the hypotheses of no differences between averages values was performed at Tmax between Pw and Pst (** = $P \leq 0.001$)

maximum daily shrinkage of the stem (Pst plants showed an MDS ten times higher than control ones) with no significant differences between clones ($P=0.562$). As consequence at Tmax, Pst plants showed a significant reduction in ΔR (negative values for both clones). After resumption of the irrigation, SWC of treated plants was maintained to field capacity for fifteen days. At Trec treated plants had similar leaf Ψ_{pd} , RWC, ΔR and MDS showing a complete recovery of plant water status and growth.

Determination of malondialdehyde content

The effect of water deficit on lipid peroxidation of cellular membranes in the cambial region of ‘Dvina’ and ‘I-214’ was estimated by measuring MDA content in stressed and control plants collected at different times. We did not detect a significant increase in levels of lipid peroxidation in plants of ‘Dvina’ during the time course of the experiment, on the contrary, significant enhancement of MDA were observed in ‘I-214’ (Figure 1). However, the clones exhibited different contents of MDA. In fact, ‘I-214’ displayed a MDA content two-fold higher than ‘Dvina’ independently of treatments (Table 3; Table 5).

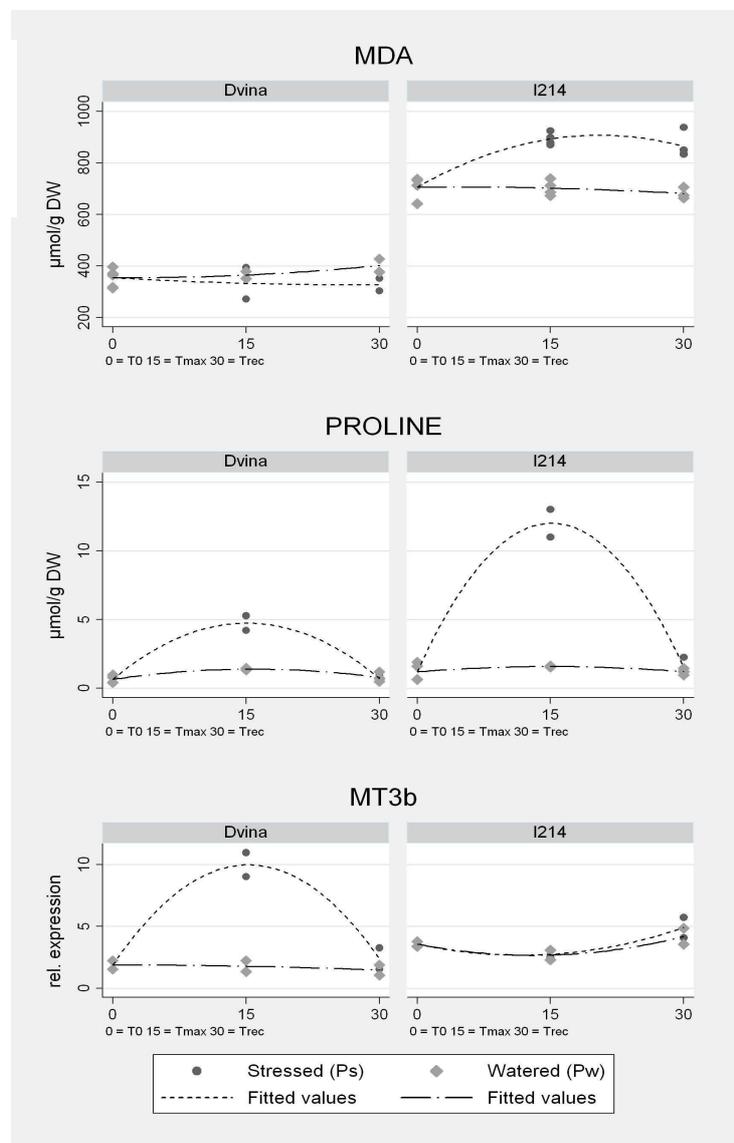
	T0		Tmax		Trec	
	Control (Pw)	Control (Pw)	Stress (Pst)	Control (Pw)	Stress (Pst)	
I-214						
MDA ($\mu\text{mol/g DW}$)	705.96 (31.56)	702.20 (20.43)	793.06 (97.65)	681.38 (15.82)	864.08 (35.60)	
Osmotically active solutes -OAS (mOsm/g DW)	1.96 (0.05)	2.30 (0.11)	2.65 (0.05)	1.67 (0.05)	2.13 (0.08)	
Proline ($\mu\text{mol/g DW}$)	1.20 (0.46)	1.58 (0.04)	12.00 (1.00)	1.20 (0.14)	1.50 (0.37)	
DVINA						
MDA ($\mu\text{mol/g DW}$)	354.79 (23.10)	364.88 (13.74)	332.80 (61.58)	401.80 (25.37)	327.49 (25.00)	
Osmotically active solutes (mOsm/g DW)	1.77 (0.12)	2.20 (0.12)	2.44 (0.04)	1.84 (0.09)	1.86 (0.03)	
Proline ($\mu\text{mol/g DW}$)	0.64 (0.20)	1.39 (0.06)	4.74 (0.53)	0.78 (0.20)	0.72 (0.13)	

Table 3. Malondialdehyde (MDA), osmotically active solutes, and proline contents in watered (Pw) and stressed (Pst) plants at the beginning of the experiment (T_0), 15 days after withholding irrigation (Tmax) and 15 days after resumption of the irrigation (Trec).

Determination of osmotically active solutes and proline content

In this study, osmotically active solutes and proline content were analyzed in the cambial region of water-stressed (Pst) control (Pw) plants at Tmax of ‘Dvina’ and ‘I-214’ clones. In concomitance to the decrease in predawn leaf water potential and stem water content, the concentration of osmotically active solutes showed a significant increase in Pst plants, without significant differences between clones. Free-proline increased significantly in (Pst) plants respect to control (Pw) plants at T max, fivefold in ‘Dvina’, and more than tenfold in ‘I-214’, (Table 3; Table 5, Figure 1).

Figure 1. Responses to treatments of MDA, Proline and *MT3b*. Fitted values refer to quadratic functions.



Transcription level of genes involved in stress defence

The expression level of eight genes coding for proteins (SOD, CAT, APX, GR and MT) involved in stress response was analysed in the cambial region of ‘Dvina’ and ‘I-214’ under water deficit conditions and after a period of re-watering (Table 4). The expression of the genes considered in the analysis did not varied significantly in watered plants (Pw) during the time of the experiment (T0, Tmax, Trec) indicating that the transcription rate was not affected by the development. Conversely, with the exception of *Cat3*, *CuZnSod* and *Gr*, differences were observed between the clones in transcript abundance of the genes. Water deficit induced significant changes in the expression level of the genes, and the intensity of variation was clone related. In particular, *Cat3* was strongly up-regulated by

	T0	Tmax		Trec	
	Control (Pw)	Control (Pw)	Stress (Pst)	Control (Pw)	Stress (Pst)
I-214					
<i>Cat1</i>	2.89 (0.42)	2.11 (0.35)	3.08 (0.38)	2.16 (0.47)	1.95 (0.52)
<i>Cat3</i>	4.08 (0.21)	3.98 (0.18)	69.49 (2.39)	2.60 (0.76)	1.89 (0.50)
<i>CuZnSod</i>	4.79 (0.62)	4.21 (1.04)	5.60 (0.43)	4.49 (0.67)	5.75 (0.26)
<i>MnSod</i>	2.26 (0.22)	1.30 (0.30)	2.04 (0.21)	1.93 (0.24)	2.44 (0.15)
<i>Gr</i>	2.98 (0.34)	2.95 (0.11)	3.66 (0.20)	2.72 (0.28)	2.37 (0.26)
<i>Apx</i>	3.89 (0.08)	4.30 (0.28)	5.61 (1.22)	4.45 (0.90)	5.94 (0.5)
<i>MT3a</i>	3.90 (0.25)	4.57 (0.09)	2.81 (0.38)	3.61 (0.09)	4.13 (1.05)
<i>MT3b</i>	3.58 (0.19)	2.67 (0.41)	2.74 (0.25)	4.19 (0.66)	4.90 (0.83)
DVINA					
<i>Cat1</i>	1.60 (0.22)	1.35 (0.14)	2.02 (0.44)	1.61 (0.50)	1.10 (0.10)
<i>Cat3</i>	4.48 (0.78)	2.99 (0.74)	65.83 (1.41)	3.04 (0.97)	5.29 (0.52)
<i>CuZnSod</i>	5.35 (0.56)	4.94 (0.64)	1.26 (0.23)	5.17 (1.70)	5.41 (1.08)
<i>MnSod</i>	3.95 (0.14)	3.61 (0.35)	1.53 (0.36)	3.39 (0.18)	2.33 (0.41)
<i>Gr</i>	2.61 (0.49)	2.50 (0.34)	1.32 (0.32)	3.11 (0.49)	3.33 (0.03)
<i>Apx</i>	1.20 (0.15)	1.21 (0.21)	1.65 (0.51)	2.89 (1.04)	1.41 (0.28)
<i>MT3a</i>	7.78 (0.70)	6.76 (0.52)	1.68 (0.68)	6.13 (0.27)	7.29 (0.27)
<i>MT3b</i>	1.88 (0.35)	1.78 (0.45)	9.99 (0.98)	1.46 (0.41)	2.39 (0.87)

Table 4. Relative expression of stress related genes in cambial region of clones ‘Dvina’ and ‘I-214’ obtained by RT-qPCR. Values are means of at least two biological replicates, SE into brackets. Expression values are normalized with qBase software against genes coding for *EF1*, *EIF4B* and *GaS*.

water shortage both in ‘Dvina’ and ‘I-214’, while a divergent response was observed for *Gr*, whose transcription significantly decreased in Dvina and slightly increased in I-214. In contrast, in ‘Dvina’ *MnSod*, *CuZnSod* and *MT3a*, resulted down-regulated, while a up-regulation of *MT3b* gene in response to withholding water was observed (Table 5, Figure 1). Re-hydration, with the exception of *MnSod*, resulted in a return to control levels for all the genes, evidencing the reversibility of the changes observed.

T	C	fitted model	<i>Cat1</i>	<i>Cat3</i>	<i>CuZn Sod</i>	<i>Mn Sod</i>	<i>MT 3a</i>	<i>MT 3b</i>	<i>Gr</i>	<i>Apx</i>	MDA	OAS	Proline
Control (Pw)	I-214	linear	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		quadratic	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	DVINA	linear	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		quadratic	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Stress (Pst)	I-214	linear	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.
		quadratic	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***	***
	DVINA	linear	n.s.	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		quadratic	n.s.	***	**	***	***	***	**	n.s.	n.s.	***	***

Table 5. Test of the hypotheses of no differences between average values within each treatment condition and clone (n.s. = not significant, ** = significant at $P \leq 0.001$, *** = significant at $P \leq 0.0001$, F test) by means of linear and quadratic models on time (T0, Tmax and Trec).

Discussion

Because of the central role that antioxidant systems plays in the defence against stress we focused our research on the transcriptional analysis of antioxidant enzymes and scavenging proteins, coupled with physiological parameters in the cambial region of two clones with different performances in response to water deficit. The aim was to highlight the relationships among molecular and physiological traits and the different response to water deficit of clones analysed.

The water deficit applied had strong impact on the plant water status without significant differences between clones at T_{max}. In fact, the SWC, RWC stem and leaf Ψ_{pd} values showed that the water status in the continuum soil-plant-atmosphere did not vary between clones at T_{max} and these data confirmed that clones were subjected to the same water stress intensity. Severe water deficit induced a strong water loss from the stem as showed by the high MDS values and this condition led to some physiological and biochemical changes in the cambial region and differentiating phloem.

MDS represents the more sensitive parameter to define the stem water status in woody plants (Zweifel et al. 2000). In a previous analysis under mild water deficit condition, 'Dvina' showed a longer growth ability and better leaf and stem water status than 'I-214' (Giovannelli et al. 2007). In this study in order to maintain both clones in a comparable growth and water status a severe, even if reversible, water deficit was imposed; such condition can account for the comparable response to stress performed by the clones. Water deficit resulted in a significant enhancement of lipid peroxidation in the cambial zone of 'I-214' as assessed by the analysis of MDA contents. Damage at membrane level is generally observed in tissues of plants subjected to water stress, reflecting impairments in the equilibrium between ROS production and scavenging by the antioxidant system. However a low increase in MDA content in response to water deficit was found in leaves

of *P. euphratica* e *P. cathayana* subjected to prolonged water depletion (Bogeat-Triboulot, et al. 2007; Xiao et al. 2008), demonstrating that plant adaptation to drought probably involved the activation of enzymes capable to protect lipids from peroxidation. The results suggested that defence strategies carried out by 'Dvina' and 'I-214' to protect cambium cells from ROS or to avoid ROS increase, were not equally effective. Interestingly 'Dvina' plants displayed a MDA level lower than 'I-214' independently for soil water availability. In many plant species genotypes with a low lipid peroxidation level in normal irrigation regime showed higher tolerance to the toxic effect of ROS when subjected to water deficit (Sairam et al. 1998; Malenčić et al. 2003; Koca et al. 2006). On the basis of data obtained we could hypothesize that 'Dvina' had a membrane system more suitable to face lipid peroxidation induced by ROS so that contributing to its adaptation to water deficit.

A significant increase of the concentration of osmotically active solutes in the cambial region of stressed plants showed that active osmotic adjustment took place within this zone in response to water loss, without differences between 'Dvina' and 'I-214'. Free proline significantly increased in both clones under water deficit. On the basis of these results we can postulate that the increase in the concentration of osmotic active solutes within the cambial region was mainly due to the increase of proline content. The active osmotic adjustment is a typical adaptive response of plants to drought (Tschaplinsky et al.1994). Our results are not in agreement with those obtained by Arend et al. (2007) in which a decrease of the concentration of active osmotics in the cambial zone of poplar in response to the decrease in predawn leaf water potential. Moreover previous studies on leaves of *P. deltoides* indicated that a small osmotic adjustment occurred under water-deficit conditions (Tschaplinsky and Tuskan 1994; Gebre et al. 1998) and that dehydration rearrangement, such as stomatal control and adjustment of tissue elastic properties, may be the main drought tolerance mechanism of this poplar specie (Kramer 1983; White et al. 1996). Our

data on cambial region suggested a different scenario; in fact, active osmotic adjustments have been found as part of the mechanisms of water deficit response. This study also evidenced that 'I-214' under water deficit accumulated proline much more than 'Dvina'. In previous works performed on poplar (Ren et al. 2007) and other species (Sundaresan & Sudhakaran 1995; Ain-Lhout et al. 2001; Peuke et al. 2002; Rampino et al. 2006) the proline content was observed to raise strongly in the sensitive genotypes, while in the resistant ones the increase was lower or delayed. The difference in proline accumulation observed in this study may reflect the different strategies carried out by 'Dvina' and 'I-214' to achieve adaptation to water deficit. Proline accumulation in the cambial region appears as the most prominent reaction to stress of 'I-214' clone.

Transcript analysis of genes involved in stress response was performed to evidence in the clones a different expression, if any, in response water deficit. The choice of genes was driven by the results previously obtained by a microarray analysis of cambial transcriptome of white poplar in response to water deficit (Berta et al. 2010). In general we observed a deep influence of genotype on the level of gene expression independently of treatments. Transcript levels of *Cat1* and *Apx* resulted higher in 'I-214' than in 'Dvina', the contrary the expression of *MnSod* and *MT3a* was observed lower. At Tmax a five-fold up-regulation of *MT3b* in stressed plants of 'Dvina' if compared with irrigated plants was observed. On the contrary, the expression level of this gene did not change in 'I-214'. *MT3a* transcription, on the other hand, decreased in Pst plants of both clones and in a significant way in 'Dvina'. MTs belong to a small multigene family consisting of different genes, in poplar they are both constitutively expressed and respond differentially to environmental stimuli (Kholer et al. 2004); our data are in agreement with that findings. Besides their role in heavy metal detoxification, they probably contribute to cell homeostasis in response to water deficit in poplar roots and leaves (Plomion et al. 2006; Brosché et al. 2005; Bogeat-

Triboulot et al. 2007). Recently the increase of MT type 3 transcripts was observed also in the cambial region of *P. alba* under water deficit (Berta et al. 2009; Berta et al. 2010). Although the exact role of MT-encoding genes in the defence against water deficit is still not clarified, their involvement in redox homeostasis of plant cells has been recently suggested (Xue et al. 2009; Akashi et al. 2004; Samardžić et al. 2010). The up-regulation of *MT3b* induced by the stress in ‘Dvina’, and not observed in ‘I-214’, suggest for this gene exert a key role in the protection from water deficit of this clone. *Cat3* was the only gene strongly up-regulated by water deficit in both clones confirming the strong tissue specificity of this isoform and its important role in the ROS control.

The other genes involved in stress response did not change their expression level under drought in ‘I-214’, whereas in ‘Dvina’ they appeared down-regulated (*CuZnSod*, *MnSod* and *MT3a*) or not regulated (*Cat1*, *Apx*). Finally, the analysis of Pw and Pst plants at Trec revealed that the transcriptional changes observed under stress were fully reversible.

Stress tolerance is generally related to control of oxidant levels in tissues through the coordinate expression of antioxidant genes and/or a higher activity of their enzymes (Tsugane et al. 1999; Cheeseman 2007). Our data are in agreement with those obtained by other authors on sensitive and tolerant poplar genotypes subjected to long-lasting drought periods showing that adaptation to water deficit involved the regulation of few and specific isoforms of stress defence genes (Berta et al. 2006; Plomion et al. 2006; Bogeat-Triboulot et al. 2007; Xiao et al. 2009; Berta et al. 2010).

The data obtained evidenced strong differences between the clones in transcription rates of genes related to ROS detoxification highlighting the genetic control of molecular plasticity in drought response. Though so far no transcription studies at cambial region level were performed on poplar clones with a different response to water stress, a study performed on leaf proteome of *Populus x euramericana* genotypes underlined differences among

genotypes in a number of proteins involved in protection of oxidative damages (Bonhomme et al. 2009). The data obtained in this study suggest that the two clones faced oxidative stress in cambial region exploiting different metabolic tools.

Conclusions

The responses to water deficit within the cambial region of 'Dvina' and 'I-214' were investigated through the analysis of physiological and biochemical parameters and the transcription analysis of a set of antioxidant and MT genes. The results evidenced that, the clones under severe water deficit carried out different strategies to protect cambial region cells from oxidative stress. 'I-214' accumulated more free-proline than 'Dvina' suggesting for this amino acid a key role in the drought response of the clone. On the other hand, the transcript analysis of antioxidant and MT genes evidenced a different ability of the two clones to modulate antioxidant genes under stress. In particular MT3b was strongly up-regulated by water deficit in 'Dvina' thus suggesting an important role in the maintenance of cellular redox homeostasis of the clone. In contrast I-214' appeared to face water stress mainly by means of proline accumulation and osmotic adjustment, however this action resulted less effective as evidenced by the enhancement of lipid peroxidation. On the whole, genetic background appears to affect strongly the drought responses highlighting the genetic control of molecular plasticity in drought response.

Acknowledgments: This work was supported by the Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (MIUR) program PRIN (to A.C.) and by ENTE Cassa di Risparmio di Firenze (contract n° 2007.0799 to A.G.). G.P. gratefully acknowledges Dr Adelaide Turchi for helpful suggestions and her contribution to the work.

Capitolo 2

Effetto del deficit idrico sull'espressione dei geni coinvolti nel metabolismo dei carboidrati nella regione cambiale di due cloni di pioppo con una diversa risposta alla siccità

Introduzione

Il pioppo (*Populus sp.*) è di primaria importanza economica per la produzione di legno nelle regioni temperate del mondo. Lunghi periodi di siccità limitano fortemente la crescita radiale delle piante, riducendo la produttività delle piantagioni di pioppo e la qualità del legno (Giovannelli et al. 2007). Sebbene le piante di pioppo siano note per essere particolarmente sensibili alla siccità (Tschaplinski et al. 1994), la loro tolleranza varia fortemente in base alla specie, alla popolazione e al clone considerato, a causa della grande variabilità genetica tipica del genere *Populus* (Zhang et al. 2004; Monclus et al. 2006). Il confronto tra genotipi che manifestano una diversa risposta alla siccità potrebbe aiutare a comprendere i meccanismi adattativi delle piante di pioppo ed essere utile per le strategie di *breeding* che hanno la finalità di abbinare elevata produttività e tolleranza alla siccità. Finora gli studi condotti a livello biochimico e molecolare su diversi genotipi di pioppo si sono concentrati principalmente su radici e foglie, mentre le risposte al deficit idrico nella zona cambiale hanno ricevuto scarsa attenzione, con poche eccezioni (Berta et al. 2006; Berta et al. 2009; Berta et al. 2010). Il cambio vascolare è un meristema secondario, che gioca un ruolo importante nella crescita radiale dei fusti e delle radici delle gimnosperme e delle angiosperme, producendo floema secondario verso l'esterno e xilema secondario, o legno, verso l'interno. La carenza idrica influenza fortemente l'attività cambiale e, di conseguenza, il processo di sviluppo del legno (Abe et al. 2003; Corcuera et al. 2004; Arend and Fromm 2007). Nonostante l'importanza del cambio per la produttività delle colture, le nostre conoscenze sugli effetti della siccità in questo tessuto sono ancora marginali e necessitano di essere approfondite.

Le piante arboree assimilano il carbonio nel clorenchima (tessuto *source*), situato nelle foglie e nella giovane corteccia (Kozlowski 1992). Successivamente esso viene trasferito ai tessuti *sink* attraverso il floema sotto forma di saccarosio, per essere utilizzato come fonte

di energia e scheletro per la costruzione di nuove molecole durante la crescita (Konishi et al. 2004). Le proteine coinvolte nel trasporto e nel metabolismo del saccarosio nei tessuti non fotosintetici influenzano fortemente la forza del *sink* stesso, in seguito alla modulazione dei livelli di saccarosio nelle cellule, richiamando una maggiore o minore quantità di fotosintati dalle foglie. Lo scarico del saccarosio dal floema alle cellule dei *sink* avviene attraverso trasportatori degli zuccheri localizzati sulla membrana plasmatica dei vasi floematici. Sono state identificate due famiglie distinte di trasportatori: i trasportatori di disaccaridi, che permettono principalmente il trasporto attivo del saccarosio (SUC) e i trasportatori di monosaccaridi (MST) che permettono il trasporto di un'ampia varietà di monosaccaridi, derivanti dall'idrolisi del saccarosio, catalizzata dalle invertasi associate alla membrana plasmatica (Sturm and Chrispeels 1990; Weber et al. 1995). Nelle cellule dei tessuti *sink*, due enzimi chiave agiscono nella catalisi del metabolismo del saccarosio, la saccarosio sintasi (SuSy) e l'UDP-glucosio pirifosforilasi (UGPasi), liberando i precursori per la produzione dei carboidrati strutturali e di riserva (Kleczkowsky et al. 2004; Coleman et al. 2009). L'attività dei due enzimi è strettamente legata a quella dei complessi della cellulosa sintasi (CES) e di altri enzimi coinvolti nella biosintesi dei carboidrati della parete cellulare, come la callosio sintasi (CALS) (Hertzberg et al. 2001; Koch, 2004). Una parte del carbonio è invece immagazzinata sotto forma di amido nei tessuti di riserva, per poter essere utilizzata come riserva stagionale e di emergenza. Geni chiave della biosintesi dell'amido sono l'ADP-glucosio pirofosforilasi (AGPasi) (Kleczkowsky et al. 1991) e l'amido sintasi (SS) (James et al. 2003), mentre nel processo di degradazione è coinvolta la β -amilasi (BAM) (Smith and Stitt 2007).

Le risposte adattative delle piante al deficit idrico includono cambiamenti morfologici, fisiologici, biochimici e molecolari (Kozłowski and Pallardy 2002, Yin et al. 2005, Zhang et al. 2005). Un ruolo di primaria importanza è svolto dalla capacità della pianta di regolare

il metabolismo dei carboidrati, non solo nei tessuti fotosintetici, ma anche nei tessuti che in condizioni normali li ricevono per utilizzarli nella crescita o per immagazzinarli. Nei tessuti di pioppo un aumento della concentrazione di sostanze osmoticamente attive, tra cui gli zuccheri solubili, permette la protezione delle cellule dalla disidratazione (Marron et al. 2002; Lei et al. 2006; Regier et al. 2009). Sebbene il deficit idrico determini un minor tasso di assimilazione del carbonio, la concentrazione degli zuccheri solubili nelle foglie viene mantenuta tramite un drastico declino dell'amido presente nei cloroplasti (Quick et al. 1992; Arndt et al. 2001; Li and Li 2005). Meno chiari sono gli effetti della siccità sul metabolismo dei carboidrati nelle cellule dei tessuti *sink*. Uno studio recente condotto sulle radici di *P. nigra* ha evidenziato che genotipi con un diverso grado di sensibilità al deficit idrico regolano in modo diverso il livello degli zuccheri solubili e del contenuto di amido (Regier et al. 2009). Nonostante l'importanza del cambio nel processo di sviluppo del legno, e di conseguenza nella produttività dei cloni di pioppo, poco noti sono ancora gli effetti del deficit idrico sia sulla distribuzione del carbonio in questo tessuto, sia sulla regolazione dei geni chiave coinvolti in questo processo.

