

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

SCIENZE AMBIENTALI - XIX CICLO

STUDIO DELLA RELAZIONE TRA LA NUTRIZIONE SOLFATICA E
FERRICA IN PIANTE A STRATEGIA I E A STRATEGIA II

AGR/13

Coordinatore: Prof. Enrico Mincione

Firma

Tutor: Dr. Stefania Astolfi

Firma

Dottorando: Dr. Sabrina Zuchi

Firma

Alla mia famiglia

INDICE

1. INTRODUZIONE	8
1.1 IL FERRO	10
1.1.1 Il ferro nella pianta	10
1.1.2 Il ferro nel suolo	15
1.1.3 La Strategia I	18
1.1.4 La Strategia II	23
1.2 LO ZOLFO	30
2. SCOPO DELLA TESI	45
3. MATERIALI E METODI	47
3.1 Allevamento delle piante di mais	47
3.2 Allevamento delle piante di orzo	49
3.3 Allevamento delle piante di pomodoro	51
3.4 Estrazione degli enzimi	53
3.5 Determinazione del contenuto di clorofilla nelle foglie	54
3.6 Determinazione dell'attività fotosintetica della pianta	54
3.7 Determinazione quantitativa delle proteine	55
3.8 Determinazione dell'attività dell'ATP-sulfurilasi (ATPs)	55
3.9 Determinazione dell'attività della O-acetil serina (tiol) liasi (OASTL)	56
3.10 Rimozione e determinazione del contenuto di ferro apoplastico nelle radici	56
3.11 Contenuto di ferro nelle foglie	57
3.12 Determinazione del contenuto totale di zolfo	57
3.13 Determinazione dei composti tiolici non proteici	58
3.14 Determinazione del contenuto di zuccheri totali in foglie e radici	58
3.15 Contenuto di glutatione e cisteina in foglie e radici	59
3.16 Raccolta degli essudati radicali e analisi	

quali-quantitativa dei fitosiderofori	59
3.17 Misura della velocità di assorbimento radicale del ferro	60
3.18. Misura della velocità di assorbimento radicale del solfato e della sua traslocazione	61
3.19 Estrazione dell'RNA totale e analisi RT-PCR	61
3.20 Determinazione dell'attività Fe(III)-riduttasica a livello radicale.	63
3.21 Determinazione della produzione di etilene	64
4. RISULTATI	65
4.1. STUDIO DELLA RELAZIONE TRA LA NUTRIZIONE SOLFATICA E FERRICA IN PIANTE A STRATEGIA II	65
4.1.1 Caratterizzazione preliminare delle interconnessioni metaboliche tra i processi di acquisizione dei nutrienti zolfo e ferro in piante di mais	65
4.1.1.1 Parametri di crescita	65
4.1.1.2 Contenuto di ferro nelle foglie	66
4.1.1.3 Contenuto di ferro apoplastico nelle radici	66
4.1.1.4 Contenuto di zolfo totale in foglie e radici	66
4.1.1.5 Contenuto di tioli non proteici in foglie e radici	67
4.1.1.6 Attività degli enzimi ATPs e OASTL in foglie e radici	68
4.1.1.7 Assorbimento e traslocazione del solfato.	69
4.1.1.8 Discussione	75
4.1.2 Ruolo della disponibilità di zolfo nella risposta alla Fe-carezza in piante di orzo.	79
4.1.2.1 Parametri di crescita	79
4.1.2.2 Contenuto di zuccheri totali in foglie e radici	80
4.1.2.3 Contenuto di ferro nelle foglie	80
4.1.2.4 Rilascio di fitosiderofori	81
4.1.2.5 Velocità di assorbimento del ferro	81

4.1.2.6 Discussione	86
4.1.3 Modificazioni nella capacità di acquisizione e assimilazione dello zolfo indotte dalla carenza di ferro in piante di orzo.	90
4.1.3.1 Contenuto di zolfo totale in foglie e radici	90
4.1.3.2 Contenuto di cisteina e GSH in foglie e radici.	90
4.1.3.3 Espressione del gene <i>HvST1</i> nei tessuti radicali.	91
4.1.3.4 Assorbimento del solfato.	91
4.1.3.5 Attività dell'enzima ATPs e OASTL in foglie e radici	92
4.1.3.6 Discussione	97
 4.2 STUDIO DELLA RELAZIONE TRA LA NUTRIZIONE SOLFATICA E FERRICA IN PIANTE A STRATEGIA I	 100
4.2.1 Effetto della disponibilità di zolfo sulla risposta alla Fe-carenza di piante a Strategia I	100
4.2.1.1 Parametri di crescita	100
4.2.1.2 Contenuto di ferro nelle foglie	101
4.2.1.3 Produzione dell'etilene	101
4.2.1.4 Attività Fe(III)-riduttasica a livello radicale	101
4.2.1.5 Velocità di assorbimento del ferro	102
4.2.1.6 Espressione del gene <i>LeIRT1</i> nei tessuti radicali	102
4.2.1.7 Discussione	107
 5. CONCLUSIONI	 110
 6. BIBLIOGRAFIA	 113

ABBREVIAZIONI

ACC	Acido 1-aminociclopropano-1-carbossilico
ALA	Acido δ -aminolevulinico
APS	Adenosina 5' - fosfosolfata
ATPs	ATP-sulfurilasi
bHLH	basic helix-loop-helix
BPDS	Batofenantrolinadisulfonato
BSA	Albumina di siero bovina
Cys	Cisteina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMA	Acido deossimugineico
dNTP	Nucleotidi trifosfato
DPNPasi	3'(2'),5'-difosfonucleoside 3'(2')-fosfoidrolasi
DTNB	Acido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico)
DTT	Ditiotreitolo
EDTA	Acido etilendiaminotetracetico
epi-HMA	Acido epi-idrossimugineico
GSH	Glutathione ridotto
HAc	Acido Acetico
HEPES	Acido 4-(2-idrossietil)-1-piperazina etansulfonico
IAA	Acido indolo-3-acetico
ICP-OES	Inductively coupled plasma - optical emission spectrometry
IDS	Iron deficiency specific genes
IRT	Iron regulate transporter
MA	Acido mugineico
MES	Acido 2-(N-morfolino)-etansulfonico
NA	Nicotianamina
NAAT	Nicotianamina-aminotransferasi
NAS	Nicotianamina sintasi
Nramp	Natural resistance associated macrophage protein

NS	Soluzione nutritiva
OAS	O-acetilserina
OASTL	O-acetilserina (tiol) liasi
p.f.	Peso fresco
p.s.	Peso secco
PAPS	3'- fosfoadenosina 5' fosfosolfata
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLC	Parkinson leaf cuvette
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
PPi	Pirofosfato inorganico
PS	Fitosiderofori,
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
PVPP	Polivinilpolipirrolidone
RT-PCR	Reverse translation - polymerase chain reaction
SAM	S-adenosil-metionina
SAMS	S-adenosil-metionina -sintasi
SOD	Superossidodismutasi
TRIS	Tris(idrossimetil)amminometano
UL	Unità di luce
YS	Yellow stripe
ZIP	Putative zinc transporter

1. INTRODUZIONE

La crescita e lo sviluppo delle piante dipendono strettamente da alcuni fattori ambientali quali l'acqua, l'anidride carbonica, la luce e, non ultimo, la disponibilità di elementi nutritivi essenziali. In particolare, un elemento viene definito essenziale quando la sua assenza impedisce il completamento del ciclo biologico di una pianta. Sulla base della loro concentrazione nei tessuti vegetali gli elementi essenziali sono suddivisi in macro e micronutrienti. I primi (C, H, O, N, P, S, Ca, Mg, K, Cl) sono presenti a concentrazioni maggiori di 1000 ppm e i secondi (Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo) a concentrazioni generalmente inferiori a 100 ppm (Marschner, 1995). La fonte principale di nutrienti per le piante è il suolo, in cui essi devono trovarsi in forma disponibile, cioè tali da poter essere assunti dalla pianta e metabolizzati all'interno dei tessuti vegetali. Per assicurare una crescita e uno sviluppo ottimale, macro e micronutrienti devono essere presenti in quantità adeguata e bilanciata corrispondente alla momentanea richiesta della pianta. Infatti, da un lato la disponibilità dei nutrienti nel suolo e la loro concentrazione nella soluzione è molto variabile nel tempo, dall'altro le esigenze nutrizionali delle piante si modificano nelle diverse fasi di crescita.

La variazione nei livelli dei nutrienti disponibili per le colture è uno dei fattori più limitanti per la produzione agricola e quindi aumentare la produttività delle colture attraverso il miglioramento della gestione della nutrizione minerale delle piante risulta essere una sfida complessa. Tuttavia, il raggiungimento di questo obiettivo è importante ed auspicabile alla luce dell'ipotizzato vertiginoso aumento della popolazione globale, che potrebbe raggiungere i sette bilioni già nel 2013.

L'incremento della produzione agricola può essere raggiunto attraverso una maggiore somministrazione di nutrienti alle colture o una maggiore efficienza di assorbimento degli stessi da parte delle piante.

Il ricorso a livelli elevati di fertilizzazione per superare le carenze nutrizionali non è tuttavia una soluzione sostenibile, sia dal punto di vista economico che da quello ambientale. Risulta quindi evidente la necessità di identificare e studiare quei

meccanismi che a livello del sistema suolo-pianta possono portare al miglioramento dell'efficienza agronomica dei nutrienti mantenendo elevati livelli produttivi. Tale obiettivo è tuttavia difficile da raggiungere ed esprime il concetto dell'efficienza d'uso dei nutrienti (NUE). Il maggior livello di efficienza viene raggiunto quando la somministrazione di minime quantità di nutrienti a suoli carenti è associata a rese produttive elevate.

L'ottimizzazione della produttività non deve però compromettere la qualità dei prodotti agricoli. Un importante sviluppo in questo settore della ricerca può essere rappresentato dall'idea di aumentare il contenuto di minerali essenziali per la dieta umana nei tessuti delle piante prima della loro raccolta (Poletti et al., 2004). L'attenzione è stata focalizzata soprattutto sui micronutrienti, che rappresentano un problema per la salute umana: circa 800 milioni di persone nel mondo evidenziano infatti patologie correlate a deficit di micronutrienti (Underwood, 2003). Alcuni di essi hanno assunto una maggiore importanza, in quanto sono più evidenti e gravi le manifestazioni carenziali, e tra questi lo iodio, il ferro e lo zinco.

In particolare, la carenza di ferro rappresenta uno dei maggiori disordini nutrizionali nel mondo e tale problema è ancora più grave in quelle popolazioni che ricavano il ferro per la dieta esclusivamente da alimenti vegetali o loro derivati, come ad esempio i cereali. La possibilità di aumentare il contenuto di ferro in queste piante (biofortificazione) potrebbe aiutare a risolvere questo grave problema per la salute umana (Guerinot e Salt, 2001).

Inoltre, la maggiore capacità delle piante di accumulare minerali potrebbe essere sfruttata anche ad altri scopi, come ad esempio la "phytoremediation". Pianta iperaccumulatrici di metalli potrebbero infatti essere utilizzate per risanare suoli inquinati. Attualmente sono note 45 famiglie di piante che contengono specie iperaccumulatrici di metalli quali Cu, Co, Cd, Mn, Ni, Se, o Zn a livelli da 100 a 1000 volte più alti del normale (Reeves e Baker, 2000).

Qualunque sia lo scopo, ottimizzare la produttività delle piante, migliorare la qualità dei prodotti agricoli o sfruttare le piante a fini ecologici, appare chiara la necessità di migliorare le conoscenze dei meccanismi preposti all'assimilazione dei nutrienti nelle piante.

Questo a sua volta implica la necessità di una maggiore comprensione dei rapporti che si stabiliscono tra la radice e il suolo e delle eventuali interazioni tra i processi metabolici dei vari nutrienti nella pianta.

1.1 IL FERRO

1.1.1 Il ferro nella pianta

Il ferro è un elemento indispensabile per la nutrizione minerale della pianta, in quanto è parte integrante di vari enzimi che intervengono in fondamentali processi biologici quali la fotosintesi, la respirazione, e la sintesi del DNA ed, inoltre, svolge un ruolo importante come cofattore di enzimi chiave coinvolti in processi di ossidoriduzione, di scissione dei perossidi, di fissazione simbiotica dell'azoto e nella sintesi di ormoni che controllano lo sviluppo della pianta e le sue risposte a variazioni ambientali. L'importanza del ferro deriva soprattutto dal fatto che questo elemento può esistere in due differenti stati redox: ridotto (Fe^{2+}) o ossidato (Fe^{3+}). Questa caratteristica gli permette di partecipare a numerose reazioni che prevedono il trasferimento di elettroni.

Nei tessuti vegetali il ferro raggiunge la concentrazione di $2 \mu\text{mol g}^{-1}$ p.s. (Marschner, 1995) ed è localizzato soprattutto nelle foglie, accumulato in prevalenza nei cloroplasti. Dato che il ferro nella cellula può precipitare o reagire con l'ossigeno generando specie nocive, esso si trova sempre in forma chelata con vari acidi organici oppure con aminoacidi, tra i quali la nicotianamina (NA), che rappresenta il principale chelante del ferro simplastico (Hell e Stephan, 2003). Inoltre, legato alla nicotianamina, il ferro viene trasportato anche a livello floematico (Takahashi et al., 2003).

Quando la concentrazione del ferro nelle cellule raggiunge livelli elevati o potenzialmente tossici, il metallo viene immagazzinato all'interno dei cloroplasti, non in forma libera, ma legato ad una proteina, la fitoferritina, la cui sintesi è indotta appunto dall'eccesso di ferro (Hell e Stephan, 2003).

La fitoferritina è una proteina cava contenente un cuore di ferro: ciascuna molecola può immagazzinare fino a 4500 atomi di ferro in forma solubile, non tossica e biodisponibile (Briat e Lobréaux, 1997). E' una proteina ubiquitaria: la sua

localizzazione non è confinata ai cloroplasti, ma può essere rilevata anche nello xilema e nel floema. E' abbondante nei semi, dove viene degradata durante la germinazione, e funge da donatrice di ferro per la sintesi di proteine coinvolte nella fotosintesi, e per la sintesi del gruppo eme durante lo sviluppo dei noduli delle leguminose (Briat e Lobréaux, 1997). La sintesi della fitoferritina viene stimolata da processi endogeni, quali la maturazione dei semi, ma anche da vari stress, quali l'esposizione a ozono e ad elevate concentrazioni di ferro che provocano stress ossidativi (Seckbach, 1982).

Oltre alla fitoferritina, le altre proteine contenenti ferro vengono generalmente suddivise in due gruppi: le emoproteine, caratterizzate dalla presenza del gruppo eme, e le Fe-S proteine, in cui l'atomo di ferro è coordinato con un gruppo tiolico cisteinico oppure è inserito in un cluster con zolfo inorganico (Fig. 1.1) (Marschner, 1995).

Tra le emoproteine, le più conosciute sono i citocromi, che contengono un complesso eme Fe-porfirina che funziona da gruppo prostetico. I citocromi sono costituenti di sistemi redox a livello dei cloroplasti nei fotosistemi I e II (PSI e PSII) e dei mitocondri nella catena respiratoria. In questi sistemi viene sfruttata la capacità del ferro di cambiare stato di ossidazione da Fe(III) a Fe(II) e quindi di trasportare elettroni con conseguente trasferimento di energia. Altre emoproteine sono rappresentate dalla leghemoglobina, dalle catalasi e dalle perossidasi. La leghemoglobina è una proteina emica in grado di legare ossigeno e svolge un ruolo importante nel processo dell'azotofissazione biologica. Essa regola la concentrazione di ossigeno all'interno del nodulo radicale permettendo la respirazione del batteroide e contemporaneamente limitando la presenza di ossigeno libero che inibisce l'enzima nitrogenasi il quale catalizza il processo di fissazione dell'azoto. Catalasi e perossidasi sono invece enzimi coinvolti nei processi di detossificazione delle specie reattive e tossiche dell'ossigeno prodotte durante stress ossidativi, nel caso particolare di questi enzimi il substrato è l' H_2O_2 .

La più nota tra le proteine Fe-S è invece la ferredossina. Questa proteina esiste in due forme, ossidata e ridotta, ed il suo ruolo biologico è legato alla capacità di interconversione tra le due forme. La ferredossina, ad esempio, è coinvolta nella fase

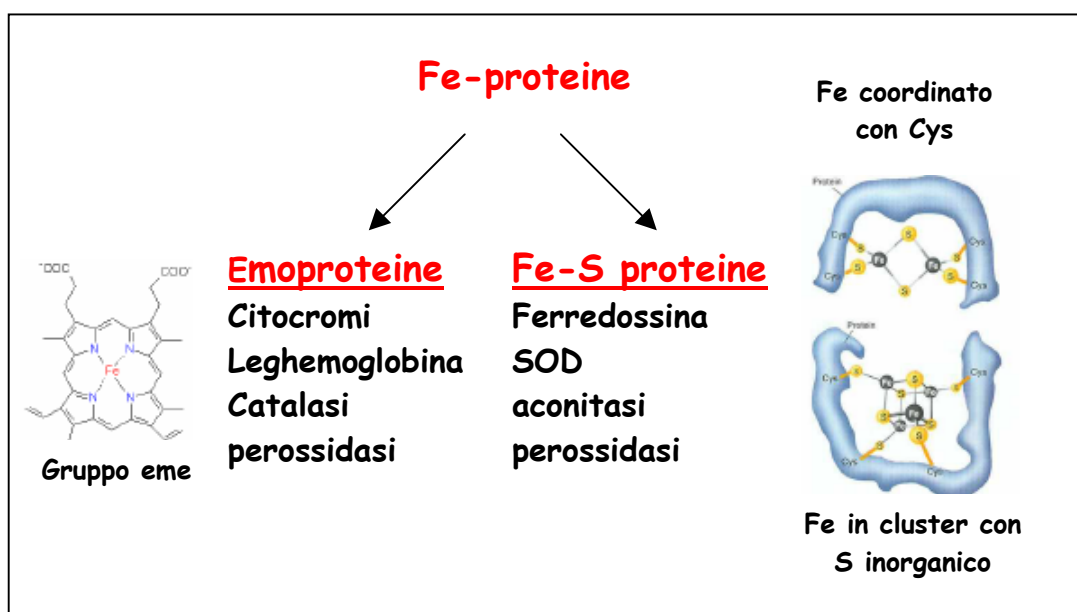


Fig. 1.1 : Le proteine contenenti ferro si dividono in emoproteine e Fe-S proteine: nelle prime il ferro è inserito in un gruppo eme, nelle seconde il ferro può essere coordinato con un gruppo tiolico cisteinico o può trovarsi in un cluster con zolfo inorganico.

luminosa della fotosintesi come trasportatrice di elettroni: agisce infatti da accettore del P_{700} del PSI ed è quindi il primo dei componenti della catena redox che porta alla riduzione del $NADP^+$. Inoltre, questa proteina ha un ruolo importante come donatrice di elettroni, sia nel processo di assimilazione del nitrato, ed in particolare nella reazione di riduzione del nitrato ad ammoniaca in cui cede elettroni alla nitrito riduttasi, che nel processo di assimilazione dello zolfo, in cui dona elettroni per la riduzione del solfito a solfuro, importante per la sintesi degli amminoacidi solforati cisteina e metionina. Altri esempi di proteine Fe-S sono la superossidodismutasi (SOD), che agisce nella conversione dei radicali dell'ossigeno altamente tossici in H_2O_2 , e l'aconitasi, che catalizza l'isomerizzazione del citrato a isocitrato nel ciclo degli acidi tricarbossilici. In quest'ultimo caso la catalisi non è legata alla variazione dello stato di ossidazione del ferro, tuttavia questo metallo è direttamente coinvolto in quanto il cluster in cui è contenuto è responsabile dell'orientamento spaziale del substrato (citrato-isocitrato).

Oltre a queste due classi di proteine contenenti ferro, esiste un gruppo di proteine meno caratterizzate nelle quali il ferro agisce o come componente metallico in reazioni redox oppure come elemento che media il legame tra enzima e substrato (Marschner, 1995). Tra queste la lipossigenasi, coinvolta nella perossidazione dei lipidi durante la senescenza e nella risposta delle piante ai patogeni, che contiene un atomo di ferro.

Il primo sintomo caratteristico evidenziabile in una pianta Fe-carente è la comparsa di clorosi fogliare che interessa principalmente le foglie più giovani, essendo il ferro un elemento poco mobile nella pianta (Fig. 1.2). L'insorgenza della clorosi ferrica è determinata dal fatto che il ferro è necessario per la funzionalità di una serie di proteine coinvolte nel complesso processo biosintetico che porta alla biosintesi di clorofilla. In particolare, la sintesi dell'acido δ -aminolevulinico (ALA), precursore della clorofilla, è regolata dalla presenza del ferro (Pushnik e Miller, 1989) ed, inoltre, il ferro è necessario per la sintesi della protoclorofillide dalla Mg-protoporfirina. Infine, nelle membrane tilacoidali sono necessari venti atomi di ferro per unità fotosintetica nella catena di trasporto degli elettroni del PSII e del PSI (Terry e Abadia, 1986; Rutherford, 1989; Abadia e Abadia, 1993). Tali disturbi metabolici indotti dalla Fe-carenza portano alla disorganizzazione dei cloroplasti, che



Fig. 1.2: La comparsa di clorosi fogliare è un sintomo caratteristico delle piante che crescono in condizioni di carenza di ferro. La clorosi interessa principalmente le foglie più giovani in quanto il ferro è un elemento scarsamente mobile nella pianta.

si manifesta con la diminuzione del numero delle unità fotosintetiche, di granuli e lamelle stromali del cloroplasto, ed inoltre con la diminuzione del numero di tilacoidi per granum (Spiller e Terry, 1980; Terry, 1980). Nelle piante C₄, la ferro carenza influenza più marcatamente la struttura dei cloroplasti delle cellule del mesofillo rispetto a quella dei cloroplasti delle cellule della guaina del fascio (Stocking, 1975). La conseguenza più immediata di questi eventi è una minore velocità di fotosintesi nelle piante Fe-carenti associata a un minor contenuto di amido e zuccheri nei tessuti (Arulanantham et al., 1990).

