

UNIVERSITA' DELLA CALABRIA



**Dottorato di Ricerca in Biologia Vegetale
XVIII Ciclo (2003-2006)**

**Sistemi vegetali e *patterns* di risposta a
fattori abiotici**

Coordinatore

Prof.ssa Anna Maria Innocenti

Tutor

Prof.ssa Radiana Cozza

Candidato

Dr. Tiziano Pangaro

Dipartimento di Ecologia
Università della Calabria

Settore disciplinare scientifico: BIO/01



PhD thesis, Doctorate Research Program in Plant Biology
Ecology Department – University of Calabria
XVIII Cycle (2003-2006) – Coordinator Prof. A.M. Innocenti

Ai miei genitori

Indice

1. INTRODUZIONE	3
1.1 Premessa	3
1.2 Finalità di ricerca	5
1.3 Il sistema di studio <i>Posidonia oceanica</i>	7
1.4 Il sistema di studio <i>Helianthus annuus</i>	13
2. SISTEMI VEGETALI E METALLI PESANTI	15
2.1 Principali sistemi di risposta al Cadmio ed ai metalli pesanti nelle piante superiori	16
2.1.1 Le Fitochelatine	17
2.1.2 Le Metallotioneine	18
2.2 Risultati	21
2.2.1 Pomt2f e Pomt2b, sequenze codificanti per putative MTs di tipo 2.	21
2.2.2 Pomt2b è coinvolta nella risposta da stress da Cadmio.	29
3. SISTEMI VEGETALI E BILANCIO IDRICO	32
3.1 Le Acquaporine: struttura e sistematica	33
3.2 Risultati	36
3.3 Deidrine: struttura e funzione	46
3.4 Risultati	47
3.4.1 La deidrina <i>HaDHN1</i>	47
4. SISTEMI VEGETALI E RADIAZIONE LUMINOSA	60
4.1 Luce e <i>Posidonia oceanica</i>	61
4.2 Risultati	64
4.2.1 Immunolocalizzazione della Rubisco in <i>Posidonia oceanica</i>	64
4.2.2 <i>Features</i> di ultrastruttura in <i>P. oceanica</i>	67
5. MATERIALI E METODI	78
5.1 <i>In situ</i> hybridization (ISH)	78
5.2 Analisi TEM ed Immunogold	79
BIBLIOGRAFIA	81

1. INTRODUZIONE

1.1 Premessa

Le piante, organismi notoriamente sessili, risultano particolarmente esposte alle variazioni dei diversi parametri che regolano il normale svolgersi del loro ciclo biologico. Proprio per questi motivi i sistemi vegetali hanno sviluppato nel corso dell'evoluzione una serie di complessi ed articolati sistemi di monitoraggio dei parametri bio-ecologici caratterizzanti il loro ambiente di sviluppo.

In effetti la percezione del proprio ambiente attraverso l'elaborazione di un particolare segnale è alla base delle interazioni pianta-ambiente (Hazen et al., 2003) ed a questa segue una trasduzione del segnale stesso che guida in prima istanza i cambiamenti di espressione genica (Kreps et al. 2002; Seki et al. 2002).

Quanto affermato ci consente di capire facilmente come l'omeostasi, intesa come equilibrio ottimale dei diversi parametri biologici, è una condizione raramente riscontrabile proprio a causa della continua variabilità di fattori ambientali abiotici e biotici e delle conseguenti risposte metaboliche che le piante sono costrette ad attivare (Dobrota, 2006).

In particolare, lo studio degli effetti di stimoli abiotici esogeni quali temperatura, disponibilità idrica, radiazione luminosa, concentrazione e tossicità ionica (intesa come salinità e metalli pesanti) presenta notevoli difficoltà in quanto le reazioni messe in atto dai sistemi vegetali comprendono, oltre ai complessi cambiamenti nella regolazione dell'espressione genica, anche l'attivazione di opportuni *pathways* di risposta (Mittler et al., 2004; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2005). Diventa quindi cruciale capire e descrivere i meccanismi che conferiscono tolleranza ai sistemi vegetali nei confronti delle diverse componenti ambientali che, ad ogni modo, sono alla base della diversità biologica, della distribuzione delle specie (Bruno et al., 2003) ma anche degli aspetti socio-ecologici derivanti in particolare da specie con un

alta valenza dal punto di vista economico e/o della conservazione degli habitat (Bonhert et al., 2006).

Inoltre le forme di adattamento ad uno stesso fattore abiotico possono essere, oltre che specie-specifiche, molto diverse tra loro ed i meccanismi di difesa e tolleranza non si limitano solo a cambiamenti morfo-fisiologici della singola pianta ma arrivano ad investire anche i rapporti interspecifici e di comunità riuscendo ad innescare meccanismi di competizione o di reciproco vantaggio tra specie vegetali diverse (Callaway et al. 2002; Pennings et al. 2003).

E' dunque palese come un particolare stimolo abiotico possa dare inizio ad una cascata di eventi direttamente riconducibili ad esso ed alle prime modificazioni che si instaurano nella pianta.

Da ciò deriva la crescente utilità dello studio di geni attivati da fattori esogeni in modo da determinare l'entità, la localizzazione ed i tempi della risposta genica nonché il ruolo anche di singoli geni nel conferire un'eventuale tolleranza (Vinocur and Altman, 2005).

Risultati così ottenuti, quali *patterns* di espressione genica ma anche di localizzazione proteica, possono considerarsi come parte integrante e fondamentale di studi di genomica funzionale che uniscono alle osservazioni più propriamente fisiologiche e fenotipiche anche informazioni inerenti i geni e le proteine attivate dal medesimo evento (Sharp et al., 2004) .

In tale contesto, abbiamo incentrato l'attività di studio e di ricerca su tre fattori abiotici di fondamentale importanza per gli organismi vegetali, quali la radiazione luminosa, l'equilibrio idrico e l'interazione con i metalli pesanti. Ci riferiamo dunque a fattori fondamentali sia quando essi risultino in equilibrio con gli altri parametri ambientali, sia quando, per cause naturali o antropiche, questi arrivino ad essere veri e propri cause di stress.

Nella fattispecie ci siamo interessati ai meccanismi di risposta di due diversi sistemi vegetali (la fanerogama marina *Posidonia oceanica* (L.) Delile e la monocotiledone *Helianthus annuus*) relativi all'interazione con i fattori sopra citati

indagando a livello immediatamente successivo alla percezione del segnale ed incentrando quindi i nostri studi sui meccanismi di espressione genica e, limitatamente allo stimolo luminoso, di risposta proteica.

1.2 Finalità di ricerca

In relazione a quanto introdotto, durante il lavoro di ricerca l'attenzione è stata rivolta a due sistemi vegetali: la fanerogama marina *Posidonia oceanica* e, oggetto di uno studio meno esteso, la Monocotiledone terrestre *Helianthus annuus*, indagando sulla risposta molecolare che i due sistemi di studio prescelti attuano verso alcuni fattori abiotici.

In particolare, per quanto riguarda *Posidonia oceanica*, abbiamo affrontato lo studio sui meccanismi di tolleranza che questa fanerogama attua nei confronti dei metalli pesanti, più specificatamente nei confronti del Cadmio. L'approccio utilizzato è stato quello di isolamento di geni putativi (in collaborazione con il Prof. Cavallini dell'Università di Pisa) e localizzazione *in situ* dei relativi messaggeri attraverso la tecnica di ibridazione RNA-RNA. Tale metodica rappresenta un validissimo strumento per la localizzazione dei trascritti nei vari tessuti ed organi della pianta. In tal modo è possibile avere non solo indicazione sulla presenza o meno del messaggero (peraltro suffragata da analisi di tipo Northern), ma soprattutto una risposta di tipo qualitativo che fornisce informazioni puntuali e precise su come il messaggero si esprima selettivamente nei diversi organi e/o tessuti e nei diversi domini cellulari nonché in differenti momenti di sviluppo.

Da sottolineare che gli studi fisiologici relativi alla risposta molecolare che le fanerogame marine, ed in particolare *P. oceanica*, attuano in presenza di metalli pesanti risultano ad oggi alquanto carenti. In aggiunta, occorre precisare che il continuo sviluppo delle attività industriali e di produzione, in assenza di opportune politiche di protezione ambientale, ha portato negli ultimi decenni ad un aumento esponenziale delle concentrazioni di metalli pesanti quali Cadmio, Zinco, Rame, Nichel, Cromo e Mercurio nelle diverse componenti della biosfera, compreso il

comparto marino (Duarte, 2002). Pertanto l'indagine della risposta genica di una fanerogama marina nei confronti dei metalli pesanti appare estremamente interessante sia in relazione al fatto che l'inquinamento da metalli pesanti nelle zone costiere è un fenomeno sempre più diffuso sia perché *P. oceanica* appare "tollerante" per il Hg, potenzialmente bioaccumulabile nei propri tessuti e sembra regolare così la biodisponibilità ai livelli trofici successivi (Pergent and Pergent-Martini, 1999; Giordani et al., 2000; Maserti et al., 2005)

Un altro aspetto, non di secondaria importanza, è relativo a quello di acquisire nuove conoscenze circa piante capaci di tollerare la presenza di inquinanti quali i metalli pesanti o che riescono addirittura a diminuirne la concentrazione in termini assoluti nell'ecosistema di appartenenza (Lasat, 2002). Tali conoscenze possono avere una diretta applicazione in campo biotecnologico: esiste infatti tutta una gamma di tecnologie emergenti (tecnologie verdi) che vanno sotto il nome di *Phytoremediation* e che utilizzano sistemi vegetali per la bonifica di siti inquinati sfruttando la capacità di alcuni di essi di concentrare inquinanti presenti nei diversi comparti (suolo, acqua, aria) e/o renderli meno biodisponibili (Ernst, 2005).

In tale contesto abbiamo focalizzato l'attenzione su un gruppo di molecole quali le Metallotioneine (di seguito meglio trattate) che svolgono un ruolo importante sia nei meccanismi di tolleranza e detossificazione da metalli pesanti che nella risposta più generale a stress. Abbiamo valutato il *pattern* di espressione di due geni codificanti per putative metallotioneine in *P. oceanica*. Di uno dei due geni è stata anche valutata la variazione nel *pattern* di espressione in piante sottoposte a stress da Cadmio in acquario al fine di approfondire le conoscenze circa la tolleranza ai metalli pesanti di *Posidonia oceanica* stessa.

La natura marina di questa fanerogama ci ha indotto a considerare un altro aspetto, quello relativo alla risposte di questa pianta a variazioni del bilancio idrico in merito a modificazioni saline del proprio ambiente. Più nello specifico abbiamo studiato i *patterns* di espressione di due geni codificanti per acquaporine, proteine

transmembrana implicate nel trasporto dell'acqua e di piccoli soluti neutri (Kaldhenoff and Fischer, 2006a).

Sempre nell'intento di comprendere la fisiologia di questa pianta adattata a vivere in ambiente acquatico, abbiamo considerato la relazione esistente tra intensità luminosa e distribuzione dell'enzima Rubisco in rapporto a variazioni di intensità luminosa in seguito a stress turbidimetrico. Allo scopo l'approccio utilizzato è stato quello di immunolocalizzazione della proteina su preparati messi a punto per l'analisi TEM.

In ultimo, sempre in *P. oceanica*, abbiamo verificato se variazioni qualitative della radiazione luminosa corrispondenti a differenze batimetriche, influenzassero la struttura cloroplastica. A tal fine è stato messo a punto un protocollo di fissazione ed inclusione per analisi in microscopia elettronica a trasmissione su campioni di *P. oceanica* prelevati a diverse profondità (-5m; -22m).

I fattori luce/bilancio idrico sono stati considerati anche in relazione al secondo sistema di studio considerato, *Helianthus annuus*, questa volta indagando se radiazioni luminose di diversa lunghezza d'onda avessero effetti sul *pattern* di espressione di un gene codificante per una deidrina. Le deidrine sono proteine di estremo interesse visto il loro coinvolgimento in diversi tipi di tolleranza e/o stress quali quello idrico, salino, termico (Zhu et al., 2000) nonché da metalli (Alsheikh et al., 2005).

1.3 Il sistema di studio *Posidonia oceanica*

Relativamente alle interazioni tra i fattori abiotici quali metalli, salinità e intensità luminosa e la pianta *Posidonia oceanica*, i dati ottenuti rappresentano uno dei primi contributi ad un approccio più generale teso a studiare la fisiologia di *Posidonia oceanica*. Tale fanerogama, ritornata secondariamente all'ambiente acquatico marino, risulta di estremo interesse sia trofico, in quanto parte fondamentale della catena

alimentare, che ecologico, data anche la numerosità e diversità di specie vegetali ed animali ad essa associata (Gambi, 2002).

Altrettanto importante è il ruolo che le praterie formate da *Posidonia oceanica* hanno nella stabilizzazione dei sedimenti attraverso gli organi ipogei (rizomi) e nella salvaguardia delle coste dai fenomeni di erosione tramite la riduzione dei movimenti delle acque (moto ondoso e correnti) da parte delle foglie (Koch, 2001).

Posidonia oceanica appartiene a quel gruppo di piante che comunemente vengono chiamate *seagrasses* per via della loro morfologia e della loro capacità di formare letteralmente delle “praterie marine”. Queste idrofite sono ampiamente distribuite in tutti gli oceani prediligendo acque relativamente poco profonde quali quelle prossime alla costa. E’ da citare l’eccezione costituita dalle coste antartiche dove, ad oggi, non è stata individuata la presenza di alcuna fanerogama. Il limite di profondità per *Posidonia* è di circa -40 metri e ciò è dovuto sia ad esigenze di temperatura sia ad esigenze luminose visto che la penetrazione della luce diminuisce sensibilmente con la profondità (Duarte, 1991).

Le fanerogame marine contano circa 50 specie e dal punto di vista tassonomico appartengono a cinque famiglie: *Posidonaceae*, *Zosteraceae*, *Cymodoceae*, *Hydrocaritaceae*, *Ruppiceae*. Tuttavia su tassonomia e numero di specie non vi sono pareri unanimi a causa di diversi criteri sistematici adottati (Hemminga and Duarte, 2000). Esse mostrano una morfologia simile a quella delle piante terrestri presentando radici, rizoma (che funge da fusto modificato) e foglie.

Studi filogenetici possono efficacemente spiegare le strettissime affinità fisiomorfologiche delle fanerogame marine con le piante terrestri. Infatti l’ordine *Helobiae*, di cui *Posidonia oceanica* fa parte, è costituito da piante vascolari che, affrancatesi evolutivamente dal mare, sono in seguito ritornate a colonizzare le acque.

Molte teorie indicano che dalle Angiosperme terrestri si siano evolute specie capaci di sopravvivere ad immersioni episodiche e/o cicliche nelle acque salate come quelle causate da fenomeni di marea. In effetti la ricolonizzazione marina sarebbe avvenuta durante il Cretaceo, circa 100 milioni di anni fa come molti ritrovamenti

fossili lasciano ritenere, da parte di piante che svilupparono capacità osmoregatorie capaci di permettere la resistenza a periodi di immersione (Larkum and den Hartog, 1989). Successivamente l'evolversi dell'impollinazione idrofila ha permesso che si sviluppassero piante capaci di compiere il loro intero ciclo biologico in habitat marino (Cox et al., 1992).

La morfologia di *Posidonia oceanica* è del tutto tipica. Nella parte superiore del rizoma è situato l'apice vegetativo da cui si originano le foglie organizzate in tipici fasci (Fig. 1). Nell'ambito di ogni fascio, le foglie si dispongono a ventaglio.

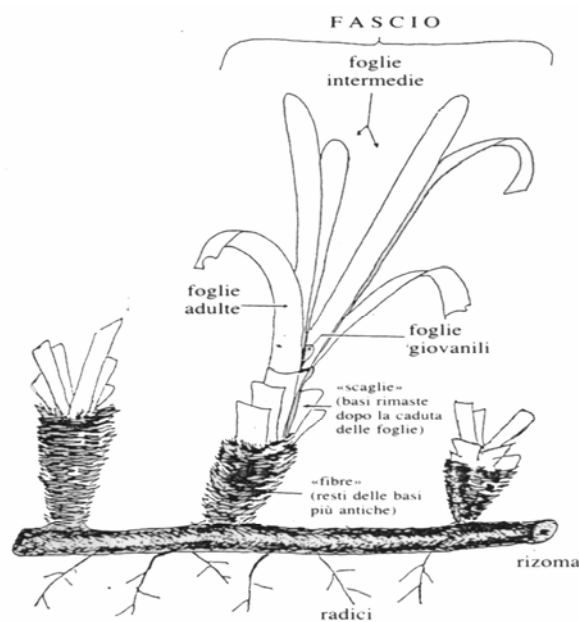


Fig. 1. Organizzazione in fasci.

Le foglie sono tipicamente prive di stomi e questo ha fatto in modo che evolutivamente l'epidermide si ricoprisse di una cuticola cerosa. Tuttavia la presenza di cuticola sembrerebbe essere di ostacolo agli scambi gassosi, vista soprattutto la scarsa diffusione di questi attraverso uno strato ceroso. *Posidonia* ha ovviato a questo apparente inconveniente attraverso dei pori che possono agire come “canali” di scambio ionico con importanti funzioni anche nel flusso dei nutrienti (Kuo, 1978). Inoltre la parete cellulare delle cellule epidermiche della foglia rivela la presenza di pectine, cellulosa, proteine ed altri polisaccaridi altamente idratati in modo da facilitare processi fisiologici e biochimici nonché una eventuale rapida reidratazione

dopo periodi di emersione accidentali o dovuti a fenomeni di marea (Tomlinson, 1980).

Dal punto di vista macroscopico la foglia presenta una suddivisione tra una base ed un lembo attraverso una linea curva chiamata *ligula*, in corrispondenza della quale le foglie più vecchie tendono a staccarsi

E' importante sottolineare l'accrescimento basale delle foglie che, in piante colonizzate da epifiti, contribuisce a ridurre l'ombreggiamento dei tessuti in accrescimento e differenziazione da parte di questi stessi organismi.

L'attività fotosintetica sembra confinata quasi esclusivamente negli strati epidermici della foglia mentre, al contrario di quanto avviene nelle piante emerse, risulta scarsa nel mesofillo. Le cellule epidermiche presentano, infatti, numerosi e ben sviluppati cloroplasti oltre a molti organelli, indice questo di un'intensa attività metabolica proprio nell'epidermide (Fig. 2).

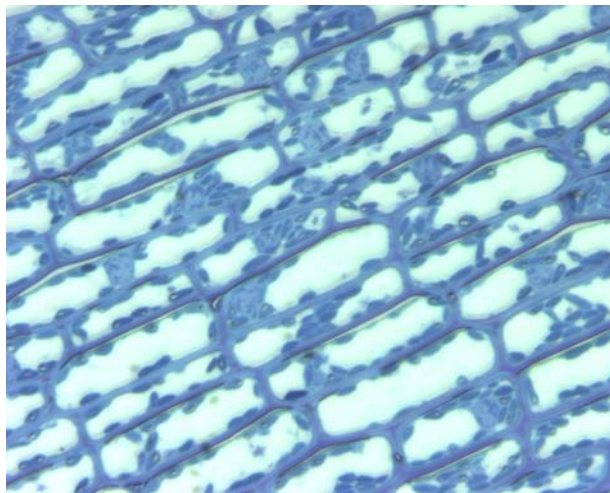


Fig. 2. Epidermide in sezione paradermale.

Il mesofillo presenta una struttura alquanto omogenea composta da cellule parenchimatiche dotate di una sottile parete e di grandi vacuoli. Come già detto, i cloroplasti nel mesofillo sono scarsi e confinati nelle zone periferiche citoplasmatiche delle cellule. Inoltre le cellule del mesofillo sono disposte a formare degli spazi aeriferi detti *lacunae* che nella maggior parte delle *seagrasses* sono disposte lungo un singolo strato cellulare mentre in *Posidonia* risultano più piccole in dimensioni e presenti nei diversi strati cellulari del mesofillo (Fig. 3).

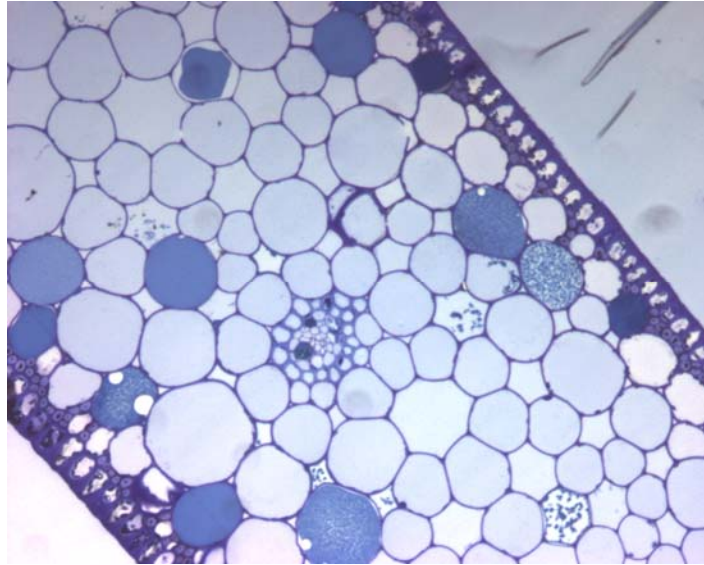


Fig. 3. Organizzazione del mesofillo in sezione trasversale.

In tutte le specie le lacune formano condotti aeriferi continui dalle foglie alle radici interrotti ad intervalli regolari da setti di piccole cellule parenchimatiche (Roberts and Moriarty, 1987). Le lacune svolgono un ruolo centrale nel processo fotosintetico poichè proprio attraverso loro la pianta immagazzina e trasferisce i gas in tutta la pianta consentendo quindi gli scambi gassosi di fotosintesi e respirazione (Larkum et al., 1989). Inoltre tali “canali aeriferi”, rilasciando ossigeno anche nelle radici, consentirebbero la sopravvivenza anche in ambienti marini con substrati relativamente anossici (Zimmerman et al., 1997).

Le *seagrasses* sono considerate dal punto di vista fotosintetico come piante C3 ma spesso ritroviamo anatomie della foglia che sembrerebbero appartenere a specie intermedie tra C3 e C4 suggerendo anche la presenza di particolari meccanismi di concentrazione del carbonio per favorire l’azione della Rubisco (Kuo, 1983; Touchette et al., 2000). Infatti solo poche piante terrestri adattate all’ombra presentano una disposizione cloroplastica prevalentemente epidermica confrontabile con quanto riscontrato in *Posidonia*.

L’allungamento dei rizomi avviene sia in senso orizzontale che in senso verticale (Hemminga and Duarte, 2000) e più strati di rizomi, assieme al sedimento in esso compattato, formano una particolare struttura detta *matte* che può raggiungere diversi metri di spessore (Green and Short, 2003).

I rizomi, dunque, intrappolano grandi quantità di sedimenti contribuendo così ad aumentare la qualità delle acque e nel contempo a limitarne la torbidità (Terrados and Duarte, 2000). Inoltre le fronde formate da foglie lunghe anche un metro, agendo come massa frenante del moto ondoso, smorzano l'impatto idrodinamico sul litorale.

L'elevata produzione di ossigeno (20 l/m²/giorno) e l'ampia disponibilità di biomassa vegetale (30t/ha) fanno sì che la prateria costituisca un ambiente di grande interesse trofico e riproduttivo per molte specie (Della Croce et al., 1997; Gambi, 2002).

E' facile capire dunque l'importanza che *Posidonia oceanica* riveste nell'ecosistema marino e di come questa abbia forti interazioni sia con le componenti biotiche che abiotiche. Tuttavia, le praterie di *Posidonia oceanica* sono in continua regressione in tutto il bacino mediterraneo (Duarte, 2002) sia a causa di tecniche di pesche deleterie per i fondali (Pasqualini et al., 1999), sia per lo sversamento nelle acque marine di sostanze tossiche e/o nocive. E' ormai ampiamente dimostrato come in particolare i metalli pesanti ed i sottoprodotti dell'industria petrolchimica siano una grave minaccia per le praterie di *Posidonia oceanica* (Prange and Dennison, 2000). Gli effetti di disturbo su *Posidonia oceanica* stanno ormai diventando causa di grave alterazione degli ecosistemi marini caratterizzati da questa fanerogama (Whitfield et al., 2004).

Come già detto, i nostri studi tendono ad inserirsi in un contesto che indaghi meglio i meccanismi fisiologici di questa pianta in risposta alle interazioni con fattori naturali e/o antropici in modo da poter ottenere anche eventuali ricadute applicative di tutela e salvaguardia della specie.

1.4 Il sistema di studio *Helianthus annuus*

Il genere *Helianthus* appartiene alla sottofamiglia delle *Asteroideae* della famiglia delle *Compositae* (detta anche *Asteraceae*) a sua volta inclusa nell'ordine *Asterales* ed annovera sia specie annuali che perenni. La specie coltivata *Helianthus annuus* è generalmente conosciuta come girasole. La maggior parte delle varietà coltivate di questa specie presentano una parte epigea sviluppata in altezza entro un *range* compreso tra 50 cm e 500 cm. Il fusto è tipicamente non ramificato e la sua lunghezza viene determinata dal numero di internodi. Le prime foglie sono opposte anche se in qualche varietà diventano alternate.

L'infiorescenza è tipica della famiglia delle *Compositae* e, in *Helianthus annuus*, consiste in un numero di fiori compreso tra 300 e 1000 che può risultare addirittura più elevato nelle specie coltivate non a scopo alimentare. Nel loro insieme formano un disco florale con precisi meccanismi e tempi di apertura delle diverse spire. Inoltre la morfologia dell'infiorescenza può variare e si riscontrano infiorescenze concave, convesse o piatte.

Il frutto è costituito da un achene contenente il seme. Se non fecondati gli acheni possono essere vuoti. Reperti archeologici sembrano suggerire un'origine nord americana della specie e sempre in quest'area geografica ha avuto origine l'addomesticazione come coltura del girasole.

E' da sottolineare la facilità con cui si possono avere ibridi con diverse varietà spontanee (Burke et al. 2002). Per ovviare a ciò, le varietà attualmente in commercio sono auto-compatibili anche se le condizioni ambientali possono influenzare il livello di auto-fertilità (Snow et al. 1998).

Il girasole riveste primaria importanza come coltura agraria essendo una delle principali fonti di olio ad uso alimentare. Infatti l'olio di girasole è considerato di elevata qualità per via dell'alto contenuto in acidi grassi polinsaturi, per l'assenza di acidi grassi trans, per la sua stabilità e per l'alto punto di fumo. Inoltre si sta sempre più estendendo un uso non alimentare principalmente come fonte di energia alternativa e nella cosmesi.

Nel contesto di importanza economico-produttiva di questa pianta, i dati riportati sull'espressione di geni codificanti per deidrine, proteine implicate nella risposta a fattori quali la radiazione luminosa, la siccità, la salinità, rappresentano un ulteriore contributo alla conoscenza dell'interazione tra questa pianta e alcuni fattori fortemente condizionanti la resistenza e la capacità produttiva della pianta stessa.

2. SISTEMI VEGETALI E METALLI PESANTI

Occorre premettere che molti metalli pesanti risultano essenziali al metabolismo delle piante quando essi sono presenti in tracce (Callahan et al., 2006). Tuttavia quando la loro concentrazione risulta relativamente elevata si possono avere effetti tossici con ripercussioni su molteplici aspetti della biologia delle piante (Mejáre and Bülow, 2001).

Negli ultimi decenni, il continuo sviluppo delle attività industriali e di produzione, in assenza di opportune politiche di protezione ambientale, ha portato ad un aumento esponenziale delle concentrazioni di metalli pesanti quali Cadmio, Zinco, Rame, Nichel, Cromo e Mercurio nelle diverse componenti della biosfera.

Particolare attenzione va posta nei riguardi dell'ecosistema marino visto che sia scarichi diretti che acque reflue provenienti da impianti di smaltimento e depurazione hanno il mare come sbocco ultimo con un accumulo preoccupante di queste categorie di inquinanti.

Come premesso, alcuni vegetali risultano utili bioindicatori dell'inquinamento da metalli pesanti e la risposta alla loro esposizione è la risultante di una serie di eventi a livello fisiologico, morfologico e, soprattutto, molecolare (Sanità di Toppi and Gabrielli, 1999; Lombi et al. 2001). Molte specie vegetali infatti risultano bio-sensibili, bio-tolleranti o addirittura iperaccumulatrici nei confronti dei metalli pesanti e delle loro concentrazioni (Chen et al., 2004).

Metalli pesanti quali il Cadmio influenzano importantissime funzioni della fisiologia delle piante come il bilancio idrico, l'attività dei fotosistemi (Siedlecka and Krupa, 1996) fino ad inibire la funzione enzimatica ed a causare gravi danni ossidativi (Hendry et al., 1992; Anderson et al. 2001). Inoltre, è da tempo nota l'azione negativa del Cd sul corretto movimento ionico nelle cellule di guardia,

influenzando, anche se indirettamente, il meccanismo di apertura stomatico (Barcelò and Poschenrieder, 1990).

Risulta chiara quindi l'importanza di acquisire nuove conoscenze circa piante capaci di tollerare la presenza di inquinanti quali i metalli pesanti o che riescono addirittura a diminuirne la concentrazione in termini assoluti nell'ecosistema di appartenenza (Lasat, 2002). Infatti, sotto il termine di *Phytoremediation* vengono indicati tutta una serie di nuove tecnologie per la bonifica di siti inquinati che utilizzano sistemi vegetali capaci di concentrare nei loro tessuti inquinanti presenti nei suoli, nelle acque e nell'aria o, in ultima ipotesi, di rendere questi inquinanti non più biodisponibili (Ernst, 2005). Tale capacità è conferita ad idonei sistemi vegetali in particolar modo da specifiche proteine e lo studio dell'espressione dei geni che codificano per tali proteine può essere di grande utilità nel migliorare le tecniche di fitorimediazione.

2.1 Principali sistemi di risposta al Cadmio ed ai metalli pesanti nelle piante superiori

Vale la pena introdurre brevemente i diversi sistemi di tolleranza e/o detossificazione che le piante adottano nei meccanismi di risposta alla presenza eccessiva di metalli pesanti nel loro spazio fisio-ecologico.

I principali sistemi di difesa sono rappresentati da: sistemi di immobilizzazione, di esclusione, presenza di ligandi quali Fitochelatine e Metallotioneine (Sanità di Toppi et al., 1999).

Per immobilizzazione si intende il blocco degli ioni Cadmio a livello della parete cellulare (Nishizono et al., 1989; Leita et al., 1996) oppure a livello dei carboidrati extracellulari quali il callosio (Wagner, 1993).

Nel meccanismo di esclusione è invece la membrana cellulare a rappresentare il sistema di difesa visto che il Cadmio sembra utilizzare i canali del Calcio presenti nella membrana plasmatica come punti di ingresso della cellula (Rivetta et al., 1997).

Tuttavia è ancora da chiarire come la pianta risponda a livello del plasmalemma a concentrazioni elevate dei metalli pesanti anche se è ormai chiaro che tali livelli promuovano la sintesi di amminoacidi ad azione chelante facilmente riscontrabili negli essudati radicali di molte specie (Costa et al., 1997; Wenzel et al., 2003).

Infatti sono da tempo oggetto di studio particolari proteine e peptidi capaci di legare i metalli pesanti attraverso l'azione chelante dovuta alla loro particolare struttura.

Fanno parte di queste sia le Fitochelatine che le Metallotioneine.

