

SOCIETÀ BOTANICA ITALIANA

GRUPPO DI LAVORO PER LA CITOLOGIA

LAVORI PRESENTATI

ALLA

RIUNIONE SCIENTIFICA ANNUALE

Torino  
17-18 Giugno 1999



## PREMESSA

Nei giorni 17-18 giugno 1999 ha avuto luogo a Torino, presso l'Aula del Convento delle Sacramentine di via Cavour 32, la Riunione Scientifica annuale del Gruppo di Lavoro per la Citologia (ora Biologia Cellulare e Molecolare), della Società Botanica Italiana, grazie all'ospitalità della prof. P. Bonfante e del suo gruppo. Viene qui presentata una parte dei riassunti delle

comunicazioni tenute nel Convegno. Esse vertevano su aspetti citologici e molecolari, nei processi di differenziamento, nella risposta a stress biotici ed abiotici, negli eventi di secrezione, nonché nello sviluppo di organi e tessuti.

[a cura di G. BERTA]



## Indice biologico di resistenza al carico di immissioni inquinanti

M.G. ALAIMO, B. LI PANI, M.G. LOMBARDO, S. ORECCHIO, M. TURANO e M.R. MELATI

**ABSTRACT** - *Biological index of resistance to polluting emissions* - The effect and dosage of lead is the object of our research conducted on vascular plants which are among those most commonly found in the tree-lined streets of Palermo. Morphogenetic damage and chemical accumulations differed according to the plant type considered, the site where it is found and to the sampling period. Of particular interest is the fact that tannin accumulations were greater in the distal parts than in the proximal parts of the leaves.

*Key words:* atmospheric pollution, biological index of resistance, lead dosage, tannins, tree-lined city streets

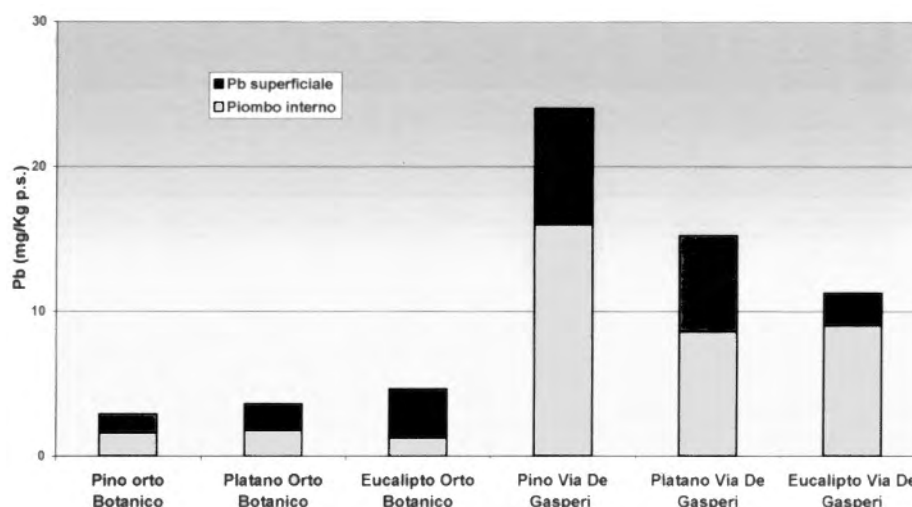
Lavorando su tre entità vegetali di tipo ornamentale, componenti rappresentative delle alberate della città di Palermo (bioindicatrici passive, perché indigene o di antica naturalizzazione) (ALAIMO *et al.*, 1998), abbiamo effettuato indagini chimiche e citologiche sulle foglie di eucalipto, pino e platano, mettendo in evidenza una correlazione tra i danni biologici e le concentrazioni di metalli pesanti. Sono stati distinti differenti gradi di danneggiamento: 1= perdita iniziale di foglie (defogliazione precoce); 2 = perdita progressiva di foglie, in soggetto molto colpito; 3 = forte danno, con moria di rami e rametti; 4 = morie a carico dell'intero soggetto [Metodo di Pollanschutz, 1971 (LARCHER, 1993)]. Dalle nostre valutazioni è emerso che *Pinus pinea* L. è molto sensibile a danni cronici e a gas tossici (SE), *Platanus hybrida* Brot. poco sensibile (PS) ed *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. relativamente resistente (RR). Le piante reagiscono ai veleni ambientali in maniera più sensibile dell'uomo: quelle molto sensibili possono essere usate come bioindicatrici della inquinazione inquinante aerea. Le cuticole fogliari, che impediscono l'uscita di acqua attraverso la superficie, rendono difficile anche un accesso di acqua dopo bagnatura e per questo, nei diversi periodi stagionali, possono evolversi danni e accumuli diversi di inquinanti. Piccole foglie, come gli aghi delle conifere e le foglie strette di alcuni eucalipti, hanno bassi valori di resistenza di superficie e la diffusione del vapore acqueo è ridotta dai tamponi cerosi o dai metaboliti secondari delle camere sottostomatiche; per questo anche l'ingresso di inquinanti adesi può essere più complicato. Queste due entità, però, sono sempreverdi e possono tendere ad accumulare gli inquinanti; questo si verifica soprattutto nel pino che, essendo carico di resine, è capace di inglobare un contenuto ele-

vato di particolato inquinante. L'eucalipto presenta una resistenza cuticolare resa più alta dalla disposizione, dallo spessore e dal numero di lamelle cerosi e cutiniche sistemate sulla parete epidermica, come pure dallo spessore delle cuticole stesse. Le piante latifoglie, come ad esempio il platano, si difendono con il loro ritmico ricambio della chioma. I rivestimenti piliferi delle foglie del platano, inoltre, contribuiscono a formare una barriera di protezione che riduce l'assimilazione del particolato all'interno del tessuto fogliare; in questo modo buona parte del materiale rimane adeso sulla superficie e viene dilavato dalle piogge. Un caratteristico effetto indotto dallo stress da inquinamento è la riduzione della superficie traspirante che si realizza in pino attraverso il piegarsi e l'arrotolarsi caratteristico delle foglie. L'eucalipto, invece, riesce a difendersi in dipendenza di un ricambio idrico più massivo.

Mediamente sono stati raccolti 15 campioni per ciascuna specie arborea. I campionamenti sono stati effettuati nella città di Palermo sia in zone rurali scarsamente antropizzate (Ustica, PA, Orto Botanico, PA). I campioni di foglie sono stati suddivisi in due lotti approssimativamente uguali di cui uno è stato sottoposto a lavaggio per eliminare il particolato superficiale. Prima delle analisi chimiche sia i campioni non lavati che quelli sottoposti a lavaggio sono stati posti in stufa a 80°C per una notte e successivamente mineralizzati con acido nitrico e perossido di idrogeno nel rapporto 6:1. I metalli presenti nelle soluzioni a concentrazione dell'ordine di parti per milione sono stati determinati quantitativamente mediante spettroscopia ad assorbimento atomico con atomizzazione a fiamma mentre quelli presenti a più basse concentrazioni con atomizzazione a fornetto di grafite. Tutte le determinazioni, sia degli standard

TABELLA 1

Concentrazioni di piombo riscontrate nelle foglie di tre specie arboree, raccolte in due diverse stazioni della città di Palermo.  
Concentrations of lead in the leaves of three arboreal species, collected in two different stations in the city of Palermo.



Concentrazioni medie dell'anno 1997. In ogni colonna dell'istogramma è possibile distinguere il contenuto di piombo superficiale e il relativo contenuto di piombo compartimentato entro le strutture fogliari. Tra le stazioni prescelte le prime tre sono pulite (controlli) e le altre sono ad alto traffico veicolare (inquinata).

Average concentrations in 1997. The columns of the histogram show surface lead content and content of lead within the leaf structure. The first three stations are clean (controls) and the others are subjected to heavy traffic (polluted).

che dei campioni, sono state ripetute tre volte per minimizzare gli errori. Gli accumuli di metaboliti (fosfatasi acida e tannini) nei tessuti vegetali sono stati messi in evidenza mediante colorazione istochimica adottando le metodiche di GAHAN (1984); a tale scopo sono state preparate diverse criosezioni trasversali di porzioni apicali e basali delle foglie delle tre specie arboree prese in considerazione.

D'accordo con le nostre aspettative, le concentrazioni maggiori di piombo, e di altri metalli pesanti considerati (Cu, Fe, Cd, Zn), sono state riscontrate nelle foglie prelevate dalle stazioni più intensamente esposte alle emissioni dei gas di scarico degli autoveicoli, mentre nelle stazioni controllo (Orto Botanico di

Palermo) le concentrazioni di piombo si sono mantenute piuttosto basse (Tab.1). E' risultato, inoltre, che, nelle varie stazioni, una buona parte del piombo si trova depositato sulla superficie fogliare. In pino e platano i picchi più elevati di accumulo del piombo si rilevano in estate (71 mg/kg ps in pino e 21 mg/kg ps in platano), mentre in eucalipto si raggiungono in inverno (22,4 mg/kg ps).

I test istochimici hanno evidenziato un marcato incremento in metaboliti (fosfatasi acida e tannini) come reazione allo stress saturnino durante il corso dell'anno, soprattutto in pino e platano, meno in eucalipto (Figs. 1a,b; 2a,b; 3a,b). I tannini si accumulano fondamentalmente nei vacuoli delle cellule

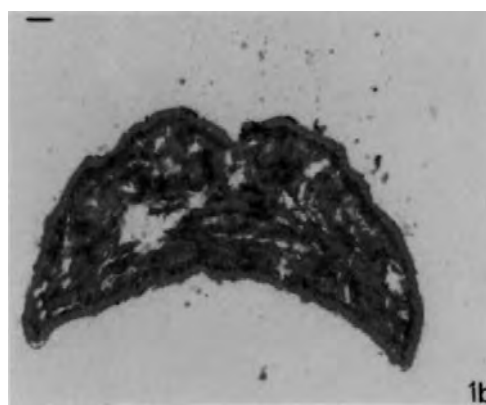
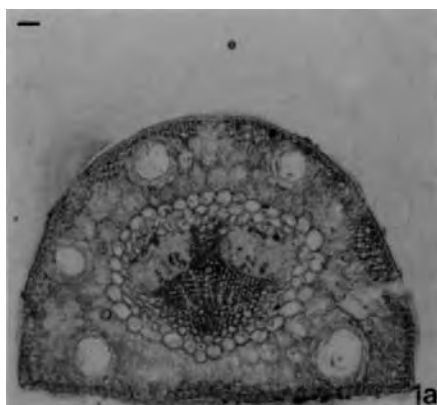


Fig. 1

*Pinus pinea*: Criosezioni trasversali della porzione prossimale (a) e distale (b) della foglia. La porzione distale si presenta non secca, ma con ampie lacune (zone di necrosi) e abnormi imbrunimenti dovuti all'accumulo di tannini. (barretta = 100µm).

*Pinus pinea*: Cross-cryosections of the proximal (a) and distal (b) parts of the leaf. The distal part is sub-necrotic, with wide gaps (areas of necrosis) and abnormal dark areas due to the accumulation of tannins. (bar = 100µm).

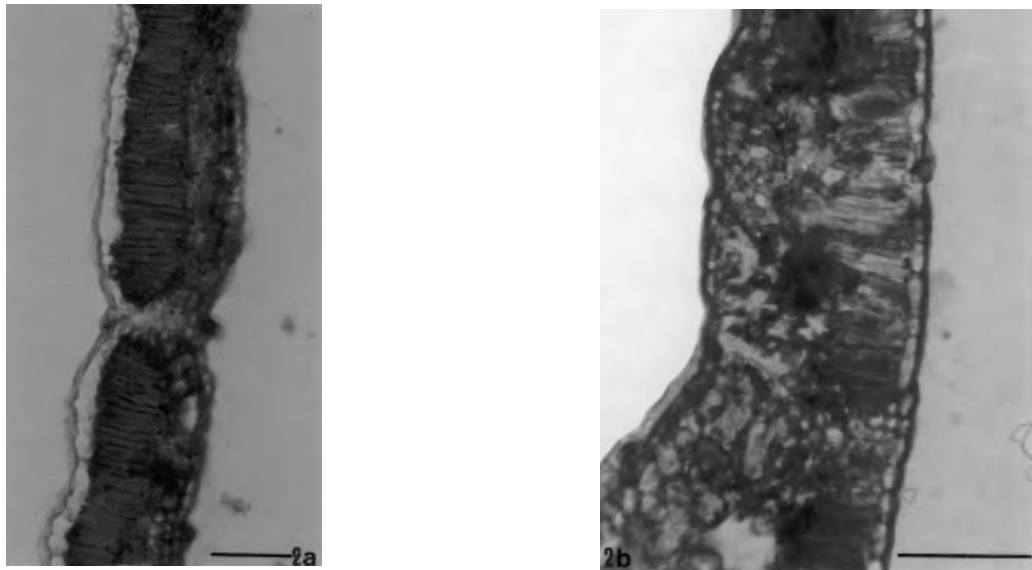


Fig. 2

*Platanus hybrida*: Criosezioni colorate per evidenziare i tannini: i danni cellulari, dovuti all'inquinamento da metalli pesanti, sono correlati alle incrementate deposizioni di tannini nelle cellule del mesofillo fogliare, più nelle foglie provenienti da strade trafficate (a), che da stazioni pulite (b). (barretta = 100µm).

*Platanus hybrida*: Cryosections stained to highlight the tannins: cellular damage due to heavy metal pollution is related to increased deposits of tannins in the cells of the leaf mesophyll, more so in the leaves from streets with heavy traffic (a) than in those from the clean stations (b). (bar = 100µm).

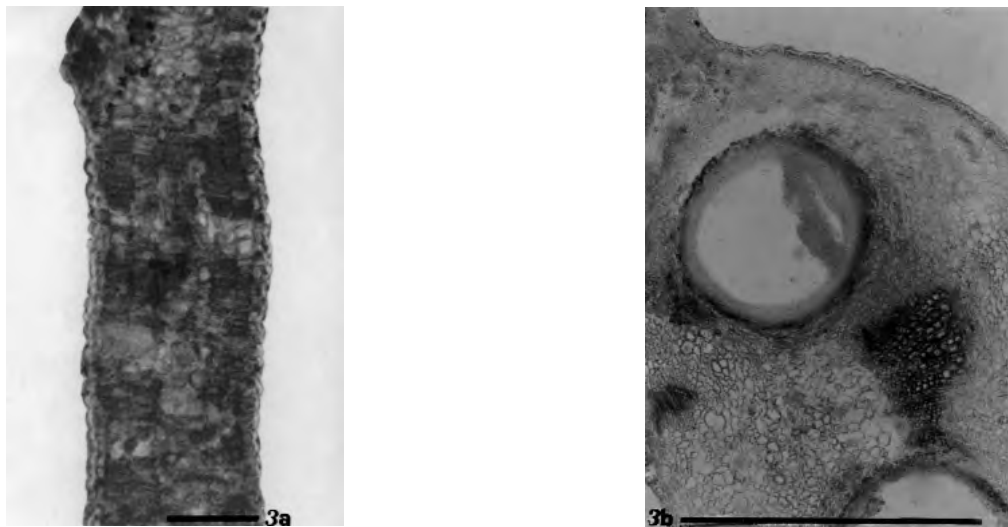


Fig. 3

*Eucalyptus camaldulensis*: Criosezioni della foglia-controllo (a) e della foglia proveniente da stazione inquinata con le caratteristiche galle (b). I depositi di tannini risultano meno abbondanti rispetto al pino ed al platano. (barretta = 100µm).

*Eucalyptus camaldulensis*: Cryosections of a control leaf (a) and of a leaf from a polluted station with the characteristic galls (b). Tannin deposits are not as abundant as those found in the pine and plane tree. (bar = 100µm).

del mesofillo, soprattutto nel palizzata, e nello strato epidermico superiore. Quando la foglia appare imbrunita e subnecrotica i tannini si presentano solubilizzati nel citoplasma e abbondanti così da fare ipotizzare il loro ruolo nei processi di protezione dagli stress e di detossificazione soprattutto in pino, meno in platano e ancora meno in eucalipto. Il loro accumulo tra pareti e cuticola è evidente nel tessuto

epidermico superiore e a ridosso delle pareti epidermiche, dove alcuni autori (MATSUDA, RAYAN, 1990) hanno osservato una marcata traslocazione di polisaccaridi, precursori della sintesi di cellulosa, ed i tannini formano forti complessi sia con i carboidrati che con le proteine (PORTE, 1989).

*Ringraziamenti* - Ricerca eseguita con un contributo M.U.R.S.T. (Fondi 60%).

## LETTERATURA CITATA

ALAIMO M.G., LI PANI B., LOMBARDO M.G., ORECCHIO S., TURANO M., MELATI M.R., 1998 - *Air pollution in an urban area: the mapping of stress in the predominant plants in the city of Palermo by heavy metal dosage*. 6° Int.Congr. Aerobiol. Perugia, 31 August-5 September: 19.

GAHAN P.B., 1984 - *Plant Histochemistry and Cytochemistry*. Academic Press. London.

LARCHER W., 1993 - *Ecofisiologia Vegetale*. Edagricole. Bologna.

MATSUDA K., RAYAN A., 1990 - *Anatomy: a key factor regulating plant tissue response to water stress*. In: KATTERMANN F., *Environmental Injury to Plants*: 63-68. Academic Press Inc., San Diego, CA, USA.

PORTE L.J., 1989 - *Tannins*. In: HARBORNE J.B. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry*, vol. 1, "Plant Phenolics": 389-419. Academic Press Ltd., London.

RIASSUNTO - L'effetto e il dosaggio del piombo rappresenta l'oggetto della nostra ricerca condotta sulle piante vascolari inserite tra le alberate cittadine caratteristiche di Palermo.