Anche la morfologia dell'apparato radicale può subire delle modificazioni in risposta alla carenza di ferro: in particolare, si osserva un decremento della lunghezza delle radici laterali e la formazione di molti peli radicali (Römheld e Marschner, 1981; López-Bucio et al., 2003). In molte specie vegetali compaiono inoltre degli ispessimenti degli apici radicali dovuti ad un rigonfiamento delle cellule corticali e all'aumento della divisione cellulare nel rizoderma e nell'ipoderma (Römheld e Marschner, 1981). Infine, nelle dicotiledoni si può verificare la comparsa, in condizioni di Fe-carenza, di cellule parenchimatose con un citoplasma denso, numerosi mitocondri, un esteso reticolo endoplasmatico e molte invaginazioni della parete cellulare, che vengono dette cellule "transfer" (Offler et al., 2003). La presenza di queste invaginazioni aumenta la superficie del plasmalemma, determinando un alto apporto area/volume in queste cellule e favorendo l'assorbimento dei nutrienti minerali. La loro formazione sembrerebbe quindi un meccanismo attuato per aumentare la velocità di trasporto dei soluti tra apoplasto e simplasto. Questa ipotesi è supportata dal fatto che nelle invaginazioni del plasmalemma c'è una maggiore presenza di H⁺ATPasi, enzimi che generano la forza proton-motrice necessaria per l'assorbimento dei nutrienti all'interno delle cellule radicali (Renault et al., 1989; Harrington et al., 1997).

1.1.2 Il ferro nel suolo

Il ferro è presente in grande abbondanza nel suolo e nella crosta terrestre, dove occupa il quarto posto per contenuto percentuale, dopo ossigeno, silicio e alluminio (Louet, 1986). Non è quindi certamente la mancanza di ferro a provocare fenomeni di carenza, quanto quella di forme assimilabili per la vegetazione.

Nel suolo il ferro è presente in tre forme principali: il ferro incluso nei reticoli cristallini di minerali primari e secondari, il ferro solubile e il ferro legato alla sostanza organica. La disponibilità nel suolo e nella rizosfera è pertanto dipendente dalla sua concentrazione del ferro nella soluzione circolante e dalla capacità della fase solida di rifornire la fase liquida di forme solubili attraverso equilibri che si stabiliscono tra i processi di solubilizzazione/precipitazione e dissociazione/formazione di complessi.

Nell'ambito dei minerali primari, il ferro è presente soprattutto come Fe(II) in forma di silicati quali l'olivina, l'augite e la biotite (Segalen, 1964; Louet, 1986; Schwertmann e Taylor, 1989). La degradazione di questi minerali grazie alla presenza di acqua e ossigeno atmosferico e all'attività di organismi viventi, come le piante (Hinsinger et al., 2001) e i microrganismi (Brantley et al., 1999), porta al rilascio di ioni Fe(II) e Fe(III), che tuttavia precipitano portando alla formazione di minerali secondari quali gli ossidi di ferro (ematite, magnetite, ghetite, lepidocrocite) e minerali meno organizzati, come la ferridrite (Segalen, 1964; Cornell e Schwertmann, 1996).

Nei suoli areati, i minerali secondari contengono principalmente Fe(III). La loro solubilità è strettamente legata ai processi di solubilizzazione e precipitazione attraverso equilibri che sono funzione del pH e del potenziale di ossidoriduzione del suolo. In particolare, la concentrazione del ferro solubile diminuisce all'aumentare del pH ed è generalmente più bassa di 10^{-10} a pH 7 (Lindsay e Schwab, 1982). Inoltre, quando prevalgono le condizioni ossidanti, vale a dire nella maggior parte dei suoli, la concentrazione del Fe(II) è minore rispetto a quella del Fe(III), eccetto nei suoli fortemente alcalini (Lyndsay, 1979).

La disponibilità del ferro è influenzata anche dalla complessazione o chelazione del metallo con la sostanza organica. Si stima che circa il 95% del ferro nella soluzione circolante del suolo sia presente in forma chelata (Van Hees e Lundström, 2000). Sono coinvolti in questo processo composti chelanti a bassa affinità, quali acidi fenolici, carbossilici, ossalici e citrici (Jones et al., 1996; Jones, 1998; Reichard et al., 2005), prodotti da organismi vegetali e microbici, ed altri ad alta affinità, quali i siderofori microbici, i fitosiderofori e le sostanze umiche.

In particolare, le sostanze umiche presentano un elevato contenuto di gruppi funzionali contenenti ossigeno che favoriscono la formazione di complessi stabili con il ferro ad elevati valori di pH (Stevenson, 1994; Chen, 1996). In questo modo si previene la precipitazione del metallo che porta alla diminuzione della solubilità del minerale (Schwertmann, 1991; Cesco et al., 2000; Varanini e Pinton, 2001). E' stato inoltre dimostrato che il ferro legato alle sostanze umiche è disponibile per la pianta (Lobartini e Oriolo, 1988; Chen e Aviad, 1990; Varanini e Pinton, 1995, 2001; Pinton et al., 1998; Cesco et al., 2002).

Quindi, sebbene in alcune particolari condizioni (ad esempio nei terreni sommersi) il ferro possa essere eccessivamente disponibile per le piante, nei terreni ben areati a pH neutro o alcalini, il micronutriente è spesso presente in forma disponibile in quantità tale da non soddisfare i fabbisogni della coltura.

Il ferro biodisponibile è definito come la porzione del ferro totale che può essere facilmente assimilata dagli organismi viventi. Le piante assorbono il ferro dal terreno mediante l'apparato radicale e necessitano di concentrazioni del nutriente pari a 10^{-4} - 10^{-8} M nel suolo. L'unica forma cationica che viene significativamente assorbita dalle radici, attraverso dei trasportatori specifici è quella ferrosa. Tuttavia, nel terreno il ferro, come abbiamo visto, è principalmente presente nello stato ossidato e risulta fortemente insolubile. E' quindi evidente la difficoltà della pianta ad ottenere questo nutriente dal suolo. Come accennato, il problema si acuisce nei terreni calcarei dove il pH è elevato e la precipitazione del ferro è chimicamente favorita.

Le piante hanno pertanto sviluppato due diversi meccanismi per rispondere a situazioni di Fe-carezza ed, in base alla strategia adottata, vengono distinte in due gruppi: quello delle piante a Strategia I, che sono in grado di acidificare la rizosfera per ottenere la mobilizzazione del Fe(III), che viene reso così disponibile per la riduzione a Fe(II) (Fig. 1.3), e quello delle piante a Strategia II, che invece secernono essudati che agiscono da chelanti per il Fe(III) (Marschner et al., 1986; Römheld, 1987) (Fig. 1.5). In entrambi i casi la risposta della pianta allo stress è confinata a livello degli apici radicali (Römheld, 1987).

1.1.3 La Strategia I

Il meccanismo della Strategia I è utilizzato da tutte le piante mono e dicotiledoni, eccetto le graminacee (Fig. 1.3). Queste piante rispondono alla Fe-carenza aumentando l'acidificazione delle zone di terreno circostanti la radice (rizosfera) e l'attività di riduzione dei complessi ferrici (Schmidt, 1999). L'intensificazione dell'acidificazione della rizosfera è da imputare all'attivazione di pompe H^+ATP asiche di tipo P associate al plasmalemma delle cellule radicali. Queste proteine sono normalmente coinvolte nel mantenimento del potenziale di membrana, nel controllo del pH sia citoplasmatico che apoplastico, nonché nel generare gradienti protonici che vengono sfruttati per il trasporto di numerosi soluti (Palmgren e Harper, 1999). La loro attività viene indotta da situazioni di carenza di ferro (Dell'Orto et al., 2000; Schmidt et al., 2003) con conseguente aumento del rilascio dei protoni nella rizosfera che porta alla diminuzione del pH. In tale condizione l'equilibrio della reazione di formazione degli ossidi ferrici si sposta verso i prodotti per cui si avrà una maggiore quantità di Fe(III) libero che può essere complessato e successivamente ridotto a Fe(II) (Schwertmann, 1991). E' stato suggerito che l'aumento dell'acidificazione della rizosfera sia dovuto all'espressione di una specifica isoforma dell' H^+ATP asi (Santi et al., 2005).

Come detto precedentemente, la Fe-carenza può determinare modificazioni morfologiche a carico dell'apparato radicale, tra cui la formazione di cellule transfer caratterizzate da una elevata densità di pompe protoniche. Appare quindi logico supporre che la formazione di queste cellule e l'aumento dell'acidificazione siano eventi correlati. Tuttavia, è stato dimostrato che tali cellule contribuiscono, ma non sono indispensabili, all'acidificazione della rizosfera in condizioni di Fe-carenza ed inoltre, che la loro formazione e l'attività H^+ATP asica rispondono a stimoli diversi (Schmidt et al, 2003).

La capacità di ridurre il Fe(III) a Fe(II) è invece ascrivibile a proteine di membrana che agiscono da riduttasi NADH-dipendenti, dette Fe(III)-riduttasi, la cui attività risulta stimolata dalla diminuzione del pH indotta dall'attivazione delle pompe protoniche (Toulon et al., 1992). Non è ancora chiaro se nel meccanismo di risposta alla Fe-carenza siano coinvolte delle proteine sintetizzate *de novo* o modificate, dette riduttasi "turbo", come proposto da Bienfait (1985), o delle riduttasi

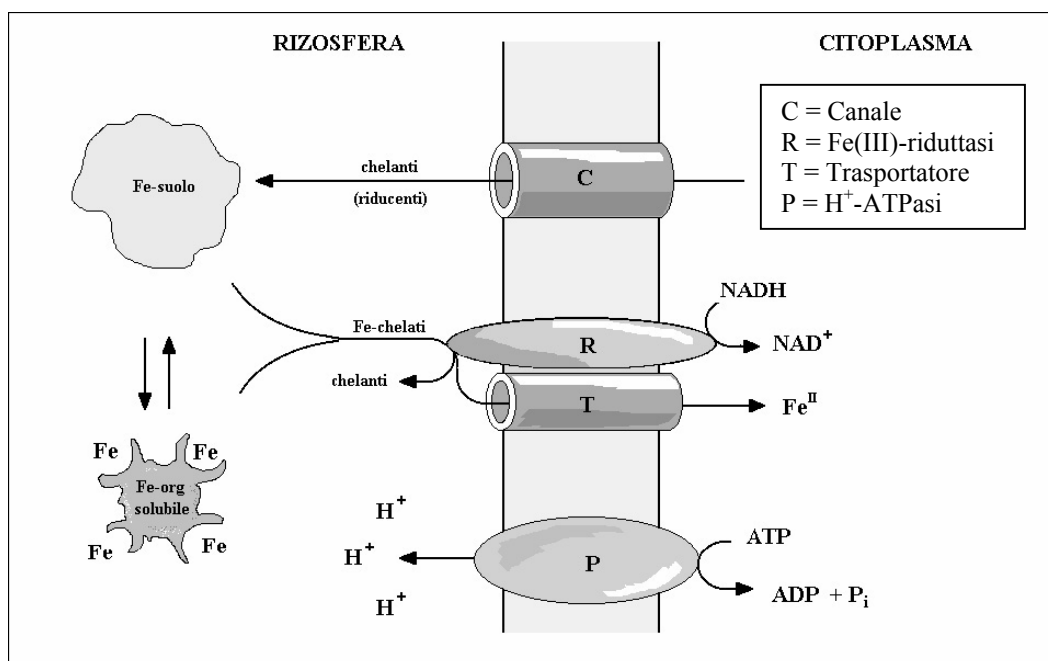


Fig. 1.3 : Rappresentazione schematica del meccanismo di risposta alla Fe-carezza delle piante a Strategia I.

esprese costitutivamente e attivate dallo stress (Schmidt, 1999). Alcuni autori (Robinson et al., 1999) propendono a favore della seconda ipotesi ed, in particolare, hanno identificato un gene che codifica per la Fe(III)-riduttasi (*FRO2*) espresso costitutivamente, ma sovraespresso in condizioni di stress da carenza di ferro. Il gene è sottoposto a controllo sia trascrizionale che post-trascrizionale (Connolly et al., 2003).

Il ferro ridotto prodotto da queste riduttasi viene legato e trasportato all'interno della cellula da trasportatori specifici per il Fe(II). La capacità di assorbimento e traslocazione del ferro risulta fortemente aumentata in condizioni di carenza di questo nutriente (Römheld e Kramer, 1983; Yi e Guerinot, 1996), ma non è ancora chiaro se tale aumento sia semplicemente correlato all'aumento della riduzione del Fe(III) a Fe(II) (Schmidt, 1999).

Le proteine responsabili del trasporto del ferro nelle piante a Strategia I appartengono a due famiglie diverse. La prima è rappresentata dalla famiglia Nramp (Natural resistance associated macrophage protein) ed è stata studiata in *Arabidopsis*: alcune proteine di questa famiglia sono regolate dalla carenza di ferro e possono complementare un mutante di lievito per l'acquisizione del nutriente (Curie et al., 2000). Tuttavia, non ci sono ancora dati che indicano se questi trasportatori siano coinvolti nell'acquisizione del ferro dal suolo o se contribuiscano solo alla compartimentalizzazione del ferro all'interno della pianta (Curie e Briat, 2003). La famiglia genica ZIP (Putative Zinc Transporter) è la seconda classe di trasportatori di metalli coinvolti nel trasporto del ferro. In *Arabidopsis* sono stati identificati due membri di questa famiglia, *IRT1* e *IRT2* (iron regulate transporter), che sono espressi preferenzialmente nelle radici e sono trascrizionalmente indotti in condizioni di Fe-carenza (Eide et al., 1996; Vert et al., 2001). Ortologi di *IRT1* e *IRT2* sono stati clonati anche nel pomodoro e nel pisello (Eckhardt et al., 2001; Cohen et al., 2004). Diversi autori hanno dimostrato che *IRT1* è controllato a differenti livelli. Sia nel pomodoro che in *Arabidopsis* la regolazione trascrizionale è dipendente da fattori di trascrizione di tipo bHLH (basic helix-loop-helix), in particolare FRU1/FIT1 in *Arabidopsis* e FER nel pomodoro (Colangelo e Guerinot, 2004; Jackoby et al., 2004; Ling et al., 2002). Inoltre, la stabilità della proteina IRT1 regola anche l'assorbimento del ferro. Infatti, in *Arabidopsis* questa proteina viene velocemente

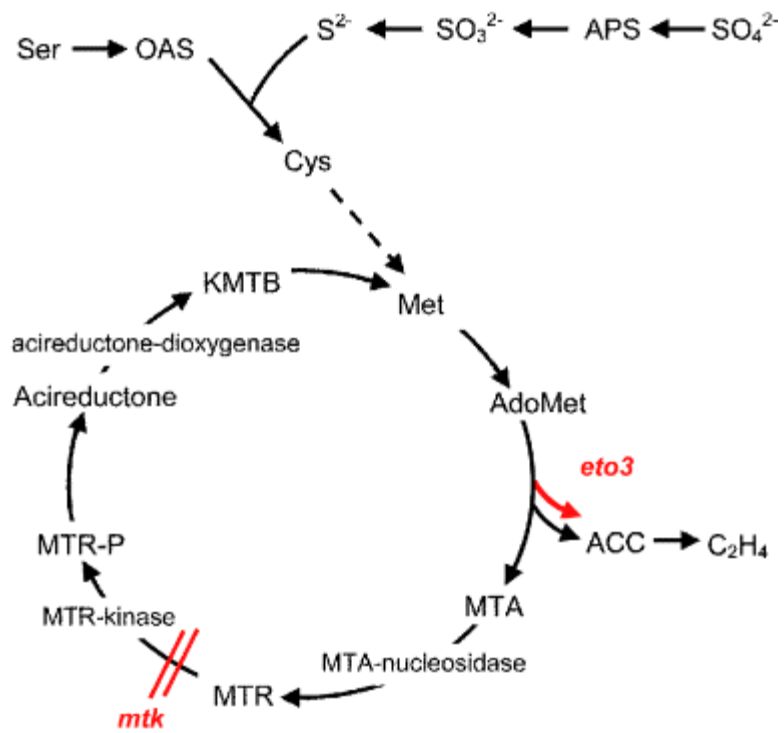
degradata in presenza di alti livelli di ferro, probabilmente per evitare l'accumulo del metallo in quantità tossica (Connolly et al., 2002). Infine, uno studio recente sul trasportatore LeIRT1 ha dimostrato che la regolazione di questa proteina è soggetta a segnali sia locali che sistemici (Schikora et al., 2006) ed, inoltre, è stato dimostrato che in *Arabidopsis* il gene *IRT1* è regolato in maniera coordinata con il gene *FRO2* (Connolly et al., 2003).

L'osservazione che le radici delle piante soggette a Fe-carenza spesso presentano diverse modificazioni morfologiche suggerisce il coinvolgimento di alcuni ormoni, quali l'auxina e l'etilene, nella regolazione delle risposte a questo stress.

L'auxina è coinvolta in molti processi cellulari, quali la regolazione della crescita, la differenziazione vascolare e la differenziazione delle radici laterali. L'auxina endogena maggiormente rappresentata è l'acido indolo-3-acetico (IAA). L'auxina viene trasportata nella pianta attraverso due vie: una veloce bidirezionale nel floema e una più lenta unidirezionale nello xilema, conosciuta come trasporto polare dell'auxina (Friml e Palme, 2002).

D'altra parte, l'etilene è coinvolto in processi quali la germinazione dei semi, la senescenza dei fiori, l'abscissione e la maturazione dei frutti. La produzione di etilene è strettamente regolata da segnali interni prodotti in risposta a stress biotici, come l'attacco di un patogeno, o abiotici come stress meccanici, ipossia, esposizione a elevate concentrazioni di ozono e disordini nutrizionali (Morgan e Drew, 1997). L'etilene viene sintetizzato utilizzando come precursore la L-metionina, che viene convertita in S-adenosil-metionina (SAM), che a sua volta è convertita in acido 1-aminociclopropano-1-carbossilico (ACC), nella reazione catalizzata dall'enzima ACC sintasi. Nella fase finale, l'ACC viene trasformato in etilene mediante l'enzima ACC ossidasi. La metionina necessaria per la sintesi dell'etilene viene fornita attraverso il ciclo della metionina, o ciclo di Yang (Yang e Hoffman, 1984) (Fig. 1.4). L'etilene, essendo un gas, non è molto mobile all'interno della pianta; tuttavia, il suo precursore, l'ACC, si sposta facilmente sia per via floematica che xilematica (Finlayson et. al., 1991).

La formazione dei peli radicali e delle cellule transfer in risposta alla Fe-carenza nelle piante a Strategia I risulta regolata sia dall'auxina che dall'etilene (Römheld e Marschner, 1986; Tanimoto et al., 1995). Inoltre, è stata evidenziata una interazione



da Bürstenbinder et al. (2007) *The Plant J.*

Fig. 1.4: Il precursore della biosintesi dell'etilene è la metionina che viene fornita al processo dal ciclo di Yang.

tra i due ormoni (Masucci et al., 1994): alti livelli di auxina promuovono la sintesi dell'ACC-sintetasi (Yu e Yang, 1979) e, d'altra parte, l'etilene può influenzare l'accumulo dell'auxina e il suo trasporto polare (Swarup et al., 2002).

Oltre che nelle risposte di tipo morfologico, è stato ipotizzato il coinvolgimento di entrambi gli ormoni nelle risposte fisiologiche alla Fe-carenza. In tali condizioni infatti si osserva un aumento nei livelli di questi ormoni: l'auxina probabilmente a causa del suo ruolo

nella stimolazione dell'acidificazione della rizosfera, l'etilene probabilmente a causa del suo coinvolgimento nello sviluppo delle risposte alla Fe-carenza. In particolare, esperimenti condotti mediante l'applicazione di inibitori della sintesi dell'etilene hanno mostrato la mancata induzione di tutti i componenti della risposta alla Fe-carenza nel cetriolo, tra i quali la capacità di ridurre il ferro ferrico (Romera e Alcántara, 1994) e di acidificare il mezzo esterno (Romera e Alcántara, 2004).

Tuttavia, questa ipotesi è ancora oggetto di discussione (Romera et al., 2006), in quanto esperimenti condotti con mutanti “non sensibili all'auxina e non sensibili all'etilene” mostrano che questi sono comunque in grado di incrementare la loro capacità di ridurre il Fe(III) (Schmidt et al., 2000).

1.1.4 La Strategia II

In passato, le graminacee sono state definite Fe-inefficienti (Olsen e Brown, 1980) poiché il meccanismo di acquisizione del ferro delle piante a Strategia I è stato il primo ad essere scoperto e le graminacee non solo non risultavano incapaci di ridurre i chelati ferrici. Successivamente, è stato individuato il meccanismo utilizzato da queste piante per facilitare l'acquisizione del ferro, detto Strategia II, e alla luce di questa scoperta le graminacee non appaiono inefficienti nell'assimilazione del ferro, ma la loro strategia presenta addirittura alcuni vantaggi ecologici, visto che sfrutta la forma più abbondante di ferro nel terreno, cioè quella ossidata, e non risulta quindi inibita da valori di pH del terreno fortemente basici.