I due cloni 'Dvina' (*Populus deltoides*) e 'I-214' (*Populus x canadensis*) sono caratterizzati da un diverso tasso di crescita e di produzione del legno sia in condizioni normali che in presenza di deficit idrico (Giovannelli et al. 2007; Deslauriers et al. 2009). L'analisi della zona cambiale ha inoltre evidenziato diverse strategie di protezione di questo tessuto messe in atto dai due cloni, che coinvolgono sia un diverso grado di accumulo di sostanze osmoticamente attive, che una diversa modulazione dei geni antiossidanti (Capitolo 1). In questo studio abbiamo confrontato la risposta al deficit idrico dei due cloni 'Dvina' e 'I-214' nella zona cambiale, ipotizzando che in presenza di questo stress ambientale i due cloni regolino in modo diverso la distribuzione del carbonio in zuccheri solubili e amido e l'espressione di geni chiave coinvolti nel trasporto e nel

metabolismo dei carboidrati. Per verificare questa ipotesi abbiamo analizzato l'effetto di un periodo di deficit idrico di due settimane sulla zona cambiale dei due genotipi. In particolare, l'analisi si è articolata nei seguenti punti: i) analisi del livello degli zuccheri solubili; ii) analisi del contenuto di amido; iii) analisi dell'espressione di geni codificanti per enzimi coinvolti nel trasporto e nel metabolismo del saccarosio, della cellulosa, del callosio e dell'amido.

Materiali e metodi

Materiale vegetale e disegno sperimentale

Per la realizzazione del presente studio sono stati utilizzati due cloni di pioppo, 'Dvina' (*Populus deltoides*) e 'I-214' (*Populus x canadensis* Moench), ottenuti presso l'Unità di Ricerca per le Produzioni Legnose Fuori Foresta di Casale Monferrato (AL). All'inizio di giugno 2009, 32 piante di due anni di ciascun clone sono state selezionate per uniformità di dimensioni (altezza media 144.6 ± 12.3 cm per 'I-214' e 133.5 ± 10.5 cm per 'Dvina', diametro medio del fusto a $\frac{1}{4}$ dell'altezza dello fusto, 17.1 ± 0.6 mm per 'I-214' e 16 ± 1.1 mm per 'Dvina', area fogliare totale media per pianta 77.36 ± 3.8 dm² per 'I-214' e 72.2 ± 3.2 dm² per 'Dvina'). Per ciascun clone, le piante sono state suddivise in due gruppi omogenei di 16 piante ciascuno. Dal 3 giugno 2009 (T0) le piante sono state sottoposte a due diversi regimi di irrigazione per 30 giorni. Nelle piante irrigate "Pw" il contenuto idrico del suolo (SWC) è stato mantenuto alla capacità di campo (28-30%), mentre nelle piante sottoposte a stress "Pst" l'irrigazione è stata sospesa per 15 giorni (Tmax) e successivamente ripristinata fino al trentesimo giorno (Trec). Durante l'esperimento le piante sono state coltivate in un vivaio all'aria aperta. Per evitare la reidratazione del suolo dovuta alle precipitazioni atmosferiche, i vasi delle piante Pst sono stati ricoperti con coperture in plastica idrofobica. Durante l'esperimento la temperatura media è risultata compresa tra 16 e 26°C con un valore massimo di 34°C registrato a metà (15.00 p.m.) del giorno 20 (temperatura dell'aria registrata al LAMMA, Laboratorio di Monitoraggio e Modellistica ambientale per lo sviluppo sostenibile, Firenze, <http://www.lamma.rete.toscana.it/eng/index.html>). La media giornaliera del deficit di pressione di vapore è risultata compresa tra 0.6 e 2 KPa, mentre la radiazione globale giornaliera è risultata compresa tra 13 and 30 MJ/mq.

Relazioni idriche suolo-pianta e misura dell'accrescimento

Il potenziale idrico fogliare di base (leaf Ψ_{pd} , MPa) è stato misurato con una camera a pressione (PMS Instruments Co., Corvallis) su due o tre foglie completamente espanse (indice di plastocrone tra 5 and 7) prelevate da fusti selezionati casualmente. Nei giorni 0, 15 e 30 dell'esperimento quattro piante per ciascun clone e trattamento sono state utilizzate per determinare il contenuto idrico del fusto (stem WC), calcolato seguendo la procedura descritta da Deslauriers et al. (2009). Il fusto è stato suddiviso in sezioni della lunghezza di 10 cm, pesate immediatamente entro 15 minuti dalla raccolta per determinare la massa fresca (g). Il volume fresco dei campioni (cm^3) è stato misurato tramite il principio di Archimede (Borghetti et al. 1991). La massa secca (g) è stata misurata dopo che i campioni sono stati essiccati per 96 h a 72°C. Il contenuto idrico relativo del fusto (stem RWC) è stato calcolato come descritto da Domec and Gartner (2001):

$$\text{stem RWC} = (\text{Mf} - \text{Md}) / (\text{Vf} - \text{Vs}) \times 100$$

dove Mf e Md sono rispettivamente la massa fresca e secca del legno (g) e Vf e Vs sono rispettivamente i volumi di materiale fresco e secco (cm^3). Vs è stato misurato dividendo Md per 1.53, assumendo una densità di 1.53 g cm^{-3} per il materiale di parete cellulare secco (Skaar 1998). Il contenuto idrico del suolo (SWC) è stato misurato ogni due giorni all'interno di ciascuna replica nelle piante Pw e Pst tramite sonde Hydro-sense (Campbell scientific Inc., USA), basate su riflettometria nel dominio temporale (TDR). La crescita radiale del fusto è stata determinata tramite dendrometri a puntale ad acquisizione automatica, come riportato da Giovannelli et al. (2007). I dati grezzi sono stati registrati ogni 15 minuti ed ogni ora sono state calcolate le medie. L'estrazione del restringimento massimo giornaliero. Il calcolo del ritiro massimo giornaliero (MDS) e dell'incremento giornaliero del fusto (stem increment, ΔR) è stato effettuato dividendo il ciclo in tre fasi distinte (Downes et al. 1999; Deslauriers et al. 2003) e identificando (i) fase di espansione,

periodo totale dal minimo del mattino al massimo del mattino seguente; (ii) fase di incremento del raggio, parte della fase di espansione dal momento in cui il raggio del fusto supera il massimo del mattino fino al massimo del mattino successivo; (iii) fase di contrazione o MDS, periodo tra massimo del mattino e minimo del pomeriggio.

Isolamento della zona cambiale

La regione cambiale è stata isolata seguendo la procedura utilizzata da Berta et al. (2010). Lo fusto di ciascuna pianta è stato tagliato al livello del colletto e suddiviso in sezioni di 10-15 cm in lunghezza. Le sezioni sono state immediatamente immerse in azoto liquido e liofilizzate sotto vuoto (0.15 mbar o meno) ad una temperatura costante di -50°C per facilitare la separazione della corteccia dallo xilema maturo. La zona cambiale con il floema in differenziamento è stata recuperata grattando con un rasoio il lato interno della corteccia. Per ciascun campione sono stati raccolti da 200 a 500 mg di polvere essiccata. L'analisi è stata condotta sulla sezione più vicina al colletto della pianta.

Determinazione degli zuccheri solubili totali e dell'amido

Gli zuccheri solubili totali sono stati estratti dalla regione cambiale seguendo la procedura proposta da Giovannelli et al. (2010). Quaranta mg di polvere di cambio sono stati estratti rispettivamente tre volte in 5 ml di ETOH all'80%, portando successivamente il pH della miscela a 7.0. Dopo la centrifugazione a 10000 g per 5 min, tutte le soluzioni estratte sono state mescolate tra loro fino ad un volume finale di 15 ml. Un'aliquota di 75 µl di campione è stata addizionata con 425 µl di acqua distillata e, dopo l'aggiunta di 2.5 ml di una soluzione acida di antrone solforico, la concentrazione degli zuccheri solubili è stata misurata mediante spettrofotometro a 625 nm.

L'amido è stato misurato in accordo con Gucci et al. (1991). Quaranta mg di polvere di cambio sono stati estratti in 5 ml di ETOH all'80%, portando successivamente il pH della miscela a 7.0. Dopo la centrifugazione a 10000 g per 5 min, il pellet ottenuto è stato

incubato a 55°C per 16 h con l'amiloglucosidasi (Fluka). Successivamente i campioni sono stati diluiti con acqua distillata a 5 ml e tre aliquote da 0.25 ml di ogni campione sono state saggiate con metodo colorimetrico usando la glucosio ossidasi (Sigma). L'assorbanza è stata letta a 440 nm.

Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA a singolo filamento

L'RNA totale è stato estratto da 100 mg di regione cambiale in accordo con il protocollo di estrazione di Kolosova et al. (2004), trattato con DNasi (Rnase-Free Dnase Set, Qiagen) e purificato mediante colonnine di silice (RNase Clean-up kit, Qiagen). La concentrazione dell'RNA è stata misurata tramite spettrofotometro (Gene Quant Pro, Amersham Biosciences) e la qualità è stata verificata tramite visualizzazione su gel di agarosio colorato con etidio bromuro. La sintesi del cDNA a singolo filamento è stata effettuata a partire da 5 µg di RNA totale usando la trascrittasi inversa (Superscript II reverse transcriptase, Invitrogen) e innescando la reazione con oligo(dT). La qualità del cDNA a singolo filamento e l'assenza di DNA genomico nei campioni è stata verificata tramite PCR usando i primer per il gene della subunità β del fattore di elongazione eucariotico (*Ef1*) (Tabella 1).

Disegno dei primer e real-time qPCR (RT-qPCR)

I geni coinvolti nel metabolismo dei carboidrati (CAZyme) analizzati in questo studio sono stati selezionati sulla base di informazioni ottenute precedentemente in altri lavori sul pioppo (Grunze et al. 2004; Geisler-Lee et al. 2006; Coleman et al. 2009; Regier et al. 2009; Berta et al. 2010). Le sequenze dei primer utilizzate per la RT-qPCR sono elencate in Tabella 1. Le coppie di primer necessarie per l'amplificazione dei geni *Bam1*, *Ugp* e *Suc2* sono state disegnate usando il software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>; Rozen and Skaletzki 2000), ottenendo le sequenze dal database di *Populus trichocarpa* v1.1 (http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html; Tuskan et al. 2006). Per

L'amplificazione di tutti gli altri geni sono state utilizzate coppie di primer precedentemente pubblicate, i cui riferimenti bibliografici sono riportati in Tabella 1.

I campioni di cDNA ottenuti dalla retrotrascrizione sono stati diluiti fino ad un volume finale di 100 μ l e 1 μ l è stato utilizzato per ciascuna analisi di RT-qPCR in una reazione di 15 μ l di volume totale. Le reazioni sono state effettuate usando l'iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) e lo strumento iCycler iQ Real Time PCR System (Bio-Rad). Le reazioni di PCR sono state effettuate seguendo il seguente protocollo: 2 min a 95 °C, 40 cicli di 30 s a 95 °C, 20 s a 60 °C e 20 s a 72 °C. Un campione di cDNA diluito 1/5, 1/25, 1/125, 1/625 e 1/3125 è stato utilizzato come standard per calcolare l'efficienza di amplificazione per ciascun primer. L'analisi della curva di denaturazione ha confermato la specificità dell'amplificazione. I valori grezzi dei cicli soglia (C_t) sono stati normalizzati relativamente al gene di riferimento interno codificante per la subunità β del fattore di elongazione eucariotico (*Ef1*) utilizzando il software *Q-gene* (Muller et al. 2002).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il software STATA 9 (STATA Corp, College Station) sottoponendo i dati all'analisi della varianza (ANOVA) per verificare l'effetto del regime idrico, del clone e della loro interazione sul livello di espressione dei geni coinvolti nel metabolismo dei carboidrati nella regione cambiale delle piante di 'Dvina' e 'I-214' campionate al T_{max} , sottoposte a deficit idrico (Pst) e irrigate normalmente (Pw). L'ANOVA è stata inoltre utilizzata per verificare l'effetto del giorno di campionamento, del clone e della loro interazione sul livello di espressione dei geni nelle piante sottoposte alla condizione di controllo Pw. Il test statistico è stato considerato significativo per $P \leq 0.05$.

Nome del gene	Funzione	Codice del gene	Sequenza dei primer	Riferimenti bibliografici
Trasporto del saccarosio				
<i>Mst3.1</i>	Trasportatore di monosaccaridi	fgenes4_pg.C_LG_II000886	F: GCCAAAGCATAACTGTTCGC R: AATCCAACCAGCATAGAATAGG	Grunze et al. 2004
<i>Suc2</i>	Trasportatore del saccarosio	GW1.XIX.2155.1	F: CTTTCATTTGGCTCTGTGGG R: GGCAATGGTGACGAAAGC	
Metabolismo del saccarosio				
<i>Susy</i>	Saccarosio sintasi	estExt_fgenes4_pg.C_280066	F: ACCAGCACATTCCAAGAGATTGCT R: TGTAGAGGCCAGGGAGAGTGAAAG	Coleman et al. 2009
<i>Ugp</i>	UDP-glucosio pirofosforilasi	eugene3.11070001	F: ATGCCTTGTTTCACTGACCA R: GTGCTTTCGATCTTCGCTCT	
Metabolismo della parete cellulare				
<i>Cals</i>	Callosio sintasi	gw.1.I6689.1	F: TTGAGGAGGCCTTGAAGATG R: GCTGGCCGAGAGTTACAAAG	Berta et al. 2010
<i>Ces</i>	Cellulosa sintasi	estExt_fgenes4_pg.C_LG_IX0979	F: TGTGGTGGATCACGAAAGAA R: TCCTCAACGCCCTCTTCTA	Berta et al. 2010
Metabolismo dell'amido				
<i>Agp</i>	ADP-glucosio pirofosforilasi	eugene3.00141188	F: TGAGGAGCACAATGTTTTGG R: TGCATCAGTTTCCCTGTGAG	Regier et al. 2009
<i>Bam1</i>	β -amilasi	grail3.0064001202	F: GTCAGGAAAATGCATGCTGA R: GATATCGTCAACCGGAATCG	
<i>SsII</i>	Amido sintasi	gw1.XVII.1126.1	F: GTGGACATTTGATGGTGCTG R: GGAGTCCCTCCCAACTTTTC	Regier et al. 2009
Gene di riferimento				
<i>Ef1</i>	Fattore di elongazione 1, subunità β	estExt_fgenes4_pg.C_LG_I1178	F: AAGCCATGGGATGATGAGAC R: ACTGGAGCCAATTTTGTATGC	Regier et al. 2009

Tabella 1. Primer utilizzati per la real-time qPCR.

Risultati

Il presente lavoro è stato svolto in collaborazione con il gruppo del Dott. Alessio Giovannelli dell'IVALSA (Istituto di Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree) del CNR di Firenze, che ha realizzato il monitoraggio dei parametri morfo-fisiologici delle piante, l'analisi degli zuccheri solubili e dell'amido.

Monitoraggio dei parametri morfo-fisiologici

Nel presente studio il deficit idrico è stato imposto per 15 giorni, seguito da un periodo di reidratazione di 15 giorni. Nella Tabella 2 sono riportati i valori ottenuti dall'analisi dei parametri morfo-fisiologici. La riduzione del contenuto idrico del suolo (80% in meno rispetto alla capacità di campo) ha influenzato significativamente lo stato delle foglie e del fusto e la crescita delle piante Pst. Tuttavia dopo 15 giorni dalla ripresa dell'irrigazione è stata osservata una completa ripresa della crescita della pianta e del fusto, dal momento che

Tabella 2. Potenziale idrico di base della foglia (Ψ_{pd}), contenuto idrico del suolo (SWC), contenuto idrico relative del fusto (RWCstem), variazione giornaliera radiale del fusto (ΔR), ritiro massimo giornaliero (Stem MDS) misurati all'inizio dell'esperimento (T_0), 15 giorni dopo la sospensione dell'irrigazione (T_{max}) e 15 giorni dopo la ripresa dell'irrigazione (T_{rec}). Medie di quattro repliche biologiche, SE tra parentesi.

	T0		Tmax		Trec	
	Control (Pw)	Control (Pw)	Stress (Pst)	§	Control (Pw)	Stress (Pst)
I-214						
Leaf Ψ_{pd} (MPa)	-0.28 (0.02)	-0.23 (0.02)	-1.45 (0.7)	**	-0.3 (0.04)	-0.25 (0.05)
SWC (%)	31.0	29.0	5.5	**	29.0	28.0
Stem RWC (%)	67.2	64.4	57.6	**	56.9	56.3
Stem ΔR (μm)	25.3 (1.7)	27.8 (1.1)	-24.6 (2)	**	20.2 (2.3)	21.7 (3.4)
Stem MDS (μm)	-5.4 (0.4)	-6.2 (1.3)	-48,2 (3.5)	**	-5.2 (2.5)	-9.7 (1.2)
DVINA						
Leaf Ψ_{pd} (MPa)	-0.40 (0.08)	-0.18 (0.02)	-1.36 (0.17)	**	-0.20 (0.03)	-0.30 (0.03)
SWC (%)	33.7	27.7	5.3	**	31.0	29.7
Stem RWC (%)	64.7	67.0	62.2	**	57.7	58.6
Stem ΔR (μm)	20.0 (1.3)	19.4 (3.8)	-26.5 (1.4)	**	16.3 (2.1)	18.8 (1.4)
Stem MDS (μm)	-5.5 (0.8)	-4.2 (0.9)	-50.0 (4.6)	**	-4.1 (0.1)	-5.1 (0.4)

§ La verifica dell'ipotesi dell'asserza di differenze tra i valori medi è stata effettuata al Tmax tra le piante Pw e le piante Pst. (** = $P \leq 0.001$)

lo stress somministrato non è stato sufficientemente forte da indurre un danno irreversibile. Dopo 15 giorni di deficit idrico (Tmax), il Ψ_{pd} della foglia delle piante trattate è sceso a valori sotto -1,5 MPa. La riduzione del Ψ_{pd} è associata con un significativo incremento nella perdita di acqua nel fusto (riduzione di RWC >10% nelle piante Pst rispetto alle piante Pw in entrambi i cloni), che ha causato un incremento nell'MDS del fusto (le piante Pst hanno mostrato un MDS 10 volte più elevato delle piante Pw) senza differenze significative tra i due cloni. Dopo la ripresa dell'irrigazione, l'SWC delle piante trattate è risultata pari alla capacità idrica di campo per 15 giorni. Al Trec le piante trattate hanno mostrato valori di Ψ_{pd} della foglia, RWC, ΔR e MDS simili tra loro, confermando un completo recupero dello stato idrico e della crescita delle piante.

Effetto dello stress idrico sulla concentrazione di zuccheri solubili totali e dell'amido

La concentrazione degli zuccheri solubili e dell'amido è stata analizzata nella zona cambiale delle piante di 'Dvina' e 'I-214' sottoposte alla condizione di controllo Pw e a quella di deficit idrico Pst. Lo stress idrico ha causato una riduzione nella concentrazione degli zuccheri solubili totali in entrambi i cloni, più marcata in 'Dvina' (-20%) e meno rilevante in 'I-214' (-9%) (Tabella 3; Figura 1a) e una riduzione media nel contenuto di amido in 'Dvina' pari al 71% (Tabella 3; Figura 1b).

	T0		Tmax		Trec	
	Control (Pw)	Control (Pw)	Stress (Pst)	Control (Pw)	Stress (Pst)	
I-214						
Zuccheri solubili (mg/g DW)	82.0 (18.2)	145.3 (5.1)	131.1 (9.3)	107.3 (9.1)	121.5 (35.8)	
Amido (mg/g DW)	5.4 (0.7)	9.5 (0.8)	10.0 (1.4)	11.7 (0.7)	9.0 (0.3)	
DVINA						
Zuccheri solubili (mg/g DW)	108.4 (11.6)	140.1 (1.7)	108.0 (9.3)	92.7 (15.9)	120.0 (34.7)	
Amido (mg/g DW)	7.9 (1.8)	8.6 (1.0)	3.4 (2.1)	12.9 (0.7)	12.2 (1.6)	

Tabella 3. Concentrazione degli zuccheri solubili e dell'amido nelle piante di 'Dvina' e 'I-214' irrigate (Pw) e sottoposte a stress idrico (Pst) all'inizio dell'esperimento (T₀), dopo 15 giorni di deficit idrico (Tmax) e dopo 15 giorni dalla ripresa dell'irrigazione (Trec) (Giovannelli et al., comunicazione personale). Medie di almeno due repliche biologiche. SE tra parentesi.

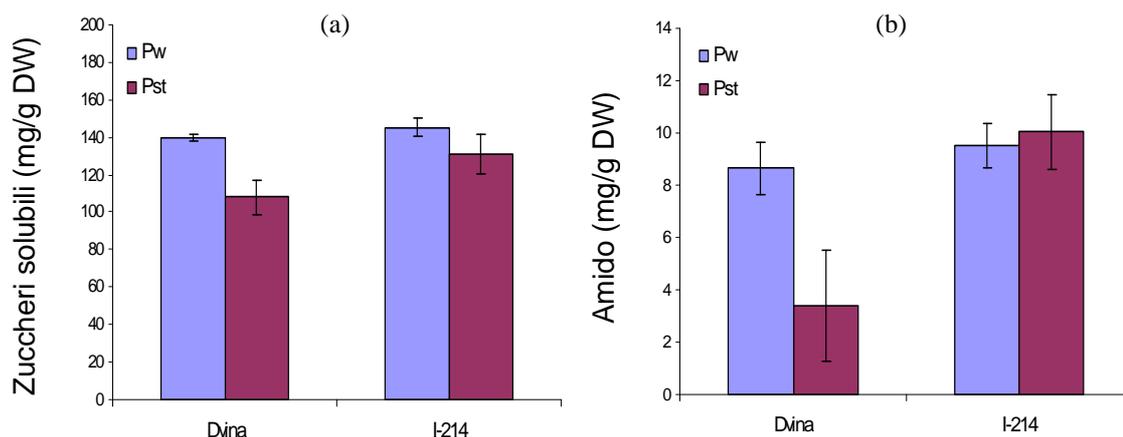


Figura 1 (a-b). Concentrazione degli zuccheri solubili nella zona cambiale di 'Dvina' e 'I-214' nelle piante di controllo Pw e nelle piante sottoposte a stress idrico Pst alla massima intensità di deficit idrico (Tmax) (Giovannelli et al., comunicazione personale). I valori sono medie di almeno due repliche biologiche \pm SE.

Livello di trascrizione dei geni coinvolti nel metabolismo dei carboidrati

I risultati relativi all'effetto del deficit idrico sul livello di espressione dei geni coinvolti nel metabolismo e nel trasporto dei carboidrati (saccarosio, cellulosa, callosio e amido) in 'Dvina' e 'I-214' sono riportati in Tabella 4. L'ANOVA effettuata per determinare l'effetto del regime idrico, del clone e della loro interazione è riportata in Tabella 5. In generale in 'Dvina' il deficit idrico ha avuto un effetto consistente sull'espressione dei geni analizzati, mentre in 'I-214' le variazioni hanno interessato un numero limitato di geni e, quando presenti, sono risultate di minore intensità (Figura 2a-i). Nelle piante di 'Dvina' i geni coinvolti nel trasporto del saccarosio alle cellule dei *sink* (*Mst3.1* e *Suc2*), nel catabolismo di questo disaccaride (*Susy* e *Ugp*) e nella sintesi della parete cellulare (*Cals* e *Ces*) sono stati regolati in modo fortemente negativo dalla carenza idrica (da 3 a 16 volte), mentre in 'I-214' il livello di espressione di tali geni è rimasto invariato o si è ridotto leggermente, con la sola eccezione di *Ugp* e *Ces* (Figura 2a-f). Inoltre in 'Dvina' la carenza idrica ha determinato un notevole aumento (32 volte) nel livello di espressione di *Bam1*, codificante per la β -amilasi e ha modificato l'espressione degli altri due geni coinvolti nel metabolismo dell'amido, riducendo l'abbondanza dei trascritti di *Agp* (7 volte) e

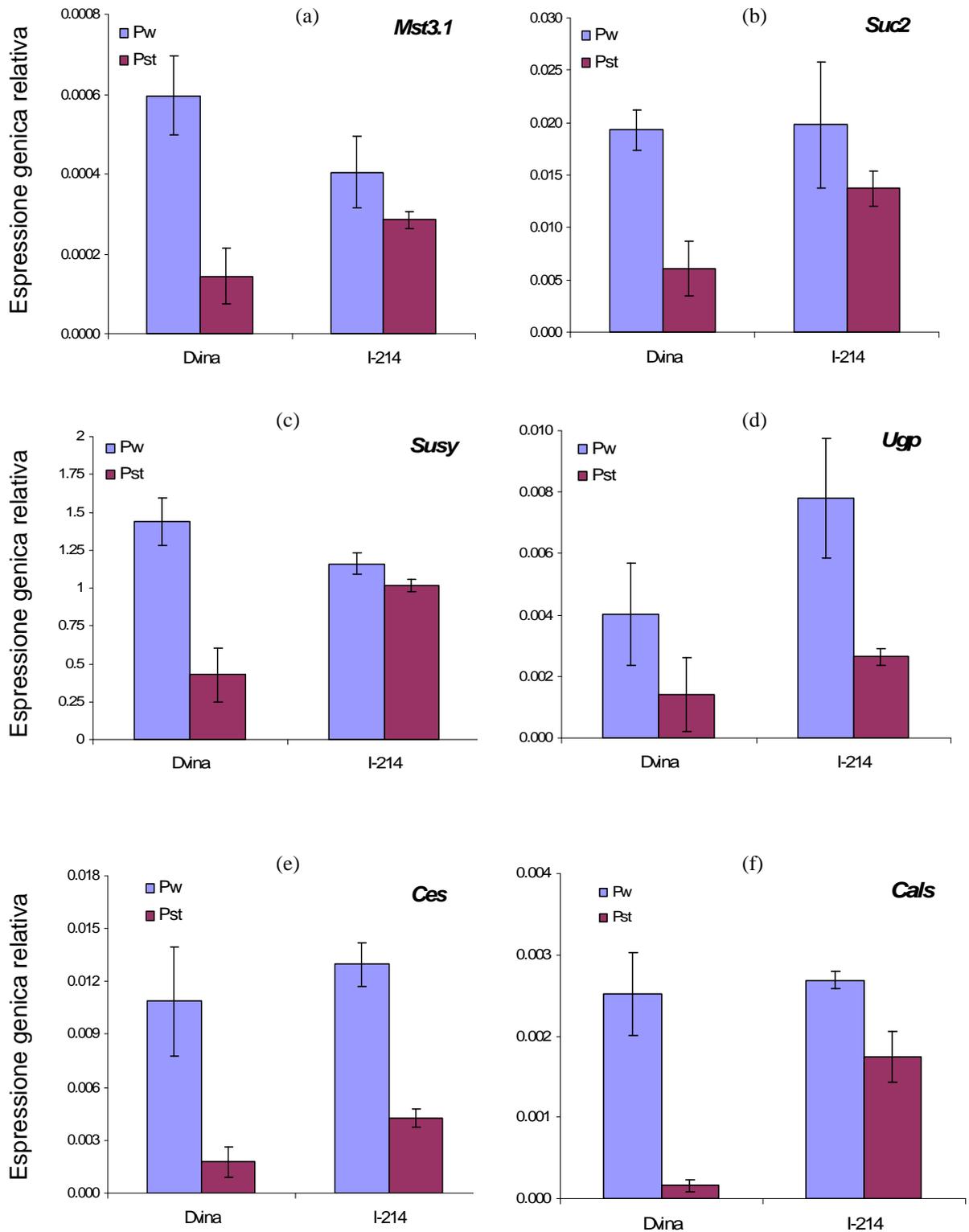
aumentando quella di *SsII* (3 volte) (Tabella 4; Figura 2g-i). Al contrario, in 'I-214' il trascritto di *BamI* non è stato rilevato nei campioni analizzati e l'espressione di *Agp* e *SsII* è stata scarsamente modificata dalla carenza idrica (Tabella 4; Figura 2g-i).