## AUTORI

*Marisa Grazia Alaimo, Barbara Li Pani, Maria Grazia Lombardo, Maria Turano, Maria Rita Melati, Dipartimento di Scienze Botaniche, Università di Palermo, Via Archirafi 38, 90123 Palermo*  
*Santino Orecchio, Dipartimento di Chimica Inorganica, Università di Palermo, Parco D'Orleans, 90100 Palermo*



## Ultrastruttura, composizione in pigmenti e sequenza genica del 18S rDNA di una Chlorophyta isolata dal ghiaccio marino di Wood Bay (Mare di Ross, Antartide)

C. ANDREOLI, I. MORO, N. LA ROCCA, L. DALLA VALLE e L. BARGELLONI

**ABSTRACT** - *Ultrastructure, pigments and 18S rDNA gene sequence of a Chlorophyta from sea ice of Wood Bay (Ross Sea, Antarctica)* - Ultrastructural, biochemical and biomolecular data on a green microalga, isolated from the sea ice of Wood Bay are reported. These results led us to verify that probably it is a new taxon of Trebouxiophyceae (Chlorophyta).

*Key words:* Antarctica, Chlorophyta, sea-ice, Trebouxiophyceae

Durante l'estate australe 1993-94, dal ghiaccio marino di Wood Bay, fu isolata una microalga dal tallo sarcinoide che, dall'analisi dei pigmenti effettuata mediante HPLC, è risultata appartenere alle Chlorophyta. Oltre alla clorofilla *a*, infatti, essa presenta clorofilla *b* e la luteina è la xantofilla predominante. Al SEM, oltre l'organizzazione sarcinoide, è ben visibile una cellula basale allungata (holdfast) assai diversa da quelle, per lo più sferiche, della colonia. Al TEM si può distinguere un unico grosso cloroplasto parietale provvisto di pirenoide attraversato da piccoli tilacoidi. A differenza di altre microalga, il pirenoide non presenta amido ma pirenoglobuli che circondano la sua matrice. Oltre al cloroplasto, sono ben visibili il nucleo, l'apparato del Golgi ed i mitocondri. La parete è ispessita e formata da più strati fibrillari.

L'aspetto morfologico e l'ultrastruttura di questa microalga sono molto simili a quelli di *Desmococcus endolythicus* Broady & Ingerfeld, *D. olivaceus* (Pers. Ex Ach.) Laudon e *Coccolobrya mucosus* Broady & Ingerfeld, tre Chaetophorales ritrovate da BROADY, INGERFELD (1993) in habitat terrestri dell'Antartide. Non mancano somiglianze anche con *Trichosarcina mucosa* (Broady) Cappel et O'Kelly e *T. polymorpha* Nichols & Bold, due Ulotrichales ritrovate sia sul suolo che in laghi dell'Antartide (BROADY, 1979; Ettl e GÄRTNER, 1995).

Il confronto delle sequenze geniche del 18S rDNA di questo organismo con quelle disponibili in GenBank di altre specie, appartenenti sia alle Chaetophorales che ad altri ordini di Chlorophyta, ci ha permesso di verificare che il nostro isolato appartiene alle Trebouxiophyceae (FRIEDL, 1995). Non appena

saranno completate le sequenze geniche delle specie sopramenzionate saremo in grado di stabilire se questa microalga è una nuova specie di un nuovo genere o se essa è una specie sorella di queste. In quest'ultimo caso la posizione delle tre Chaetophorales e/o delle due Ulotrichales dovrebbe essere riconsiderata. Un altro aspetto interessante è l'aver ritrovato questo organismo nello strato più superficiale del pack-ice, quello a più diretto contatto con l'atmosfera. Ciò ci permette di ipotizzare che l'ambiente da cui è stato isolato non sia il suo usuale ma che, probabilmente, vi sia stato trasportato dai pinguini. Woody Bay, infatti, si affaccia su una delle pinguinaie più popolate della Victoria Land.

*Ringraziamenti* - Lavoro eseguito nell'ambito del Progetto Nazionale di Ricerche in Antartide (ENEA-P.N.R.A.)

### LETTERATURA CITATA

- BROADY P.A., 1979 - *The terrestrial algae of Signy Island, South Orkney Islands.* Br. Antarctic Survey, Sc. Rep., 98: 1-117.
- BROADY P.A., INGERFELD M., 1993 - *Three new species and a new record of chaetophoracean (Chlorophyta) algae from terrestrial habitats in Antarctica.* Eur. J. Phycol., 28: 25-31.
- ETTL H., GÄRTNER G., 1995 - *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen.* G. Fischer, Stuttgart.
- FRIEDL T., 1995 - *Inferring taxonomic positions and testing genus level assignments in coccoid green lichen algae: a phylogenetic analysis of 18S ribosomal RNA sequences from Dictyochloropsis reticulata and from members of the genus Myrmecea (Chlorophyta, Trebouxiophyceae Cl. Nov.).* J. Phycol., 31: 632-639.

**RIASSUNTO** - Vengono riportati i risultati ultrastrutturali, biochimici e biomolecolari ottenuti su una microalga isolata dal ghiaccio marino di Wood Bay (Mare di Ross,

Antartide). Questi dati ci hanno permesso di verificare che essa appartiene alle Trebouxiophyceae e che, molto proba-

bilmente, è una nuova specie di questa classe.

#### AUTORI

*Carlo Andreoli, Isabella Moro, Nicoletta La Rocca, Luisa Dalla Valle, Luca Bargelloni, Dipartimento di Biologia, Università di Padova, Via Ugo Bassi 58/b, 35131 Padova labandr@civ.bio.unipd.it*

## Risposte di *Koliella antarctica* Andreoli et al. (Klebsormidiales, Chlorophyta) a diverse condizioni di salinità, luce e temperatura: aspetti morfologici, ultrastrutturali e fisiologici

C. ANDREOLI, I. MORO, S. ZANETTI e B. SALVATO

**ABSTRACT** - *Effects of salinity, light and temperature on the ultrastructure and growth of Koliella antarctica Andreoli et al. (Klebsormidiales, Chlorophyta)* - A study carried out at different environmental conditions on *Koliella antarctica* lead us to verify that the salinity stress determines morphological changes and glycerol production. On the contrary, the light increase causes chloroplast modifications. The low ( $-2^{\circ}\text{C}$ ) and the high temperature ( $+2^{\circ}\text{C}$ ), instead, do not have effects.

*Key words:* Chlorophyta, environmental stress, *Koliella antarctica*, ultrastructure

L'ambiente marino dell'Antartide, per la ricchezza di forme di vita che lo caratterizza, mostra di essere più ospitale del corrispondente ambiente terrestre. Anche in mare, tuttavia, sussistono condizioni chimico-fisiche estreme e, di conseguenza, gli organismi che vi vivono hanno dovuto adottare particolari strategie di sopravvivenza. Non vi è dubbio che l'intensità luminosa, la temperatura e la salinità siano i fattori ambientali che, più di altri, subiscono cambiamenti periodici molto rapidi e, nello stesso tempo, molto drastici e che, di conseguenza, impongono agli organismi viventi risposte compensative molto rapide. Fra gli organismi marini dell'Antartide, le microalghe, passando la maggior parte della loro vita all'interno del pack-ice o nell'interfaccia acqua-ghiaccio, si prestano molto bene come organismi modello su cui studiare tali risposte adattative. In quest'ottica, ci siamo proposti di verificare gli effetti di questi tre parametri sull'attività di crescita e sulla morfologia di *Koliella antarctica*, una nuova Chlorophyta isolata dalle acque di Baia Terra Nova (Mare di Ross, Antartide) da ANDREOLI *et al.* (1998). Utilizzando un piano fattoriale a tre variabili e a due livelli sono state estrapolate otto prove sperimentali che prevedevano interazioni di questi tre parametri. I risultati ottenuti ci hanno permesso di verificare che la più alta salinità (70‰) è quella che determina le più consistenti modificazioni morfologiche di questo organismo. In tale condizione, infatti, sia a bassa ( $8 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) che ad alta intensità luminosa ( $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) così come a  $-2^{\circ}\text{C}$  e a  $+2^{\circ}\text{C}$ , *Koliella antarctica* risponde allo stress salino con un aumento del volume cellulare, con la spiralizzazione delle cellule e con la formazione di grossi corpi elettrondensi

che, come osservato in *Dunaliella bioculata* (BÉRUBÉ *et al.*, 1999), potrebbero essere un accumulo in glicerolo. In tale condizione, inoltre, si ha una diminuzione del suo tasso di crescita che è invece risultato ottimale a  $8 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,  $+2^{\circ}\text{C}$  e al 34‰ di salinità. Similmente a quest'ultima condizione sperimentale un buon tasso di crescita è stato pure ottenuto a  $-2^{\circ}\text{C}$ . Effetti del tutto negativi si sono invece riscontrati con l'aumento dell'intensità luminosa che, ai livelli di temperatura e salinità considerati, ha comportato una diminuzione delle membrane tilacoidali. Ciò è in accordo con la spiccata sciafilia delle micro- e delle macroalghe dell'Antartide (KIRST, WIENCKE, 1995)

*Ringraziamenti* - Lavoro eseguito nell'ambito del Programma Nazionale di Ricerche in Antartide (ENEA-P.N.R.A.)

### LETTERATURA CITATA

- ANDREOLI C., LOKHORST G.M., MANI A.M., SCARABEL L., MORO I., LA ROCCA N., TOGNETTO L., 1998 - *Koliella antarctica* sp. nov. (Klebsormidiales) a new marine green microalga from the Ross Sea (Antarctica). *Algological Studies*, 90 (=Archiv Hydrobiol. Suppl., 125): 1-8.
- BÉRUBÉ K.A., DODGE J.D., FORD T.W., 1999 - *Effects of chronic salt stress on the ultrastructure of Dunaliella bioculata (Chlorophyta, Volvocales): mechanisms of response and recovery*. *Eur. J. Phycol.*, 34: 117-123.
- KIRST G.O., WIENCKE C., 1995 - *Ecophysiology of polar algae*. *J. Phycol.*, 31: 181-199.

**RIASSUNTO** - Prove sperimentali, a diverse condizioni ambientali, condotte su *Koliella antarctica* ci hanno permesso di verificare che questa microalga reagisce allo stress salino con modificazioni morfologiche e la produzione di glicerolo. Al contrario, l'aumento dell'intensità luminosa

determina cambiamenti nell'assetto del cloroplasto. Non si sono riscontrati invece effetti sia delle basse (-2 °C) che

delle alte temperature (+ 2 °C).

#### AUTORI

*Carlo Andreoli, Isabella Moro, Stefania Zanetti, Benedetto Salvato, Dipartimento di Biologia, Università di Padova, Via Ugo Bassi 58/b, 35131 Padova, labandr@civ.bio.unipd.it*

## Test per il monitoraggio di morte cellulare programmata in cellule vegetali

B. BALDAN, B. ORLANDO e P. MARIANI

**ABSTRACT** - *Test for monitoring programmed cell death in plant cells* - In order to determine the temporal sequence of programmed cell death (PCD) events several cytochemical, biochemical and molecular methods were applied on carrot cell cultures.

*Key words:* carrot, programmed cell death (PCD), TUNEL

La morte cellulare programmata (PCD), nelle piante e negli animali, è attivata come parte del programma normale di crescita e di sviluppo o in risposta a fattori biotici e abiotici (PENNELL e LAMB, 1997). Stimoli diversi inducono la PCD attraverso una serie di eventi spesso differenti tra loro. Similmente, sistemi modello diversi, indotti a PCD da uno stesso stimolo, possono presentare modalità di morte specifiche per ciascun sistema, particolarmente negli eventi iniziali.

I test utilizzati per monitorare la PCD possono essere di tipo citologico o biochimico. Test citologici usati di routine nelle cellule animali sono stati messi a punto su cellule e protoplasti di carota in coltura indotti a PCD dallo ionoforo del  $Ca^{2+}$  A23187. Tra questi test alcuni sono adatti ad evidenziare eventi precoci quali l'alterazione della permeabilità delle membrane plasmatica e mitocondriale e l'aumento del grado di condensazione della cromatina. Con l'analisi elettroforetica del DNA su gel di agarosio (RYERSON e HEATH, 1997) e l'applicazione della tecnica citologica TUNEL (O' BRIEN *et al.*, 1998), è

stato possibile evidenziare la frammentazione del DNA indotta dallo ionoforo. Tuttavia questa molecola è un induttore debole, poiché una bassa % di cellule (20%) presentava sintomi di PCD. L'analisi citologica al microscopio elettronico ha permesso di seguire le diverse fasi e di individuarne le caratteristiche strutturali quali condensazione di cromatina, lisi del citoplasma e processi di autofagia.

### LETTERATURA CITATA

- PENNELL R.I., LAMB C., 1997. *Programmed cell death in plants*. *Plant Cell*, 9: 1157-1168.  
RYERSON D.E., HEATH M.C., 1996. *Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic stress*. *Plant Cell*, 8: 393-402.  
O'BRIEN I.E.W., REUTELINGSPERGER C.P.M., HOLDAWAY K.M., 1997. *Annexin-V and TUNEL use in monitoring the progression of apoptosis in plants*. *Cytometry*, 29: 28-33.

**RIASSUNTO** - Diversi metodi citochimici, biochimici e molecolari sono stati applicati a cellule di carota in coltura, allo scopo di determinare la sequenza temporale degli eventi di morte programmata.

### AUTORI

Barbara Baldan, Barbara Orlando, Paola Mariani, Dipartimento di Biologia, Università di Padova, Via U.Bassi 58/B, 35131 Padova, Marianip@civ.bio.unipd.it

## Espressione del gene *PsNlec1*, codificante per una lectina, in radici micorrizzate e noduli radicali di *Pisum sativum* (var. *Wisconsin Perfection*)

R. BALESTRINI, S. PEROTTO, N.J. BREWIN e P. BONFANTE

**ABSTRACT** - *Expression of a gene encoding a lectinlike glycoprotein in mycorrhizal roots and nodules of Pisum sativum (var. Wisconsin Perfection)* - The expression of *PsNlec1* pea gene was compared in two symbiotic interactions: arbuscular mycorrhizas and root nodules. By using RT-PCR and *in situ* hybridization, we demonstrated that *PsNlec1* is strongly expressed in root nodules and it is also induced in mycorrhizal roots when the cells were colonized by the endomycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. No transcript was detectable in uninfected pea roots. A polyclonal antibody (R76) was used to investigate the presence of the glycoprotein antigen PsNLEC-1. Immunoblot experiments revealed PsNLEC-1 as a single antigenic band (25 kDa) following gel electrophoresis of extracts from mycorrhizal roots. However, the amount of antigen was apparently too low to be detected by immunogold localization in tissue sections of pea mycorrhizal roots.

**Key words:** arbuscular mycorrhizas, *in situ* hybridization, *Pisum sativum*, RT-PCR

### INTRODUZIONE

Le leguminose rappresentano un valido sistema modello per studiare le interazioni piante-microrganismi in quanto le loro radici possono essere colonizzate da almeno due importanti microrganismi del suolo, i funghi micorrizici arbuscolari (AM) ed i rizobi fissatori di azoto. L'analisi dei diversi stadi del processo di infezione da parte dei funghi AM e dei rizobi indica la presenza di eventi che sono comuni alle due simbiosi. Il processo di infezione, in entrambi i casi, è associato a profondi cambiamenti morfologici nell'organizzazione subcellulare e alla formazione di un'interfaccia che separa costantemente la pianta dal microsimbionte. Dati precedenti indicano somiglianze molecolari nella composizione dell'interfaccia presente nelle radici micorrizzate e nei noduli radicali di pisello (PEROTTO *et al.*, 1994). Per verificare se geni coinvolti nello sviluppo del nodulo intervengono anche nel processo di micorrizzazione sono in corso numerosi studi che utilizzano mutanti simbiosi-difettivi o che confrontano, anche grazie all'utilizzo di piante trasformate, l'espressione di determinati geni nelle micorrize e nei noduli radicali (ALBRECHT *et al.*, 1999). Lo scopo di questo lavoro è di confrontare l'espressione genica e la localizzazione di una lectina (codificata dal gene *PsNlec1*) nelle radici micorrizzate e nei noduli radicali di pisello. Il gene *PsNlec1* è stato identificato nei noduli da KARDAILSKY *et al.* (1996). Un corrispondente clone di cDNA è stato utilizzato come sonda per studiare l'espressione di questo gene nei noduli. In questo lavoro ci siamo

occupati di effettuare da una parte l'analisi degli mRNA codificanti per questa lectina con tecniche di RT-PCR e di ibridazione *in situ* e dall'altra la localizzazione della proteina mediante western blot ed immunomarcatura utilizzando un anticorpo policlonale. Sono state analizzate sia radici micorrizzate e non micorrizzate sia noduli radicali di *Pisum sativum* che rappresentano il nostro controllo positivo.

### MATERIALI E METODI

L'RNA totale è stato estratto in piccola scala dalle radici micorrizzate, da quelle non micorrizzate e dai noduli radicali ed utilizzato in esperimenti di RT-PCR utilizzando dei primers specifici chiamati lec1 e lec2 (BALESTRINI *et al.*, 1999), disegnati sulla sequenza di cDNA già pubblicata (KARDAILSKY *et al.*, 1996). Sui campioni amplificati in RT-PCR è stato effettuato un southern blot con una sonda specifica per il gene *PsNlec1*, ottenuta dal clone di cDNA. Per verificare che l'amplificato corrispondesse effettivamente al gene studiato, i primers lec1/lec2 sono stati utilizzati in reazioni di PCR su DNA genomico (BALESTRINI *et al.*, 1999) e la banda ottenuta in PCR è stata sequenziata. In parallelo sono stati effettuati esperimenti di ibridazione *in situ* utilizzando una sonda specifica marcata con digossigenina. Il materiale sperimentale è stato fissato, disidratato, incluso in paraffina e tagliato ottenendo sezioni di 7-8 µm di spessore che sono state messe su vetrini, sparaffinate e trattate secondo la metodica di ibridazione descrit-

ta in BALESTRINI *et al.* (1999). A questo punto le sezioni sono state sottoposte a sviluppo mediante reazione colorimetrica mediata da un anticorpo anti-digossigenina legato alla fosfatasi alcalina. Per la localizzazione della proteina PsNLEC-1 è stato utilizzato, in esperimenti di western blot e di immunomarcatura, un anticorpo policlonale (R76) ottenuto contro la proteina ricombinante.