In particolare, il meccanismo della Strategia II prevede la secrezione nella rizosfera di essudati contenenti composti chelanti altamente specifici, detti fitosiderofori (PS), che legano il Fe(III) presente nel suolo sotto forma di ferro idrossido o fosfato (Fig. 1.5). I complessi Fe-PS vengono quindi trasportati all'interno della radice da

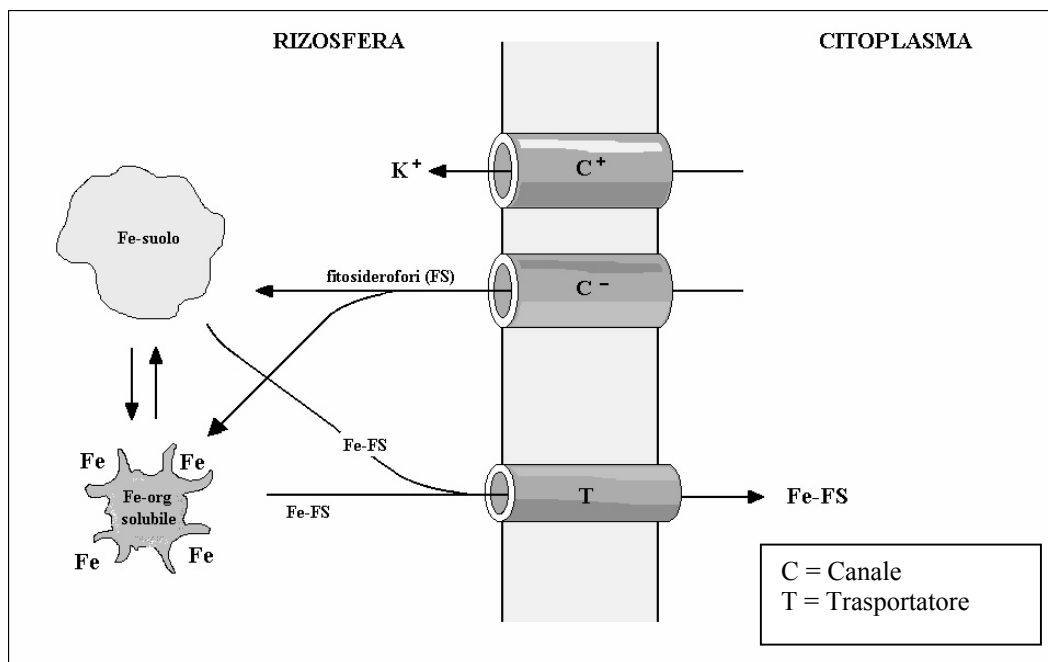


Fig. 1.5: Rappresentazione schematica del meccanismo di risposta alla Fe-carenza delle piante a Strategia II.

specifici trasportatori (Mori, 2001). I fitosiderofori sono aminoacidi non proteinogenici a basso peso molecolare (PM 294-336) caratterizzati dalla presenza di ligandi α -idrossicarbossilati e α -amminocarbossilati e contenenti sei gruppi funzionali che giocano un ruolo cruciale nella chelazione e nell'assorbimento del ferro (Murata et al., 2006) (Fig. 1.6). La capacità di secernere quantità elevate di fitosiderofori è stata associata in molte graminacee al grado di tolleranza alla Fe-carenza. L'ordine di tolleranza della Fe-carenza è il seguente: orzo > segale > avena > frumento > sorgo = mais = riso (Römheld, 1987).

Tra i fitosiderofori, hanno ricevuto la maggior attenzione quelli appartenenti alla famiglia dell'acido mugineico (MA), che vengono sintetizzati a partire da un solo precursore comune che è la L-metionina (Mori and Nishizawa, 1987) e il ciclo della metionina, o ciclo di Yang (Yang e Hoffman, 1984) (Fig. 1.7), è stato proposto come fonte di metionina per questo processo (Ma et al., 1995). In particolare, dalla metionina si forma il primo intermedio della biosintesi dei fitosiderofori, la S-adenosilmetionina (SAM), nella reazione catalizzata dall'enzima SAM-sintasi (SAMS). Successivamente, l'enzima nicotianamina sintasi (NAS) combina tre molecole di SAM per formare una molecola di nicotianamina (NA), che è quindi convertita in 3''-chetoacido dalla nicotianamina-aminotransferasi (NAAT). Infine, una riduttasi, la DMA-sintasi, catalizza la reazione di sintesi dell'acido deossimugineico (DMA), il primo tipo di fitosideroforo prodotto. Attraverso la trasformazione del DMA si formano tutti gli altri fitosiderofori della stessa famiglia (Ma et al., 1995). Ad oggi, i fitosiderofori appartenenti alla famiglia dell'MA sono gli unici ad essere stati identificati. In particolare, sono stati isolati nove analoghi dell'MA identificati in varie specie e cultivars di graminacee (Ma, 2005) e molti dei geni coinvolti nel processo biosintetico dei fitosiderofori sono stati clonati. In particolare, sono stati clonati tre geni che codificano per la SAMS (Takizawa et al., 1996), tutti costitutivamente espressi e non inducibili dalla carenza di ferro. Inoltre, sono stati isolati due geni codificanti per la proteina NAAT, *NAATA* e *NAATB* (Takahashi et al., 1999), il primo espresso esclusivamente in condizioni di carenza di ferro e il secondo espresso costitutivamente, ma comunque indotto dalla carenza di ferro. Infine, è stato clonato il gene *HvNAS1-7* codificante per l'enzima NAS (Higuchi et al., 1999) ed i geni *IDS1* e *IDS3* (iron deficiency specific genes)

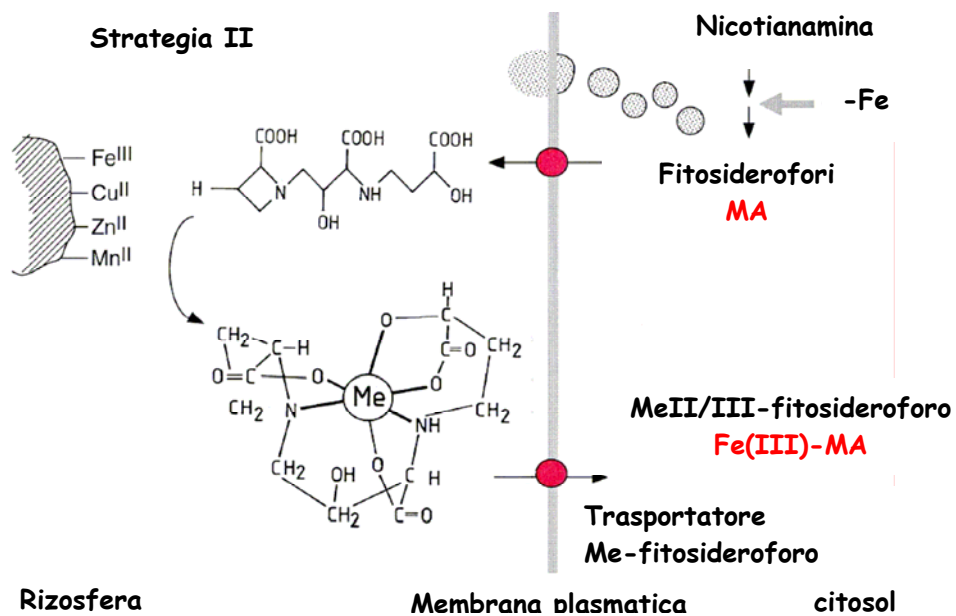
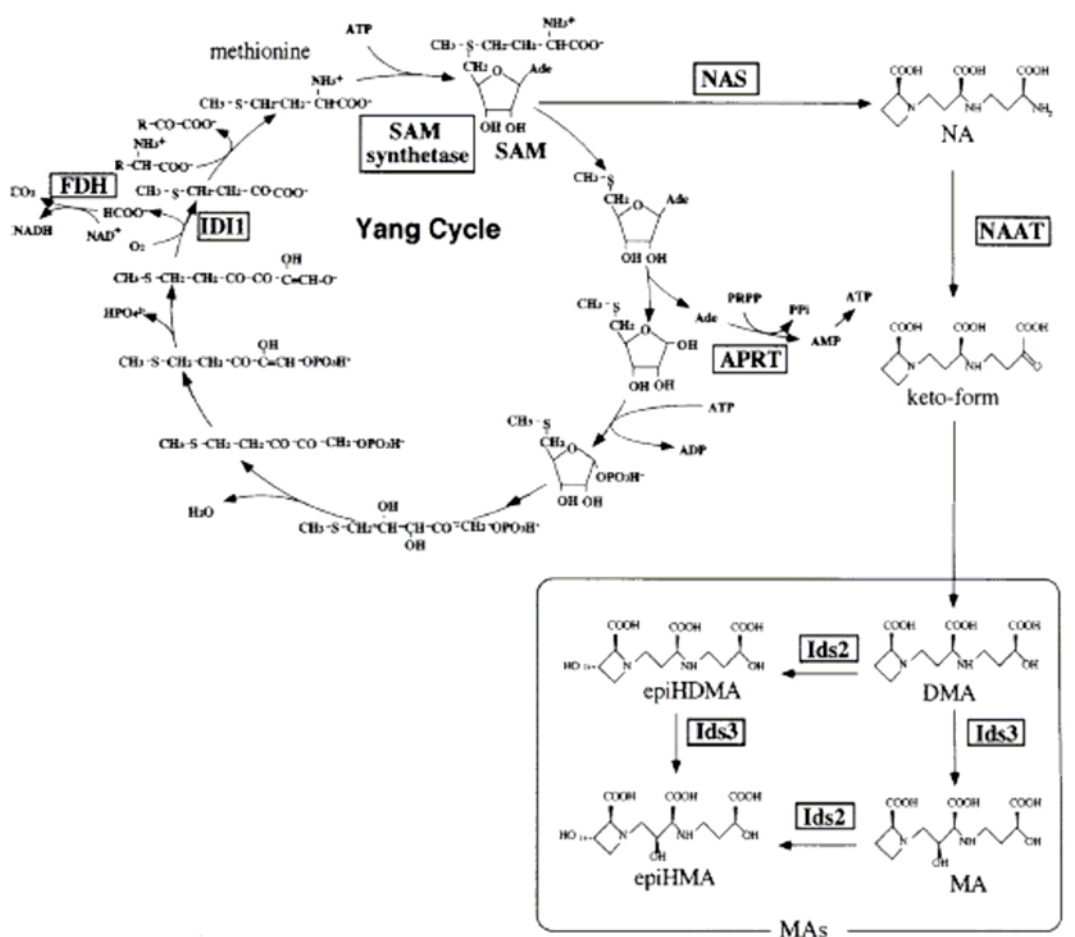


Fig. 1.6: Le piante a Strategia II secernono composti chelanti il Fe(III) detti fitosiderofori. I fitosiderofori sono aminoacidi non proteinogenici a basso peso molecolare caratterizzati dalla presenza di ligandi α -amminocarbossilati e α -idrossicarbossilati e contenenti sei gruppi funzionali fondamentali per il processo di chelazione dei metalli.



da Negishi et al. (2002) *The Plant J.*

Fig. 1.7: I fitosiderofori della famiglia dell'MA vengono sintetizzati a partire da un precursore comune che è rappresentato dalla metionina la quale viene fornita dal ciclo di Yang.

(Okumura et al., 1991; Nakanishi et al., 1993) che codificano per due deossigenasi che idrossilano l'MA in posizione C-3 e C-2 ed è stato dimostrato che tutti questi geni sono specificamente indotti nelle radici in condizioni di Fe-carenza.

E' stato recentemente dimostrato che in radici di orzo Fe-carenti si ha un incremento della sintesi della metionina per transulfurazione, attraverso la sintesi di omocisteina, probabilmente per far fronte all'aumentata richiesta di questo precursore per la sintesi dei fitosiderofori (Negishi et al., 2002). Altri autori (Nakanishi et al., 1999), utilizzando metionina marcata con ^{14}C e studiando le immagini in tempo reale del trasporto della metionina in piante di orzo Fe-carenti, hanno dimostrato che la metionina sintetizzata nella parte epigea della pianta non viene utilizzata per la sintesi dei fitosiderofori nelle radici; si ipotizza piuttosto che siano molecole di ATP prodotte da fotoassimilati o direttamente trasportate dalla parte superiore della pianta alle radici, i precursori per la costruzione dello scheletro della metionina nel ciclo di Yang. Tuttavia, non può essere escluso che anche i tioli prodotti nella parte epigea della pianta possano essere utilizzati come fonte di zolfo ridotto per la sintesi della metionina nelle radici.

La secrezione dei fitosiderofori è influenzata da fattori ambientali quali la luce e la temperatura. In particolare, nell'orzo il processo mostra un distinto ritmo circadiano, con un picco di secrezione a 2-3 h dall'inizio del periodo di luce (Takagi et al., 1984). La secrezione è controllata anche dalla temperatura, il picco compare 3-6 h dall'inizio del periodo di luce, a seconda della specie, quando la temperatura si aggira intorno ai 20°C, scompare a basse temperature (<10°C) e viene anticipato a temperature più elevate (30°C) (Ma et al., 2003).

La secrezione dei fitosiderofori avviene probabilmente attraverso canali anionici sfruttando un gradiente di potassio tra il citoplasma e l'esterno della cellula. Tale ipotesi è stata suggerita da esperimenti in cui si osservava una diminuzione del rilascio dei fitosiderofori quando le radici erano trattate con un inibitore dei canali anionici o con la valinomicina, ionoforo che altera il gradiente di potassio transmembrana (Sakaguchi et al., 1999).

Alcuni autori hanno ipotizzato che la sintesi dei fitosiderofori avvenga all'interno di particolari vescicole, probabilmente originatesi dal reticolo endoplasmatico, avendo osservato un aumento della grandezza e del numero di queste vescicole appena prima

dell'inizio della secrezione dei fitosiderofori nelle cellule dell'epidermide di radici Fe-carenti (Negishi et al., 2002). A conferma di tale ipotesi anche la dimostrata localizzazione nelle stesse vescicole degli enzimi NAS e NAAT coinvolti, come detto precedentemente, nella sintesi dei fitosiderofori (Negishi et al., 2002).

Una volta formati nella rizosfera, i complessi Fe-PS vengono trasportati nella forma indissociata all'interno delle radici. Il trasporto avviene attraverso la corteccia delle cellule radicali (Römheld e Marschner, 1986) ed è mediato da uno specifico trasportatore. In particolare, nel mais è stato clonato un trasportatore per i complessi Fe-PS, denominato yellow stripe 1 (YS1), dal nome del fenotipo del mutante di mais inefficiente nell'assorbimento dei fitosiderofori, e classificato come membro della famiglia dei trasportatori oligopeptidici (Curie et al., 2001). Questo trasportatore risulta essere fortemente indotto dalla Fe-carenza. La caratterizzazione della proteina codificata da questo gene, detta ZmYS1, ha rivelato che si tratta di un trasportatore che agisce da co-trasportatore H^+ /Fe-PS (Shaaf et al., 2004) e presenta una vasta specificità sia per i metalli che per i ligandi. In particolare, l'espressione eterologa di ZmYS1 nel lievito e negli oociti di *Xenopus* mostra che la proteina può trasportare, oltre al ferro, altri metalli legati ai fitosiderofori quali lo zinco, il rame e il nichel. Anche nell'orzo è stato identificato un gene codificante per un trasportatore dei complessi Fe-PS, denominato HvYS1 (Murata et al., 2006). Questo gene è preferenzialmente espresso a livello radicale e la sua espressione è stimolata dalla Fe-carenza. La proteina, come anche l'mRNA, sono specificamente localizzati nelle cellule dell'epidermide e la proteina sembra essere in grado di trasportare l'MA, ma non la NA. L'espressione eterologa di HvYS1 negli oociti di *Xenopus* ha mostrato che questo trasportatore di orzo, a differenza di quello isolato nel mais, presenta una elevata specificità di ligando e substrato in quanto è in grado di trasportare solo ed unicamente il ferro legato ai fitosiderofori.

Un'eccezione nell'ambito delle piante a Strategia II è rappresentata dal riso (*Oryza sativa* L.). E' stato infatti dimostrato che le piante di riso sono in grado di assorbire direttamente il Fe(II) (Ishimaru et al., 2006) e sono stati isolati i geni codificanti per trasportatori specifici del Fe(II), denominati OsIRT1 e OsIRT2 (Buglio et al., 2002; Ishimaru et al., 2006). Tale peculiarità è stata spiegata considerando che il riso cresce in sommersione e, quindi, in condizioni in cui il Fe(II) è più abbondante del

Fe(III) (Yoshida, 1981). Tuttavia, analogamente alle altre piante a Strategia II, il riso è anche in grado di assorbire il Fe(III) ed in particolare, è stato isolato il gene che codifica per un trasportatore per i complessi metallo-NA, denominato *OsYL2* (Koike et al., 2004).

Gli argomenti esposti mostrano che le due strategie di risposta alla Fe-carenza, pur essendo molto diverse tra loro, hanno alcuni elementi in comune.

Innanzitutto, la NA (Rudolph et al., 1985; Douchkov et al., 2002) che in tutte le piante funziona come chelante per il trasporto del ferro a livello simplastico e floematico e che nelle piante a Strategia II, è anche il precursore della famiglia dell'MA.

Inoltre, la metionina, rappresenta un'ulteriore elemento comune in quanto svolge un ruolo chiave nell'attuazione delle risposte alla Fe-carenza in entrambe le strategie, dato che attraverso essa vengono sintetizzati sia l'etilene che i fitosiderofori (Roje, 2006).

1.2 LO ZOLFO

Lo zolfo è un elemento chimico di fondamentale importanza nei sistemi biologici, in quanto costituente integrale di molte biomolecole quali lipidi, vitamine, proteine e cofattori enzimatici. Di conseguenza, lo zolfo riveste un ruolo essenziale nella crescita e nella regolazione dello sviluppo della pianta ed una sua limitata disponibilità si riflette sui parametri quali-quantitativi del raccolto (Fig. 1.8).

Lo zolfo rappresenta solo lo 0.1–0.5% del peso secco delle piante contro l'1.5% dell'azoto e il 45% del carbonio e quindi, tra tutti i macroelementi, è quello meno abbondante.

Condizioni di S-carenza provocano una serie di disturbi metabolici associati alla diminuzione della sintesi proteica con conseguente accumulo di composti azotati nelle cellule (Marschner, 1995; Nikiforova et al., 2005). In condizioni di S-carenza la pianta presenta una velocità di crescita ridotta, che interessa prevalentemente la parte aerea, con conseguente diminuzione del rapporto parte aerea/radice (shoot/root) (Clarkson et al., 1989; Robinson, 1994). La carenza di zolfo determina, inoltre, variazioni nella composizione delle proteine che presentano un minor contenuto di

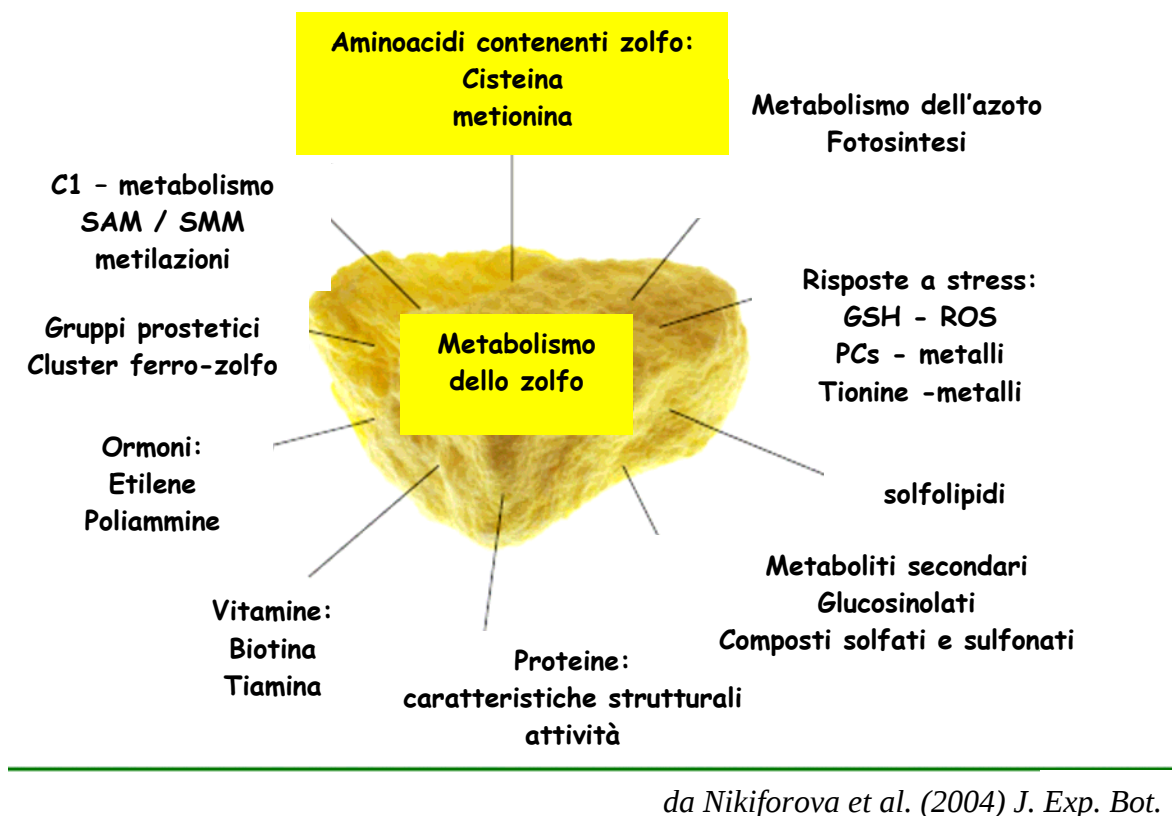


Fig. 1.8: Rappresentazione schematica del coinvolgimento dello zolfo nella biosintesi di alcuni metaboliti della pianta e in varie funzioni fisiologiche. I metaboliti contenenti zolfo sono coinvolti direttamente, come costituenti, o indirettamente, ad esempio come cofattori, gruppi prostetici o donatori di gruppi metilici di proteine ed enzimi.

aminoacidi solforati. Tali modificazioni influiscono da un lato sui processi metabolici della pianta e dall'altro sulle qualità nutrizionali del raccolto. La metionina è infatti un aminoacido essenziale nella nutrizione umana e spesso rappresenta un fattore limitante nelle diete. Inoltre, la diminuzione del contenuto di cisteina nei cereali diminuisce il livello qualitativo delle farine utilizzate per la panificazione (Zhao et al., 1999, Zhao et al., 1999), in quanto proprio i ponti disolfuro sono responsabili della polimerizzazione della frazione glutinica durante la preparazione dell'impasto (Ewart, 1978) (Fig. 1.9).