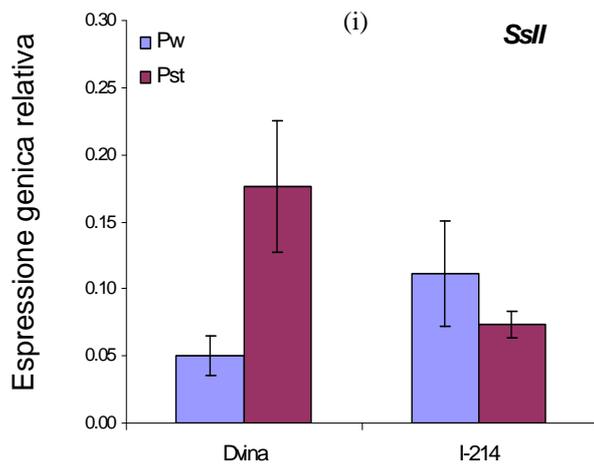
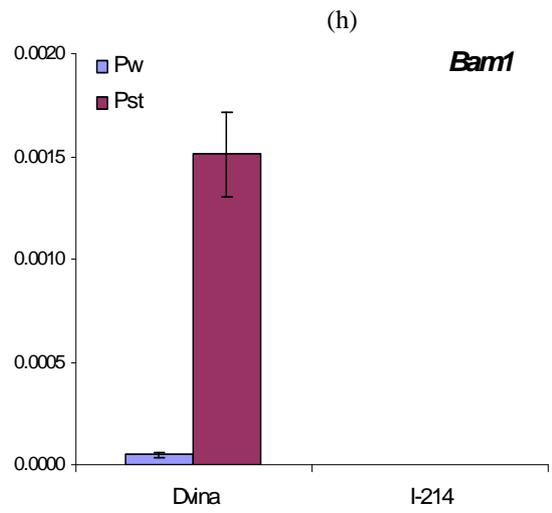
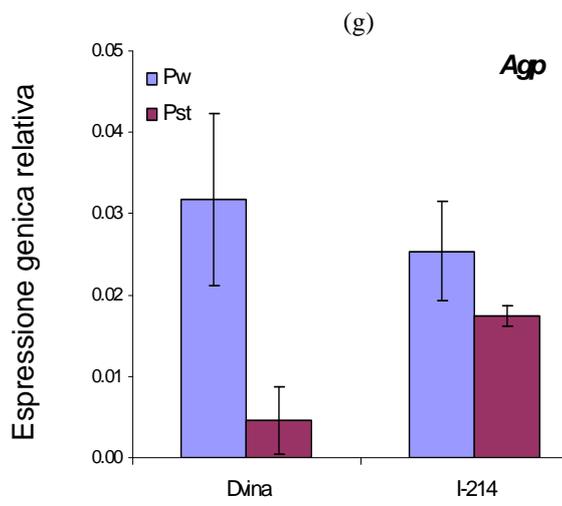
Nelle piante sottoposte alla condizione di controllo (Pw) l'ANOVA ha evidenziato il solo effetto del clone sul livello dei trascritti di *Mst3.1* e *Agp* (Tabella 6), infatti 'Dvina' ha mostrato in generale valori mediamente più elevati dei due trascritti nei tre giorni di campionamento (Figura 3a-b). Invece il clone e l'interazione tra clone e giorno di campionamento hanno avuto effetto su *Suc2* e *Ces* (Tabella 6), poiché i due geni hanno mostrato valori di espressione paragonabili al Tmax e al Trec nei due cloni, mentre il loro livello di espressione al T0 è risultato molto più basso in 'I-214' rispetto a 'Dvina' (Figura 3c-d). Inoltre è interessante notare che il livello dei trascritti di alcuni geni nelle piante di controllo Pw è stato influenzato dal giorno di campionamento e che l'effetto è stato diverso nei due cloni. Infatti in 'Dvina' *Mst3.1*, *Suc2* e *Ces* hanno mostrato valori di espressione generalmente decrescenti dal T0 al Trec, mentre in 'I-214' i tre geni e *Agp* hanno mostrato i valori più elevati al Tmax (Fig 3a-d).

Tabella 4. Espressione relativa dei geni coinvolti nel metabolismo dei carboidrati nella zona cambiale di 'Dvina' e 'I-214' analizzata tramite RT-qPCR nelle piante di controllo Pw e nelle piante sottoposte a stress idrico Pst all'inizio (T0), alla massima intensità di deficit idrico (Tmax) e dopo due settimane dalla ripresa dell'irrigazione (Trec). I valori sono medie di almeno due repliche biologiche, SE tra parentesi. I valori di espressione sono normalizzati rispetto al gene *Efl*. ND = non determinato.

	T0	Tmax		Trec	
	Pw	Pw	Pst	Pw	Pst
Clone Dvina					
<i>Mst3.1</i>	7.6E-04 (0.5E-04)	6.0E-04 (1.0E-04)	1.4E-04 (0.7E-04)	4.7E-04 (1.2E-04)	2.8E-04 (1.2E-04)
<i>Suc2</i>	2.8E-02 (0.2E-02)	1.9E-02 (0.2E-02)	0.6E-02 (0.3E-02)	1.3E-02 (0.1E-02)	2.3E-02 (0.7E-02)
<i>Susy</i>	1.4 (0.1)	1.4 (0.1)	0.4 (0.2)	1.1 (0.1)	0.9 (0.2)
<i>Ugp</i>	3.9E-03 (0.7E-03)	4.0E-03 (1.6E-03)	1.4E-03 (1.2E-03)	6.2E-03 (1.4E-03)	3.2E-03 (2.0E-03)
<i>Cals</i>	3.8E-03 (0.4E-03)	2.52E-03 (0.5E-03)	0.2E-03 (0.1E-03)	4.91E-03 (1.94E-03)	3.03E-03 (0.5E-03)
<i>Ces</i>	18.5E-03 (1.83E-03)	10.9E-03 (3.1E-03)	1.76E-03 (0.9E-03)	8.10E-03 (0.2E-03)	6.88E-03 (1.40E-03)
<i>Agp</i>	34.9E-03 (1.0E-03)	31.8E-03 (10.6E-03)	4.5E-03 (4.2E-03)	29.1E-03 (4.1E-03)	23.1E-03 (0.4E-03)
<i>SsII</i>	6.7E-02 82.4E-02)	5.0E-02 (1.5E-02)	17.6E-02 (4.9E-02)	12.1E-02 (3.8E-02)	5.6E-02 (2.1E-02)
<i>Bam1</i>	4.3E-05 (2.4E-05)	4.7E-05 (1.5E-05)	151.1E-05 (20.6E-05)	7.0E-05 (7.0E-05)	25.9E-05 (13.6E-05)
Clone I-214					
<i>Mst3.1</i>	1.7-04 (0.2E-04)	4.0E-04 (0.9E-04)	2.8E-04 (0.2E-04)	2.8E-04 (1.2E-04)	1.5E-04 (0.7E-04)
<i>Suc2</i>	0.6E-02 (0.2E-02)	2.0E-02 (0.6E-02)	1.4E-02 (0.2E-02)	0.7E-02 (0.4E-02)	1.2E-02 (0.4E-02)
<i>Susy</i>	1.1 (0.1)	1.2 (0.1)	1.0 (0.1)	1.2 (0.4)	0.8 (0.1)
<i>Ugp</i>	3.8E-03 (1.2E-03)	7.8E-03 (1.93E-03)	2.6E-03 (0.3E-03)	2.7E-03 (0.1E-03)	1.44E-03 (0.1E-03)
<i>Cals</i>	0.9E-03 (0.3E-03)	2.7E-03 (0.1E-03)	1.7E-03 (0.3E-03)	1.9E-03 (1.3E-03)	2.4E-03 (1.1E-03)
<i>Ces</i>	4.3E-03 (0.6E-03)	13.0E-03 (1.2E-03)	4.2E-03 (0.5E-03)	4.9E-03 (2.3E-03)	3.5E-03 (1.4E-03)
<i>Agp</i>	0.4E-02 (0.1E-02)	2.5E-02 (0.6E-02)	1.7E-02 (0.1E-02)	1.2E-02 (0.7E-02)	1.5E-02 (1.1E-02)
<i>SsII</i>	10.5E-02 (1.8E-02)	11.1E-02 (3.9E-02)	7.4E-02 (0.9E-02)	6.0E-02 (1.3E-02)	8.4E-02 (5.5E-02)
<i>Bam1</i>	ND	ND	ND	ND	ND

Figura 2 (a-h). Espressione relativa dei geni coinvolti nel metabolismo dei carboidrati nella zona cambiale di 'Dvina' e 'I-214' analizzata tramite RT-qPCR nelle piante di controllo Pw e nelle piante sottoposte a stress idrico Pst al Tmax. I valori sono medie di almeno due repliche biologiche \pm SE. I valori di espressione sono normalizzati rispetto al gene *Ef1*.





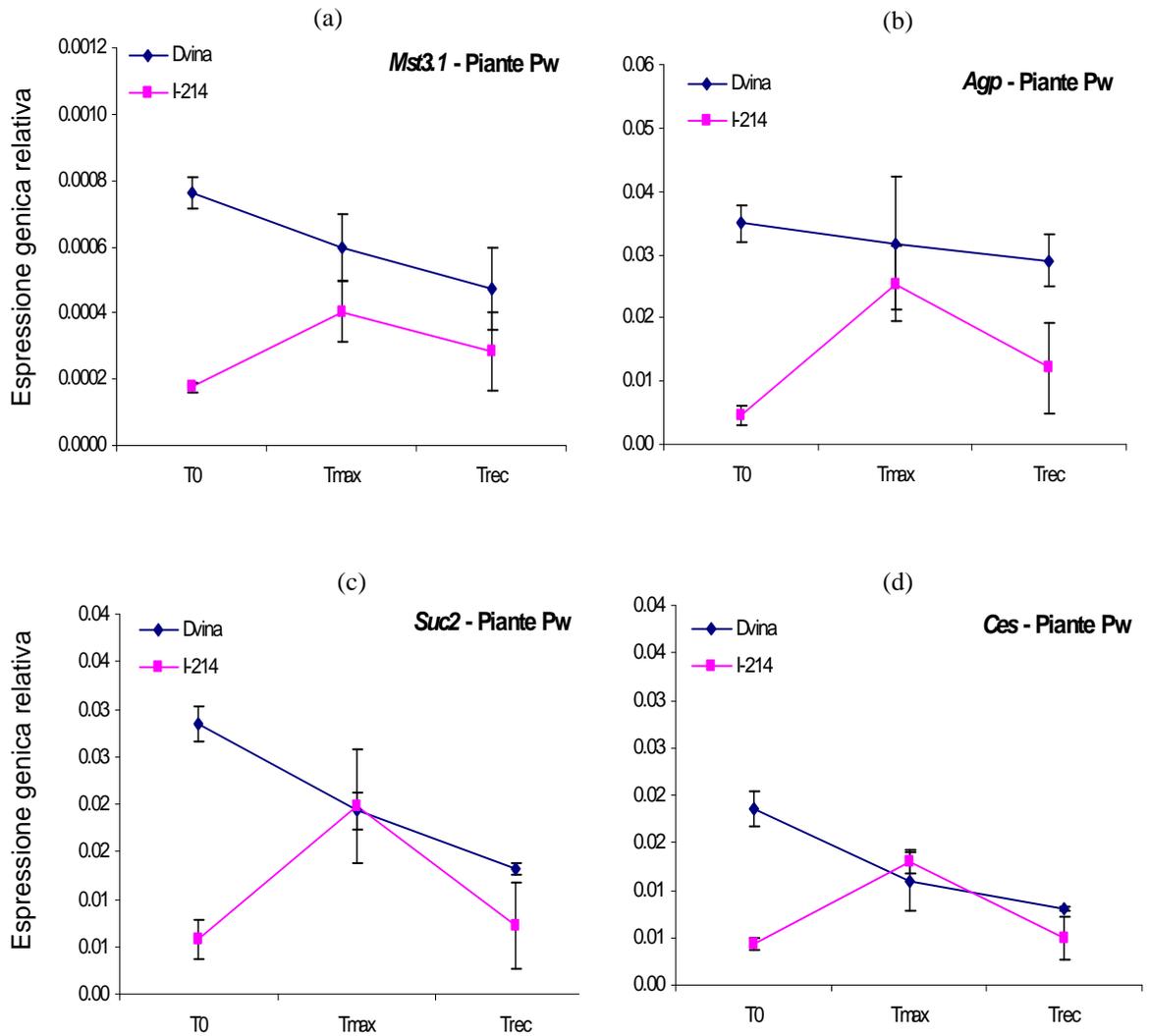


Figura 3 (a-d). Espressione relativa dei geni coinvolti nel metabolismo dei carboidrati nella zona cambiale di 'Dvina' e 'I-214' analizzata tramite RT-qPCR nelle piante di controllo Pw al T0, al Tmax e al Trec. I valori sono medie di almeno due repliche biologiche \pm SE. I valori di espressione sono normalizzati rispetto al gene *Efl*.

Tabella 5. Verifica dell'ipotesi dell'assenza di variazione tra le medie dei valori di espressione dei geni coinvolti nel metabolismo dei carboidrati misurati al momento di massimo stress (Tmax) in relazione al regime idrico (RI), al clone (C) e alla loro interazione (RI X C). (ns = non significativo, * = significativo per $P \leq 0.05$, ** = significativo per $P \leq 0.01$).

Fonte di variazione	Media dei quadrati								
	<i>Mst3.1</i>	<i>Suc2</i>	<i>Susy</i>	<i>Ugp</i>	<i>Cals</i>	<i>Ces</i>	<i>Agp</i>	<i>Bam1</i>	<i>SsII</i>
Regime idrico (RI)	*	*	**	*	**	**	ns	*	ns
Clone (C)	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	-	ns
RI X C	ns	ns	**	ns	*	ns	ns	-	ns

Tabella 6. Verifica dell'ipotesi dell'assenza di variazione tra le medie dei valori di espressione dei geni coinvolti nel metabolismo dei carboidrati misurati al T0, al Tmax e al Trec nelle piante sottoposte alla condizione di controllo Pw in relazione al giorno di campionamento (GC), al clone (C) e alla loro interazione (GC X C). (ns = non significativo, * = significativo per $P \leq 0.05$, ** = significativo per $P \leq 0.01$).

Fonte di variazione	Media dei quadrati								
	<i>Mst3.1</i>	<i>Suc2</i>	<i>Susy</i>	<i>Ugp</i>	<i>Cals</i>	<i>Ces</i>	<i>Agp</i>	<i>Bam1</i>	<i>SsII</i>
Giorno di campionamento (GC)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Clone (C)	**	*	ns	ns	ns	*	*	-	ns
GC X C	ns	*	ns	ns	ns	*	ns	-	ns

Discussione

Questo studio ha evidenziato che, in presenza di deficit idrico, i due cloni 'Dvina' e 'I-214' sono in grado di regolare in modo differente il livello degli zuccheri solubili, dell'amido e dei geni coinvolti nel metabolismo dei carboidrati nella zona cambiale.

Dal punto di vista fisiologico la condizione di stress idrico applicata ha avuto un forte impatto sullo stato idrico delle piante di 'Dvina' e 'I-214'. I valori di SWC, RWC dello stelo e il Ψ_{pd} della foglia hanno mostrato che lo stato idrico nel *continuum* suolo-pianta-atmosfera non era diverso tra i cloni al Tmax e questi dati confermano che i cloni in quel momento sono stati sottoposti alla stessa intensità di stress. Il deficit idrico ha indotto una forte perdita d'acqua dallo stelo come dimostrato dai valori elevati di MDS e questa condizione ha portato a cambiamenti fisiologici e biochimici nella regione cambiale e nel floema in differenziamento. L'MDS rappresenta il parametro più sensibile per definire lo stato idrico dello stelo nelle piante legnose (Zweifel et al. 2000).

Il deficit idrico non ha causato un aumento nel livello degli zuccheri solubili nella zona cambiale di 'Dvina' e 'I-214'. Gli zuccheri solubili totali possono svolgere la funzione di sostanze osmoticamente attive, per proteggere le cellule vegetali dalla disidratazione (Chaves et al. 2003). Lo studio illustrato nel capitolo 1 ha messo in luce che in entrambi i cloni l'aggiustamento osmotico contribuisce alla difesa della zona cambiale dallo stress idrico tramite l'aumento degli osmoliti e in particolare della prolina. Al contrario i dati ottenuti in questo studio evidenziano che la regolazione del livello degli zuccheri solubili non ha contribuito all'aggiustamento osmotico nella zona cambiale dei due cloni. In particolare in presenza di deficit idrico il livello degli zuccheri solubili si è ridotto in modo consistente in 'Dvina', mentre in 'I-214' è risultato simile a quello rilevato nelle piante di controllo. Poiché i due cloni hanno mostrato differenze anche nella regolazione dei livelli di prolina (Capitolo 1), i dati relativi agli zuccheri solubili confermano la diversa capacità

dei due cloni di modificare il livello delle sostanze osmoticamente attive nella zona cambiale.

Il deficit idrico ha causato una riduzione nel contenuto di amido nella zona cambiale in 'Dvina', ma non in 'I-214'. Uno dei principali effetti del deficit idrico è rappresentato dalla riduzione della quantità di carboidrati prodotti dall'apparato fogliare, in seguito sia alla riduzione del tasso fotosintetico (Flexas and Medrano 2002), che all'aumento dell'abscissione fogliare (Pallardy and Rhoads 1997). Durante questo tipo di stress le piante possono utilizzare le riserve immagazzinate sottoforma di amido per sostenere il metabolismo cellulare nei tessuti *sink*. Questo effetto, indotto dalla siccità, è stato osservato nelle radici di *P. nigra* (Regier et al. 2009) e i nostri dati evidenziano che esso può avvenire anche nella zona cambiale di pioppo. La differente risposta osservata nei due genotipi evidenzia tuttavia una diversa capacità di regolare la forza del *sink*, cioè di richiamare saccarosio in modo maggiore o minore in relazione alla sua attività metabolica. I dati suggeriscono che 'Dvina' utilizzi nella zona cambiale una parte dei carboidrati accumulati sottoforma di amido come fonte di energia aggiuntiva rispetto a quelli prodotti dalle foglie. Al contrario, è probabile che in 'I-214' essi derivino principalmente dall'apparato fogliare. Si può quindi ipotizzare che la forza del *sink* in 'I-214', a differenza di 'Dvina' rimanga elevata anche in presenza di deficit idrico, continuando a richiamare saccarosio dalle foglie. Questo potrebbe essere una causa della maggior abscissione fogliare rilevata in questo clone e della sua minore tolleranza alla carenza idrica (Giovannelli et al. 2007).

Il trasporto del saccarosio a lunga distanza dai *source* ai *sink* deve essere finemente regolato e i trasportatori del saccarosio (SUC) e dei monosaccaridi (MST) svolgono un ruolo indispensabile in questo processo. La regolazione dei loro geni è strettamente legata al livello degli zuccheri solubili nelle cellule (Shiratake 2008). Rabbani et al. (2003) hanno

evidenziato l'aumento nell'espressione di tali geni causato dalla siccità, collegandolo alla necessità di incrementare la concentrazione di zuccheri solubili nelle cellule per favorire l'aggiustamento osmotico. Sia in 'Dvina' che in 'I-214' i due geni *Suc2* e *Mst3.1* non sono stati indotti dalla siccità. Poiché il livello degli zuccheri solubili nella zona cambiale non è stato aumentato dal deficit idrico, i dati sui livelli di espressione dei geni per trasportatori confermano l'ipotesi che i due cloni non utilizzino come strategia di difesa dal deficit idrico prolungato l'aumento della traslocazione del saccarosio dalle foglie alla zona cambiale per contribuire all'aggiustamento osmotico. Inoltre, i due geni sono stati modulati in modo diverso dalla siccità nei due cloni, poiché sono risultati sottoespressi in 'Dvina' e non regolati in 'I-214'. Il pattern di espressione osservato nei due cloni è coerente in entrambi i casi con i dati sugli zuccheri solubili: la variazione nel livello di espressione dei due geni indotta dal deficit idrico è stata meno marcata in 'I-214' rispetto a 'Dvina', così come il livello degli zuccheri solubili. Questi dati supportano l'ipotesi che una minor quantità di saccarosio sia traslocata dalle foglie al cambio in 'Dvina', a differenza di 'I-214'.

In 'Dvina' i geni *Udgp*, *Susy*, *Ces* e *Cals* sono stati regolati negativamente dal deficit idrico, mentre in 'I-214' questo effetto è stato rilevato solo per *Udgp* e *Ces*. La saccarosio sintasi e l'UDP-glucosio pirofosforilasi catalizzano la formazione di UDP-glucosio, che costituisce il precursore per la sintesi dei carboidrati strutturali, tra cui la cellulosa e il callosio (Amor et al. 1995; Subbaiah and Sachs 2001). Studi condotti utilizzando piante transgeniche di pioppo hanno dimostrato la stretta relazione tra il livello di espressione dei geni codificanti per questi enzimi, la quantità di saccarosio traslocato nel *sink* e il contenuto di cellulosa depositata nella parete secondaria dello xilema (Coleman et al. 2007; Coleman et al. 2009). Inoltre nella zona cambiale di *P. alba* numerosi geni coinvolti nella sintesi della parete secondaria, tra cui il gene per la cellulosa sintasi e per la callosio

sintasi analizzati in questo studio (*Ces*, *Cals*), sono stati regolati negativamente dal deficit idrico (Berta et al. 2010). La riduzione nel livello di espressione dei quattro geni in 'Dvina' e di *Udgp* e *Cals* in 'I-214' sembrerebbe dunque legata alla riduzione della velocità di accrescimento dello xilema, causata dalla scarsa disponibilità di scheletri carboniosi. Inoltre è interessante notare in 'I-214' la non regolazione del gene *Susy*. La reazione catalizzata dall'enzima è l'idrolisi del saccarosio a UDP-glucosio e fruttosio. Siccome la riduzione nel livello degli zuccheri solubili in 'I-214' è risultata essere meno marcata rispetto a 'Dvina' questi dati suggeriscono un ruolo importante dell'enzima nella regolazione dei livelli di zuccheri solubili nel primo clone.

'Dvina' e in 'I-214' hanno mostrato anche una diversa risposta alla siccità per quanto riguarda la regolazione dei geni coinvolti nel metabolismo dell'amido. Solo in 'Dvina' infatti è stato rilevato un forte aumento nei livelli del trascritto codificante per la β -amilasi 1 (*Bam1*) e la riduzione nell'espressione del gene coinvolto nella sintesi dell'amido *Agp*. L'analisi di espressione genica condotta sui geni dei CAZyme ha mostrato che *Bam1* è espresso in modo specifico nel cambio (Geisler-Lee et al. 2006). I nostri dati sono in accordo con Regier et al. (2009), che hanno rilevato nelle radici di *P. nigra* sottoposto a deficit idrico l'aumento nel livello di espressione del gene *Bam3*, omologo di *Bam1*, e la contemporanea riduzione nel contenuto di amido, evidenziando che la regolazione positiva del gene favorisce la mobilitazione di questo carboidrato di riserva. La riduzione nel contenuto di amido della zona cambiale in 'Dvina' ma non in quella di 'I-214' osservata in questo studio, insieme ai dati ottenuti sulla regolazione di *Bam1*, forniscono un ulteriore sostegno all'ipotesi che il primo clone mobilizzi l'amido per sopperire alla carenza di carboidrati nel *sink* causata dalla siccità, mentre il secondo non utilizzi questo sistema di difesa. La capacità di 'Dvina' nell'utilizzare questa fonte alternativa di carboidrati potrebbe essere uno dei motivi della sua maggiore tolleranza al deficit idrico rispetto all'altro clone.