#### RISULTATI

I risultati ottenuti con l'RT-PCR mostrano che una banda delle dimensioni attese di 670 pb viene amplificata nei noduli, ma anche nelle radici micorrizzate. L'amplificato non è presente nelle radici non micorrizzate. Questo risultato indica dunque che l'espressione del gene *PsNlec1* è presente anche nelle radici micorrizzate. L'utilizzo dei primers ribosomali (NS1/NS2) nello stesso esperimento ci ha permesso di verificare la presenza dell'RNA nei campioni analizzati. L'assenza del segnale nelle reazioni di controllo RT- indica che non vi è stata contaminazione di DNA. Per verificare che la banda amplificata in RT-PCR fosse quella corrispondente al gene studiato, è stato effettuato un southern blot con una sonda specifica ottenuta dal clone di cDNA. E' stata osservata la presenza del segnale in corrispondenza della banda sia nelle radici micorrizzate che nei noduli. L'amplificato corrisponde effettivamente al gene studiato, in quanto la banda genomica ottenuta ha mostrato la stessa sequenza nucleotidica del gene *PsNlec1*. In parallelo sono stati effettuati esperimenti di ibridazione *in situ*. Questi, realizzati con una sonda specifica marcata con digossigenina, mostrano che il gene *PsNlec1* nei noduli radicali è espresso nelle cellule della zona colonizzata dai batteri e nei vasi del nodulo, in accordo con KARDAILSKY *et al.* (1996). L'espressione è presente anche nelle radici micorrizzate, ma solo nelle cellule colonizzate dal fungo ed in particolare nelle cellule contenenti gli arbuscoli. Non si osserva alcun segnale nelle radici non micorrizzate e sulle sezioni di controllo trattate con la sonda senso. Successivamente ci siamo occupati di localizzare la proteina PsNLEC-1. Nei noduli gli esperimenti di immunoblot hanno evidenziato la presenza di tre diverse isoforme, mentre nelle radici micorrizzate si rivela la presenza di una singola banda, quella a minor peso molecolare (25Kda). Lo stesso anticorpo è stato provato su sezioni di materiale incluso con tecniche di immunomarcatura, ma in questo caso

non è stato possibile visualizzare la proteina.

#### DISCUSSIONE

Il lavoro svolto ha dunque permesso di dimostrare che un gene di *Pisum sativum* fortemente espresso nei noduli radicali viene espresso dalla pianta anche in presenza del fungo micorrizico arbuscolare, ma solo nelle cellule colonizzate dal fungo. Inoltre è stato possibile dimostrare la presenza nelle radici micorrizzate di una sola delle tre isoforme presenti nei noduli. La discrepanza tra i risultati di ibridazione *in situ* e quelli di immunomarcatura è probabilmente dovuta alla presenza di una scarsa quantità di proteina nelle radici micorrizzate, come mostrato dagli esperimenti di western blot dove la banda evidenziata è debole. In conclusione, i risultati ottenuti aggiungono un'ulteriore informazione a quelle già esistenti che mostrano alcune somiglianze tra le AM ed i noduli radicali.

#### LETTERATURA CITATA

- ALBRECHT C., GEURTS R., LAPEYRIE F., BISSELING T., 1999 - *Endomycorrhizae and rhizobial Nod factors both require SYM8 to induce the expression of the early nodulin genes PsENOD5 and PsENOD12A*. Plant J., 15 (5): 605-614.
- BALESTRINI R., PEROTTO S., GASVERDE E., DAHIYA P., GULDMANN L.-L., BREWIN N.J., BONFANTE P., 1999 - *Transcription of a gene encoding a lectinlike glycoprotein is induced in root cells harboring arbuscular mycorrhizal fungi in Pisum sativum*. MPMI, 12: 785-791.
- KARDAILSKY I.V., SHERRIER D.J., BREWIN N.J., 1996 - *Identification of a new pea gene, PsNlec1, encoding a lectin-like glycoprotein isolated from the symbiosomes of root nodules*. Plant Physiol., 111: 49-60.
- PEROTTO S., BREWIN N.J., BONFANTE P., 1994 - *Colonization of pea roots by the mycorrhizal fungus Glomus versiforme and by Rhizobium bacteria: immunological comparison using monoclonal antibodies as probes for plant cell surface components*. MPMI, 7 (1): 91-98.

RIASSUNTO - L'espressione genica e la localizzazione di una lectina (codificata dal gene *PsNlec1*) sono state confrontate nelle radici micorrizzate e nei noduli radicali di pisello. Esperimenti di RT-PCR ed ibridazione *in situ* hanno mostrato che il gene *PsNlec1* è fortemente espresso nei noduli radicali e nelle radici micorrizzate, quando le cellule sono colonizzate dal fungo endomicorrizico arbuscolare *Glomus versiforme*. Per individuare la proteina PsNLEC-1 è stato utilizzato un anticorpo policlonale (R76). Nei noduli gli esperimenti di immunoblot hanno evidenziato la presenza di tre diverse isoforme, mentre nelle radici micorrizzate si rivela la presenza di una singola banda (25Kda).

#### AUTORI

Raffaella Balestrini, Silvia Perotto, Paola Bonfante, CSMT-CNR e Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Torino, V.le Mattioli 25, 10125 Torino  
Nicholas J. Brewin Department of Genetics, John Innes Centre, Norwich, U.K.

## Perossidasi nel tegumento del seme di *Brassica*

L.M. BELLANI, M. GUARNIERI e A. SCIALABBA

**ABSTRACT** - *Brassica seed coat peroxidase* - Peroxidase activity was tested in *Brassica oleracea* seed integument during germination. POD activity increased from 24 to 72 h after seed imbibition with no significant changes from 72 to 144 h. Maximum level of enzyme activity was reached 48 h after the radicle protrusion. After germination the enzyme has been localized in the cell walls of palizade, pigmented and aleurone layers and in the cytoplasm of aleurone cells.

*Key words:* *Brassica oleracea*, germination, peroxidase, seed coat

### INTRODUZIONE

Le perossidasi (POD) (EC 1.11.1.7) catalizzano l'ossidazione di donatori di idrogeno, inclusi i polifenoli e la riduzione del perossido di idrogeno (MC ELDOON *et al.*, 1995); esse possono usare anche ossigeno molecolare come accettore di elettroni nelle reazioni di ossidazione (DUNFORD, STILLMAN, 1976). Le POD nel tegumento dei semi sono state messe in relazione alla presenza di estensina insolubile (CASSAB, VARNER, 1987) e all'ossidazione dei fenoli solubili in lignina insolubile che forma una barriera impermeabile all'acqua, importante per la longevità dei semi nel suolo (EGLEY *et al.*, 1983). Nel tegumento del seme di soia l'attività POD è stata utilizzata come *marker* enzimatico in studi genetici e a scopo diagnostico nell'identificazione delle cultivars (GIJZEN *et al.*, 1993). Il presente studio si propone di indagare sulla presenza dell'attività POD libera nel tegumento del seme di *Brassica oleracea* e sui relativi cambiamenti che si verificano durante la germinazione, per valutare la possibilità di utilizzare questo enzima in studi sulla caratterizzazione dello stato fisiologico di semi deteriorati.

### MATERIALI E METODI

Semi di *Brassica oleracea* sono stati posti in una capsula Petri contenente quattro fogli di carta bibula imbibiti con 10 ml di acqua distillata ed allevati alla luce alla temperatura di 20°C. Per il dosaggio dell'attività POD sono stati utilizzati 0,5 g di tegumento prelevato da semi in fase pregerminativa (12 e 21 ore di imbibizione) e da semi germinati con plantule di circa 3 mm (24 ore di imbibizione), 10-15 mm (48 ore), 20-30mm (72 ore), 40-50 mm (96 ore) e 50-60 mm (144 ore). Sui campioni è stata rilevata la presenza dei fenoli con cloruro ferrico. La presenza del-

l'enzima POD è stata rilevata spettrofotometricamente a 470 nm usando orto-dianisidina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ed espressa come incremento dell'assorbanza nel primo minuto per grammo di peso fresco ( $\Delta A/m/g$ ) (MARKKOLA *et al.*, 1990). L'indagine citochimica è stata condotta con pirocatecolo, fenilendiamina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Il controllo è stato effettuato omettendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalla soluzione (GAHAN, 1984).

### RISULTATI

L'attività POD del tegumento subisce dei cambiamenti durante il processo germinativo (Fig. 1): si

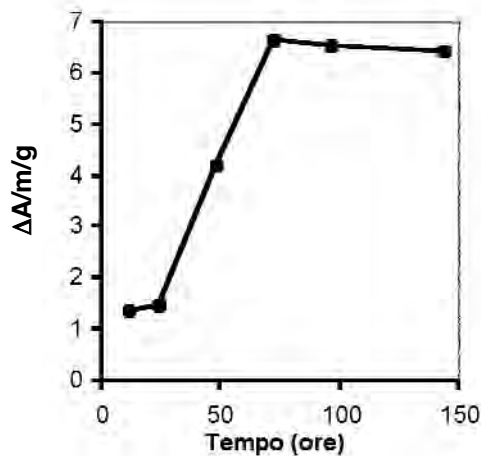


Fig. 1  
Attività POD nei tegumenti dei semi a differenti tempi di imbibizione.  
POD activity in seed integuments in different times of imbibition.



mantiene costante durante la fase pregerminativa, manifesta un sensibile incremento tra 24 e 72 ore in concomitanza con la rottura del tegumento e le prime fasi di crescita della plantula, è massima a 48 ore dalla germinazione, non subisce cambiamenti significativi da 72 a 144 ore, periodo in cui la plantula perde il contatto spaziale con il tegumento.

Il tegumento di *Brassica* consta di un tegumento esterno con uno strato di cellule mucillaginose e uno strato a palizzata e di un tegumento interno costituito da uno strato epidermico schiacciato pigmentato. A questo aderisce lo strato aleuronico mono o bistratificato seguito dallo strato ialino compresso. I composti fenolici sono presenti nelle cellule dello strato a palizzata e pigmentato. L'attività POD fino a 24 ore di imbibizione è presente soprattutto sulle pareti delle cellule dello strato pigmentato; dopo 48 ore e fino a 144 ore si osserva nelle pareti cellulari degli strati a palizzata, pigmentato ed aleuronico e nel citoplasma dello strato aleuronico.

#### DISCUSSIONE

Il tegumento del seme maturo costituisce una barriera che protegge l'embrione dai predatori, dalla luce, dai danni meccanici provenienti dall'esterno e impedisce la germinazione del seme. Nei semi di *Araucaria* l'attività POD incrementa dopo il taglio dei tessuti (RIQUELME e CARDEMIL, 1993); nel tegumento del seme di *Brassica* aumenta nelle 48 ore successive alla ferita causata dalla protrusione della radichetta. In accordo con l'ipotesi di RIQUELME, CARDEMIL (1993), l'aumento delle POD nel tegumento potrebbe essere legato al ruolo protettivo che l'enzima svolge nei processi di riparazione cellulare che in natura si verificano in seguito alle lesioni riportate durante la dispersione del seme. In questo caso le POD potrebbero catalizzare l'ossidazione di composti fenolici, presenti nella parete cellulare dello strato a palizzata e pigmentato, a composti idrofobici come suberina (KOLATTUKUDY, 1984; ESPELLE *et al.*, 1986), lignina (GROSS, 1977) o altri polimeri che proteggono i polisaccaridi di parete dall'attacco enzimatico e dall'acqua (FRY, 1980). E' probabile inoltre che l'enzima, dopo la rottura del tegumento, possa essere rilasciato dalle cellule di questo nel suolo, dove promuoverebbe la produzione o la degradazione di polimeri o la formazione di fenoli che con la loro azione antimittotica (PODBIELKOWSKA *et al.*, 1994)

proteggerebbero la plantula dalle infezioni microbiche.

*Ringraziamenti* - Lavoro effettuato con il contributo finanziario del MURST.

#### LETTERATURA CITATA

- CASSAB G.I., VARNER J.E., 1987 - *Immunocytolocalization of extensin in developing soybean seed coat by immunogold-silver staining and by tissue printing on nitrocellulose paper*. J. Cell Biol., 105: 2581-2588.
- DUNFORD H.B., STILLMAN J.S., 1976 - *On the function and mechanism of action of peroxidase*. Coord. Chem. Rev., 19: 187-251.
- EGLEY G.H., PAUL R.N., VAUGHAN K.C.JR., DUKE S.O., 1983 - *Role of peroxidase in the development of water-impermeable seed coats in Sida spinosa L.* Planta, 157: 224-232.
- ESPELLE K.E., FRANCESCHI V.R., KOLATTUKUDY P.E., 1986 - *Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue*. Plant Physiol., 81: 487-492.
- FRY S.C., 1980 - *Giberellin-controlled pectinic acid and protein secretion in growing cells*. Phytochemistry, 19: 735-740.
- GAHAN P.B., 1984 - *Plant histochemistry and cytochemistry*. Academic Press. London.
- GIJZEN M., VAN HUUSTEE R., BUZZEL R.I., 1993 - *Soybean seed coat peroxidase*. Plant Physiol., 103: 1061-1066.
- GROSS G.G., 1977 - *Biosynthesis of lignin and related monomers*. Recent Adv. Phytochem., 11: 141-184.
- KOLATTUKUDY P.E., 1984 - *Biochemistry and function of cutin and suberin*. Can. J. Bot., 62: 2918-2933.
- MARKKOLA A.M., OHTONEN R., TARVAINEN O., 1990 - *Peroxidase activity as an indicator of pollution stress in the fine roots of Pinus sylvestris*. Water, air, soil pollution, 52: 149-156.
- McELDOON J.P., POKORA A.R., DORDICK J.S., 1995 - *Lignin peroxidase-type activity of soybean peroxidase*. Enzyme Microb. Technol., 17: 359-365.
- PODBIELKOWSKA M., KUPIDLOWSKA E., WALEZA M., DOBRZYNSKA K., LOUIS S.A., KEIGHTLEY A., ZOBEL A.M., 1994 - *Coumarins as antimittotics*. Inter. J. Pharmacog., 32: 1-12.
- RIQUELME A., CARDEMIL L., 1993 - *Peroxidases in the cell walls of seeds and seedlings of Araucaria araucana*. Phytochem., 32: 15-20.

**RIASSUNTO** - L'attività perossidasi è stata misurata nel tegumento del seme di *Brassica* durante la germinazione. I livelli di POD aumentano da 24 a 72 ore, e non subiscono cambiamenti significativi da 72 a 144 ore. Il livello massimo di attività enzimatica si ha 48 ore dopo la protrusione della radichetta. Dopo la germinazione, l'enzima è localizzato sulle pareti cellulari degli strati palizzata, pigmentato ed aleuronico e nel citoplasma delle cellule aleuroniche.

#### AUTORI

Lorenza M. Bellani, Dipartimento di Biologia Evolutiva, Università di Siena, Via Mattioli 4, 53100 Siena  
 Massimo Guarnieri, Centro Servizi della Facoltà di Scienze, Università di Siena, Via del Laterano 8, 53100 Siena  
 Anna Scialabba, Dipartimento di Scienze Botaniche, Università di Palermo, Via Archirafi 38, 90123 Palermo

## Trasmissione verticale di batteri endosimbionti nel fungo micorrizico arbuscolare (AM) *Gigaspora margarita*

V. BIANCIOTTO, G. BÉCARD e P. BONFANTE

**ABSTRACT** - *Vertical transmission of endobacteria in the AM fungus Gigaspora margarita* - Intracellular bacteria have been recently described in the cytoplasm of an arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* BEG 34. In particular they were found in all phases of the life cycle of the AM fungus (spore, extra and intraradical mycelium). To investigate bacteria are transmitted in the AM fungi based on a vertical (from one spore to spores of the next generation) or a horizontal mechanism (by the acquisition of bacteria from the soil during the extraradical phase of the life cycle), we colonized *in vitro* carrot transformed roots with a single mother spore of *G. margarita*. Morphological and molecular observations were carried out on the spores of the new generation. The results of PCR amplifications using universal and specific primers to the 16S rDNA, together confocal microscopy observations, demonstrate that these endobacteria are still present in the first spore generation. Therefore they represent a stable population in the cytoplasm of the AM fungi.