2.1.1 Le Fitochelatine

E' ormai chiaro che il Cadmio mostri una forte interazione con diversi *steps* del metabolismo dello Zolfo (De Knecht et al., 1995).

Infatti, una volta che il Cadmio è penetrato nell'ambiente endocellulare, viene attivato un sistema anabolico legato strettamente al metabolismo dello Zolfo che porta alla formazione di agenti complessanti e chelanti che contribuiscono a neutralizzare gli ioni Cadmio. Tali agenti chelanti sono chiamati Fitochelatine (PCs) (Sanità di Toppi and Gabrielli, 1999).

Le Fitochelatine presentano la seguente struttura generale: $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, dove n rappresenta il numero di ripetizioni che varia, in genere, da 2 a 5. Questa struttura è tipica di molte specie vegetali anche se sono state identificate alcune varianti presenti in alcune specie che differiscono nell'amminoacido terminale (Cobbett, 2000).

Le PCs sono strutturalmente correlate al Glutatione (GSH) e numerosi studi hanno accertato che lo stesso GSH rappresenta il substrato di biosintesi sul quale agisce la PC sintasi (Grill et al., 1989; Cobbett and Goldsbrough, 2002). Tale enzima presenta auto regolazione e la sua sintesi termina nel momento in cui non vi sono più ioni Cadmio liberi disponibili visto che proprio il Cadmio risulta comportarsi come parte integrante del substrato e di conseguenza l'enzima cessa la propria attività per semplice esaurimento del substrato (Cobbett and Goldsbrough, 2002).

La sintesi di PCs è attivata principalmente dal Cadmio mentre lo stimolo risulta minore in presenza di altri metalli quali Ag, Pb, Zn, Cu (Ha et al., 1999; Clemens et al. 1999)

Le Fitochelatine formano diversi complessi con il Cadmio grazie ai gruppi tiolici della cisteina che, sequestrando il Cadmio per via dell'attività chelante, fanno in modo che non vi siano all'interno del citosol ioni liberi Cd^{2+} (Grill et al., 1985). Attraverso la formazione di complessi a diverso peso molecolare il Cadmio può essere trasportato all'interno del vacuolo attraverso *carriers* specifici (Li et al., 1997) con una concentrazione che all'interno del tonoplasto può risultare più di 38 volte maggiore rispetto al citosol (Salt and Rauser, 1995). Tali evidenze supportano l'ipotesi che la produzione di fitochelatine sia il meccanismo principale per la detossificazione dal Cadmio nelle piante superiori (Gekler et al., 1989; Sanità di Toppi et al., 1999).

2.1.2 Le Metallothioneine

Cadmio ed metalli pesanti possono essere complessati e detossificati, oltre che dalle Fitochelatine, anche dalle Metallothioneine (MTs) (Kagi, 1991; Delhaize et al., 2004), una famiglia di peptidi ricchi in cisteina (circa il 30%) e che presentano un basso peso molecolare (6-7 kDa) (Coyle et al. 2002).

Tuttavia occorre sottolineare che, oltre ad un ruolo fondamentale nel mantenere l'omeostasi da metalli pesanti, le MTs svolgono altri importantissimi ruoli quali fungere da *scavenger* nei confronti di specie chimiche altamente ossidanti (Wong et al., 2004), regolare la crescita cellulare ed interagire con altri metallo-enzimi e fattori di trascrizione (Haq et al., 2003).

Caratteristica delle MTs è la presenza (sia all'estremità carbossi- che amino-terminale) di domini ricchi in residui di Cys del tipo Cys-Cys, Cys-X-Cys e Cys-X-X-Cys dove X è rappresentato da un diverso aminoacido (Mejäre and Bülow, 2001).

L'attività chelante è svolta anche per le MTs dai gruppi tiolici delle cisteine che riescono ad immobilizzare e complessare gli ioni di diversi metalli pesanti.

Le MTs vengono attualmente suddivise in classi in base alle loro diverse strutture. La Classe I, tipica dei mammiferi, di molti vertebrati ma anche di specie vegetali (Zhou et al. 2006), è composta da proteine che presentano due domini ricchi in cisteina separati tra loro da una regione spaziatrice (Coyle et al. 2002) e che riescono a legare sette ioni divalenti o 12 ioni monovalenti (Mejère and Bülow, 2001).

Le MTs isolate da lieviti, cianobatteri e piante superiori, pur presentando basso peso molecolare con un alto contenuto in cisteina, mostrano però una diversa distribuzione di tale aminoacido rispetto alle MTs di classe I e perciò vengono definite di classe II (Robinson et al., 1993; Cobbett et al., 2002).

Molti autori tendono a considerare le Fitochelatine come MTs di classe III (Mejère and Bülow, 2001; Zhou et al. 2006).

A loro volta, le MTs di classe II vengono ulteriormente distinte in 4 tipi in base alla disposizione dei residui di Cys.

Analisi di espressione hanno dimostrato che il tipo 1 contiene un totale di sei ripetizioni Cys-Xaa-Cys (dove Xaa rappresenta un diverso aminoacido) egualmente distribuiti in due domini separati tra loro da circa 40 aminoacidi tra cui anche aromatici. Questo spaziatore relativamente lungo è una caratteristica delle MTs presenti nelle piante (Cobbett and Goldsbrough, 2002). Il tipo 1 viene espresso prevalentemente nelle radici e, in minor misura, negli apici (Hsieh et al., 1996) .

Il tipo 2 ha caratteristiche simili al tipo 1 con due domini ricchi in cisteina ed uno spaziatore di circa 40 aa. Tuttavia i primi due residui di cisteina sono presenti come motivo Cys-Cys nelle posizioni 3 e 4 di queste proteine ed inoltre il dominio N-terminale risulta altamente conservato. Al contrario, la regione spaziatrice varia molto nelle diverse specie. Il tipo 2 è maggiormente espresso nelle foglie e negli apici (Hsieh et al., 1996).

Il tipo 3 presenta nel dominio N-terminale solo 4 residui di cisteina con una articolata e tipica disposizione mentre persiste, come negli altri tipi, uno spaziatore di

circa 40 aa. Tale tipologia di MTs viene espressa tipicamente nelle foglie, specie in quelle appartenenti a piante che non producono frutti carnosì, o in frutti in maturazione (Ledger and Gardner, 1994; Cobbet et al., 2002).

Il tipo 4 differisce da tutte le altre MTs vegetali in quanto presenta tre domini ricchi in cisteina ognuno dei quali contiene 5 o 6 residui e separati tra loro da 10 a 15 residui amminoacidici (Cobbett and Goldsbrough, 2002). Il tipo 4 viene espresso durante la germinazione (White and Rivin, 1995) e sembra essere l'unica tipologia con un preciso organo dove viene quasi unicamente espresso. In questo senso queste MTs potrebbero avere un ruolo nel manipolare la concentrazione dei metalli pesanti nei semi (Lucca et al., 2001).

Tuttavia sembra chiaro che l'espressione di alcune MT cambia drasticamente nelle varie fasi di sviluppo. Questo è sicuramente dimostrato per il forte aumento di RNA codificanti per MTs nelle foglie in senescenza di *Brassica napus*, *Arabidopsis* e riso (Garcia-Hernandez et al., 1998). Sempre in fase di senescenza foliare è ampiamente dimostrata l'espressione nel floema di MTs che potrebbero fungere da *chaperone* nel trasporto a lunga distanza dei metalli pesanti (Himmelblau et al., 2000; Cobbett et al., 2002; Zhou et al., 2006).

Inoltre l'espressione in particolar modo del tipo 1, oltre che dai metalli pesanti, sembra essere stimolata da shock termici e da deficit di nutrienti (Snowden et al., 1995) e ciò supporta il fatto che le MTs siano una parte di una risposta più generale agli stress (Akashi et al., 2004) ed essere correlate anche con un elevato numero di processi biologici legati al normale sviluppo delle piante (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Haq et al., 2003).

2.2 Risultati

2.2.1 *Pomt2f* e *Pomt2b*, sequenze codificanti per putative MTs di tipo 2.

Il gruppo di ricerca del prof. Cavallini del Dip. di Biologia delle Piante Agrarie dell'Università di Pisa ha isolato, attraverso l'utilizzo di *primers* degenerati costruiti su sequenze codificanti per MTs in altre specie vegetali, tre sequenze codificanti per putative MTs in *Posidonia oceanica* (Giordani et al., 2000).

Due di queste sequenze, *Pomt2f* e *Pomt2b* hanno mostrata un'alta similarità con geni codificanti MTs di tipo 2 mentre la terza sequenza, *Pomt2c*, sembra essere un prodotto della retrotrascrizione dell'RNA messaggero di *Pomt2b*.

Abbiamo analizzato il *pattern* d'espressione dei due geni attraverso ibridazione *in situ* RNA-RNA in apici vegetativi, in foglie, in radici ed in rizomi di *Posidonia oceanica*. Il risultato di questo studio è allegato come pubblicazione.



Isolation of putative type 2 metallothionein encoding sequences and spatial expression pattern in the seagrass *Posidonia oceanica*

R. Cozza^{a,*}, T. Pangaro^a, P. Maestrini^b, T. Giordani^b, L. Natali^b, A. Cavallini^b

^a University of Calabria, Department of Ecology, Ponte P. Bucci, Cubo 6B, 87030 Arcavacata di Rende, Cosenza, Italy

^b University of Pisa, Department of Agricultural Plant Biology, Via Matteotti 1/B, 56124 Pisa, Italy

Received 1 March 2006; received in revised form 12 June 2006; accepted 16 June 2006

Abstract

Metallothioneins (MTs) are a group of proteins with low molecular mass and high cysteine content that bind to heavy metals and are thought to play a role in their metabolism and detoxification. Genes encoding MT-like proteins have been isolated in a number of plants. In this work we isolated nine MT-like sequences from copper- or cadmium-exposed plants of the seagrass *Posidonia oceanica*, a marine Angiosperm playing a major role in maintaining infralittoral ecosystems in the Mediterranean sea. These sequences, together with two other MT genes previously isolated from this species, show high similarities with genes encoding type 2 MTs. Neighbour-joining analysis, at both deduced protein and 3'-UTR sequence level, indicates that at least two subgroups occur within *Posidonia* type 2 MTs, showing, however, a strong sequence uniformity. Southern analysis of two type 2 MT-encoding sequences (*Pomt2b* and *Pomt2f*) belonging to the two different subgroups showed distinct hybridisation patterns. For both type 2 MTs, we have determined, by *in situ* technique, the expression domain in *Posidonia* plants. The members of these two MT subgroups show differences in their histological expression, with *Pomt2b* associated with proliferative tissues whereas *Pomt2f* is associated with lignified or suberized cell wall.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *In situ* hybridisation; Metallothionein-encoding gene; *Posidonia oceanica*; Trace metal

1. Introduction

Metallothioneins (MT) are a large family of low-molecular-weight cysteine-rich proteins that are widespread through the animal and plant kingdoms and show a high metal binding capacity (Hamer, 1986; Kagi, 1991; Robinson et al., 1993). Many MT-like protein genes have been identified in both monocots and dicots (Robinson et al., 1996; Cobbett and Goldsbrough, 2002). MTs have been divided into two classes based on amino acid sequences. Class I MTs contain 20 highly conserved Cys residues arranged as in mammals and are widespread in vertebrates (Klaassen et al., 1999). Metallothioneins from plants and fungi, as well as invertebrates, are grouped in Class II (Robinson et al., 1993). According to their amino acid sequences, plant Class II MT proteins are further classified into four types (Cobbett and Goldsbrough, 2002). In *Arabidopsis*, for example, seven actively expressed MT genes have been identified and include representatives of these four types (Zhou and Goldsbrough,

1995; Cobbett and Goldsbrough, 2002). Based on analysis of MT RNA expression in a number of plant species, type 1 MT genes are expressed more abundantly in roots than in leaves, whereas type 2 MT genes are expressed primarily in the leaves (Zhou and Goldsbrough, 1994, 1995; Hsieh et al., 1995, 1996; Foley et al., 1997; Garcia-Hernandez et al., 1998; Guo et al., 2003; Mir et al., 2004). Type 3 MT genes are expressed in leaves or in ripening fleshy fruits (Ledger and Gardner, 1994; Abdullah et al., 2002; Guo et al., 2003), while expression of type 4 MTs appears to be restricted to developing seeds (Kawashima et al., 1992; White and Rivin, 1995; Nam et al., 1999; Chyan et al., 2005).

In view of their metal-binding capacity, it has been suggested that MTs may play a role in the homeostasis of essential metal ions and the detoxification of heavy metals. However, plant MT-like genes can be involved in a wide range of biological processes related to normal development and both biotic and abiotic responses (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Guo et al., 2003; Chang et al., 2004; Lee et al., 2004; Zimeri et al., 2005; Zhou et al., 2005).

The marine phanerogam *Posidonia oceanica* represents an important food substrate for many marine organisms (Novak, 1982; Pirc, 1985). Like other seagrasses, i.e. *Zostera* and

* Corresponding author. Tel.: +39 0984492966/60; fax: +39 0984492964.
E-mail address: rad.cozza@unical.it (R. Cozza).

Cymodocea, *Posidonia* plays a major role in maintaining marine environments. Although a large number of studies have focused on the ability of *P. oceanica* to sequester metals from the environment (Malea and Haritonidis, 1989; Calmet et al., 1991; Pergent and Pergent-Martini, 1999; Tranchina et al., 2005) and this species has been proposed as a bioindicator for mercury-rich sites (Maserti et al., 1988; Pergent-Martini, 1998; Ferrat et al., 2003), the metal-binding mechanisms are still largely unknown.

In previous work, three *P. oceanica* type 2 MT-like sequences were isolated by PCR using degenerated primers designed to Cys-rich regions (Giordani et al., 2000). Two sequences, *Pomt2a* and *Pomt2b* showed high similarity to genes encoding type 2 MTs; the third sequence, *Pomt2c* was presumed to be a pseudogene originating by retrotranscription of the *Pomt2b* mRNA. As for the animal MTs, it was observed that *Pomt2b* transcript accumulation increases after exposure to trace metals such as copper and cadmium, but not with exposure to mercury (Giordani et al., 2000).

In this paper we report on the isolation of further *P. oceanica* type 2 MT-like sequences expressed after metal treatments. Two possible subgroups of sequences were found. In order to elucidate the function of the two MT subgroups, we analysed the pattern of mRNA localization of one member of each subgroup (*Pomt2b* and *Pomt2f*) by *in situ* hybridisation. We investigated on different organ of *P. oceanica* plants and, regarding the leaf, at different stage of development. The hybridisation pattern of *Pomt2b* versus *Pomt2f* showed some differences being *Pomt2b* associated with proliferative tissues whereas *Pomt2f* is associated with lignified or suberized cell wall. The significance of this regulated expression of the two *Posidonia* MT subgroups is discussed.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

P. oceanica shoots were sampled in March 2003, by scuba diving at 12 m depth in the *P. oceanica* meadows of Livorno and Praia a Mare (Mar Tirreno, Italy). For molecular analyses, plants were immediately frozen in liquid nitrogen or were acclimated in aquaria for 24 h. Then, seawater culture medium was added with CuCl_2 , or $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ solutions to reach total concentrations of $1 \mu\text{M}$ Cu^{2+} and $10 \mu\text{M}$ Cd^{2+} . Metal treatment was conducted for 2 d (see also Giordani et al., 2000).

In other experiments, after washing off the excess of sediments, plants were immediately fixed and processed for the *in situ* hybridisation. Leaf samples were subdivided into young leaves (leaves < 5 cm and lacking a leaf sheath) and mature leaves (leaves longer than 5 cm and possessing a leaf sheath) according to Giraud (1979). In both cases, two leaf portions were processed: a basal region (undifferentiated and light-green) and an apical region (differentiated and green). The leaf tip was not used because of the presence of a luxuriant carpet of epiphytes.

2.2. Isolation of RNA

Total RNA extraction was performed by the CTAB method (Giordani et al., 2000). Basal leaf portions from clonal plants were homogenized in liquid nitrogen in a mortar and lysed using large volumes of CTAB isolation buffer (3% (w/v) CTAB (Sigma), 1.4 M NaCl, 0.2% (v/v) 2-mercaptoethanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0), 1 mL g^{-1} of tissue, at 60°C , in order to increase the RNA yield. Samples were incubated at 60°C for 30 min with occasional gentle swirling and then extracted once with chloroform:isoamyl alcohol (24:1, v/v). After centrifugation (2040 g) at 4°C , nucleic acids were precipitated from the aqueous phase by adding 2/3 volumes of cold isopropanol and then spooled with a glass hook, washed in 76% ethanol, 10 mM ammonium acetate for 1–2 h, allowed to dry briefly and solubilized in diethylpyrocarbonate-treated water. RNA integrity was assayed on agarose gels in denaturing standard conditions.

2.3. Isolation of putative type 2 MT encoding cDNAs

DNA sequences homologous to metallothionein-coding genes were isolated by PCR-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) (Frohman et al., 1988) on total RNA, using the 3'-RACE System kit (Gibco) according to manufacturer's instructions. The primer used in these experiments was 5'-ATGTCCTTGCTGYGGAGGAARCTGT-3'. For 3'-RACE, first strand cDNA was synthesized using total RNA from Cu^{2+} - or Cd^{2+} -treated plants as a template. $2.5 \mu\text{g}$ RNA was heated for 10 min at 70°C and retrotranscribed in a $25 \mu\text{L}$ reaction volume using $500 \mu\text{M}$ each of deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 500 nM of the AP-adapter primer, $1\times$ PCR-buffer, 10 mM DTT, 200 U SuperScript II Reverse Transcriptase and 2.5 mM MgCl_2 . Incubation time was 50 min at 42°C . After retrotranscription, RNase Mix was added to the mixture for 20 min at 37°C . Retrotranscribed cDNA was used for PCR amplification: PCR was performed using $2 \mu\text{L}$ retrotranscribed cDNA, 1.5 mM MgCl_2 , $200 \mu\text{M}$ of each dNTP, 200 nM MT-primer in conjunction with 200 nM AUAP primer, $1\times$ thermophilic buffer (Promega), 2.5 U *Taq*-DNA polymerase (Promega). The reaction mixture ($50 \mu\text{L}$) was heated to 94°C for 2 min, then 35 cycles, each consisting of 30 s at 94°C , 30 s at 55°C , 60 s at 72°C , were used. The final step at 72°C was extended for 7 min.

Fragments amplified from cDNA were cloned into a pGEM-T Easy plasmid vector (Promega). The cloned fragments were sequenced by the dideoxy chain termination method (Sanger et al., 1977) using the PRISM dye terminator cycle sequencing kit (Perkin-Elmer) according to the manufacturer's instructions; sequences were analysed using the Sequencing Analysis 2.1.2 (Perkin-Elmer) and the Sequencer 3.0 analysis program (Gene Codes Corporation).

2.4. Southern analysis

Ten micrograms of genomic DNA was digested with the restriction endonucleases *EcoRI*, *BamHI* and *MspI* in five-fold

excess according to the instructions of the suppliers (Boehringer). Complete digestion was checked by including unmethylated bacteriophage lambda DNA, which, when digested with *EcoRI* plus *HindIII* (DNA molecular size marker III; Boehringer), was also used as a fragment size marker. Southern blotting of digested DNAs was performed according to standard protocols (Sambrook et al., 1989) and hybridisations were made using *Pomt2b* or *Pomt2f* riboprobe as described later.

2.5. Computer analysis

Relationships among metallothionein deduced proteins of *P. oceanica* and of other six species were investigated by the neighbour-joining (NJ) method (distance algorithm after Kimura), using the PHYLIP program package Version 3.572 (Felsenstein, 1989): after protein sequence alignment, 1000 versions of the original alignment were generated using the SEQBOOT program; then, trees were generated using PROTDIST (or DNADIST) and NEIGHBOR programs, using default options. A strict consensus tree was obtained from the available trees using the CONSENSE program.

2.6. In situ hybridisation

Excised shoots and leaves were fixed, dehydrated, embedded in paraffin and cut into 8 µm sections. The sections were dewaxed and then treated with 4% paraformaldehyde followed by treatment with 0.25% acetic anhydride in triethanolamine. After dehydration through a graded ethanol series, the sections were hybridised with digoxigenin-labelled antisense and sense *Pomt2b* or *Pomt2f* RNA. A cDNA clone was linearised and the digoxigenin labelled RNA probe was produced by T7-polymerase driven *in vitro* transcription using the DIG RNA labelling kit SP6/T7 (Roche). The hybridisation was performed at 53 °C for 24 h in 50% formamide, 0.3 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM Na phosphate, 5 mM EDTA, 2.5% dextran sulphate, 1.25 Denharts' solution and 1 mg mL⁻¹ tRNA. After hybridisation the sections were washed in 1× SSC (30 mM NaCl, 3 mM Na Citrate) two

times for 5 min at room temperature; 0.2× SSC two times for 10 min at 55 °C; 2× SSC for 2 min at 37 °C. Then, the sections were treated with 10 µg mL⁻¹ RNase A in 2× SSC at 37 °C for 30 min and washed in 2× SSC. The hybridisation signals were visualized using antidigoxigenin-alkaline phosphatase conjugated with nitroblue tetrazolium salt and 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate (Sigma). Slides were dried, mounted and photographed using a light microscope (Leica DM RB) equipped with a PC-based image analysis system.

3. Results

In previous work, three genomic DNA sequences putatively encoding type 2 metallothioneins were isolated, one of which is likely to be a pseudogene (Giordani et al., 2000). In this work 10 new DNA sequences putatively encoding type 2 metallothioneins were isolated from cDNAs using RNA isolated from Cu- and/or Cd-treated plants (Table 1). Of these, one cDNA has the same sequence as the coding portion of the previously isolated *Pomt2b* gene. A neighbour-joining analysis of the 10 protein sequences deduced from the cDNAs and one protein sequences deduced from previously isolated genomic sequence (*Pomt2a*, Giordani et al., 2000) is reported in Fig. 1. Though there is high sequence uniformity, the tree indicates the occurrence of at least two subgroups according to the genetic distance, based on amino acid sequence.

Southern analysis of one member of each type 2 MT subgroup is reported in Fig. 2. Two distinct Southern patterns were observed, indicating hybridisation specificity of the two probes. So, an analysis of the MT spatial expression pattern was performed using *Pomt2b* or *Pomt2f* cDNAs as probe.

Pomt2b was expressed in shoot, leaves and root with stronger signal compared to *Pomt2f* (Figs. 3 and 4). In shoot cross-section, the *Pomt2b* riboprobe hybridised mainly in the inner portion of the shoot and the signal is widespread in all the developing tissue, except for the vascular bundles (Fig. 3A). In shoot longitudinal-sections, a strong signal of *Pomt2b* mRNA is visible at the base of the developing leaf primordia (Fig. 3B and C). Interestingly, in the apical dome of the shoot meristem, which contains cells that will become incorporated into lateral

Table 1
Type 2 MT-like sequences of *P. oceanica*

Sequence	Accession number	DNA sequence length (bp)	Deduced protein length (aa)	Isolated from
Pomt2a	AJ249603	745	77	Genomic DNA ^a
Pomt2b	AJ249602	364	77	Genomic DNA, expressed in Cu ²⁺ - and Cd ²⁺ -treated plants ^a
Pomt2c	AJ249604	227	–	Genomic DNA, presumed pseudogene ^a
Pomt2d	AJ628138	456	77	cDNA of Cu ²⁺ -treated plants
Pomt2e	AJ628139	466	77	cDNA of Cu ²⁺ -treated plants
Pomt2f	AJ628140	404	77	cDNA of Cu ²⁺ -treated plants
Pomt2g	AJ628141	470	77	cDNA of Cu ²⁺ - and Cd ²⁺ -treated plants
Pomt2h	AJ628142	537	77	cDNA of Cu ²⁺ - and Cd ²⁺ -treated plants
Pomt2i	AJ628143	500	77	cDNA of Cu ²⁺ - and Cd ²⁺ -treated plants
Pomt2j	AJ628144	443	77	cDNA of Cu ²⁺ -treated plants
Pomt2k	AJ628145	456	77	cDNA of Cu ²⁺ -treated plants
Pomt2l	AJ628146	355	74	cDNA of Cu ²⁺ -treated plants

^a Giordani et al. (2000).

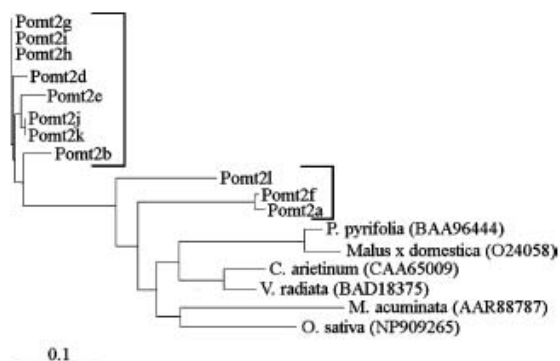


Fig. 1. Neighbour-joining analysis of alignment of proteins deduced from isolated MT-encoding genes of *Posidonia oceanica* and metallothioneins of other species. Bar represents distance (percent divergence) between all pairs of sequence from the multiple alignments.

organs and the stem core, *Pomt2b* mRNA is completely lacking (Fig. 3C). In the lower zone of the meristem, corresponding to the early steps of rhizome differentiation, the mRNA is abundant in the vascular bundles (Fig. 3D). As for the mature leaves, the transcript was exclusively associated to the vascular tissues with strong expression in the basal part of the leaf, while in the apical part *Pomt2b* mRNA was localized mainly in the phloem (Fig. 3E and F). The expression pattern was not affected by the developmental stage and the young leaves (<5 cm) showed the same expression pattern as the adult ones (>15 cm) (data not shown). In the root *Pomt2b* is mainly localized in the apex, in the cap and vascular tissue (Fig. 3G and H). No signal was observed in the sense strand control (Fig. 3I and J).

Pomt2f mRNA is visible in the shoot as a weak signal around the vascular bundles whereas in the leaves the transcript was

associated also to the sub-epidermal cells (collenchyma) and in the root mainly to the endodermis layer (Fig. 4A–E).

4. Discussion

The use of a degenerate primer designed to a highly conserved region of plant type 2 metallothioneins allowed isolation a number of isoforms with very similar DNA sequence. Such sequence conservation within the MT gene family is not surprising (see for example *Arabidopsis thaliana* in Zhou and Goldsbrough, 1994; Murphy et al., 1997; Garcia-Hernandez et al., 1998). The occurrence of at least two subgroups can be inferred from the phylogenetic tree obtained using deduced proteins (Fig. 1), showing that three sequences (*Pomt2a*, *Pomt2f*, and *Pomt2l*) are more similar to MTs of other species than to the other isolated *Posidonia* MTs. Obviously, the exact number of genes belonging to these two subgroups cannot be precisely established. Moreover, in those cases in which only a small number of nucleotide substitutions are observed between isoforms, it cannot be excluded that such substitutions depend on experimental errors of the retro-transcriptase or *Taq*-polymerase.

One member for each subgroup was selected (*Pomt2b* and *Pomt2f*) and analysed in Southern blot and hybridisation experiments (Fig. 2) showing specific hybridisation patterns. Both sequences were obtained by RACE-PCR of cDNAs isolated from Cu^{2+} - or Cd^{2+} -treated plants, i.e. were transcribed in these plants (Table 1). *Pomt2b*, a sequence showing high similarity with the majority of *Posidonia* MT isolated sequences (9 out of 12), is expressed in Cd^{2+} - or Cu^{2+} -treated plants as well as constitutively (Giordani et al., 2000). *Pomt2f* belongs to a minor subgroup (comprising three out of 12 sequences).

To better understanding the functional role of the two MTs subgroups, the expression of *Pomt2b* and *Pomt2f* were analysed by *in situ* hybridisation, using riboprobes that include 5'- and 3'-UTR regions under high stringency conditions in order to reduce cross-reaction. On the other hand, it is to be recalled that, in Southern blots, the two probes show different hybridisation pattern (Fig. 2). The results show that *Pomt2b* mRNA is more conspicuous than *Pomt2f* and associated to vegetative meristem, foliar tissues, root apex, cap and endodermis. *Pomt2b* is mainly expressed in tissues where cell division and morphogenetic events occurs with a very precocious association to the foliar tissue. In fact *Pomt2b* signal is visible just in the early stages of leaf development (primordia) in the whole mesophyll, while in differentiated leaves *Pomt2b* mRNA is confined to the vascular tissue and, in the apical part of the leaf, only to a few sieve elements. Moreover, we found *Pomt2b* signal in the shoot meristems, mostly in the inner region, with the transcript missing in the apical dome. These evidences suggest that *Pomt2b* could act in metal homeostasis in the mesophyll cells, especially in the young leaves, protecting the shoot apex, the first organ to absorb excess metals from the sediments. The strict association of the transcripts to the vascular bundle in the mature leaf, in the early rhizome and in the root apex, supports this hypothesis, suggesting that this MT serves as a "trafficking" metal chaperone, for long-distance transport of heavy metals.

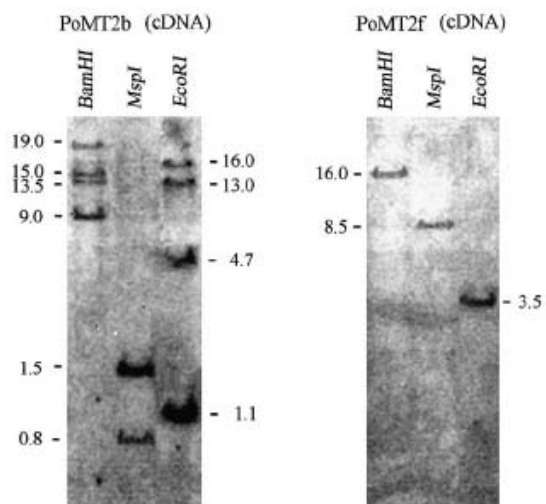


Fig. 2. Southern blots of *P. oceanica* DNA, digested with enzymes that do not recognize sites within isolated putative metallothionein coding sequences, hybridised with digoxigenin labelled *Pomt2b* or *Pomt2f*. Molecular weights of bands are reported in bp.