Nella condizione di controllo (Pw) 'Dvina' ha mostrato in generale valori mediamente più elevati di *Mst3.1* nelle tre date di campionamento e di *Suc2* e *Ces* al T0. Deslauriers et al. (2009) hanno proposto che la maggiore produttività nella produzione del legno tipica di 'Dvina' rispetto a 'I-214' sia legata alla maggiore quantità di zuccheri solubili presenti nella regione cambiale del clone durante la fase di sviluppo dello xilema. I nostri dati suggeriscono che questo potrebbe essere favorito in 'Dvina' rispetto a 'I-214', in generale, dalla maggior espressione del gene per il trasportatore di monosaccaridi *Mst3.1* e, particolarmente al T0, dalla maggior espressione nel primo clone del gene per il trasportatore del saccarosio *Suc2* e per la cellulosa sintasi (*Ces*). Tali geni potrebbero favorire la traslocazione di una maggior quantità di saccarosio nella regione cambiale di 'Dvina' e un maggior tasso di deposizione della parete secondaria, almeno per una parte del periodo di sviluppo dello xilema.

Sempre nella condizione di controllo (Pw) è stato osservato un effetto del giorno di campionamento sui livelli medi di espressione dei geni *Mst3.1*, *Suc2* e *Ces* e inoltre tale effetto è risultato diverso nei due cloni. In 'Dvina' i valori rilevati per *Mst3.1*, *Suc2*, *Ces* sono stati tendenzialmente decrescenti nelle tre date del campionamento, mentre in 'I-214' i tre geni e *Adg* hanno mostrato i valori più elevati al Tmax. Studi condotti sul legno esterno di *Populus x canadensis* e *Robinia pseudoacacia* L. hanno evidenziato una variazione nell'attività di enzimi coinvolti nel metabolismo dei carboidrati in relazione alle fasi di sviluppo dello xilema, con un picco durante il differenziamento cellulare (Hauch and Magel 1998; Schrader and Sauter 2002). E' possibile dunque ipotizzare che i livelli più elevati di espressione di *Mst3.1*, *Suc2* e *Ces* corrispondano ad una maggior attività metabolica della regione cambiale. Sorprendentemente, in 'I-214' è stato osservato anche un aumento dal T0 al Trec nel livello di espressione di *Adg*, un gene coinvolto nella sintesi di amido. Questo dato, parallelamente all'aumento nel contenuto di amido rilevato nella

zona cambiale di 'I-214', suggerisce che parte del saccarosio importato in questo tessuto sia stato utilizzato dal clone per la produzione di amido.

Conclusioni

L'effetto del deficit idrico sul metabolismo dei carboidrati nei due cloni di pioppo 'Dvina' e 'I-214', caratterizzati da una diversa sensibilità al deficit idrico, è stato analizzato monitorando i cambiamenti nella concentrazione degli zuccheri solubili, dell'amido e nel livello dei trascritti di geni coinvolti nel trasporto e nel metabolismo dei carboidrati strutturali e di riserva. I risultati ottenuti hanno mostrato che i due cloni presentano una diversa regolazione del rapporto tra *source-sink* dopo un periodo di deficit idrico. La riduzione nell'espressione dei geni *Mst3.1* e *Suc2*, codificanti per trasportatori, e il forte aumento nell'espressione di *Bam1* parallelamente alla riduzione nel contenuto di amido, suggeriscono che, in condizioni di carenza idrica, 'Dvina' sia in grado di ridurre il trasporto del saccarosio dalle foglie alla zona cambiale e di utilizzare in parte l'amido accumulato in questo tessuto come fonte di energia alternativa per il sostegno del metabolismo. Al contrario, l'assenza di variazioni nei profili trascrizionali di tali geni in 'I-214' suggerisce che nella zona cambiale il clone continui a consumare prevalentemente i fotoassimilati prodotti dalle foglie, rendendo più difficile per la pianta gestire la richiesta di nutrimento dei diversi tessuti.

Capitolo 3

Analisi di trascritti di geni di difesa dallo stress in radici e foglie di un clone di pioppo tollerante ai metalli pesanti (AL35) micorrizzato con *Glomus mosseae* e cresciuto su un suolo inquinato

Introduzione

Molti fattori di natura antropica, come le estrazioni minerarie, gli impianti di combustione, gli scarichi industriali e l'uso dei fertilizzanti chimici in agricoltura, possono causare l'accumulo dei metalli pesanti nei suoli e nei sedimenti acquatici (Briat and Lebrun 1999). I metalli pesanti non possono essere degradati da processi biologici o chimici, per cui il loro accumulo nei suoli rappresenta attualmente uno dei principali problemi per la salute umana ed ambientale. La fitoestrazione, una delle strategie più promettenti per la decontaminazione dei suoli dai metalli pesanti, prevede l'impiego di piante per rimuovere i contaminanti dal suolo e concentrarli nella parte aerea, affinché possano essere raccolti, inceneriti ed in alcuni casi recuperati (Wong 2003). Questa tecnica può essere realizzata *in situ*, minimizzando i costi e preservando la struttura fisica e biologica del suolo (LeDuc and Terry 2005; Pilon-Smits 2005). Il pioppo (*Populus* spp.) possiede numerose caratteristiche che lo rendono un buon candidato per la fitoestrazione, come rapidità di crescita, produzione di molta biomassa, un sistema radicale esteso e la capacità di accumulare i metalli pesanti nei tessuti (Punshon and Dickinson 1997; Di Baccio et al. 2003). Inoltre l'elevata variabilità genetica che caratterizza questo genere permette di identificare genotipi con tratti utili per la fitoestrazione (Smulders et al. 2008).

E' noto che i funghi micorrizici arbuscolari (FMA) possono conferire alle piante con cui stabiliscono la simbiosi una maggior tolleranza nei confronti dei metalli pesanti ed una diversa modalità di accumulo dei metalli nei tessuti. In alcuni casi è stata osservata una maggiore crescita sia delle radici che della parte aerea delle piante micorrizzate cresciute su suoli contaminati rispetto a quelle non micorrizzate (Leyval et al. 2002). Inoltre i FMA possono modificare la quantità di metallo accumulata nella pianta, sia aumentandola (Tonin et al. 2001; Jamal et al. 2002) che riducendola (Zhu et al. 2001; Lin et al. 2007), oppure possono favorire un maggior accumulo dei metalli in un particolare organo della

pianta piuttosto che in un altro (Lingua et al. 2008). Un'importante applicazione di queste conoscenze è rappresentata dalla possibilità di integrare ed incrementare l'efficienza di estrazione dei metalli pesanti dal terreno nel processo di fitoestrazione (Lingua et al. 2008). Specie diverse di FMA determinano un effetto diverso sulla traslocazione e sull'accumulo dei metalli nel clone con cui stabiliscono la simbiosi (Lingua et al. 2008). Per tale motivo da un lato è necessario identificare le associazioni pianta-fungo più convenienti per la fitoestrazione, anche in relazione al tipo di metallo che si intende rimuovere, e dall'altro risulta importante acquisire maggiori conoscenze sui meccanismi che favoriscono la tolleranza ai metalli nelle piante micorrizzate rispetto a quelle non micorrizzate, poiché questo potrebbe costituire un valido supporto nella selezione delle associazioni più adatte.

Concentrazioni tossiche di metalli pesanti nel suolo risultano dannose per la salute delle piante. A livello cellulare uno dei principali effetti è rappresentato dall'aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), con un conseguente danno su diversi componenti cellulari, tra cui le proteine, i lipidi di membrana e il DNA (Schützendübel and Polle 2002). Le piante hanno a disposizione una serie di strategie per prevenire gli effetti dannosi dei metalli pesanti (Hall 2002). Per contenere l'aumento delle specie reattive dell'O₂ la pianta può incrementare la produzione di molecole antiossidanti (Foyer and Noctor 2005; Mittler 2006; Meyer 2008; Miller et al. 2008). I principali enzimi antiossidanti sono le superossido dismutasi (SOD), le catalasi, (CAT), e gli enzimi del ciclo dell'ascorbato-glutatione, come l'ascorbato perossidasi (APX), la glutatione reduttasi (GR) e la deidroascorbato reduttasi (DHAR) (Foyer and Halliwell 1976; Noctor and Foyer 1998; Asada 1999). Un altro meccanismo di difesa molto importante è rappresentato dalla capacità della pianta di mantenere la concentrazione dei metalli nel citosol al di sotto dei livelli tossici, grazie al legame dei metalli con agenti chelanti, come metallotioneine (MT) e fitochelatine (PC) (Rea et al. 1998) e alla regolazione dei trasportatori dei metalli (MTP)

a livello dei vacuoli, capaci di regolare l'ingresso dei complessi metallo-PC in questi compartimenti (Salt and Wagner 1993; Rea et al. 1998). L'effetto della simbiosi micorrizica sulla regolazione dei geni coinvolti nella sintesi degli enzimi antiossidanti e nell'omeostasi dei metalli è stato finora poco studiato e merita di essere approfondito.

In un precedente studio cloni di pioppo ottenuti da popolazioni naturali situate nelle vicinanze del fiume Ticino sono stati sottoposti ad una selezione in campo per identificare i genotipi più adatti per la fitoestrazione, sulla base della loro tolleranza ai metalli pesanti e della loro capacità di accumularli nella parte aerea (Castiglione et al. 2009). Il clone di *Populus alba* 'AL35' ha mostrato le migliori caratteristiche, accumulando un quantitativo di Cu e Zn nelle radici e nelle foglie superiore rispetto agli altri cloni analizzati. Poiché la simbiosi con FMA può incrementare la tolleranza e la capacità di accumulo dei metalli pesanti nelle piante di pioppo (Lingua et al. 2008), ipotizziamo che l'associazione con il FMA *Glomus mosseae* possa rendere 'AL35' più efficiente nella fitoestrazione e che le piante micorrizzate e cresciute su suolo contaminato abbiano un diverso pattern di espressione dei geni coinvolti nella tolleranza ai metalli pesanti rispetto alle piante non micorrizzate. Per verificare questa ipotesi le piante di 'AL35' micorrizzate e non micorrizzate con *G. mosseae* sono state coltivate su un suolo contenente elevate quantità di Cu e Zn e su un suolo di controllo non contaminato. Le analisi effettuate sulle piante di 'AL35' hanno permesso di: i) verificare l'effetto della simbiosi sulla crescita degli organi di 'AL35'; ii) verificare l'effetto della simbiosi sulla concentrazione dei metalli accumulati negli organi di 'AL35'; iii) verificare l'effetto della simbiosi sull'espressione dei geni codificanti per enzimi antiossidanti (SOD, CAT, APX, GR, DHAR, ECS) e per proteine coinvolte nell'omeostasi dei metalli (MT, PCS, MTP).

Materiali e metodi

Materiale vegetale

Il clone di *Populus alba* L. 'AL35' usato nel presente studio è stato selezionato tramite un esperimento condotto in campo (Castiglione et al. 2009) in un sito contaminato da metalli pesanti, situato nelle vicinanze della fabbrica KME-Italy S.p.A. (Serravalle Scrivia, AL, Italia). Talee della lunghezza di 20 cm sono state raccolte nel febbraio 2006 dalle piante cresciute in campo e conservate a 4°C fino al loro utilizzo.

Inoculo del fungo

Nel marzo 2006 le talee di pioppo sono state collocate per tutta la notte in acqua. Successivamente sono state poste in vasi di plastica (750 ml) contenenti sabbia di quarzo (3-4 mm di diametro) sterilizzata a caldo (180 °C, 3 h). I vasi sono stati inoculati con *G. mosseae* (Gerd. And Nicol.) come descritto precedentemente (Lingua et al. 2008) oppure non sono stati inoculati (controlli). L'inoculo è stato fornito ad una concentrazione del 50% (v/v), usando tubi Falcon senza il fondo intorno ad ogni talea. I nutrienti sono stati somministrati alle talee a giorni alternati con 80 ml di soluzione Long Ashton, modificata in accordo con Trotta et al. (1996). Dopo un mese le talee sono state trasferite in vasi sterilizzati di plastica da 7.5 L contenenti sia suolo autoclavato sterilizzato che suolo non sterilizzato (vedi sotto).

Disegno sperimentale e condizioni di crescita

Il suolo, prelevato dal sito inquinato sopraccitato, è una terra sabbiosa (in accordo con le specifiche USDA) e possiede le seguenti caratteristiche: sostanza organica 2.24% dw; N<0.01 dw; K 0.0237% dw; P 0.0026% dw; pH 6.2 con una concentrazione media di Zn di 950 mg Kg⁻¹ dw e di Cu di 1300 mgKg⁻¹. Il suolo non inquinato, campionato da un sito vicino, ha caratteristiche simili ed una concentrazione media di Zn e Cu di 60 e 14 mgKg⁻¹ dw rispettivamente.

Le piante pre-inoculate con *G. mosseae* sono state coltivate per due stagioni vegetative (da marzo 2006 a luglio 2007) in vasi contenenti il suolo contaminato o non contaminato. Sono state preparate dieci piante per trattamento, poste in serra ed irrigate automaticamente due volte a settimana per 3 min; in luglio e agosto le piante sono state irrigate per 8 min a giorni alternati. Un fertilizzante organico commerciale a lento rilascio (Grenago Medio Plus, Grena, San Bonifacio, Verona, Italia) è stato fornito una volta (16.5 g per pianta). Lo stesso numero di piante non inoculate è stato cresciuto nelle medesime condizioni.

Procedura di campionamento

I campioni sono stati prelevati nel luglio 2006 (primo campionamento, piante di 4 mesi) e nel luglio 2007 (secondo campionamento, fine dell'esperimento, piante di 16 mesi). Nel primo anno i campioni di foglie rappresentativi dell'intero fogliame della pianta (escludendo le foglie più giovani non espanse), sono stati prelevati da tutte le piante per ciascun trattamento. Nel secondo anno, l'intera pianta è stata raccolta; campioni di radici, fusto e foglie sono stati raccolti e conservati separatamente per la misura del peso secco e fresco e per la determinazione della concentrazione di Cu, Zn e P. Le foglie prelevate da 3-4 piante per trattamento (per un totale di 10) sono state mescolate per avere tre repliche biologiche per ciascuna data di campionamento, congelate in azoto liquido e conservate a -80°C per l'estrazione dell'RNA o essiccate a 75°C per la determinazione dei metalli pesanti.

Analisi chimiche

Circa 0.5 g (peso secco) di foglie, fusti e radici sono stati utilizzati per la quantificazione di Cu e Zn, effettuando l'analisi su tre repliche biologiche separatamente. La concentrazione dei metalli nei campioni è stata determinata come descritto da Lingua et al. (2008).

Analisi della crescita e della colonizzazione micorrizica

Alla fine dell'esperimento (giugno 2007), la crescita è stata valutata sulla base del peso fresco e secco di foglie, fusto (escludendo il peso della talea originaria) e radici. Il grado di colonizzazione micorrizica di tutte le piante, pre-inoculate o no, è stato valutato al microscopio usando il metodo di Trouvelot et al. (1986). I risultati sono espressi come intensità di colonizzazione, cioè percentuale di radici colonizzate (%M). E' stata anche verificata la presenza di arbuscoli e vescicole.

Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA a singolo filamento

L'RNA totale è stato estratto da 2 g di foglie e radici delle piante di 'AL35' raccolte nel luglio 2007 (seconda data di campionamento), seguendo il protocollo di Kolosova et al. (2004). Successivamente è stato trattato con RNasi (Rnase-Free Dnase Set, Qiagen) e purificato con colonnine di silice (RNase Clean-up kit, Qiagen). La concentrazione dell'RNA è stata determinata tramite lettura allo spettrofotometro (Gene Quant Pro, Amersham Biosciences) e la qualità dell'acido nucleico è stata verificata tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio colorato con etidio bromuro. La sintesi del cDNA a singolo filamento è stata ottenuta a partire da 5 µg di RNA totale usando la trascrittasi inversa (Superscript II reverse transcriptase, Invitrogen) e innescando la reazione con oligo(dT). La qualità del cDNA a singolo filamento e l'assenza di DNA genomico è stata verificata tramite PCR usando i primer per l'ubiquitina (*Ubi*) e la tubulina (*Tub*) (Tabella 1). I campioni di cDNA sono stati utilizzati per l'analisi cDNA macroarray e per la RT-qPCR.

Produzione delle membrane di nylon per l'analisi macroarray

Per l'analisi dei trascritti dei geni di pioppo coinvolti nella tolleranza ai metalli pesanti abbiamo utilizzato le informazioni di sequenza contenute nel database di *Populus trichocarpa* v1.1 (http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html; Tuskan et al.

2006). I primer sono stati disegnati usando il software Primer3 (<http://frodo.wi.mitedu/primer3>; Rozen and Skaletzki 2000) per l'amplificazione di frammenti genici di dimensione compresa tra 120 e 289 bp. Per evitare l'ibridazione incrociata delle sonde immobilizzate sulla membrana con trascritti non specifici abbiamo usato frammenti aventi un'identità di sequenza inferiore all'80% con le altre sequenze presenti nel database di *Populus trichocarpa*. Le sequenze dei primer utilizzate sono riportate nella Tabella 1a e nella Tabella 1b.

I campioni di cDNA sono stati addizionati con 0.5 μl di RNasi H (10 U μl^{-1}) e incubati a 37°C per 20 minuti. La miscela è stata addizionata con 10 U μl^{-1} di EDTA 50 mM e 1 μl di Rnasi T1 (1000 U μl^{-1}) e incubata a 37°C per 40 minuti. Il cDNA è stato purificato con colonnine Microcon YM-30 (Millipore) e utilizzato sia per l'amplificazione dei frammenti genici che per la produzione delle sonde marcate. Le reazioni di PCR sono state realizzate e l'identità degli ampliconi è stata verificata tramite elettroforesi su gel di agarosio. I frammenti genici sono stati purificati usando colonnine Quiaquick (Quiagen) e diluiti ad una concentrazione di 100 ng/ μl . Aliquote della miscela (1 μl) sono state denaturate a 95°C per 10 minuti e trasferite manualmente su membrane di nylon cariche positivamente (Roche), in modo da avere quattro repliche dell'analisi di ciascun gene per membrana e quattro controlli negativi costituiti da acqua distillata.

Le sonde di cDNA sono state marcate usando il sistema di marcatura non radioattiva con digossigenina (DIG DNA Labelling Kit, ROCHE) e i filtri preparati sono stati ibridati seguendo le istruzioni del produttore (Dig System User's Guide). I filtri sono stati lavati due volte per 15 minuti in SSC 2X contenente lo 0.1% di SDS a temperatura ambiente, due volte per 15 minuti in SSC 0.5X contenente lo 0.1% di SDS (68°C). La rilevazione è stata effettuata usando CDP-Star in accordo con il protocollo del DIG Luminescent Detection Kit (Roche). Il segnale chemiluminescente è stato visualizzato usando ChemiDoc XRS

(Bio-Rad) e quantificato con il software Quantity One (Bio-Rad). Per ogni gene, è stata rilevata l'intensità del segnale di quattro spot e il valore medio è stato normalizzato rispetto all'intensità del segnale dei trascritti dell'ubiquitina presenti sulla stessa membrana. Per ciascuna tesi l'analisi è stata condotta su due repliche biologiche.

Real-time PCR quantitativa (RT-qPCR)

Le sequenze dei primer usati per la RT-qPCR sono riportate nella Tabella 2. I campioni di cDNA sono stati diluiti ad un volume finale di 100 μ l e 1 μ l è stato utilizzato come template per la RT-qPCR in una reazione di 15 μ l di volume totale. Le reazioni sono state effettuate usando la iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) sullo strumento iCycler iQ Real Time PCR System (Bio-Rad). Un campione di cDNA, diluito 1/5, 1/25, 1/125, 1/625 e 1/3125, è stato impiegato come standard per calcolare l'efficienza di amplificazione per ciascuna coppia di primer. Le reazioni di PCR sono state effettuate con il seguente protocollo di amplificazione: 2 min a 95 °C, 40 cicli di 30 s a 95 °C, 20 s a 60 °C e 20 s a 72 °C. L'analisi delle curve di melting ha confermato la specificità dell'amplificazione. I valori grezzi dei cicli soglia (C_t) sono stati normalizzati relativamente al gene di riferimento interno ubiquitina (*Ubi*) e la tubulina (*Tub*) utilizzando il software *Q-gene* (Muller et al. 2002).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata realizzata utilizzando il software STATA9 (STATA Corp.). Per valutare l'effetto del tipo di terreno, della micorrizzazione e della loro interazione sui livelli di espressione genica, i dati ottenuti sono stati sottoposti all'analisi della varianza a due vie (ANOVA). I test statistici sono stati considerati significativi per $P \leq 0.05$. I risultati sono espressi come medie \pm errore standard (s.e.).

Tabella 1a. Geni antiossidanti analizzati nello studio, funzione e localizzazione putativa dei prodotti proteici, codice del gene sul database di *P. tricocharpa* v1.1, sequenze dei primer utilizzati per il cDNA macroarray, temperatura di *annealing* (T_a) e dimensione del frammento trasferito sulla membrana. Abbreviazioni: m, mitocondriale; cyt, citosolico; chl, plastidiale; per, legato alla membrana del perossisoma.

Gene	Funzione e localizzazione	Codice del gene su JGI	Primer <i>forward</i>	Primer <i>reverse</i>	T_a (°C)	Dimens. framm.(bp)
<i>CuZnSodchl</i>	Cu/Zn Superossido dismutasi (chl)	fgenes4_pm.C_scaffold_163000009	ATTCCTCATTCATGGCGTCTC	GCCCAGTAATACGAACACTCAC	185	62
<i>CuZnSodcytb</i>	Cu/Zn Superossido dismutasi (cyt)	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIII1983	CCTGAGAAGCATAAGGAACAGTG	TCCATGGTCCTTCTTTAATGG	262	54
<i>CuZnSodcytc</i>	Cu/Zn Superossido dismutasi (cyt)	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIII1233	TCTCGCCAGACTCTGATTG	CCTTCTTGGGTAAAGATGATGGT	231	55
<i>CuZnSodcytd</i>	Cu/Zn Superossido dismutasi (cyt)	eugene3.00700152	GCTGTTTTGAGCTGCGAAT	CCTTCTTGGGTAAAGATGATGGT	241	55
<i>FeSod1</i>	Fe Superossido dismutasi (chl)	gw1.V.3253.1	TGCAGTTACGCCAATTGTATGG	GTTCGCCTAGATTCACGAATGC	188	60
<i>FeSod2</i>	Fe Superossido dismutasi (chl)	gw1.XV.2559.1	TAGTGGTCAAGAGTCCCAATGC	AGCCCTTGCAACTTCAAGTCTC	188	62
<i>MnSod1</i>	Mn Superossido dismutasi (m)	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIII3158	GTGCTGGTTTTGGACACACAGATG	TGAACAAGGATCAGCACAACAC	209	62
<i>MnSod2</i>	Mn Superossido dismutasi (m)	grail3.0095006301	ACACAGTTGTGGCTTCGTAG	CACCAGTAAACAACCTCAGCAAC	125	60
<i>Cat1</i>	Catalasi	eugene3.00020082	TGAAGACGACACCAAAGCTC	AACTGCAAACCACACAGCAG	244	60
<i>Cat2</i>	Catalasi	estExt_fgenes4_pm.C_LG_V0171	ATGAGGCCAAGCATTGAAG	GGCCTGACTGAAGAGCATAGG	299	60
<i>Cat3</i>	Catalasi	estExt_fgenes4_pm.C_LG_V0695	GACCAAGCGTCTGAAGATGAC	GATGAAGGGCATCCAGGAC	189	60
<i>Apxchl</i>	Ascorbato perossidasi (chl)	gw1.V.5347.1	CACCAAAATCGCAACCAATGG	AACGGTGCTCATTGACGATC	195	57
<i>Apxcyt</i>	Ascorbato perossidasi (cyt)	estExt_fgenes4_pg.C_LG_IX1399	AAAGCCGTTGAAAAGGCCAAG	GATGGGAAACTGCTCCTTGATG	231	57
<i>Apxper</i>	Ascorbato perossidasi (per)	estExt_fgenes4_pm.C_LG_IV0530	ACCGTTGTTGACACAGAGTAC	AACCATGAGAGCACTCCTCTTC	172	57
<i>Dhar</i>	Deidroascorbato reductasi (cyt)	estExt_fgenes4_pm.C_LG_X0841	CTGGTTATGTACTGTGCTTTAGCC	GCCAGTGCTCTCATAACAAAAC	219	56
<i>Ecs</i>	γ -Glutamilcisteina sintasi	EstExt_fgenes4_pm.C_LG_III0405	ACTTTCACCGCAAACCAAC	AGCGTCATGCCTTGAAGAG	211	60
<i>Grchl</i>	Glutazione reductasi (chl)	eugene3.00150408	GATGCACCTGAAATCGTGCAG	CCAGCTATTTTCCGGAGTGA	289	62
<i>Grcyt</i>	Glutazione reductasi (cyt)	grail3.0008003701	GATGCACCTGAAATCGTGCAG	GGTTTGCCACCAGCAGTAAC	155	60

Tabella 1b. Geni coinvolti nell'omeostasi dei metalli analizzati nello studio e geni di riferimento utilizzati per la normalizzazione, funzione dei prodotti proteici, codice del gene sul database di *P. tricocharpa* v1.1, sequenze dei primer utilizzati per il cDNA macroarray, temperatura di *annealing* (T_a) e dimensione del frammento trasferito sulla membrana.