*Key words:* arbuscular mycorrhizal fungi, endobacteria, ribosomal genes, transformed roots

### INTRODUZIONE

I funghi micorrizici arbuscolari sono biotrofi obbligati che appartengono all'ordine Glomales degli Zigomiceti e che entrano in simbiosi con le radici dell'80% delle piante terrestri. Nonostante i recenti avanzamenti nella comprensione delle basi molecolari dell'interazione pianta fungo (HARRISON 1999), molti aspetti della biologia di questi funghi rimangono ancora oscuri. Ciò è principalmente dovuto al loro stato di biotrofi obbligati, alla loro condizione di organismi cenocitici e multinucleati e ad un livello di variabilità genetica molto elevato. Un livello ulteriore di complessità genetica è dato dalla presenza di strutture citoplasmatiche inizialmente denominate BLOs (bacteria like organisms) e descritte morfologicamente in numerosi isolati di funghi AM (*Acaulospora laevis*, *Glomus versiforme*, *Gigaspora margarita*). Nel nostro laboratorio abbiamo dimostrato, grazie ad un approccio combinato di tipo morfologico e molecolare, che i BLOs presenti nelle spore di *G. margarita* (BEG 34) sono dei veri batteri (BIANCIOTTO *et al.*, 1996). All'interno delle spore della specie AM *G. margarita* sono infatti presenti endosimbionti batterici (circa 250000 batteri/spora) identificati come appartenenti al genere *Burkholderia* sulla base delle sequenze del gene ribosomiale (BIANCIOTTO *et al.*, 1996). Esperimenti di PCR usando degli oligonucleotidi specifici (BLOf-BLOR) hanno dimostrato che la stessa popolazione batterica è presente in tutte le fasi del ciclo vitale del fungo:

spora, micelio extraradicale, ife del fungo durante la fase simbiotica all'interno delle radici della pianta ospite. Lo scopo di questo lavoro è verificare se il meccanismo di trasmissione di questi batteri nei funghi AM si basi su una trasmissione verticale (da una spora alla generazione di spore successiva) oppure orizzontale (con l'acquisizione di batteri dal suolo durante il ciclo vitale del fungo). Per questo motivo sono stati approntati esperimenti di monitoraggio su spore di *G. margarita* ottenute axenicamente *in vitro* con il sistema di coltura duale sviluppato da BÉCARD, FORTIN, 1988. Generazioni successive di spore di *G. margarita* sono state ottenute colonizzando *in vitro* radici trasformate di carota a partire da una sola spora madre. Su queste spore di prima generazione sono state effettuate osservazioni di tipo morfologico e molecolare per verificare se era ancora rivelabile la presenza di batteri.

### MATERIALI E METODI

Spore del fungo AM *G. margarita* sono state raccolte da vasi di trifoglio micorrizati. Le spore sono state lavate più volte in acqua filtrata distillata sterile, poi sterilizzate con 4% di chloramina T e 0.04% di streptomycin per 30 min e quindi sonicate e lavate con acqua filtrata distillata sterile. Le spore così trattate sono state utilizzate per esperimenti di micorrizzazione *in vitro*. Radici trasformate di carota sono state propagate *in vitro* su un mezzo minimo come

descritto in BÉCARD, FORTIN, 1988. Venti di queste sono state selezionate disposte in capsule Petri quadrate e messe in contatto con un'unica spora. Le radici sono state poi analizzate per verificarne la colonizzazione e la formazione di spore di nuova generazione.

*Osservazioni morfologiche.* La presenza di batteri nelle spore è stata verificata incubando il citoplasma con il Live/Dead BacLight™ kit (Molecular Probes) come descritto in BIANCIOTTO *et al.*, 1996. I batteri vivi nel citoplasma appaiono come strutture fluorescenti in verde mentre quelli morti appaiono in rosso.

*Estrazione del DNA e Amplificazione in PCR.* Da ogni singola spora è stato estratto il DNA in un tampone contenente 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100. Il 16S rDNA è stato amplificato in PCR utilizzando una coppia di primers universali per gli eubatteri (704f/1495r) e una coppia di primers specifici (BLOf/BLOr) disegnati per i batteri endosimbionti di *Gi. margarita* (BEG 34) come descritto in BIANCIOTTO *et al.*, 1996).

#### RISULTATI E DISCUSSIONE

Tutte le prove di micorrizzazione *in vitro* con una spora madre di *G. margarita* hanno dato esito positivo. Osservazioni effettuate a 10 settimane dall'inoculo hanno evidenziato la formazione da 50 a 70 spore di nuova generazione per capsula. L'uso combinato di tecniche morfologiche e molecolari su queste spore ci ha permesso di verificare la presenza costante degli endobatteri nelle spore di neoformazione ottenute a conclusione del ciclo vitale del fungo. Esperimenti di PCR sul DNA estratto da queste spore usando sia primers universali eubatterici per il 16S rDNA che primers specifici per gli endobatteri di *G. margarita* (BLOf-BLOr) hanno dato amplificati della lunghezza attesa in tutte le spore testate. Rispettivamente di circa 790 e 400 paia di basi. Anche le osservazioni in microscopia confocale utilizzando un kit specifico per batteri hanno messo in evidenza che le neo spore presentavano nel citoplasma numerosi endobatteri. Allo stesso tempo sono stati messi a punto esperimenti di ibridazione *in situ* utilizzando il primer universale EUB338 (AMANN *et al.*, 1990) e il primer specifico BLOr sull'isolato BEG 34. Tali prove hanno confermato la presenza degli endobatteri nel citoplasma delle spore. In tutte

le prove effettuate sono state utilizzate come controllo negativo spore di *Gigaspora rosea* note per essere prive di endobatteri.

I risultati ottenuti dimostrano che è possibile, a partire da una sola spora madre, ottenere spore di *G. margarita* (BEG 34) in condizioni completamente axeniche e che all'interno del micelio cenocitico di questi Zigomiceti i batteri vengono trasmessi da una generazione all'altra. Questi dati suggeriscono quindi una trasmissione verticale degli endobatteri che rappresentano una popolazione stabile nel citoplasma fungino.

#### LETTERATURA CITATA

- AMANN R.I., KRUMHOLZ L., STHAL D.A., 1990 - *Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology*. J. Bacteriol., 172: 762-770
- BÉCARD G., FORTIN J.A., 1988 - *Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots*. New Phytol., 108: 211-218.
- BIANCIOTTO V., BANDI C., MINERDI D., SIRONI M., BONFANTE P., 1996 - *An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria*. Appl. Environ. Microbiol., 62: 3005-3010.
- HARRISON, M. J. 1999 - *Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 50: 361-89.

**RIASSUNTO** - Batteri intracellulari sono stati descritti precedentemente nel citoplasma di un fungo micorrizico arbuscolare *Gigaspora margarita* (isolato BEG 34). In particolare essi sono presenti nel fungo durante tutte le fasi del suo ciclo vitale (spora, micelio extraradicale, micelio intraradicale). Per verificare se il meccanismo di trasmissione di questi batteri nei funghi AM si basi su una trasmissione verticale (da una spora alla generazione di spore successiva) oppure orizzontale (con l'acquisizione di batteri dal suolo durante la fase extraradicale del ciclo vitale) sono stati messi a punto esperimenti di monitoraggio su spore di *G. margarita* ottenute axenicamente *in vitro* con il sistema di coltura duale (radici trasformate di carota e fungo AM) sviluppato da BÉCARD, FORTIN, 1988. Generazioni successive di spore di *G. margarita* sono state ottenute colonizzando *in vitro* radici trasformate di carota a partire da una sola spora madre. Su queste spore di prima generazione sono state effettuate osservazioni di tipo morfologico e molecolare. I risultati ottenuti utilizzando primers specifici per l'amplificazione PCR del gene ribosomale degli endobatteri di *G. margarita*, insieme ad osservazioni in microscopia confocale hanno dimostrato che questi batteri continuano ad essere presenti nella prima generazione di spore. Questo suggerisce una trasmissione verticale da una generazione all'altra di spore e dimostra che questi batteri rappresentano una popolazione stabile nel citoplasma fungino.

#### AUTORI

Valeria Bianciotto, Paola Bonfante, CSMT - C.N.R. e Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Torino, Viale Mattioli 25, 10125 Torino  
Guillaume Bécard, Laboratoire de Mycologie, Pole de Biotechnologie Vegetale, Chemin de borde-rouge BP 17, Auzeville 31326, Castanet Tolosan, France

## Gradiente di differenziazione del fusto e localizzazione delle perossidasi in piante di *Cicer arietinum* L.

A. CHIAPPETTA, G. ANSANI, M.B. BITONTI, A.M. INNOCENTI, P.D. GEROLA, L. CARRARO, G. LOMBARDO e E. ONELLI

**ABSTRACT** - *Gradient of tissue differentiation and cytochemical localization of peroxidases in Cicer arietinum plants* - Peroxidase activity was determined along the stem of light-grown seedlings and field-grown plants of *Cicer arietinum* L. Apparent tissue distribution of enzyme was visualised by means of histochemical technique. Apoplastic biochemical activity was detected in lignosuberized cells whereas in living cells the enzyme was visualised at the level of vacuols and plasmalemma. Moreover, a close relationship between the occurrence of enzyme and the gradient of tissue differentiation along the stem appeared to characterize plant growth.

*Key words:* *Cicer arietinum*, cell differentiation, peroxidase, stem

Scopo del lavoro è stato quello di verificare a livello di microscopia ottica, presenza e distribuzione delle perossidasi (POD) lungo il fusto di piante di *Cicer arietinum* L. L'ambito tematico in cui esso si inquadra è volto a localizzare e correlare, in piante a stadi di sviluppo diversi, l'attività delle POD con quella delle DAO (diaminoossidasi). Queste ultime risultano, infatti, essere ampiamente diffuse nelle Leguminose ed a quelle apoplastiche viene assegnata la funzione di produrre l' $H_2O_2$  necessaria all'azione delle POD, in processi fisiologici correlati con la differenziazione cellulare (FEDERICO *et al.*, 1985; FEDERICO, ANGELINI, 1986; ANGELINI, FEDERICO, 1989; ANGELINI *et al.*, 1990; SLOCUM, FUREY, 1991).

La localizzazione istochimica delle perossidasi è stata effettuata sfruttando la precipitazione della dioaminobenzidina (DAB) a seguito di somministrazione di  $H_2O_2$  esogena. La reazione citochimica è stata effettuata su sezioni ottenute al vibrotomo da materiale blandamente prefissato in gluteraldeide, operando a pH 5.5 risultato essere, sulla base di dati precedenti, il valore ottimale per la suddetta reazione. La localizzazione delle POD è stata seguita lungo il fusto in plantule con 3/4 internodi, cresciute in laboratorio, e piante allevate in campo, presentanti mediamente 21 internodi. In linea con i dati in letteratura, attività POD è stata osservata a livello delle pareti cellulari di xilema, sclerenchima ed epidermide. Tale attività è stata posta in relazione alla lignificazione, suberificazione e cutinizzazione presenti in

tali tessuti. Attività POD è stata inoltre osservata a livello del cambio cribro-vascolare, del floema, dell'endoderme, delle cellule stomatiche e dei tricomi ghiandolari.

Per quanto attiene il gradiente di attività enzimatica nel corso della differenziazione dei singoli tessuti, nelle plantule cresciute in laboratorio attività POD è stata osservata nell'epidermide già a livello dell'internodo apicale mentre negli altri tessuti in via di differenziazione si è riscontrato un gradiente basipeto. Al contrario, nelle piante cresciute in campo, a livello dell'internodo apicale tutti i tessuti sono risultati essere interessati dall'attività POD, ad eccezione del cambio presente solo nella porzione intrafasciale e non ancora attivo. Passando ad internodi successivi, è stato riscontrato un gradiente basipeto di attività in relazione al progredire della differenziazione dei diversi tessuti o dell'attivazione del cambio. Negli internodi basali è, invece, assente a livello dei tessuti che hanno completato la differenziazione (fibre), mentre permane a livello di floema, cambio e legno secondario in via di differenziazione.

Tali indagini al microscopio ottico sono state affiancate da informazioni di carattere ultrastrutturale, compiute al microscopio elettronico, riguardanti la distribuzione delle POD in plantule allevate in laboratorio. I dati preliminari ottenuti indicano che le POD finora evidenziate potrebbero essere separate in due gruppi: alcune sono presenti nel simplasto (vacuolo, plasmalemma) di cellule destinate a mantenersi vive e con parete non lignificata (epidermide,

floema, endoderme) altre si trovano nell'apoplasto (prevalentemente strati più esterni della parete) di cellule in via di lignificazione (fibre e trachee), destinate a morire dopo la completa differenziazione.

#### LETTERATURA CITATA

ANGELINI R., FEDERICO R., 1989 – *Histochemical evidence of polyamine oxidase and generation of hydrogen peroxide in the cell wall*. J. Plant Physiol., 135: 212-217.

ANGELINI R., MANES F., FEDERICO R., 1990 – *Spatial and functional correlation between diamine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chick-pea stems*. Planta, 182: 89-96.

FEDERICO R., ANGELINI R., 1986 – *Occurrence of diamine oxidase in the apoplast of pea epicotyl*. Planta, 167: 300-

303.

FEDERICO R., ANGELINI R., ARGENTO-CERU' M.P., MANES F., 1985 – *Immunohisto-chemical demonstration of lentil diamine oxidase*. Cell. Mol. Biol., 31: 171-174.

SLOCUM R.D., FUREY M.J., 1991 – *Electron-microscopic cytochemical localization of diamine and polyamine oxidase in pea and maize tissue*. Planta, 183: 443-450.

RIASSUNTO – E' stata effettuata una localizzazione istochimica delle perossidasi lungo il fusto di *Cicer arietinum* L., utilizzando sia giovani plantule che piante adulte cresciute in campo. Perossidasi sono presenti a livello apoplastico nelle cellule in via di lignificazione e nel simplasto (vacuolo, plasmalemma) di cellule destinate a mantenersi vive dopo la completa differenziazione. Una stretta relazione è stata, inoltre, trovata tra attività enzimatica e gradiente di differenziazione lungo il fusto.

#### AUTORI

A. Chiappetta, G. Ansani, Maria Beatrice Bitonti, Anna Maria Innocenti, Dipartimento di Ecologia, Università della Calabria, Arcavacata di Rende (Cosenza)  
 Paolo Gerola, Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università dell'Insubria, Via Ravasi 2, 21100 Varese  
 Luisa Maria Carraro, Giuliana Lombardo, Elisabetta Onelli, Dipartimento di Biologia, Università di Milano, Via Celoria 26, 20133 Milano

## Pattern di metilazione e zonazione nell'espressione di RPS28 e Met1 nel timing organogenetico in *Prunus persica*

R. COZZA, G. DONATO, A. SETA, M. RUFFINI-CASTIGLIONE, D. MARIOTTI, M.B. BITONTI e A.M. INNOCENTI

**ABSTRACT** - *Pattern of DNA methylation and in situ expression of RPS28 e Met1 during organogenesis in Prunus persica* - Pattern of DNA methylation and in situ expression of RPS28 e Met1 genes were investigated in the shoot apical meristem (SAM) of peach (*Prunus persica*) during distinct developmental phases. Differences in the level and cytological pattern of both methylation and gene expression have been observed between juvenile, vegetative adult and reproductive buds. Hence, both parameters are reliable markers of SAM activity and developmental fate.

*Key words:* developmental phase transition, DNA methylation, *Prunus persica*, shoot apical meristem

Scopo del lavoro è stato quello di caratterizzare a livello citologico e metabolico il meristema apicale del germoglio (SAM) di *Prunus persica* in relazione alle diverse fasi di sviluppo (giovanile, vegetativa adulta e riproduttiva). Come modello sono state prese in esame sia gemme singole, a destino vegetativo, che il complesso gemmario della triade, tipico del pesco, in cui ad una gemma centrale con destino vegetativo si affiancano due gemme laterali competenti a fiorire. I parametri presi in esame nelle diverse zone del SAM hanno riguardato da una parte il livello ed il pattern citologico di metilazione del DNA nucleare, dall'altra l'espressione dei geni RPS28, codificante per una proteina della subunità minore del ribosoma, e Met 1 codificante per una metilasi di tipo 1.

Per quanto attiene il primo aspetto si è proceduto ad effettuare una immunolocalizzazione dell'anticorpo contro la 5-metilcitosina, mentre per quanto concerne il pattern di espressione genica l'approccio metodologico è stato quello della ibridazione *in situ*.

Le analisi sono state effettuate:

su gemme vegetative singole, prelevate in diversi momenti stagionali (da marzo fino a giugno) da piante allo stadio giovanile ed adulto;

sul complesso della triade, seguita nel corso del suo intero sviluppo dalla fase di pre-induzione sino alla differenziazione fiorale.

I risultati relativi all'immuno-localizzazione della 5-metilcitosina hanno permesso di stabilire che, indipendentemente dal periodo stagionale, il livello di metilazione, valutato sia come percentuale di cellule marcate che come intensità di marcatura per nucleo, è sempre maggiore nella fase vegetativa adulta, dove

la marcatura appare essere omogeneamente distribuita su tutto il nucleo. Al contrario nella fase giovanile, che presenta una minore marcatura, questa è preferenzialmente localizzata alla periferia nucleare. L'uso del fluorocromo cromomicina A3, specifico per le sequenze ricche in CG, ha confermato questo modello di marcatura. Analizzando separatamente gli strati L1, L2 ed L3 del SAM, si è potuto inoltre osservare un comportamento differenziale dello strato L1 ed L3 rispettivamente nella fase adulta ed in quella giovanile.

Per quanto attiene l'espressione *in situ* del gene RPS28 e Met-asi 1 è emerso che nella fase vegetativa il segnale è molto forte nel periodo di intensa attività metabolica ed il pattern istologico di localizzazione ricalca, sia nel giovane che nell'adulto, la zonazione tipica dell'apice vegetativo. Il segnale di espressione è infatti presente nelle zone del SAM dove più intensa è l'attività proliferativa quali la "peripheral zone" (PZ) e, sul margine fogliare, la blastozona. Nel complesso della triade, che compare a partire da maggio, il segnale si presenta più debole e diffuso sull'apice della gemma centrale che si svilupperà con ritardo, mentre nella gemma laterale il segnale è sempre più forte, e nella fase di induzione coinvolge notevolmente la "central zone" (CZ) e lo strato L1. Il segnale di espressione è fortemente presente anche nella fase di differenziazione fiorale dove, nel marcare ancora una volta le zone di intensa proliferazione, mostra pattern distintivi dei diversi momenti dell'organogenesi.