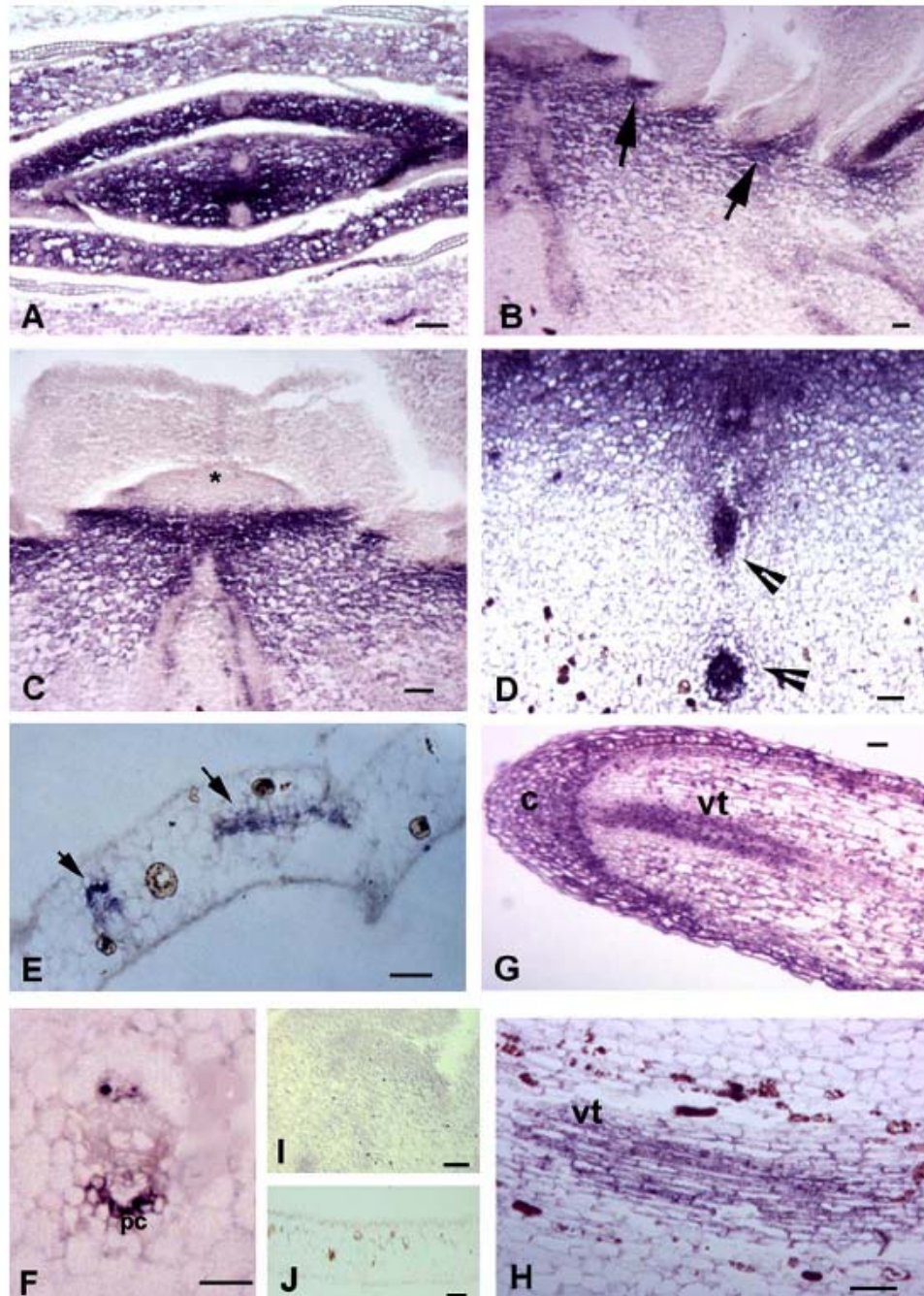


Fig. 3. Expression pattern of *Pomt2b* in *P. oceanica*. (A) *In situ* localization of *Pomt2b* transcript in transverse section through a shoot meristem, note the intense signal is in the developing tissue in the inner portion of the shoot. (B) *In situ* localization of *Pomt2b* transcript in longitudinal section through a shoot meristem, *Pomt2b* mRNA is observed at the base of the developing leaf primordia (arrows). (C) In a near median longitudinal section the signal is lacking in the apical dome (star). (D) Longitudinal sections of early differentiating rhizome, *Pomt2b* marks intensively the vascular bundles (arrows). (E) Cross sections of basal portion of leaf, the signal is confined to the vascular tissue (arrows); (F) in the apical portion of the leaf *Pomt2b* is confined to companion cells of sieve tissue; (G and H) longitudinal section of the root, note the signal in the apex, cap and vascular tissue; (I) apical shoot and (J) leaf hybridised with sense probe as negative controls. c: cap; pc: phloemtic cells; vt: vascular tissue. Size bars: 5 μ m.

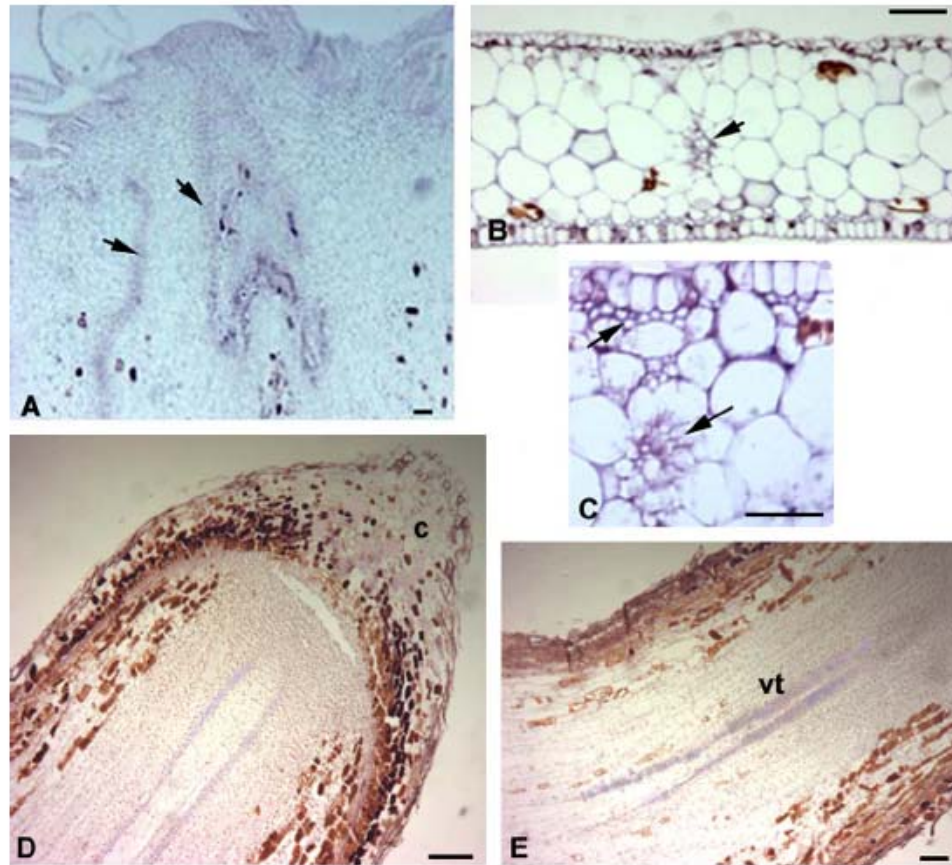


Fig. 4. Expression pattern of *Pom2f* in *P. oceanica*. (A) Longitudinal section through a shoot meristem, *Pom2f* expression domains is confined to the vascular tissue (arrows). (B and C) In the leaf the transcript is detectable in vascular tissue and collenchyma cells (arrows); (D and E) longitudinal section of the root, note the weak signal in the cap and vascular tissue. c: cap; vt: vascular tissue. Size bars: 5 μ m.

On the other hand *Pom2f* hybridised with a set of specific cells: vascular tissue in the shoot, endodermal cells in the root, sub-epidermal cell (collenchymatic cells) in the leaf. The association of *Pom2f* to tracheary element, collenchymatic and endodermal cells indicate a correlation between lignified or suberized cell wall and expression of MT genes. In fact these types of cells synthesize aromatic polymer species during cell wall lignification and/or suberification and are subject to high oxidative redox status (Ros-Barcelo, 1998; Razem and Bernards, 2003), suggesting that *Pom2f* would be involved in metal-ion transport that might be linked to the oxidative processes occurring during suberization. These evidences agree with other data in the literature reporting a correlation between the presence of lignified or suberized cell wall and elevated expression of MT genes (Guo et al., 2003; Nakazono et al., 2003; Mir et al., 2004).

Our data represent the first *in situ* hybridisation study of MT mRNAs in a marine Angiosperm and they support a role for *Pom2f* in metal-ion transport linked to the suberization/lignification processes, and for *Pom2b* mainly a role for long-distance transport of heavy metals. It is worth to note that

expression studies of some MTs genes in *Arabidopsis* transgenic plants, reported the expression of *MT1a* and *MT2b* as mainly localized in the phloem of all organs and expression of *MT2a* and *MT3* mainly in leaf mesophyll cells (Guo et al., 2003). Also in *P. oceanica*, the high expression of *Pom2b* in the inner region of the shoot meristem and in the basal part of the young leaves (where the leaf is growing) suggest a role of this gene in actively dividing and differentiating cells.

Other data reported a high MT gene expression in stem nodes (Yu et al., 1998) where MTs may deliver metal to proteins involved in physiological activity such as cell wall lignification and cell elongation (Oman et al., 1994; Rucker and Maier, 1992); they also found a high expression in actively dividing cells at the intercalary meristem (Yu et al., 1998). Also for *Pom2f*, being expressed in vascular bundles, endodermis, and collenchyma, it could be suggested a role in cell wall lignification and cell elongation.

Studies are in progress in order to isolate the promoter region of the *Pom2b* and *Pom2f* gene and to elucidate the system regulating gene expression *in vivo*.

References

- Abdullah, S.N.A., Cheah, S.C., Murphy, D.J., 2002. Isolation and characterization of two divergent type3 metallothioneins from oil palm, *Elaeis guineensis*. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 255–263.
- Calmet, D., Charmasson, S., Gontier, G., Meinesz, A., Boudouresque, C.F., 1986–1987. Chernobyl radionuclides in the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *J. Environ. Radioact.* 13, 157–173.
- Chang, T., Liu, X., Meng, H.X.K., Chen, S., Zhu, Z., 2004. A metallothionein-like gene *htMt2* strongly expressed in internodes and nodes of *Helianthus tuberosus* and effects of metal ion treatment on its expression. *Planta* 218, 449–455.
- Chyan, C.L., Lee, T.T.T., Liu, C.P., Yang, Y.C., Tzen, J.T.C., Chou, W.M., 2005. Cloning and expression of a seed-specific metallothionein-like protein from sesame. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 (12), 2319–2325.
- Cobbett, C., Goldsbrough, P., 2002. Phytochelatins and Metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 159–182.
- Felsenstein, J., 1989. PHYLIP – phylogeny inference package (Version 3.2). *Cladistics* 5, 164–166.
- Ferrat, L., Pergent-Martini, C., Roméo, M., 2003. Assessment of the use of biomarkers in aquatic plant for the evaluation of environmental quality. Application to seagrasses. *Aquat. Toxicol.* 65, 187–204.
- Foley, R.C., Liang, Z.M., Shing, K.B., 1997. Analysis of type I metallothionein cDNAs in *Vicia faba*. *Plant Mol. Biol.* 33, 583–591.
- Frohman, M.A., Dush, M.K., Martin, G.R., 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rear transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 8998–9002.
- García-Hernández, M., Murphy, A., Taiz, L., 1998. Metallothionein 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118, 387–397.
- Giordani, T., Natali, L., Maserti, B.E., Taddei, S., Cavallini, A., 2000. Characterization and expression of DNA sequences encoding putative type-II metallothioneins in seagrass *Posidonia oceanica*. *Plant Physiol.* 123, 1571–1581.
- Giraud, G., 1979. Sur une méthode de mesure et de comptage des structures foliaires de *Posidonia oceanica* (Linnaeus) Delile. *Bull. Mus. Hist. Nat. Marseille* 39, 33–39.
- Guo, W.J., Bundithya, W., Goldsbrough, P.B., 2003. Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytol.* 159, 369–381.
- Hamer, D.A., 1986. Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 913–951.
- Hsieh, H.M., Liu, W.K., Huang, P.C., 1995. A novel stress-inducible metallothionein-like gene from rice. *Plant Mol. Biol.* 28, 381–389.
- Hsieh, H.M., Liu, W.K., Chang, A., Huang, P.C., 1996. RNA expression pattern of a type 2 metallothionein-like gene from rice. *Plant Mol. Biol.* 32, 525–529.
- Kagi, J.H.R., 1991. Overview of metallothionein. *Meth. Enzymol.* 205, 613–626.
- Kawashima, I., Kennedy, T.D., Chino, M., Lane, B.G., 1992. Wheat Ec metallothionein genes. *Eur. J. Biochem.* 209, 971–976.
- Klaassen, C.D., Liu, J., Choudhuri, S., 1999. Metallothioneins: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 267–294.
- Ledger, S.E., Gardner, R.C., 1994. Cloning and characterization of five cDNAs for genes differentially expressed during fruit development of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*). *Plant Mol. Biol.* 25, 877–886.
- Lee, J., Shim, D., Song, W.Y., Hwang, I., Lee, Y., 2004. *Arabidopsis* metallothioneins 2a and 3 enhance resistance to cadmium when expressed in *Vicia faba* guard cells. *Plant Mol. Biol.* 54, 805–815.
- Malea, P., Haritonidis, S., 1989. Uptake of Cu, Cd, Zn and Pb in *Posidonia oceanica* (Linnaeus) from Antikyra Gulf, Greece: preliminary note. *Mar. Environ. Res.* 28, 495–498.
- Maserti, B.E., Ferrara, R., Paterno, P., 1988. *Posidonia* as an indicator of mercury contamination. *Mar. Poll. Bull.* 19, 381–382.
- Mir, G., Domènech, J., Huguet, G., Guo, W.J., Goldsbrough, P., 2004. A plant type 2 metallothionein (MT) from cork tissue respond to oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 55 (408), 2483–2493.
- Murphy, A., Zhou, J.M., Goldsbrough, P.B., Taiz, L., 1997. Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 113, 1293–1301.
- Nakazono, M., Qiu, F., Borsuk, L.A., Scnoble, P.S., 2003. Laser-capture microdissection, a tool for the global analysis of genes expressed differentially in epidermal cells or vascular tissues of maize. *Plant Cell* 15, 583–596.
- Nam, Y.W., Tichit, L., Leperlier, M., Cuerg, B., Marty, I., Lelièvre, J.M., 1999. Isolation and characterization of mRNAs differentially expressed during ripening of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) fruits. *Plant Mol. Biol.* 39 629 and 636.
- Novak, R., 1982. Spatial and seasonal distribution of the meiofauna in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Neth. J. Sea Res.* 16, 380–388.
- Oman, F., Beaulieu, N., Tyson, H., 1994. cDNA sequence and tissue-specific expression of an anion flax peroxidase. *Genome* 37, 137–147.
- Pergent, G., Pergent-Martini, C., 1999. Mercury fluxes in *Posidonia oceanica* meadows. *Environ. Pollut.* 106, 33–37.
- Pergent-Martini, C., 1998. *Posidonia oceanica*: a biological indicator of past and present mercury contamination in the Mediterranean sea. *Mar. Environ. Res.* 45, 101–111.
- Pirc, H., 1985. Growth dynamics in *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Mar. Ecol.* 6, 141–145.
- Razem, F.A., Bernards, M.A., 2003. Hydrogen peroxide is required for poly(phenolic) domains formation during wound induced suberization. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1009–1015.
- Robinson, N.J., Tommey, A.M., Kuske, C., Jackson, P.J., 1993. Plant metallothioneins. *Biochem. J.* 295, 1–10.
- Robinson, N.J., Wilson, J.R., Turner, J.S., 1996. Expression of the type 2 metallothionein-like gene MT2 from *Arabidopsis thaliana* in Zn²⁺-metallothionein-deficient *Synechococcus* PCC7942: putative role for MT2 in Zn²⁺ metabolism. *Plant Mol. Biol.* 30, 1169–1179.
- Ros-Barcelo, A., 1998. The generation of H₂O₂ in the xylem of *Zinnia elegans* is mediated by an NADPH-oxidase-like enzyme. *Planta* 207, 207–216.
- Rucker, W., Maier, R., 1992. Stress effects on hormonal growth factors in tobacco tissue indicated by special changes in the isoelectric peroxidase pattern. *Electrophoresis* 13, 789–799.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463–5467.
- Tranchina, L., Brai, M., D'Agostino, F., Bartolotta, A., Rizzo, A., 2005. Trace metals in *Posidonia oceanica* seagrass from south-eastern Sicily. *Chem. Ecol.* 21 (2), 109–118.
- White, C.N., Rivin, C.J., 1995. Characterization and expression of a cDNA encoding a seed-specific metallothionein in maize. *Plant Physiol.* 108, 831–832.
- Yu, L.H., Umeda, M., Liu, J.Y., Zhao, N.M., Uchimiya, H., 1998. A novel MT gene of rice plants is strongly expressed in the node portion of the stem. *Gene* 206, 29–35.
- Zhou, J., Goldsbrough, P.B., 1994. Functional homologs of animal and fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6, 875–884.
- Zhou, J., Goldsbrough, P.B., 1995. Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. *Mol. Gen. Genet.* 248, 318–328.
- Zhou, G.K., Xu, Y.F., Liu, J.Y., 2005. Characterization of a rice class II metallothionein gene: tissue expression pattern and induction in response to abiotic factors. *J. Plant Physiol.* 162, 686–696.
- Zimeri, A.M., Dhanker, O.P., McCaig, B., Meagher, R.B., 2005. The plant MT1 metallothioneins are stabilized by cadmium and are required for cadmium tolerance and accumulation. *Plant Mol. Biol.* 58, 839–855.

2.2.2 *Pomt2b* è coinvolta nella risposta da stress da Cadmio

Limitatamente a *Pomt2b* abbiamo investigato il suo coinvolgimento nella risposta a stress da Cadmio in piante allevate in acquario e valutato la variazione nel *pattern* di espressione del gene. Dopo acclimatamento delle piante in acquario per 7 giorni i campioni sono stati esposti per 3 giorni a 10 μ M CdCl₂. Le analisi Northern condotte dall'Università di Pisa hanno mostrato un aumento del messaggero di *Pomt2b* (Fig. 1).

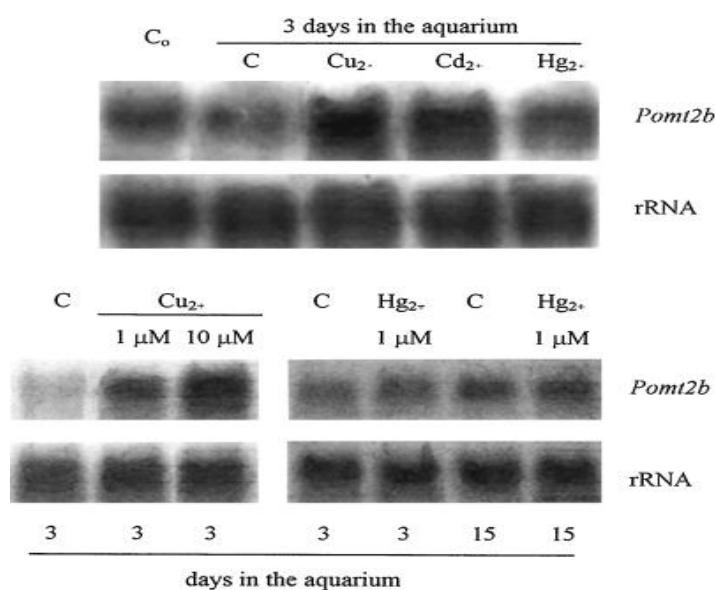


Fig. 1. Analisi northern in acquario di controllo ed in presenza di metalli pesanti .

Anche negli esperimenti di ibridazione *in situ*, nei limiti della tecnica, si è riscontrato un aumento generalizzato del segnale che si estende fino alla parte apicale del SAM pur rispettando sostanzialmente il pattern riscontrato nei campioni non trattati (Fig. 2). In particolare si ha un aumento spaziale e quantitativo dei domini di espressione di *Pomt2b* nei campioni sottoposti a stress da Cd vs i campioni di controllo (Fig. 2 A, C, D vs B). Più in dettaglio la localizzazione *in situ* del trascritto di *Pomt2b* in sezioni longitudinali di apice meristematico esposto al cadmio (Fig. 2A) mostra come il dominio di espressione di *Pomt2b* aumenta rispetto agli apici non esposti (Fig. 2B). Per quanto riguarda la foglia il segnale è presente in tutte le

componenti del mesofillo di foglie trattate con Cd (Fig. 2 C) mentre nella parte apicale il segnale tende a intensificarsi soprattutto nei tessuti vascolari (Fig. 2 D). Gli esperimenti di controllo effettuati con sonda senso marcata con digossigenina risultano privi di segnale (Fig. 2 E,F).

Questi risultati confermano quindi il ruolo primario del Cadmio nell'attivare la sintesi di peptidi di detossificazione da metalli pesanti (Sanità Di Toppi et al., 1999; Clemens et al., 1999; Hall et al., 2002) e, conseguentemente, nell'aumento dell'espressione di geni per essi codificanti. Da sottolineare che l'aumento del trascritto di *Pomt2b* riscontrato a livello del domo apicale, dominio istologico ad intensa attività di divisione cellulare, è con tutta probabilità correlabile ad un'attività di difesa e/o omeostasi dei metalli pesanti anche propriamente legate alla regolazione del ciclo cellulare (Palmiter, 1998; Haq et al., 2003).

In ultimo la presenza marcata del segnale nei fasci vascolari lascia ipotizzare una funzione del tessuto vascolare nella traslocazione del messaggero e/o della proteina nei diversi distretti della pianta (Ruiz-Medrano et al., 2001); d'altra parte la costante presenza di *Pomt2b* a livello dei fasci vascolari (ben circoscritta nella parte apicale della foglia) indica ancora una volta una correlazione tra cellule lignificate ed espressione di geni per le metallotioneine, come riportato in letteratura (Guo et al., 2003; Nakazono et al., 2003; Mir et al. 2004) e/o in tessuti soggetti a stress ossidativi come quelli provocati dai metalli pesanti (Ros-Barcelo, 1998; Razem and Bernards, 2003).

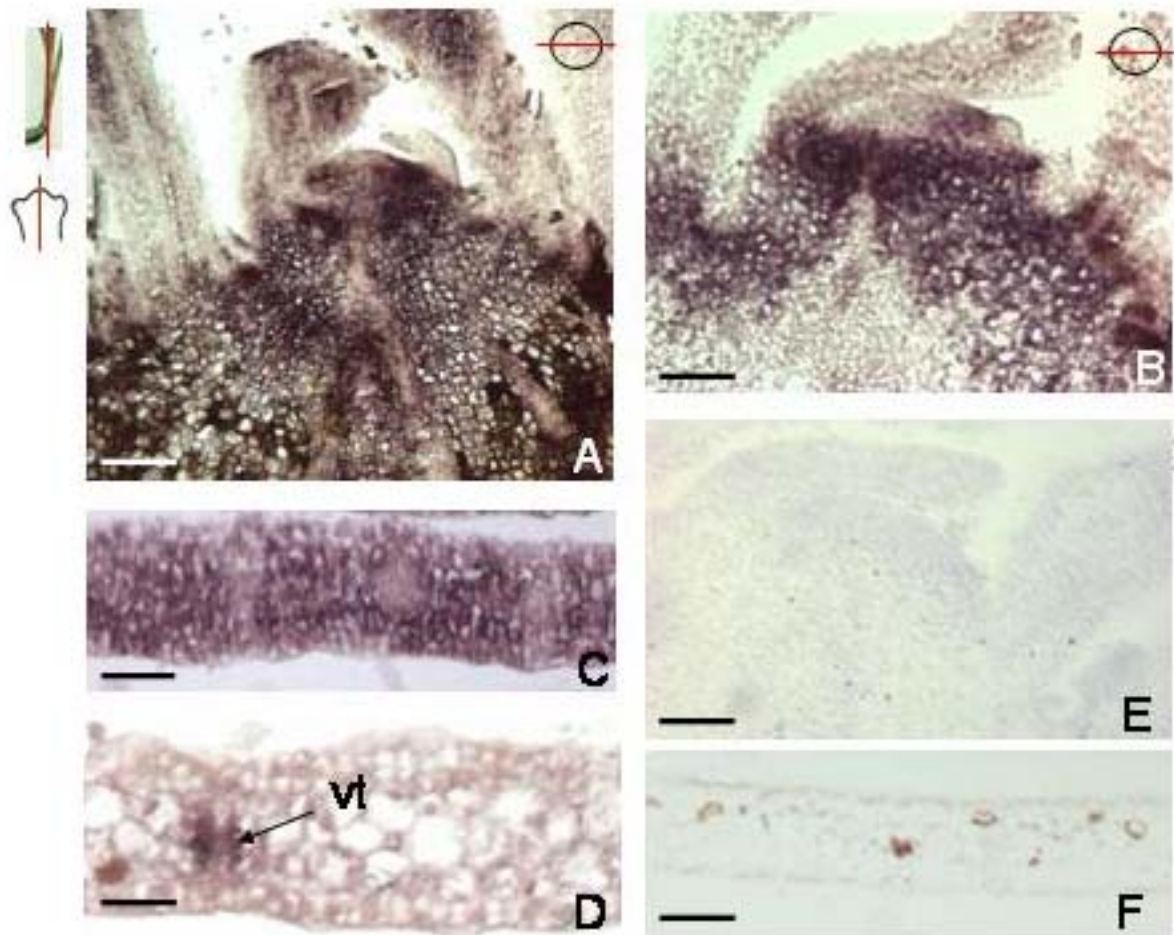


Figura 2. Pattern di espressione di *Pomt2b* in *P. oceanica* esposta a CdCl_2 $10\mu\text{M}$. Localizzazione in situ del trascritto di *Pomt2b* in sezioni longitudinali di apice meristemático esposto(A) e non esposto al cadmio(B). nella sezione esposta(A) il dominio di espressione di *Pomt2b* aumenta rispetto agli apici non esposti(B). (C) Il segnale è presente in tutte le componenti del mesofillo di foglie trattate; (D) nella parte apicale di foglie esposte il segnale si localizza nei tessuti vascolari. Gli esperimenti di controllo effettuati con sonda senso marcata con digossigenina risultano privi di marcatura(E,F). vt, fasci vascolari. Dimensioni delle barre: (A,F) $100\mu\text{m}$; (B) $80\mu\text{m}$; (C, E), $70\mu\text{m}$; (D) $40\mu\text{m}$.

3. SISTEMI VEGETALI E BILANCIO IDRICO

E' del tutto ovvio come l'acqua sia indispensabile per ogni organismo vivente. Essa, oltre ad essere indispensabile per reazioni metaboliche, e quindi per i molteplici aspetti della fisiologia di un vegetale, è la molecola più abbondante nei tessuti viventi.

Durante il loro ciclo vitale le piante costantemente assorbono e perdono acqua. L'assorbimento, almeno per le piante viventi sulle terre emerse, avviene essenzialmente attraverso le radici mentre la perdita si compie in larga parte per mezzo delle aperture stomatiche delle foglie tramite eventi di traspirazione.

In *Posidonia oceanica*, in quanto pianta marina, si assiste ad una diversa regolazione del bilancio idrico che avviene per mezzo delle foglie mentre le radici hanno funzioni quasi esclusivamente di adesione al substrato (Tomlison, 1980). Il trasporto a lunga distanza dell'acqua avviene per mezzo dei tessuti vascolari dove la resistenza di barriere quali le membrane è, di solito, assente. Al contrario, il trasporto a breve distanza e quello cellula/cellula coinvolge i sistemi membranosi. Infatti il trasporto trans-membrana avviene per diffusione attraverso il bilayer lipidico ed attraverso canali proteici per l'acqua: le acquaporine (Johansson et al., 2000).

Molti eventi fisiologici delle piante, quali ad esempio il differenziamento e l'accrescimento cellulare oppure i movimenti stomatici, hanno bisogno di relativamente abbondanti e/o rapidi flussi di acqua che spesso la sola diffusione attraverso la membrana non è in grado di assicurare. Un pronto e veloce flusso trans-membrana è invece possibile grazie all'azione delle acquaporine (AQPs) (Shapiguzov, 2004).

Tuttavia anche la deidratazione è un normale evento del ciclo biologico di molte piante essendo fondamentale durante i processi di maturazione del seme. Questa

perdita di acqua avviene attraverso l'espressione programmata di specifici geni e l'azione del fitormone acido abscissico (ABA) svolge un ruolo molto importante nel regolare questo processo. Geni importantissimi nelle fasi di sviluppo embrionale e di risposta a stress idrici codificano per una precisa classe di proteine dette deidrine.

3.1 Le Acquaporine: struttura e sistematica

Le acquaporine giocano un ruolo cruciale nel regolare quantità e flusso di acqua attraverso le membrane. La loro importanza risulta ancora più evidente per le piante in generale (in quanto organismi sessili) e per le piante marine in particolare vista l'ambiente salino in cui vivono che pone problemi di regolazione di osmolarità.

Le acquaporine appartengono alla superfamiglia delle Proteine Intrinseche di Membrana (MIPs) (Luu and Maurel, 2005). Sono rappresentate da piccole proteine integrali di membrana che facilitano il trasporto di piccole molecole come l'acqua ed il glicerolo ma anche di alcuni gas come CO₂ (Uehlein et al. 2003).

La prima acquaporina fu isolata da eritrociti di mammifero e chiamata CHIP28 (channel-like integral protein of 28 kD) (Denker et al., 1988) senza che però vi fosse ancora piena consapevolezza di struttura e funzioni di queste proteine. Ulteriori studi dimostrarono l'esistenza di numerose proteine omologhe in diversi organismi (Johnson et al., 1991), vegetali compresi, oltre a provare definitivamente la loro attività nei meccanismi di trasporto.

Venne così adottato il termine "acquaporine" per queste proteine ed il polipeptide CHIP28 fu rinominato Aqp1, diventando ad oggi l'acquaporina più studiata (Sui et al., 2000) per via di molte caratteristiche in comune con le altre acquaporine .

Tipicamente presentano una struttura molto conservata di sei domini trans-membrana uniti tra loro da tre *loops* extra-citosolici e da due citosolici. Le zone ammino- e carbossi-terminali si rinvengono entrambe a contatto con il citosol (Shapiguzov et

al., 2004). Il secondo ed il quinto *loop* contengono due piccoli domini contenenti ognuno un box aminoacidico altamente conservato, a parte poche eccezioni (Chaumont et al., 2001), dalla tipica struttura Asn-Pro-Ala e detto NPA box. I due *boxes* ed i *loops* di appartenenza penetrano la membrana dai due lati contribuendo in larga parte a creare il canale per l'acqua (Fig. 1).

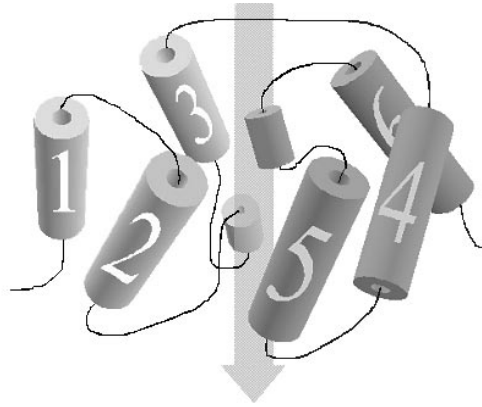


Fig. 1. Diagramma della struttura terziaria di acquaporina. I sei domini transmembrana sono numerati. I due corti domini contenenti i boxes NPA contribuiscono a creare il "canale" indicato dalla freccia. (da "Shapiguzov et al., 2004")

La struttura appena descritta è da ritenersi un monomero facente parte di un tetramero che costituisce l'acquaporina nella sua interezza e dove ogni monomero costituisce un canale indipendente per l'acqua (Luu & Maurel, 2005). Questo riarrangiamento sembra conferire maggiore funzionalità e stabilità alla proteina.

I domini proteici del canale generalmente concorrono a costruire una forma molto tipica fatta da due zone ad "imbuto", una esterna ed una citoplasmatica, connesse tra loro da un lungo e stretto poro. Le superfici delle aperture sono costituite da amminoacidi polari e quella esterna presenta una zona di connessione con il poro molto stretta con funzioni di filtro sterico (Shapiguzov et al., 2004) mentre la stessa zona, oltre ad essere meno idrofilica (Jensen et al., 2001), risulta più larga nelle acquaporine specifiche per il glicerolo (Thomas et al., 2002).