Un'altro caratteristico sintomo delle piante sottoposte a S-carenza è la clorosi fogliare dovuta alla diminuzione della sintesi della clorofilla (Fig. 1.10). La carenza di zolfo si manifesta con un particolare fenotipo, caratterizzato da foglie giovani clorotiche e foglie mature verdi, dovuto alla scarsa mobilità di questo nutriente nella pianta (Hell e Hillebrand, 2001).

Infine, anche l'architettura radicale risulta modificata con la caratteristica proliferazione di radici laterali. In *Arabidopsis* è stato dimostrato che tali modificazioni sono legate all'induzione dell'enzima nitrilasi, che a sua volta determina l'aumento dei livelli dell'IAA che si osserva in condizioni di S-carenza (Kutz et al., 2002).

La fonte principale di zolfo per le piante è rappresentata dal solfato acquisito dal suolo per mezzo delle radici. Tuttavia, le piante hanno la capacità di metabolizzare direttamente l'anidride solforosa sotto forma gassosa assorbendola attraverso gli stomi, anche se elevate concentrazioni atmosferiche di questo ossido (>0.3 ppm) associate a lunghi periodi di esposizione ($>8h$) possono risultare tossiche per le piante stesse a causa della formazione sulle superfici fogliari di acido solforico.

Il solfato presente nel terreno deriva dalla mineralizzazione delle rocce ed in parte può avere origine atmosferica. Lo zolfo è infatti normalmente presente nell'aria sotto forma di anidride solforosa e solforica di origine per lo più vulcanica. In zone caratterizzate da grandi insediamenti urbani ed attività industriali, la concentrazione di questi ossidi nell'aria può risultare anche triplicata. Questo aumento è legato all'utilizzazione di combustibili fossili che porta alla liberazione nell'aria di forme gassose di zolfo, come l'anidride solforosa (SO_2) e l'acido solfidrico (H_2S), che vengono veicolati al suolo tramite la pioggia. L'anidride solforosa in acqua si

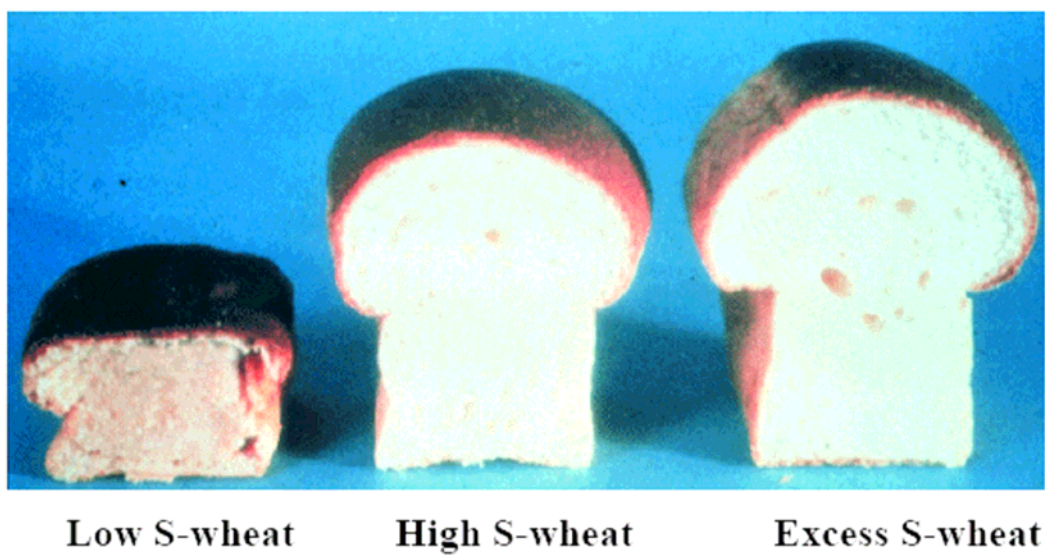


Fig. 1.9: Dimostrazione dell'importanza del contenuto di zolfo per la qualità delle farine utilizzate nel processo di panificazione.

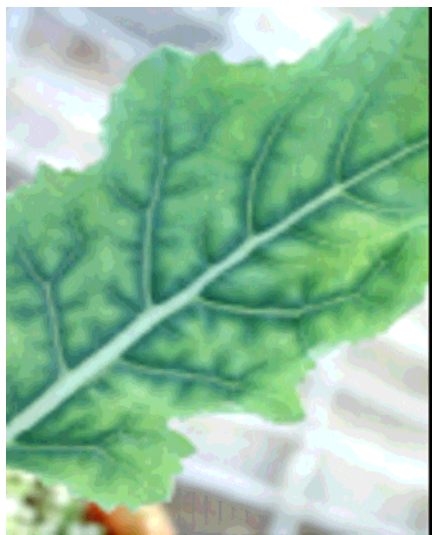


Fig. 1.10: La carenza di zolfo si manifesta con la comparsa di clorosi fogliare che interessa principalmente le foglie più giovani essendo lo zolfo un elemento scarsamente mobile nella pianta

idrolizza a formare H_2SO_4 , un acido forte che è il principale responsabile delle piogge acide. Lo zolfo può infine arrivare al terreno a causa di altre attività antropiche come la fertilizzazione e la somministrazione di alcuni prodotti fitosanitari.

Il trasporto del solfato dall'apoplasto attraverso la membrana plasmatica fino all'interno della cellula radicale è un processo attivo che avviene sia contro gradiente chimico, visto che la concentrazione del solfato all'interno delle cellule è da 100 a 1000 volte più alta rispetto a quella della soluzione del terreno, sia contro gradiente elettrico, essendo il solfato carico negativamente. Quindi il trasporto del solfato avviene con un meccanismo di tipo secondario che prevede consumo di energia ricavata dall'idrolisi dell'ATP (Clarkson et al., 1993) (Fig. 1.11). Specifiche proteine trasportatrici presenti a livello della membrana plasmatica sono in grado di riconoscere e legare lo ione solfato e quindi successivamente di mediarne il trasporto nel citoplasma attraverso un meccanismo di simporto. Questo evento è infatti accompagnato dal contemporaneo rilascio di tre protoni necessari a bilanciare le cariche negative del solfato. Lo squilibrio di cariche che si viene a creare durante il trasporto determina una depolarizzazione della membrana che porta all'attivazione di una pompa H^+ATP asica del plasmalemma la quale riequilibra lo scompenso di cariche positive estrudendo protoni verso l'esterno della cellula (Hawkesford et al., 1993).

I trasportatori del solfato sono costituiti da una singola catena polipeptidica di circa 70-74 KDa (Hawkesford et al., 2000) e vengono generalmente suddivisi in cinque gruppi funzionali (Hawkesford e De Kok., 2006) (Fig. 1.12). Il gruppo 1 comprende i trasportatori ad alta affinità, quasi esclusivamente espressi nelle membrane plasmatiche delle cellule radicali. Il gruppo 2 è caratterizzato da trasportatori a più bassa affinità localizzati nella membrana plasmatica dei tessuti vascolari e probabilmente coinvolti nella distribuzione tissutale del solfato. Il gruppo 3 non è stato ancora del tutto caratterizzato, ma sembra essere caratteristico dei tessuti fogliari (Hawkesford, 2000). I gruppi 4 e 5 comprendono trasportatori localizzati nella membrana del tonoplasto: i trasportatori del gruppo 4 sarebbero coinvolti nell'efflusso del solfato dal vacuolo e sono stimolati dalla carenza di zolfo, il ruolo dei trasportatori del gruppo 5 non è ancora stato chiaramente precisato.

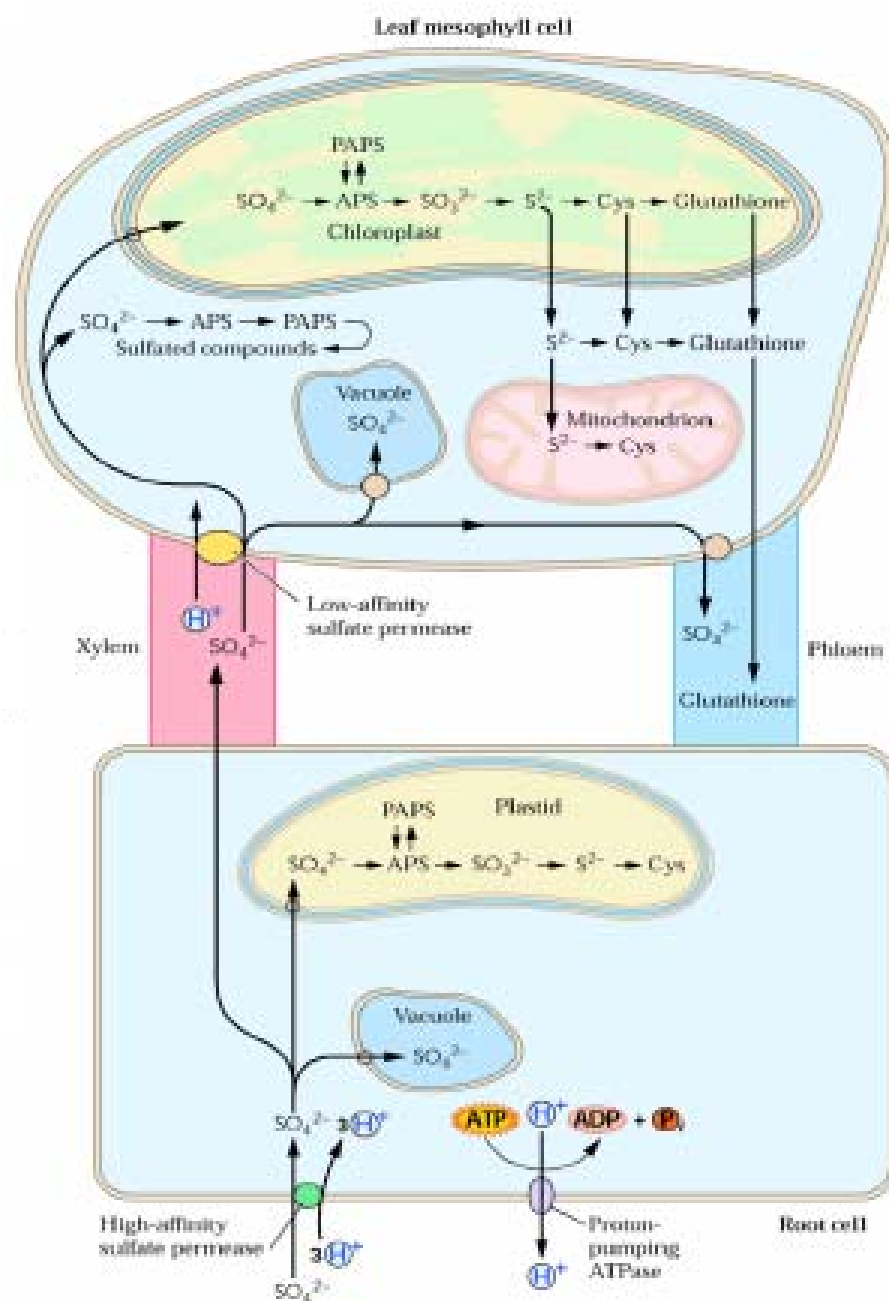
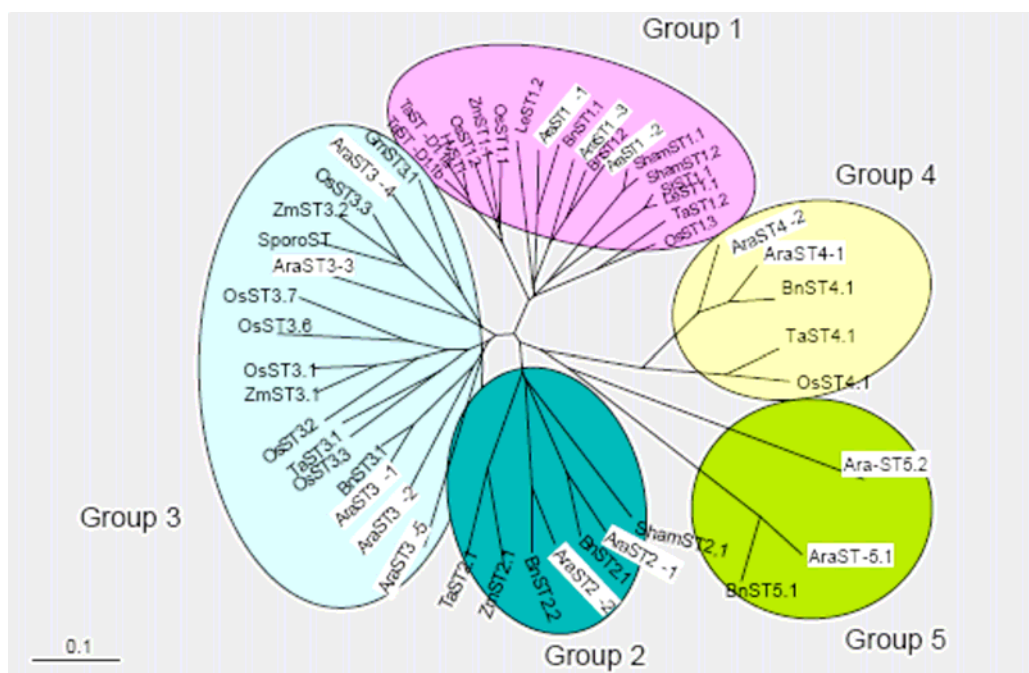


Fig. 1.11: Rappresentazione schematica del metabolismo del solfato nella pianta.



da Hawkesford M.J. (2003) *Physiol. Plant.*

Fig. 1.12: Analisi filogenetica della sequenza aminoacidica dei trasportatori del solfato delle piante.

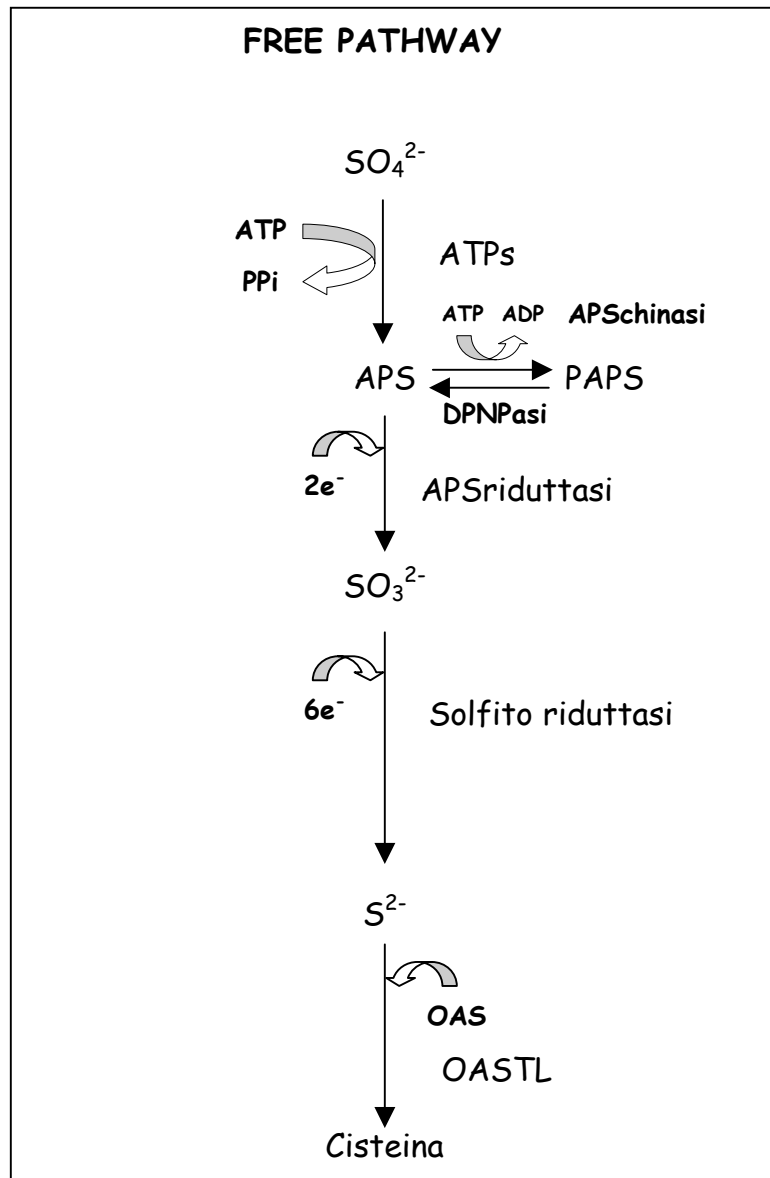
Il trasporto è soggetto a meccanismi di induzione e inibizione: carenze di solfato nel mezzo esterno possono provocare un incremento dell'attività di trasporto, a causa dell'aumentata sintesi di carriers, mentre l'accumulo di alcuni solfocomposti nella cellula, come ad esempio la cisteina o il glutatione, può inibire questo processo bloccando l'induzione della sintesi di carriers e/o stimolando una rapida demolizione degli stessi (Hawkesford, 2003; Bolchi et al., 1999; Herschbach e Rennenberg, 1994).

Una volta nella cellula, il solfato viene convertito in composti organici oppure viene rapidamente traslocato nel vacuolo dal quale può, in un secondo momento, essere rimobilizzato.

Nelle piante superiori gli enzimi responsabili dell'assimilazione del solfato sono localizzati nei cloroplasti delle cellule delle foglie e nei proplastidi delle cellule del parenchima corticale delle radici, anche se il processo assimilativo avviene principalmente a livello fogliare (Fankhauser e Brunold, 1978, 1979).

Il solfato è chimicamente molto stabile e quindi per poter essere organicato deve prima essere attivato (Leustek et al., 2000) (Fig.1.13). L'attivazione di questo ione avviene attraverso una reazione fortemente endoergonica e tramite l'intervento di un enzima specifico, l'ATP-sulfurilasi (ATPs), che catalizza la formazione di un composto solforato intermedio, l'APS (adenosina 5'- fosfosolfato), utilizzando come substrati il solfato e l'ATP e liberando pirofosfato (PPi). Questa reazione è energeticamente sfavorevole, come dimostrato dalla sua costante di equilibrio ($K_{eq} \approx 10^{-7}$). Per ottenere la formazione del prodotto l'equilibrio deve essere spostato e ciò si realizza grazie alla reazione di idrolisi del PPi liberato in due moli di fosfato inorganico, catalizzata da una pirofosfatasi inorganica, e grazie al consumo del prodotto APS che rappresenta il substrato per le successive reazioni che portano alla riduzione del solfato o alla produzione di una seconda forma attivata, il PAPS (3'-fosfoadenosina 5' fosfosolfato).

La sintesi del PAPS è catalizzata dall'enzima APS chinasi che utilizza ATP come donatore del gruppo fosforico. A partire dal PAPS il solfato può essere direttamente incorporato in esteri quali solfolipidi, brassinosteroidi, alline, glucosinolati e polisaccaridi extracellulari, tramite il trasferimento del solfato attivato ad un gruppo ossidrilico (Leustek et al., 2000). In particolare, nei solfolipidi l'esterificazione



da Hell (1997) Planta

Fig. 1.13: Rappresentazione schematica del processo di organizzazione del solfato tramite la via di formazione del solfuro detta “free pathway” in cui gli enzimi riconoscono i substrati in forma libera.

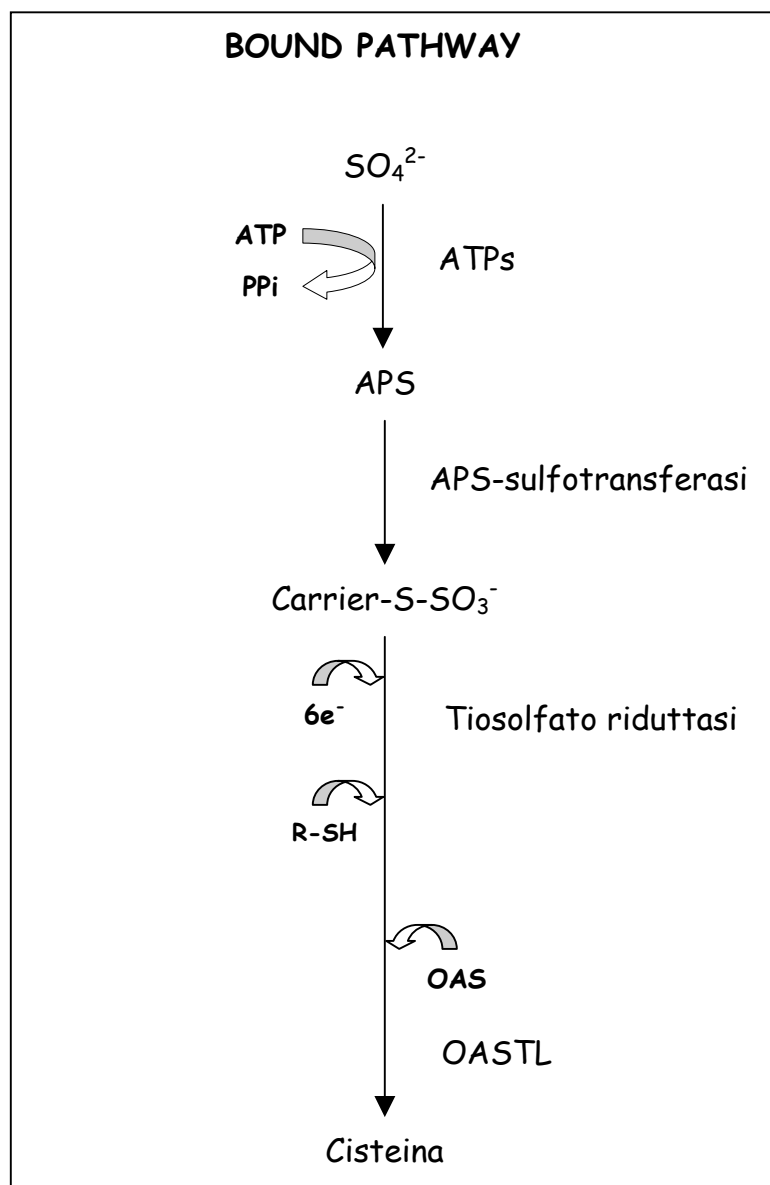
coinvolge uno zucchero a sei atomi di carbonio, come ad esempio il glucosio. I solfolipidi sono costituenti essenziali di tutte le membrane biologiche, ma sono particolarmente abbondanti nelle membrane tilacoidali e in quelle dei cloroplasti dove rappresentano circa il 5% della frazione lipidica totale. I solfolipidi oltre al ruolo strutturale presentano altre funzioni: sono infatti coinvolti nei meccanismi di regolazione del trasporto di ioni attraverso le membrane ed inoltre sembrano essere coinvolti nel meccanismo di tolleranza delle piante alla salinità.