Gene	Funzione	Codice del gene su JGI	Primer <i>forward</i>	Primer <i>reverse</i>	T_a (°C)	Dimens. framm. (bp)
Omeostasi dei metalli						
<i>MT1a</i>	Metallotioneina 1a	eugene3.01200081	CAGTTGGTCAGCTCATGTTTG	CCACATAGTTCAAGTTTCCAAGC	162	60
<i>MT1b</i>	Metallotioneina 1b	estExt_Genewise1_v1.c_1420036	TGCTGGCTGTAGCTGTGGCTCTG	GTAGAACATCTGAACTGGTGCAAA	137	60
<i>MT2a</i>	Metallotioneina 2a	eugene3.00060718	CGTGTTAGCTGCTTGTCGTC	AGCCAGTCAGTTTCATACATGC	174	60
<i>MT2b</i>	Metallotioneina 2b	eugene3.00091335	GTCTGGTCACTCCATGTTTGTGTC	TGGAATGGAACCAACAAAGC	158	60
<i>MT3a</i>	Metallotioneina 3a	eugene3.00110909	AGCACGTAAACCGTCATGTG	CTGATTTAGTTGTGAAGAGGCAGAG	224	60
<i>MT3b</i>	Metallotioneina 3b	eugene3.01070053	GAAAGATGGCCAACCCCTAC	TGTTATATCTTCAAGCCCTGCTC	173	60
<i>Mtp2</i>	Trasportatore dei metalli	fgenesh4_pm.C_LG_II000836	GATCACAATCATGGGACTGG	CATGACGGTGCTCATCTTTC	124	60
<i>Pcs</i>	Fitochelatina sintasi	gw1.XIV.198.1	CAAATGTCTGCTGCCAAGG	GGCCGCTGTCTGAGATAAAG	197	60
Geni di riferimento						
<i>Tub</i>	Tubulina β	grail3.6820000102	CTTCAAGGATTTCAAGTTTGCC	AGTTGCGTTGTATGGCTCAAC	171	60
<i>Ubi</i>	Ubiquitina	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XI0348	AGTCCACCCTTCACCTTGTC	CAATGGAACGGCCCTTAACAG	212	60

Tabella 2. Primer utilizzati per la RT-qPCR.

Gene	Funzione	Codice del gene su JGI	Primer <i>forward</i>	Primer <i>reverse</i>	T_a (°C)
<i>Apxper</i>	Ascorbato perossidasi	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_IV0530	ACCGGTTGTTGACACAGAGTAC	AACCATGAGAGCACTCCTCTTC	57
<i>CuZnSodcytb</i>	Cu/Zn Superossido dismutasi	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIII1983	CCTGAGAAGCATAAGGAACAGTG	TCCATGGTCCTTCTTTAATGG	54
<i>Dhar</i>	Deidroascorbato reductasi	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_X0841	GGGCTCAAAGATATCCCATC	GCAATGAATGGACCGTGTG	60
<i>MT1a</i>	Metallotioneina 1a	eugene3.01200081	CAGTTGGTCAGCTCATGTTTG	CCACATAGTTCAAGTTTCCAAGC	60
<i>Pcs</i>	Fitochelatina sintasi	gw1.XIV.198.1	CAAATGTCTGCTGCCAAGG	GGCCGCTGTCTGAGATAAAG	60
<i>Tub</i>	Tubulina β	grail3.6820000102	CTTCAAGGATTTCAAGTTTGCC	AGTTGCGTTGTATGGCTCAAC	60
<i>Ubi</i>	Ubiquitina	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XI0348	AGTCCACCCTTCACCTTGTC	CAATGGAACGGCCCTTAACAG	60

Risultati

Questo studio è parte di un progetto più ampio avente come fine la valutazione degli effetti di *G. mosseae* sulla tolleranza e la capacità di accumulo dei metalli pesanti nel clone di pioppo bianco 'AL35', considerato un buon candidato per la fitoestrazione. Per tale ragione, oltre all'analisi molecolare svolta nel presente corso di dottorato, altri gruppi di ricerca hanno eseguito analisi di tipo microbiologico, chimico e fisiologico sulle piante di 'AL35' cresciute nelle condizioni sopradescritte. Di seguito sono riportati, per completezza, i dati ottenuti dalle altre unità di ricerca sulla percentuale di radici colonizzate da *G. mosseae* (%M), sul peso fresco e secco degli organi (radici, fusti e foglie) e sulla concentrazione dei metalli nelle piante di 'AL35', che sono stati pubblicati recentemente (Cicatelli et al. 2010).

Nelle piante non inoculate la percentuale di radici colonizzate da *G. mosseae* M% è risultata <1%, indipendentemente dal tipo di suolo, mentre le piante inoculate con *G. mosseae* hanno mostrato valori di M% compresi tra 5 e 23% senza differenze significative tra suolo contaminato e non contaminato (Cicatelli et al. 2010). Alla fine dell'esperimento, nelle piante cresciute sul terreno di controllo la micorrizzazione non ha avuto effetto sul peso fresco e secco dei fusti e delle radici, mentre ha ridotto quello delle foglie (Fig. 1). Nelle piante non micorrizzate i metalli pesanti hanno determinato una riduzione della biomassa di radici, fusto e foglie approssimativamente dell'85%, rispetto

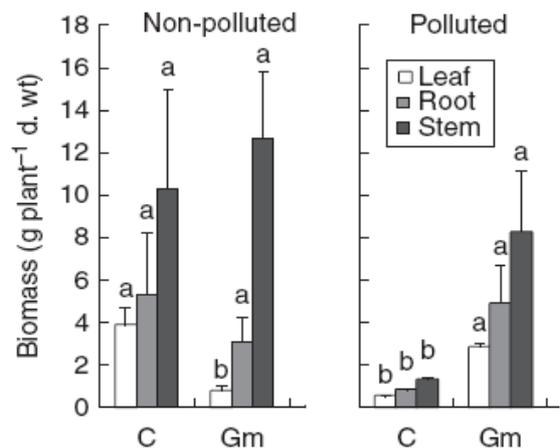


Figura 1. Biomassa del clone 'AL35' di *P. alba* dopo due stagioni di crescita sul suolo non contaminato e contaminato. Le piante non sono state inoculate (C) o sono state inoculate con *G. mosseae* (Gm). Le diverse lettere indicano differenze significative dei valori ($P \leq 0.05$) tra i trattamenti con riferimento allo stesso organo della pianta. Le barre indicano gli s.e. (Cicatelli et al. 2010).

alle piante cresciute in assenza di contaminanti (Fig. 1). Infine, le piante micorrizzate hanno mostrato valori di tutti e tre gli organi da 4 a 6 volte superiori rispetto a quelle non micorrizzate (Fig. 1).

Le piante micorrizzate con *G. mosseae* cresciute sul suolo contaminato hanno mostrato valori di Cu molto più elevati nelle radici (circa 6 volte superiori) rispetto ai livelli osservati nelle piante non micorrizzate cresciute nello stesso tipo di suolo (Fig. 2); il fungo ha avuto anche un effetto sull'accumulo del metallo nelle foglie, sebbene più contenuto e tardivo (seconda data di campionamento) (Fig. 2). La quantità totale di Cu (prodotto della concentrazione media di Cu e del peso secco medio) accumulata dalle piante micorrizzate è risultata, nel complesso, circa 30 volte più elevata rispetto alle piante non micorrizzate (Cicatelli et al. 2010).

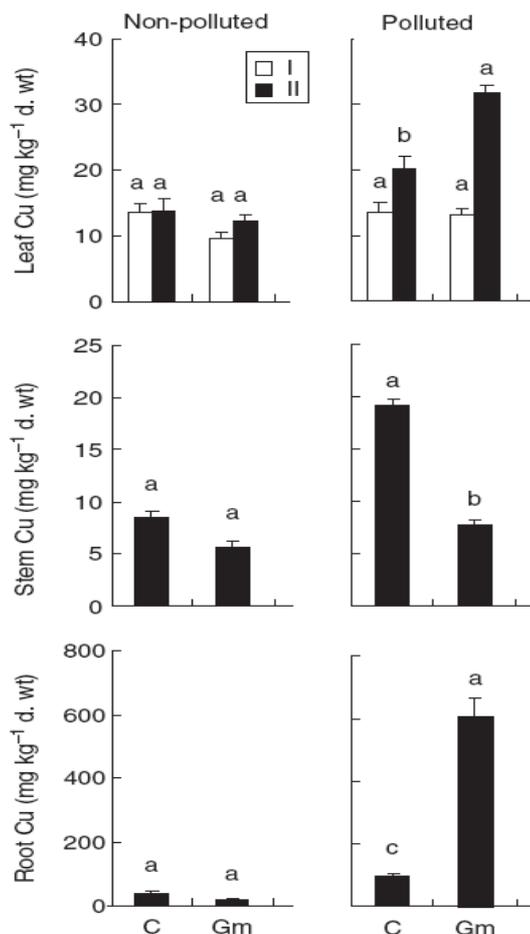


Figura 2. Concentrazioni di Cu in foglie, fusti e radici del clone di *P. alba* 'AL35' cresciuto su un suolo non contaminato o contaminato in assenza o in presenza di *G. mosseae*. Le foglie sono state analizzate dopo una (barre bianche) o due (barre nere) stagioni di crescita; fusti e radici sono stati raccolti solo al termine della seconda stagione di crescita (fine dell'esperimento). Le diverse lettere indicano differenze significative dei valori ($P < 0.05$) tra i trattamenti con riferimento allo stesso organo della pianta. Le barre indicano gli s.e. (Cicatelli et al. 2010).

Lo Zn è stato accumulato principalmente nelle foglie e ha raggiunto i valori più elevati nelle piante cresciute sul suolo contaminato e campionate alla fine dell'esperimento, indipendentemente dalla presenza del fungo (Fig. 3). Sul suolo contaminato, la concentrazione di Zn è risultata più elevata nelle radici delle piante micorrizate rispetto a quelle non micorrizate (Fig. 3). Nello stesso tipo di suolo la quantità totale di Zn per organo della pianta e per intera pianta è risultata sempre superiore nelle piante micorrizate rispetto a quelle non micorrizate (Cicatelli et al. 2010).

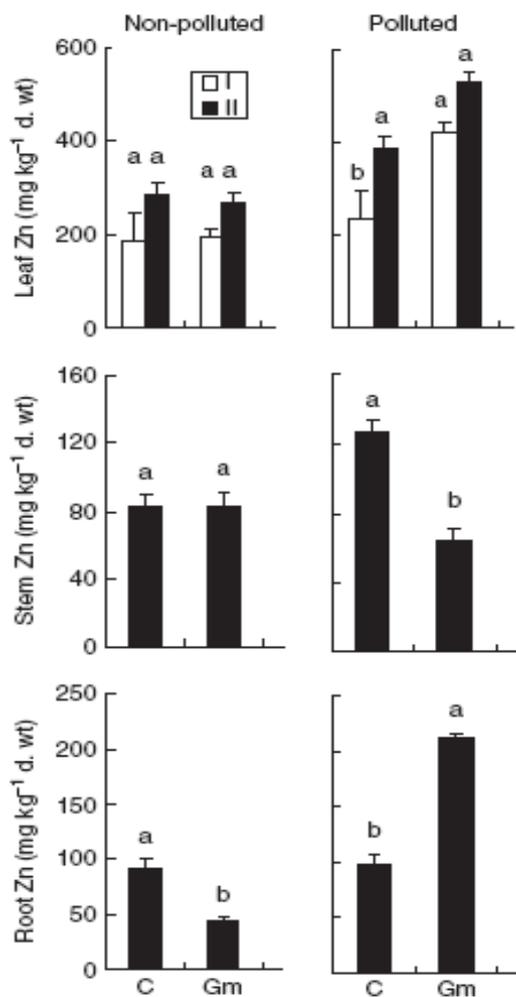


Figura 3. Concentrazioni di Zn in foglie, fusti e radici del clone di *P. alba* 'AL35' cresciuto su un suolo non contaminato o contaminato in assenza o in presenza di *G. mosseae*. Le foglie sono state analizzate dopo una (barre bianche) o due (barre nere) stagioni di crescita; fusti e radici sono stati raccolti solo al termine della seconda stagione di crescita (fine dell'esperimento). Le diverse lettere indicano differenze significative dei valori ($P \leq 0.05$) tra i trattamenti con riferimento allo stesso organo della pianta. Le barre indicano gli s.e. (Cicatelli et al. 2010).

Profilo di espressione dei geni coinvolti nella risposta allo stress

I dati di espressione dei geni antiossidanti e dei geni coinvolti nell'omeostasi dei metalli ottenuti tramite cDNA macroarray e normalizzati rispetto ai geni di riferimento interni *Ubi* e *Tub* sono riportati nelle Tabelle 3a-b e nelle Tabelle 5a-b. Nelle Tabelle 4 e 6 i livelli dei trascritti dei geni coinvolti nella difesa antiossidante e nell'omeostasi dei metalli sono espressi relativamente a quelli delle piante di controllo (suolo non contaminato ed assenza del fungo), a cui è stato attribuito arbitrariamente il valore di 1.

	Radici			
	C	Gm	HM	Gm+HM
SOD				
<i>CuZnSodchl</i>	2.5 (1.5)	4.6 (0.6)	10.5 (0.8)	4.1 (0.2)
<i>CuZnSodcytb</i>	7.2 (1.0)	1.8 (0.8)	5.7 (0.4)	1.6 (0.4)
<i>CuZnSodcytc</i>	3.1 (0.1)	1.3 (0.3)	1.6 (0.1)	1.5 (0.3)
<i>CuZnSodcytd</i>	7.3 (0.3)	1.4 (0.4)	2.2 (0.1)	1.1 (0.1)
<i>MnSod1</i>	4.0E-03 (0.1E-03)	1.4E-03 (0.3E-03)	2.8E-03 (0.1E-03)	2.1E-03 (0.2E-03)
<i>MnSod2</i>	15.7E-03 (2.9E-03)	3.3E-03 (1.4E-03)	14.3E-03 (3.4E-03)	4.4E-03 (0.6E-03)
<i>FeSod1</i>	12.0E-04 (5.80E-04)	4.4E-04 (0.3E-04)	10.3E-04 (4.1E-04)	4.2E-04 (0.1E-04)
<i>FeSod2</i>	47.3E-04 (16.0E-04)	70.6E-04 (7.4E-04)	103.4E-04 (0.1E-04)	37.9E-04 (6.6E-04)
CAT				
<i>Cat1</i>	2.7E-02 (1.7E-02)	0.6E-02 (0.3E-02)	3.3E-02 (2.2E-02)	1.5E-02 (0.3E-02)
<i>Cat2</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Cat3</i>	ND	ND	ND	ND
ASC-GSH				
<i>Apxchl</i>	8.5E-02 (3.6E-02)	7.9E-02 (0.5E-02)	16.2E-02 (2.3E-02)	7.4E-02 (0.5E-02)
<i>Apxcyt</i>	3.0 (0.9)	2.5 (0.1)	5.4 (1.9)	2.5 (0.4)
<i>Apxper</i>	1.8 (0.4)	1.2 (0.2)	4.1 (0.5)	1.5 (0.3)
<i>Grchl</i>	64.5E-03 (4.5E-03)	43.8E-03 (1.5E-03)	79.5E-03 (0.1E-03)	58.0E-03 (2.0E-03)
<i>Grcyt</i>	17.6E-01 (1.4E-01)	12.1E-01 (1.0E-01)	24.1E-01 (3.2E-01)	10.2E-01 (0.2E-01)
<i>Dhar</i>	1.9 (0.9)	1.5 (0.2)	8.1 (2.0)	2.5 (1.0)
<i>Ecs</i>	16.3 (3.4)	1.2 (0.2)	13.2 (3.9)	5.1 (1.3)

Tabella 3a. Espressione dei geni coinvolti nella difesa antiossidante nelle radici di 'AL35'. Le piante sono state coltivate sul terreno non contaminato, in assenza (C) e in presenza fungo *G. mosseae* (Gm) oppure sul terreno contaminato, in assenza (HM) e in presenza del fungo *G. mosseae* (Gm+HM). I livelli di mRNA sono stati quantificati tramite cDNA macroarray e normalizzati rispetto ai geni *Ubi* e *Tub*. Sono riportati i valori medi di due repliche biologiche e degli s.e. tra parentesi. ND = non determinabile.

	Foglie			
	C	Gm	HM	Gm+HM
SOD				
<i>CuZnSodchl</i>	167.5 (7.8)	73.9 (4.2)	108.8 (12.2)	149.7 (11.2)
<i>CuZnSodcytb</i>	5.6 (0.4)	5.4 (0.6)	5.7 (0.1)	7.00 (0.1)
<i>CuZnSodcytc</i>	4.7 (0.4)	3.5 (0.3)	4.5 (0.4)	8.3 (0.4)
<i>CuZnSodcytd</i>	3.1 (0.1)	2.8 (0.4)	6.1 (0.9)	2.4 (0.1)
<i>MnSod1</i>	6.0E-03 (0.5E-03)	5.6E-03 (1.7E-03)	7.3E-03 (1.1E-03)	5.7E-03 (1.3E-03)
<i>MnSod2</i>	11.4E-04 (5.2E-04)	2.8E-04 (1.2E-04)	20.0E-04 (0.3 E-04)	20.0E-04 (2.6E-04)
<i>FeSod1</i>	9.3E-03 (2.6E-03)	13.3E-03 (1.4E-03)	32.3E-03(2.6E-03)	15.9E-03 (2.2E-03)
<i>FeSod2</i>	6.7E-02 (1.3E-02)	8.1E-02 (1.7E-02)	15.0E-02 (1.0E-02)	12.2E-02 (1.7E-02)
CAT				
<i>Cat1</i>	10.0E-02 (1.3E-02)	8.6E-02 (0.2E-02)	9.2E-02 (1.7E-02)	14.0E-02 (1.4E-02)
<i>Cat2</i>	19.4E-03 (4.7E-03)	10.3E-03 (2.5E-03)	14.2E-03 (2.7E-03)	4.3E-03 (0.1E-03)
<i>Cat3</i>	ND	ND	ND	ND
ASC-GSH				
<i>Apxchl</i>	19.9E-02 (1.4E-02)	27.2E-02 (1.0E-02)	29.6E-02 (0.6E-02)	28.2E-02 (2.0E-02)
<i>Apxcyt</i>	6.6 (0.4)	8.4 (1.7)	9.5 (1.1)	11.4 (0.5)
<i>Apxper</i>	192.1 (41.8)	179.8 (25.1)	247.0 (8.3)	304.4 (10.1)
<i>Grchl</i>	23.7E-02 (0.8E-02)	16.6E-02 (0.6E-02)	36.1E-02 (1.2E-02)	35.1E-02 (2.3E-02)
<i>Grcyt</i>	4.8 (0.1)	8.4 (0.4)	8.0 (0.3)	7.6 (0.1)
<i>Dhar</i>	12.1 (1.3)	13.4 (2.4)	20.2 (0.4)	18.0 (3.5)
<i>Ecs</i>	11.1 (2.2)	15.3 (0.8)	13.3 (1.6)	12.9 (2.6)

Tabella 3b. Espressione dei geni coinvolti nella difesa antiossidante nelle foglie di 'AL35'. Le piante sono state coltivate sul terreno non contaminato, in assenza (C) e in presenza fungo *G. mosseae* (Gm) oppure sul terreno contaminato, in assenza (HM) e in presenza del fungo *G. mosseae* (Gm+HM). I livelli di mRNA sono stati quantificati tramite cDNA macroarray e normalizzati rispetto ai geni *Ubi* e *Tub*. Sono riportati i valori medi di due repliche biologiche e degli s.e. tra parentesi. ND = non determinabile.

Infine, le Tabelle 7 e 8 riportano i risultati dell'ANOVA a due vie utilizzata per valutare l'effetto del tipo di terreno, della micorrizzazione e della loro interazione sui livelli di espressione dei geni antiossidanti e dei geni coinvolti nell'omeostasi dei metalli.

I trascritti di *Cat3* non hanno mostrato alcun segnale di ibridazione sia nei campioni di radici che di foglie, mentre quelli di *Cat2*, *MT2a* e *MT3a* sono stati rilevati solo nelle foglie (Tab. 3a-b; Tab. 5a-b).

Geni antiossidanti

Nelle radici delle piante di ‘AL35’ cresciute sul suolo di controllo (Gm) la micorrizzazione ha in generale ridotto il livello di espressione dei geni antiossidanti, con l’eccezione di *CuZnSodchl* e *FeSod2*, che sono stati indotti da *G. mosseae* (Tab. 3a; Tab. 4). Sempre in assenza di stress da metalli pesanti, nelle foglie di ‘AL35’ la simbiosi con *G. mosseae* ha modificato il pattern di espressione dei geni antiossidanti (Tab. 3b; Tab. 4). Di questi sono stati regolati positivamente *FeSod1*, *FeSod2*, *Apxchl*, *Apxcyt*, *Grcyt*, *Dhar* ed *Ecs*, mentre gli altri geni sono risultati inalterati o regolati negativamente dalla simbiosi (Tab. 3b; Tab. 4).

	Radici			Foglie		
	Gm	HM	Gm+HM	Gm	HM	Gm+HM
SOD						
<i>CuZnSodchl</i>	1.87	4.25	1.67	0.44	0.65	0.89
<i>CuZnSodcytb</i>	0.25	0.80	0.23	0.96	1.02	1.25
<i>CuZnSodcytc</i>	0.42	0.54	0.47	0.73	0.96	1.75
<i>CuZnSodcytd</i>	0.19	0.31	0.15	0.89	1.97	0.79
<i>MnSod1</i>	0.36	0.71	0.52	0.93	1.21	0.95
<i>MnSod2</i>	0.21	0.91	0.28	0.25	1.76	1.76
<i>FeSod1</i>	0.36	0.86	0.35	1.42	3.46	1.70
<i>FeSod2</i>	1.49	2.19	0.80	1.22	2.25	1.84
CAT						
<i>Cat1</i>	0.23	1.23	0.57	0.86	0.92	1.41
<i>Cat2</i>	ND	ND	ND	0.53	0.73	0.22
<i>Cat3</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ASC-GSH						
<i>Apxchl</i>	0.93	1.91	0.87	1.37	1.49	1.42
<i>Apxcyt</i>	0.84	1.81	0.85	1.27	1.44	1.73
<i>Apxper</i>	0.67	2.21	0.81	0.94	1.28	1.58
<i>Grchl</i>	0.68	1.23	0.90	0.70	1.52	1.48
<i>Grcyt</i>	0.69	1.37	0.58	1.73	1.63	1.58
<i>Dhar</i>	0.78	4.26	1.33	1.11	1.67	1.49
<i>Ecs</i>	0.08	0.81	0.31	1.37	1.20	1.16

Tabella 4. Espressione dei geni coinvolti nella difesa antiossidante nelle foglie e nelle radici di ‘AL35’ quantificati tramite cDNA macroarray ed espressi come rapporto tra il valori osservati nel controllo (suolo non contaminato ed assenza di fungo). Gm: presenza del fungo *G. mosseae*; HM: terreno contaminato; Gm+HM terreno contaminato e presenza del fungo *G. mosseae*. ND: non determinabile.

Nelle radici delle piante di 'AL35' non micorrizzate cresciute sul terreno contaminato (HM) i metalli hanno causato l'induzione dei geni codificanti per due SOD attive nei plastidi (*CuZnSodchl* e *FeSod2*), per una catalasi (*Cat1*) e per tutti i geni coinvolti nel ciclo dell'ascorbato-glutatione, con l'eccezione di *Ecs* (Tab. 3a; Tab. 4); inoltre nelle foglie i metalli hanno indotto numerosi geni codificanti per SOD attive nei mitocondri e nei cloroplasti (*MnSod1*, *MnSod2*, *FeSod1*, *FeSod2*), per una SOD citosolica (*CuZnSodcytd*) e per tutti i geni del ciclo dell'ascorbato-glutatione (Tab. 3b; Tab. 4).

I cambiamenti indotti dai metalli sono risultati assenti nelle radici delle piante micorrizzate con *G. mosseae* (Gm+HM), con l'eccezione di *CuZnSodchl* e *Dhar*, che comunque hanno mostrato livelli di espressione più bassi rispetto alle piante non micorrizzate (Tab. 3a; Tab. 4). Nelle foglie il pattern di espressione è stato confermato per tutti i geni coinvolti nel ciclo dell'ascorbato-glutatione, per *MnSod2*, *FeSod1* e *FeSod2* e sono risultati indotti anche i geni *CuZnSodcytb*, *CuZnSodcytc* e *Cat1* (Tab. 3b; Tab. 4).