Alla luce dei dati riportati si può ritenere che la metilazione del DNA sia strettamente correlata al cambiamento di fase (phase change). Dati sempre più

ampi in letteratura suggeriscono che la metilazione del DNA è coinvolta in molteplici processi (ADAMS, 1990; CEDAR, 1988; CEDAR, RAZIN, 1990) e che cambiamenti nello stato di metilazione possono modulare l'espressione genica e la morfogenesi delle piante (KAKUTANI *et al.*, 1996; RICHARDS, 1997). Le differenze da noi riscontrate, sia a livello del pattern citologico di metilazione che di espressione della Met-asi 1, possono quindi essere correlate ad un diverso programma di espressione di specifici geni nei diversi stadi di sviluppo del meristema facendo intuire un ruolo chiave della metilazione nella riprogrammazione del meristema durante la transizione dalla fase giovanile alla fase adulta. Nelle due fasi vegetative considerate i nostri risultati evidenziano, inoltre, una stretta correlazione tra espressione di RPS28 e proliferazione cellulare. L'espressione differenziale sia di RPS28 che di Met1 nel complesso della triade dimostra, infine che entrambi i geni potrebbero essere correlati sia al timing di attivazione del meristema che al suo destino organogenetico.

#### AUTORI

Radiana Cozza, A. Seta, Maria Beatrice Bitonti, Anna Maria Innocenti, Dipartimento di Ecologia, Università della Calabria, 87030 Arcavacata di Rende (Cosenza)  
Monica Ruffini-Castiglione, Dipartimento di Scienze Botaniche, Università di Pisa, Via L. Ghini 5, 56100 Pisa  
Giannino Donato, Domenico Mariotti, Istituto di Biochimica ed Ecofisiologia Vegetali, CNR, 00016 Monterotondo Scalo (Roma)

#### LETTERATURA CITATA

- ADAMS R.L.P., 1990 - *DNA methylation*. Biochem. J., 265: 309-320.  
CEDAR H., 1988 - *DNA methylation and gene activity*. Cell, 53: 3-4.  
CEDAR H., RAZIN A., 1990 - *DNA methylation and development*. Biochem. Biophys. Acta, 1049: 1-8.  
KAKUTANI T., JEDDELOH J.A., FLOWERS S.K., MUNAKATA K., RICHARDS E.J., 1996 - *Developmental abnormalities and epimutations associated with DNA hypomethylation mutations*. Proc. Natl. Acad. Sci., 93: 12406-12411.  
RICHARDS E.J., 1997 - *DNA methylation and plant development*. Trends in Genet., 13: 319-323.

RIASSUNTO - Il livello ed il pattern citologico di metilazione del DNA e l'espressione *in situ* dei geni RPS28 e Met1 sono stati valutati nel meristema apicale del germoglio (SAM) di *Prunus persica* in relazione a specifiche fasi di sviluppo. Le differenze quantitative e qualitative riscontrate tra il meristema delle gemme giovanili, vegetative adulte e riproduttive caratterizza entrambi i parametri come markers sensibili dell'attività metabolica e del destino organogenetico del SAM.

## Alcuni effetti del cadmio su plantule di riso (*Oryza sativa* L.)

F. DALLA VECCHIA, P. NOGAROLE, C. GONNELLI, R. GABBRIELLI e N. RASCIO

**ABSTRACT** - *Some cadmium effects on rice plants (Oryza sativa L.)* - Cadmium is one of major environmental pollutants. It is active at lower concentrations respect to those of the other heavy metals. Cadmium accumulated in plants represents the most important cause of contamination for animals and humans. In the present work we have studied some effects of cadmium at different concentrations in rice plants, considering the behaviour of both roots and shoots.

*Key words:* *Oryza sativa* L., cadmium, phytochelatins, ultrastructure

Negli ultimi anni il problema dell'inquinamento da metalli pesanti ha ricevuto considerevole attenzione a causa dell'aumentata emissione di questi nell'ambiente, attraverso attività industriali, agricole o di produzione energetica (HENDRY *et al.*, 1992). Il cadmio è uno dei principali contaminanti di questo tipo e manifesta fitotossicità a concentrazioni più basse di altri metalli pesanti (HARDIMAN, JACOBY, 1984). Del cadmio si conoscono numerosi effetti a livello fisiologico e metabolico sugli organismi vegetali, anche se non per tutti è stata chiarita l'azione primaria del metallo (OUZOUNIDOU *et al.*, 1977). Il cadmio accumulato nelle piante, inoltre, è la fonte principale di contaminazione anche per animali ed esseri umani (VAN BRUWAENE *et al.*, 1984). Risultano quindi di notevole importanza studi condotti su specie vegetali di interesse alimentare.

Nel presente lavoro abbiamo studiato le risposte di plantule di riso, a concentrazioni crescenti di cadmio (50, 100, 250 mM) analizzando diversi aspetti conseguenti al trattamento con il metallo sia nella radice che nel germoglio.

Accettando come parametro di tolleranza la concentrazione di cadmio che riduce la crescita delle radici del 50%, risulta che, per il riso, la soglia di tossicità si colloca appena al di sopra di Cd 50 mM. Un'evidente organo-specificità si riscontra nella distribuzione del cadmio tra radice e germoglio. Il grosso del cadmio entrato dall'ambiente esterno viene "immobilizzato" nella radice attraverso due diversi meccanismi di detossificazione. Il primo si realizza all'esterno delle cellule e consiste nell'esclusione del cadmio dai protoplasti mediante il suo legame con gli acidi poligalatturonici delle pareti. Il secondo viene attivato all'interno delle cellule e si basa sulla produzione Cd-indotta di fitochelatine che, assieme al glutatione, sono in grado di complessare il cadmio,

successivamente traslocato nel compartimento vacuolare. In tal modo, la maggior parte del cadmio viene trattenuta nella radice. Questo organo risente, comunque, della presenza del metallo, che ne inibisce la crescita in lunghezza, probabilmente alterando l'attività del meristema apicale. La capacità della radice di trattenere il cadmio, riducendone la traslocazione verso la parte aerea della plantula, mostra di mantenere la sua efficacia anche alle alte concentrazioni del metallo. Infatti la quantità di cadmio che arriva al germoglio si mantiene sul 5-7% di quello entrato nelle cellule radicali nell'intero range di concentrazioni da noi utilizzate (50-250 mM). Anche nei tessuti del germoglio si osserva una certa capacità di detossificazione del cadmio. Questa, però, si basa principalmente sull'esclusione di parte del metallo dai protoplasti. A differenza di quanto avveniva nelle radici, invece, il cadmio entrato nelle cellule del germoglio non sembra indurre la produzione di quantità rilevabili di fitochelatine come composti detossificanti intracellulari. Ciò può dipendere dal fatto che la quantità di cadmio che arriva al citoplasma delle cellule del germoglio è notevolmente inferiore a quella che entra nelle cellule radicali. Nel germoglio, comunque, il cadmio alle concentrazioni da noi utilizzate, provoca effetti tossici già alla concentrazione di Cd 50 mM. Oltre alla riduzione della crescita, si producono alterazioni dell'organizzazione e della funzionalità dei cloroplasti e la caduta dell'attività fotosintetica, che diventano tanto più drammatiche quanto più aumenta la concentrazione del metallo. Nei tessuti del germoglio, quindi, gli effetti tossici del cadmio sulle strutture e sul metabolismo cellulare si manifestano a concentrazioni inferiori a quelle che potrebbero attivare l'induzione di specifici sistemi di detossificazione. La resistenza della plantula al cadmio sembra così dipendere essenzial-



mente dalla capacità della radice di trattenere il metallo, ostacolandone la traslocazione verso il germoglio.

## LETTERATURA CITATA

- HARDIMAN R.T., JACOBY B., 1984 – *Absorption and translocation of Cd in bush beans (Phaseolus vulgaris)*. *Physiol. Plant.*, 61: 670-674.
- HENDRY G.A.F., BAKER A.J.M., EWART C.F., 1992 – *Cadmium tolerance and toxicity, oxygen radical processes and molecular damage in cadmium-tolerant and cadmium-sensitive clones of Holcus lanatus*. *Acta Bot. Neerl.*, 41: 271-281.
- OUZOUNIDOU G., MOUSTAKAS M., ELEFTHEROU E.P., 1997 - *Physiological and ultrastructural effects of cad-*

- mium on wheat (Triticum aestivum L.) leaves*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 32: 154-160.
- VAN BRUWAENE R., KIRCHMANN R., IMPENS R., 1984 – *Cadmium contamination in agriculture and zootechnology*. *Experientia*, 40: 42-52.

RIASSUNTO – Il cadmio è uno dei principali contaminanti presenti nell'ambiente e manifesta fitotossicità a concentrazioni più basse di altri metalli pesanti. Il cadmio accumulato nelle piante, inoltre, è la principale fonte di contaminazione per animali ed esseri umani. Nel presente lavoro abbiamo ritenuto interessante studiare le risposte di una pianta di notevole importanza alimentare, quale il riso, alle concentrazioni crescenti di cadmio, analizzando diversi aspetti conseguenti al trattamento con il metallo sia nella radice che nel germoglio.

## AUTORI

Francesca Dalla Vecchia, Patrizia Nogarole, Nicoletta Rascio, Dipartimento di Biologia, Università di Padova, Via U. Bassi 58 b, 35131 Padova  
Cristina Gonnelli, Roberto Gabrielli, Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Firenze, via P.A. Micheli 1, 50121 Firenze

## Trattamento con campo magnetico stabile per pollini con basso potere germinativo

A. FIRETTO, M.G. ALAIMO e M.R. MELATI

**ABSTRACT** - *Treatment with fixed magnetic field of pollen with low germination capacity* - *Antirrhinum majus* L. pollen, conserved for a long time, and with low vitality and reduced germinative capacity, was exposed to a static magnetic field, created with an electromagnet E 104B/EPR (Varian). Magnetic induction of 30mT was conducted for 15, 30 and 60 seconds, and significantly stimulated vitality (from 40% to 85%) and germinative capacity (up to 95%) after 15 and 30 seconds. These preliminary data encourage us to carry out further investigations.

*Key words:* germinative capacity, magnetic induction, pollen, vitality

L'interesse suscitato dai campi elettrici e magnetici generati dalle linee di trasmissione della corrente elettrica (campi a 50 Hz) e quelli prodotti da ripetitori radiotelevisivi per la telefonia mobile e i telefoni cellulari (campi elettromagnetici a frequenza), per la loro possibile interazione sulla salute umana, ha promosso diverse ricerche volte alla identificazione delle relazioni tra tali campi e la materia organica vivente. Il nostro gruppo di ricerca (FIRETTO, 1999; LI VIGNI, MELATI, 1995) ha ottenuto risultati preliminari, pensiamo, di un certo interesse, sulla modificazione della germinabilità di pollini di *Antirrhinum majus* L. con bassa vitalità (testata con fluoresceina allo 0.1% (W/V) in 100% di acetone, stoccata a 4°C per 1 notte e poi portata a volume) (WIDHOLME, 1972) e ridotto potere germinativo, in seguito al trattamento con campi magnetici (PIETRUSZEWSKI, 1993; 1996) statici di 30 mT di intensità, applicati per tempi variabili (15, 30, 60 secondi).

Il sistema utilizzato per il trattamento è costituito dall'elettromagnete E 104B/EPR (Varian) e da particolari provette, dove alloggiare il polline imbibito, ed in grado di adattarsi alla ridotta cavità interna dell'elettromagnete, sede in cui è generato il campo magnetico statico di interesse.

Sia i campioni sottoposti al trattamento di induzione magnetica, che i controlli, sono stati esaminati al microscopio ottico dopo 24 ore di incubazione, in termostato, alla temperatura di 24°C, nelle stesse condizioni ricevute entro il magnete e su substrato liquido, costituito da saccarosio, acido bórico, cloruro di potassio e nitrato di calcio, a pH 5.5 (TOWILL, 1985).

Nelle condizioni sperimentali seguite il campione-controllo si è presentato con bassa percentuale di germinazione e tubetti corti e rari.

Comparando la germinabilità dei controlli con quelle dei trattati sottoposti ad induzione magnetica di 30mT di intensità, per 15, 30 e 60 secondi, solo nel secondo caso si è presentata una buona percentuale di germinazione (del 90% circa) e, nel caso dei trattati per 30 secondi, la percentuale di germinazione s'è incrementata ulteriormente sino al 95%; i tubetti pollinici si sono presentati più lunghi, con qualche irregolarità nello spessore, ma con apici meno slarga-

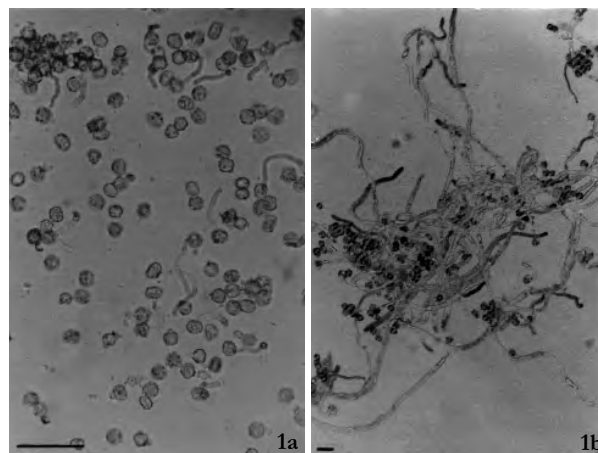


Fig. 1  
*Antirrhinum majus* L. Pollini - controllo con bassa vitalità e potere germinativo (a) e con vitalità e potere germinativo ottimale (b). (barretta = 100µm).

*Antirrhinum majus* L. Pollen - control with low vitality and germinative capacity (a) and with optimal vitality and germinative capacity (b). (bar = 100µm).

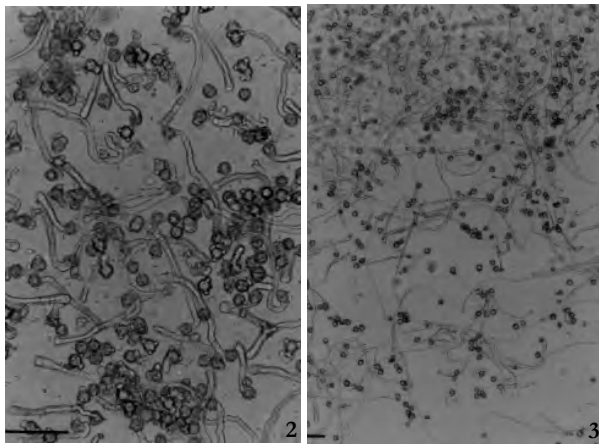


Fig. 2  
*Antirrhinum majus* L. Pollini di tipo 1(a) trattati con campo magnetico statico di 30mT per 15 secondi: esibiscono una percentuale di germinazione (o potere germinativo) alta. (barretta = 100μm).  
*Antirrhinum majus* L. Pollen of 1(a) type treated with a static magnetic field of 30 mT for 15 seconds: they show a high percentage of germination (or germinative capacity). (bar = 100μm).

Fig. 3  
*Antirrhinum majus* L. Pollini di tipo 1 (a) trattati con campo magnetico statico di 30mT per 30 secondi: presentano una percentuale di germinazione (o potere germinativo) anche più elevata rispetto al caso della Fig. 2. (Barretta = 100mm).  
*Antirrhinum majus* L. Pollen of 1 (a) type treated with a static magnetic field for 30 seconds: their percentage of germination (or germinative capacity) is even higher than in the case in Fig. 2. (Bar = 100mm).

ti rispetto al caso precedente. Parallelamente la vitalità è stata incrementata dal 40% all'85%.

Infine con 60 secondi di trattamento la germinazione dei pollini è risultata inibita.

Come si può rilevare dalle foto (Fig. 1a, b; 2; 3; 4) al potere germinativo dei pollini sono da correlare anche le caratteristiche morfogenetiche dei tubetti pollinici, il loro spessore e la morfologia degli apici. Il trattamento di 30mT per 30 secondi ha aumentato significativamente la percentuale di germinazione dei pollini.



Fig. 5  
Elettromagnete E 104B/EPR (Varian) (a, b)  
Electromagnet E 104B/EPR (Varian) (a, b)

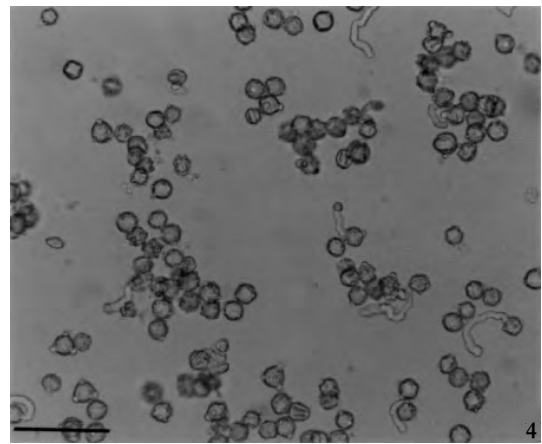
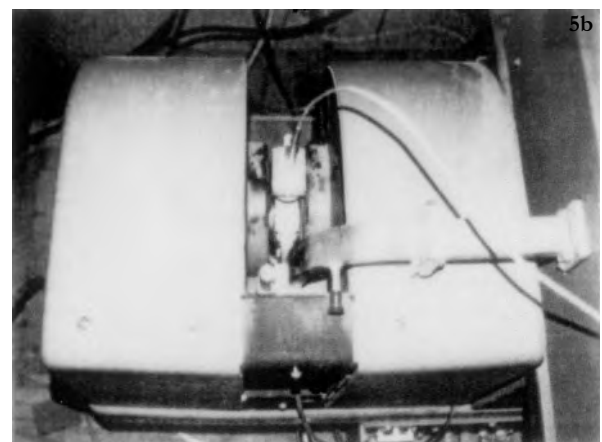


Fig. 4  
*Antirrhinum majus* L. Pollini di tipo 1(a) trattati con campo magnetico statico di 30mT per 60 secondi: presentano una inibizione della percentuale di germinazione (o potere germinativo). (barretta = 100μm).  
*Antirrhinum majus* L. Pollen of 1(a) type treated with a static magnetic field of 30 mT for 60 seconds: there is a repression of their percentage of germination (or germinative capacity). (bar = 100μm).