L'APS formatosi nella prima reazione può essere ceduto ad un gruppo tiolico per arrivare alla sintesi di cisteina (Leustek et al., 2000). In questo caso il solfato deve prima essere ridotto a solfuro, passando così dallo stato di ossidazione +6 a quello -2. In un primo passaggio il solfato viene ridotto a solfito nella reazione catalizzata dall'APS riduttasi, in cui il donatore di elettroni potrebbe essere il glutatione (GSH) o il ditiotreitolo (DTT). A questo punto, l'enzima solfito riduttasi catalizza la riduzione del solfito a solfuro in una reazione in cui la ferredossina agisce da donatrice di elettroni. La riduzione dell'APS a solfuro nelle foglie è stimolata dalla luce, probabilmente in relazione all'aumento della ferredossina ridotta legata all'attività dei fotosistemi.

Anche il PAPS può essere sfruttato in queste reazioni, previa riconversione in APS mediante la reazione catalizzata dall'enzima 3'(2'),5'-difosfonucleoside 3'(2')-fosfoidrolasi (DPNPasi). La localizzazione cellulare e i meccanismi di regolazione di questo enzima non sono ancora molto chiari, ma probabilmente potrebbe avere la funzione di regolare i livelli di PAPS dando vita a questo ciclo futile tra APS e PAPS (Peng e Verma, 1995).

E' stata ipotizzata, infine, l'esistenza di una via alternativa per la formazione del solfuro a partire dall'APS, che viene detta "bound pathway" (Fig. 1.14). Questa via prevede l'intervento di enzimi che riconoscono solo i solfocomposti legati ad opportuni carrier e si distingue quindi da quella precedentemente descritta ("free pathway") in cui gli intermedi delle reazioni sono liberi.

La prima reazione in questa via è catalizzata dall'enzima APS-sulfotransferasi e prevede il trasferimento del gruppo solforico ad un carrier avente un gruppo tiolico. Il carrier potrebbe essere il glutatione, come osservato in *Chlorella* (Leustek et al., 2000; Anderson, 1990). Nella seconda reazione, l'enzima tiosolfato riduttasi



da Hell (1997) Planta

Fig. 1.14: Rappresentazione schematica del processo di organizzazione del solfato tramite la via di formazione del solfuro detta “bound pathway”, in cui gli enzimi riconoscono i substrati legati ad opportuni carriers.

catalizza la conversione del solfito legato al carrier a gruppo solfidrilico in una reazione ferredossina-dipendente.

Il significato dell'esistenza di vie diverse per la produzione di solfuro non è ancora del tutto chiaro ed, inoltre, diverse evidenze sperimentali pongono dei dubbi sull'effettiva esistenza dell'enzima APS-sulfotransferasi, a causa della similarità cinetica e dell'identità della sua sequenza aminoacidica con l'enzima APS-riduttasi dimostrate rispettivamente nell'alga rossa *Porphyra yezoensis* (Kanno et al., 1996) e in *Lemna minor* (Suter et al., 2000).

Una volta prodotto, il solfuro viene incorporato nell'aminoacido cisteina nella reazione catalizzata dall'enzima O-acetilserina(tiol)liasi (OASTL) che porta alla formazione di cisteina e alla liberazione di acetato e che costituisce l'ultima fase del processo di riduzione assimilativa dello zolfo.

La cisteina rappresenta il primo prodotto stabile del processo di riduzione del solfato ed è un elemento di grande importanza nei sistemi biologici, sia come costituente essenziale delle proteine, delle quali influenza fortemente struttura e funzione, sia come precursore di tutti gli altri composti contenenti zolfo ridotto. La presenza del gruppo tiolico di questo aminoacido permette infatti la formazione reversibile di ponti disolfuro tra due residui cisteinici adiacenti in una catena polipeptidica e questo tipo di legame è importante per la costituzione della struttura terziaria della proteina. La cisteina è inoltre il precursore dell'altro aminoacido solforato, la metionina, che riveste particolare importanza per la pianta in quanto è sia donatore di gruppi metilici che iniziatore della sintesi proteica.

La metionina è sintetizzata in tre fasi a partire da cisteina e O-fosfomoserina (derivata dall'acido aspartico): l'enzima cistationina γ -sintasi catalizza il primo passaggio che prevede la sostituzione del gruppo fosfato dell' O-fosfomoserina con la cisteina per formare cistationina; nella seconda reazione, la cistationina β -liasi catalizza la scissione del legame β -C-S per produrre omocisteina, piruvato e ammoniaca; infine, la metionina sintasi trasferisce il gruppo metilico dal N⁵-metiltetraidrofolato all'omocisteina formando metionina (Saito, 2000).

Attraverso gli aminoacidi cisteina e metionina, lo zolfo può essere incorporato in proteine, coenzimi ed altri prodotti secondari della pianta quali ad esempio le fitochelatine.

Particolare importanza tra le molecole biologiche delle piante contenenti zolfo che si formano dalla cisteina è rivestita dal glutatione (Leustek et al., 2000), che rappresenta il 90% della frazione tiolica solubile in acqua ed è quindi da considerare la forma più abbondante di zolfo ridotto presente nella pianta.

Il glutatione è un tripeptide (γ -glutamilcisteinilglicina) che viene sintetizzato dalla cisteina in due tappe: nella prima, catalizzata dall'enzima glutamilcisteina sintasi, glutammato e cisteina reagiscono formando glutamilcisteina; nella seconda tappa, questo dipeptide reagisce a sua volta con la glicina attraverso l'azione della glutatione sintetasi per formare γ -glutamilcisteinilglicina. L'attività dell'enzima glutatione sintetasi è regolata dal glutatione stesso che, inibendo l'attività della glutamilcisteina sintasi, provoca una caduta della concentrazione del dipeptide necessario alla formazione di glutatione. Lo zolfo immagazzinato nel glutatione può così raggiungere attraverso la via floematica i diversi organi e tessuti della pianta.

Il glutatione nella pianta riveste un ruolo importante come antiossidante: in particolare nei cloroplasti, insieme all'ascorbato, è coinvolto nel meccanismo di detossificazione dei radicali tossici dell'ossigeno e del perossido d'idrogeno, come dimostrato dal rapido aumento della sua concentrazione nelle piante sottoposte a stress ossidativo. Inoltre, il glutatione è anche il precursore delle fitochelatine che svolgono un ruolo nella risposta della pianta alla tossicità da metalli pesanti come ad esempio il cadmio e lo zinco (Grill et al., 1987; Rauser, 1990). Le fitochelatine sono costituite da unità ripetute di glutamilcisteina (da 2 a 11) con una glicina terminale e sono sintetizzate attraverso la degradazione del glutatione mediata dalla carbossipeptidasi (Zenk, 1996). Le fitochelatine sono in grado di legare i metalli pesanti carichi positivamente tramite i gruppi tiolici rendendoli così non tossici per la pianta. La sintesi delle fitochelatine è stimolata dalla presenza di cadmio, ma anche dalla presenza di zinco e rame (Tukendorf e Rauser, 1990). In particolare, il cadmio stimola la sintesi delle fitochelatine anche a bassissime concentrazioni.

Nonostante l'importanza dell'acquisizione dello zolfo nella nutrizione minerale della pianta, lo studio del metabolismo di questo nutriente è stato a lungo trascurato per due ragioni principali: la prima è che normalmente lo zolfo è presente nei suoli in abbondanza e la seconda è che è richiesto dalle piante in quantità 20-30 volte minori rispetto ad altri macronutrienti, come ad esempio l'azoto.

La presenza dello zolfo nel suolo è dovuta principalmente al fatto che la combustione delle risorse fossili all'inizio dell'era industriale in Europa aveva determinato un incremento del rilascio di SO₂. I livelli di inquinamento hanno raggiunto un picco massimo negli anni '80, con un aumento delle deposizioni di zolfo dall'atmosfera che ad esempio in Germania hanno toccato i 50 Kg/ha. A causa di tali apporti al suolo e alla presenza dello zolfo in alcuni prodotti fertilizzanti, quali il fosfato d'ammonio (24% di zolfo) e il superfosfato singolo (10-12% di zolfo), il fabbisogno di zolfo da parte delle piante è stato pienamente soddisfatto.

Il riconoscimento delle emissioni di SO₂ nell'atmosfera quale causa principale delle piogge acide e del declino delle foreste, ha determinato però l'attuazione di una serie di interventi che hanno portato ad un calo dei livelli di deposizione di zolfo fino a meno di 20 Kg/ha negli ultimi 20 anni (Dämmgen et al., 1998). Inoltre, l'intensificazione delle coltivazioni e l'orientamento delle moderne tecniche di fertilizzazione verso l'utilizzo di prodotti più puri, come l'urea e il super fosfato triplo, ha determinato una ulteriore diminuzione del contenuto di zolfo nel suolo e quindi la comparsa di sintomi da S-carenza. Tali sintomi si sono manifestati soprattutto nei suoli del Nord Europa ed inizialmente solo nelle colture che richiedono elevate quantità di zolfo, come il colza da olio, ma in un secondo momento anche nelle piante che ne richiedono in minor quantità, come il frumento e la patata.

Un altro problema derivante dalle situazioni di S-carenza è l'aumento della sensibilità di alcune piante all'attacco di patogeni fungini. Le basi fisiologiche di questo fenomeno, che è stato affrontato ricorrendo ad un'adeguata fertilizzazione con zolfo (Schnug et al., 1995), sono ancora oggetto di studio (Jost et al., 2003).

2. SCOPO DELLA TESI

Il ferro è un minerale essenziale per la nutrizione della pianta in quanto svolge un ruolo fondamentale nel metabolismo della pianta stessa. Il problema della carenza di ferro è molto diffuso (Marschner, 1995), poiché questo elemento, pur se generalmente presente in abbondanza nel suolo, si presenta prevalentemente in una forma scarsamente biodisponibile per le piante.

Come precedentemente descritto, le piante hanno sviluppato due diverse strategie per rispondere a condizioni di Fe-carenza ed, in base alla strategia adottata, vengono distinte in due gruppi: quello delle piante a Strategia I (tutte le piante eccetto le graminacee) e quello delle piante a Strategia II (le graminacee).

Le due strategie di risposta delle piante alla Fe-carenza pur essendo molto diverse tra loro, presentano alcuni elementi in comune, tra i quali la metionina, attraverso la quale vengono sintetizzati sia l'etilene che i fitosiderofori.

Appare quindi ragionevole supporre che la Fe-carenza possa determinare in entrambi i casi un'alterazione del ciclo della metionina e dei processi metabolici ad esso connessi, attraverso la regolazione dei flussi di solfato e che, viceversa, la disponibilità di solfato possa condizionare le capacità della pianta di rispondere alla Fe-carenza.

Scopo di questo lavoro di tesi è stato quindi quello di analizzare la relazione esistente tra la nutrizione solfatica e ferrica sia in piante a Strategia I che in piante a Strategia II.

L'importanza di questo studio è sottolineata dal recente aumento dell'incidenza del problema della S-carenza per le colture agrarie. Infatti, mentre in passato l'input di zolfo proveniente dall'atmosfera era sufficiente per soddisfare le esigenze della maggior parte delle piante, negli ultimi anni, la drastica riduzione delle emissioni di SO₂ e dell'uso di fertilizzanti quali il solfato d'ammonio e il superfosfato semplice, in cui era contenuto zolfo, ha contribuito all'aumento dell'incidenza della S-carenza in molte aree ed in particolare nei suoli del nord Europa, con conseguenze gravi per l'agricoltura (Tandon, 1995; McGrath e Zhao 1995).

La prima fase di questa tesi è stata quindi dedicata a verificare l'esistenza di una possibile relazione tra la nutrizione solfatica e ferrica nelle piante a Strategia II,

utilizzando come pianta modello inizialmente il mais, data la sua importanza economica nel settore agroalimentare, e successivamente l'orzo, che presenta il vantaggio sperimentale di rilasciare grandi quantità di fitosiderofori in un periodo determinato della giornata e quindi ci ha permesso di analizzare l'influenza della disponibilità di zolfo sul rilascio dei fitosiderofori in condizioni di Fe-carezza.

Infine, l'ultima fase del lavoro di tesi è stata dedicata allo studio della relazione tra la nutrizione solfatica e ferrica in piante a Strategia I utilizzando come pianta modello un'altra pianta con elevata importanza economica, il pomodoro.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Allevamento delle piante di mais

Nella Fig. 3.1 è raffigurato lo schema sperimentale utilizzato per l'allevamento delle piante di mais. In particolare, semi di mais (*Zea mays* L. cv. Cecilia) erano lavati accuratamente e lasciati in acqua corrente per circa un'ora allo scopo di eliminare gli antigerminativi e gli antifungini presenti sulla loro superficie. Essi venivano quindi posti su carta da filtro imbibita di acqua deionizzata e messi in camera climatica a 28°C e al buio per 3 giorni al fine di favorire la germinazione. Successivamente, le plantule di mais così ottenute erano allevate in soluzione idroponica in condizioni di S-sufficienza e S-carenza. In particolare, le plantule venivano trasferite in vasi di plastica (18 plantule/vaso) contenenti 2,2 l di soluzione nutritiva (Zhang *et al.*, 1991), avente per la condizione di S-sufficienza (+S) la seguente composizione:

MgSO₄ 0.5 mM,

K₂SO₄ 0.7 mM,

KCl 0.1 mM,

KH₂PO₄ 0.1 mM,

Ca(NO₃)₂ 2.0 mM,

H₃BO₃ 1 µM,

MnSO₄ 0.5 µM,

ZnSO₄ 0.5 µM,

CuSO₄ 0.2 µM,

(NH₄)₆MoO₇ 0.01 µM,

Fe(III)-EDTA 80 µM

Nella soluzione nutritiva utilizzata per la condizione di S-carenza (–S) i solfati (K⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺) erano sostituiti da cloruri (K⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺). La crescita delle piante era condotta in una cella climatica, ad intensità luminosa pari a 200 µE m² s^{–1} con un fotoperiodo di 16 h di luce e 8 h di buio (27°C / 20°C temperatura diurna/notturna). La soluzione nutritiva era continuamente areata tramite un gorgogliatore e rinnovata ogni 3-4 giorni.

Dopo 10 giorni dalla semina, le piante erano trattate in modo da rimuovere il ferro

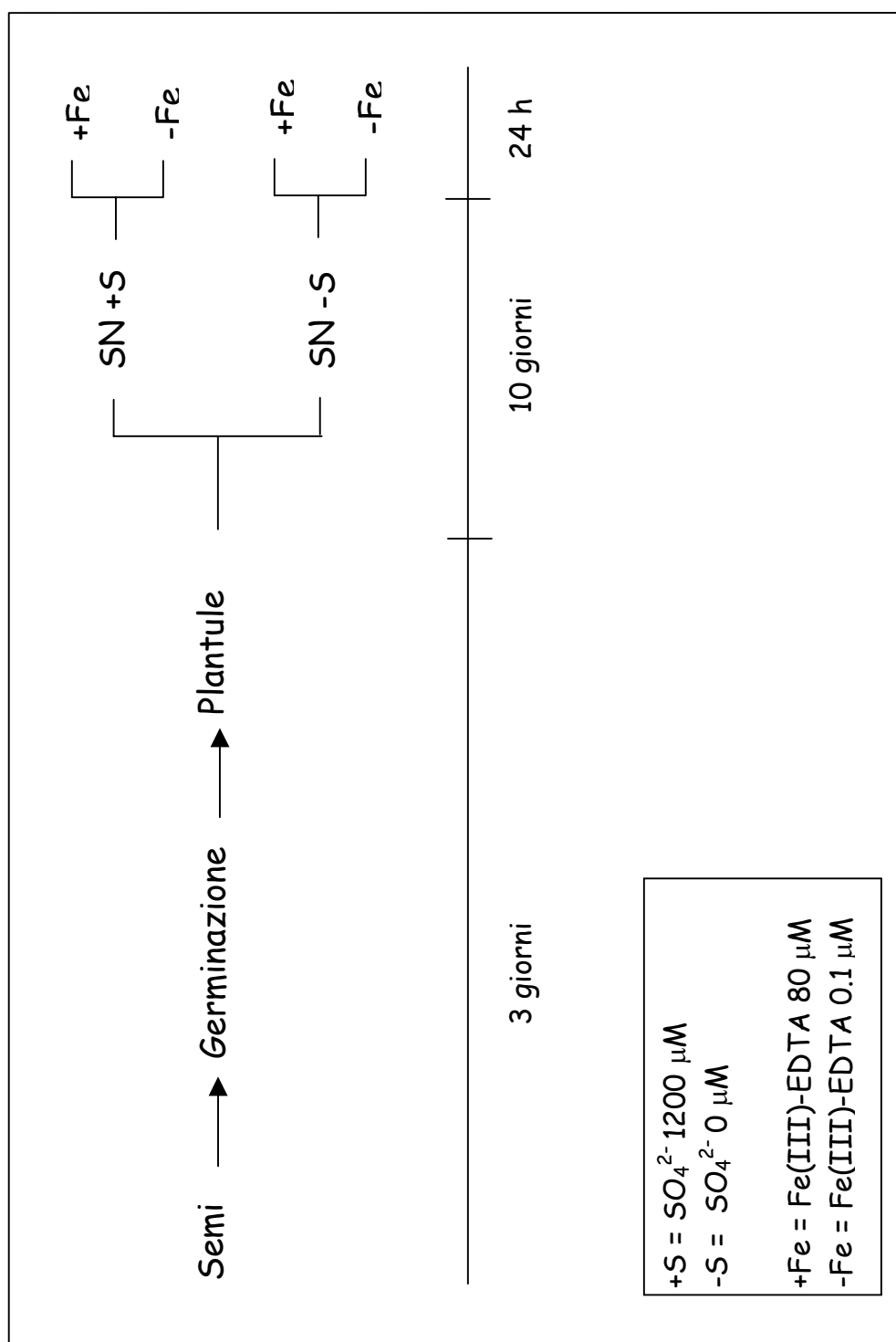


Fig. 3.1: Schema sperimentale della crescita delle piante di mais

apoplastico dalle radici e quindi metà delle piante di ciascuna condizione nutritiva (+S e -S) era trasferita in una nuova soluzione nutritiva in condizioni di Fe-carenza (Fe(III)-EDTA 0.1 μ M, -Fe), mentre le restanti piante di ciascun trattamento erano invece trasferite in una soluzione nutritiva in condizioni di Fe-sufficienza (Fe(III)-EDTA 80 μ M, +Fe).

Dopo 4 e 24 h dall'inizio del periodo di Fe-privazione, dalle piante erano prelevati campioni di foglie e radici, che erano congelati in N₂ e conservati a -80°C fino al momento dell'uso per analisi chimiche ed enzimatiche.

3.2 Allevamento delle piante di orzo

Nella Fig. 3.2 è raffigurato lo schema sperimentale utilizzato per l'allevamento delle piante di orzo. In particolare, semi di orzo (*Hordeum vulgare* L. cv. Europa) erano lavati accuratamente e lasciati in acqua corrente per circa un'ora. I semi erano quindi posti su una retina appoggiata su un beacker del volume di 5 l contenente 3 l di una soluzione di CaSO₄ 0.5 mM areata con un gorgogliatore ed erano coperti con carta da filtro imbevuta di acqua deionizzata. Il beacker era posto in camera climatica a 28°C e al buio per 4 giorni allo scopo di favorire la germinazione dei semi. Successivamente le plantule di orzo così ottenute erano allevate in soluzione idroponica in condizioni di S-sufficienza, moderata S- carenza e completa S-carenza. In particolare le plantule erano trasferite in vasi di plastica (12 plantule/vaso) che contenevano 2.2 l di soluzione nutritiva (Zhang et al., 1991) avente per la condizione di S-sufficienza (SO₄²⁻ 1.2 mM, S2) la seguente composizione:

MgSO₄ 0.5 mM,

K₂SO₄ 0.7 mM,

KCl 0.1 mM,

KH₂PO₄ 0.1 mM,

Ca(NO₃)₂ 2.0 mM,

H₃BO₃ 1 μ M,

MnSO₄ 0.5 μ M,

ZnSO₄ 0.5 μ M,

CuSO₄ 0.2 μ M,

(NH₄)₆MoO₇ 0.01 μ M.