Le acquaporine attualmente possono essere considerate ubiquitarie negli organismi viventi. In *Arabidopsis* sono stati identificati circa 35 geni codificanti per AQP (Kaldhenoff and Fischer, 2006a).

Dal punto di vista della classificazione vi sono opinioni divergenti a causa dei diversi approcci utilizzati nel classificare le acquaporine.

Tuttavia tali criteri non possono prescindere dalla struttura e dai siti di espressione (Heyman et al., 1999; Zardoya et al., 2001).

Ciò premesso, molti studiosi concordano nell'identificare quattro tipologie di acquaporine nelle piante (Baiges et al., 2002; Luu and Maurel, 2005).

Le TIPs (proteine intrinseche del tonoplasto), agendo a livello del vacuolo, svolgono un ruolo fondamentale nel mantenere livelli adeguati di turgore cellulare e, di conseguenza, di potenziale idrico della cellula (Johansson et al., 2000). Ciò è suffragato dal fatto che la membrana tonoplastica risulta molto più permeabile della membrana plasmatica, suggerendo una diversa presenza in tipologia e numero di canali per l'acqua quali le aquaporine.

Le PIPs (proteine intrinseche della membrana plasmatica) agiscono principalmente a livello della membrana plasmatica anche se sono state riscontrate anche in altri siti. Rappresentano la tipologia con il più alto numero di componenti (Kaldhenoff and Fischer, 2006b) e sono caratterizzate da un alta variabilità dei domini terminali (Shapiguzov et al., 2004).

Infatti, in base alla lunghezza delle zone N- e C- terminali ed alla loro permeabilità all'acqua, vengono suddivise in due ulteriori *clusters*: PIP1 e PIP2. Il gruppo PIP1 presenta un'estremità N-terminale più lunga (Martre et al., 2002) e, generalmente, un tasso di permeabilità più basso rispetto alle acquaporine PIP2 (Weig et al. 1997, Johansson et al. 1998).

Al contrario, le proteine del *cluster* PIP2 presentano un'estremità C-terminale più lunga ed otto residui amminoacidici addizionali nel primo *loop* extracitosolico (Kaldhenoff and Fischer, 2006b).

Le NIPs (proteine intrinseche Noduline-26-like) sono presenti quasi esclusivamente nelle membrane dei noduli radicali di piante azoto-fissatrici. Infatti è ampiamente documentato come siano coinvolte nel trasferimento dei metaboliti tra la cellula vegetale ed il batterio simbiote in soia (Rivers et al., 1997). Tale funzione di *transfer* è supportata dal fatto che le NIPs presentino una diversa selettività rispetto alle altre tipologie essendo permeabili anche al glicerolo (Wallace et al., 2002).

Le SIPs (piccole proteine intrinseche basiche) sono state isolate in *Arabidopsis* ma la loro funzione e localizzazione non è ancora ben definita (Johanson and Gustavsson, 2002; Shapiguzov et al., 2004). Sono proteine molto basiche e presentano le regioni citosoliche N-terminali molto più corte rispetto alle altre MIPs (Kaldhenoff and Fischer, 2006b).

Ovviamente le acquaporine più abbondanti ed importanti appartengono alle PIPS ed alle TIPs.

3.2 Risultati

Pattern di espressione di *PoPIP1;1* e *PoTIP1;1*: due putative acquaporine in *Posidonia oceanica*

Nell'intento di chiarire i meccanismi molecolari coinvolti nella regolazione del bilancio idrico in *P. oceanica*, abbiamo localizzato, in diversi organi della pianta, la presenza di due messaggeri codificanti per due diverse acquaporine, rispettivamente *PoPIP1;1* e *PoTIP1;1* appartenenti rispettivamente alle PIPs ed alle TIPs. I *probes* usati sono stati forniti dal gruppo di ricerca del prof. Cavallini di Pisa che ha isolato i due geni (Maestrini et al., 2004). Le sequenze di *PoPIP1;1* e *PoTIP1;1* risultano lunghe rispettivamente 1548 bp e 1212 bp e analisi Southern hanno dimostrato che entrambi i geni sono a singola copia.

Analisi northern avevano dimostrato cambiamenti nella quantità del messaggero in piante di *P. oceanica* sottoposte a stress salino (Fig. 2, da Maestrini et al., 2004), come evidenziato anche da altri dati in letteratura (Maurel et al., 2002).

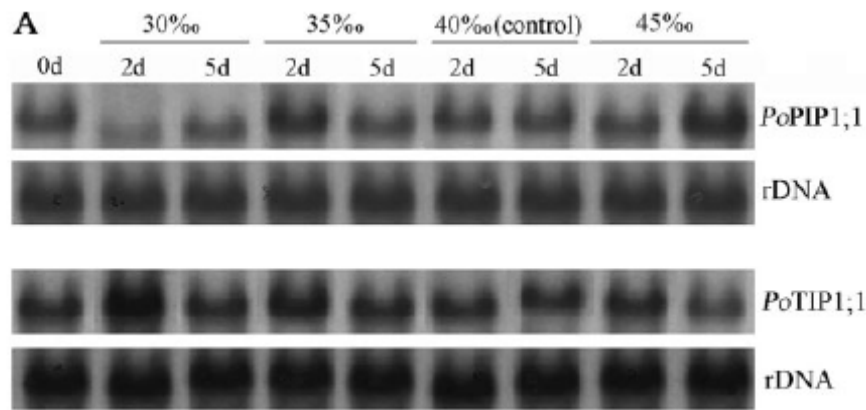


Fig. 2. Analisi northern del trascritto nella parte basale della foglia di *P. oceanica* a diversi tempi e condizioni di salinità (da “Maestrini et al., 2004).

Anche per la localizzazione *in situ* alcuni individui sono stati sottoposti in acquario a stress salino con un acqua di mare avente una salinità pari a 45‰ al fine di evidenziare eventuali cambiamenti nella localizzazione del trascritto.

Gli esperimenti condotti senza alterazioni saline mostrano che *PoPIP1;1* è generalmente più espressa nell’apice rispetto *PoTIP1;1* (Fig. 3 A, B, C, D). Tuttavia la presenza di messaggero di entrambe le AQP’s nei tessuti in divisione lascia ipotizzare un ruolo nel mantenimento del giusto equilibrio idrico in tessuti così cruciali per la pianta con un ruolo maggiore per *PoPIP1;1* dovuto forse alla natura relativamente indifferenziata delle cellule meristematiche e, di conseguenza, a tonoplasti ancora poco sviluppati. Inoltre il segnale di ibridazione è anche riscontrabile nei tessuti in differenziazione e distensione sempre a livello degli apici meristematici, lasciando così ipotizzare un ruolo delle acquaporine anche in quei periodi fisiologicamente determinanti che seguono la divisione cellulare (Maurel et al., 2002). La netta marcatura nelle foglie (Fig. 4 A, B, C, D, E, F) è in accordo con quanto presente in letteratura che vede nella foglia l’organo di elezione nel mantenimento del giusto *status* idrico nella pianta. La reattività in particolare degli strati epidermici conferma ulteriormente le molteplici funzioni di questo tessuto nelle piante marine quale principale interfaccia tra pianta-ambiente esterno. Infatti nelle fanerogame marine le radici hanno una funzione essenzialmente di ancoraggio

mentre la foglia assume ruoli supplementari rispetto alle piante terrestri (Tomlinson, 1980).

Tuttavia nelle radici riscontriamo marcatura per entrambe le acquaporine con *patterns* praticamente sovrapponibili che vedono il segnale presente a livello meristemico (Fig. 5 A, B), dei fasci vascolari (Fig 5 C, D) ed in alcune cellule della caliptra (Fig 5 E, F). Ovviamente, alla luce di quanto presente in letteratura, la presenza di messaggero negli organi radicali non è da collegare ad una funzione di rifornimento idrico per la pianta ma al fatto che le due acquaporine abbiano sicuramente un'importante funzione nel trasporto dell'acqua (Maestrini et al., 2004) e nel mantenimento del giusto bilancio idrico in tutti i distretti della pianta, radici incluse. Si spiega così anche la reattività, in particolare dei fasci vascolari, dei rizomi (Fig. 6 A, B, C, D) confermando un'espressione costitutiva dei messaggeri.

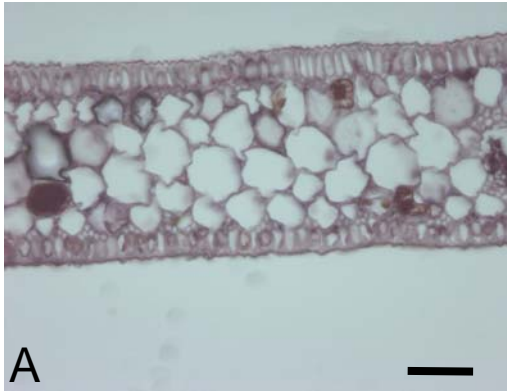
Lo stress salino dovuto ad acclimatamento per due giorni ad una salinità del 45% induce un aumento significativo del messaggero soprattutto nelle foglie (Fig. A, B, C, D) ed interessa tutte le tipologie cellulari ed in particolare, ancora una volta, le cellule epidermiche ed i fasci vascolari ossia strutture fondamentali per una pianta marina nella risposta precoce a variazioni di salinità al fine di ristabilire un corretto equilibrio idrico in condizioni stressanti ed osmoticamente alterate.

Inoltre la marcatura molto debole, sempre sotto stress salino, nei tessuti in divisione per entrambe le acquaporine lascia presupporre una minore esposizione di queste zone allo stress salino rispetto a tessuti in differenziazione e distensione visto anche che il segnale per *PoPIP1;1* risulta confinato nelle regioni laterali del meristema (Fig. 7 A) mentre *PoTIP1;1* risulta generalmente poco espresso (Fig. 7 B) considerata, come già detto, l'immatùrità del sistema vacuolare a questi stadi di sviluppo cellulare. A conferma del ruolo predominante della foglia nel mantenimento dell'omeostasi idrica è anche il segnale del tutto basale sia per *PoPIP1;1* che per *PoTIP1;1* nei rizomi in condizioni di stress salino (Fig. 7 C, D).

Possiamo quindi dedurre che nei momenti di alterazione salina positiva il livello di espressione delle due acquaporine si abbassi in maniera "polare" negli organi non

direttamente coinvolti nella risposta a questa tipologia di stress per localizzarsi nella foglia che rappresenta il sito di elezione in *P. oceanica* per i fenomeni di scambio e diffusione. La presenza costante del trascritto nei fasci vascolari in ogni tipologia di condizione ci lascia concludere che i tessuti di conduzione svolgano un'importantissima funzione di trasporto del messaggero e di comunicazione (Ruiz-Medrano et al., 2001) circa l'equilibrio idrico nei vari distretti morfo-funzionali di *Posidonia*.

PoPIP1;1



PoTIP1;1

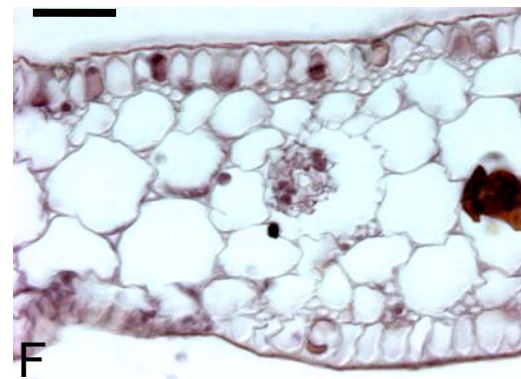
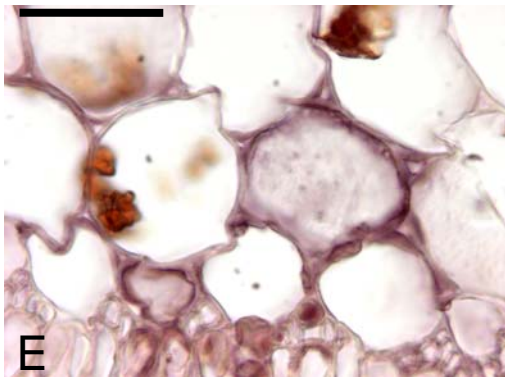
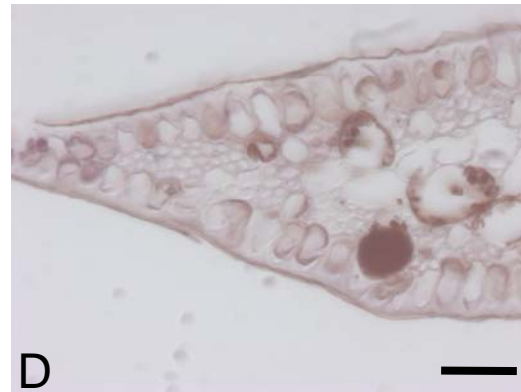


Fig. 4. Ibridazioni *in situ* su foglie di *P. oceanica* con sonde specifiche per le acquaporine *PoPIP1;1* (A, C, E) e *PoTIP1;1* (B,D,F). Dimensioni barra: 50 μ m;

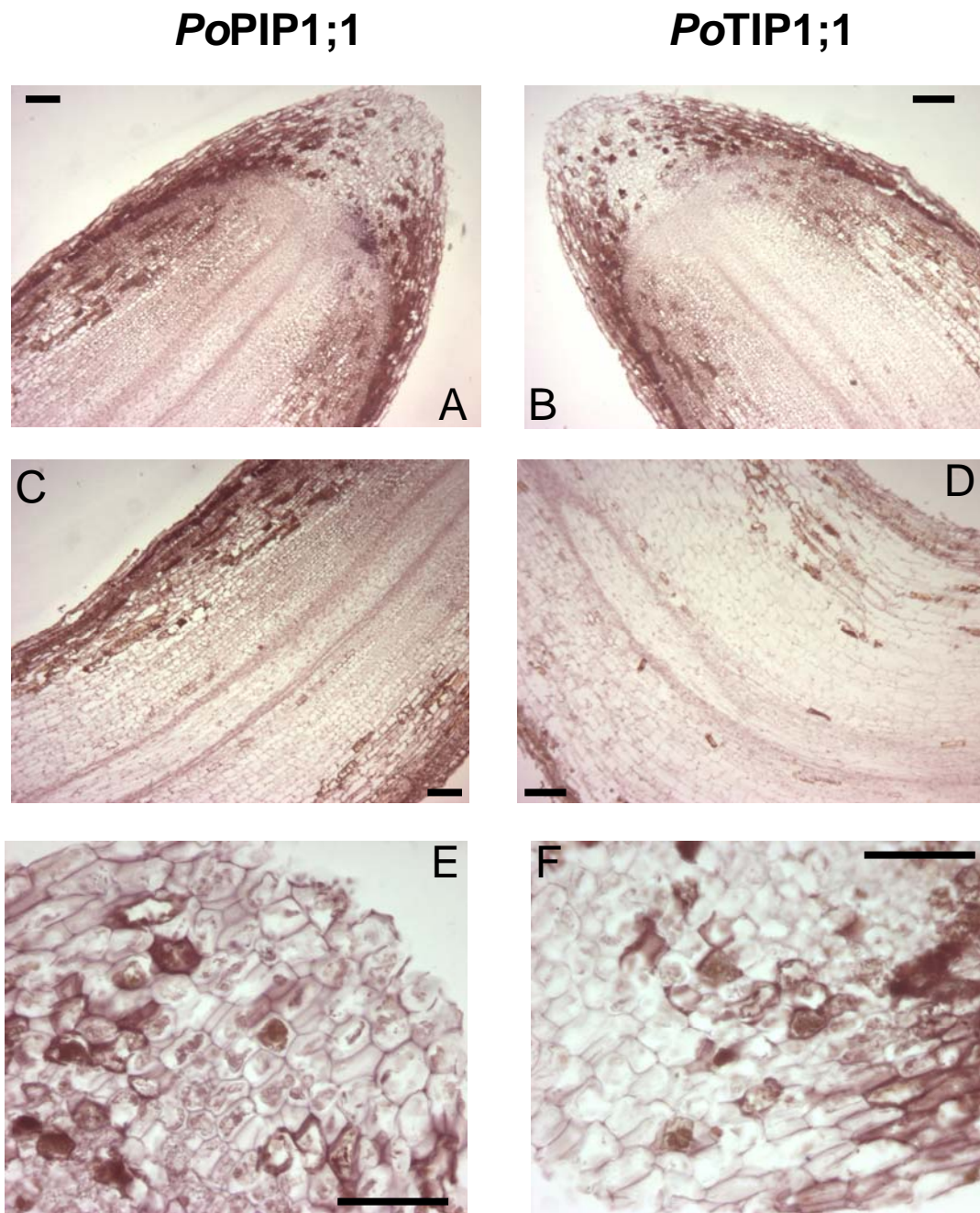
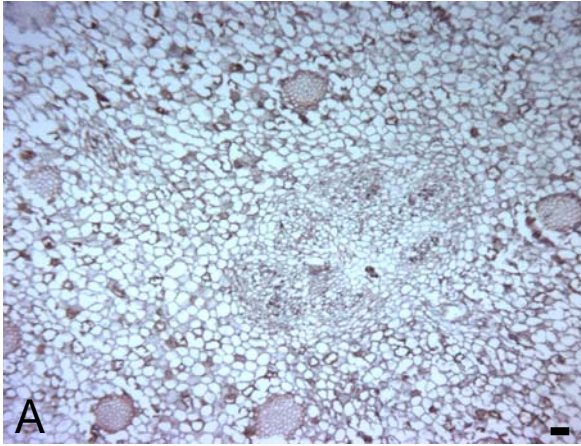


Fig. 5. Ibridazioni *in situ* su radici di *P. oceanica* con sonde specifiche per le acquaporine *PoPIP1;1* (A, C, E) e *PoTIP1;1* (B,D,F). Dimensioni barra: 50 μ m;

PoPIP1;1



PoTIP1;1

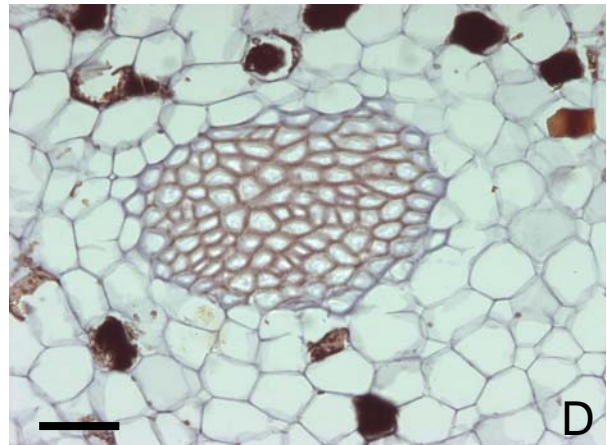
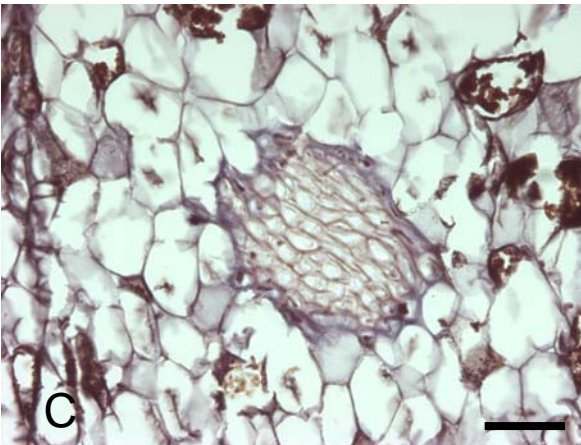
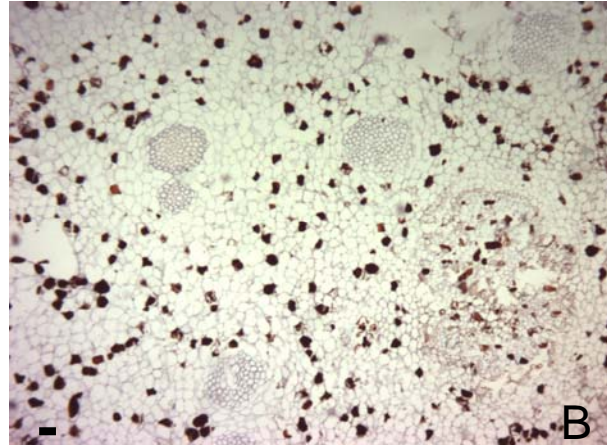


Fig. 6. Ibridazioni *in situ* su rizomi di *P. oceanica* con sonde specifiche per le acquaporine *PoPIP1;1* (A, C) e *PoTIP1;1* (B,D). Dimensioni barra: 50 μ m;

PoPIP1;1

PoTIP1;1

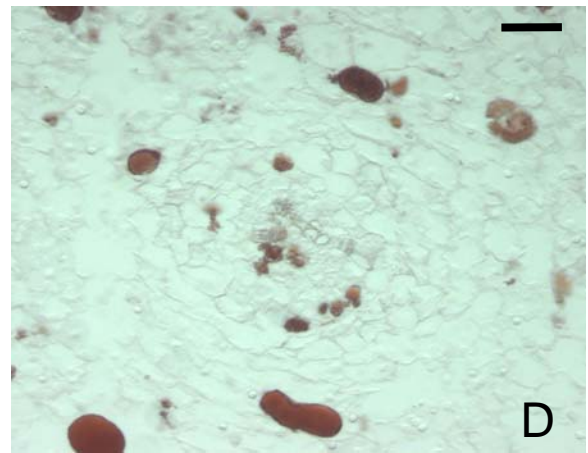
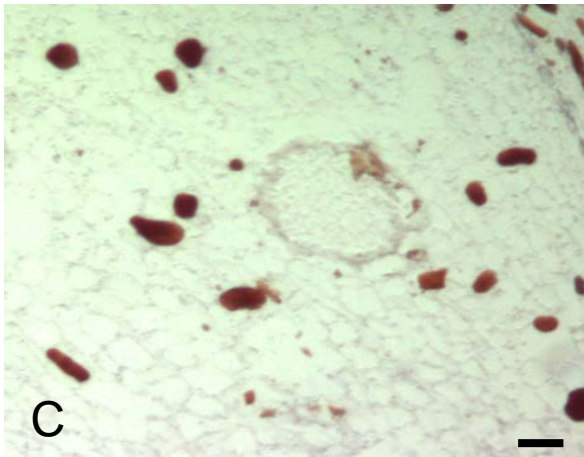
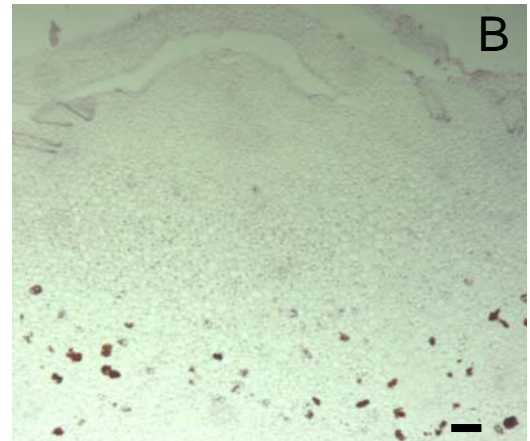
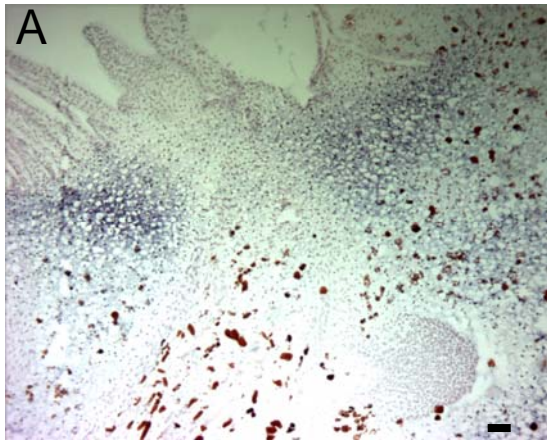


Fig. 7. Ibridazioni *in situ* su apici e rizomi di *P. oceanica* acclimatata per 2gg in acqua con salinità al 45‰ con sonde specifiche per le acquaporine *PoPIP1;1* (A, C) e *PoTIP1;1* (B,D). Dimensioni barra: 50 μ m;

PoPIP1;1

PoTIP1;1

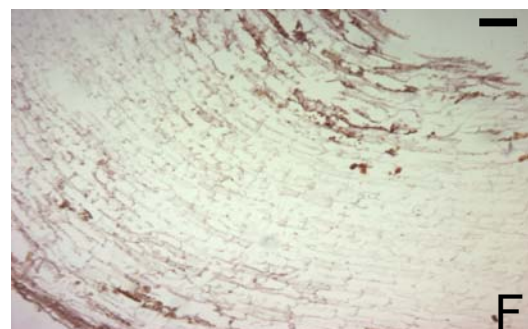
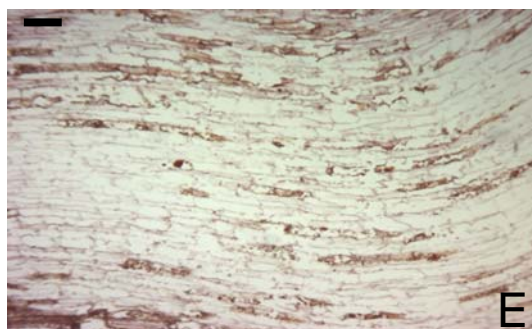
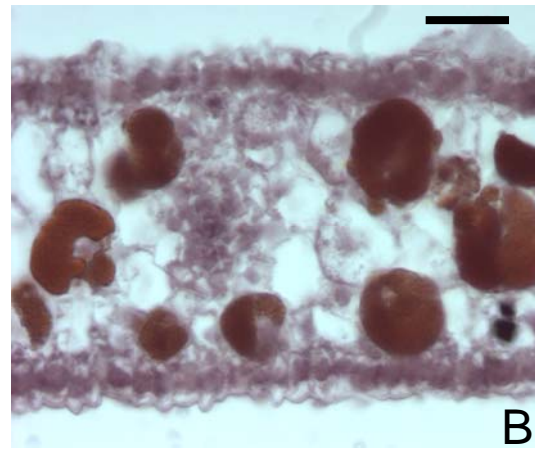


Fig. 8. Ibridazioni *in situ* foglie di *P.oceanica* acclimatata per 2gg in acqua con salinità al 45‰ con sonde specifiche per le acquaporine *PoPIP1;1* (A, C) e *PoTIP1;1* (B,D). Gli esperimenti di controllo con sonde-senso mostrano assenza di marcatura per entrambe le sonde (E, F). Dimensioni barra: 50 μ m;

3.3 Deidrine: struttura e funzione

E' ormai da tempo noto che l'intensità dello sviluppo e della crescita delle piante è strettamente dipendente dalla loro disponibilità idrica. Risulta del tutto ovvio l'interesse verso le reazioni dei sistemi vegetali verso rilevanti variazioni del proprio equilibrio idrico sia in termini di espressione genica che, di conseguenza, di risposta proteica.

Studi in tal senso avevano riscontrato una popolazione di proteine durante gli stadi finali dell'embriogenesi. Queste proteine, chiamate LEA (late embryogenesis abundant), venivano isolate nei tessuti embrionali che nel contempo mostravano un certo contenuto di ABA endogeno che di norma aumenta durante la maturazione dei semi.

Proprio la sintesi intensiva e l'accumulo di proteine LEA nei semi negli stadi di deidratazione suggerì il coinvolgimento di queste proteine nelle risposte tese al mantenimento delle strutture embrionali in condizioni di deficit idrico (Dure et al., 1989). In effetti la sintesi di proteine LEA non risulta solo confinata agli stadi embrionali ma segue ad ogni stimolo ambientale che può causare disidratazione come siccità, basse temperature e salinità (Zhu et al. 2000).

Un sottogruppo di proteine LEA è risultato particolarmente attivo e facilmente indotto dalla scarsa disponibilità idrica: le deidrine, conosciute anche come sottogruppo LEA D11 con polipeptidi che variano da 82 a 575 residui amminoacidici (Close, 1997). Queste proteine sono ormai state identificate in molte specie di angiosperme e gimnosperme (Close, 1997) e sono accomunate da una o più copie di un dominio anfipatico ad α -elica, detto segmento K, che risulta altamente conservato sia nelle piante superiori che inferiori e forma una sequenza consenso di 15 residui nella regione C-terminale (Close, 1996).

Molte deidrine contengono anche altri domini che, diversamente distribuiti nelle varie specie, danno vita ad una complessa ed articolata classificazione di queste proteine.

Tra questi domini, molto presente risulta il cosiddetto segmento S costituito da residui di serina, suscettibile di fosforilazione (Vilardell et al. 1990), spesso associato ad una sequenza consenso nella regione N-terminale detta segmento Y (Close 1997).

Interposti tra questi tre domini, se contemporaneamente presenti, vi sono altri domini, detti segmenti Φ , meno conservati dei precedenti e caratterizzati dall'essere particolarmente ricchi in glicina ed in amminoacidi polari quali la treonina (Allugova et al., 2003).

Basandosi sulle diverse combinazioni dei principali domini, le deidrine vennero suddivise in cinque classi: Y_nSK_2 , K_n , SK_n , K_nS e $Y_2 K_n$ (Rorat, 2006). Tuttavia alcune deidrine non possono essere assegnate a nessuna delle classi citate (Close, 1996).

Abbiamo precedentemente discusso sui tipici fattori ambientali che inducono l'espressione di geni codificanti per deidrine. Studi recenti hanno confermato come alcune deidrine vengano stimulate anche dalla luce (Ohno et al. 2003), implicando anche l'azione dei fotorecettori (Crosatti et al., 1999; Tepperman et al. 2004), e, specie in *Helianthus annuus*, dal ciclo buio/luce (Cellier et al. 2000).

3.4 Risultati

3.4.1 La deidrina *HaDHNI*

Una deidrina avente i tre domini YSK ed indotta da stress idrico è stata isolata e sequenziata in *Helianthus annuus* (Ouvrard et al., 1996). L'accumulo dei trascritti di tale gene è stato correlato con condizioni di deficit idrico (Cellier et al., 1998). Di particolare interesse è il fatto che linee mutanti di girasole deficienti in ABA mostravano, dopo stress idrico, un accumulo di trascritti di *HaDHNI* (Giordani et al., 1999) e che la sintesi era modulata dal ciclo buio/luce durante lo stress idrico (Cellier et al., 2000).

Inoltre molto interessante è il fatto che cotiledoni di girasole germinati al buio in condizioni ottimali di idratazione e temperatura, dopo precisi trattamenti luminosi,

mostravano un'espressione del gene stress- indipendente ed evidentemente indotta da fotorecettori stimolati dalla luce (Tapperman et al., 2001; Tapperman et al., 2004).

Nell'ambito di uno studio più generale teso a migliorare le conoscenze circa il ruolo della radiazione luminosa nella regolazione dell'espressione di questo gene in *Helianthus annuus*, abbiamo contribuito a determinare il pattern di espressione di *HaDHNI* in cotiledoni sottoposti a diverse condizioni di irraggiamento. A tal fine abbiamo utilizzato ancora una volta la tecnica dell'ibridazione *in situ* RNA-RNA utilizzando una sonda specifica per la deidrina *HaDHNI* sintetizzata dal gruppo di ricerca del prof. Cavallini dell'Università di Pisa. Il risultato di questo studio è allegato come pubblicazione.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com
**JOURNAL OF
PLANT PHYSIOLOGY**
www.elsevier.de/jplph

Light induces expression of a dehydrin-encoding gene during seedling de-etiolation in sunflower (*Helianthus annuus* L.)