I risultati evidenziano che lo stimolo magnetico (Fig. 5) risulta benefico sui pollini a bassa vitalità e ridotta germinabilità per cui potrebbe essere usato routinariamente nei centri di conservazione dei pollini (Banche di Geni).

Per quanto riguarda i rapporti intercorrenti tra campi magnetici e materia vivente, negli ultimi anni, si è sviluppata una intensa attività di ricerca in tutto il mondo. Tali studi vanno evidenziando influenze enzimatiche, ioniche, di recettori, nei loro rapporti con i canali di membrana, notando anche che, a differenti tipi di segnali, prolungati per tempi diversi, corrispondono diversi tipi di risposte biologiche (DIONETTE, CARUSO, 1995) e numerose ricerche sono ancora in itinere.

*Ringraziamenti* - Si ringrazia per l'utilizzazione dell'elettromagnete E 104 B/EPR (Varian) il Dott. San Biagio e la Dott.ssa Bulone del CNR di Palermo. Ricerca eseguita con un contributo MURST (Fondi 60%).



## LETTERATURA CITATA

- DIONETTE P., CARUSO I., 1995 - *Associazione laser-campi magnetici nel trattamento della nevralgia del trigemino: studio pilota*. Phoenix, anno II, n.2, Aprile-Giugno: 139-141.
- FIRETTO A., LI VIGNI I., MELATI M.R., 1999 - *Effects of magnetic fields on seedling growth and cytomorphogenesis in Sinapis alba L.* In stampa.
- LI VIGNI I., MELATI M.R., 1995 - *Interazioni tra campo elettromagnetico e germinazione dei semi*. Giorn. Bot. Ital., 129: 2.
- PIETRUSZEWSKI S., 1993 - *Effects of magnetic seed treatment on yields of wheat*. Seed Sci. Technol., 21: 621-626.
- , 1996 - *Effects of magnetic biostimulation of wheat seeds on germination, yield and proteins*. Int. Agrophysics, 10: S 1-55.

TOWILL L.E., 1985 - *Low temperature and freeze-vacuum-drying preservation of pollen*. In: KARTHE K.K. (ed.), *Cryopreservation of plant cell organs*: 171-198. CRC Press. Boca Raton.

WIDHOLME J.M., 1972 - *The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells*. Stain Technol., 47: 189.

RIASSUNTO - Pollini di *Antirrhinum majus* L., conservati da tempo, e con bassa vitalità e ridotto potere germinativo, sono stati esposti ad un campo magnetico statico, creato da un elettromagnete E 104B/ÉPR (Varian). L'induzione magnetica di 30mT è stata condotta per 15, 30 e 60 secondi ed ha significativamente stimolata la vitalità (da 40% circa a 85%) ed il potere germinativo (sino al 95%) dopo 15 e 30 secondi. Questi dati preliminari ci spingeranno ad ulteriori approfondimenti.

## AUTORI

Anna Firetto, Maria Grazia Alaimo, Maria Rita Melati, Dipartimento di Scienze Botaniche, Università di Palermo, Via Archirafi 38, 90123 Palermo

## Localizzazione di clatrina e $\gamma$ -tubulina in radici micorrizzate di tabacco

A. GENRE e P. BONFANTE

**ABSTRACT** - *Localisation of clathrin and  $\gamma$ -tubulin in tobacco mycorrhizal roots* - Cytoskeletal components play crucial roles in many plant cell events, such as organelle movement, cytoplasmic streaming, cell wall deposition and other cytoplasmic events. Microtubules and microfilaments are also known to respond to extracellular stimuli, and to interactions with microorganisms. In arbuscular mycorrhizas (AM), the fungal infection takes place in the root cortex, where hyphae, after crossing the epidermal layer, colonize single cells by penetrating through their wall and developing a highly branched structure called the arbuscule. The presence of the arbuscule causes a drastic rearrangement of the cell cytoplasm (organelle movements, vacuole splitting and new cell wall deposition at the interface between the host and the fungus). In our experiments we studied the patterns of cytoskeleton in root cells of tobacco either colonized or not by the AM fungus *Gigaspora margarita*. The results show that in colonised cells microtubule organising centers, labelled with an anti- $\gamma$ -tubulin antibody, increased their number and distribution, covering the perifungal membrane. A clathrin coating was observed over the perifungal membrane and part of the endoplasmic reticulum. These data suggest new speculations on the role of these cytoskeletal components.

*Key words:* clathrin, cytoskeleton,  $\gamma$ -tubulin, mycorrhizas

### INTRODUZIONE

Le micorrize arbuscolari interessano le radici di oltre l'80% delle piante terrestri e un gruppo di zigomiceti del terreno (Glomales). Durante l'instaurarsi di queste simbiosi il fungo penetra attraverso l'epidermide della radice e produce ife inter- ed intracellulari nel parenchima corticale. Nelle cellule corticali, le ife formano strutture altamente ramificate chiamate arbuscoli. Attraverso queste strutture si compie lo scambio di nutrienti tra i due partner e con la loro formazione ed attività si verifica una notevole riorganizzazione della cellula ospite: la membrana plasmatica si invagina avvolgendo il fungo in crescita, il vacuolo centrale si smembra, il nucleo si muove verso il centro della cellula e nuovi componenti di parete vengono depositi all'interfaccia tra la membrana cellulare dell'ospite e la parete del fungo.

Le componenti del citoscheletro rispondono a molti stimoli intra- ed extracellulari ed hanno un ruolo importante nei meccanismi di trasduzione del segnale durante le interazioni simbiotiche e patogeniche tra piante e funghi. Studi precedenti hanno evidenziato la riorganizzazione di microtubuli e microfilamenti in seguito alla colonizzazione micorrizica arbuscolare.

Presentiamo qui i risultati più recenti delle nostre ricerche sulla disposizione dei centri di organizzazione dei microtubuli (MTOC), e delle membrane rivestite da clatrina in radici di tabacco axeniche o

micorrizzate da *Gigaspora margarita*, confrontandone le rispettive organizzazioni con quelle di microtubuli e microfilamenti.

### MATERIALI E METODI

Nel corso di questa ricerca abbiamo utilizzato le tecniche di immunofluorescenza e microscopia confocale descritte in GENRE, BONFANTE (1999) per osservare l'organizzazione di  $\gamma$ -tubulina e clatrina, confrontandone la rispettiva organizzazione nelle cellule non colonizzate e in quelle ospitanti un arbuscolo.

### RISULTATI

I nostri risultati dimostrano: i) la completa riorganizzazione di tutte le componenti citoscheletriche studiate durante l'infezione fungina e ii) come questa nuova disposizione del citoscheletro sia in relazione con la riorganizzazione del citoplasma dell'ospite e con le strutture fungine intracellulari. Nelle cellule non micorrizzate i MTOC sono localizzati sulla superficie del nucleo; microtubuli e microfilamenti sono associati alla membrana plasmatica e al citoplasma perinucleare; e un rivestimento di clatrina è presente soprattutto su parte del reticolo endoplasmatico. Nelle cellule colonizzate dal fungo, i MTOC si diffondono lungo la membrana periarbuscolare; i microtubuli attraversano l'area occupata dall'arbuscolo collegandone i rami l'uno con l'altro oltreché

con la periferia e con il nucleo della cellula ospite; i filamenti di actina seguono strettamente le ramificazioni fungine ed avvolgono l'intero arbuscolo in un denso reticolo; il reticolo ricoperto da clatrina circonda le ramificazioni del fungo avvolgendo l'intero arbuscolo.

#### DISCUSSIONE

Da queste principali differenze tra le componenti citoscheletriche è possibile trarre alcune ipotesi circa il loro ruolo negli eventi strutturali e funzionali che caratterizzano la simbiosi endomicorrizica.

Innanzitutto è evidente che la colonizzazione arbuscolare induce una nuova organizzazione delle proteine del citoscheletro. Almeno per quanto riguarda i microtubuli, questo è un effetto di una nuova attività trascrizionale e della redistribuzione dei MTOC, come suggeriscono gli studi di espressione genica (BONFANTE *et al.*, 1996) e la marcatura della  $\gamma$ -tubulina.

Il ruolo di queste nuove strutture, per quanto riguarda i microtubuli potrebbe essere legato al movimento degli organelli, al trasporto di vescicole e, pensando alla sottile parete cellulare dell'arbuscolo e alle intense forze che probabilmente agiscono all'interfaccia tra i due simbionti in termini di pressione di turgore, alla stabilizzazione della massa ifale e al sostegno del continuum costituito da fungo / interfaccia / membrana cellulare / citoplasma dell'ospite.

D'altro canto, i filamenti di actina potrebbero essere coinvolti nei processi di scambio di segnali tra i partner, come è stato dimostrato nel caso di interazioni patogeniche (KOBAYASHI *et al.*, 1997), nonché nella regolazione della proliferazione e del posizionamento della membrana cellulare.

Due ipotesi possono spiegare la presenza di un rivestimento di clatrina sulla membrana periarbuscolare: innanzitutto la secrezione di componenti di parete nello spazio dell'interfaccia può essere mediato da vescicole ricoperte, similmente a quanto fu descritto in cellule meristematiche durante la formazione del setto; inoltre, quali che siano le vescicole che si fondono con il plasmalemma secernendo materiali dell'interfaccia o nutrienti, si rende necessario un riciclaggio della membrana, un fenomeno tipicamente mediato dalla clatrina.

Infine, la presenza di clatrina sul reticolo rivestito, un compartimento di stoccaggio dove si fondono vescicole provenienti dalla membrana cellulare, dal reticolo endoplasmatico e dall'apparato di Golgi, mentre altre vescicole gemmano dalla sua superficie dirette verso altre destinazioni intra o extracellulari, può essere messa in relazione con l'aumentato metabolismo mostrato dalle cellule colonizzate (HARRISON, 1998), come suggerisce anche la posizione del reticolo rivestito attorno alla massa fungina.

Gli interrogativi che restano aperti riguardano i fattori scatenanti di questa riorganizzazione cellulare, ovvero i segnali chimici e fisici che i due simbionti si scambiano prima e durante le diverse fasi della colonizzazione.

#### LETTERATURA CITATA

- BONFANTE P., BERGERO R., URIBE X., ROMERA C., RIGAU J., PUIGDOMENECH P., 1996 - *Transcriptional activation of a maize  $\alpha$ -tubulin gene in mycorrhizal maize and transgenic tobacco plants*. Plant J., 9: 737-743.
- GENRE A., BONFANTE P., 1999 - *Cytoskeleton-related proteins in tobacco mycorrhizal cells:  $\gamma$ -tubulin and clathrin localisation*. Eur. J. Hystochem., 43: 105-111.
- HARRISON M. J., 1998 - *Development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis*. Current Opinion Plant Biol., 1: 360-365.
- KOBAYASHI Y., YAMADA M., KOBAYASHI I., KUNOH H., 1997 - *Actin microfilaments are required for the expression of nonhost resistance in higher plants*. Plant Cell Physiol., 38 (6): 725-733.

**RIASSUNTO** - Le componenti citoscheletriche hanno un ruolo fondamentale in molti eventi citoplasmatici, come i movimenti degli organelli, le correnti citoplasmatiche, la deposizione della parete; esse rispondono anche a stimoli extracellulari e alle interazioni con microorganismi. Nelle micorrize arbuscolari (AM) la colonizzazione interessa principalmente le cellule corticali, in cui le ife, attraversata l'epidermide, producono delle strutture ramificate dette arbuscoli. La presenza dell'arbuscolo induce una profonda riorganizzazione del citoplasma (movimenti degli organelli, frammentazione del vacuolo, deposizione di parete all'interfaccia tra i due simbionti). Con questa ricerca abbiamo studiato l'organizzazione del citoscheletro nelle cellule radicali di tabacco, axeniche o colonizzate dal fungo AM *Gigaspora margarita*. I risultati ottenuti dimostrano come, nelle cellule colonizzate, i centri di organizzazione dei microtubuli aumentino per numero e distribuzione, estendendosi alla membrana periarbuscolare. Contemporaneamente un rivestimento di clatrina ricopre la stessa membrana e parte del reticolo endoplasmatico.

#### AUTORI

Andrea Genre, Paola Bonfante, Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Torino, Viale Mattioli 25, 10125 Torino

## Espressione di geni codificanti chitinsintasi in *Glomus versiforme*

L. LANFRANCO, M. VALLINO, R. BALESTRINI e P. BONFANTE

**ABSTRACT** - *Expression analysis of chitin synthase genes in Glomus versiforme* - The genome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* contains at least three distinct chitinsynthase genes (*Gvchs1*, *Gvchs2* and *Gvchs3*). In order to analyse the expression of these genes, specific primers were designed and used in RT-PCR experiments. The expected amplified fragments from the two genes, *Gvchs1* and *Gvchs2*, were detected in mycorrhizal roots. By contrast, *Gvchs3* transcript was not revealed by RT-PCR or by *in situ* hybridization, suggesting that this gene is not expressed in colonized roots. The different expression of chitinsynthase genes might mirror a different role during the fungal life cycle. To have a new tool for studying chitinsynthases a recombinant protein was also expressed in bacteria and used to produce a polyclonal antibody.

*Key words:* chitinsynthase, expression, gene, *Glomus versiforme*

### INTRODUZIONE

I funghi micorrizici arbuscolari (AM) presentano processi morfogenetici molto complessi: ad una fase presimbiotica, caratterizzata da spore e micelio extraradicale, segue una fase simbiotica con la produzione di ife inter-, intracellulari e dei caratteristici arbuscoli (BONFANTE, PEROTTO, 1995). I funghi AM subiscono durante questi passaggi profonde modificazioni morfologiche, soprattutto a livello della parete cellulare. Analisi ultrastrutturali mostrano infatti che la chitina, il polimero dell' N-acetilglucosamina, può assumere un aspetto fibrillare con architettura elicoidale come a livello della parete della spora o un aspetto amorfo come a livello della parete delle ife nell'arbuscolo. La chitina, oltre al ruolo strutturale, può anche assumere un ruolo di molecola segnale: oligomeri di chitina possono infatti indurre le risposte di difesa della pianta nelle interazioni con patogeni e in alcune ectomicorrize.

Le conoscenze sui meccanismi di sintesi della chitina al momento riguardano il lievito e alcuni funghi filamentosi modello. In lievito la sintesi di chitina richiede tre geni la cui espressione è regolata nel tempo e nello spazio (BULAWA C.E., 1993). I funghi filamentosi presentano generalmente un numero più alto di geni chitinsintasi (*chs*) (SPECHT *et al.*, 1996). Per omologia di sequenza le chitinsintasi sono state raggruppate in cinque classi (I-V) ma non è stato ancora possibile assegnare un ruolo specifico a ciascuna classe. In alcuni casi, esperimenti di mutagenesi su determinati geni hanno consentito di individuarne un ruolo specifico. Per l'identificazione e lo studio di geni *chs* nel fungo AM *Glomus versiforme* è

stato seguito un approccio molecolare: in questo lavoro è stata analizzata l'espressione di geni *chs* durante la fase di colonizzazione della radice ed è stato svolto il lavoro per la produzione di un anticorpo policlonale.

### MATERIALE E METODI

I geni *chs* di *Glomus versiforme* sono stati identificati da LANFRANCO *et al.* (1999a). L'RNA totale è stato estratto da radici di *Allium porrum* e *Medicago truncatula* secondo la procedura descritta da CHROMCZYNSKI, SACCHI (1987) e trattato con DNase RNase-free (GIBCO-BRL). Le RT-PCR sono state effettuate con oligonucleotidi specifici (LANFRANCO *et al.*, 1999a) con il protocollo riportato in LANFRANCO *et al.* (1999b). L'ibridazione *in situ* è stata condotta su radici di *Zea mays* micorrizzate utilizzando una sonda marcata con digossigenina (Boehringer Mannheim). Il materiale è stato fissato, disidratato, incluso in paraffina e tagliato in sezioni di 7-8 micron di spessore che sono state messe su vetrini, sparaffinate e trattate secondo la metodica descritta in BALESTRINI *et al.* (1997). Per esprimere una porzione della proteina *Gvchs3* (aa 580-804) in batteri, è stato utilizzato il kit QIAexpressionist (QIAGEN).

### RISULTATI

In un lavoro precedente sono state identificate due porzioni geniche (*Gvchs1* e *Gvchs2*) che appartengono entrambe alle chitinsintasi di classe I e un gene

completo (*Gvchs3*), che presenta un'alta omologia con chitinsintasi di classe IV (LANFRANCO *et al.*, 1999a). Per lo studio dell'espressione di questi geni sono stati effettuati esperimenti di RT-PCR, utilizzando coppie di oligonucleotidi specifici per ciascun gene. Un prodotto di amplificazione delle dimensioni attese è stato ottenuto da radici micorrizzate per i geni *Gvchs1* e *Gvchs2*. L'amplificato era talmente debole che è stato necessario effettuare un Southern blot dei prodotti di RT-PCR per poter evidenziare il segnale. Lo stesso tipo di approccio per il gene *Gvchs3* non ha dato alcun segnale. Per quanto riguarda il gene *Gvchs3* abbiamo voluto verificare se l'espressione fosse localizzata in determinate aree della radice colonizzata tanto da non essere rilevata con l'RT-PCR. Pertanto sono stati effettuati esperimenti di ibridazione *in situ*. La sonda antisense non ha tuttavia evidenziato alcun segnale. Anche questo approccio sembra quindi indicare che il gene *Gvchs3* non sia espresso durante la fase di colonizzazione della radice.