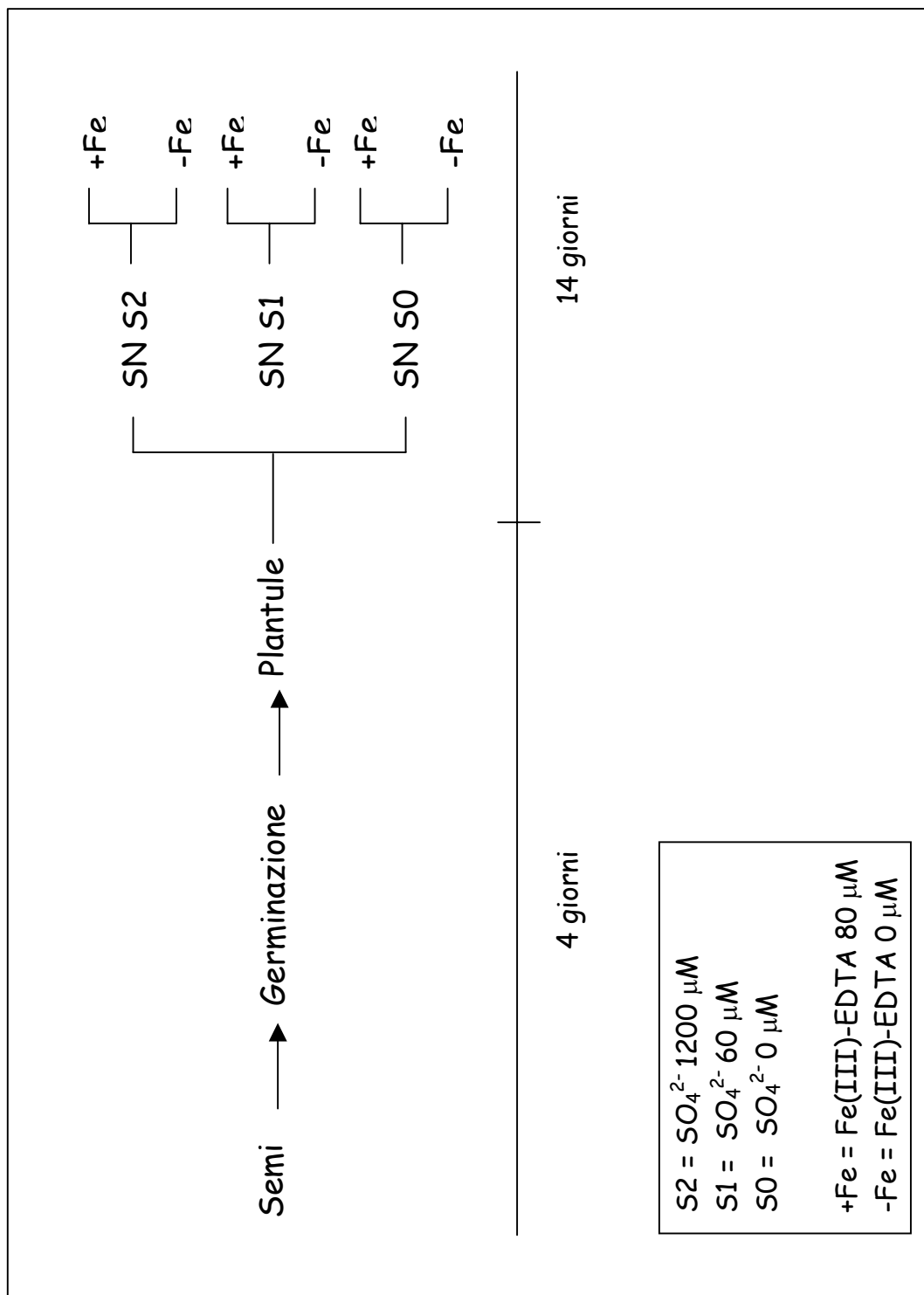


Fig. 3.2: Schema sperimentale della crescita delle piante di orzo

Nelle soluzioni nutritive moderatamente S-carente (SO_4^{2-} 0.06 mM, S1) e completamente S-carente (SO_4^{2-} 0 mM, S0), i solfati (K^+ , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}) erano sostituiti da quantità appropriate di cloruri (K^+ , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}). Inoltre, metà delle piante di ciascuna condizione nutritiva era allevata in presenza di ferro (Fe(III)-EDTA 80 μM , +Fe) mentre l'altra metà in totale assenza di ferro (Fe(III)-EDTA 0 μM , -Fe). La crescita delle piante era condotta in una cella climatica, ad intensità luminosa pari a 200 $\mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$ con un fotoperiodo di 16 h di luce e 8 h di buio (27°C / 20°C temperatura diurna/notturna). La soluzione nutritiva era continuamente areata tramite un gorgogliatore e rinnovata ogni 3-4 giorni.

Dopo 14 giorni dalla semina, dalle piante erano prelevati campioni di foglie e radici che erano congelati in N_2 e conservati a -80°C fino al momento dell'uso per analisi chimiche ed enzimatiche.

3.3 Allevamento delle piante di pomodoro

Nella Fig. 3.3 è raffigurato lo schema sperimentale utilizzato per l'allevamento delle piante di pomodoro. In particolare, semi di pomodoro (*Solanum lycopersicum* L., cv. Gimar) erano sterilizzati con ipoclorito di sodio al 50% (v/v) per 15 minuti e successivamente risciacquati accuratamente con acqua deionizzata. I semi erano quindi posti a germinare su perlite imbibita di acqua deionizzata al buio e alla temperatura di 28°C per 4 giorni. Le plantule così ottenute erano trasferite in vasi (12 plantule/vaso) che contenevano 2.2 l di soluzione nutritiva (Zhang et al., 1991) composta da:

MgSO_4 0.5 mM,

K_2SO_4 0.7 mM,

KCl 0.1 mM,

KH_2PO_4 0.1 mM,

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 2.0 mM,

H_3BO_3 10 μM ,

MnSO_4 0.5 μM ,

ZnSO_4 0.5 μM ,

CuSO_4 0.2 μM ,

$(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_7$ 0.01 μM ,

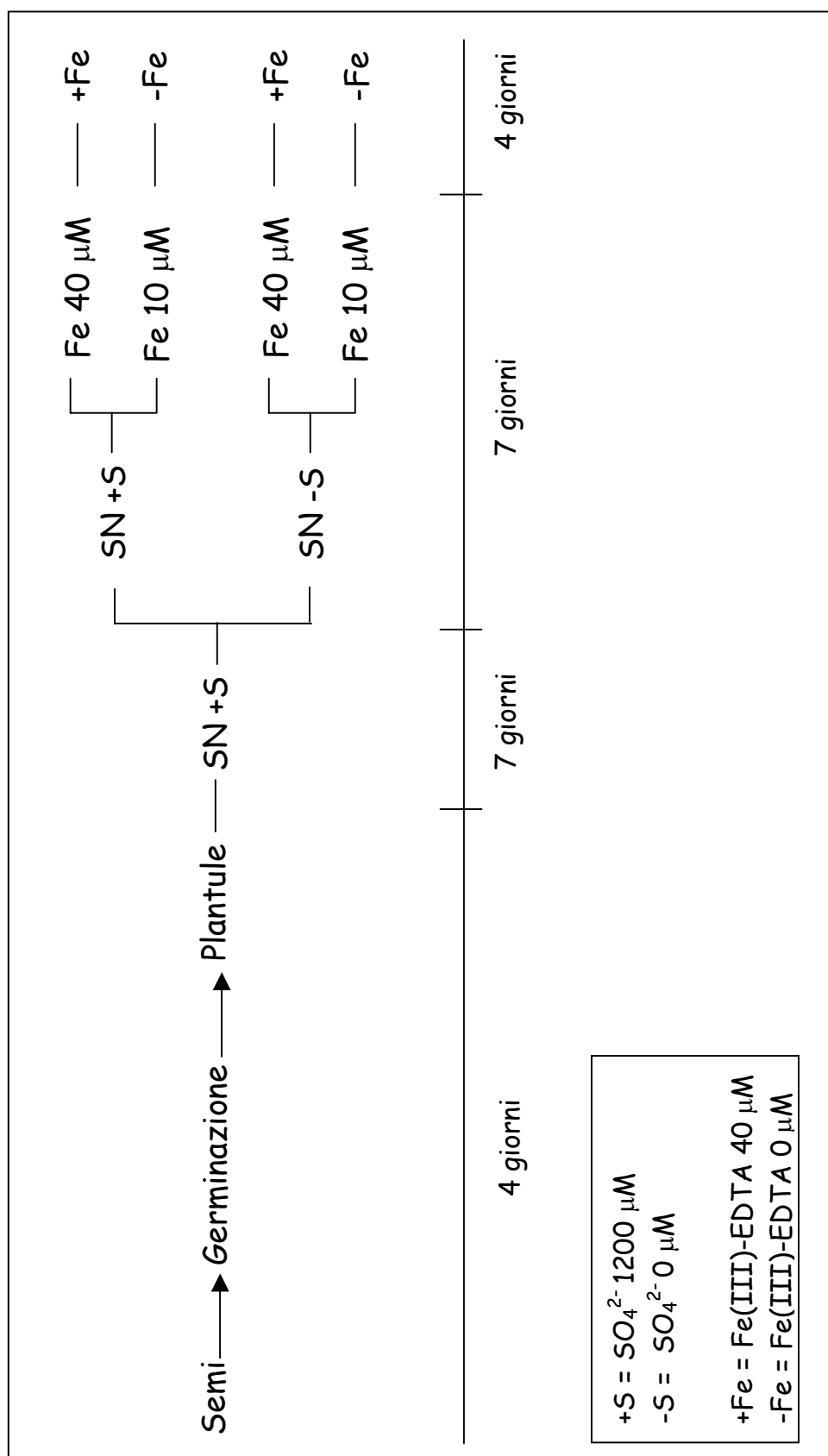


Fig. 3.3: Schema sperimentale della crescita delle piante di pomodoro

Fe(III)-EDTA 40 μ M.

La crescita delle piante era condotta in una cella climatica, ad intensità luminosa pari a 200 μ E m² s⁻¹ con un fotoperiodo di 16 h di luce e 8 h di buio (27°C / 20°C temperatura diurna/notturna). La soluzione nutritiva era continuamente areata tramite un gorgogliatore e rinnovata ogni 3-4 giorni.

Dopo una settimana, metà delle piante erano trasferite in condizioni di S-carenza (SO₄²⁻ 0 mM, -S). Inoltre, durante la settimana successiva a metà delle piante di ciascuna condizione nutritiva (+S e -S) era progressivamente ridotta la quantità di ferro somministrata con la soluzione nutritiva fino ad arrivare alla completa privazione del nutriente (Fe(III)-EDTA 0 μ M, -Fe).

Dopo quattro giorni dall'imposizione della carenza di ferro, dalle piante erano prelevati campioni di foglie e radici, che erano congelati in N₂ e conservati a -80°C fino al momento dell'uso per analisi chimiche ed enzimatiche.

3.4 Estrazione degli enzimi

Il tessuto congelato di foglie e radici (circa 1 gr di peso fresco) era polverizzato in un mortaio in N₂ liquido e quindi omogenizzato in presenza di un tampone di estrazione a pH 7.4 contenente HEPES-KOH 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, glicerolo 10% (v/v), Triton X-100 0.1% (v/v), DTT 5 mM, PMSF 1 mM e PVPP 1% (w/v). Il tampone era aggiunto in un rapporto 1:7 (g p.f.:ml di tampone) per le foglie e 1:3 (g p.f.:ml di tampone) per le radici. L'omogenato era quindi filtrato attraverso 4 strati di garza e centrifugato a 1000 g per 5 min a 4°C. Il surnatante era recuperato e passato su una colonna Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia, Uppsala, Sweden) preequilibrata con il tampone di estrazione privo di Triton X-100.

L'eluato era quindi centrifugato a 15000 g per 5 min ed il risultante surnatante era suddiviso in aliquote da 0.3 ml che venivano congelate in N₂ liquido e conservate a -80 °C fino al momento dell'uso.

Tutte le fasi dell'estrazione erano condotte alla temperatura di circa 4 °C, al fine di minimizzare il danneggiamento delle attività enzimatiche da saggiare.

3.5 Determinazione del contenuto di clorofilla nelle foglie

Per la determinazione della clorofilla nelle foglie delle piante di mais è stato utilizzato il metodo descritto da Winterman e De Mots (1965). In particolare 100 µl di omogenato, ottenuto come descritto nel precedente paragrafo, erano prelevati subito dopo la filtrazione su garza e diluiti in etanolo in un volume finale di 1 ml. Dopo la centrifugazione a 13000 g per 5 min, era effettuata la lettura allo spettrofotometro (Perkin-Elmer Lambda 3) alla lunghezza d'onda di 665 nm e 649 nm. la quantità di clorofilla totale era calcolata applicando la seguente formula:

$$\text{Clorofilla totale} = 6.1 * A_{665} + 20.04 * A_{649}.$$

Nelle piante di orzo e di pomodoro, la concentrazione della clorofilla per unità di area era stimata su foglie ancora attaccate alle piante utilizzando un apparato portatile (SPAD Meter, Minolta Co., Osaka, Japan) ed effettuando la lettura sulla foglia più giovane pienamente espansa. I valori misurati con lo SPAD Meter sono espressi in unità SPAD e sono calcolati in base alla quantità di luce trasmessa dalla foglia in due regioni di lunghezze d'onda nelle quali l'assorbimento della clorofilla è differente e che ricadono rispettivamente nella zona del rosso (approssimativamente a 650 nm dove l'assorbimento non è influenzato dal carotene) e dell'infrarosso (approssimativamente a 940 nm, dove l'assorbimento è estremamente basso). Le unità SPAD rappresentano un indice accurato e sensibile del contenuto della clorofilla nelle foglie.

3.6 Determinazione dell'attività fotosintetica della pianta

L'attività fotosintetica della pianta era misurata *in vivo* utilizzando un analizzatore all'infrarosso portatile (Licor 6400). L'apparecchio è in grado di determinare la CO₂ incorporata dalla foglia attraverso l'uso di analizzatori di gas a infrarossi. Lo stesso apparecchio permette anche di stimare il flusso di acqua traspirato.

La misurazione era condotta su una singola foglia utilizzando cuvette Parkinson per foglie (Parkinson leaf cuvette, PLC). Gli esperimenti sono stati condotti alla concentrazione di CO₂ ambientale e al livello di umidità relativa presente nella camera climatica. Le misurazioni sono state effettuate su foglie illuminate per 4-5 h.

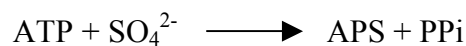
3.7 Determinazione quantitativa delle proteine

La determinazione del contenuto di proteine negli estratti era effettuata seguendo il metodo descritto da Bradford (1976). Tale metodo si basa sull'utilizzo di una sonda colorimetrica, il cromoforo Coomassie Brilliant Blue G 250, caratterizzata dal modificare il proprio spettro di assorbimento in seguito al suo legame con le proteine. Quando il cromoforo si lega alle proteine in un ambiente mediamente acido si osserva infatti lo spostamento del suo picco di assorbimento da 465 nm a 595 nm, con conseguente cambiamento del colore da rosso a blu.

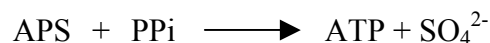
Aliquote variabili di estratto erano diluite in H₂O deionizzata in un volume finale di 1 ml. Ai campioni si aggiungeva poi 1 ml di Coomassie Protein Assay Reagent e dopo 10 min era effettuata la lettura dell'assorbanza a 595 nm. Il contenuto proteico dei vari campioni era determinato confrontando i relativi valori d'assorbanza registrati con una retta di taratura ricavata utilizzando una serie di concentrazioni note di albumina di siero bovina (BSA) (da 0 a 20 µg di BSA).

3.8 Determinazione dell'attività dell'ATP-sulfurilasi (ATPs)

L'enzima ATP-sulfurilasi (E.C. 1.7.7.4.) catalizza la prima reazione del processo di assimilazione dello zolfo, cioè l'attivazione del solfato:



L'attività dell'enzima è stata invece determinata sperimentalmente sfruttando la reazione inversa, nella quale si ha la produzione di ATP a partire da APS e PPi seguendo il metodo descritto da Schmutz e Brunold (1982):



L'ATP prodotto in questa reazione attiva il sistema luciferina-luciferasi che emette luce alla lunghezza d'onda di 562 nm, con intensità direttamente proporzionale alla quantità di ATP presente. L'intensità della luce prodotta era misurata utilizzando un luminometro (LKB 1250). Il saggio è stato eseguito usando il Quantitative Monitoring Kit (ThermoLabSystems). La miscela di reazione, in un volume finale di 0.25 ml, conteneva: tampone TRIS-HAc 16 mM pH 7.75, 40 µl di soluzione contenente luciferina/luciferasi, APS 8 µM e 5 µl di estratto. La cuvetta era inserita nel luminometro (LKB 1250) e dopo 10'' era effettuata la prima lettura delle unità luce (UL). La reazione iniziava con l'aggiunta di Na₄P₂O₇ 68 µM e dopo 10''

dall'inserimento della cuvetta nel luminometro era effettuata la seconda lettura. Dalla differenza tra le due letture era possibile ricavare la quantità di ATP prodotta durante la reazione, riferendo il valore di UL ottenuto a quello ricavato usando una quantità nota di ATP (0.1 nmoli).

3.9 Determinazione dell'attività della O-acetil serina (tiol) liasi (OASTL)

L'O-acetil serina (tiol) liasi (E.C. 4.2.99.8.) catalizza la reazione di sintesi della cisteina a partire da O-acetil-L-serina.

L'attività dell'enzima era determinata secondo il metodo colorimetrico descritto da Ferretti et al. (1993).

Il saggio era condotto in un volume finale di 100 µl: a 10 µl di estratto erano aggiunti TRIS-HCl 100 mM (pH 8.0), DTT 10 mM, piridossalfosfato 0.4 mM e OAS 2.5 mM. Alla miscela veniva quindi aggiunto Na₂S 50 mM in tampone fosfato pH 6.8, e la reazione era condotta a 30 °C. Dopo 10 min la reazione era bloccata con l'aggiunta di 200 µl di Reagente di Gaitonde, costituito da 0.25 g di ninidrina, 4 ml di HCl 12 N e 16 ml di acido acetico. I campioni erano quindi posti a 100°C per 5 min, e successivamente raffreddati a temperatura ambiente. Ogni campione era quindi diluito in 1 ml di etanolo prima di effettuare le letture dell'assorbanza a 560 nm. I valori ottenuti erano riferiti ad una retta di taratura ottenuta usando concentrazioni note di cisteina (da 0 a 200 nmoli di cisteina).

3.10 Rimozione e determinazione del contenuto di ferro apoplastico nelle radici

Per rimuovere dalle radici il pool apoplastico di ferro, radici di piante intatte venivano trattate secondo il metodo descritto da Bienfait et al. (1985) leggermente modificato.

Le radici di ogni pianta erano immerse in 30 ml di una soluzione contenente MES 10 mM, Ca(NO₃)₂ 0.5 mM e 2,2'-bipiridil 1.5 mM (pH 5.5) a temperatura ambiente. La soluzione veniva posta sotto flusso di azoto gassoso per 1 min, al fine di creare un ambiente riducente, prima di aggiungere Na₂S₂O₄ 7.5 mM. Dopo 4 min le radici delle piante erano lavate con acqua deionizzata e la procedura appena descritta veniva ripetuta una seconda volta.

Al fine di determinare il contenuto di ferro apoplastico nelle radici, venivano prelevati i due campioni della soluzione dopo 4 min dall'aggiunta del sodio

idrosolfito. Quindi, 24 h dopo il prelievo dei campioni veniva misurata l'assorbanza di ogni campione alla lunghezza d'onda di 520 nm mediante uno spettrofotometro (Perkin-Elmer Lambda 3). La concentrazione del ferro era calcolata utilizzando il coefficiente di estinzione molare del complesso $\text{Fe}[\text{bipiridil}]_3$ formatosi, che era pari a $8.650 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.11 Contenuto di ferro nelle foglie

Il contenuto di ferro nelle foglie delle piante di orzo e di pomodoro era determinato sui campioni di tessuto essiccati a 105°C per 24 h e successivamente inceneriti in muffola a 500°C per 24 h. Le risultanti ceneri erano disciolte in 10 ml di HNO_3 1% (v/v) e i campioni così ottenuti erano filtrati con filtri Whatman $0.45 \mu\text{m}$ (Whatman® Schleicher & Schuell, Germany) e successivamente analizzati con l'ausilio della tecnica ICP-OES (inductively coupled plasma - optical emission spectrometry). Tale tecnica sfrutta le proprietà di emissione ottica degli atomi ionizzati. Gli atomi e gli ioni contenuti nel campione vengono eccitati fino ad emettere una radiazione luminosa, la cui lunghezza d'onda è caratteristica degli elementi presenti. La radiazione attraversa uno spettrofotometro ed un software associa le lunghezze d'onda presenti agli elementi corrispondenti, in modo da creare uno spettro completo della composizione del campione. L'intensità della radiazione, proporzionale alla concentrazione nel campione dell'elemento corrispondente, viene elaborata mediante un set di curve di calibrazione ed infine espressa in mg g^{-1} p.s..

3.12 Determinazione del contenuto totale di zolfo

Il contenuto di zolfo totale in foglie e radici era determinato sui campioni essiccati a 105°C per 24 h e successivamente inceneriti in muffola a 500°C per 24 h. Le ceneri ottenute sono state disciolte in HCl 3 N in rapporto 1:10 (g p.f.:ml) e filtrate utilizzando filtri Whatman (ashless n. 42). Il filtrato veniva fatto reagire con BaCl_2 20% (w/v) per 15 minuti. La presenza di BaCl_2 determinava la formazione di un precipitato costituito da BaSO_4 , che può essere determinato turbidimetricamente attraverso la lettura dell'assorbanza a 420 nm (Bardsley e Lancaster, 1962). Il contenuto di zolfo era determinato riferendo i valori di assorbimento dei campioni ad una retta di taratura realizzata utilizzando concentrazioni note di K_2SO_4 (da 0 a 30

mg/l di zolfo).