Geni coinvolti nell'omeostasi dei metalli

Nelle piante di 'AL35' cresciute sul suolo di controllo (Gm) la micorrizzazione ha avuto un effetto consistente sul pattern di espressione dei geni coinvolti nell'omeostasi dei metalli (Tab. 5a-b; Tab. 6). Infatti nelle radici i quattro geni codificanti per MT rilevati dal cDNA macroarray (*MT1a*, *MT1b*, *MT2b*, *MT3b*) e i geni coinvolti nel trasporto dei metalli nei vacuoli (*Mtp2* e *Pcs*) sono stati regolati negativamente dalla simbiosi (Tab. 5a; Tab. 6); nelle foglie la presenza di *G. mosseae* ha causato l'induzione di quattro geni MT (*MT1a*, *MT1b*, *MT2a*, *MT3a*) e del gene per il trasportatore dei metalli *Mtp2* (Tab. 5b; Tab. 6).

Nelle radici di 'AL35' la crescita sul terreno contaminato (HM) non ha determinato in generale un aumento nel livello di espressione dei geni coinvolti nell'omeostasi dei metalli, sia in presenza che in assenza della simbiosi con *G. mosseae* (Tab. 5a; Tab. 6). L'unica eccezione è rappresentata dal gene *MT2b*, indotto dai metalli e in misura maggiore in

presenza di *G. mosseae* (Tab. 5a; Tab. 6). Al contrario del trend osservato nelle radici, i metalli pesanti hanno in generale causato un aumento dei valori medi di espressione genica nelle foglie (Tab. 5b; Tab. 6). In assenza della simbiosi con *G. mosseae* la crescita sul terreno contaminato ha causato la forte induzione di *MT1a* e *Mtp2*, mentre il livello di espressione di *MT1b*, *MT2a*, *MT3a* e *Pcs* è aumentato ma in modo più contenuto (Tab. 5b; Tab. 6). La combinazione dei due fattori, metalli pesanti e micorrizzazione (Gm+HM), ha determinato la sovraespressione degli otto geni analizzati rispetto alle piante di controllo (C) (Tab. 5b; Tab. 6). Inoltre per *MT1b* e *MT2a* il livello dei trascritti è risultato molto superiore rispetto a quello osservato nelle piante non micorrizzate (HM), mentre quello di *MT3b* e *Mtp2* è risultato paragonabile sia in presenza che in assenza del fungo (Tab. 5b; Tab. 6).

	Radici			
	C	Gm	HM	Gm+HM
<i>MT</i>				
<i>MT1a</i>	26.1 (3.1)	1.3 (0.1)	1.7 (0.1)	14.2 (1.2)
<i>MT1b</i>	9.6E-02 (0.3E-02)	1.5E-02 (0.7E-02)	5.3E-02 (1.1E-02)	5.3E-02 (2.1E-02)
<i>MT2a</i>	ND	ND	ND	ND
<i>MT2b</i>	3.0 (0.6)	1.4 (0.4)	8.8 (0.3)	12.3 (1.1)
<i>MT3a</i>	ND	ND	ND	ND
<i>MT3b</i>	4.1E-01 (0.5E-01)	1.8E-01 (0.3E-01)	4.6E-01 (0.3E-01)	4.1E-01 (0.1E-01)
<i>Vacuolar sequestration</i>				
<i>Pcs</i>	2.9 (0.6)	1.3 (0.3)	1.4 (0.1)	1.9 (0.4)
<i>Mtp2</i>	57.9E-03 (7.8E-03)	6.0E-03 (0.4E-03)	6.8E-03 (0.4E-03)	19.8E-03 (1.9E-03)

Tabella 5a. Espressione dei geni coinvolti nell'omeostasi dei metalli nelle radici di 'AL35'. Le piante sono state coltivate sul terreno non contaminato, in assenza (C) e in presenza fungo *G. mosseae* (Gm) oppure sul terreno contaminato, in assenza (HM) e in presenza del fungo *G. mosseae* (Gm+HM). I livelli di mRNA sono stati quantificati tramite cDNA macroarray e normalizzati rispetto ai geni *Ubi* e *Tub*. Sono riportati i valori medi di due repliche biologiche e degli s.e. tra parentesi. ND: non determinabile.

	Foglie			
	C	Gm	HM	Gm+HM
MT				
<i>MT1a</i>	1.4 (0.3)	2.5 (0.5)	19.2 (2.8)	7.0 (0.1)
<i>MT1b</i>	5.9E-03 (0.4E-03)	10.7E-03 (3.9E-03)	7.4E-03 (1.5E-03)	21.7E-03 (8.0E-03)
<i>MT2a</i>	1.2E-04 (0.2E-04)	2.4E-04 (0.5E-04)	2.9E-04 (0.4E-04)	28.6E-04 (3.4E-04)
<i>MT2b</i>	5.2 (0.9)	2.5 (0.1)	3.7 (0.3)	7.0 (0.4)
<i>MT3a</i>	1.2E-01 (0.3E-01)	3.6E-01 (0.7E-01)	2.4E-01 (0.9E-01)	2.0E-01 (0.2E-01)
<i>MT3b</i>	108.0 (11.4)	78.5 (5.5)	96.9 (6.8)	122.4 (3.0)
Vacuolar sequestration				
<i>Pcs</i>	7.0 (0.2)	6.7 (0.6)	9.7 (1.0)	13.4 (0.6)
<i>Mtp2</i>	1.1 (0.1)	1.7 (0.7)	6.0 (0.4)	5.7 (0.8)

Tabella 5b. Espressione dei geni coinvolti nell'omeostasi dei metalli nelle foglie di 'AL35'. Le piante sono state coltivate sul terreno non contaminato, in assenza (C) e in presenza fungo *G. mosseae* (Gm) oppure sul terreno contaminato, in assenza (HM) e in presenza del fungo *G. mosseae* (Gm+HM). I livelli di mRNA sono stati quantificati tramite cDNA macroarray e normalizzati rispetto ai geni *Ubi* e *Tub*. Sono riportati i valori medi di due repliche biologiche e degli s.e. tra parentesi. ND: non determinabile.

	Radici			Foglie		
	Gm	HM	Gm+HM	Gm	HM	Gm+HM
MT						
<i>MT1a</i>	0.05	0.06	0.54	1.83	13.81	5.04
<i>MT1b</i>	0.16	0.56	0.56	1.82	1.26	3.67
<i>MT2a</i>	ND	ND	ND	1.95	2.32	22.97
<i>MT2b</i>	0.46	2.93	4.10	0.49	0.72	1.36
<i>MT3a</i>	ND	ND	ND	3.08	2.02	1.68
<i>MT3b</i>	0.44	1.12	1.01	0.73	0.90	1.13
Vacuolar sequestration						
<i>Pcs</i>	0.46	0.48	0.66	0.96	1.39	1.92
<i>Mtp2</i>	0.10	0.12	0.34	1.59	5.46	5.23

Tabella 6. Espressione dei geni coinvolti nella omeostasi dei metalli nelle foglie e nelle radici di 'AL35' quantificati tramite cDNA macroarray ed espressi come rapporto tra il valori osservati nel controllo (suolo non contaminato ed assenza di fungo). Gm: presenza del fungo *G. mosseae*; HM: terreno contaminato; Gm+HM terreno contaminato e presenza del fungo *G. mosseae*. ND: non determinabile.

Tabella 7. Verifica dell'ipotesi di uguaglianza tra le medie dei valori di espressione dei geni antiossidanti in relazione alla presenza o assenza di terreno contaminato (T), alla presenza o assenza del fungo micorrizico (M) e alla interazione tra i due fattori (T x M). (ns = non significativo, ** = significativo per $P \leq 0.001$, *** = significativo per $P \leq 0.0001$)

Fonte di variazione	Media dei quadrati																	
	<i>CuZn Sodchl</i>	<i>CuZn Sodcytb</i>	<i>CuZn Sodcytc</i>	<i>CuZn Sodcytd</i>	<i>MnSod1</i>	<i>MnSod2</i>	<i>FeSod1</i>	<i>FeSod2</i>	<i>Cat1</i>	<i>Cat2</i>	<i>Apx chl</i>	<i>Apx cyt</i>	<i>Apx per</i>	<i>Grchl</i>	<i>Grcyt</i>	<i>Dhar</i>	<i>Ecs</i>	
T	Foglie	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	*	**	*	n.s.	n.s.	*	*	*	***	**	*	n.s.
	Radici	*	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	n.s.	*	**	n.s.	*	n.s.
M	Foglie	*	n.s.	*	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	*	**	n.s.	n.s.
	Radici	n.s.	*	*	***	**	*	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	n.s.	*	**	**	n.s.	*
T X M	Foglie	**	n.s.	**	*	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.
	Radici	**	n.s.	*	***	*	n.s.	n.s.	**	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabella 8. Verifica dell'ipotesi di uguaglianza tra le medie dei valori di espressione dei geni coinvolti nell'omeostasi dei metalli in relazione alla presenza o assenza di terreno contaminato (T), alla presenza o assenza del fungo micorrizico (M) e alla interazione tra i due fattori (T x M). (ns = non significativo, ** = significativo per $P \leq 0.001$, *** = significativo per $P \leq 0.0001$)

Fonte di variazine	Media dei quadrati								
	<i>MT1a</i>	<i>MT1b</i>	<i>MT2a</i>	<i>MT2b</i>	<i>MT3a</i>	<i>MT3b</i>	<i>Pcs1</i>	<i>Mtp2</i>	
T	Foglie	**	n.s.	**	*	n.s.	n.s.	**	**
	Radici	*	n.s.	-	***	-	*	n.s.	**
M	Foglie	*	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Radici	*	*	-	n.s.	-	*	n.s.	**
T X M	Foglie	**	n.s.	**	**	n.s.	*	n.s.	n.s.
	Radici	***	*	-	*	-	n.s.	n.s.	*

Real time qPCR

Per validare i dati ottenuti dal cDNA macroarray, l'abbondanza dei trascritti di tre geni coinvolti nella difesa antiossidante (*Apxper*, *Dhar*, *CuZnSodcytb*) e di due geni coinvolti nell'omeostasi dei metalli (*MT1a* e *Pcs*) è stata analizzata mediante RT-qPCR. Per ogni gene il \log_2 del valore ottenuto tramite cDNA macroarray è stato plottato contro il \log_2 del valore ottenuto con la RT-qPCR e le due serie di dati sono risultate altamente correlate (Fig. 4).

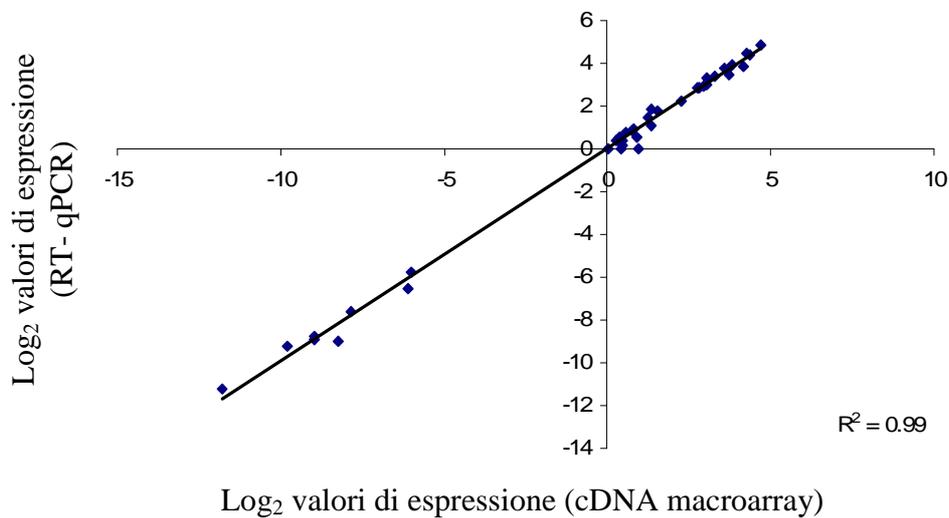


Fig 4. Correlazione tra i valori relativi di espressione espressi in forma logaritmica (base 2) dei geni *MnSod2*, *Dhar*, *Greyt*, *Pcs* e *MT1a* ottenuti con il cDNA macroarray e con la RT-qPCR.

Discussione

I dati ottenuti in questo studio hanno evidenziato che nelle piante di 'AL35' cresciute sul suolo contaminato la simbiosi con *G. mosseae* favorisce la crescita dei diversi organi, determina un maggior accumulo dei metalli rispetto alle piante non micorrizzate e influenza la regolazione di importanti geni di difesa dallo stress sia nelle radici che nelle foglie. In particolare la micorrizzazione in suolo contaminato riduce nelle radici l'espressione di geni coinvolti nel metabolismo del GSH e induce nelle foglie geni con un ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi dei metalli.

I dati raccolti sul grado di micorrizzazione, sull'accrescimento delle piante e sulla concentrazione dei metalli pesanti nel clone di pioppo 'AL35' sono stati recentemente pubblicati da Cikatelli et al. (2010). Gli autori riportano che il grado di colonizzazione micorrizica è in linea con studi precedenti sul pioppo (Neville et al. 2002; Quoreshi and Khasa 2008) e che l'assenza di arbuscoli potrebbe essere legata all'elevato livello di fosforo nel terreno (Smith and Read 1997) o alla specie della pianta o del clone (Lingua et al. 2008). Inoltre la simbiosi con il fungo *G. mosseae* ha determinato nelle piante di 'AL35' cresciute sul suolo contaminato uno sviluppo dei diversi organi paragonabile a quello delle piante cresciute sul suolo non contaminato, suggerendo che il fungo abbia esercitato sulla pianta un effetto di protezione nei confronti dei metalli pesanti (Cikatelli et al. 2010). In alcune interazioni è stato proposto che la maggior tolleranza della pianta favorita dalla micorrizzazione sia dovuta all'effetto diluizione', per cui il fungo stimola l'aumento della biomassa, riducendo la concentrazione di metalli nei tessuti (Lebeau et al. 2007). Tuttavia, poiché la concentrazione di Cu e Zn nelle piante micorrizzate cresciute sul suolo contaminato è risultata più elevata rispetto a quelle non micorrizzate non pare essere questa una spiegazione per quanto osservato in 'AL35' (Cikatelli et al. 2010). Inoltre secondo gli autori, la concentrazione dei metalli nei diversi organi delle piante osservata

nello studio è in accordo con altri studi sul pioppo. Infatti, l'accumulo del Cu principalmente a livello radicale è stato osservato in *P. deltoides* (Guerra et al. 2009), così come l'elevata traslocazione e accumulo dello Zn nelle foglie (Di Baccio et al. 2003; Lingua et al. 2008).

Espressione dei geni antiossidanti

Nelle radici di 'AL35' cresciute sul suolo di controllo la micorrizzazione ha causato la regolazione negativa della maggior parte dei geni antiossidanti. I sistemi antiossidanti svolgono un ruolo cruciale nelle cellule, poiché permettono di proteggere i tessuti dagli effetti tossici dei ROS, generati dall'attività metabolica dei mitocondri (Navrot et al. 2007) e dei cloroplasti (Foyer and Noctor 2003), ma anche da condizioni di stress, come l'eccesso di metalli pesanti (Schützendübel and Polle 2002). Finora gli effetti della simbiosi micorrizica sull'espressione dei geni antiossidanti delle piante sono stati poco studiati, tuttavia è stato evidenziato che essa determina un consistente rimodellamento del trascrittoma del fitobionte (Hohnjec et al. 2005). Nelle radici di 'AL35' la regolazione negativa della maggior parte dei geni antiossidanti, causata dalla simbiosi in assenza di stress da metalli pesanti, potrebbe essere legata ad un più efficace controllo dei ROS favorito dal fungo, per cui la pianta produrrebbe una minore quantità di molecole antiossidanti. Non è escluso che il fungo stesso possa contribuire con i propri enzimi antiossidanti alla difesa delle radici dallo stress ossidativo. Nelle foglie delle piante non micorrizzate *G. mosseae* ha determinato in generale un aumento nell'espressione dei geni antiossidanti i cui prodotti proteici sono attivi nel citosol e nei cloroplasti. Questi dati, parallelamente alla riduzione della biomassa fogliare osservata da Cikatelli et al. (2010), suggeriscono che la simbiosi con *G. mosseae* non eserciti un effetto di protezione delle foglie dallo stress ossidativo.

Sia nelle radici che nelle foglie delle piante non micorrizzate, la crescita sul terreno contaminato ha avuto come effetto l'induzione di quasi tutti i geni coinvolti nel ciclo dell'ascorbato-glutatione. Come molecola antiossidante e precursore delle fitochelatine, il GSH e il suo metabolismo giocano un importante ruolo nella risposta delle piante allo stress (Rennenberg and Brunold 1994; Xiang and Oliver, 1998). I nostri dati sono in accordo con Di Baccio et al. (2005), che hanno evidenziato l'importanza della molecola antiossidante GSH nella difesa dallo Zn in pioppo. Comunque, con l'eccezione dei geni del ciclo dell'ascorbato-glutatione, nelle radici non micorrizzate i metalli pesanti hanno causato una scarsa attivazione dei geni antiossidanti. Infatti dei diversi geni codificanti le SOD solo due presentano un aumento di espressione (*CuZnSodchl*, *FeSod2*). Secondo Schützendübel and Polle (2002) l'esposizione delle piante ad elevate concentrazioni di metalli pesanti redox-attivi, come il Cu, determina molto spesso un decremento e non un aumento nelle difese antiossidanti a causa del danneggiamento degli enzimi coinvolti nella detossificazione dei ROS. I nostri dati sono in accordo con questa ipotesi, poiché le piante analizzate hanno mostrato alti livelli di Cu nelle radici ed una crescita fortemente compromessa. Inoltre le risposte delle piante sottoposte ad uno stress prolungato sono in certi casi essere molto diverse da quelle che si verificano nelle prime fasi dello stress (Bougeat-Triboulot et al. 2007), che al contrario potrebbero aver coinvolto maggiormente questa categoria di geni. Al contrario delle radici, questo studio ha evidenziato nelle foglie un coinvolgimento generale dei geni antiossidanti nella difesa dall'eccesso di metalli pesanti nel suolo, suggerendo che tutti i compartimenti cellulari sono interessati da un aumento della produzione dei ROS. Questo potrebbe essere legato all'effetto dello Zn, siccome è noto che l'eccesso di questo metallo interferisce con i processi metabolici del cloroplasto (Van Assche and Clijsters 1986).

Nelle radici micorrizzate i metalli pesanti non hanno causato alcuna induzione dei geni coinvolti nel riciclo del GSH ridotto. Un effetto analogo è stato osservato in piante di *Pisum sativum* coltivate in presenza di elevati livelli di Cd, in cui la colonizzazione con *G. intraradices* ha causato la regolazione negativa di geni coinvolti nella biosintesi e nella riduzione del GSH (Rivera-Becerril et al. 2005). E' dunque possibile che il fungo abbia contribuito in qualche modo ad alleviare lo stress ossidativo indotto dai metalli pesanti, come suggerito da recenti studi (Andrade et al. 2009; Debiane et al. 2009). Non è escluso che la pianta possa beneficiare del contributo di metaboliti di difesa prodotti dal fungo stesso (Schützendübel and Polle 2002; Ouziad et al. 2005; Hildebrant et al. 2007) oppure, nel caso delle radici, del sequestro dei metalli nelle strutture del fungo (Rivera-Becerril et al. 2005). Nelle foglie la maggior parte dei geni antiossidanti sono risultati essere indotti dai metalli pesanti, anche in presenza della simbiosi con *G. mosseae*, probabilmente a causa degli elevati livelli di Zn presenti in questo organo sia nelle piante micorrizzate che in quelle non micorrizzate. Questi dati suggeriscono che, sulle foglie di 'AL35', il fungo micorrizico non abbia un effetto di protezione dallo stress ossidativo indotto dai metalli pesanti, ma solo sulle radici.

Espressione dei geni coinvolti nell'omeostasi dei metalli

Le MT sono proteine a basso peso molecolare ricche di residui di cisterna, importanti per regolare la concentrazione dei metalli nei tessuti delle piante (Kohler et al. 2004). Nelle radici delle piante di 'AL35' cresciute sul suolo di controllo la micorrizzazione ha causato la regolazione negativa dei geni MT e dei due geni coinvolti nella compartimentazione dei metalli nel vacuolo, *Mtp2* e *Pcs*. Al contrario, nelle foglie la simbiosi ha determinato l'induzione di *MT1a*, *MT1b*, *MT2a*, *MT3a* e *Mtp2*, sebbene nella maggior parte dei casi l'incremento è risultato contenuto. I dati ottenuti in questo studio suggeriscono la capacità

di *G. mosseae* di influenzare, anche in condizioni di crescita normali, i meccanismi di omeostasi dei metalli della pianta.

Il legame dei metalli a molecole chelanti nel citosol e la compartimentazione nel vacuolo rappresentano due importanti meccanismi di tolleranza delle piante nei confronti dei metalli pesanti (Hall 2002). Nelle piante di 'AL35' non micorrizzate cresciute sul suolo contaminato, i metalli pesanti hanno avuto effetto sia sulle radici, inducendo *MT2b*, che sulle foglie, inducendo in modo forte *MT1a* e *Mtp2* e in modo più lieve altre tre isoforme di geni MT (*MT1b*, *MT2a*, *MT3a*) e il gene *Pcs*. Possiamo supporre che l'attivazione di questi geni sia dovuta all'elevata concentrazione di Cu nelle radici e di Zn nelle foglie e alla necessità di ridurre la tossicità tramite il legame ai chelanti e/o alla compartimentazione nel vacuolo.

Nelle piante cresciute sul terreno contaminato la presenza di *G. mosseae* ha stimolato l'induzione di alcuni geni coinvolti nell'omeostasi dei metalli, sia nelle radici che nelle foglie, rispetto alle piante non inoculate. Infatti nelle radici di 'AL35' la combinazione dei due fattori ha causato l'induzione del gene *MT2b*, mentre nelle foglie ha indotto in modo forte *MT2a*, ma anche *MT1b*, *MT2b* e *Pcs*. Ouziad et al. (2005) hanno osservato, in contrasto con il presente studio, che in piante di pomodoro sottoposte a stress da metalli pesanti l'abbondanza del trascritto di un gene per MT (*Lemt2*) è stata ridotta dalla simbiosi con *G. intraradices*. Gli autori suggeriscono che la regolazione di *Lemt2* sia legata alla concentrazione dei metalli nelle cellule, poiché la regolazione negativa del gene nelle piante micorrizzate, rispetto a quelle non micorrizzate, si accompagnava ad una più bassa concentrazione di metalli pesanti nelle cellule della pianta. Al contrario, i nostri dati suggeriscono che l'induzione dei geni MT e del gene *Pcs* osservata nelle piante micorrizzate sia dovuta alla combinazione dei due stimoli (elevata concentrazione di metalli pesanti e FMA). Non è escluso che il fungo possa influenzare la regolazione di tali geni grazie a dei

segnali che agiscono sia a breve distanza sulle radici che a lunga distanza sulle foglie. Questo spiegherebbe anche l'induzione di alcuni geni coinvolti nell'omeostasi dei metalli, sebbene di lieve entità, causata da *G. mosseae* nelle foglie delle piante cresciute sul suolo non contaminato.

Conclusioni

La micorrizzazione di 'AL35' con *G. mosseae* ha favorito una maggior produzione di biomassa da parte delle piante rispetto ai controlli non inoculati e un maggiore accumulo dei metalli pesanti nei tessuti. Nelle radici di 'AL35' l'effetto benefico del fungo nella protezione dallo stress causato dai metalli pesanti appare associato con una generale riduzione nell'espressione dei geni antiossidanti, suggerendo la capacità del micobionte di esercitare un più efficace controllo dei livelli di ROS nelle cellule. Al contrario la simbiosi con *G. mosseae* nelle foglie appare stimolare i geni coinvolti nell'omeostasi dei metalli, consentendo ad 'AL35' di evitare gli effetti tossici causati dall'elevata concentrazione dei metalli pesanti nel citosol. Il presente studio ha mostrato che il pre-inoculo di 'AL35' con *G. mosseae* costituisce un'utile strategia per aumentare l'efficienza di questo clone nel processo di fitoestrazione.