Nell'ottica di produrre anticorpi specifici una porzione della proteina GvChs3 (circa 200 aa) è stata espressa in batteri utilizzando il sistema del vettore contenente una cassetta di sei istidine. La proteina ricombinante (circa 30 kDa) è stata purificata sulla colonna di affinità ed analizzata su SDS-Page. Una purificazione in grande scala ha quindi consentito di ottenere una quantità di proteina sufficiente per immunizzare un coniglio e ottenere un anticorpo policlonale. Esperimenti di immunomarcatura sono in corso di svolgimento.

#### DISCUSSIONE

Il fungo endomicorrizico *G. versiforme* possiede una famiglia di chitinsintasi: almeno fino a questo momento sono stati identificati tre geni, due appartenenti alla classe I e uno appartenente alla classe IV. Questo potrebbe suggerire che i diversi geni possano in effetti svolgere ruoli specifici, come è stato già dimostrato per alcuni geni *chs* in altri sistemi. Esperimenti di inattivazione genica, che sarebbero molto utili per definire il ruolo dei diversi geni, non sono al momento applicabili ai funghi AM. In alternativa, lo studio del pattern di espressione dei messaggeri e l'utilizzo di anticorpi potrebbero rappresentare un primo passo per la comprensione delle specifiche funzioni dei diversi geni *chs*. In questo lavoro è

stato dimostrato che almeno due geni *chs* sono espressi durante la fase di colonizzazione della radice, suggerendo l'esistenza di un controllo a livello trascrizionale. Il gene di classe IV non sembra essere espresso nelle radici micorrizzate. Questo confermerebbe alcuni dati in letteratura che descrivono alcuni geni di classe IV come enzimi ausiliari (DIN *et al.*, 1996). Si prospetta per il futuro l'analisi dei trascritti presenti durante altre fasi del ciclo vitale del fungo e l'utilizzo dell'anticorpo per la localizzazione della proteina.

#### LETTERATURA CITATA

- BALESTRINI R., JOSE'-ESTANIOL M., PUIGDOMENECH P., BONFANTE P., 1997 - *Hydroxyproline-rich glycoprotein mRNA accumulation in maize root cell colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus as revealed by in situ hybridization*. *Protoplasma*, 198: 36-42.
- BONFANTE P., PEROTTO S., 1995 - *Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants*. *New Phytol.*, 130: 3-21.
- BULAWA C.E., 1993 - *Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 47: 505-534.
- CHROMCZYNSKI P., SACCHI N., 1987 - *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal. Biochem.*, 162: 156-159.
- DIN A.B., SPECHT C., ROBBINS P.W., YARDEN O., 1996 - *chs-4, a class IV chitin synthase gene from Neurospora crassa*. *Mol. Gen. Genet.*, 250: 214-222.
- LANFRANCO L., GARNERO L., BONFANTE P., 1999a - *Chitin synthase genes in the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus versiforme: a full sequence encoding a class IV chitin synthase*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 170: 59-67.
- LANFRANCO L., VALLINO M., BONFANTE P., 1999b - *Expression of chitin synthase genes in the arbuscular mycorrhizal fungus Gigaspora margarita*. *New Phytol.*, 142: 347-354.
- SPECHT C.A., LIU Y., ROBBINS P.W., BULAWA C.E., IARTCHOUK N., WINTER K.R., RIGGLE P.J., DODGE C.L., CULP D.W., BORGAS P.T., 1996 - *The chsD and chsE genes of Aspergillus nidulans and their roles in chitin synthesis*. *Fung. Gen. Biol.*, 20: 153-167.

RIASSUNTO - Il fungo micorrizico arbuscolare *Glomus versiforme* possiede almeno tre diversi geni codificanti chitinsintasi (*Gvchs1*, *Gvchs2* and *Gvchs3*). Per definire il pattern di espressione di questi geni sono stati utilizzati oligonucleotidi specifici in esperimenti di RT-PCR. Con questo approccio è stato possibile evidenziare i trascritti dei geni *Gvchs1* e *Gvchs2* in radici micorrizzate. Non è stato invece ottenuto alcun segnale per il gene *Gvchs3*, sia con esperimenti di RT-PCR sia di ibridazione *in situ*. Questi risultati suggeriscono che il gene *Gvchs3* non sia espresso durante questa fase del ciclo vitale del fungo. Per avere un ulteriore strumento di analisi una porzione di *GvChs3* è stata espressa in batteri e utilizzata per produrre un anticorpo policlonale.

#### AUTORI

Luisa Lanfranco, Paola Bonfante, Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Torino, Viale Mattioli 25, 10125 Torino  
Marta Vallino, Raffaella Balestrini, Centro di Studio sulla Micologia del Terreno CNR, Viale Mattioli 25, 10125 Torino



## Analisi del contenuto di istoni H1 in nuclei di radici infettate o no con un fungo micorrizico arbuscolare

G. LINGUA, M. IPPOLITO, A. TROTTA e G. BERTA

**ABSTRACT** - *Analysis of the histone H1 content in the nuclei of roots colonized or not by an arbuscular mycorrhizal fungus* - The chromatin structure of nuclei extracted from leek roots, colonized or not by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*, was analyzed with immunolabelling of histone H1 and its quantification via flow cytometry. Chromatin was also examined with affinity chromatography, in order to evaluate the exposition of the -SH groups of the nucleosomes. The results indicated a clear reduction of fluorescence in the mycorrhizal nuclei, suggesting that the increase in chromatin decondensation, well documented in the literature, could be mediated by H1. Biochemical data confirmed the decrease of chromatin condensation and showed that, in the DNA of mycorrhizal plants, a larger number of nucleosomes in active conformation (-SH groups exposed) was present, in comparison with control plants.

*Key words:* chromatin, istones H1, micorrizas, nucleus

### INTRODUZIONE

Le micorrize arbuscolari (AM) costituiscono, come è noto, uno dei sistemi modello per lo studio delle interazioni simbiotiche.

Tra i numerosi effetti indotti dai funghi AM nelle cellule della pianta ospite (GIANINAZZI-PEARSON, 1996), sono state riscontrate anche modificazioni quantitative e strutturali del nucleo, quali ipertrofia, possibili variazioni del grado di ploidia, aumento del grado di decondensazione della cromatina, aumento della trascrizione, rallentamento della senescenza (BERTA, FUSCONI, 1998; BERTA *et al.*, 1999; LINGUA *et al.*, 1999). Nel presente studio abbiamo approfondito le osservazioni riguardanti lo stato di condensazione della cromatina, nei nuclei di uno dei sistemi sperimentali comunemente utilizzati nei nostri laboratori, e cioè *Allium porrum*, colonizzato o no con il fungo AM *Glomus mosseae* (BEG 12), mediante l'utilizzo di tecniche citofluorimetriche e biochimiche.

### MATERIALI E METODI

Dalle radici di piante di porro, micorrizzate e di controllo, coltivate con due diversi livelli di nutrizione fosfatica (3.2 e 96  $\mu$ M), sono stati estratti i nuclei. Le radici, private degli apici, sono state sminuzzate su ghiaccio, in un tampone di estrazione a pH controllato (MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Saccarosio 0.25 M, Tween 20 0.5 %, Tris/HCl 0.5 mM. Il pH del tampone è pari a 7.5). La sospensione è stata filtrata, e successivamente fissata con formaldeide al 2.5%. I nuclei sono stati centrifugati, risospesi in tampone PBS e sotto-

posti a incubazione per 1 h a 37° C con anticorpo murino anti-H1 Calbiochem, quindi incubati, in identiche condizioni, con anticorpo secondario anti-mouse biotinilato e trattati con streptavidina FITC. Infine sono stati controcolorati con 2.5  $\gamma$  di ioduro di propidio. Posizionando un "gate" elettronico sui nuclei 4C evidenziati con il PI (la popolazione più abbondante), i nuclei sono stati analizzati in citometria a flusso. Un campione "negativo", privo dell'anticorpo primario è stato preparato quale controllo. I dati, acquisiti in amplificazione logaritmica sono stati linearizzati e il valore di fluorescenza del "negativo" è stato sottratto dai valori ottenuti, in modo da eliminare il fondo di fluorescenza gialla dovuta al propidio. Un campione di nuclei è stato centrifugato e risospeso in tampone di digestione (10 mM Tris/HCl pH 7.4, 25 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NaButirrato, 0.1 mM FenilMetilSulfonilFluoruro (PMSF), 0.1 mM 1,2-epossi-3-(paranitrofenossi)propano (EPNP), 0.35 M Saccarosio), quindi digerito per 5 minuti con nucleasi micrococcica ed infine fatto passare su una colonna con Affigel, una resina contenente mercurio, capace di legare i gruppi sulfidrilici esposti. Per l'eluizione si è usato un mezzo con la seguente composizione: Tris/HCl 10 mM, 25 mM KCl, 25 mM NaCl, 5  $\mu$ M EDTA, 5 mM NaButirrato, 0.1 mM EPNP, 0.1 mM PMSF; pH 7.4. L'eluizione è continuata per 20 tubi dopodichè è stato aggiunto il tampone RunOff + DTT (180 ml RunOff + 20 ml DTT 100 mM), in modo che il

DTT si sostituisse nel legame che il nucleosoma impegnava con il Mercurio, l'eluizione è continuata per altri 30 tubi.

L'assorbanza dell'eluato è stata misurata ad una lunghezza d'onda pari a 260 nm.

I tubi relativi ai picchi ottenuti sono stati poi uniti e la quantità di DNA è stata misurata attraverso il metodo della DiFenilAmmina.

#### DISCUSSIONE

I campioni di nuclei estratti da piante micorrizate hanno sempre mostrato valori di fluorescenza inferiori, sia ad alta (P 3.2  $\mu$ M) sia a bassa (P 96  $\mu$ M) concentrazione di fosfati nella soluzione nutritizia (Tab. 1), cioè i nuclei avevano minor contenuto di istoni H1; la quantità di nucleosomi in conformazione attiva, cioè predisposta per la trascrizione, era chiaramente superiore nel DNA dei nuclei estratti da piante micorrizate (Fig. 1).

TABELLA 1

*Intensità di fluorescenza pesata dei campioni micorrizati e di controllo, presentata con limite di confidenza al 99% e errore standard. Anche il numero di nuclei analizzati è indicato. Intensity of fluorescence of the mycorrhizal and control samples; limits of confidence and standard errors are indicated, as well as the number of analyzed nuclei.*

Campione	Media $\pm$ lim. di conf.	Err. St.	Numero nuclei
Micorriz. (P 3.2)	12.11 $\pm$ 0.085	0.033	2402
Controllo (P 3.2)	15.02 $\pm$ 0.103	0.040	1603
Micorriz. (P 96)	18.323 $\pm$ 0.050	0.019	2260
Controllo (P 96)	23.186 $\pm$ 0.216	0.084	1701

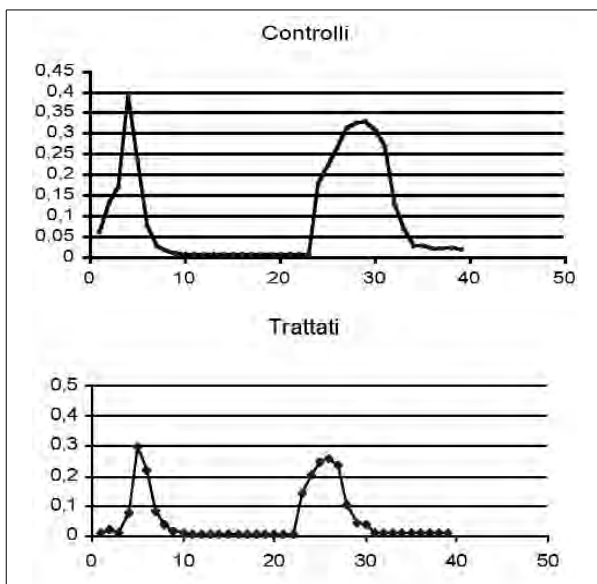


Fig. 1

Nel controllo, il I picco, quello dei nucleosomi che non si legano all'Afigel, costituisce il 73% del totale; nel micorrizato il 62%.

In the control roots, nucleosomes who do not bind to Afigel (peak I) represent 73% of the total; in mycorrhizal roots they are 62%.

Questi dati sono in accordo con le informazioni già presenti in letteratura, che indicano una riduzione della condensazione della cromatina, associata ad un aumento della attività trascrizionale (BERTA *et al.*, 1990; SGORBATI *et al.*, 1993; BERTA *et al.*, 1996) e suggeriscono che tali cambiamenti possano essere mediati dalla riduzione della quantità di istoni H1. Dati precedentemente pubblicati (DICORATO *et al.*, 1995) e relativi a embrioni di pisello in germinazione, ottenuti mediante elettroforesi, indicavano una drastica diminuzione del contenuto di istoni H1. Al contrario, nello stesso lavoro, un incremento di marcatura con anticorpo anti-H1 era stato misurato, mediante citometria a flusso, nei campioni con cromatina più decondensata ed era stato spiegato con un aumento dell'accessibilità dei siti di reazione, dovuta alla minore condensazione cromatinica. Dai nostri risultati emerge come le due situazioni non siano confrontabili e la germinazione degli embrioni sia un processo che mobilita e coinvolge sostanzialmente tutto il DNA, a differenza di quanto avviene nella porzione differenziata delle radici (che è quella colonizzata dal fungo micorrizico).

#### LETTERATURA CITATA

- BERTA G., FUSCONI A., 1998 - *Effects of arbuscular mycorrhizal and ericoid fungi on the structure and activity of host cell nuclei*. In: BRYANT J.A., CHIATANTE D. (Eds.), *Plant cell proliferation and its regulation in growth and development*: 213-217. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
- BERTA G., FUSCONI A., LINGUA G., TROTTA A., SGORBATI S., 1996 - *Influence of arbuscular mycorrhizal infection on nuclear structure and activity during root morphogenesis*. In: AZCÓN-AGUILAR C., BARÉA J.M. (Eds.), *Mycorrhizas in integrated systems from genes to plant development*. Proc. Fourth European Symposium on Mycorrhizas: 174-177.
- BERTA G., FUSCONI A., SAMPÒ S., LINGUA G., PERTICONE S., REPETTO O., 1999 - *Polyploidy in tomato roots as affected by arbuscular mycorrhizae colonization*. *Plant and soil*, 1: 37-44.
- BERTA G., FUSCONI A., TROTTA A., SCANNERINI S., 1990 - *Morphogenetic modifications induced by the mycorrhizal fungus Glomus strain E3 in the root system of Allium porrum L.* *New Phytol.*, 114: 207-215.
- DICORATO W., SAVINI C., BRACALE M., SGORBATI S., GRILLI M.G., 1995 - *Histone H1 during germination of pea seeds: an analysis by electrophoretic and immunofluorimetric methods*. *J. Exper. Bot.*, 46: 1895-1903.
- GIANINAZZI-PEARSON V., 1996 - *Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis*. *Plant Cell*, 8: 1871-1883.
- LINGUA G., SGORBATI S., CITTERIO A., FUSCONI A., TROTTA A., GNAVI E., BERTA G., 1999 - *Arbuscular mycorrhizal colonization delays nucleus senescence in leek root cortical cells*. *New Phytol.*, 141: 161-169.
- SGORBATI S., BERTA G., TROTTA A., SCHELLENBAUM L., CITTERIO S., DELA PIERRE M., GIANINAZZI-PEARSON V., SCANNERINI S., 1993 - *Chromatin structure variation in successful and unsuccessful arbuscular mycorrhizas of pea*. *Protoplasma*, 175: 1-8.

RIASSUNTO - La struttura della cromatina di nuclei estratti da piante di porro colonizzate e non dal fungo micorrizico arbuscolare *Glomus mosseae* è stata analizzata mediante immunomarcatura dell'istone H1 e quantificazione in citometria a flusso. Le condizioni della cromatina sono state esaminate mediante cromatografia di affinità, al fine di valutare l'esposizione dei gruppi -SH dei nucleo-

somi. I dati hanno indicato una netta riduzione della fluorescenza nei nuclei delle radici micorrizzate, suggerendo che l'aumento di decondensazione della cromatina, ben documentato in letteratura, sia mediato dagli istoni H1. I dati biochimici hanno confermato la maggior deconden-

sazione cromatinica e hanno dimostrato che nel DNA delle piante micorrizzate era presente una maggior quantità di nucleosomi in conformazione attiva (gruppi -SH esposti) rispetto a quanto avviene nelle piante di controllo.

#### AUTORI

*Guido Lingua, Graziella Berta, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Avanzate, Università del Piemonte Orientale, Corso Borsalino 54, 15100 Alessandria*  
*Massimo Ippolito, Antonio Trotta, Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Torino, Viale Mattioli 25, 10125 Torino*

## Organogenesi ed embriogenesi somatica in colture di callo di *Azadirachta excelsa*

B. MONACELLI, G. GIAGNACOVO, S.A. VAN DER ESCH e G. PASQUA

**ABSTRACT** - *Somatic organogenesis and embryogenesis in callus cultures of Azadirachta excelsa* - Callus production from leaf explants of *Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs was favoured by MURASHIGE and SKOOG medium supplemented with indole-3-butyric acid (IBA)(4mg/l) and 6-benzylaminopurine (BAP)(1mg/l). When the concentration of BAP was increased to 2 mg/l, shoot regeneration was induced. The histological analysis revealed the simultaneous occurrence of organogenesis and embryogenesis in the callus.