Lucia Natali^{a,*}, Tommaso Giordani^a, Bartolomeo Lercari^a,
Pierluigi Maestrini^a, Radiana Cozza^b, Tiziano Pangaro^b, Paolo Vernieri^a,
Federico Martinelli^a, Andrea Cavallini^a

^aDipartimento di Biologia delle Piante Agrarie della Università, Via Matteotti 1/B, 56124 Pisa, Italy

^bLaboratorio di Botanica, Dipartimento di Ecologia della Università, Ponte P. Bucci, Cubo 6B, Arcavacata di Rende, 87030 Cosenza, Italy

Received 14 November 2005; accepted 24 January 2006

KEYWORDS

De-etiolation;
Dehydrin;
Light;
Photoreceptors;
Transcription;
Sunflower

Summary

The effects of light quality on the expression of a sunflower dehydrin-encoding gene, *HaDhn1*, were studied during seedling de-etiolation. Seeds were germinated in the dark and, after 5 days, seedlings were maintained well watered and de-etiolated under different lights for 3, 6, 12, and 24 h. Exposure to white light stimulated *HaDhn1* transcript accumulation in the cotyledons of these seedlings, contrary to seedlings grown in the dark. *HaDhn1* transcripts increased also treating plantlets with monochromatic lights, especially red light. The increase of *HaDhn1* transcripts is provoked by the formation of the active form of phytochrome. Further experiments, performed saturating active phytochrome by yellow light, in combination or not with blue light, showed that also cryptochrome can increase *HaDhn1* transcripts accumulation after exposure to light. In situ analysis of *HaDhn1* expression domains in cotyledons of light-treated seedlings showed a hybridisation signal spread in all mesophyll cells, especially in the basal portion and in the vascular tissue. In the distal portion of the cotyledons, less intense signal was observed. Western blot analysis indicated that *HaDhn1* transcription is not followed by dehydrin-protein accumulation.

The isolated putative promoter sequence of the *HaDhn1* gene showed that different putative *cis*-elements recognisable by transcription factors occur in the isolated sequence, including a putative light-responsive G-box. On the whole, our

Abbreviations: ABA, abscisic acid; WL, white light; R, red light; B, blue light; FR, far red light; UV, UVB light; Y, yellow light

*Corresponding author. Tel.: +39 050571567; fax: +39 050576750.

E-mail address: lnatali@agr.unipi.it (L. Natali).

0176-1617/\$ - see front matter © 2006 Elsevier GmbH. All rights reserved.

doi:10.1016/j.jplph.2006.01.015

results indicate that *HaDhn1* gene expression is induced by light during de-etiolation, in absence of water stress.

© 2006 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Dehydrins are an immunologically distinct family, also known as the *Lea D11* subgroup of late-embryogenesis-abundant (*Lea*) proteins (Dure et al., 1989) and have been described and classified in many angiosperm and gymnosperm species (Close, 1997). They are characterised by several domains, including one or more putative amphipathic α -helix forming consensus regions at the C-terminus (K-domain), and, in the majority of dehydrins, a region at the N-terminus with homologies to a portion of the nucleotide binding site of chaperones of plants and bacteria (Y-domain); many dehydrins contain also a tract of serine residues, possibly phosphorylatable (S-domain; see Natali et al., 2003).

Many studies indicate that dehydrins are associated with macromolecules such as nucleoprotein complexes in the nucleus (Godoy et al., 1994) and endomembranes in the cytoplasm (Schneider et al., 1993). This suggests that these proteins are surfactants that inhibit the coagulation of a range of macromolecules and preserve their structural integrity, stabilising proteins and membranes through detergent or reverse chaperone activities (Close, 1996; Ismail et al., 1999; Hara et al., 2001). Recently, dehydrins have been demonstrated to confer freezing, drought and salt stress tolerance in *Arabidopsis* and rice (Cheng et al., 2001; Puhakainen et al., 2004) and to be implicated in metal binding (Alsheikh et al., 2005).

Dehydrins are usually produced by plants in the late stages of embryo development (Dure et al., 1989) and also following any environmental stimulus involving dehydration, such as drought or cold stress and salinity, as key components of dehydration tolerance (Close, 1996; Zhu et al., 2000). Moreover, modulation of transcripts by light has been reported for many dehydrin-encoding genes in drought- or cold-stressed plants (Chauvin et al., 1993; Crosatti et al., 1999; Panta et al., 2001; Ohno et al., 2003).

An YSK-type dehydrin cDNA, *HaDhn1*, induced by drought stress, has been isolated and sequenced in sunflower (Ouvrard et al., 1996); the accumulation of *HaDhn1* transcripts correlates with drought tolerance (Cellier et al., 1998). This gene was found to be expressed in the latest stages of

Helianthus annuus embryogenesis, depending on abscisic acid (ABA) accumulation; moreover, *HaDhn1* transcripts accumulated after drought stress even in ABA deficient sunflower mutants (Giordani et al., 1999). The expression of this gene is modulated by dark/light cycle during drought stress (Cellier et al., 2000).

With the aim to clarify mechanisms of expression regulation of this gene by light, we have analysed *HaDhn1* expression during seedling de-etiolation, which provides an ideal experimental condition to evaluate the effects of different photoreceptors on gene activity. Recent data on expression profiling during seedling de-etiolation in *Arabidopsis*, showed that, beside many transcription factors, also different stress- or defence-protein encoding genes are expressed within 24h of light exposure, due to phytochrome A activity (Tepperman et al., 2001) and many of these genes are regulated by more than one phytochrome (Tepperman et al., 2004). Activation of such genes should enable seedling to respond rapidly to different abiotic stresses by the accumulation of mRNA (even before stress events occur) with the subsequent production of protective molecules and/or proteins.

In this sense, we have analysed *HaDhn1* induction during de-etiolation and observed that light can induce the expression of this gene in absence of water stress and established the classes of photoreceptors involved in *HaDhn1* induction.

Materials and methods

Plant material and light treatments

Seeds of an inbred line of *Helianthus annuus*, HCM, were used in the experiments. Seeds were germinated at 25 °C in the dark in Petri dishes on filter paper moistened with distilled water.

Light treatments were performed in the same growth chamber, at 25 °C, and manipulations were made in the dark or under dim green safelight. After 5 days, when 4–5 cm in length, seedlings were maintained in the dark or transferred under different lights or a UV source. Red light (R) at $15.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ was obtained from Philips TL 20W/15 fluorescent tubes filtered with Roscolux

Table 1. Characteristics of the actinic light sources used

Light quality	Fluence rate ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Phytochrome photoequilibrium
WL	50	0.7
R	15	0.8
B	15	0.45
Y	150	0.9
FR	15	0.03
UVB	18	0.45
Y+B	150+15	0.9

red filter 27; far red light (FR) at $15.0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ was obtained from Sylvania VHO F40T12/232 fluorescent tubes filtered with Roscolux blue filter 83 and red filter 27; white light (WL) at $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ was obtained from Philips TL 40 W/33 RS fluorescent lamps; blue light (B) at $15.0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ was obtained from Philips TL 20 W/18 fluorescent tubes filtered with Roscolux blue filter 83; yellow light (Y) at $150.0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ was obtained from low pressure sodium lamps (SOX 130 W Philips); UVB was obtained from Philips TL 12 W/40 fluorescent tubes; standard fluence rate was $20.0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$; UVC was removed using a cut-off filter WG 280 nm (Schott, Mainz, Germany). The spectral distribution and the fluence rate of the different light sources were measured with a calibrated spectra radiometer (Licor 1800) and those of UVB source by a Macam spectra radiometer. The spectral distribution has been reported in Lercari et al. (1999). The lights used for continuous, pulse, or dichromatic irradiations, their fluence rate and the respective phytochrome photoequilibria are reported in Table 1. In other experiments, 4–5 cm long seedlings were subjected at 1-h intervals to 5-min pulses of R or B, followed or not by 5-min pulses of FR. As a control, seedlings were subjected at 1-h intervals to 5-min pulses of FR alone. With these treatments, 5-min FR reverts the active form of phytochrome (Pfr) produced by 5-min pulses of R or B light to the inactive Pf form.

During light treatments, seedlings were maintained well watered. Tissue samples (cotyledons) were detached and immediately frozen and stored in liquid nitrogen. Light treatments were replicated three times.

Tissue ABA content determination

Seedling cotyledons were weighed, immediately frozen in liquid nitrogen and extracted for 16 h at

4°C in the dark with distilled water (water:tissue ratio 50:1, v/w). Quantitative analyses of ABA were performed using a solid-phase radioimmunoassay (RIA) based on the use of DBPA1 monoclonal antibody (Vernieri et al., 1989) and (+) *cis-trans* ABA (Sigma) as a standard. Experiments to validate RIA results with sunflower crude extracts were previously shown (Pugliesi et al., 1994). Experiments were repeated six times.

RNA isolation and Northern blot analysis

For total RNA extraction, tissues were ground in liquid nitrogen with a MES-guanidine hydrochloride-containing buffer and RNA was isolated using two phenol/chloroform extractions and an acetic acid–ethanol precipitation procedure (Logemann et al., 1987).

Total RNAs (2.5, 5 or 10 μg) were separated by 1% formaldehyde agarose gel electrophoresis and blotted onto positively charged nylon membranes (Roche). The integrity and the equal amount of RNA loading were confirmed by ethidium bromide staining and subsequent densitometric image analysis.

The *HaDhn1* dehydrin cDNA was digoxigenin-labelled using the DIG RNA labelling kit SP6/T7 (Roche) and hybridisations were performed using the labelled RNA probe as described in Giordani et al. (1999). Northern blots were repeated three times. Hybridisation bands were scanned using a UVP's system 5000 equipped with a GelBase-GelBlot software for quantitative determinations: data were reported as mean (\pm SE) densitometric absorption. When hybridisation signals seemed over saturation, experiments were repeated loading reduced quantities of RNA.

In situ hybridisation

Excised cotyledons were fixed, dehydrated, embedded in paraffin and cut into $8 \mu\text{m}$ sections. The sections were deparaffined and then treated with 4% *para*-formaldehyde followed by treatment with 0.25% acetic anhydride in triethanolamine. After dehydration throughout a graded ethanol series, the sections were hybridised with digoxigenin-labelled antisense and sense *HaDhn1* RNA. A 174 bp-long cDNA clone, corresponding to the 3' extremity of the *HaDhn1* coding region, was linearised and the digoxigenin labelled RNA probe was achieved by T7-RNA polymerase driven in vitro transcription using the DIG RNA labelling kit SP6/T7 (Roche). The hybridisation was performed at 53°C for 24 h in 50% formamide, 0.3 M NaCl, 10 mM

Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM Na-phosphate, 5 mM EDTA, 2.5% dextran sulphate, 1.25 Denharts' solution and 1 mg mL⁻¹ tRNA. After hybridisation, the sections were washed in 1 × SSC two times for 5 min at room temperature; 0.2 × SSC two times for 10 min at 55 °C; 2 × SSC for 2 min at 37 °C. Then, the sections were treated with 10 μm mL⁻¹ RNase A in 2 × SSC at 37 °C for 30 min and washed in 2 × SSC. The hybridisation signals were visualised using anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugate with nitro-blue tetrazolium salt and 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate (Sigma). Slides were dried, mounted and photographed by a light microscope (Leica DM RB) equipped with Imaging analysing System PC.

Western blot analysis

Antibodies used for western blot analyses were produced in rabbits against the dehydrin K segment, consensus peptide CTGEEKGIMDKIKELPGQH (Close et al., 1993). Crude protein extracts were isolated from cotyledons of seedlings grown in the dark until 4–5 cm in length and then exposed to WL or maintained in the dark for 6 and 12 h, and from dry seeds. Soluble proteins were extracted by grinding cotyledons in a cold mortar containing ascorbic acid (1% tissue weight) and PVP (10% tissue weight) and homogenised in extraction buffer (220 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 250 mM sucrose, 1 mM PMSF, 10 mM β-mercaptoethanol). The resulting slurry was centrifuged at 12,000g for 5 min at 4 °C and supernatant was used as source of soluble proteins and stored at -20 °C (Fambrini et al., 1997).

Soluble proteins from dry seeds were extracted as in Garello et al. (2000) after tegument removal and *n*-hexan treatment to remove oil.

Total proteins from seedlings cotyledons and dry seeds were precipitated by (NH₄)₂SO₄ (80%) and solubilised in extraction buffer without sucrose.

Finally, the extracts were incubated at 80 °C for 10 min and centrifuged at 12,000g for 10 min at 4 °C. The supernatant containing heat-stable proteins was stored at -20 °C or immediately analysed by SDS-PAGE.

For SDS-PAGE analyses, 50 μg proteins from each sample were electrophoresed in 13% polyacrylamide gels as described by Laemmli (1970). After electrophoresis gels were stained with Coomassie Blue or analysed by western blot.

For immunoblot analysis, proteins were transferred electrophoretically to nitrocellulose membrane using minitransblot cells as described (Asghar

et al., 1994). After transfer, the nitrocellulose was blocked with 3% (w/v) gelatin in PBS buffer and then incubated with 'anti-dehydrin' primary antibody (Close et al., 1993). After washing, the nitrocellulose was incubated with secondary goat anti-rabbit antibody (IgG) peroxidase conjugate (Sigma). The secondary antibody was detected in PBS buffer using 4-Chloro-1-naphthol (Sigma) and hydrogen peroxide.

Isolation of upstream *HaDhn1* sequence

DNA sequence upstream to *HaDhn1* was isolated by PCR-RAGE (Cormack and Somssich, 1997) on *H. annuus* total DNA, using the 5'-RACE System kit (Life Technologies) according to the manufacturer instructions. Eight micrograms of genomic DNA were digested using the restriction enzyme *Hind*III and purified using the GlassMax DNA Isolation Spin Cartridge System (Life Technologies). About 1.5 μg of purified DNA was denatured for 3 min at 94 °C in 4 nM of dCTP and 1 × tailing buffer, then 2 μL of terminal transferase of the 5'-RACE System kit (Life Technologies) were added. Tailing reaction proceeded at 37 °C for 1 h.

First PCR amplification was performed using 5 μL of dC-tailed DNA, 1 × Thermophilic Buffer (Promega), 1.5 mM MgCl₂, 200 μM of each dNTP, 400 nM of Abridged Anchor Primer (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGIIGGGIIGGGIIG-3'), 400 nM of a primer specific to *HaDhn1* sequence and 2.5 U of Taq DNA polymerase (Promega). A second PCR amplification was performed using 1 μL of a 1:10 dilution of first PCR, 1 × Thermophilic Buffer (Promega), 1.5 mM MgCl₂, 200 μM of each dNTP, 400 nM of Abridged Universal Amplification Primer (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'), 400 nM of a nested primer designed on *HaDhn1* sequence and 2.5 U of Taq DNA polymerase (Promega). PCR reaction mixtures (50 μL) were heated to 94 °C for 2 min, then 35 cycles, each consisting of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C, 60 s at 72 °C, were used. The final step at 72 °C was extended for 7 min. 5'-RAGE *HaDhn1* specific primer was 5'-acttccagaacgatgcagaa-3'; 5'-RAGE *HaDhn1* nested primer was 5'-ctgggttggttttgaaggt-3'.

RAGE fragment was cloned into a pGEM-T Easy plasmid vector (Promega) and sequenced by the dideoxy chain termination method. Sequence has been deposited at GenBank under accession number AM051287.

Putative *cis*-acting elements for different transcription factors were determined using the PLACE programme (www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/).

Results

Seeds of sunflower were germinated in the dark and, after 5 days, the seedlings were transferred under different light quality for 3, 6, 12, and 24 h. Northern analyses were performed on RNA isolated from these seedlings (Fig. 1). Exposure to WL determined *HaDhn1* expression in the cotyledons within 3 h. Maximum transcripts accumulation was observed after 6 h WL, then the "steady-state" level of transcripts decreased, though maintaining at higher levels than in seedlings grown in the dark. Optimal water potential in seedlings was maintained during treatments (data not shown). ABA content was also determined as well in the same tissues: minimum ABA quantities, with no significant differences between light- and dark-grown seedlings were observed (data not shown).

Other experiments were performed under continuous monochromatic, red-, far red-, blue-, and UVB-light (R, FR, B, UV, respectively): northern analyses showed that the strongest responses occurred under R and B treatments (Fig. 2). Especially R treatment fully matched the *HaDhn1* transcripts accumulation pattern found under WL, indicating that phytochrome(s) activation was involved in *HaDhn1* induction. This was confirmed shown (Fig. 3) by increased mRNA production in

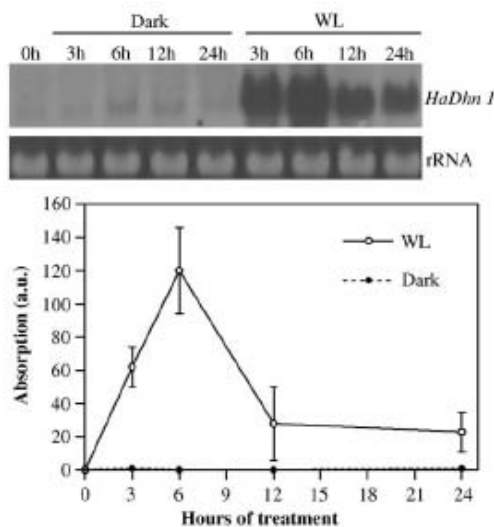


Figure 1. Northern blots of RNAs isolated from cotyledons of seedlings of sunflower cultivated, after 5 days from germination, in the dark or under continuous white-light (WL). Filters were hybridised with digoxigenin labelled *HaDhn1* probe. EtBr-stained rRNA bands are reported to show the equal loading of total RNA. Densitometric absorption of hybridisation bands are also reported (mean \pm SE of three repetitions).

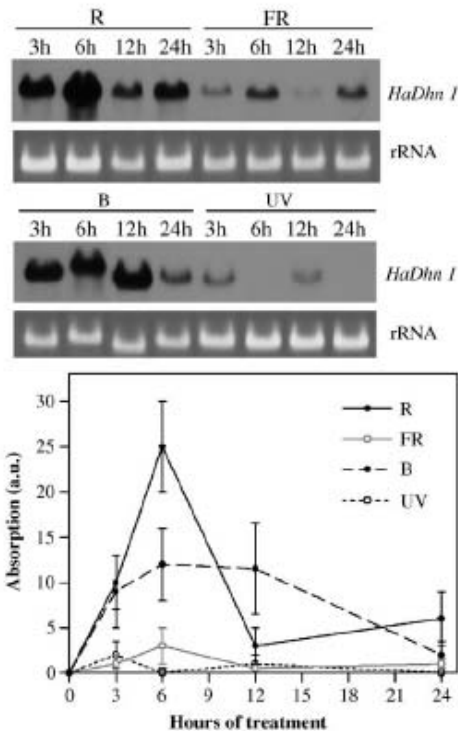


Figure 2. Northern blots of RNAs isolated from cotyledons of seedlings of sunflower cultivated, after 5 days from germination, under continuous red-, far-red-, blue-, or UVB-light (R, FR, B, UV, respectively). Filters were hybridised with digoxigenin labelled *HaDhn1* probe. EtBr-stained rRNA bands are reported to show the equal loading of total RNA. Densitometric absorption of hybridisation bands are also reported (mean \pm SE of three repetitions).

seedlings subjected to brief (5') pulses of R or B followed by 5' FR (that reverts phytochrome from its active form (Pfr) to the inactive one (Pr) (Mohr, 1972)). These reversion experiments demonstrated that the increase of *HaDhn1* transcripts is provoked by the formation of the active form of phytochrome, although reversion by FR is not complete, probably due to rapidity of transcription activation during the R or B treatments.

To establish if also cryptochrome is involved in *HaDhn1* activation beside phytochrome, experiments were performed irradiating continuously seedlings with yellow light at high intensity (Y) or Y+B light. Y is not absorbed by any blue-UV absorbing photoreceptor and, at high intensity, establishes a very high phytochrome photoequilibrium and cycling rate between P_r and P_{fr} , which is not affected by concomitant B irradiation (Thomas and Dickinson, 1979). Because the "steady-state"

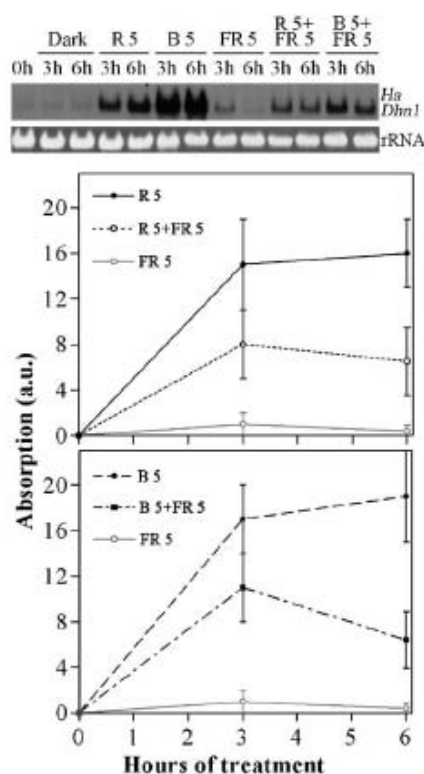


Figure 3. Northern blots of RNAs isolated from cotyledons of seedlings of sunflower cultivated, after 5 days from germination, for 6 h under different light conditions (R5: 5'R+55'Dark repeated six times; R5+FR5: 5'R+5'FR+50'Dark repeated six times; FR5: 5'FR+55'Dark repeated six times; B5: 5'B+55'Dark repeated six times; B5+FR5: 5'B+5'FR+50'Dark repeated six times). Filters were hybridised with digoxigenin labelled *HaDhn1* probe. EtBr-stained rRNA bands are reported to show the equal loading of total RNA. Densitometric absorption of hybridisation bands are also reported (mean \pm SE of three repetitions).

level of *HaDhn1* transcripts after 3 h Y+B dichromatic irradiation is slightly but significantly ($P \geq 0.01$) higher than after monochromatic Y irradiation (Fig. 4), it is presumed that this difference is due to the activation of cryptochromes, specifically activated by B and whose action seems additive to that of phytochromes.

We have also analysed the cyto-histological expression domains of *HaDhn1* in cotyledons of seedlings germinated in the dark and exposed to R or B for 6 h. In the basal portions of these organs (near the petiole region) the antisense *HaDhn1* fragment shows a hybridisation signal spread in all the mesophyll cells, although more intense staining occurs in the vascular tissue (Fig. 5a); in the distal

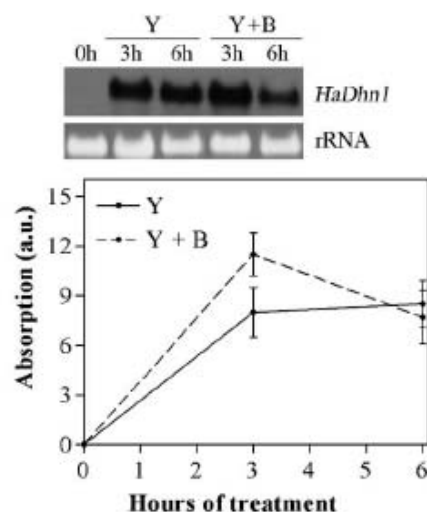


Figure 4. Northern blots of RNAs isolated from cotyledons of seedlings of sunflower cultivated, after 5 days from germination, for 6 h under continuous yellow-light (Y) added or not with blue-light (B). Filters were hybridised with digoxigenin labelled *HaDhn1* probe. EtBr-stained rRNA bands are reported to show the equal loading of total RNA. Densitometric absorption of hybridisation bands are also reported (mean \pm SE of three repetitions).

portion of the cotyledons, *HaDhn1* mRNA shows a tissue and cell type specific accumulation being localised preferentially in the parenchyma cells, overall near the chloroplasts, and within the stomata guard cells (Fig. 5b and c); *HaDhn1* mRNA is also detected in cells within and bordering the vascular tissue (Fig. 5d). A very weak signal is observed in cotyledons of seedlings grown in the dark (Fig. 5e). No signal is observed in cross section hybridised with a sense *HaDhn1* fragment (Fig. 5f).

Western blot analysis of proteins isolated from cotyledons of seedlings grown under WL or in the dark was performed using an antibody recognising the conserved alpha-helix regions of dehydrins (Close et al., 1993) to verify if *HaDhn1* RNA synthesis was followed by dehydrin-protein accumulation. As a control the antibody was used on proteins isolated from dry seeds (in which different dehydrins are usually accumulated). In dry seeds three bands were observed (Fig. 6) as already reported (Garello et al., 2000). The observed 26 kDa band is presumably the dehydrin encoded by the *HaDhn1* gene, according to its deduced molecular weight (26.6 kDa) and to preliminary experiments of *HaDhn1* expression in *E. coli* (Martinelli, unpublished). The dehydrin corresponding to the 17 kDa band was constitutive

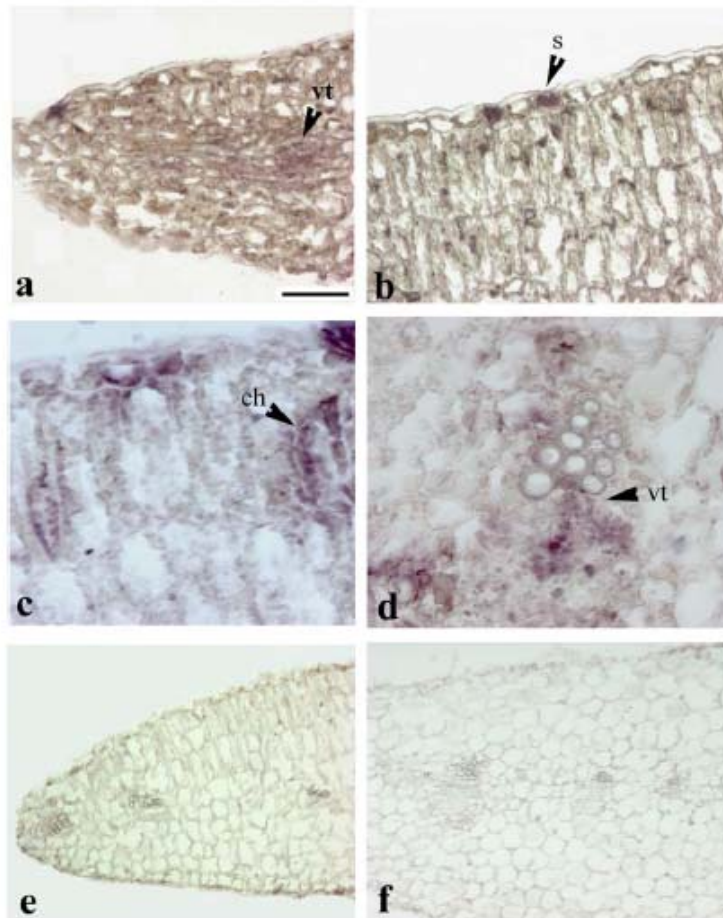


Figure 5. In situ expression pattern of *HaDhn1*. Localisation of *HaDhn1* transcript in transverse section of cotyledons exposed to R (a,b) and B (c,d). The signal of hybridisation is detectable as brown-purple colour. (a) basal portion of the cotyledon; (b, c, d) apical portion; *HaDhn1* localisation in transverse section of cotyledons grown in the dark (e); cotyledons exposed to R and hybridised with sense *HaDhn1* (f). ch, chloroplast; vt, vascular tissue; s, stomata guard cells. Size bar: (a) 100 μ m; (b) 70 μ m; (c) 33 μ m; (d) 40 μ m; (e) 125 μ m; and (f) 100 μ m.

because it was found in all samples including cotyledons from seedlings grown in the dark (which do not accumulate *HaDhn1* transcripts). Supplementary bands were not observed in cotyledons from seedlings grown under WL, at least in the experimental conditions used. This should indicate that light-induced *HaDhn1* gene expression is not followed by significant dehydrin mRNA translation.

Finally, to study possible mechanisms of induction of gene expression we isolated and studied 600 bp upstream *HaDhn1* coding region, i.e. corresponding to the putative partial promoter sequence of the *HaDhn1* gene (Fig. 7). Sequence analysis showed that different putative *cis*-elements recognisable by transcription factors occur in the isolated sequence: beside the putative TATA box

(at -76bp from the ATG codon), ABA-responsive elements (ABREs), dehydration responsive elements (DREs), MYB-related elements, E-boxes, auxin and drought-related motifs were found. Moreover, putative light-responsive elements as G-, I- GT1- and GATA-boxes, in both sense and antisense strands can be found: they can explain the induction of this gene by light. Some of these putative elements are indicated in Fig. 7.

Discussion

Our data show that *HaDhn1*, a dehydrin encoding gene of *Helianthus annuus*, is induced, at seedling

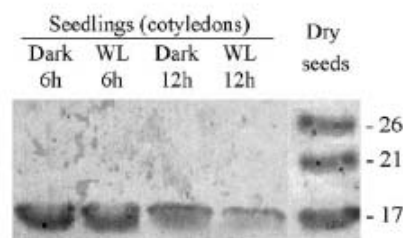


Figure 6. Western blot analysis of proteins isolated from dry seeds and from cotyledons of seedlings grown under WL or in the dark for 6 or 12h using an anti-dehydrin antibody. Molecular weights are reported in kDa.

```

-600 TGTAAACCAATATAAAAAAAAAATAAAGTTGGTAAAAACAAAATATCTG
      MYB GT1-box circadian
-550 CTCTCTACTTGATTTTACTTCTAAACAGATTTTTCAAATAGAGTTTACTTC
-500 TTACCAGATAAATATGTAAACCAATAATTTATATTTATAATTACTTTAATT
      I-box MYB auxin
-450 ATTAAGATACACTTTTAAATATTTTCCTTTTCATTTAATTGTATAGTTATGC
      GATA-box inv.GT1-box
-400 TCTTCATTCATATGSAITTAATYAGGTTTTCAAATATAAATCACAATCC
      inv.GT1-box
-350 ATTTTTAATACGAGAGATGGTCTCTTGGCCGCTACAATTACCGTCARAAA
      inv.GT1-box
-300 AAATGUYTTTAGGGTTTGTAGAAAATATCAGCCGACCTACAAGACACGGT
      GT1-box DRE G-box/ABRE
-250 GCCTCCTTTTAAATACAAATAGCATTAAATCTGGTTTGCAAAATGTACGT
      drought
-200 TCTGCCACGGTATTGATATCTCACATSCAATCCATATCTATTCCACCAG
      G-box/ABRE GATA-box E-box drought
-150 TATACCACCTTTTGATCATCTCACGGTCTCTCTATACAAACCAATTAGAATC
      drought MYB
-100 TCATCATATTCACCACACAACAATATAAAGTAACAGTGTCAAGTGT
      TATA-box
- 50 ACGTTTTGCAGOSATTSITGTACTTTTCTGAATCATTTTCGACCGAAAT
  
```

Figure 7. The 5' upstream region of *HaDhn1* gene in the inbred line HCM. Putative *cis*-acting elements for different transcription factors, as determined by the PLACE programme (www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/), are in bold and underlined. Putative-related transcription factors are specified in italics under respective sequences. Numbers on the left indicate nucleotides relative to the site of the start codon (ATG). The putative TATA box is also indicated (circadian: involved in circadian cycles; auxin: responsive to auxin; inv. GT1-box: inverted sequence of GT1-box; DRE: drought-responsive-element; ABRE: abscisic acid-responsive element; drought: responsive to drought).

stage, by R and hence by phytochrome activation in absence of drought stress (Figs. 1–3). Moreover, it appears that also B enhances the induction of this gene, indicating that also cryptochrome is involved in its regulation (Figs. 1–3). The results of the reversibility experiments, R or B pulses followed by a far red pulse, indicate that the phytochrome system is involved in the early phase of dehydrin gene induction: even a 5 min-R pulse is observed to induce the expression of *HaDhn1* gene, and this response can be reverted by far red-light application.