BIBLIOGRAFIA

Abe H, Nakai T, Utsumi Y, Kagawa A (2003) Temporal water deficit and wood formation in *Cryptomeria japonica*. *Tree Physiol* 23:859–863

Ain-Lhout F, Zunzunegui M, Diaz Barradas MC, Tirado R, Clavijo A, Garcia Novo F (2001) Comparison of proline accumulation in two mediterranean shrubs subjected to natural and experimental water deficit. *Plant Soil* 230:175–183

Akashi K, Nishimura N, Ishida Y, Yokota A (2004) Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon. *Biochem Biophys Res Commun* 323: 72–78

Andrade SAL, Gratão PL, Schiavinato MA, Silveira APD, Azevedo RA and Mazzafera P (2009) Zn uptake, physiological response and stress attenuation in mycorrhizal jack bean growing in soil with increasing Zn concentrations. *Chemosphere* 75:1363-1370

Amor Y, Haigler CH, Johnson S, Wainscott M, Delmer DP (1995) A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9353-9357

Arend M, Fromm J (2007) Seasonal change in the drought response of wood cell development in poplar. *Tree Physiol* 27:985–992

Arndt SK, Clifford SC, Wanek W, Jones HG and Popp M (2001) Physiological and morphological adaptations of the fruit tree *Ziziphus rotundifolia* in response to progressive drought stress. *Tree Physiol* 21:705-715

Arru L, Rognoni S, Baroncini M, Bonatti PM, Perata P (2004) Copper localization in *Cannabis sativa* L. grown in a copper-rich solution. *Euphytica* 140:33-38

Asada K (1999) The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:601–639

Báčkor M, Váczi P, Barták M, Budová J and Dzubaj A (2007) Uptake, photosynthetic characteristics and membrane lipid peroxidation levels in the lichen photobiont *Trebouxia erici* exposed to copper and cadmium. *Bryologist* 110:100–107

Balestrini R and Lanfranco L (2006) Fungal and plant gene expression in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 16:509-524

Barnett JR (1981) Secondary xylem cell development. *Xylem Cell Development*, Castle House Publications Ltd, Tunbridge Wells, pp 47-95

Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39:205–207

Berta G, Fusconi A, Hooker JE (2002) Arbuscular mycorrhizal modifications to plant root systems. In: Gianinazzi S, Schuepp H (eds) *Mycorrhizal technology: from genes to bioproducts - achievement and hurdles in arbuscular mycorrhizal research*. Birkhäuser, Basel, pp 71–101

- Berta M, Giovannelli A, Caparrini S, Racchi ML (2006) Expression of antioxidant genes in relation to water deficit in cambium and leaves of poplar. *J Plant Interact* 1:223–227
- Berta G, Bona E, Cattaneo C, Marsano F, D’Agostino G, Lingua G et al. (2008) AM symbiosis improved As tolerance in the As-hyperaccumulating brake fern *Pteris vittata*: cytological and molecular study. *In Proceedings of the XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB)*, 17–22 August 2008, Tampere, Finland.
- Berta M, Giovannelli A, Potenza E, Traversi ML, Racchi ML (2009) Type 3 metallothioneins respond to water deficit in leaf and cambium of white poplar (*Populus alba*). *J Plant Physiol* 166:521–530
- Berta M, Giovannelli A, Sebastiani F, Camussi A, Racchi ML (2010) Transcriptome changes in the cambial region of poplar (*Populus alba* L.) in response to water deficit. *Plant Biology* 12:341-354
- Bi YL, Li XL, Christie P (2003) Influence of early stages of arbuscular mycorrhiza on uptake of zinc and phosphorus by red clover from a low-phosphorus soil amended with zinc and phosphorus. *Chemosphere* 50:831-837
- Bingham FT, Pereyca FJ, Jarrell WM (1986) Metal toxicity to agricultural crops. *Metal Ions Biol Syst* 20:119-156
- Bogeat-Triboulot MB, Brosché M, Renaut J, Jouve L, Le Thiec D, Fayyaz P, Vinocur B, Witters E, Laukens K, Teichmann T, Altman A, Hausman JF, Polle A, Kangasjüvi J, Dreyer E (2007) Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. *Plant Physiol* 143:876-892
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG (1995) Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7:1099–1111
- Bonhomme L, Monclus R, Vincent D, Carpin S, Lomenech AM, Plomion C, Brignolas F, Morabito D (2009) Leaf proteome analysis of eight *Populus x euramericana* genotypes: genetic variation in drought response and in water-use efficiency involves photosynthesis-related proteins. *Proteomics* 9:4121–4142
- Borghetti M, Edwards WRN, Grace J, Jarvis PG, Raschi A (1991) The refilling of embolized xylem in *Pinus sylvestris*. *Plant Cell Env* 14:357-369
- Braatne JH, Rood SB and Heilman PE (1996) Life history, ecology and conservation of riparian cottonwoods in North America. *In: Stettler RF, Bradshaw HD, Heilman PE and Hinckley TM (eds) Biology of Populus and its implications for management and conservation*, NRC Research Press, Ottawa, Canada, pp 57-86
- Bradshaw HD and Stettler RF (1994) Molecular genetics of growth and development in *Populus* II. Segregation distortion due to genetic load. *Theor Appl Genet* 89:551–558
- Bradshaw HD and Stettler RF (1995) Molecular genetics of growth and development in *Populus*. IV. Mapping QTLs with large effects on growth, form, and phenology traits in a forest tree. *Genetics* 139:963-973

- Bray E (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 2:48-54
- Brett C (2000) Cellulose microfibrils in plants: biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. *Int Rev Cytol* 199: 161-199
- Briat JF and Lebrun M (1999) Plant responses to metal toxicity. *CR Acad Sci Paris, Ser. III* 322:43-54
- Brkljacic JM, Samardzic JT, Timotijevic JS, Maksimovic VR (2004) Expression analysis of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Metallothionein-like gene (*MT3*) under different stress and physiological conditions. *J Plant Physiol* 161:741-746
- Brosché M, Vinocur B, Alatalo ER, Lamminmäki A, Teichmann T, Ottow EA, Djilianov D, Afif D, Bogeat-Triboulot MB, Altman A, Polle A, Dreyer E, Rudd S, Paulin L, Auvinen P, Kangasjävi J (2005) Gene expression and metabolite profiling of *Populus euphratica* growing in the Negev desert. *Genome Biol* 6:R101
- Brunner AM, Yakovlev IA, Strauss SH (2004) Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biol* 4:14
- Buchanan-Wollaston V (1994) Isolation of cDNA for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. *Plant Physiol* 105:839-846
- Burken JG (2003) Uptake and metabolism of organic compounds: green-liver model. In McCutcheon SC and Schnoor JL (ed) *Phytoremediation: Transformation and control of contaminants*. Wiley Publishers, NY, pp 59-84
- Burleigh SH, Kristensen BK and Bechmann IE (2003) A plasma membrane zinc transporter from *Medicago truncatula* is upregulated in roots by Zn fertilization, yet down-regulated by arbuscular mycorrhizal colonization. *Plant Mol Biol* 52:1077-1088
- Burns RM and Honkala BH (1990) *Silvics of North America*. Agricultural handbook 654. USDA Forest service, Washington, DC
- Caruso A, Cheddor F, Carpin S, Depierreux C, Delmotte F, Kahlemb G, Morabito D (2008) Physiological characterization and identification of genes differentially expressed in response to drought induced by PEG 6000 in *Populus canadensis* leaves. *J Plant Physiol* 165:932-941
- Casano LM, Gomez LD, Lascano HR, Gonzalez C, Trippi VS (1997) Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photo-oxidative stress. *Plant Cell Physiol* 38:433-440
- Castiglione S, Todeschini V, Franchin C, Torrigiani P, Gastaldi D, Cicutelli A, Rinaudo C, Berta G, Biondi S, Lingua G (2009) Clonal differences in survival capacity, copper and zinc accumulation, and correlation with leaf polyamine levels in poplar: a large-scale field trial on heavily polluted soil. *Environ Pollut* 157:2108-2117
- Cervera MT, Gusmão J, Steenackers M, Peleman J, Storme V et al. (1996) Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in *Populus*. *Theor Appl Genet* 93:733-73

- Chaffey NJ, Barnett JR, Barlow PW (1997) Endomembranes, cytoskeleton and cell walls: aspects of the ultrastructure of the vascular cambium of taproots of *Aesculus hippocastanum* L. (Hippocastanaceae). *Int J Plant Sci* 158:97-109
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS (2003) Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Funct Plant Biol* 30:239-26
- Cheeseman JM (2007) Hydrogen peroxide and plant stress: a challenging relationship. *Plant Stress* 1:4-15
- Chen HJ, Hou WC, Yang CY, Huang DJ, Liu JS, Lin YH (2003) Molecular cloning of two metallothionein-like protein genes with differential expression patterns from sweet potato (*Ipomoea batatas*) leaves. *J Plant Physiol* 160:547-555
- Cicatelli A, Lingua G, Todeschini V, Biondi S, Torrigiani P and Castiglione S (2010) Arbuscular mycorrhizal fungi restore normal growth in a white poplar clone grown on heavy metal contaminated soil, and this is associated with up-regulation of foliar metallothionein and polyamine biosynthetic gene expression. *Ann Bot-London* 106:791-802
- Citterio S, Prato N, Fumagalli P, Aina R, Massa N, Santagostino A, Sgorbati S, Berta G (2005) The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* induces growth and metal accumulation changes in *Cannabis sativa* L. *Chemosphere* 59:21-29
- Clemens S (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212:475-486
- Clemens S, Palmgren MG, Krämer U (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci* 7: 309–315
- Clemens S (2006) Evolution and function of phytochelatin synthases. *J Plant Physiol* 163:319-332
- Cobbett and Goldsbrough (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 53:159-82
- Coleman HD, Ellis DD, Gilbert M, Mansfield SD (2006) Up-regulation of sucrose synthase and UDP-glucose pyrophosphorylase impacts plant growth and metabolism. *Plant Biotechnol J* 4:87-101
- Coleman HD, Canam T, Kang KY, Ellis DD, Mansfield SD (2007) Overexpression of UDP-glucose pyrophosphorylase in hybrid poplar affects carbon allocation. *J Exp Bot* 58: 4257-4268
- Coleman HD, Yan J, Mansfield SD. (2009) Sucrose synthase affects carbon partitioning to increase cellulose production and altered cell wall ultrastructure. *P Natl Acad Sci Usa* 106:13118-13123
- Corcuera L, Camarero JJ, Gil-Pelegrín E (2004) Effect of a severe drought on *Quercus ilex* radial growth and xylem anatomy. *Trees-Struct Func* 18:83–92

- Cornic G (2000) Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture – not by affecting ATP synthesis. *Trends Plant Sci* 5:187–188
- Crombie DS, Milburn JA and Hipkins MF (1985) Maximum sustainable xylem sap tensions in *Rhododendron* and other species. *Planta* 163:27-33
- Cunningham SD and Ow DW (1996) Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol* 110:715-719
- De Vos CHR, Vonk MJ and Schat H (1992) Glutathione depletion due to copper induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiol* 98:853-858
- Debiane D, Garçon G, Verdin A, Fontaine J, Durand R, Shirali P, Grandmougin-Ferjani A and Sahraoui ALH (2009) Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an *in vitro* chicory root model. *Phytochem* 70:1421-1427
- Deikman J (1997) Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription. *Physiol Plantarum* 100:561-566
- Delrot S, Atanassova R, Maurousset L (2000) Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Biochim Biophys Acta* 1465:281-306
- Denne MP and Dodd RS (1981) The environmental control of xylem differentiation. In: Barnett JR (ed.) *Xylem cell development*. Castle House Publications Ltd, Kent, pp 236–255
- Desikan R, A-H-Mackerness S, Hancock JT, Neill SJ (2001) Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol* 127:159-172
- Deslauriers A, Morin H, Urbinati C, Carrer M (2003) Daily weather response of balsam fir (*Abies balsamea* (L.) Mill.) stem radius increment from dendrometer analysis in the boreal forests of Québec (Canada). *Trees-Struct Func* 17:477-484
- Deslauriers A and Morin H (2005) Intra-annual tracheid production in balsam fir stems and the effect of meteorological variables. *Trees* 19:402-408
- Deslauriers A, Giovannelli A, Rossi S, Castro G, Fragnelli G, Traversi L (2009) Intra-annual cambial activity and carbon availability in stem of poplar. *Tree Physiol*. doi:10.1093/treephys/tpp061
- Di Baccio D, Tognetti R, Sebastiani L, Vitagliano C (2003) Responses of *Populus deltoides* × *Populus nigra* (*Populus* × *euramericana*) clone I-214 to high zinc concentrations. *New Phytol* 159:443–452
- Di Baccio D, Copriva S, Sebastiani L and Rennenberg H (2005) Does glutathione metabolism have a role in the defence of poplar against zinc excess? *New Phytol* 167:73-80
- Dickmann DI and Stuart KW (1983) *The culture of poplars in Eastern North America*. Michigan State University, East Lansing, MI

- Dietz K-J, Baier M, Krämer U (1999) Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: Prasad MNV, Hagemeyer J (eds) Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems. Springer-Verlag, Berlin, pp 73-97
- Doblin MS, Kurek I, Jacob-Wilk D and Delmer DP (2002) Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant Cell Physiol* 43:1407-1420
- Domec JC, Gartner BL (2001) Cavitation and water storage capacity in bole xylem segments of mature and young Douglas-fir trees. *Trees-Struct Func* 15:204-214
- Domenech J, Mir G, Huguët G, Capdevila M, Molinas M, Atrian S (2006) Plant metallothionein domains: functional insight into physiological metal binding and protein folding. *Biochimie* 88:583-593
- Downes G, Beadle C, Worledge D (1999) Daily stem growth patterns in irrigated *Eucalyptus globulus* and *E. nitens* in relation to climate. *Trees-Struct Func* 14:102-111
- Dueck TA, Visser P and Ernst WHO (1986) Vesicular-arbuscular mycorrhizae decrease zinc toxicity to grasses growing in zinc polluted soil. *Soil Biol Biochem* 18:331-333
- Eckenwalder JE (1996) Systematics and evolution of *Populus*. In Stettler RF, Bradshaw HD, Heilman PE and Hinckley TM (eds) *Biology of Populus and its implications for management and conservation*, NRC Research Press, Ottawa, Canada, pp 7-32
- Ehleringer JR and Cooper TA (1992) On the role of orientation in reducing photoinhibitory damage in photosynthetic-twig desert shrubs. *Plant Cell Environ* 15:301-306
- Escalante-Pérez M, Lautner S, Nehls U, Selle A, Teuber M, Schnitzler JP, Teichmann T, Fayyaz P, Hartung W, Polle A, Fromm J, Hedrich R, Ache P (2009) Salt stress affects xylem differentiation of grey poplar (*Populus x canescens*). *Planta* 229:299-309
- Fagard M, Desnos T, Desprez T, Goubet F, Refregier G, Mouille G, McCann M, Rayon C, Vernhettes S and Höfte H (2000). PROCUSTE1 encodes a cellulose synthase required for normal cortical microtubule alignment in elongating cells. *Plant Physiol* 116:2409-2424
- FAO 1979. Poplars and willows in wood production and use. FAO Forestry Series 10. FAO, Rome, Italy
- Farmer JRE (1996) The genealogy of *Populus*. In Stettler RF, Bradshaw HD, Heilman PE and Hinckley TM (eds) *Biology of Populus and its implications for management and conservation*, NRC Research Press, Ottawa, Canada, pp. 33-50
- Flathman PE and Lanza GR (1998) Phytoremediation: current views on an emerging green technology. *J Soil Contam* 7:415-432
- Foy CD, Chaney RL and White MC (1978) The physiology of metal toxicity in plants. *Ann Rev Plant Physiol* 29:511-566
- Flexas J and Medrano H (2002) Drought inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitation revisited. *Ann Bot-London* 89:183-189

- Foyer CH and Halliwell B (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133:21-2
- Foyer CH, Descourvieres P, Kunert KJ (1994) Protection against oxygen radicals—an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ* 17:507–523
- Foyer CH, Noctor G (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol Plantarum* 119:355-364
- Foyer CH, Noctor G (2005) Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ* 28:1056–1071
- Frewen BE, Chen THH, Howe G, Davis J, Rohde A, Boerjan W and Bradshaw HD (2000) QTL and candidate gene mapping of bud set and bud flush in *Populus*. *Genetics* 154:837-845
- Fujino T and Itoh T (1998) Changes in the three dimensional architecture of the cell wall during lignification of xylem cells in *Eucalyptus tereticornis*. *Int J Biol Chem Phys Technol of Wood* 52:111-116
- Fusconi A, Repetto O, Bona E, Massa N, Gallo C, Dumas-Gaudot E et al. (2006) Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. *Environ Exp Bot* 58:253-260
- Gallego SM, Benavides MP and Tomaro ML (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci* 121:151-159
- Galli U, Schuepp H, Brunold C (1995) Thiol of Cu-treated maize plants inoculated with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Physiol Plantarum* 94:247-253
- Gebre GM, Tschaplinski TJ, Tuskan GA, Todd DE (1998) Clonal and seasonal differences in leaf osmotic potential and organic solutes of five hybrid poplar clones grown under field conditions. *Tree Physiol* 18:645-652
- Geisler-Lee J, Geisler M, Coutinho PM, Segerman B, Nishikubo N, Takahashi J, Aspeborg H, Djerbi S, Master E, Andersson-Gunnerås S, Sundberg B, Karpinski S, Teeri TT, Kleczkowski LA, Henrissat B and Mellerowicz EJ (2006). Poplar Carbohydrate-Active Enzymes. Gene Identification and Expression Analyses. *Plant Physiol* 140:946-962
- Getz HP, Knauer D and Willenbrink J (1987) Transport of sugars across the plasma membrane of beetroot protoplasts. *Planta* 171:185-196
- Giaquinta RT (1983) Phloem loading of sucrose. *Annu Rev Plant Physiol* 34:347-387
- Giovannelli A, Deslauriers A, Fragnelli G, Scaletti L, Castro G, Rossi S, Crivellaro A (2007) Evaluation of drought response of two poplar clones (*Populus x canadensis* Monch 'I-214' and *P. deltoides* Marsh. 'Dvina') through high-resolution analysis of stem growth. *J Exp Bot* 58:2673–2683
- Giovannetti M, Sbrana C, Avio L (2002) Arbuscular mycorrhizal fungal mycelium: from germlings to hyphal networks. In: Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM and Haselwandter K

- (ed) Mycorrhizal technology in agriculture: from genes to bioproducts. Birkhäuser, Basel, pp. 49-58
- Gogarten JP and Bentrup FW (1989) Substrate specificity of the hexose carrier in the plasma membrane of *Chenopodium* suspension cells probed by transmembrane exchange diffusion. *Planta* 178:52-60
- Goldsbrough P (2000) Metal tolerance in plants: the role of phytochelatins and metallothioneins. In Terry N, Banuelos G (eds) *Phytoremediation of contaminated soil and water*. CRC Press LLC, Boca Raton, FL, pp 221-233
- Grill E (1989) Phytochelatins in plants. In Hamer DH, Winge DR (eds) *Metal ion homeostasis: molecular biology and biochemistry*. Alan R Liss, New York, pp 283-300
- Grunze N, Willmann M, Nehls U (2004) The impact of ectomycorrhiza formation on monosaccharide transporter gene expression in poplar roots. *New Phytologist* 164:147-155
- Gucci R, Xiloyannis C, Flore JA (1991) Gas exchange parameters, water relations and carbohydrate partitioning in leaves of field-grown *Prunus domestica* following fruit removal. *Physiol Plant* 83:497-505
- Guerra F, Duplessis S, Kohler A, Martin F, Tapias J, Lebeda P, Zamudio F, González E (2009) Gene expression analysis of *Populus deltoides* roots subjected to copper stress. *Environ Exp Bot* 67: 335-344
- Haigler CH and Brown RM (1986) Transport of rosettes from the Golgi apparatus to the plasma membrane in isolated mesophyll cells of *Zinnia elegans* during differentiation to tracheary elements in suspension culture. *Protoplasma* 134:111-120
- Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* 53:112
- Hamer DH (1986) Metallothionein. *Annu Rev Biochem* 55:913-951
- Hamilton EW, Heckathorn SA (2001) Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiol* 126:1266-1274
- Hare PD, Cress WA, Van Staden J (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ* 21:535-553
- Hare PD, Cress WA, Van Staden J (1999) Proline synthesis, degradation; a model system for elucidating stress related signal transduction. *J Exp Bot* 50:413-434
- Hartley-Whitaker J, Ainsworth G, Vooijs R, Ten-Bookum W, Schat H, Mehari AA (2001) Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerant *Holcus lanatus*? *New phytol* 155:219-225
- Hauch S and Magel E (1998) Extractable activities and protein content of sucrose-phosphate synthase, sucrose synthase and neutral invertase in trunk tissues of *Robinia pseudoacacia* L. are related to cambial wood production and heartwood formation. *Planta* 207:266-274

- Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesomepele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR. *Genome Biol* 8:R19.1–R19.4
- Hertzberg M, Aspeborg H, Schrader J, Andersson A, Erlandsson R, Blomqvist K, Bhalerao R, Uhlén M, Teeri TT, Lundeberg J, Sundberg B, Nilsson P, Sandberg G (2001) A transcriptional roadmap to wood formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:14732–14737
- Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H (2007) Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance *Phytochemistry* 68:139-146
- Hizukuri S (1986) Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydr Res* 147:342
- Hohnjec N, Vieweg MF, Pühler A, Becker A, Küster H (2005) Overlaps in the transcriptional profiles of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different *Glomus* fungi provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol* 137:1283-1301
- Holleman AF, Wiberg E (1985) *Lehrbuch der anorganischen chemie*. Walter de Gruyter, Berlin p 868.
- Howden R, Goldsbrough PB, Andersen CR, Cobbett CS (1995) Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol* 107:1059-1066
- Hsu YT and Kao CH (2004) Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regul* 42:227-238
- Iyer S and Caplan A (1998) Products of proline catabolism can function as pleiotropic effectors in rice. *Plant Physiol* 116: 203-211
- Jackson RB, Sperry JS and Dawson TE (2000) Root water uptake and transport: Using physiological processes in global predictions. *Trends Plant Sci* 5:482-488
- Jamal A, Ayub N, Usman M, Khan AG (2002) Arbuscular mycorrhizal fungi enhance zinc and nickel uptake from contaminated soil by soybean and lentil. *Int J Phytoremediation* 4:205-221
- James MG, Denyer K, Myers AM (2003) Starch synthesis in the cereal endosperm. *Curr Opin Plant Biol* 6:215–222
- Jarvis PG and McNaughton KG (1986) Stomatal control of transpiration: scaling up from leaf to region. *Adv Ecol Res* 15:1-49
- Jepsen E (1994) Ozone and acid deposition gradient and biomonitoring site selection in Winsconsin. In Proceedings 18th International meeting on Air pollution effects and forest ecosystems. Sept. 7-9, 1994, Fredericton, NB, Canada.
- Jouanin L, Brasileiro ACM, Leple JC, Pilate G and Cornu D (1993) Genetic transformation: A short review of methods and their applications, results and perspectives for forest trees. *Ann Sci For* 50:325-336

- Karpinska B, Wingsle G and Karpinski S (2000) Antagonistic effects of hydrogen peroxide and glutathione on acclimation to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *IUBMB Life* 50:21-6
- Kleczkowski LA, Villand P, Lonneborg A, Olsen O-A, Liithi E (1991) Plant ADP-glucose pyrophosphorylase-recent advances and biotechnological perspectives. *Z Naturforsch* 46c: 605-612
- Kleczkowski LA (1994) Glucose activation and metabolism through UDP-glucose pyrophosphorylase in plants. *Phytochemistry* 37:1507-1515
- Kleczkowski LA, Geisler M, Ciereszko I, Johansson H (2004) UDP-glucose pyrophosphorylase. An old protein with new tricks. *Plant Physiol* 134:912-918
- Knight H and Knight MR (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci* 6:262-267
- Koca H, Ozdemir F, Turkan I (2006) Effect of salt stress on lipid peroxidation and superoxide dismutase and peroxidase activities of *Lycopersicon esculentum* and *L. Pennellii*. *Biol Plantarum* 50:745-748
- Koch K (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr Opin Plant Biol* 7:235-246
- Kohler A, Blaudez D, Chalot M, Martin F (2004) Cloning and expression of multiple metallothioneins from hybrid poplar. *New Phytol* 164:83-93
- Kolosova N, Miller B, Ralph S, Ellis BE, Douglas C, Ritland K, Bohlmann J (2004) Isolation of high-quality RNA from gymnosperm and angiosperm trees. *BioTechniques* 36:821-824
- Konishi T, Ohmiya Y, Hayashi T (2004) Evidence that sucrose loaded into the phloem of a poplar leaf is used directly by sucrose synthase associated with various beta-glucan synthases in the stem. *Plant Physiol* 134:1146-1152
- Kono Y, Fridovich I (1982) Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 257:5751-5754
- Kosugi H, Kikugawa K (1985) Thiobarbituric acid reaction of aldehydes and oxidized lipids in glacial acetic acid. *Lipids* 20:915-921
- Kozlowski TT (1992) Carbohydrate sources and sinks in woody plants. *Bot Rev* 58:107-222
- Kozlowski TT, Pallardy SG (2002) Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. *Bot Rev* 68:270-334
- Kramer PJ (1983) Water relations of plants. Academic Press, Orlando
- Krupa Z and Moniak M (1998) The stage of leaf maturity implicates the response of the photosynthetic apparatus to cadmium toxicity. *Plant Sci* 138:149-156

- Langer K, Ache P, Geiger D, Stinzing A, Arend M., Wind C, Regan S, Fromm J, Hedrich R (2002) Poplar potassium transporters capable of controlling K⁺ homeostasis and K⁺-dependent xylogenesis. *Plant J* 32:997-1009
- Larson PR (1994) The vascular cambium. Development and structure. Springer Verlag, Berlin
- Laureysens I, Blust R, de Temmerman L, Lemmens C, Ceulemans R (2004) Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture: I. Seasonal variation in leaf, wood and bark concentrations. *Environ Pollut* 131:485-494
- Laureysens I, De Temmerman L, Hastir T, Van Gysel M, Ceulemans R (2005) Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a polar coppice culture. II Vertical distribution and phytoextraction potential. *Environ Pollut* 133:541-551
- Lawlor DW, Cornic G (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ* 25:275–294
- Lebeau T, Braud A, Jézéquel K (2008) Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review. *Environ Pollut* 153:497-522
- LeDuc DL and Terry N (2005) Genetic engineering stress tolerant plants for phytoremediation. In: Rai AK and Takabe T (eds) *Abiotic Stress Tolerance in Plants*, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Lei Y, Yin C, Li C (2006) Differences in some morphological, physiological and biochemical responses to drought stress in two contrasting populations of *Populus przewalskii*. *Physiol Plantarum* 127:182-191
- Levitt J (1972) Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York.
- Lewis S, Handy RD, Cordi B, Billingham Z, Depledge MH (1999) Stress proteins (hsp's): methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology* 8:351-368
- Lewis S, Donkin ME, Depledge MH (2001) Hsp expression in *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) exposed to environmental stressors. *Aquat toxicol* 51:277-291
- Leyval C, Jones EJ, del Val C, Haselwandter K (2002) Potential of arbuscular mycorrhizal fungi for bioremediation. In: Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K (eds) *Mycorrhizal Technology in Agriculture*, Birkhäuser, Basel, pp 175-186
- Li TH and Li SH (2005) Leaf responses of micropropagated apple plants to water stress: nonstructural carbohydrate composition and regulatory role of metabolic enzymes. *Tree Physiol* 25:495-504
- Lin AJ, Zhang XH, Wong MH, Ye ZH, Lou LQ, Wang YS and Zhu YG (2007) Increase of multi-metal tolerance of three leguminous plants by arbuscular mycorrhizal fungi colonization. *Environ Geochem Health* 29:473-481