3.13 Determinazione dei composti tiolici non proteici

La determinazione del contenuto di composti tiolici non proteici è basata sulla classica reazione con DTNB in ambiente sub-alcalino (pH=7-8) previa deproteinizzazione degli estratti.

Il tessuto radicale e quello fogliare erano omogenizzati con mortaio e pestello in una soluzione estraente utilizzata in rapporto 3:1 (ml:g p.f.) con il tessuto e composta da acido tricloroacetico 80 mM, EDTA 1 mM, acido ascorbico 0.15% (w/v) e PVPP 10% (w/v).

L'omogenato ottenuto veniva filtrato su garza e centrifugato a 22000 g per 30 min. Il surnatante (1 ml) era recuperato e incubato in presenza di tampone MES 24 mM pH 5.8 per 10 min a 30°C in un volume finale di 2.1 ml. Successivamente, venivano aggiunti DTNB 0.24 mM in tampone NaPi 20 mM pH 7 e tampone TRIS 190 mM pH 8 (volume finale 4.2 ml). IL DTNB reagisce con i gruppi SH presenti nell'estratto determinando la formazione di tiobenzoato dianione, che presenta un picco di assorbimento a 415 nm. Quindi veniva misurata l'assorbanza di ogni campione alla lunghezza d'onda di 415nm mediante uno spettrofotometro (Perkin-Elmer Lambda 3) e la concentrazione dei composti tiolici veniva calcolata utilizzando il coefficiente di estinzione molare del cromoforo formatosi, che era pari a $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.14 Determinazione del contenuto di zuccheri totali in foglie e radici

Il contenuto di zuccheri solubili totali nelle foglie e nelle radici delle piante di orzo erano determinati mediante estrazione in acqua calda seguendo il metodo descritto da Stephan e Rudolph (1984) con alcune modifiche. Ai tessuti vegetali polverizzati in N₂ era aggiunta acqua distillata bollente (100 °C) in rapporto 0.5:1 (ml:g.p.f.). L'omogenato ottenuto veniva incubato per 10 min ad 80 °C ed il materiale insolubile era rimosso centrifugando i campioni per 10 min a 16500 g. Il pellet veniva risospeso utilizzando 500 µl di acqua distillata bollente secondo la procedura precedentemente descritta e dopo una seconda centrifugata, il surnatante era utilizzato per la determinazione spettrofotometrica degli zuccheri ridotti e del saccarosio secondo il metodo descritto da Blakeney e Mutton (1980).

3.15 Determinazione del contenuto di glutatione e cisteina in foglie e radici

Campioni di foglie e radici (300 mg ciascuno) erano polverizzati in N₂ e quindi omogenizzati in un mortaio in presenza di acido 5-sulfosalicilico 5% (w/v) raffreddato in ghiaccio e contenente acido dietilentriaminopentacetico 6.3 mM, seguendo il metodo descritto da De Knecht et al. (1994). Dopo aver centrifugato i campioni a 10000 g per 10 min a 4°C, il surnatante era prelevato e successivamente filtrato attraverso filtri Minisart RC4 0.45-µm (Sartorius, Goettingen, Germany) e immediatamente analizzato utilizzando la tecnica cromatografica HPLC (high performance liquid chromatography) (model 200, Perkin-Elmer, Norwalk, CT). La cisteina (Cys) e il glutatione (GSH) erano separati iniettando 200 µl di ciascun campione in una colonna a fase inversa Purosphere C₁₈ (Merck GmbH, Darmstadt, Germany). La separazione della Cys e del GSH era ottenuta isocraticamente utilizzando acetonitrile acquoso al 2% (v/v) contenente acido trifluoroacetico 0.05% (v/v) con una velocità di flusso di 0.7 ml min⁻¹. La Cys e il GSH erano determinati attraverso una derivatizzazione post-colonna con reagente di Ellman 300 µM (DTNB) e rilevati a 412 nm (rilevatore UV-VIS Model 430, Kontron Instruments S.p.A., Milano, Italy). Per la quantificazione del contenuto di Cys e GSH veniva utilizzata una curva di calibrazione costruita con Cys e GSH puri (Merck GmbH, Darmstadt, Germany).

3.16 Raccolta degli essudati radicali e analisi quali-quantitativa dei fitosiderofori

Per la raccolta degli essudati radicali erano utilizzate piante di orzo di 14 giorni e l'operazione era effettuata 2 h dopo l'inizio del periodo di luce, in quanto l'orzo presenta un picco di secrezione dei fitosiderofori che coincide con la 2^a-3^a h dall'inizio del periodo di luce. In particolare, 3 piante di orzo erano prelevate dalla soluzione nutritiva e le radici, dopo un'accurato lavaggio in acqua distillata, venivano immerse in 30 ml di acqua distillata per 3 h in continua areazione. Una volta rimosse le piante, alla soluzione contenente gli essudati radicali era aggiunto il Micropur (Roth, Karlsruhe, Germany) alla concentrazione di 10 mg l⁻¹, allo scopo di prevenire la degradazione microbica dei fitosiderofori.

Il contenuto dei fitosiderofori nella soluzione di lavaggio era determinato per iniezione diretta (20 µl) utilizzando la tecnica cromatografica HPLC (high

performance liquid chromatography) (HPLC-LC 10 series, Shimadadzu, Duisburg, Germany) a scambio anionico con un sistema di derivatizzazione post-colonna (FCV-10AL) mediante ortoftaldialdeide (OPA) come descritto da Neumann et al. (1999). Per la quantificazione dei fitosiderofori rilasciati dalle radici durante le 3 h di immersione in acqua distillata, erano costruite delle curve di calibrazione standard per il DMA, l'MA e l'epi-HMA (acido epi-idrossimugineico).

3.17 Misura della velocità di assorbimento radicale del ferro

La misura di tale parametro era effettuata utilizzando come fonte ferrica $\text{Fe}(\text{OH})_3$ marcato con ^{59}Fe . Le piante di orzo allevate nelle diverse condizioni nutritive erano prelevate dalla soluzione nutritiva e le radici erano immerse per 30 min in una soluzione nutritiva priva di micronutrienti. Ogni pianta era quindi trasferita in beakers contenenti 200 ml di soluzione nutritiva nuova priva di micronutrienti (denominata soluzione di assorbimento) tamponata a pH 7.5 con HEPES-KOH 10 mM. Il $^{59}\text{Fe}(\text{OH})_3$ era preparato come descritto da Cesco et al (2000) sciogliendo il $^{59}\text{FeCl}_3$ in acqua distillata e quindi aggiungendo KOH 1N per alcalinizzare la soluzione (attività specifica 123 KBq $\mu\text{mol Fe}^{-1}$). L'esperimento iniziava con l'aggiunta di 1 ml di sospensione contenente $^{59}\text{Fe}(\text{OH})_3$ (2 $\mu\text{mol Fe}$) nella soluzione di assorbimento e terminava 24 h dopo.

Gli esperimenti condotti per valutare la velocità di assorbimento del ferro Fe(II) erano effettuati utilizzando la procedura descritta per il Fe(III), ma alla soluzione era aggiunto acido ascorbico 300 μM .

In piante di orzo sono stati condotti esperimenti per valutare la capacità dell'apparato radicale di assorbire i complessi Fe-PS, mediante l'aggiunta di DMA libero (10 mM) alla soluzione di assorbimento.

Al termine del periodo di assorbimento (24 h) le piante erano trasferite in una nuova soluzione nutritiva priva di ^{59}Fe per 10 min. A questo punto, dopo aver rimosso il ^{59}Fe apoplastico utilizzando il metodo precedentemente descritto, le radici e le foglie erano raccolte, seccate a 105° C per 24 h, pesate e quindi incenerite in muffola a 500 °C per 24 h. Le ceneri erano disciolte in HCl 1% (w/v) per la determinazione del ^{59}Fe attraverso conta per scintillazione. La velocità di assorbimento del ^{59}Fe , misurata

come $\mu\text{mol } ^{59}\text{Fe}$ assorbito dall'intera pianta (radici + foglie) è riferita ai g.p.s. delle radici e al periodo di assorbimento di 24 h.

3.18 Misura della velocità di assorbimento radicale del solfato e della sua traslocazione

Le piante allevate nelle diverse condizioni nutritive venivano prelevate e le radici erano immerse in una soluzione nutritiva priva di micronutrienti e di solfato per 30 min. Le piante erano quindi trasferite in beakers contenenti una nuova soluzione nutritiva priva di micronutrienti e di solfato (soluzione di assorbimento) e tamponata a pH 6.0 con MES-KOH 10 mM. L'esperimento iniziava con l'aggiunta di $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ (attività specifica $2.1 \text{ KBq } \mu\text{mol}^{-1} \text{ } ^{35}\text{SO}_4^{2-}$) in quantità tale da avere una concentrazione finale di SO_4^{2-} pari a $600 \mu\text{M}$, e terminava 1 h dopo. Trascorso il periodo di assorbimento le piante erano trasferite in una soluzione di desorbimento fredda contenente CaSO_4 1 mM e MES-KOH 10 mM (pH 6.0) per 5 min. Le radici e le foglie venivano quindi prelevate seccate a 105°C per 24 h, pesate e incenerite a 500°C per 24 h. Le ceneri erano disciolte in HCl 1% (w/v) per la determinazione del $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ mediante conta per scintillazione. La velocità di assorbimento del $^{35}\text{SO}_4^{2-}$, misurata come $\mu\text{mol } ^{35}\text{SO}_4^{2-}$ assorbito dall'intera pianta (radici + foglie) è riferita ai g.p.s. delle radici e al periodo di assorbimento di 1 h.

La velocità di traslocazione dello ^{35}S è riportata come $\mu\text{moli } ^{35}\text{S}$ misurate nelle foglie per g.p.s. di radice per h.

3.19 Estrazione dell'RNA totale e analisi RT-PCR

Campioni di tessuto radicale (0.5 g) prelevati dalle piante allevate nelle diverse condizioni nutritive erano polverizzati in azoto liquido e quindi omogenizzati utilizzando il sistema TRIZOL^(R). L'omogenato era trasferito in una provetta eppendorf ed incubato per 5 min in ghiaccio per permettere la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici. Successivamente, era aggiunto al campione il cloroformio e dopo 3 min di incubazione, le provette erano centrifugate per 15 min a 12000 g a 4°C . Dopo la centrifugazione, nelle provette è evidente la separazione di una fase rossa in basso (la fase del fenolo-cloroformio), un'interfase ed una fase acquosa poco colorata in alto. L'RNA può essere recuperato nella fase acquosa,

mentre il DNA e le proteine rimangono nell'interfase e nella fase organica. Per permettere la precipitazione dell'RNA, la fase acquosa era quindi trasferita in una nuova provetta con un'aliquota di isopropanolo. Dopo un'incubazione di 10 min in ghiaccio, le provette erano centrifugate per 10 min a 4 °C. Il pellet era quindi recuperato, lavato con etanolo al 75% (v/v), e centrifugato a 7500 g per 5 min a 4 °C. Il pellet ottenuto era risospeso in 60-80 µl di H₂O-DEPC, incubato a 55-60 °C per 10 min e conservato a -80 °C fino al momento dell'uso.

La concentrazione dell'RNA isolato è stata misurata allo spettrofotometro (Perkin-Elmer Lambda 3) alla lunghezza d'onda di 260 nm. Il valore di Assorbanza $A_{260} = 1$ corrisponde a circa 40 µg di RNA/ml. L'integrità dell'RNA isolato è stata controllata mediante gel-elettroforesi in 1,2 % di agarosio e 2,2% formaldeide, in MOPS. La corsa elettroforetica è stata eseguita a 4-5 Volt/cm costanti per 1 ora e 30 min. L'RNA è stato visualizzato con l'etidio bromuro. Solo i campioni di RNA che hanno presentato le due principali bande degli rRNA 18S e 28S sono stati utilizzati per l'analisi dell'RNA messaggero.

Per lo studio dell'espressione dei geni *HvST1* e *LeIRT1*, è stata utilizzata la tecnica RT-PCR (Reverse Translation - Polymerase Chain Reaction), che consente di amplificare un DNA partendo da mRNA. La tecnica prevede due fasi distinte:

1. la retrotrascrizione dell'RNA in cDNA, effettuata utilizzando il kit M-MLV (H-) Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA);
2. l'amplificazione del cDNA ottenuto nella prima fase, utilizzando un enzima, la Taq Polimerasi, che catalizza la reazione di amplificazione *in vitro* di una particolare sequenza di DNA a partire da una frazione di acido nucleico che viene utilizzata come stampo.

Per valutare l'espressione del gene *HvST1* erano disegnati i primers reverse e forward sulla base della sequenza del gene *HvST1* pubblicata (numero di accesso Q43482) che amplificano un frammento di 699bp. I primers erano i seguenti per *HvST1-r* 5'-CGGATTCTTCAGGCTAGGGT-3' e per *HvST1-f* 5'-GCCACCATTTCTTTGTTCCC-3'.

Per la preparazione della miscela di reazione venivano utilizzati il tampone di reazione, la miscela 10 mM dei quattro nucleotidi trifosfato (dNTP), i due primer specifici, la Taq DNA polimerasi ed un'aliquota del cDNA.

Il ciclo di amplificazione prevedeva una prima fase di 2 min a 94 °C per attivare la Taq Polimerasi e poi una successione di 40 cicli costituiti da 1 min di denaturazione a 93 °C, 1 min di appaiamento a 55 °C e 2 min di estensione a 72 °C.

Per valutare l'espressione del gene *LeIRT1* erano utilizzati i primers reverse e forward come descritto da Schikora et al. (2006) che amplificano un frammento di lunghezza variabile tra 90 e 110 bp. I primers erano i seguenti per *LeST1-r* 5'-CAACTCCCAATAGGTCATGAAGA-3' e per *LeIRT1-f* 5'-GGCCATTTGGGCTTAAACTT-3'. La miscela di reazione era la stessa utilizzata per l'amplificazione del gene *HvST1*. Il ciclo di amplificazione prevedeva una prima fase di 2 min a 94 °C per attivare la Taq Polimerasi e poi una successione di 40 cicli costituiti da 1 min di denaturazione a 93 °C, 1 min di appaiamento a 56 °C e 2 min di estensione a 72 °C.

I prodotti di PCR erano quantificati rapportando la loro quantità a quella di un gene di controllo (*18S*).

L'espressione genica del *18S* è stata valutata utilizzando la metodica descritta per l'analisi del gene *HvST*, ma utilizzando un numero di cicli inferiore, in particolare pari a 30.

Tutte le RT-PCR semiquantitative sono state condotte in duplicato. I prodotti dell'RT-PCR erano separati elettroforeticamente su gel di agarosio 1% (peso/volume) e colorati con etidio bromuro.

3.20 Determinazione dell'attività Fe(III)-riduttasica a livello radicale.

La capacità di radici di piante intere di ridurre il Fe(III)-EDTA era saggiata seguendo l'aumento di assorbanza a 535nm della soluzione a contatto con le radici dovuta alla formazione del complesso colorato tra l'acido batofenantrolinadisulfonato (BPDS) ed il Fe(II), originatosi in seguito alla riduzione del Fe(III) da parte delle radici, come descritto in Pinton et al. (1999).

Le radici di ogni pianta erano immerse, dopo accurato lavaggio in acqua distillata, in una soluzione areata contenente CaSO₄ 0.5 mM, Fe(III)-EDTA 0.25 mM, BPDS 0.6 mM e Mes-KOH 10 mM (pH 5.5) per 30-60 min e mantenute al buio per evitare eventuali processi di fotoriduzione. Dopo la reazione, le piante erano rimosse dalla soluzione, le radici tagliate e pesate, e l'assorbanza della soluzione era letta

spettrofotometricamente (Perkin-Elmer Lambda 3) a 535 nm. Le nmoli di Fe(III) ridotto erano determinate utilizzando il coefficiente di estinzione molare pari a $22.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.21 Determinazione della produzione di etilene

La quantità di etilene prodotta a livello fogliare da piante di pomodoro allevate nelle differenti condizioni nutritive, era misurata utilizzando la seconda foglia di ciascuna pianta. Le foglie erano pesate e introdotte in un tubo Falcon (50 ml) che era lasciato aperto per 30 min, allo scopo di far disperdere l'etilene prodotto a seguito della ferita. Il tubo era quindi chiuso e le foglie erano mantenute a 24 °C per 2 h. Campioni di aria (1 ml) erano quindi prelevati con una siringa e la quantità di etilene contenuta nel campione era determinata mediante la tecnica della gascromatografia. Il gascromatografo (Fraetovap 4200, Carlo Erba) era equipaggiato con una colonna di allumina 80100 mesh.

4. RISULTATI

4.1. STUDIO DELLA RELAZIONE TRA LA NUTRIZIONE SOLFATICA E FERRICA IN PIANTE A STRATEGIA II

4.1.1 *Caratterizzazione preliminare delle interconnessioni metaboliche tra i processi di acquisizione dei nutrienti zolfo e ferro in piante di mais*

4.1.1.1 *Parametri di crescita*

Le piante di mais allevate nelle due diverse condizioni nutritive (+S e -S) raggiungevano lo stesso stadio di sviluppo al momento del prelievo. La crescita delle piante per dieci giorni in condizioni di S-carenza non aveva effetti significativi sullo sviluppo delle foglie e delle radici, come dimostrato dalla determinazione del peso fresco (Fig. 4.1a e 4.1b). Tuttavia, si osservava un decremento del rapporto “shoot/root” determinato dalla S-carenza (Fig. 4.1a riquadro).

Un quadro molto simile si ottiene dall’analisi dei valori di peso secco di foglie e radici riportati rispettivamente in Fig. 4.1c e 4.1d. Anche in questo caso la S-carenza non determinava decrementi significativi del parametro, tuttavia si osservava una tendenziale riallocazione della biomassa dalle foglie verso le radici come dimostrato dalla diminuzione del rapporto “shoot/root” (Fig. 4.1c riquadro).

Un tipico sintomo della crescita in condizioni di S-carenza è rappresentato dalla comparsa di clorosi fogliare, che riguarda essenzialmente le foglie più giovani essendo lo zolfo un elemento poco mobile nella pianta. Anche nelle nostre condizioni sperimentali il contenuto di clorofilla delle foglie (Fig. 4.2) era influenzato dalla disponibilità di zolfo nella soluzione nutritiva. Le foglie delle piante S-carenti presentavano infatti un minor contenuto di clorofilla rispetto alle piante S-sufficienti, con percentuali di decremento pari al 40 e al 55%, rispettivamente nei prelievi a 4 e 24 h, sia nelle piante Fe-sufficienti che nelle piante Fe-carenti.

La comparsa di clorosi nelle foglie giovani è un tipico sintomo anche della Fe-carenza, tuttavia nelle nostre condizioni sperimentali i livelli di clorofilla non risultavano influenzati significativamente dall’imposizione dello stress, probabilmente a causa del breve periodo considerato (24 h di Fe-carenza).

4.1.1.2 Contenuto di ferro nelle foglie

La Fig. 4.3a riporta i dati relativi al contenuto di ferro nel tessuto fogliare di piante di mais allevate per dieci giorni in presenza (+S) e in assenza (-S) di zolfo nella soluzione nutritiva. Il parametro era influenzato dalla disponibilità di zolfo ed in particolare, le foglie delle piante di mais cresciute in condizioni di S-carenza mostravano un minor contenuto di ferro (-30%) rispetto a quelle cresciute in presenza del nutriente.

4.1.1.3 Contenuto di ferro apoplastico nelle radici

Nelle radici, parte del ferro viene ossidato o precipita nello spazio intracellulare sotto forma di idrossidi o di sali fosfato andando a formare quello che viene definito pool di ferro apoplastico. Il ferro apoplastico costituisce il 95% del contenuto di ferro totale delle radici delle piante allevate in soluzione idroponica e può essere sfruttato dalla pianta in condizioni di Fe-carenza. Nella Fig. 4.3b sono riportati i dati riguardanti il contenuto di ferro apoplastico nelle radici di piante di mais allevate per dieci giorni in presenza (+S) e in assenza (-S) di zolfo nella soluzione nutritiva.

Il contenuto di ferro apoplastico nelle radici era influenzato dalla disponibilità di zolfo. In particolare, le radici delle piante di mais cresciute nella soluzione nutritiva S-carente mostravano un minor contenuto di ferro apoplastico (-30%) rispetto a quelle cresciute in presenza del nutriente.

4.1.1.4 Contenuto di zolfo totale in foglie e radici

La Fig. 4.4a mostra che la condizione di S-carenza determinava ovviamente una riduzione dei livelli di zolfo totale a livello fogliare, con percentuali di decremento intorno al 90% rispetto a quanto osservato nelle piante S-sufficienti. Inoltre, il contenuto di zolfo totale nelle foglie era influenzato anche dal fattore tempo e dall'imposizione della Fe-carenza. In particolare, in Fig. 4.4a si osserva una significativa caduta del livello del nutriente sia nelle piante controllo (+S+Fe) (-45% dopo 24 h), che in quelle S-sufficienti ma Fe-carenti (-20% da 4 a 24 h).

Infine, anche la Fe-carenza aveva effetto sui livelli di zolfo totale delle piante, ma solo in condizioni di S-sufficienza. Dopo 24 h di Fe-carenza le foglie delle piante S-sufficienti mostravano infatti un più alto contenuto di zolfo totale (+50%) rispetto al

controllo (+S+Fe), mentre il parametro non era significativamente influenzato dalla Fe-carenza nelle foglie delle piante S-carenti.