The unavailability of phytochrome and cryptochrome mutants in sunflower does not allow determining the specific photoreceptor(s) involved in *HaDhn1* expression. In *Arabidopsis*, in which such mutants are available, during de-etiolation R induces many stress/defence genes within 1 h from the onset of light treatment and many other are induced within 24 h de-etiolation (Tepperman et al., 2001, 2004). Moreover, many transcription factors, putatively involved in stress and light responses are induced as, for example, the bZIP protein HY5, that has a central role in recognition of G-box DNA-binding sites in target genes and is induced by Phy A (Tepperman et al., 2001); a CRT/DRE binding factor is moderately induced by Phy B (Tepperman et al., 2004). However, the majority of genes activated during de-etiolation are regulated by R through the action of more than one phytochrome (Tepperman et al., 2004).

Light induction of water stress-related genes has already been reported. For example, Crosatti et al. (1999) observed a light-dependent accumulation of both transcripts and proteins of a COR gene of barley. However, in that case, both cold treatment and light stimuli were necessary for the expression, indicating a unique regulation pathway for these two stimuli. Similarly, other dehydrin-encoding genes induced by drought- or cold-stress and modulated by light were reported in wheat (Chauvin et al., 1993; Ohno et al., 2003) and blueberry (Panta et al., 2001).

Also in sunflower adult plants, *HaDhn1* expression is affected by light in conjunction to drought stress (Cellier et al., 2000). In our experiments, light determines the dehydrin gene expression, independently from association to water stresses, only in seedlings grown in the dark. When seedlings are cultured under a 16/8 h photoperiod, no expression of *HaDhn1* gene is detectable during the light periods subsequent to de-etiolation (see Giordani et al., 1999). Hence, it can be deduced that *HaDhn1* activation by light occurs only at the first exposition of plant to light. In this sense, *HaDhn1* transcription should be considered as a preventive response to possible water deficiency conditions that might occur at the de-etiolation stage of the seedling. It is possible that during de-etiolation, special defence mechanisms are active, which will not work during subsequent life phases of the plant. Analyses of the transcription factors produced at this moment could help in clarifying such a defence mechanism.

The in situ hybridisation experiments showed that *HaDhn1* mRNA is detectable only in seedlings exposed to light and is more expressed in the basal portion of the cotyledon compared to the distal

portion, in which the signal is specifically localised in parenchyma cells, stomata guard cells, and in the vascular tissue (Fig. 5). Localisation of dehydrin transcripts and/or proteins in vascular tissues has been previously reported in stressed plants (Godoy et al., 1994; Bravo et al., 1999; Nylander et al., 2001). In *Arabidopsis*, immunolocalisation of dehydrins in vascular tissues and/or stomata guard cells was observed also in unstressed plants (Nylander et al., 2001). In situ localisation of dehydrin transcripts that we observed in absence of stress, during de-etiolation, indicates that the vascular system, the parenchyma cells, and the stomata guard cells are to be especially protected, even before stress occurs.

HaDhn1 light-induced gene expression should be related to the occurrence, in the putative promoter, of a putative G-box (CACGTGGC, Fig. 7), a motif found in the promoter region of many light-regulated genes, that was experimentally shown to be an important component in the light response (Menkens et al., 1995). Generally, promoter light-responsive sequences (LREs) have been shown to be complex elements formed by aggregates of cognate sequences for different transcription factors (Terzaghi and Cashmore, 1995), for example G-, I-, and GT1-boxes. Many distinct conserved DNA modular arrays (CMAs) associated with light-responsive promoter portions have been identified, composed of combinations of either a sequence related to the I-box core motif or its inverted version with a G- or GT1-box-related element (Martinez-Hernandez et al., 2002). In the sunflower dehydrin putative promoter, such complex sequences can be found, for example from -445 to -425, from -280 to -251, from -195 to -182 (Fig. 7). Transient transformation of sunflower cotyledons with variously modified *HaDhn1* promoters will enable to clarify this aspect. Preliminary experiments are in progress.

Western blot analyses suggest that dehydrin gene transcription is not followed by translation or dehydrin production is so reduced to be undetectable (Fig. 6). If this should be true, then the activity of this gene would be blocked at translational level, and a mechanism establishing the necessity for dehydrin translation should be postulated. The occurrence of endogenous levels of dehydrin mRNAs in the absence of the corresponding protein has been already reported by Robertson and Chandler (1992) in roots of *Pisum sativum*, in which the dehydrin gene is expressed constitutively but dehydrins are not found. Increase of dehydrin mRNAs without subsequent increase of dehydrin translation was observed in cell cultures of blueberry subjected to cold stress, suggesting that post-

transcriptional mechanisms are involved in regulation of dehydrin expression (Parmentier-Line et al., 2002).

Gene regulation can occur by establishing equilibrium between gene expression and mRNA degradation. Processes such as RNA interference or RNA silencing have been described, usually associated to genes controlling development and to viral sequences (Baulcombe, 2004; Meister and Tuschl, 2004). One can hypothesise that such processes work also for abiotic stress-related genes, blocking their translation in absence of stress. Experiments are in progress to verify this hypothesis for *HaDhn1* induction by light.

Acknowledgements

We thank Prof. Timothy J. Close (University of California-Riverside) for his generous gift of anti-dehydrin antibody. This research work was supported by University of Pisa funds.

References

- Alsheikh MK, Svensson JT, Randall SK. Phosphorylation regulated ion-binding is a property shared by the acidic subclass dehydrins. *Plant Cell Environ* 2005; 28:1114–22.
- Asghar R, Fenton RD, DeMason DA, Close TJ. Nuclear and cytoplasmic localization of maize embryo and aleurone dehydrin. *Protoplasma* 1994;177:87–94.
- Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature* 2004; 431:356–63.
- Bravo LA, Close TJ, Corcuera LJ, Guy CL. Characterization of an 80-kDa dehydrin-like protein in barley responsive to cold acclimation. *Physiol Plant* 1999; 106:177–83.
- Cellier F, Conejero G, Bretiler JC, Casse F. Molecular and physiological responses to water deficit in drought-tolerant and drought-sensitive lines of sunflower. Accumulation of dehydrin transcripts correlates with tolerance. *Plant Physiol* 1998;116:319–28.
- Cellier F, Conejero G, Casse F. Dehydrin transcript fluctuations during a day/night cycle in drought-stressed sunflower. *J Exp Bot* 2000;51:299–304.
- Chauvin LP, Oude M, Sarhan F. A leaf-specific gene stimulated by light during wheat acclimation to low temperature. *Plant Mol Biol* 1993;23:255–65.
- Cheng ZQ, Targolli J, Su J, He CK, Li F, Wu R. Transgenic approaches for generating rice tolerant of dehydration stress. In: Khush GS, Brar DS, Hardy B, editors. *Rice genetics IV*. IRRI Science Publishers; 2001. p. 423–39.
- Close TJ. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol Plant* 1996;97:795–803.

- Close TJ. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant* 1997;100:291–6.
- Close TJ, Fenton RD, Moonan F. A view of plant dehydrins using antibodies specific to the carboxy terminal peptide. *Plant Mol Biol* 1993;23:279–86.
- Cormack RS, Somssich IE. Rapid amplification of genomic ends (RAGE) as a simple method to clone flanking genomic DNA. *Gene* 1997;194:273–6.
- Crosatti C, Polverino De Laureto P, Bassi R, Cattivelli L. The interaction between cold and light controls the expression of the cold-regulated barley gene *cor14b* and the accumulation of the corresponding protein. *Plant Physiol* 1999;119:671–80.
- Dure III L, Crouch M, Harada J, Ho T-HD, Mundy J, Quatrano R, et al. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol Biol* 1989;12:475–86.
- Fambrini M, Sebastiani L, Rossi VD, Cavallini A, Pugliesi C. Genetic analysis of an electrophoretic variant for the chloroplast-associated form of Cu/Zn superoxide dismutase in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J Exp Bot* 1997;48:1143–6.
- Garello G, Barthe P, Bonelli M, Bianco-Trinchant J, Bianco J, Le Page-Degivry M-T. Abscisic acid-regulated responses of dormant and non-dormant embryos of *Helianthus annuus*: role of ABA-inducible proteins. *Plant Physiol Biochem* 2000;38:473–82.
- Giordani T, Natali L, D'Ercole A, Pugliesi C, Fambrini M, Vernieri P, et al. Expression of a dehydrin gene during embryo development and drought stress in ABA-deficient mutants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Mol Biol* 1999;39:739–48.
- Godoy JA, Lunar R, Torres-Schumann S, Moreno J, Rodrigo RM, Pintor-Toro JA. Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. *Plant Mol Biol* 1994;26:1921–34.
- Hara M, Terashima S, Kuboi T. Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. *J Plant Physiol* 2001;158:1333–9.
- Ismail AM, Hall AE, Close TJ. Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea. *Plant Physiol* 1999;120:237–44.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- Lercari B, Moscatelli S, Ghirardi E, Niceforo R, Bertram L. Photomorphogenic control of shoot regeneration from etiolated and light-grown hypocotyls of tomato. *Plant Sci* 1999;140:53–61.
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem* 1987;163:16–20.
- Martinez-Hernandez A, Lopez-Ochoa L, Arguello-Astorga G, Herrera-Estrella L. Functional properties and regulatory complexity of a minimal *RCBS* light-responsive unit activated by phytochrome, cryptochrome, and plastid signals. *Plant Physiol* 2002;128:1223–33.
- Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004;431:343–9.
- Menkens AE, Schindler U, Cashmore AR. The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends Biochem Sci* 1995;20:506–10.
- Mohr H. Lectures on photomorphogenesis. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 1972.
- Natali L, Giordani T, Cavallini A. Sequence variability of a dehydrin gene within *Helianthus annuus*. *Theor Appl Genet* 2003;106:811–8.
- Nylander M, Svensson J, Palva ET, Welin BV. Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 2001;45:263–79.
- Ohno R, Takumi S, Nakamura C. Kinetics of transcript and protein accumulation of a low-molecular weight wheat LEA D-11 dehydrin in response to low temperature. *J Plant Physiol* 2003;160:193–200.
- Ouvrard O, Cellier F, Ferrare K, Tusch D, Lamaze T, Dupuis JM, et al. Identification and expression of water stress- and abscisic acid-regulated genes in a drought-tolerant sunflower genotype. *Plant Mol Biol* 1996;31:819–29.
- Panta GR, Rieger MW, Rowland LJ. Effect of cold and drought stress on blueberry dehydrin accumulation. *J Hort Sci Biotech* 2001;76:549–56.
- Parmentier-Line CM, Panta GR, Rowland LJ. Changes in dehydrin expression associated with cold, ABA and PEG treatments in blueberry cell cultures. *Plant Sci* 2002;162:273–82.
- Pugliesi C, Fambrini M, Vernieri P, Baroncelli S. Characterization of a wilted sunflower (*Helianthus annuus* L.) mutant. I. Abscisic acid content, light-dark changes in the stomatal conductance and genetic analysis. *J Exp Bot* 1994;45:533–8.
- Puhakainen T, Hess MW, Mäkelä P, Svensson J, Heino P, Palva ET. Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 2004;54:743–53.
- Robertson M, Chandler PM. Pea dehydrins: identification, characterization and expression. *Plant Mol Biol* 1992;19:1031–44.
- Schneider K, Wells B, Schmelzer E, Salamini F, Bartels D. Desiccation leads to the rapid accumulation of both cytosolic and chloroplastic proteins in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Planta* 1993;189:120–31.
- Tepperman JM, Zhu T, Chang HS, Wang X, Quail PH. Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome a signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9437–42.
- Tepperman JM, Hudson ME, Khanna R, Zhu T, Chang SH, Wang X, et al. Expression profiling of *phyB* mutant demonstrates substantial contribution of other phytochromes to red-light-regulated gene expression during seedling de-etiolation. *Plant J* 2004;38:725–39.

- Terzaghi WB, Cashmore AR. Light-regulated transcription. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1995;46:445–74.
- Thomas B, Dickinson HG. Evidence for two photoreceptors controlling growth in de-etiolated seedlings. *Planta* 1979;146:545–50.
- Vernieri P, Perata P, Armellini D, Bugnoli M, Presentini R, Lorenzi R, et al. Solid-phase radioimmunoassay for the quantitation of abscisic acid in plant crude extracts using a new monoclonal antibody. *J Plant Physiol* 1989;134:441–6.
- Zhu B, Choi DW, Fenton R, Close TJ. Expression of the barley dehydrin multigene family and the development of freezing tolerance. *Mol Gen Genet* 2000;264:145–53.

4. SISTEMI VEGETALI E RADIAZIONE LUMINOSA

Il ruolo cruciale e fondamentale della radiazione luminosa nell'attivare e nel regolare i processi biochimici ed ecologici della biosfera è da tempo noto. Altrettanto conosciuto e studiato è il nesso inscindibile tra la luce e gli organismi fotosintetizzanti. Ecco perchè è appena il caso di richiamare gli argomenti principali alla base di questi assunti scientifici.

La relazione primaria tra luce e piante è data senza dubbio dall'esigenza trofica di queste ultime. Infatti, oltre a tutte le implicazioni che la luce ha nei processi di morfogenesi delle piante, essa fornisce loro l'energia necessaria al processo fotosintetico mediante il quale si ha l'organizzazione della CO₂. A causa dell'assorbimento da parte dell'atmosfera, solo il 55% della radiazione luminosa raggiunge la superficie terrestre nelle lunghezze d'onda PAR (radiazione fotosinteticamente attiva) (Hopkins, 1995) e quindi in forma biologicamente utilizzabile (Smith, 1994).). Ecco perché le pressioni selettive, durante il percorso evolutivo delle piante, hanno reso sempre più efficienti i processi fotobiologici ed hanno ottimizzato l'assorbimento dell'energia luminosa nelle diverse condizioni quali-quantitative di irraggiamento. Le piante hanno sviluppato pigmenti fotosintetici capaci di assorbire energia luminosa consentendone, quindi, la trasformazione in energia chimica metabolicamente spendibile. Tali pigmenti vengono essenzialmente raggruppati nelle clorofille, nei carotenoidi e nelle ficobiliproteine. L'azione dei pigmenti, quindi, è alla base della fotochimica delle piante e si colloca all'inizio di quella complessa e straordinaria serie di reazioni che la fotosintesi comprende.

Tuttavia le esigenze trofiche degli organismi vegetali (e conseguentemente di tutti i componenti della catena alimentare) non potrebbero venire soddisfatte senza

l'azione di un'enzima chiave: la Rubisco (ribulosio-1,5-difosfato carbossilasi/ossigenasi). E' proprio questo enzima a rendere biochimicamente utilizzabile il carbonio contenuto nelle molecole di CO₂ che viene organizzato nel ciclo di Calvin-Benson attraverso reazioni foto-indipendenti nella componente stromatica dei cloroplasti.

E' ovvio che disturbi dell'intensità e delle componenti spettrali della luce radiante possono assumere carattere di stress fino a causare alterazioni morfologiche e/o biochimiche dell'apparato e del processo fotosintetico. Gli effetti causati da una diminuzione dell'irraggiamento sulle piante terrestri sono da tempo studiati. Infatti tale condizione provoca una serie di modificazioni e meccanismi di adattamento all'ombra come la formazione delle cosiddette "foglie d'ombra" che, rispetto alle foglie normo-esposte, si presentano generalmente con una superficie più ampia ed hanno cloroplasti più grandi, un più elevato contenuto in clorofilla, un più basso rapporto clorofilla *a*/clorofilla *b* oltre ad un più basso punto di saturazione luminosa e di fissazione della CO₂ (Chapelle et al., 1992; Schiefthaler et al., 1999). Al contrario, le conoscenze sugli effetti fisiologici di tali modificazioni in piante marine quali le *seagrasses* sono solo da poco tempo oggetto di approfondimento .

4.1 Luce e *Posidonia oceanica*

Come già affermato in precedenza, non è ancora possibile definire con assoluta certezza se *P. oceanica* dal punto di vista fotosintetico appartenga alle piante C3 o C4 (Touchette et al., 2000). Questo principalmente per via della particolare disposizione dei cloroplasti, tipicamente negli strati cellulari epidermici, e per una morfologia del tutto particolare del mesofillo dovuta anche alla presenza di *lacunae*. Tuttavia i cloroplasti presentano le medesime caratteristiche di quelli studiati nelle piante superiori terrestri.

Più nello specifico, anche le tipologie di pigmenti fotosintetici sono sovrapponibili: clorofilla *a*, clorofilla *b* e carotenoidi quali xantofille e caroteni

(Beer et al., 1998). In effetti, se escludiamo le differenze anatomiche ed istologiche sopra citate oltre ad una diversa composizione quantitativa dei pigmenti (Falkowsky P.G. et al., 1997), la fotochimica strettamente intesa di *P. oceanica* e delle *seagrasses* non presenta sostanziali differenze rispetto a quella di una tipica pianta superiore (Kirk, 1994; Touchette et al., 2000). Meno conosciuta è invece la regolazione della risposta a stress luminosi.

Vari fattori possono infatti influenzare l'efficienza fotosintetica in *P. oceanica* e nelle piante marine in generale.

Sappiamo che le *seagrasses* risultano bene adattate a basse concentrazioni di CO₂ utilizzando ulteriori apporti di carbonio inorganico, in particolare come ione bicarbonato, attraverso meccanismi ancora non del tutto chiari (Beer, 1996; Touchette et al., 2000; Invers et al., 2001). Ciò risulta ancora più vero in *Posidonia* per via della presenza una cuticola porosa (Kuo et al., 1978) che facilita enormemente la diffusione gassosa e l'ingresso di nutrienti.

Tuttavia è la luce ad essere il fattore abiotico principale nel determinare la sopravvivenza delle *seagrasses* (Dixon, 2000). La diminuzione della radiazione luminosa lungo la colonna d'acqua è principalmente dovuta alla quantità totale di particolato sospeso, al fitoplancton, alle macroalghe ed agli organismi epifiti che possono ricoprire la superficie foliare delle *seagrasses* stesse (Hauxwell et al., 2001).

E' altrettanto risaputo che condizioni di bassa intensità luminosa fanno sì che la scarsa disponibilità di NADPH₂ e ATP, prodotti appunto nelle reazioni luce-dipendenti, diventino fattori limitanti per il normale prosieguo dell'evento fotosintetico (Kirk, 1994).

Inoltre, come precedentemente ricordato, condizioni di scarso irraggiamento possono causare una diminuzione della capacità fotosintetica spesso associata ad una riduzione della clorofilla in termini assoluti e/o a variazioni del rapporto clorofilla *a*/clorofilla *b* (Chapelle et al., 1992). Infatti l'efficienza di utilizzo della luce dipende dal tasso con il quale l'energia di eccitazione ottenuta tramite l'azione

dei pigmenti viene utilizzata nella catena di trasferimento degli elettroni e nell'organizzazione della CO₂ da parte degli enzimi della componente stromatica dei cloroplasti.

Per tali motivi le *seagrasses* hanno evoluto la capacità di adattare il proprio apparato fotosintetico al cambiamento dei parametri ambientali attraverso variazioni delle concentrazioni e dei relativi rapporti dei pigmenti fotosintetici (Major and Dunton, 2002).

In generale la capacità di sopravvivere a condizioni negative di luminosità dipende dalla capacità di fotoacclimatazione della pianta e, generalmente, le *seagrasses* risultano essere bene adattate, ovviamente entro certi limiti, a tale tipologia di stress (Ralph and Burchette, 1995).

In base a queste considerazioni abbiamo voluto approfondire gli effetti di condizioni di luce limitanti, oltre che nella fase luminosa e nei suoi componenti, anche nella fase luce-indipendente. In particolare abbiamo voluto verificare variazioni nel *pattern* di distribuzione della Rubisco in cloroplasti di campioni provenienti da un sito non disturbato dal punto di vista dell'intensità luminosa incidente sulla pianta (sito C) e da un sito disturbato (Sito D), ambedue localizzati nell'alto Tirreno cosentino e distanti tra loro solo 3.5 Km in modo da ottenere prelievi ad una profondità di circa 8m da piante sottoposte alle stesse condizioni macro-climatiche. Studi pregressi effettuati sugli stessi siti e nello stesso momento di campionamento hanno mostrato un decremento delle concentrazioni di clorofilla totale così come una diminuzione del numero di cloroplasti per unità di superficie nelle foglie provenienti dal sito D rispetto al sito C (Mazzuca et al., 2006). Alla luce di questi dati risulta evidente l'interesse nel valutare non tanto la quantità assoluta di Rubisco nei campioni provenienti dai due siti (in quanto influenzabile dal diverso numero di cloroplasti) quanto il *pattern* enzimatico nei cloroplasti stessi.

In ultimo, sono state effettuate analisi TEM anche per indagini concernente l'ultrastruttura di campioni ottenuti da piante prelevate a due diverse profondità (-

5m e -22m) da praterie di Ischia (NA) in modo da verificare se diverse condizioni quali-quantitative dello spettro luminoso dovute alla profondità potessero influenzare o meno l'organizzazione strutturale dei cloroplasti oltre ad approfondire le conoscenze circa la cuticola porosa così peculiare nella fisiologia di *P.oceanica*.

4.2 Risultati

4.2.1 Immunolocalizzazione della Rubisco in *Posidonia oceanica*

I campioni sono stati prelevati nel primo periodo estivo (Giugno) e la misurazione della radiazione luminosa incidente sulle due praterie ha rilevato valori medi nel periodo del prelievo doppi nel sito C rispetto a quelli registrati nel sito D (Fig. 1).

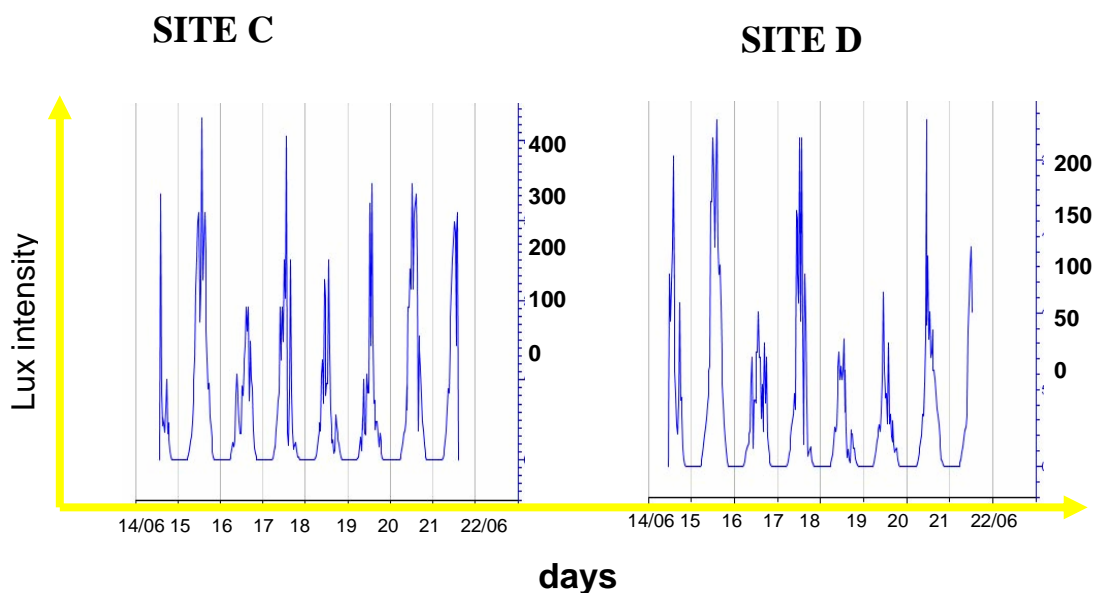


Fig. 1. Misurazioni in lux nei siti di campionamento.

Tale variazione di intensità è da attribuire in massima parte ad attività di pesca e diporto nell'area D che, inevitabilmente, creano un aumento delle sospensioni nella colonna d'acqua.

Sono state effettuate analisi per entrambi i siti sia su foglie giovani che su foglie adulte in modo da evidenziare eventuali differenze tra le due fasi di sviluppo. Inoltre si è proceduto ad ottenere campioni inerenti la parte basale e la parte apicale della foglia allo scopo di rilevare un ulteriore ed eventuale gradiente lungo l'asse foliare, tenendo sempre presente l'accrescimento basale delle foglie di *Posidonia oceanica*. Come metodica è stata prescelta l'immunogold, descritta nello specifico in *Materiali e Metodi*. Le risultanze sperimentali sono state analizzate attraverso metodiche di microscopia elettronica a trasmissione (TEM).

Dai dati ottenuti possiamo evidenziare generalmente una maggiore reattività all'immunolocalizzazione dei campioni provenienti dal sito C rispetto a quelli provenienti dal sito D (Fig. 2, 3, 4, 5, 6) lasciando subito ipotizzare una relazione positiva tra luce e Rubisco.

All'interno delle diverse tipologie di campionamento, si è riscontrato una maggiore marcatura negli esperimenti sulle regioni apicali delle foglie (Fig. 3, 6). Questo potrebbe spiegarsi tenendo presente la modalità di accrescimento foliare in *P. oceanica* e quindi la parte basale della foglia, pur pigmentata, potrebbe presentare un minor grado di sviluppo e differenziamento dell'apparato fotosintetico. Infatti i campioni più reattivi in assoluto, nei limiti della tecnica, sembrano essere quelli ottenuti dalla parte apicale di foglia giovane del sito C (Fig. 3 A,C), ben pigmentata e priva di epifiti.

Questo gradiente crescente tra le due regioni della foglia sembra attenuarsi se si considerano le foglie adulte (fig. 5, 6) rilevando una localizzazione della Rubisco meno contrastata tra sito C e sito D negli individui adulti con un *pattern* che appare addirittura sovrapponibile nelle regioni apicali della foglia (Fig 6) forse a causa degli epifiti che si presentano con più frequenza sulle foglie adulte ed, in particolare, sulla zona medio-distale di queste con maggior effetto schermante del quale anche le foglie del sito C potrebbero aver risentito.

Tuttavia, dai risultati ottenuti e da quanto presente in letteratura, si evince una risposta molto articolata del riarrangiamento dell'apparato fotosintetico di

seagrasses sottoposte a basse condizioni di luminosità come quelle fotoacclimatate nel sito D. In più è da premettere che la capacità fotosintetica in *P.oceanica* è da ritenersi conseguenza di una risposta multifattoriale che vede nella radiazione luminosa la componente principale ma che può essere influenzata anche da altri fattori quali la temperatura, la presenza e la composizione dei nutrienti che possono agire sinergicamente con la luce (Pedersen, 1993) rendendo spesso il dato della risposta locale e non generalizzabile (Alcoverro et al., 2001).

In effetti nelle *seagrasses* anche le modificazioni del contenuto in clorofilla non seguono un meccanismo univoco e, in particolare a basse intensità luminose, le risposte divergono per alcuni aspetti da quando accade nelle piante terrestri.

Infatti, a condizioni di stress luminoso negativo, molte *seagrasses* aumentano il contenuto in clorofilla proprio per massimizzare l'assorbimento della luce disponibile (Major and Dunton, 2002) così come del resto avviene nelle foglie d'ombra delle piante terrestri (Schieffhaller et al., 1999). Tuttavia alcune specie di *seagrasses* possono anche non variare, nelle citate condizioni, il contenuto in clorofilla (Neely, 2000). Al contrario, altre specie, tra cui *Zostera capricorni* e *Cymodocea serrulata*, riducono il contenuto in clorofilla quando viene dimezzata loro la normale disponibilità luminosa ambientale (Dawson and Dennison; 1996). In effetti le piante di *P. oceanica* acclimatate nel sito D e campionate nei nostri esperimenti sembrano seguire questa via (Mazzuca et al., 2006).

Per *P. oceanica* si è comunque visto che il processo fotosintetico diventa via via meno efficiente a profondità maggiori e cioè all'aumentare dell'ostacolo alla radiazione luminosa rappresentato dalla colonna d'acqua sempre maggiore (Pirc, 1986).

La presenza più evidente di Rubisco nei campioni del sito C vs D può integrarsi in quanto appena detto e cioè in una risposta molto articolata e specifica a condizioni deficitarie di radiazione luminosa lasciando ipotizzare meccanismi di regolazione a tali stress non inquadrabili nelle classiche risposte delle piante superiori terrestri.

I nostri dati di immunolocalizzazione della Rubisco, assieme ai dati pregressi, suggeriscono che nei siti di studio buone condizioni di illuminazione regolano positivamente tra loro le varie componenti dell'apparato fotosintetico.

Viceversa in ambienti con insufficiente intensità luminosa sembra esservi un abbassamento della capacità di fotosintesi della pianta che vede nella scarsa disponibilità di energia luminosa un fattore limitante (Pirc, 1986; Kirk, 1994; Alcoverro et al., 2001) che da un lato riduce il quantitativo totale di clorofilla (Dawson and Dennison, 1996) ed il numero di cloroplasti (Mazzuca et al., 2006) e dall'altro abbassa il valore massimo di saturazione da luce (P_{max}) (Alcoverro et al., 2001).

Tali condizioni fanno sì che diminuisca il quantitativo di Carbonio organicato ed i meccanismi di fotoacclimatamento di *Posidonia* potrebbero quindi conseguentemente diminuire i contenuti di Rubisco per cloroplasto come da noi osservato.

Inoltre, come già affermato, non sono da escludere interazioni di altri fattori che, in concomitanza con la diversa condizione luminosa dei due siti, abbiano determinato i *patterns* descritti.

Tuttavia la scelta dei due siti e le metodiche di campionamento effettuate hanno cercato di ridurre al minimo le variabili prevedibili.

In ultimo, valori e risultati così tipici e particolari potrebbero anche suggerire il verificarsi non di meccanismi derivanti da una risposta da stress di tipo “causa-effetto” ma derivanti da un acclimatamento *long time* della prateria del sito D a condizioni di bassa intensità luminosa, ipotesi, questa, che solo misure continue e di lungo periodo della radiazione luminosa potrebbero avvalorare.

4.2.2 Features di ultrastruttura in *P. oceanica*

Un primo, e ancora del tutto preliminare, studio ultrastrutturale ha riguardato lo studio di cloroplasti di *P. oceanica* di piante campionate a due diversi livelli di profondità, rispettivamente -5m e -22m, da una prateria di Ischia (NA). I prelievi

sono stati processati per osservazioni TEM. Complessivamente dalle nostre analisi non sono emerse differenze nette e marcate tra i tessuti esaminati (Fig. 7 A, B).

Tuttavia, ad un primo esame, è possibile rilevare una maggiore presenza e strutturazione in *grana* dei tilacoidi nei campioni prelevati a -5m rispetto a quelli prelevati a maggiore profondità (Fig. 7 C,D).

Abbiamo abbondantemente discusso sul fatto che la luce sia il principale fattore limitante per *P. oceanica* (Kirk, 1994), di come spesso nelle seagrasses il contenuto totale in clorofilla diminuisca colinearmente al diminuire della radiazione luminosa (Dawson and Dennison, 1996), come del resto avviene a maggiore profondità, e di come anche in *Posidonia* condizioni di luce limitanti possono provocare un abbassamento dei valori di questi pigmenti (Mazzuca et al., 2006).

Queste premesse ci consentono di ipotizzare e rafforzare la relazione di regolazione positiva tra condizioni di intensità luminosa ottimale e capacità fotosintetica.