- Lingua G, Franchin C, Todeschini V, Castiglione S, Biondi S, Burlando B, Parravicini V, Torrigiani P, Berta G (2008) Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones. *Environ Pollut* 153:137-147
- Lorraine EW, Lemoine R and Sauer N (2000) Sugar transporters in higher plants – a diversity of roles and complex regulation. *Trends Plant Sci* 5:283-290
- Ludlow MM (1989) Strategies in response to water stress. In: Kreeb HK, Richter H, Hinkley TM (eds) *Structural and functional response to environmental stresses: water Shortage*. SPB Academic Press, The Netherlands, pp 269–281
- Malenčić D, Popović M, Miladinović J (2003) Stress tolerance parameters in different genotypes of soybean. *Biol Plantarum* 46:141-143
- Marron N, Delay D, Petit JM, Dreyer E, Kahlem G, Delmotte FM, Brignolas F (2002) Physiological traits of two *Populus* × *euramericana* clones, Luisa Avanzo and Dorskamp, during a water stress and re-watering cycle. *Tree Physiol* 22:849–858
- Maynard JW and Lucas WJ (1982) Sucrose and glucose uptake in *Beta vulgaris* leaf tissue. A case for a general (apoplastic) retrieval system. *Plant Physiol* 70:1436-1443
- McDowell N, Pockman WT, Allen CD, Breshears DD, Cobb N, Kolb T, Sperry J, West A, Williams D and Yepez EA (2008) Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *Tansley Review. New Phytol* 178:719–739
- Menconi M, Sgherri CLM, Pinzino C, Navarri-Izzo F (1995) Activated oxygen production and detoxification in wheat plants subjected to a water-deficit program. *J Exp Bot* 46:1123–1130
- Meyer AJ (2008) The integration of glutathione homeostasis and redox signalling. *J Plant Physiol* 165:1390–1403
- Miller G, Shulaev V, Mittler R (2008) Reactive oxygen signalling and abiotic stress. *Physiol Plant* 133:481–489
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405-410
- Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci* 11:15–19
- Monclus R, Dreyer E, Delmotte FM, Villar M, Delay D, Boudouresque E, Petit JM, Marron N, Bréchet C., Brignolas F (2005) Productivity, leaf traits and carbon isotope discrimination in 29 *Populus deltoides* × *P. nigra* clones. *New Phytol* 167:53-62
- Monclus R, Dreyer E, Villar M, Delmotte FM, Delay D, Petit JM, Barbaroux C, Le Thiec D, Bréchet C, Brignolas F (2006) Impact of drought on productivity and water use efficiency in 29 genotypes of *Populus deltoides* × *Populus nigra*. *New Phytol* 169:765–777

- Morabito D and Guerrier G (2000) The free oxygen radical scavenging enzymes and redox status in roots and leaves of *Populus x euramericana* in response to osmotic stress, desiccation and rehydration. *J Plant Physiol* 157:74–80
- Morgan JM (1984) Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35:299–319
- Mueller SC, Brown RM (1980) Evidence for an intramembrane component associated with a cellulose microfibril synthesizing complex in higher plants. *J Cell Biol* 84:315-326
- Muller PY, Janovjak H, Miserez AR and Dobbie Z (2002) Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques* 32:1372-1379
- Munns R (2005) Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol* 167:645-663
- Navarri-Izzo F, Pinzino C, Quartacci MF, Sgherri CLM (1994) Intracellular membranes: kinetics of superoxide production and changes in thylakoids of resurrection plants upon dehydration and rehydration. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B* 102B, pp 187–191.
- Navrot N, Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot J-P (2007) Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiol Plantarum* 129:185–195
- Neumann D, Lichtenberger O, Gunter D, Tschiersch K and Nover L (1994) Heat-shock proteins induce heavy metals tolerance in higher plants. *Planta* 194:360-367
- Neumann D, Nieden UZ, Lichtenberger O, Leopold I (1995) How does *Armeria maritima* tolerate high heavy metal concentrations? *J Plant Physiol* 146:704-717
- Neville J, Tessier JL, Morrison I, Scarratt J, Canning B, Klironomos JN (2002) Soil depth distribution of ecto- and arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Populus tremuloides* within a 3-year-old boreal forest clear-cut. *Appl Soil Ecol* 19:209-216
- Newcombe G and Bradshaw HD (1996) Quantitative trait loci conferring resistance in hybrid poplar to *Septoria populicola*, the cause of leaf spot. *Can J For Res* 26:1943-1950
- Newcombe G, Bradshaw HD, Chastagner GA and Stettler RF (1996) A major gene for resistance to *Melampsora medusae* f. sp. *deltoideae* in a hybrid poplar pedigree. *Phytopathology* 86:87-94
- Nielsen KB, Kjoller R, Olsson PA, Schweiger PF, Andersen FO, Rosendahl S (2004) Colonisation and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the aquatic plants *Littorella uniflora* and *Lobelia dortmanna* in southern Sweden. *Mycol Res* 108:616-625
- Noctor G, Foyer CH (1998) Simultaneous measurement of foliar glutathione, gamma-glutamylcysteine, and amino acids by high-performance liquid chromatography: comparison with two other assay methods for glutathione. *Anal Biochem* 264: 98–110
- Noiraud N, Delrot S, Lemoine R (2000) The sucrose transporter of celery: Identification and expression during salt stress. *Plant Physiol* 122:1447-1455

- Ouziad F, Hildebrandt U, Schmelzer E, Bothe H (2005) Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress. *J Plant Physiol* 162:634-649
- Pallardy SG, Rhoads JL (1997) Drought effects on leaf abscission and leaf production in *Populus* clones. In: Pallardy SG, Cecich RA, Garrett HE, Johnson PS (eds) Proceedings 11th central hardwood forest conference. North Central Forest Experiment Station, general technical report, NC-188. Washington, DC, USA, US Department of Agriculture, Forest Service, pp 374-384
- Passioura JB and Fry SC (1992) Turgor and cell expansion: beyond the Lockhart equation. *Austral J Plant Physiol* 19:565-576
- Pastori GM, Foyer CH (2002). Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of 'redox' and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol* 129:7460-7468
- Petit J.R, Basile I, Leruyet A, Raynaud D, Lorius C, Jouzel J, Stievenard M, Lipenkov VY, Barkov NY, Kudryashov BB, Davis M, Saltzman E and Kotlyakov V (1997) Four climate cycles in the Vostok ice core. *Nature* 387:359
- Peuke AD, Schraml C, Hartung W, Rennenberg H (2002) Identification of drought-sensitive beech ecotypes by physiological parameters. *New Phytol* 154:373-387
- Pfannschmidt T (2003) Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci* 8:33-41
- Pilon-Smits EAH (2005) Phytoremediation *Annu Rev Plant Biol* 56:15-39
- Plomion C, Leprovost G and Stokes A (2001) Wood formation in trees. *Plant Physiol* 127:1513-1523
- Plomion C, Lalanne C, Claverol S, Meddour H, Kohler A, Bogeat-Triboulot MB, Barre A, Le Provost G, Dumazet H, Jacob D, Bastien C, Dreyer E, de Daruvar A, Guehl JM, Schmitter JM, Martin F, Bonneau M (2006) Mapping the proteome of poplar and application to the discovery of drought-stress responsive proteins. *Proteomics* 6:6509-6527
- Preiss J (1991) Biology and molecular biology of starch synthesis and its regulation. In Mifflin BJ (ed) *Oxford Surveys of Cellular and Molecular Biology*, Oxford University Press, Oxford, 7: 59-114
- Punshon T, Dickinson NM (1997) Mobilization of heavy metals using short-rotation coppice. *Aspects Appl Biol* 49:285-292
- Quick WP, Chaves MM, Wendler R, David M, Rodrigues ML, Passaharinho JA, Pereira JS, Adcock MD, Leegood RC and Stitt M (1992) The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant Cell Environ* 15:25-35
- Quoreshi AM, Khasa DP (2008) Effectiveness of mycorrhizal inoculation in the nursery on root colonization, growth, and nutrient uptake of aspen and balsam poplar. *Biomass Bioenerg* 32:381-391

- Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Monitoring expression profiles of rice (*Oryza sativa* L.) genes under cold, drought and high-salinity stresses, and ABA application using both cDNA microarray and RNA gel blot analyses. *Plant Physiol* 133:1755-1767
- Rajendrakumar CSV, Reddy BVB, Reddy AR (1994) Proline-protein interactions: Protection of structural and functional integrity of M₄ lactate-dehydrogenase. *Biochem Bioph Res Co* 201:957–963
- Rampino P, Pataleo S, Gerardi C, Mita G, Perrotta C (2006) Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant Cell Environ* 29:2143–2152
- Raskin I, Smith RD and Salt DE (1997) Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Curr Opin Biothec* 8:221-226
- Rea PA, Li Z-S, Lu Y-P, Drozdowicz YM (1998). From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Annu Rev Plant Phys* 49:727-760
- Read DJ (1991) Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia* 47:376-391
- Regier N, Streb S, Cocozza C, Schaub M, Cherubini P, Zeeman SC, Frey B (2009) Drought tolerance of two black poplar (*Populus nigra* L.) clones: contribution of carbohydrates and oxidative stress defence. *Plant Cell Environ* 32:1724-1736
- Reiter WD, Vanzin GF (2001) Molecular genetics of nucleotide sugar interconversion pathways in plants. *Plant Mol Biol* 47:95-113
- Ren J, Dai WR, Xuan, ZY, Yao YN, Korpelainen H, Li CY (2007) The effect of drought and enhanced UV-B radiation on the growth and physiological traits of two contrasting poplar species. *Forest Ecol Manag* 239:112–119
- Rennenberg H, Brunold C (1994) Significance of glutathione metabolism in plants under stress. *Prog Bot* 55:142-156
- Rivera-Becerril F, van Tuinen D, Martin-Laurent F, Metwally A, Dietz K-J, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (2005) Molecular changes in *Pisum sativum* L. roots during arbuscular mycorrhiza buffering of cadmium stress. *Mycorrhiza* 16:51-60
- Robinson NJ, Tommey AM, Kuske C, Jackson PJ (1993) Plant metallothioneins. *Biochem J* 295:110
- Rosendahl S (2008) Communities, populations and individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 178:253-266
- Rossi S, Deslauriers A, Anfodillo T, Morin H, Saracino A, Motta R and Borghetti M (2006) Conifers in cold environments synchronize maximum growth rate of tree-ring formation with day length. *New Phytol* 170:301–310

- Rozen S, Skaletzki H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365–386
- Sairam RK, Deshmukh PS and Saxena DC (1998) Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biol Plantarum* 41:387-394
- Salt DE, Thurman DA, Tomsett AB, Sewell AK (1989) Copper phytochelatins of *Mimulus guttatus*. *Proc Royal Soc B, London* 236:79-89
- Salt DE and Wagner GJ (1993) Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiport activity. *J Biol Chem* 268:12297-12302
- Salt DE, Kato N, Krämer U, Smith RD, Raskin I (2000) The role of root exudates in nickel hyperaccumulation and tolerance in accumulator and nonaccumulator species *Thlaspi*. In: Terry N, Banuelos G (eds) *Phytoremediation of contaminated soil and water*. CRC Press LLC, pp 189-200
- Samardžić JT, Nikolić DB, Timotijević GS, Jovanović ZS, Milisavljević MD, Maksimović VR (2010) Tissue expression analysis of *FeMT3*, a drought and oxidative stress related metallothionein gene from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *J Plant Physiol*. doi:10.1016/j.jplph.2010.05.016
- Samuel D, Kumar TK, Ganesh G, Jayaraman G, Yang PW, Chang MM, Trivedi VD, Wang SL, Hwang KC, Chang DK, Yu C (2000) Proline inhibits aggregation during protein refolding. *Protein Sci* 9:344-352
- Saradhi PP, Arora S and Prasad KVSK (1995) Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against induced peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 290:1-5
- Sauter JJ (2000) Photosynthate allocation to the vascular cambium: facts and problems. In: R. Savidge, J. Barnett and R. Napier (Eds) *Exptl Biol Rev*, BIOS Scientific Publications, Oxford, pp 71–83
- Schrader S and Sauter JJ (2002) Seasonal changes of sucrosephosphate synthase and sucrose synthase activities in poplar wood (*Populus x canadensis* Moench ‘Robusta’) and their possible role in carbohydrate metabolism. *J Plant Physiol* 159:833-843
- Schrader J, Nilsson J, Mellerowickz E, Berglund A, Nilsson P, Hertzberg M, Sandberg G (2004) A high-resolution transcript profile across the wood-forming meristem of poplar identifies potential regulators of cambial stem cell identity. *Plant Cell* 16:2278-2292
- Schützendübel A, Polle A (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* 53:1351-1365
- Sebastiani L, Scebba F, Tognetti R (2004) Heavy metal accumulation and growth responses in poplar clones Eridano (*Populus deltoides* × *maximowiczii*) and I-214 (*P. × euramericana*) exposed to industrial waste. *Environ Exp Bot* 52:79-88
- Selote DS, Khanna-Chopra R (2006) Drought acclimation confers oxidative stress tolerance by inducing co-ordinated antioxidant defense at cellular and subcellular level in leaves of wheat seedlings. *Physiol Plantarum* 127: 494–506

- Shingles R, Wimmers LE, McCarty RE (2002) Copper transport across pea thylakoid membranes. *Plant Physiol* 135:145–151
- Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot* 58:221-227
- Shiratake K (2008) Sugar and polyol transporters in plants. In: Jaiwal PK, Singh RP and Dhankher OP (ed) *Plant membrane and vacuolar transporters*. CAB International, Oxfordshire, UK, pp 239-266
- Skaar C (1988) *Wood-water relations*. Springer Verlag, Berlin
- Smirnoff N, Colomé SV (1988) Drought influences the activity of the chloroplast hydrogen peroxide scavenging system. *J Exp Bot* 39:1097–1108
- Smirnoff N (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol* 125:27–58
- Smith SE, Read DJ (1997) *Mycorrhizal symbioses*. 2nd edn, Academic Press, San Diego
- Smith AM, Stitt M (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Environ* 30: 1126–1149
- Smulders MJM, Cottrell JE, Lefevre F, van der Schoot J, Arens P, Vosman B et al. (2008) Structure of the genetic diversity in black poplar (*Populus nigra* L.) populations across European river systems: Consequences for conservation and restoration. *Forest Ecol Manag* 255:1388-1399
- Socias X, Correia MJ, Chaves M, Medrano H (1997) The role of abscisic acid and water relations in drought responses of subterranean clover. *J Exp Bot* 48:1281–1288
- Sofa A, Tuzio AC, Dichio B, Xiloyannis C (2005) Influence of water deficit and rewatering on the components of the ascorbate-glutathione cycle in four interspecific *Prunus* hybrids. *Plant Sci* 169:403–412
- Sturm A, Chrispeels MJ (1990) cDNA cloning of carrot extracellular β -fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. *Plant Cell* 2:1107-1119
- Subbaiah CC and Sachs MM (2001) Altered patterns of sucrose synthase phosphorylation and localization precede callose induction and root tip death in anoxic maize seedlings. *Plant Physiol* 125: 585-594
- Sundaresan P, Raja NU, Gunasekaran P (1993) Induction and accumulation of phytoalexins in cowpea roots infected with the mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and their resistance to Fusarium wilt disease. *J Biosci* 18:291-301
- Sundaresan S, Sudhakaran PR (1995) Water stress-induced alterations in the proline metabolism of drought-susceptible and -tolerant cassava (*Manihot esculenta*) cultivars. *Physiol Plantarum* 94:635–642

- Tamura T, Hra K, Yamaguchi Y, Koizumi N and Sano H (2003) Osmotic stress tolerance of transgenic tobacco expressing a gene encoding a membrane-located receptor-like protein from tobacco plants. *Plant Physiol* 131:454–462
- Taylor NG, Scheible WR, Cutler S, Somerville CR and Turner SR (1999) The irregular xylem3 locus of *Arabidopsis* encodes a cellulose synthase required for secondary cell wall synthesis. *Plant Cell* 11:769–779
- Thomine S, Wang RC, Ward JM, Crawford NM, Schroeder JI (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4991-4996
- Tomsett AB, Thurman DA (1988) Molecular biology of metal tolerance of plants. *Plant Cell Environ* 11:383-394
- Tonin C, Vandenkoornhuysse P, Joner EJ, Straczek J, Leyval C (2001) Assessment of arbuscular mycorrhizal fungi diversity in the rhizosphere of *Viola calaminaria* and effect of these fungi on heavy metal uptake by clover. *Mycorrhiza* 10:161-168
- Trotta A, Varese GC, Gnani E, Fusconi A, Sampò S and Berta G (1996) Interactions between the soilborne pathogen *Phytophthora nicotianae* var *parasitica* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* in tomato plants. *Plant Soil* 185:199-209
- Trouvelot A, Kough JL and Gianinazzi-Pearson V (1986) Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In : Gianinazzi-Pearson V and Gianinazzi S (eds) *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*, INRA Press, Paris, pp 217-221
- Tschaplinski TJ, Tuskan GA (1994) Water stress tolerance of black cottonwood and eastern cottonwood clones and four of their hybrid progeny. II. Metabolites and inorganic ions that constitute osmotic adjustment. *Can J Forest Res* 24:681–687
- Tsugane K, Kobayashi K, Niwa Y, Ohba Y, Wada K, Kobayashi H (1999) A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell* 11:1195-1206
- Tubbe A and Buckhout TJ (1992) *In vitro* analysis of the H⁺-hexose symporter on the plasma membrane of sugarbeets (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physiol* 99:945-951
- Tuominen H, Puech L, Fink S, Sundberg B (1997) A radial concentration gradient of indole-3-acetic acid is related to secondary xylem development in hybrid aspen. *Plant Physiol* 115:577-585
- Turner NC (1986) Crop water deficits, a decade of progress. *Adv Agron* 39:1-51
- Tuskan GA, DiFazio SP, Teichmann T (2003) Poplar genomics is getting popular: the impact of the poplar genome project on tree research. *Plant Biol* 5:1-3
- Tuskan GA, Di Fazio S, Jansson S, et al. (2004) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313:1596–1604

- Tyree MT, Ewers FW (1991) The hydraulic architecture of trees and other woody plants. *New Phytol* 119:345-360
- Van Assche F and Clijsters H (1986) Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentrations of zinc: effects on electron transport and photophosphorylation *Physiol Plantarum* 66:717-721
- Van der Zaal BJ, Neuteboom LW, Pinas JE, Chardonnnes AN, Schat H, Verkleji JAC, Hooykaas PJJ (1999) Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiol* 119:1047-1055
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalisation of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Gen Biol* 3:1-12
- Vangronsveld J, Van Assche F, Clijsters H (1995) Reclamation of a bare industrial area, contaminated by non-ferrous metals: *In situ* metal immobilization and revegetation. *Environmental Pollution* 87:51-59
- Vierling V (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42:579-620
- Villar M, Lefevre F, Bradshaw HD and Teissier du Cros E (1996) Molecular genetics of rust resistance in poplars (*Melampsora larici-populina* Kleb./*Populus* sp.) by bulked segregant analysis in a 2 x 2 factorial mating design. *Genetics* 143:531-536
- Ward J, Kühn C, Tegeder M and Frommer WB (1998) Sucrose transport in plants. *Int Rev Cytol* 178:41-71
- Watkinson JJ, Hendricks L, Sioson AA, Vasquez-Robinet C, Stromberg V Heath LS, Schuler M, Bohnert HJ, Bonierbale M and Grene R (2006) Accessions of *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* show differences in photosynthetic recovery after drought stress as reflected in gene expression profiles. *Plant Sci* 171:745-758
- Weber H, Borisjuk L, Heim U, Buchner P, Wobus U (1995) Seed coat-associated invertases of fava bean control both unloading and storage functions: cloning of cDNAs and cell type-specific expression. *Plant Cell* 7:1835-1846
- Weissenhorn I, Leyval C, Belgy G, Berthelin J (1995) Arbuscular mycorrhizal contribution to heavy metal uptake by maize (*Zea mays* L.) in pot culture with contaminated soil. *Mycorrhiza* 5:245-251
- White DA, Beadle CL, Worledge D (1996) Leaf water relations of *Eucalyptus globulus* ssp. *Globulus* and *E. nitens*: seasonal, drought and species effects. *Tree physiol* 16:469-476
- Winter H and Huber SC (2000) Regulation of sucrose metabolism in higher plants. Localization and regulation of activity of key enzymes. *Crit Rev Plant Sci* 19:31-67
- Wong HL, Sakamoto T, Kawasaki T, Umemura K, Shimamoto K (2004) Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. *Plant Physiol* 135:1447-1456

- Wong MH (2003) Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere* 50:775-780
- Wu H, Tang S, Zhang X, Guo J, Song Z, Tian S, Smith DL (2009) Using elevated CO₂ to increase the biomass of a *Sorghum vulgare* x *Sorghum vulgare* var. sudanense hybrid and *Trifolium pratense* L. and to trigger hyperaccumulation of cesium. *J Hazard Mater* 170:861-70
- Xiang C, Oliver DJ (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1539-1550
- Xiao X, Xu X, Yang F (2008) Adaptive responses to progressive drought stress in two *Populus cathayana* populations. *Silva Fenn* 42:705-719
- Xiao X, Yang F, Zhang S, Korpelainen H, Li C (2009) Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress. *Physiol Plantarum* 136:150-168
- Xue T, Li X, Zhu W, Wu C, Yang G, Zheng C (2009) Cotton metallothionein *GhMT3a*, a reactive oxygen species scavenger, increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast. *J Exp Bot* 60:339-349
- Yamamoto Y, Hachiya H and Matsumoto H (1997) Oxidative damage to membranes by a combination of aluminum and iron in suspension cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol* 38:1333-1339
- Yin C, Wang X, Duan B, Luo J, Li C (2005) Early growth, dry matter allocation and water use efficiency of two sympatric *Populus* species as affected by water stress. *Environ Exp Bot* 53:315-322
- Zayed A, Pilon-Smits E, de Souza M, Lin Z-Q and Terry N (2000) Remediation of selenium polluted soils and waters by phytovolatilization. In Terry N and Banuelos GS (Eds) *Phytoremediation of contaminated soil and water*, CRC Press LLC, Boca Raton, FL, pp 61-83
- Zeeman S, Smith SM, Smith AM (2007) The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochem J* 401:13-28
- Zhang X, Zang R, Li C (2004) Population differences in physiological and morphological adaptations of *Populus davidiana* seedlings in response to progressive drought stress. *Plant Sci* 166: 791-797
- Zhang X, Wu N, Li C (2005) Physiological and growth responses of *Populus davidiana* ecotypes to different soil water contents. *J Arid Environ* 60:567-579
- Zhang F, Wang Y, Lou Z, Dong J (2007) Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). *Chemosphere* 67:44-50
- ZhuYL, Pilon-Smits EAH, Tarun A, Weber SU, Jouanin L, Terry N (1999) Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol* 121:1169-1177

Zhu YG, Christie P, Laidlaw AS (2001) Uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal white clover from Zn contaminated soil. *Chemosphere* 42:193-199

Zsuffa L (1975) A summary review on interspecific breeding in the genus *Populus* L. In Proc Of Can Tree Improv Assoc 28-30 Aug. 1973, Fredericton, NB 14:107-123

Zweifel R, Item H, Häsler R (2000) Stem radius changes and their relation to stored water in stems of young Norway spruce trees. *Trees-Struct Func* 15:50-57

Ringraziamenti

Vorrei innanzitutto ringraziare la Prof.ssa Milvia Racchi che ha contribuito alla mia formazione professionale, guidandomi nell'affascinante mondo della ricerca e aiutandomi a guardare con spirito critico i risultati del mio lavoro.

Un ringraziamento anche al Prof. Alessandro Camussi per essere stato sempre disponibile nei miei confronti, fornendomi consigli utili durante il mio percorso formativo.

Vorrei inoltre ringraziare il Dott. Alessio Giovannelli del CNR di Firenze ed il suo gruppo di lavoro, per avermi fornito il materiale vegetale ed alcuni dati necessari alla realizzazione di parte della presente tesi.

Un sincero grazie alla Dott.ssa Adelaide Turchi, al Dott. Andrea Bove e ai dottorandi che hanno intrapreso il mio stesso percorso, da cui ho ricevuto spesso parole di incoraggiamento, e tutte le persone che hanno contribuito in varia misura a migliorare la qualità del mio lavoro grazie ad un proficuo scambio di idee.

Infine, un affettuoso ringraziamento a Iacopo e alla mia famiglia, per avermi sostenuto con pazienza ed essermi stati vicino in ogni momento durante questi intensi anni di lavoro.