*Key words:* *Azadirachta excelsa*, *in vitro* culture, organogenesis, somatic embryogenesis

*Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs (Fam. Meliaceae) è una specie arborea distribuita nelle regioni sud-orientali dell'Asia ed oggi annoverata tra le specie a rischio di estinzione a causa dell'eccessivo uso del legno come materiale da costruzione. L'interesse per questa specie è motivato anche dalla sua capacità a produrre metaboliti secondari, in particolare composti triterpenoidi appartenenti alla famiglia dei limonoidi (ERMEL *et al.*, 1991). Fino ad oggi sono stati isolati circa 300 limonoidi ampiamente presenti nelle Meliacee. In particolare dalla specie *Azadirachta excelsa* sono stati isolati 2 composti: l'azadiractina A (già nota in *A. indica*) e la marranghina (KALINOWSKI *et al.*, 1993) entrambi ad azione insetticida. La marranghina presenta maggiore efficacia della azadiractina nel bloccare la metamorfosi di insetti fitofagi (SCHMUTTERER, DOLL, 1993). Inoltre questi composti sono completamente biodegradabili e quindi ambientalmente compatibili. A causa della difficile reperibilità della pianta, della difficoltà di coltivazione nei nostri climi, della precoce perdita di vitalità dei semi (a 30 giorni dal raccolto solo il 4% dei semi mantiene la capacità germinativa), e poiché fino ad oggi non risulta alcuno studio sulla propagazione di *A. excelsa* attraverso colture di tessuti, è sembrato interessante indurre rigenerazione *in vitro* di piante attraverso organogenesi ed embriogenesi somatica. Per indurre formazione di callo, espianti fogliari (5x5 mm), prelevati da una giovane pianta, sono stati coltivati in differenti mezzi di coltura: MURASHIGE, SKOOG (1962) (MS), GAMBORG (1968), NITSCH, NITSCH (1969) addizionati con IBA (4 mg/l) e BAP (1 mg/l) o con solo acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D)(2mg/l). La migliore risposta è stata ottenuta

utilizzando terreno MS con IBA e BAP. Aumentando il contenuto in BAP (2 mg/l) è stata stimolata la formazione di gemme vegetative che successivamente sono state poste ad allungare in terreno contenente BAP (0,5 mg/l) e gibberellina (GA<sub>3</sub>) (0,4mg/l). La radicazione delle piantine neoformate è stata ottenuta con aggiunta di IBA (1 mg/l).

Per accertare l'origine delle gemme rigenerate, il callo è stato sottoposto ad analisi istologica durante il decorso colturale. I risultati hanno rivelato la simultanea induzione di due programmi morfogenetici, organogenesi ed embriogenesi somatica. Riguardo l'organogenesi vegetativa, il differenziamento cominciava da poche cellule localizzate entro la massa del callo. Successivamente si sviluppavano domi ed apici vegetativi che raggiungevano la superficie del callo rimanendo ad esso collegati attraverso cordoni vascolari. Nell'embriogenesi il differenziamento avveniva in definite zone della superficie del callo situate in vicinanza di grandi cellule scure per la presenza di composti fenolici. Gli embrioni erano isolati dal callo per la presenza di cutina sulle pareti delle cellule esterne ed il loro sviluppo si bloccava allo stadio globulare o a cuore, per cui tutte le piante ottenute hanno avuto sicuramente origine da un processo di organogenesi vegetativa.

### LETTERATURA CITATA

- ERMEL K., KALINOWSKI H.O., SCHMUTTERER H., 1991 - *Isolierung und Charakterisierung von Marrangin, einer neuen Insektenmetamorphose-störenden Substanz aus Samernkörnern des Marrangobaumes Azadirachta excelsa (Jack)*. J. Appl. Entomol., 112: 512-519.  
GAMBORG O.L., MILLER R.A., OJIMA K., 1968 - *Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells*.

- Expt. Cell Res., 50: 151-158.
- KALINOWSKI H.O., ERMEL K., SCHMUTTERER H., 1993 - *Strukturaufklärung eines Azadirachtinderivats aus dem Marrangobaum (Azadirachta excelsa) durch NMR-Spektroskopie*. Liebigs Ann. Chem.: 1033-1035.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962 - *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant, 15: 473-496.
- NITSCH J. P., NITSCH C., 1969 - *Haploid plants from pollen grains*. Science, 163: 85-87.
- SCHMUTTERER H., DOLL M., 1993 - *The marrango or Philippine neem tree, Azadirachta excelsa (=A. integrifoliola): A new source of insecticides with growth-regulating properties*. Phytoparasitica, 21: 79-86.
- RIASSUNTO – Produzione di callo da espunti fogliari di *Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs è stata ottenuta su mezzo culturale MURASHIGE e SKOOG addizionato con acido indolbutirrico (IBA)(4mg/l) e benzilamminopurina (BAP) (1mg/l). Rigenerazione di gemme vegetative è stata ottenuta aumentando la concentrazione di BAP(2mg/l). Analisi istologiche hanno messo in evidenza la simultanea comparsa di organogenesi ed embriogenesi nel callo.

## AUTORI

Barbara Monacelli, Gabriella Pasqua, Dipartimento di Biologia Vegetale, Università "La Sapienza", Piazz.le Aldo Moro, 5 00185 Roma  
Gimina Giagnacovo, Andrea Van der Esch, INN-BIOAG-PRIM, ENEA, CR, Casaccia, Via Anguillarese 301, 00060 Santa Maria di Galera (Roma)

## Eziolamento e primi eventi di fotoconversione in plastidi di orzo trattati con diserbanti

I. MORO, F. DALLA VECCHIA, R. BARBATO, N. LA ROCCA e N. RASCIO

**ABSTRACT-** *Etiolation and first photoconversion events in plastids of barley treated with herbicides* - In darkness grown Angiosperms etioplasts photoconvert to chloroplasts after exposure to light. The inner membranes of etioplasts, organized in prolamellar bodies and prothylakoids, are devoid of chlorophyll but contain the precursor protochlorophyllide (Pchl<sub>ide</sub>). Some different forms of protochlorophyllide, distinguishable on the basis of their fluorescence emission spectra, have been identified. Among these, Pchl<sub>ide657</sub> is located in the prolamellar bodies where, together with NADPH and protochlorophyllide-oxidoreductase (POR), it forms a ternary complex. Etioplasts from barley plants, treated with amitrole and norflurazone, two herbicides inhibiting carotenogenesis, are studied for understanding the carotenoid role in the organization of the ternary complex POR-Pchl<sub>ide</sub>-NADPH and in the stability of this complex during the light exposition.

*Key words:* amitrole, carotenoids, etioplasts, *Hordeum vulgare* L., norflurazone, POR, protochlorophyllide

Nei tessuti fogliari di Angiosperme fatte crescere al buio si differenziano ezioplasti che, una volta esposti alla luce, fotoconvertono a cloroplasti (RASCIO *et al.*, 1986).

Gli ezioplasti, oltre ad avere una organizzazione peculiare del sistema membranale interno, non contengono clorofilla, ma il precursore di questa, protochlorofillide. Nell'organello sono presenti più forme di protochlorofillide distinguibili dagli spettri di emissione di fluorescenza (77 K) (RYBERG, SUNDQVIST, 1982; BODDI *et al.*, 1993).

Una di queste, che emette a 657 nm (Pchl<sub>ide657</sub>), è la forma fototrasformabile, che si ritiene essere inserita nelle membrane del corpo prolamellare in un complesso ternario con NADPH e con l'enzima protochlorofillide ossidoreduttasi (POR) (GRIFFITHS, 1991). L'illuminazione attiva la POR che catalizza la riduzione della Pchl<sub>ide</sub> a clorofillide (che emette fluorescenza a 680 nm) (KLOCKARE, 1980).

Un'altra forma di Pchl<sub>ide</sub>, che emette a 632 nm (Pchl<sub>ide632</sub>), invece, non è fototrasformabile e si ritiene che si trovi in forma libera, prevalentemente nelle membrane protilacoidali (MINKOV *et al.*, 1988).

Nell'assetto delle membrane interne degli ezioplasti, così come nella formazione e nella stabilità del complesso ternario POR-Pchl<sub>ide</sub>-NADPH, è probabile che giochino un ruolo importante anche i carotenoidi. A questo proposito sono stati utilizzati due erbicidi inibenti la carotenogenesi (amitrolo e norflurazone), per studiare i possibili effetti di una sintesi

alterata dei carotenoidi sull'organizzazione del corpo prolamellare degli ezioplasti e sul destino delle membrane che lo formano nel corso della fotoconversione. Il trattamento di piantule di orzo (*Hordeum vulgare* L.) con amitrolo (AM), un diserbante che inibisce la carotenogenesi a livello della ciclizzazione del licopene (BARRY, PALLET, 1990; AGNOLUCCI *et al.*, 1996), causa forti anomalie nell'organizzazione ultrastrutturale degli ezioplasti e porta ad una drastica caduta del rapporto Pchl<sub>ide657</sub>/Pchl<sub>ide632</sub>, con una prevalenza della forma libera e non fototrasformabile del pigmento, rivelata anche dallo spettro di fluorescenza dopo esposizione alla luce. Ciò suggerisce che l'accumulo di licopene, un precursore già inserito nelle membrane, ma con una struttura molecolare lineare molto diversa da quella del β-carotene e delle xantofille (CUNNINGHAM, GANTT, 1988) possa ostacolare la corretta organizzazione di queste interferendo anche con la possibilità della Pchl<sub>ide</sub> di associarsi alla POR ed al NADPH per formare il complesso ternario.

Il trattamento con norflurazone (NF), che inibisce la prima tappa di desaturazione del fitoene (BARRY e PALLET, 1990), impedendo la sintesi di qualsiasi tipo di precursore successivo, non ha effetti apparenti né sulla organizzazione delle membrane dell'ezioplasto né sulla formazione del complesso ternario, rimanendo la Pchl<sub>ide657</sub> la forma prevalente. L'illuminazione, però, porta alla fotoconversione di una quantità di Pchl<sub>ide</sub> più ridotta di quella del controllo. Ciò suggerisce che la mancanza totale di carotenoidi non

ostacoli la corretta organizzazione del sistema membranale interno e la formazione del complesso ternario, ma renda tale complesso più instabile o renda più facilmente fotossidabile la clorofillide prodotta. L'esposizione continua degli ezioplasti alla luce porta, nel controllo, ad una scomparsa nelle prime 24 ore di una forma fotolabile di POR più caratteristica dei tessuti eziolati (PORA) mentre una forma fotostabile, responsabile della sintesi della clorofilla nei tessuti verdi (PORB), persiste.

Negli ezioplasti trattati con AM, che sono in grado di sintetizzare una piccola quantità di carotenoidi fotoprotettivi (AGNOLUCCI *et al.*, 1996), dopo 24 ore è ancora presente la PORB che invece non è più rilevabile negli organelli trattati con NF.

La persistenza o meno dell'enzima PORB, naturalmente, condiziona la possibilità di sintesi delle clorofille alla luce.

Negli organelli trattati con AM questi pigmenti sono rilevabili, anche se in piccole quantità, nonostante i danni fotoossidativi dovuti alla carenza di carotenoidi. Negli organelli trattati con NF, invece, dopo 24 ore di illuminazione non sono più rilevabili forme di clorofilla.

Da tutto ciò si può ricavare che una alterata sintesi dei carotenoidi può avere effetto sulla organizzazione e composizione del sistema membranale degli ezioplasti, oltre ad essere responsabile, durante la successiva esposizione alla luce, dei danni agli organelli causati dalla mancanza di protezione contro la fotossidazione.

#### LETTERATURA CITATA

AGNOLUCCI L., DALLA VECCHIA F., BARBATO R., TASSANI G., CASADORO G., RASCIO N., 1996 – *Amitrole effects on chloroplasts from barley plants at different temperatures*. J. Plant Physiol., 147: 493-502.

BARRY P., PALLET E., 1990 – *Herbicidal inhibition of carotenogenesis detected by HPLC*. Z. Naturforsch., 45: 492-497.

BODDI B., LINDSTEN A., RYBERG M., SUNDQVIST C., 1993 – *Analyses of the 77K fluorescence emission and excitation spectra of isolated etioplast inner membranes*. J. Photochem. Photobiol., 21: 125-133.

CUNNINGHAM F.X., GANTT E., 1988 – *Gene and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants*. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 49: 557-583.

GRIFFITHS W.T., 1991 – *Protochlorophyllide photoreduction*. In: Scheer H. (ed.), *Chlorophylls*: 433-449. Rcr. Press Inc., Boca Raton.

KLOCKARE B., 1980 – *Far red induced changes of the protochlorophyllide components in wheat leaves*. Physiol. Plant., 48: 104-110.

MINKOV I. N., RYBERG M., SUNDQVIST C., 1988 – *Properties of reformed prolamellar bodies from illuminated and redarkened etiolated wheat plants*. Physiol. Plant., 72: 725-732.

RASCIO N., MARIANI P., DALLA VECCHIA F., CHITANO P., 1986 – *An ultrastructural study of maize leaf etioplasts throughout their entire life-cycle*. Protoplasma, 130: 98-107.

RYBERG M., SUNDQVIST C., 1982 – *Spectral forms of protochlorophyllide in prolamellar bodies and protylakoids fractionated from wheat etioplasts*. Physiol. Plant., 56: 133-138.

RIASSUNTO - In Angiosperme cresciute al buio gli ezioplasti fotoconvertono in cloroplasti dopo l'esposizione alla luce. Nel sistema di membrane interno degli ezioplasti, organizzato in corpi prolamellari e protilacoidi, sono assenti le clorofille. E' presente, invece, il precursore protochlorofillide (Pchlde), distinguibile in forme diverse sulla base dei differenti spettri di emissione di fluorescenza. Fra queste, la Pchlde<sub>657</sub>, è localizzata nel corpo prolamellare formando, insieme al NADPH e alla protochlorofillide ossidoriduttasi (POR), un complesso ternario. Sono stati studiati ezioplasti di piante di orzo trattati con amitrolo e norflurazone, due erbicidi inibenti la carotenogenesi, per chiarire il ruolo dei carotenoidi nell'organizzazione del complesso ternario POR-protochlorofillide-NADPH e nel mantenimento della stabilità di questo complesso durante l'esposizione alla luce.

#### AUTORI

Isabella Moro, Francesca Dalla Vecchia, Nicoletta La Rocca, Nicoletta Rascio, Dipartimento di Biologia, Università di Padova, Via U. Bassi 58b, 35131 Padova  
Roberto Barbato, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Avanzate, Università del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Corso Borsalino 54, 15131 Alessandria

## La reticoloplasmina calreticulina è rilasciata nel mezzo da cellule di carota in coltura

L. NAVAZIO, M. LIBIK, C. NARDI, B. BALDAN, e P. MARIANI

**ABSTRACT-** *The reticuloplasmin calreticulin is released into the carrot cell culture medium* - Calreticulin, a ER resident calcium-binding protein, was found to be released into the culture medium of carrot, tobacco cells and germinating tobacco pollen. It is proposed that the culture conditions probably impose to the cells a non-physiological stressing state, mainly due to high hormonal concentration.

*Key words:* calreticulin, carrot, endoplasmic reticulum, reticuloplasmin

La calreticulina è una proteina ubiquitaria nelle cellule eucariotiche che svolge numerose funzioni, tra cui la principale sembra essere il coinvolgimento nell'omeostasi del calcio come proteina tampone all'interno del reticolo endoplasmatico (MICHALAK *et al.*, 1998). La sua residenza in questo compartimento come proteina solubile luminale è comprovata dalla presenza della sequenza segnale di ritenzione/recupero nel reticolo endoplasmatico HDEL all'estremità C-terminale della molecola e da prove di immunocalizzazione con anticorpi specifici. Ci sono alcuni esempi di localizzazioni extra-reticolo di questa proteina sia in cellule animali che vegetali.

Abbiamo constatato che cellule di carota in sospensione rilasciano parte del loro contenuto di calreticulina nel mezzo di coltura. Questo rilascio è stato osservato sia nella linea cellulare wild-type (A+t3) che in una linea mutante temperatura-sensibile (ts11) che presenta alterazioni strutturali dei compartimenti della via di secrezione (BALDAN *et al.*, 1997). Trattamenti con Brefeldina A (7.5 mg/ml per 48 ore) non alterano il pattern di secrezione della proteina, suggerendo che la via seguita dalla calreticulina per il suo rilascio non coinvolga l'apparato di Golgi.

Il rilascio di calreticulina non è limitato alle colture cellulari di carota, ma è stato evidenziato anche in cellule in coltura e tubetti pollinici di tabacco cre-

sciuti *in vitro*. Al contrario, sistemi più complessi e organizzati quali plantule di carota in coltura idroponica ed embrioni somatici di carota non rilasciano calreticulina nel mezzo.

Condizioni di stress quali alta densità cellulare possono determinare in colture indotte all'embriogenesi somatica non solo il blocco del processo embriogenetico ma anche il rilascio della proteina. Con ogni probabilità la secrezione di calreticulina non è parte della normale fisiologia della cellula vegetale, ma sembra essere conseguenza di uno stato di stress indotto nelle cellule dalle condizioni di coltura.

### LETTERATURA CITATA

MICHALAK M., MARIANI P., OPAS M., 1998 - *Calreticulin, a multifunctional Ca<sup>2+</sup> binding chaperone of the endoplasmic reticulum*. *Biochem. Cell Biol.*, 76: 779-785.  
BALDAN B., GUZZO F., FILIPPINI F., GASPARIAN M., LOSCHIAVO F., VITALE A., DeVRIES S.C., MARIANI P., TERZI M., 1997 - *The secretory nature of the lesion of carrot cell variant ts11, rescuable by endochitinase*. *Planta*, 203: 381-389.

**RIASSUNTO** - La calreticulina, una proteina legante calcio residente nel reticolo endoplasmatico, viene rilasciata nel mezzo di coltura di cellule di carota, di tabacco e di tubetti pollinici germinanti. Viene proposto che le condizioni di coltura probabilmente impongano alle cellule uno stato non fisiologico di stress, principalmente dovuto ad una concentrazione ormonale elevata.

### AUTORI

Lorella Navazio, Maria Chiara Nardi., Barbara Baldan, Paola Mariani, Dipartimento di Biologia, Università di Padova, Via U. Bassi 586, 35131 Padova  
Marta Libik, Institute of Botany, University of Krakow, Poland