Possiamo quindi supporre che in acque poco profonde la luce stimolerebbe un maggior sviluppo dell'apparato fotosintetico e, conseguentemente, delle strutture tilacoidali in modo da massimizzare l'efficienza di assorbimento della maggiore disponibilità di energia luminosa.

Studi ripetuti su ulteriori e più numerosi campioni potranno confermare quanto osservato in queste prime analisi.

Ci siamo occupati, inoltre, di investigare con le tecniche disponibili di analisi TEM la regione cuticolare della foglia, così cruciale nel suo ruolo di interfaccia con l'ambiente esterno e nelle diverse tipologie di scambi con esso (Kuo et al., 1978) compresi gli scambi gassosi fondamentali nell'evento fotosintetico.

In effetti in letteratura non vi sono molti studi ultrastrutturali inerenti *P. oceanica* e, ad ogni modo, i principali lavori, essendo in genere poco recenti, risultano non completamente esaustivi nell'indagine strutturale risentendo dei limiti tecnici e strumentali del periodo.

Abbiamo eseguito acquisizioni TEM sia per individui dei siti calabresi C e D (Fig. 8 A, B, C, D)) sia per i campioni di Ischia provenienti da diverse profondità (Fig. 8 E, F).

Da una visione generale della cellula epidermica (Fig. 8 A) si può apprezzare, oltre allo strato cuticolare, una spessa parete che sembra organizzarsi in due strati caratteristici dove quello più esterno, in contatto con la cuticola nella sua parte terminale, appare più spesso è strutturato mentre la parte interna della parete presenta un'organizzazione fibrillare più lassa in accordo con quanto descritto per altre specie del genere *Posidonia* (Kuo et al., 1978). Da notare nella stessa cellula numerosi corpi vescicolari oltre ai cloroplasti caratteristici dello strato epidermico.

Ad un maggior ingrandimento della parete esterna della cellula epidermica (Fig 8 A, parte indicata con *) si può meglio apprezzare la cuticola (Fig. 8 B) nella sua interezza.

L'ultrastruttura cuticolare non mostra differenze apprezzabili e sostanziali tra le varie tipologie di campioni analizzati. La cuticola appare di uno spessore medio di circa 0.7 μm e la struttura si presenta generalmente fibrillare e porosa (Fig. 8). È ricoperta da un sottile strato, probabilmente dovuto agli epifiti (Kuo et al., 1978).

Infatti la cuticola sembra essere il punto di comunicazione, oltre che con l'ambiente esterno, anche con batteri e alghe residenti *in situ* e tale comunicazione avverrebbe in senso bidirezionale (Harlin, 1975) (Fig. 8 C).

Infatti, oltre alla già citata struttura porosa diffusa immediatamente al di sopra della parte esterna della parete delle cellule epidermiche, sono chiaramente distinguibili dei pori che mettono in comunicazione questa zona con l'ambiente esterno (Fig. 8 E, F) e che spesso sembrano ricorrere ad intervalli regolari (Fig 8 B). A supporto di questa evidenza vi è il fatto che “canali” di comunicazione con l'esterno nella cuticola furono già individuati in *Thalassia testudinum* e questi presentavano un diametro di circa 100 nm (Gessner, 1971).

I pori con tale funzione da noi individuati in *P. oceanica* presentano un diametro praticamente sovrapponibile di circa 80-110 nm (Fig 8 D). Vista la presenza ad

intervalli dei pori comunicanti con l'esterno, la struttura sottostante appare altamente interconnessa in modo da uniformare lungo la superficie di scambio disponibile la concentrazione di gas e piccoli soluti in uscita o in entrata. Ulteriori studi che associassero tecniche di microscopia elettronica e metodiche più prettamente fisiologiche potrebbero dare nuove e fondamentali informazioni circa il ruolo così particolare della cuticola nelle *seagrasses* in generale ed in *P. oceanica* in particolare.

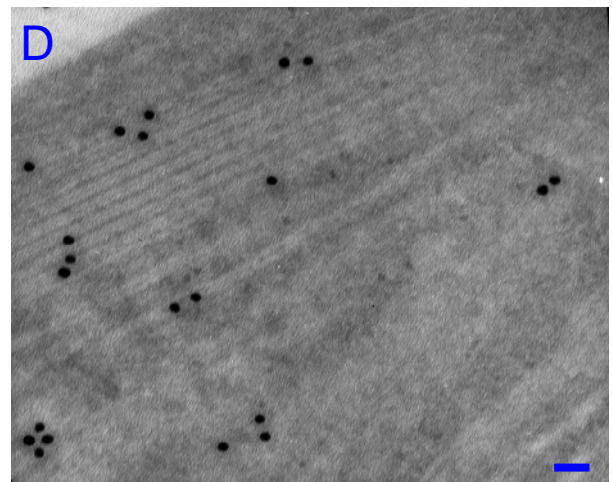
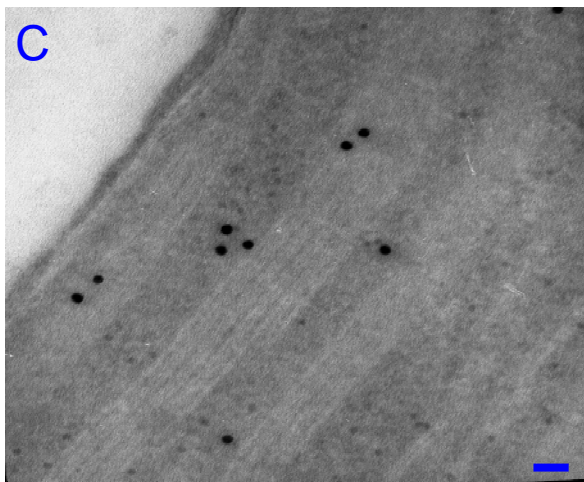
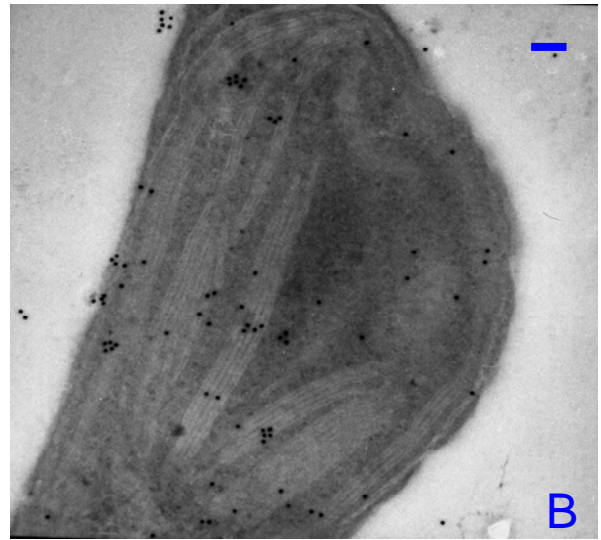
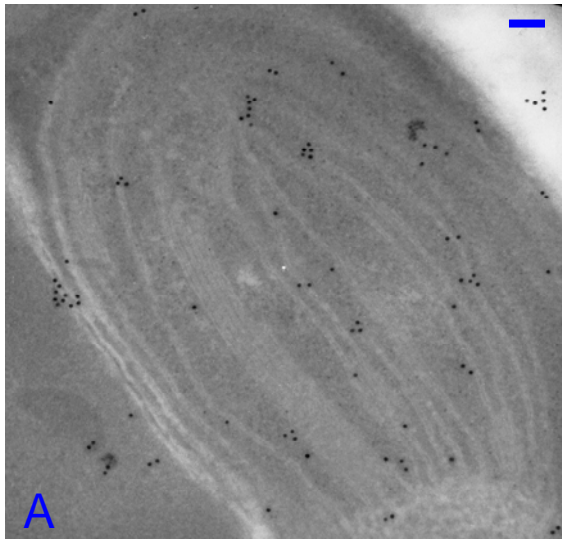


Fig 2. Immunogold su sezioni di foglie giovani , parte basale, campionate nel sito C (A, C) e nel sito D (B, D).
Dimensioni barra A 150 nm, B 150 nm, C 50 nm, D 50 nm.

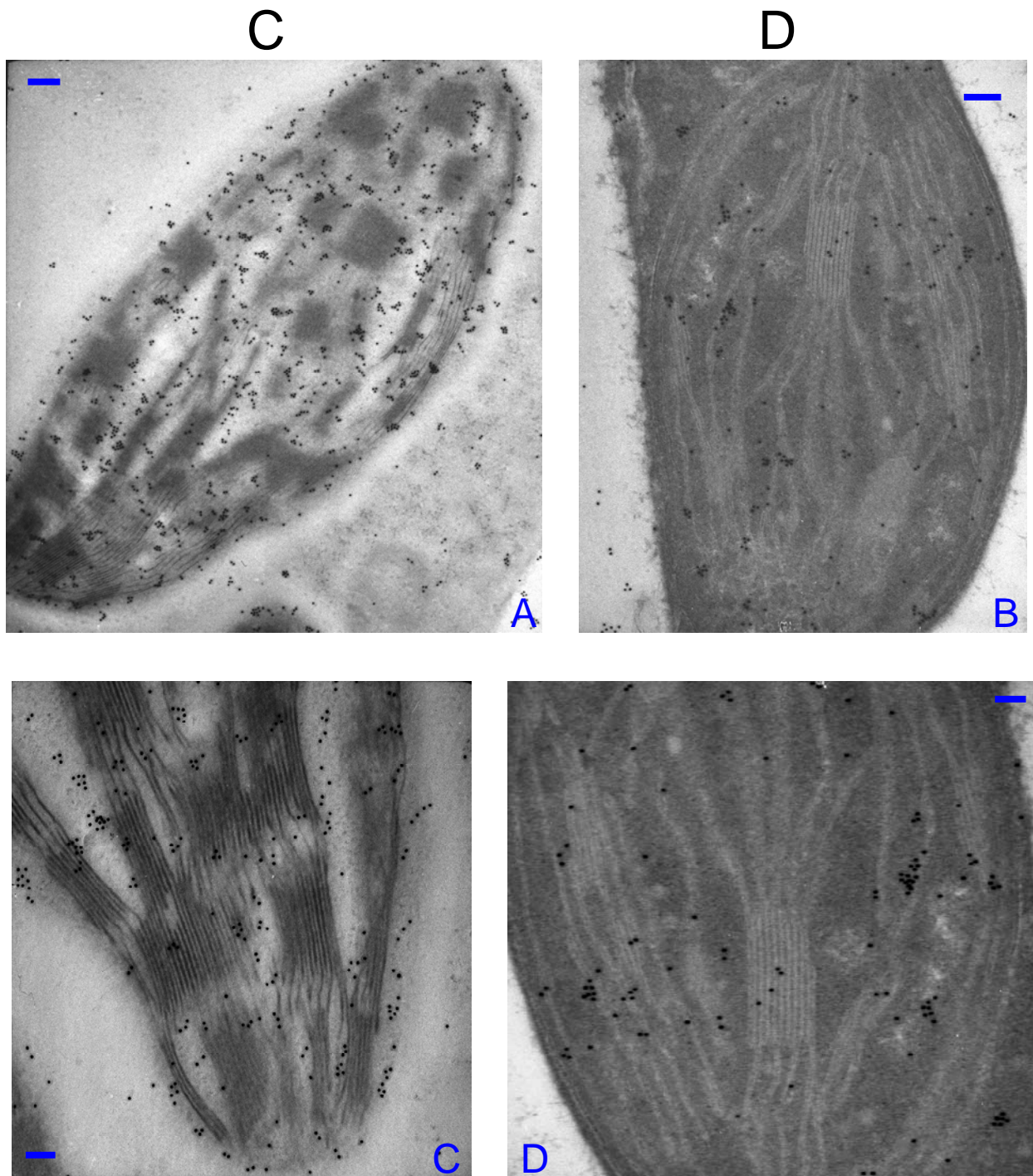


FIG. 3. . Immunogold su sezioni di foglie giovani , parte apicale, campionate nel sito C (A, C) e nel sito D (B, D).
Dimensioni barra: A 0.4 μm , B 0.25 μm , C 0.15 μm , D 0.15 μm

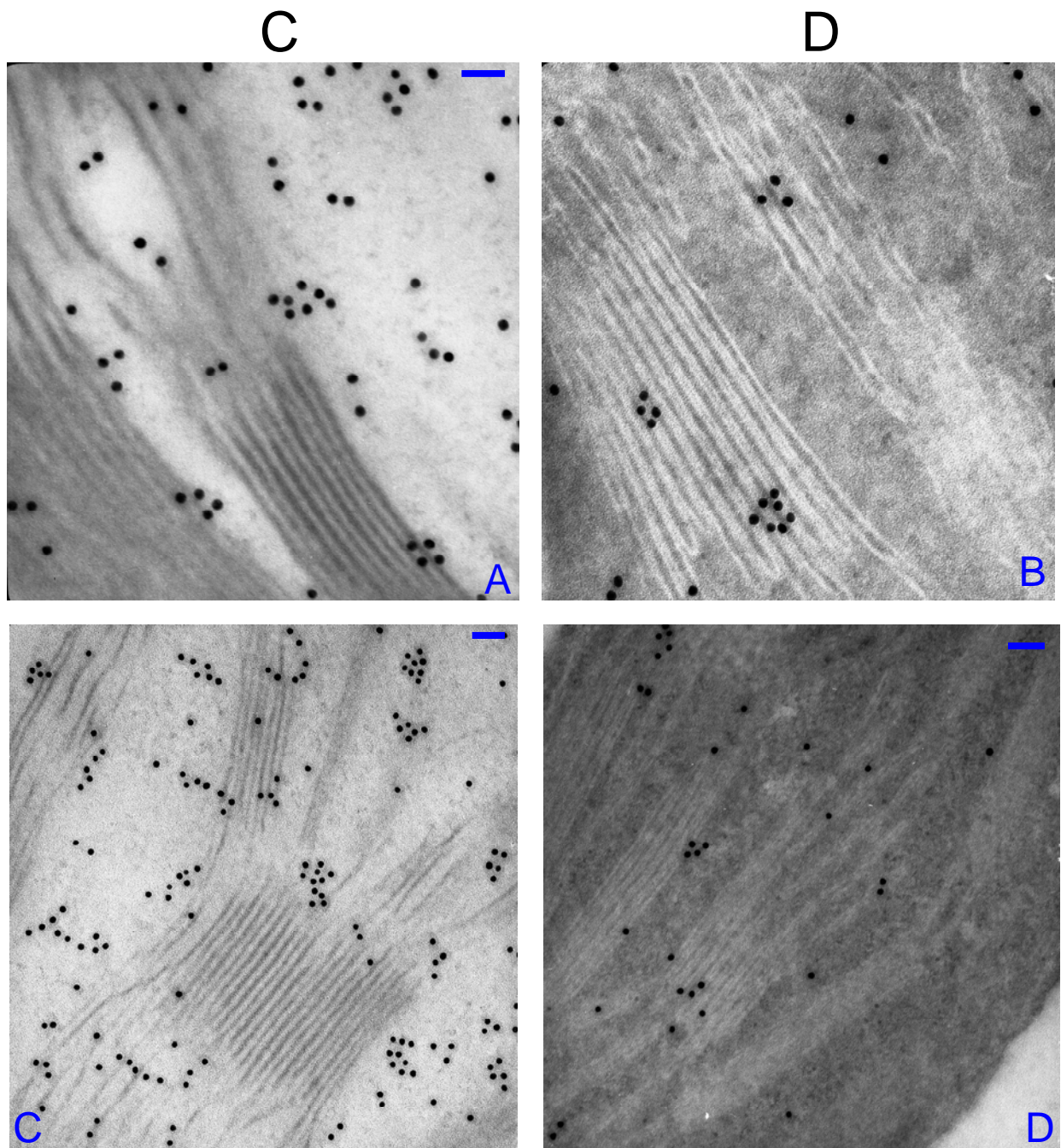


FIG. 4. Immunogold su sezioni di foglie giovani , parte apicale, campionate nel sito C (A, C) e nel sito D (B, D).
Dimensioni barra: A 50 nm, D 90 nm, C 90 nm, B 50 nm.

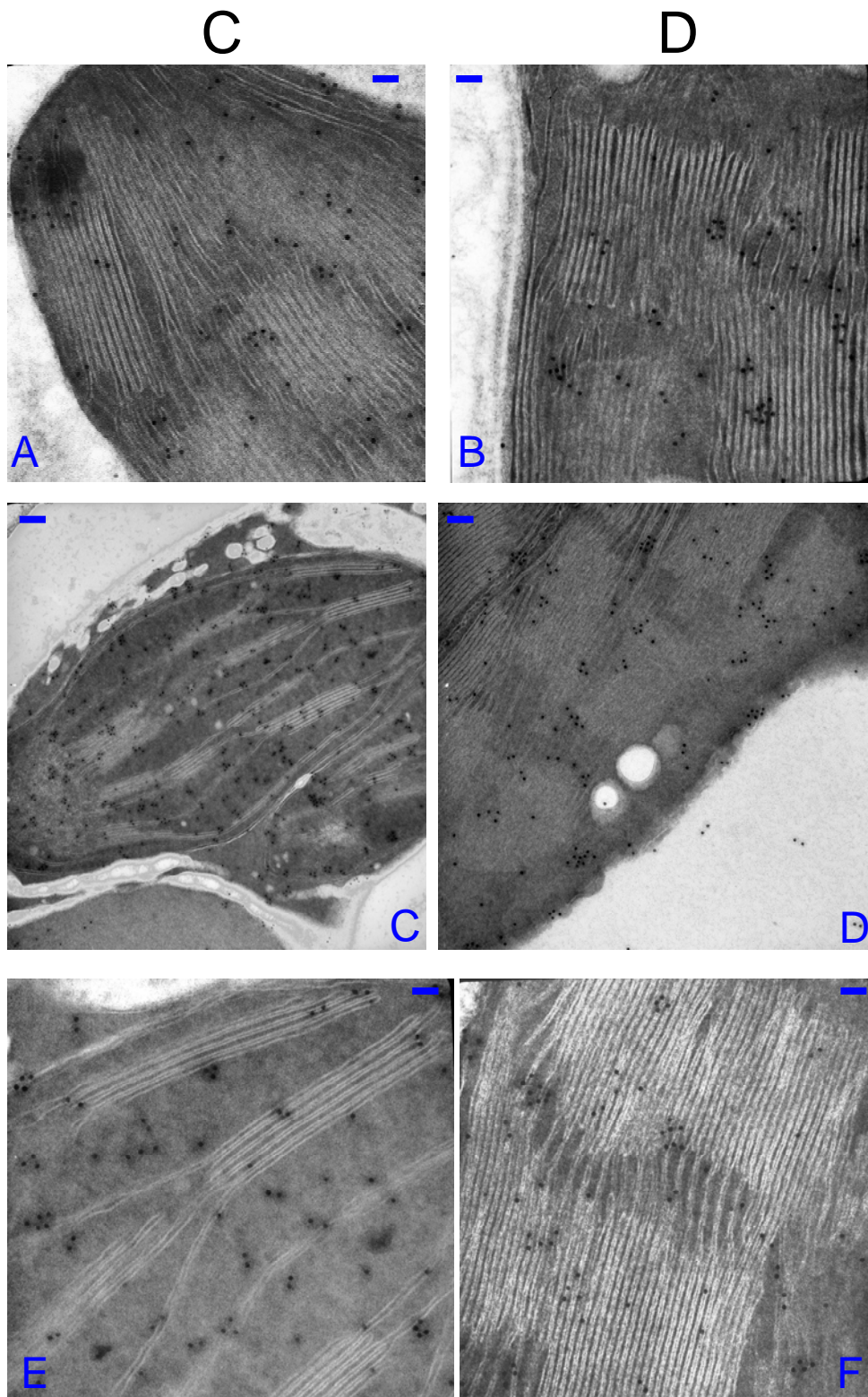


Fig 5. Immunogold su sezioni di foglie adulte , parte basale, campionate nel sito C (A, C,E) e nel sito D (B, D,F).
 Dimensioni barra: A 90 nm, B 90 nm, C 250 nm , D 150 nm, E 90 nm, F 90 nm.

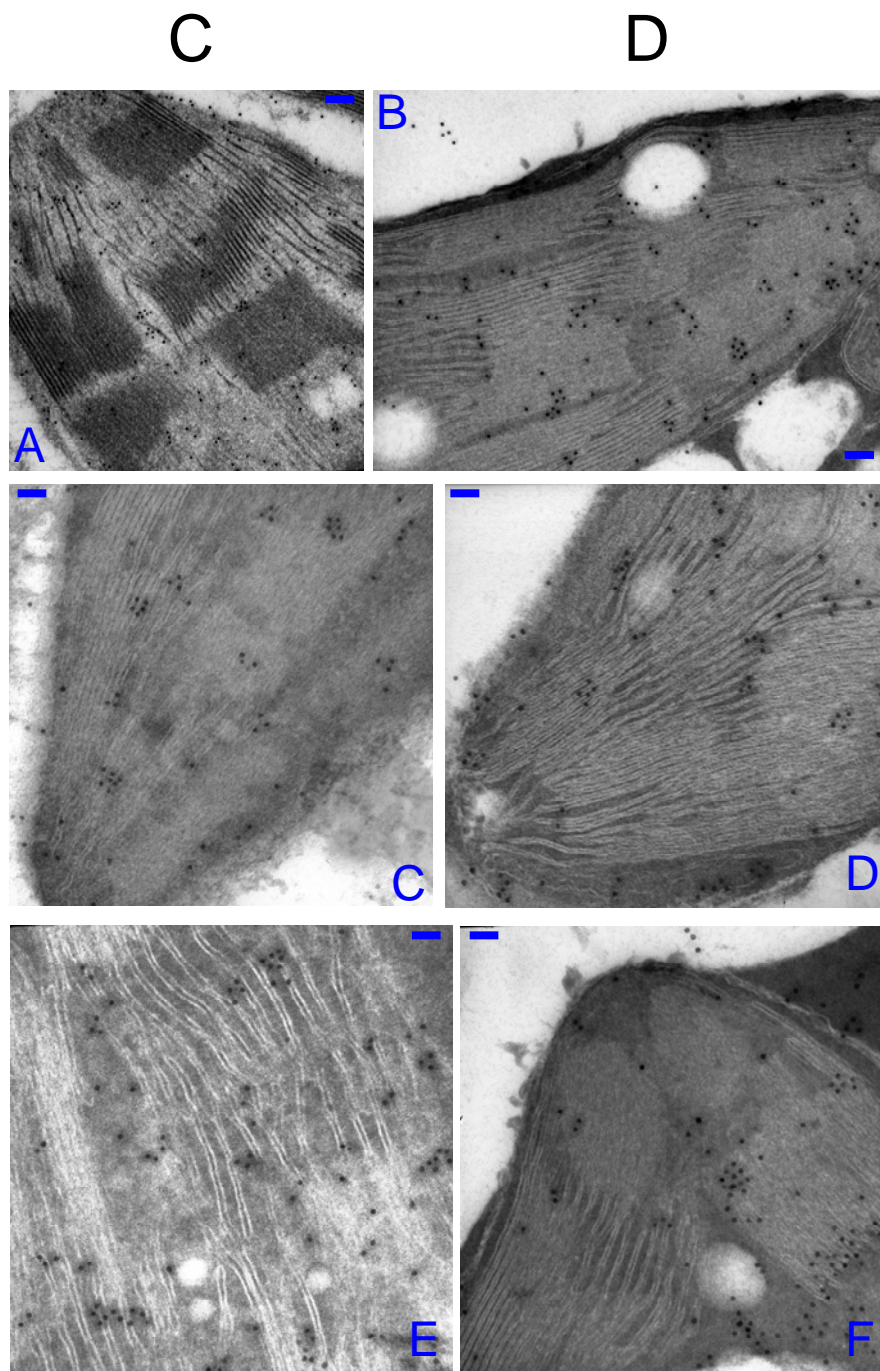


Fig 6. Immunogold su sezioni di foglie adulte , parte apicale, campionate nel sito C (A, C, E) e nel sito D (B, D, F).

-5m

-22m

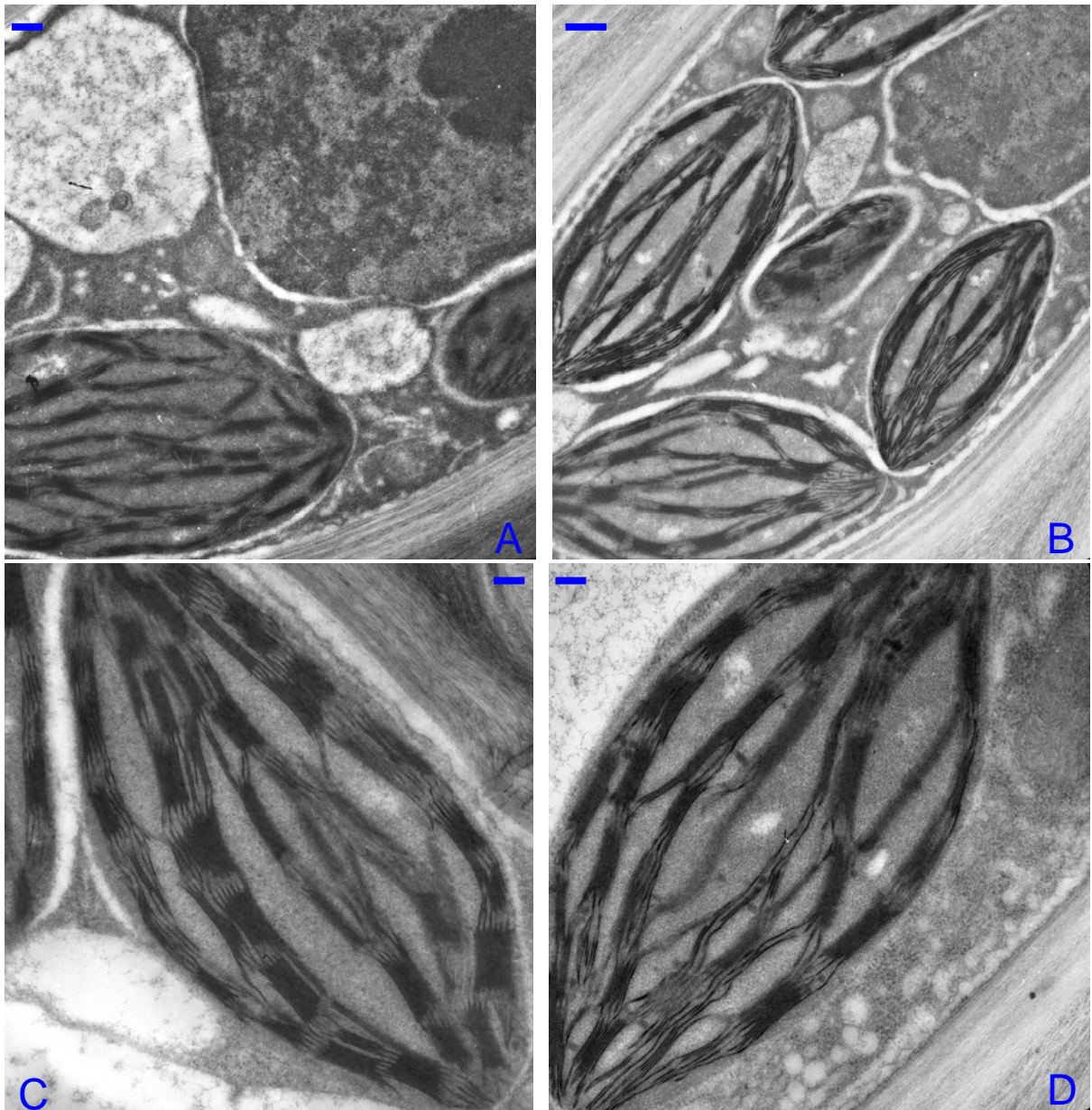


Fig. 7. Ultrastruttura di cloroplasti provenienti da individui di profondità diverse: -5m (A, C) e -22m (B, D)
Dimensioni barra: A 0.6 μm , B 0.6 μm , C 0.4 μm , D 0.4 μm .

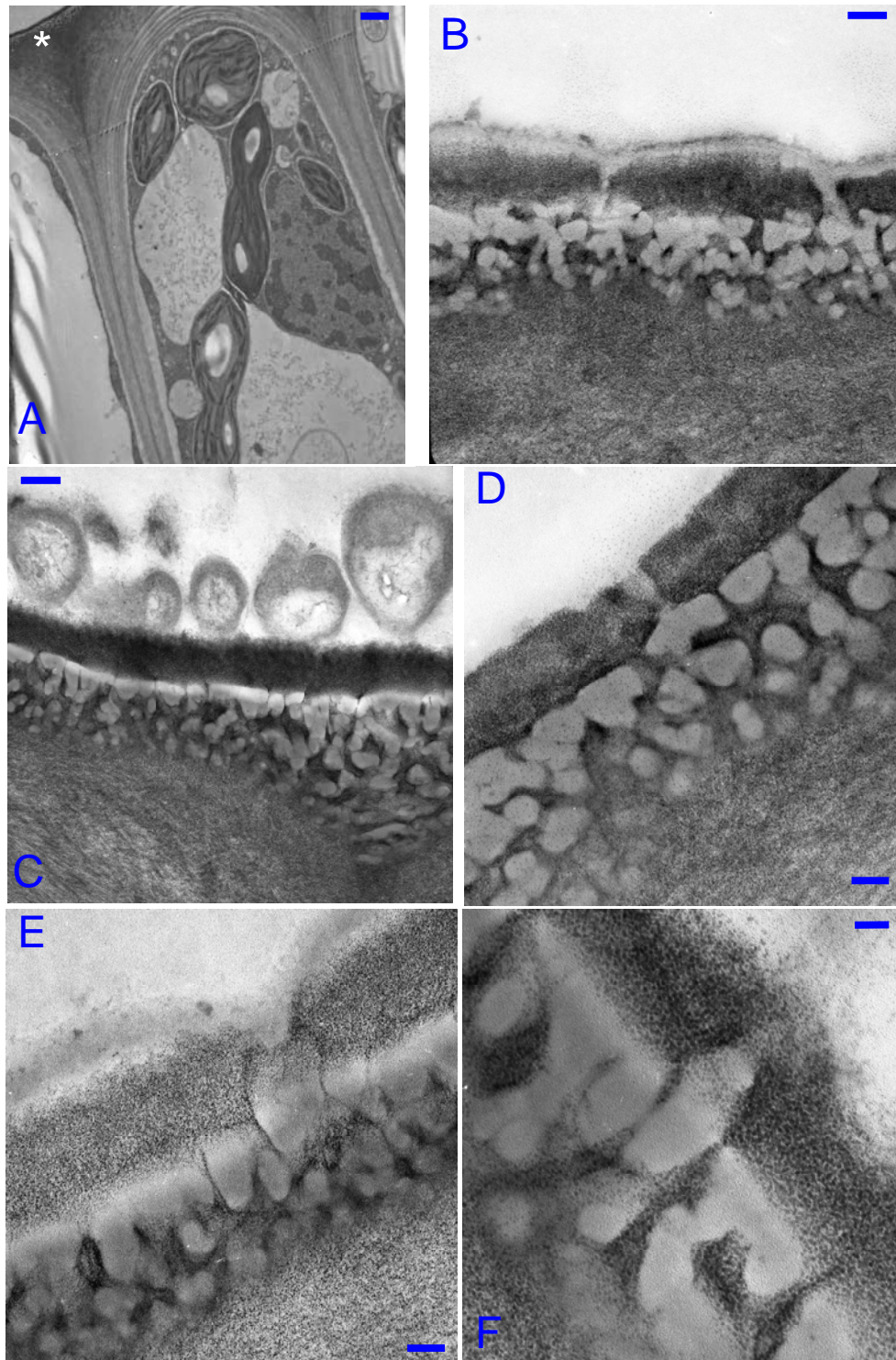


Fig. 8. Ultrastruttura di cellula epidermica (A) e cuticola in campioni provenienti dal sito C (A,B, C), dal sito D (D), da Ischia -5m (F) e -22 (E). La zona in A indicata con * è ingrandita in B. Dimensioni barra: A 1.7 μ m, B 150nm, C 250 nm, D 90 nm, E 90 nm, F 50 nm.

5. MATERIALI E METODI

5.1 *In situ* hybridization (ISH)

Per le procedure di ISH adottate su materiale proveniente sia da *P. oceanica* che da *H. annus*, i campioni sono stati fissati in paraformaldeide al 4% tramite brevi cicli di vuoto seguiti da un trattamento o.n. a 4 °C sempre nella soluzione fissativa. La fissazione è seguita, sempre a 4 °C, da una disidratazione in etanolo a concentrazioni crescenti per poi procedere a trattamenti etanolo/xilolo fino ad arrivare allo xilolo puro.

L'inclusione in paraffina incomincia con un passaggio o.n. di una soluzione fatta da xilolo puro ed ¼ del volume di paraffina solida. In seguito si sostituisce tale soluzione con xilolo/paraffina liquida nel rapporto 1/1 in stufa a 58 °C per 6-7 ore per poi procedere con un cambio di sola paraffina liquida o.n. ed alla stessa temperatura.

Nei giorni successivi si effettuano ulteriori cambi di paraffina liquida per poi concludere con la polimerizzazione dei campioni a temperatura ambiente.

Dagli inclusi si ottengono al microtomo Leica RM 2155 delle sezioni di 8 µm montate su vetrini polilisinati. I vetrini così ottenuti con le sezioni per le diverse tipologie di campioni sono stati processati per esperimenti di ibridazione *in situ*.

Le sezioni sono state sparaffinate in xilolo e reidratate per poi essere sottoposte ad un passaggio di 30' con proteinasi K (1 µg/ml) e fissate nuovamente con paraformaldeide al 4% per 10' per poi subire un trattamento con anidride acetica allo 0.25% in trietanolamina 0.1 M per ulteriori 10'.

Dopo una successiva disidratazione, si è proceduto ad ibridazione con *probes* senso ed antisense per le singole sonde utilizzate marcate con digossigenina.

L'ibridazione è stata condotta a 53 °C per 24 ore con una mix di ibridazione contenete 80ng/100µl di sonda marcata in 50% formamide, 0.3 M NaCl, 10mM Tris-

HCl pH8. 10mM Na fosfato, 5mM EDTA, 2.5 % destran solfato, 1.25 % Denhard's solution e 1mg/ml tRNA .

La post-ibridazione è stata effettuata con 2 lavaggi in 1X SSC per 5' a RT, due lavaggi di 10' in 0.2X SSC a 55 °C ed un lavaggio di 2' con 2X SSC a 37 °C.

A questi lavaggi è seguito un trattamento 10 µm/ml RNAsi A in 2X SSC a 37 °C per 30'.

L'utilizzo di anticorpo anti-Dig coniugato con fosfatasi alcalina (Roche) ha permesso la *detection* del segnale di ibridazione attraverso l'utilizzo dei coloranti BCIP e NBT (Roche). I vetrini sono stati successivamente disidratati e montati e le immagini acquisite attraverso il microscopio ottico Leica Leitz DMRB.

5.2 Analisi TEM ed Immunogold

I campioni di *Posidonia oceanica* processati per analisi ultrastrutturali e per esperimenti di immunolocalizzazione sono stati fissati con una soluzione di paraformaldeide al 3% e glutaraldeide allo 0.5% in PBS attraverso brevi cicli di vuoto ed un trattamento o.n. nella stessa soluzione.

Seguono 6 passaggi di 30' in PBS.

I soli campioni utilizzati per analisi di ultrastruttura subiscono un trattamento con acido osmico all'1% in PBS.

Si prosegue con una disidratazione in etanolo a concentrazioni crescenti.

Si procede con l'infiltrazione dei campioni con resina LR-White in etanolo con passaggi o.n nei rapporti etanolo resina di 3:1, 3:2, 1:1 fino ad arrivare alla resina pura.

Si effettua un ulteriore cambio di resina pura e si polimerizzano i campioni a 55 °C o.n..

Tramite l'ultramicrotomo Leica Ultra Cut UCT sono state ottenute sezioni di 60 nm apposte su retini per microscopia elettronica e osservati al microscopio elettronico a trasmissione Zeiss EM 900 oppure processati per gli esperimenti di immunogold.

I retini per microscopia elettronica con le sezioni da sottoporre all'immunolocalizzazione della rubisco vengono trattati con una soluzione di glicina 0.05 M in PBS per 20'.

In seguito si procede all'inattivazione dei siti aspecifici tramite una soluzione di BSA al 5% e Normal Serum Goat al 5% in PBS.

Si procede con 3 lavaggi di 5' in Incubation Buffer (PBS 10 mM, NaCl 150 mM, BSA 0.2 %, NaN₃ 20mM in H₂O).

Si diluisce l'anticorpo primario chicken anti-RbcL global (Agrisera) nel rapporto 1:80 con Incubation Buffer e si trattano i retini con tale soluzione o.n. a 4 °C.

Si continua con 6 lavaggi di 5' con solo Incubation Buffer.

Si diluisce l'anticorpo secondario rabbit anti-chicken coniugato con particelle di oro del diametro di 10 nm (BB International) in Incubation Buffer nel rapporto 1:50 e si utilizza sui retini per 2 ore a temperatura ambiente.

Si effettuano ulteriori 6 lavaggi con Incubation buffer e 3 con PBS, tutti di 5'.

Si opera una post-fissazione con glutaraldeide al 2% in PBS per 10' e si lava con solo PBS per 5'.

Infine si procede alla metallizzazione dei retini ed all'osservazione TEM con microscopio Zeiss EM 900.

BIBLIOGRAFIA

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

Alcoverro T., Cerbian E., Ballesteros E., 2001. The photosynthetic capacity of the seagrass *Posidonia oceanica*: influence of nitrogen and light. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 261, 107-120.

Allugova C.R., Gimalov F.R., Shakirova F.M., Vakhitov V.A., 2003. The plant Dehydrins: structure and putative functions. *Biokhimiya* 68(9), 1157-1165.

Alsheikh M.K., Svensson J.T., Randall S.K., 2005. Phosphorilation regulated ion-binding is a property shared by the acidic subclass dehydrins. *Plant Cell Environ* 28, 1114-1122.

Anderson C., Deram A., Petit D., Brooks R., Stewart R., Simcock R., 2001. *In*: Iskandar IK, Kirkham MB (eds) Trace elements in soil: bioavailability, flux, and transfer. Lewis, Washington DC, pp 63–76.

Baiges I., Schäffner A.R., Affenzeller J.M., Masa A. 2002. Plant aquaporins. *Physiol. Plant.* 115, 175-182.

Barcelò J. and Poschenrieder C., 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *J. Plant Nutr.* 13, 1-37.

Beer S., 1996. Inorganic carbon transport in seagrasses. *In* Kuo J., Phillips R.C., Walker D.I., Kirkman H, 1996. Seagrasses Biology: proceedings of an international workshop. Rottnest Island, Western Australia.

Beer S., Vilenkin B., Veste M., Susel L., Eshel A., 1998. Measuring of photosintetic rates in seagrasses by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 174, 293-300.

- Bohnert H.J., Gong Q., Li P., Ma S., 2006.** Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms – getting genomics going. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 180–188
- Boudouresque C.F. and Meinesz A., 1982.** Decouverte l'herbier de Posidonie Parc National de Port-Cros. *Cahiers* (1982) 4:8.
- Bruno J. F., Stachowicz J. J., Bertness M. D., 2003.** Inclusion of facilitation into ecological theory. *Trends Ecol. Evol.* 18, 119–125.
- Burke J.M., Gardner K.A., Rieseberg L.H., 2002.** The potential for gene flow between cultivated and wild sunflower (*Helianthus annuus*) in the united States. *Am. J. Bot.* 89(9), 1550-1552.
- Callahan D.L, Alan J. M., Baker Spas D., Kolev Æ., Wedd A.G., 2006.** Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *J. Biol. Inorg. Chem.* 11, 2–12.
- Callaway R. M. (and 12 others), 2002.** Positive interactions among alpine plants increase with stress. *Nature* 417, 844–888.
- Cellier F., Conejero G., Breitler J.C., Casse F., 1998.** Molecular and physiological responses to water deficit in drought-tolerant and drought-sensitive lines of sunflower. Accumulation of dehydrin transcripts correlates with tolerance. *Plant Physiol.* 116, 319-328.
- Cellier F., Conejero G., Casse F., 2000.** Dehydrin transcript fluctuations during a day/night cycle in drought-stressed sunflower. *J. Exp. Bot.* 51, 299-304.
- Chapelle E.W., Kim M.S., McMurtrey J.E. III., 1992.** Ratio analysis of reflectance spectra in (RARS): an algorithm for the remote estimation of the concentration of chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids in soybean leaves. *Remote Sens. Environ.* 39, 239-247.
- Chaumont F., Barrieu F., Wojcik E., Chrispeels M., Jung, R., 2001.** Aquaporins Constitute a Large and Highly Divergent Protein Family in Maize. *Plant Physiol.* 125, 1206–1215.

Chen Y., Li X.D., Shen Z.G., 2004. Leaching and uptake of heavy metals by ten different species of plants during an EDTA-assisted phytoextraction process. *Chemosphere* 57, 187-196.

Clemens S, Kim EJ, Neumann D, Schroeder JI., 1999. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J.* 18, 3325–33

Close T.J., 1996. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol. Plant.* 97, 795-803.

Close T.J., 1997. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant* 100, 291-296.

Cobbett C. and Goldsbrough P., 2002. Phytochelatins and Metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53, 159-182.

Cobbett C.S., 2000. Phytochelatins and their role in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* 123, 825–33.

Costa G., Michaut J.C., Guckert A., 1997. Amino acids exuded from axenic roots of lettuce and white lupin seedlings exposed to different cadmium concentrations. *J. Plant Nutr.* 20, 883-900.

Costa G., Morel J., 1994. Water relations, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce. *Plant Physiol Biochem* 32, 561-570.

Cox P.A., Laushnan T., Ruckelshaus M.H., 1992. Surface and submarine pollination in the seagrass *Zostera marina*. *Bot. J. Linn. Soc.* 109, 281- 291.

Coyle P., Philcox J. C., Carey L. C., Rofe A. M. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol. Life Sci.* 59, 627-647.

- Crosatti C., Polverino De Laureto P., Bassi R., Cattivelli L., 1999.** The interaction between cold and light controls the expression of the cold-regulated barley gene *cor14b* and the accumulation of the corresponding protein. *Plant Physiol.* 119, 671-680.
- Dawson S.P. and Dennison W.C., 1996.** Effects ultraviolet and photosynthetically active radiation on five seagrasses species. *Mar. Biol.* 125, 629-638.
- De Knecht J.A., Van Baren N., Ten Bookum W.T., Wong Fong Sang H.W., Koevoets P.L.M., Schat H., Verkleij J.A.C., 1995.** Synthesis and degradation of phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Sci.* 106, 9-18.
- Delhaize E., Ryan P. R., Hebb D. M., Yamamoto Y., Sasaki T., Matsumoto H., 2004.** Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 15249-15254.
- Della Croce N., Cattaneo Vietti R., Danovaro R., 1997.** *Ecologia e protezione dell'ambiente marino costiero.* Utet, 1997.
- Denker B., Smith B., Kuhajda F., Agre P., 1988.** Identification, Purification, and Partial Characterization of a Novel Mr 28.000 Integral Membrane Protein from Erythrocytes and Renal Tubules. *J. Biol. Chem.* 263, 15634–15642.
- Dixon L.K., 2000.** Establishing light requirement for the seagrasses *Thalassia testudinum*: an example from Tampa Bay, Florida. *In: Seagrasses: monitoring, ecology, physiology and management.* S.A. Bortone (ed.). CRC Press, Boca Raton (FL), 9-32.
- Dobrota C., 2006.** Energy dependant plant stress acclimation. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 5, 243–251.
- Duarte C.M., 1991.** Allometric scaling of seagrass form and productivity. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 77, 289-300.

Duarte C.M., 2002. The future of seagrass meadows. *Environ. Conserv.* 29, 192-206.

Dure III L., Crouch M., Harada J., Ho T.H.D., Mundy J., Quatrano R., Thomas T., Sung Z.R., 1989. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins in higher plants. *Plant Mol. Biol.* 12, 475-486.

Ernst, W.H.O., 2005. Phytoextraction of mine wastes – options and impossibilities. *Chemie der Erd.* 65, 29-42.

Falkowsky P.G. and Raven J.A., 1997. Aquatic Photosynthesis. Blackwell Science, Carlton.

Gambi M.C., 2002. Spatio-temporal distribution and ecological role of polychaete borers of *Posidonia oceanica* (L.) Delile scales. *Bull. Mar. Sci.* 71, 1323-1331.

Garcia-Hernandez M., Murphy A., Taiz L., 1998. Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118, 387-397.

Gekler W., Grill E., Grill E., Winnacker E., Zenk M.H., 1989. Survey of the plant kingdom for the ability to bind heavy metals through phytochelatins. *Z. Naturforsch.* 44, 361-369.

Gessner F., 1971. The water economy in the seagrass *Thalassia testudinum*. *Mar. Biol.* 10, 258-260.

Giordani T., Natali L., D'Ercole A., Pugliesi C., Fambrini M., Vernieri P., 1999. Expression of a dehydrin gene during embryo development and drought stress in ABA-deficient mutants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Mol. Biol.* 39, 739-748.

Giordani T., Natali L., Maserti B.E., Taddei S., Cavallini A. 2000. Characterization and expression of DNA sequences encoding putative type-II metallothioneins in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Plant Physiol.* 123, 1571-1581.

Giraud, G., 1979. Sur une méthode de mesure et de comptage des structures foliaires de *Posidonia oceanica* (Linnaeus) Delile. Bull. Mus. Hist. Nat. Marseille 39, 33–39.

Green E.P. and Short F.T., 2003. World Atlas of Seagrasses, University of California Press, Berkeley, USA.

Grill E., Loeffler S., Winnacker E., Zenk M.H., 1989. Phytochelatins, the heavy metal binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamyl-cysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 6838-6842.

Grill E., Winnacker E., Zenk M.H., 1985. Phytochelatins: the principal heavy metal complexing peptides of higher plants. Science 230, 674-676.

Guo, W. J., Bundithya, W. and Goldsbrough, P. B. 2003. Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. New Phytol. 59, 369-381.

Ha S-B, Smith A.P., Howden R., Dietrich W.M., Bugg S., et al. 1999. Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. Plant Cell 11:1153–64.

Hall, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. J. Exp. Bot. 53, 1-11.

Haq, F., Mahoney, M. and Koropatnick, J. (2003) Signaling events for metallothionein induction. Mutation Res. 533, 211-226.

Harlin M.M., 1975. Epiphytes – host relations in seagrasses communities. Aquat. Bot. 1, 124-131.

Hauxwell J., Cebrian J., Furlog C., Valiela I., 2001. Macroalgal canopies contribute to eelgrass (*Zoostera marina*) in temperate estuarine ecosystems. Ecology 82, 1007-1022.

Hazen S.P., Wu Y., Kreps J.A., 2003. Gene expression profiling of plant responses to abiotic stress. *Funct. Integr. Genomics* 3, 105–111.

Hemminga M.A., Duarte C.M., 2000. *Seagrass Ecology*. Cambridge University Press.

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.

Heymann, J. and Engel, A., ., 1999. Aquaporins: Phylogeny, Structure, and Physiology of Water Channels. *News Physiol. Sci.*, vol. 14, pp. 187–193.

Himmelblau E, Amasino RM. 2000. Delivering copper within plant cells. *Curr.Opin. Plant Biol.* 3, 205–10

Hopkins W.G., 1995. *Introduction to Plant Physiology*. J.Wiley & Sons, Inc.

Hsieh H.M., Liu W.K., Chang A., Huang P.C., 1996. RNA expression pattern of a type 2 metallothionein-like gene from rice. *Plant Molecular Biology* 32, 525-529.

Invers O., Zimmerman R.C., Alberte R.S., Pérez M., Romero J., 2001. Inorganic carbon sources for seagrass photosynthesis: an experimental evaluation of bicarbonate use in species inhabiting temperate waters. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 265, 203–217

Jensen, M., Tajkhorshid, E., and Schulten, K., 2001. The Mechanism of Glycerol Conduction in Aquaglyceroporins. *Structure (Cambridge)* 9, 1083–1093.

Johanson, U. and Gustavsson, S., 2002. A New Subfamily of Major Intrinsic Proteins in Plants. *Mol. Biol. Evol.* vol. 19, pp. 456–461.

- Johansson I., Karlsson M., Johanson U., Larsson C., Kjellbom P. 2000.** The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465, 324-342.
- Johansson I., Karlsson M., Shukla V.K., Chrispeels M.J., Larsson C., Kjellbom, P., 1998.** Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell* 10, 451–459.
- Johnson, K., Herman, E., and Chrispeels, M., 1992.** An Abundant, Highly Conserved Tonoplast Protein in Seeds. *Plant Physiol.* vol. 91, pp. 1006–1013.
- Kagi J.H.R., 1991.** Overview of metallothionein. *Methods in Enzymology* 205, 613-626.
- Kaldenhoff R. And Fischer M., 2006a.** Functional aquaporin diversity in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758 , 1134–1141.
- Kaldenhoff R. and Fischer M. 2006b.** Aquaporins in plants *Acta Physiol*, 187, 169–176.
- Kessler A. and Brand M.D. 1995.** The mechanism of the stimulation of state 4 respiration by cadmium in potato tuber (*Solanum tuberosum*) mitochondria. *Plant Physiol. Biochem.* 33, 519-528.
- Kirk J.T.O., 1994.** Light and photosynthesis in aquatic ecosystems, 2nd ed., Cambridge University Press, Melbourne.
- Koch E.W., 2001.** Beyond light: physical, geological, and geochemical parameters as possible submersed aquatic vegetation habitat requirements. *Estuaries* 24: 1-17.
- Kreps J., Wu Y., Chang H.S., Zhu T., Wang X., Harper J., 2002.** Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol.* 130, 2129–2141.

Kuo J. 1978. Morphology, anatomy and histochemistry of Australian seagrasses of genus *Posidonia* König (Posidoniaceae). *Aquat. Bot.* 5(2), 171-190.

Kuo J. 1983. The nacreous walls of sieve elements in seagrasses. *Am. J. Bot.* 70(2), 159-164.

Larkum A.W.D, Roberts G., Kuo J., Strother S., 1989. Gaseous movements in seagrasses. pp. 686-722. In *Biology of seagrasses: a treatise on the biology of seagrasses with special reference to the Australian region*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

Larkum A.W.D. and den Hartog C., 1989. Evolution and biogeography of seagrasses. pp. 112-156. In *Biology of seagrasses: a treatise on the biology of seagrasses with special reference to the Australian region*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

Lasat M.M., 2002. Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality* 31, 109-120.

Ledger S.E. and Gardner R.C., 1994. Cloning and characterization of five cDNAs for genes differentially expressed during fruit development of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*). *Plant Molecular Biology* 25, 877-886.

Leita L., De Nobili M., Cesco S., Mondini C., 1996. Analysis of intercellular cadmium forms in roots and leaves of bush bean. *J. Plant Nutr.* 19, 527-533.

Li Z.S., Lu Y.P., Zhen R.G., Szczypka M., Thiele D.J., Rea P.A. 1997. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of *bis*(glutathionato) cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 42-47.

Lombi E., Zhao F.J., Dunham S.J., Mc Grath S.P., 2001. Phytoremediation of heavy-metal contaminated soils: natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *Journal of Environmental Quality* 30, 1919-1926.

Lucca P., Hurrel R., Potrykus I., 2001. Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice grains. *Theor. Appl. Genet.* 102, 392-97.

Maestrini P., Giordani T., Lunardi A., Cavallini A., Natali L., 2004. Isolation and Expression of Two Aquaporin-Encoding Genes from the Marine Phanerogam *Posidonia oceanica*. *Plant Cell Physiol.* 45(12), 1838-1847.

Major K.M. and Dunton K.H., 2002. Photosynthetic performance in *Syringodium filiforme*: seasonal variations in light-harvesting characteristics. *Aquat. Bot.* 68, 249-264.

Martre P., Morillon R., Barrieu F., North G.B., Nobel P.S., Chrispeels M.J., 2002. Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiol.* 130, 2101–2110.

Maserti B.E., V. Ferrillo , O. Avdis ,U. Nesti , A. Di Garbo , A. Catsiki, Maestrini P.L., 2005. Relationship of non-protein thiol pools and accumulated Cd or Hg in the marine macrophyte *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Aquatic Toxicology* 75, 288–292.

Maurel, C., Javot, H., Lauvergeat, V., Gerbeau, P., Tournaire, C., Santoni, V. , Heyes, J., 2002. Molecular physiology of aquaporins in plants. *Int. Rev. Cytol.* 215: 105–148.

Mazzuca S., Cozza R., Filadoro D., Pangaro T., Innocenti A.M., 2006. Leaf proteins analysis and ultrastructural features in *Posidonia oceanica* (L.) Delile beds in different environmental conditions. *Mediterranean Seagrasses Workshop*, Malta.

Mejáre M. and Bülow L., 2001. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends in Biotechnology* 19, 67-72.

Mir G., Domènech J., Huguet G., Guo W.J., Goldsbrough P., 2004. A plant type 2 metallothionein (MT) from cork tissue respond to oxidative stress. *J.Exp. Bot.* 55 (408), 2483–2493.

Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9, 490-498.

Nakazono M., Qiu F., Borsuk L.A., Schnable P.S., 2003. Laser-capture microdissection, a tool for the global analysis of genes expressed differentially in epidermal cells or vascular tissues of maize. *Plant Cell* 15, 583–596.

Neely M.B., 2000. Somatic, respiratory and photosynthetic responses of the seagrass *Halodule wrightii* to light reduction in Tampa Bay. pp. 33-48. *In* Bortone S.A. (ed). Seagrasses: monitoring, ecology, physiology and management. CRC Press, London

Nishizono H., Kubota K., Suzuki S., Ishii F., 1989. Accumulations of heavy metals in cell walls of *Polygonum cuspidatum* roots from metalliferous habitats. *Plant Cell Physiol.* 30, 595-598.

Ohno R., Takumi S., Nakamura C., 2003. Kinetics of transcript and protein accumulation of a low-molecular weight wheat LEA D-11 dehydrin in response to low temperature. *J. Plant Physiol.* 160, 193-200.

Ouvrard O., Cellier F., Ferrare K., Tusch D., Lamaze T., Dupuis J.M., 1996. Identification and expression of water stress- and abscisic acid-regulated genes in a drought-tolerant sunflower type. *Plant Mol. Biol.* 31, 819-829.

Palmiter, R. D. (1998). The elusive function of metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 8428-8430.

Pasqualini V., Pergent-Martini C., Pergent G., 1999. Environmental impact identification along the Corsican coast (Mediterranean Sea) using image processing. *Aquat Bot* 65: 311-320.

- Pedersen M., 1993.** Growth and nutrient dynamics in marine plants. University of Copenhagen. Copenhagen.
- Pennings S. C., Seling E. R., Houser L. T., Bertness M. D., 2003.** Geographic variation in positive and negative interactions among salt marsh plants. *Ecology* **84**, 1527–1538.
- Pergent G. and Pergent-Martini C., 1999.** Mercury levels and fluxes in *Posidonia oceanica* meadows. *Environmental Pollution* **106**, 33-37
- Pirc H., 1986.** Seasonal aspects of photosynthesis in *Posidonia oceanica*: influence of depth, temperature and light intensity. *Aquat. Bot.* **26**, 203-212.
- Prange J.A. and Dennison W.C., 2000.** Physiological responses of five seagrasses species to trace metals. *Mar. Poll. Bull.* **41**, 327-336.
- Ralph P.J. and Burchett M.D., 1995.** Photosynthetic responses of the seagrass *Halophylla ovalis* (Rbr) Hook. *f.* to high irradiance stress using chlorophyll *a* fluorescence. *Aquat. Bot.* **51**, 55-66.
- Razem F.A. and Bernardis M.A., 2003.** Hydrogen peroxide is required for poly(-phenolic) domains formation during wound induced suberization. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1009–1015.
- Rivers R., Dean R., Chandy G., Hall J., Roberts D., Zeidel M., 1997.** Functional Analysis of Nodulin 26, an Aquaporin in Soybean Root Nodule Symbiosomes. *J. Biol. Chem.* **272**, 16256–16261.
- Rivetta A., Negrini N., Cocucci M., 1997.** Involvement of Ca²⁺-calmodulin in Cd²⁺ toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant Cell Environ.* **20**, 600-608.
- Roberts D.G. and Moriarty D.J.W., 1987.** Lacunal gas discharge as a measure of productivity in the seagrasses *Zostera capricorni*, *Cymodocea serrulata* e *Syringodium isoetifolium*. *Aquat. Bot.* **28**(2): 143-160.

- Robinson NJ, Tommey AM, Kuske C, Jackson PJ. 1993.** Plant metallothioneins. *Biochemical Journal* **295**, 1-10.
- Rorat T., 2006.** Plant Dehydrins – Tissue Location, Structure And Function. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **11**, 536-556.
- Ros-Barcelo, A., 1998.** The generation of H₂O₂ in the xylem of *Zinnia elegans* is mediated by an NADPH-oxidase-like enzyme. *Planta* **207**, 207–216.
- Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cázares B., Lucas W. J. 2001.** The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Curr Opin Plant Biol*, **4**:202–209.
- Salt D.E. and Rauser W.E., 1995.** MgATP-dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiol.* **107**, 1293-1301.
- Sanità di Toppi L. and Gabrielli R., 1999.** Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* **41**, 105-130.
- Schiefthaler U., Russel A.W., Bolhà-Nordenkampf H.R., Critchley C., 1999.** Photoregulation and photodamage in *Schefflera arboricola* leaves adapted to different light environments. *Aust. J. Plant Physiol.* **26**, 485-494.
- Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Akiyama K., Taji T., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y., Shinozaki K., 2002.** Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.* **31**, 279–292.
- Sharp R.E., Poroyko V., Hejlek L.G., Spollen W.G., Springer G.K., Bohnert H.J., Nguyen H.T., 2004.** Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *J. Exp. Bot.* **55**, 2343-2351.

- Siedlecka A. and Krupa Z., 1996.** Interaction between cadmium and iron and its effects on photosynthetic capacity of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol. Biochem.* 34, 833-841.
- Smith H., 1994.** Sensing the light environment: the functions of the phytochrome family. *In: Kendrick R.E. and Kronenberg G.H.M.. Photomorphogenesis in plants – 2nd Edition*, Kluwer Academic Publishers, Printed in Netherlands, pp. 377-416.
- Snow A.A., Moran-Palma P., Rieseberg A., Wszelaki A., Seiler G.J., 1998.** Fecundity, phenology and seed dormancy of F1 wild-crop hybrids in sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *Amer. J. Bot.* 85(6): 794-801.
- Snowden K.C., Richards K.D., Gardner T.C., 1995.** Aluminium-induced genes-induction by toxic metals, low calcium and wounding and pattern of expression in root tips. *Plant Physiol.* 107, 341-348.
- Sui, H., Walian, P., Tang, G., Oh, A., and Jap, B., 2000.** Crystallization and Preliminary X-Ray Crystallographic Analysis of Water Channel AQP1, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* vol. 56, pp. 1198–1200.
- Tapperman J.M., Zhu T., Chang H.S., Wang X., Quail P.H. 2001.** Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome a signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 9437–42.
- Tepperman J.M., Hudson M.E., Khanna R., Zhu T., Chang S.H., Wang X., 2004.** Expression profiling of *phyB* mutant demonstrates substantial contribution of other phytochromes to red-light-regulated gene expression during de-etiolation. *Plant J.* 38, 725-739.
- Terrados J., Duarte C.M., 2000.** Experimental evidence of resuspension within a seagrass (*Posidonia oceanica* L.) meadow. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 243, 45-63.

Thomas D., Bron P., Ranchy G., Duchesne L., Cavalier A., Rolland J., Raguene-Nicol C., Hubert J., Haase W., Delamarche C., 2002. Aquaglyceroporins: One Channel for Two Molecules. *Biochim. Biophys. Acta* 1555, 181–186.

Tomlinson P.B., 1980. Leaf anatomy and morphology in seagrasses. Handbook of seagrass biology: an ecosystem perspective. Garland Press, New York. pp. 7-28.

Touchette B.W. and Burkholder J.M., 2000. Overview of the physiological ecology of carbon metabolism in seagrasses. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 250, 169-205.

Uehlein, N., Lovisolo, C., Siefritz, F. & Kaldenhoff, R. 2003. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature* 425, 734–737.

Vilardell J., Goday A., Freire M.A., Torrent M., Martinez M.C., Torne J.M., Pages M., 1990. Gene sequence, developmental expression and protein phosphorylation of RAB-17 in maize. *Plant Mol. Biol.* 14, 423-432.

Vinocur B. and Altman A., 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 123-132.

Wagner G. J., 1993. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv. Agron.* 51, 173-212.

Wallace I., Wills D., Guenther J., Roberts D., 2002. Functional Selectivity for Glycerol of the Nodulin 26 Subfamily of Plant Membrane Intrinsic Proteins. *FEBS Lett.* 523, 109–112.

Weig A., Deswarte C., Chrispeels M.J., 1997. The major intrinsic protein family of Arabidopsis has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group. *Plant Physiol* 114, 1347–1357.

- Wenzel W.W., Unterbrunne R. R., Sommer P., Sacco P., 2003.** Chelate-assisted phytoextraction using canola (*Brassica napus* L.) in outdoors pot and lysimeter experiments. *Plant and Soil* 249, 83-96.
- White C.N. and Rivin C.J., 1995.** Characterization and expression of a cDNA encoding a seed-specific metallothionein in maize. *Plant Physiology* 108, 831-832.
- Whitfield P.E., Kenworthy W.J., Durako M.J., Hammerstrom K.K., Merello M.F., 2004.** Recruitment of *Thalassia testudinum* seedlings into physically disturbed seagrass beds. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 267, 121-131.
- Wong H. L., Sakamoto T., Kawasaki T., Umemura K., Shimamoto K., 2004.** Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. *Plant Physiol.* 135, 1447-1456.
- Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K., 2005.** Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci.* 10, 88-94.
- Zardoya, R. and Villalba, S., 2001.** A Phylogenetic Framework for the Aquaporin Family in Eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 52, 391–404.
- Zhou G., Xu Y., Li J., Yang L., Liu J.Y., 2006.** Molecular Analyses of the Metallothionein Gene Family in Rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 39(5), 595-606.
- Zhu B., Choi D.W., Fenton R., Close T.J., 2000.** Expression of the barley dehydrin multigene family and the development of freezing tolerance. *Mol. Gen. Genet.* 264, 145-153.
- Zimmerman R.C., Kohrs D.G., Steller D.L., Alberte R.S., 1997.** Impacts of CO₂ enrichment on productivity and light requirements of eelgrass. *Plant Physiol.* 115, 599-607.