Anche a livello radicale le piante allevate in carenza di zolfo presentavano livelli di zolfo totale molto bassi rispetto ai controlli, con percentuali di decremento intorno al 99% sia nelle piante Fe- sufficienti che nelle piante Fe-carenti (Fig. 4.4b). Tuttavia, a differenza di quanto si osservava nelle foglie, nelle radici il livello del nutriente non era significativamente influenzato né dal fattore tempo, né dall'imposizione della Fe-carenza.

4.1.1.5 Contenuto di tioli non proteici in foglie e radici

I tioli sono solfocomposti caratterizzati dalla presenza di un gruppo SH, come ad esempio la cisteina e il glutatione. In Fig. 4.4c e 4.4d sono riportati rispettivamente i dati relativi al contenuto di tioli non proteici nelle foglie e nelle radici di piante di mais S-sufficienti e S-carenti dopo 4 e 24 h dall'inizio del periodo di Fe-privazione.

Il livello di tioli non proteici era influenzato dalla crescita in condizioni di S-carenza sia a livello radicale che fogliare ed indipendentemente dalla disponibilità di ferro. In particolare, nelle radici si osservava un decremento pari al 20-30% circa nei tessuti prelevati dopo 4 e a 24 h dall'imposizione della Fe-carenza, mentre nelle foglie il decremento era pari al 70% e al 20% rispettivamente dopo 4 h e 24 h dall'inizio del trattamento.

Il contenuto di tioli non proteici nelle foglie e nelle radici era influenzato, inoltre, dall'imposizione della Fe-carenza in entrambe le condizioni nutritive (+S e -S). Nelle foglie, l'effetto era già visibile dopo 4 h (+12%), ma solo nelle piante S-sufficienti, mentre risultava particolarmente evidente dopo 24 h dall'inizio del periodo di Fe-privazione (50% più alto rispetto al controllo sia nelle piante S-sufficienti che S-carenti). Nelle radici, invece, l'effetto della Fe-carenza era anticipato a 4 h dall'inizio del trattamento, con incrementi del 50 e del 23%, rispettivamente nelle piante S-sufficienti e S-carenti.

4.1.1.6 Attività degli enzimi ATPs e OASTL in foglie e radici

Gli enzimi ATPs e OASTL catalizzano rispettivamente la prima e l'ultima reazione del processo di riduzione assimilativa dello zolfo. Le variazioni dell'attività di questi

enzimi in risposta alle diverse disponibilità dei nutrienti zolfo e ferro sono riportate in Fig. 4.5.

Dopo dieci giorni dall'imposizione della S-carezza, l'attività dell'enzima ATPs aumentava sia nelle foglie che nelle radici. La percentuale di stimolazione era pari al 30-40% rispetto all'attività dello stesso enzima nelle piante S-sufficienti, sia a 4 che a 24 h (Fig. 4.5a e 4.5b). La stimolazione indotta dalla S-carezza scompariva però nelle piante sottoposte contemporaneamente a S- e a Fe-carezza sia a livello fogliare che radicale.

In particolare, la Fe-carezza influenzava fortemente l'attività dell'ATPs. Nelle foglie delle piante Fe-carenti si osservava un decremento dell'attività che, sebbene già evidente a 4 h (-20 e -30% rispettivamente nelle piante S-sufficienti e S-carenti), era presente anche a 24 h dall'inizio della Fe-privazione (-20% e -50% rispettivamente nelle piante S-sufficienti e S-carenti). D'altra parte, a livello radicale si osservava una diversa risposta alla Fe-carezza in funzione della disponibilità di zolfo nella soluzione nutritiva. Nelle piante S-sufficienti, l'attività dell'enzima aumentava del 40% dopo 4 h dall'inizio del trattamento, mentre in quelle S-carenti diminuiva fortemente (-40% e -60% rispettivamente dopo 4 e 24 h dall'inizio del trattamento).

Analogamente a quanto osservato per l'ATPs, l'attività dell'OASTL era stimolata dalla S-carezza con incremento di attività di simile entità (30-40%, sia nelle foglie che nelle radici) (Fig. 4.5c e 4.5d rispettivamente). La Fe-carezza determinava la scomparsa della stimolazione indotta dalla S-carezza solo a livello fogliare. Dalla Fig. 4.5d si può infatti notare che a livello radicale l'aumento di attività dell'OASTL rimaneva inalterato. Inoltre, l'attività dell'enzima OASTL era influenzata dalla Fe-carezza a livello fogliare: si osservava una riduzione dell'attività dell'enzima sia nelle piante S-sufficienti (-35 e -30% rispettivamente dopo 4 e 24 h), che in quelle S-carenti (-70 e -80% rispettivamente a 4 e 24 h).

A livello radicale si osservava invece un aumento dell'attività di questo enzima in risposta alla Fe-carezza, ma solo nelle piante S-sufficienti (+35% circa sia a 4 che a 24 h), mentre non si osservava alcun effetto della Fe-carezza nelle piante sottoposte a S-carezza.

4.1.1.7 Assorbimento e traslocazione del solfato.

L'imposizione della condizione di S-carenza determinava una forte stimolazione della capacità delle piante di assorbire il solfato (5.25 rispetto a 1.94 $\mu\text{moli g}^{-1}$ p.s. radice h^{-1} rispettivamente nelle piante S-sufficienti e S-carenti) (Tab. 4.1). Tale attività aumentava anche in seguito all'imposizione della Fe-carenza: dopo 24 h dall'inizio del trattamento si aveva un aumento della velocità di assorbimento pari all'11 e al 55%, rispettivamente nelle piante S-sufficienti e S-carenti.

La crescita in condizioni di S-carenza influenzava anche la velocità di traslocazione del nutriente (0.86 rispetto a 0.07 $\mu\text{moli g}^{-1}$ p.s radice h^{-1}) (Tab. 4.1). Allo stesso modo, l'imposizione della Fe-carenza determinava un aumento nella velocità di traslocazione dello zolfo, che era pari al 114 e al 65% rispettivamente nelle piante S-sufficienti e S-carenti.

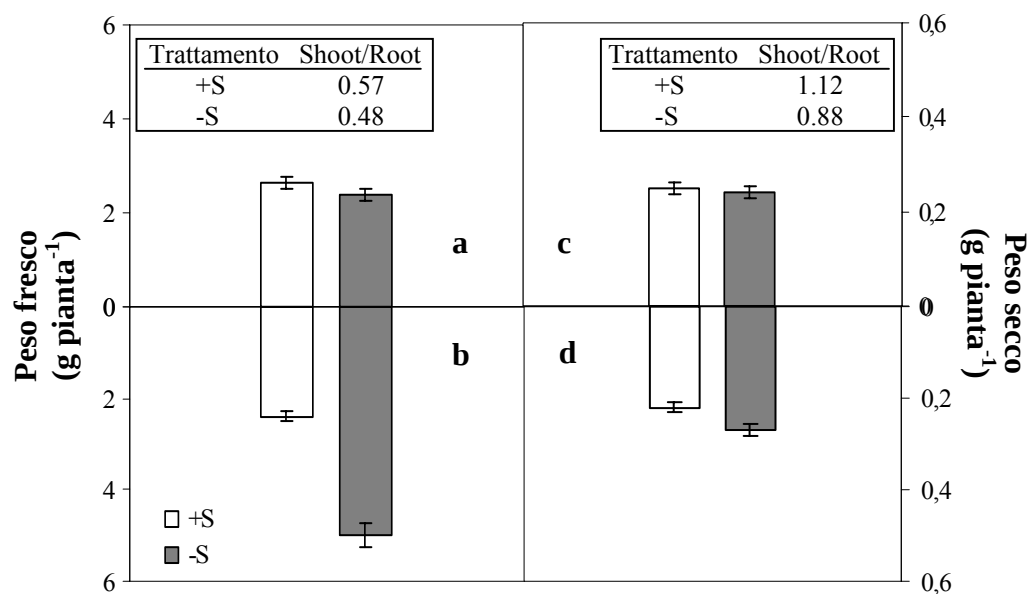


Fig. 4.1: Peso fresco di foglie (a) e radici (b) e peso secco di foglie (c) e radici (d) di piante di mais allevate per dieci giorni in presenza (+S) e in assenza (-S) di zolfo nella soluzione nutritiva. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano l'errore standard. Nei riquadri: rapporti "shoot/root".

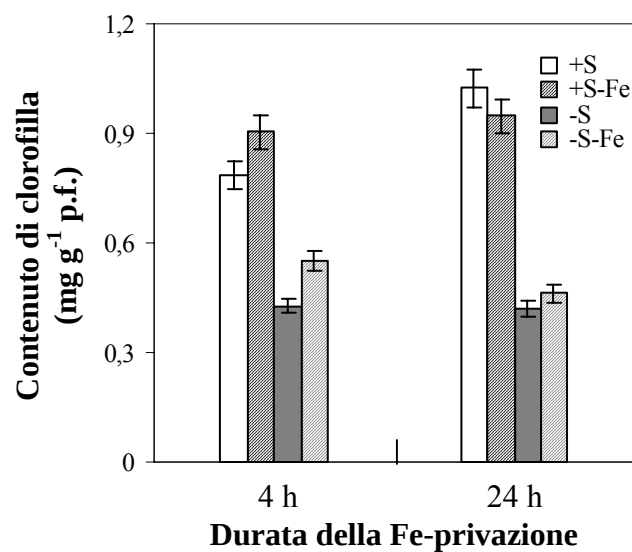


Fig. 4.2 : Contenuto di clorofilla nelle foglie di piante di mais S-sufficienti (+S) e S-carenti (-S) dopo 4 e 24 h dall'inizio del periodo di Fe-privazione. Statistica come in Fig. 4.1.

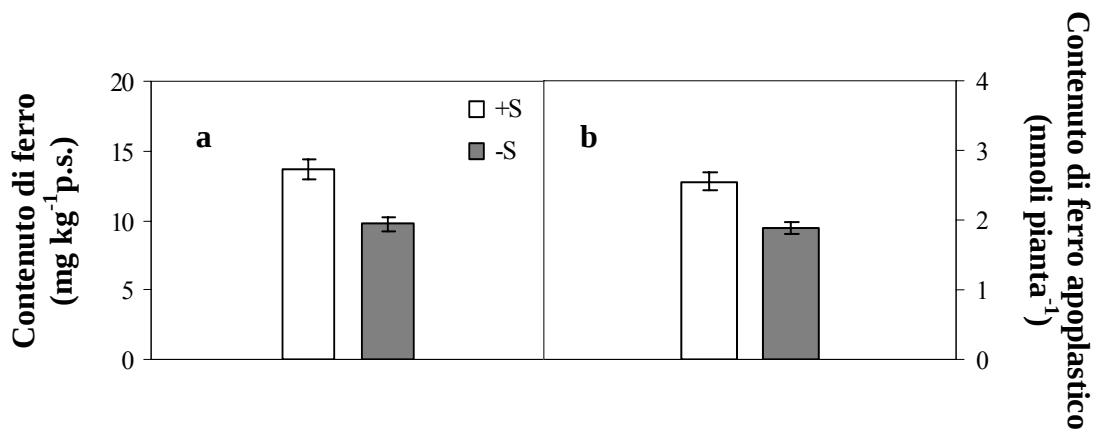


Fig. 4.3: Contenuto di ferro nelle foglie (a) e contenuto di ferro apoplastico nelle radici (b) di piante di mais allevate per dieci giorni in presenza (+S) e in assenza (-S) di zolfo nella soluzione nutritiva. Statistica come in Fig. 4.1.

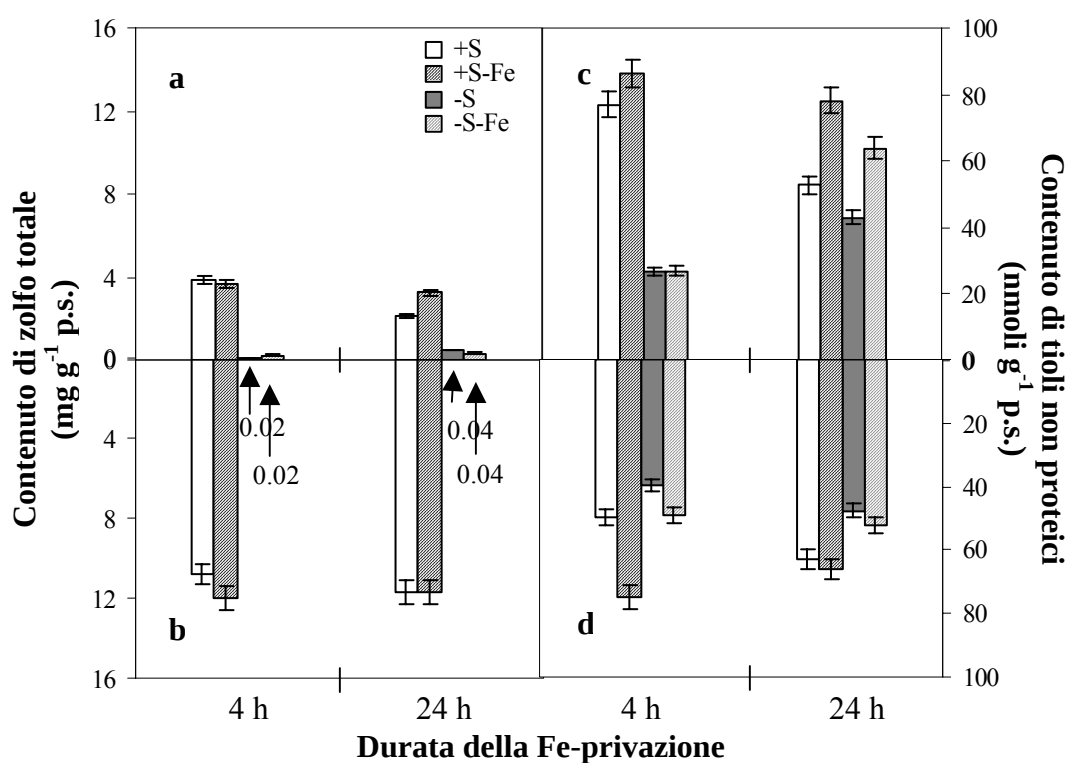


Fig. 4.4: Contenuto di zolfo totale nelle foglie (a) e nelle radici (b) e contenuto di tioli non proteici nelle foglie (c) e nelle radici (d) di piante di mais S-sufficienti (+S) e S-carenti (-S) dopo 4 e 24 h dall'inizio del periodo di Fe-privazione. Statistica come in Fig. 4.1.

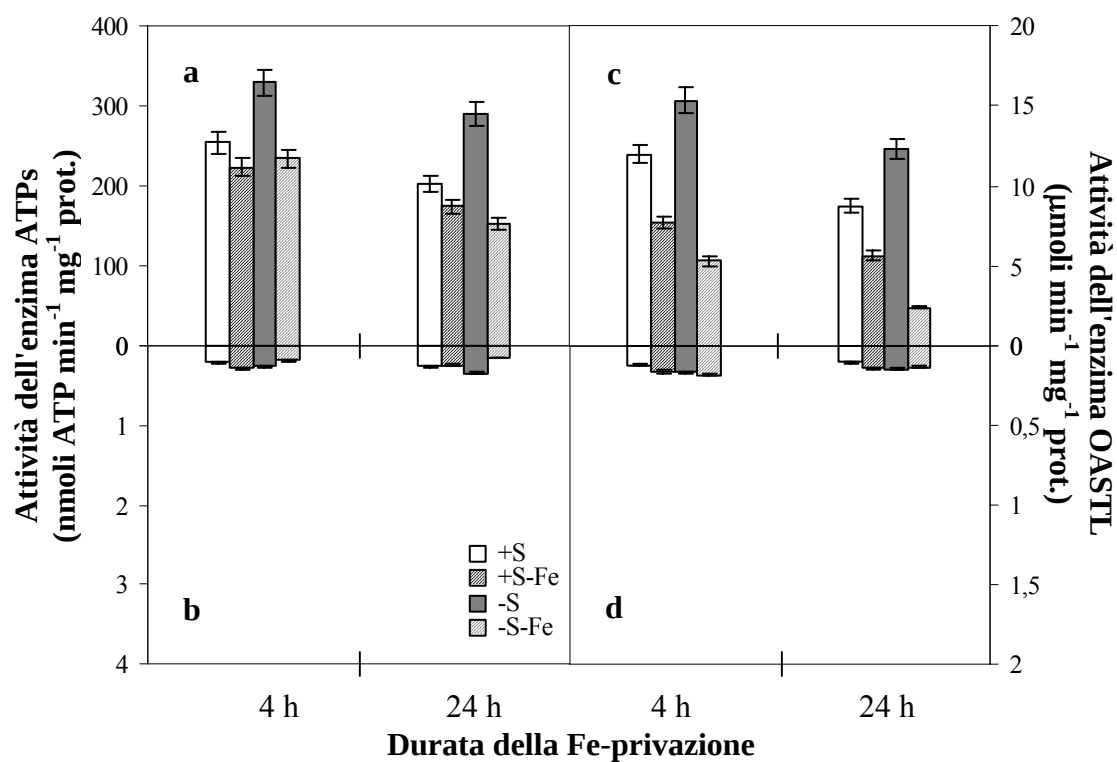


Fig. 4.5: Variazioni dell'attività dell'enzima ATP-s nelle foglie (a) e nelle radici (b) e variazioni dell'attività dell'enzima OASTL nelle foglie (a) e nelle radici (b) di piante di mais S-sufficienti (+S) e S-carenti (-S) dopo 4 e 24 h dall'inizio del periodo di Fe-privazione. Statistica come in Fig. 4.1.

	Assorbimento	Traslocazione
Trattamento	($\mu\text{moli } ^{35}\text{SO}_4^{2-} \text{ g}^{-1} \text{ p.s. radice h}^{-1}$)	($\mu\text{moli } ^{35}\text{S} \text{ g}^{-1} \text{ p.s. radice h}^{-1}$)
+S+Fe	1.94 ± 0.031	0.07 ± 0.01
+S-Fe	2.16 ± 0.079	0.15 ± 0.07
-S+Fe	5.25 ± 0.21	0.86 ± 0.28
-S-Fe	8.12 ± 1.37	1.42 ± 0.68

Tab. 4.1: Assorbimento del $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ e traslocazione dello ^{35}S in piante di mais S-sufficienti (+S) e S-carenti (-S) dopo 24 h dall'inizio del periodo di Fe-privazione. Statistica come in Fig. 4.1.

4.1.1.8 Discussione

Nella fase preliminare del lavoro di tesi è stata verificata l'esistenza di una relazione tra la nutrizione solfatica e ferrica nelle piante a Strategia II. Tra le graminacee, il mais è stato scelto come pianta modello per l'importanza economica che riveste nel settore agroalimentare.

La crescita in condizioni di completa assenza di solfato, determinava nelle piante di mais una forte diminuzione di peso fresco e secco sia dell'apparato fogliare che di quello radicale. Tuttavia, si osservava una tendenziale riallocazione della biomassa verso le radici, come indicato dalla diminuzione del rapporto "shoot/root" (riquadri nella Fig. 4.1). La maggiore inibizione dello sviluppo dell'apparato fogliare rispetto a quello radicale è un tipico sintomo indotto dalla carenza di macronutrienti, quali nitrato, fosfato e solfato (Robinson, 1994; Marschner, 1995), e può essere spiegata considerando la necessità della pianta, in queste particolari condizioni, di promuovere lo sviluppo dell'apparato radicale al fine di esplorare volumi maggiori di terreno.

La clorosi fogliare è un altro tipico sintomo della S-carenza (Marschner, 1995) ed infatti, anche nelle nostre condizioni sperimentali, la limitata disponibilità di zolfo comportava il decremento del contenuto di clorofilla nelle foglie. La comparsa di clorosi fogliare è caratteristica anche delle piante cresciute in carenza di ferro (Marschner, 1995), tuttavia, nelle piante di mais analizzate in questa parte del lavoro, non viene evidenziato alcun effetto della Fe-carenza sul contenuto fogliare di clorofilla, probabilmente a causa del breve periodo di Fe-carenza considerato (24 h).

I dati riguardanti il contenuto fogliare di ferro e il contenuto di ferro apoplastico nelle radici rappresentano la prima indicazione dell'esistenza di una relazione tra la disponibilità di zolfo e la capacità delle piante di acquisire il ferro. Infatti, la carenza di zolfo nella soluzione nutritiva limitava l'accumulo di ferro a livello fogliare e di ferro apoplastico nelle radici.

Ovviamente, la carenza di zolfo determinava delle riduzioni dei livelli di zolfo totale sia a livello fogliare che radicale, ma è interessante notare che il contenuto di zolfo totale delle foglie era influenzato dalla disponibilità di ferro. In particolare, dopo 24 h di Fe-carenza, le foglie delle piante S-sufficienti mostravano un più alto livello di zolfo totale (+50% circa). Le piante a Strategia II rispondono alla Fe-carenza

sintetizzando nelle radici i fitosiderofori, composti in grado di chelare il Fe(III), (Mori, 2001). Tali composti vengono sintetizzati utilizzando come precursore l'aminoacido metionina (Mori e Nishizawa, 1987). L'aumento del contenuto di zolfo totale nelle foglie può quindi essere spiegato considerando una aumentata domanda di zolfo ridotto da parte della pianta necessario per la sintesi della metionina e quindi dei fitosiderofori nelle radici.

I dati derivanti dall'analisi del contenuto di tioli non proteici nelle foglie e nelle radici delle piante di mais sembrano confermare tale ipotesi. La Fe-carenza determinava infatti un incremento di questi composti sia nelle piante S-sufficienti che in quelle S-carenti. I tioli sono forme abbondanti di zolfo ridotto presenti comunemente nei tessuti della pianta e, in condizioni normali, il glutathione rappresenta la principale forma attraverso la quale lo zolfo viene traslocato dalle foglie verso le radici (Rennenberg, 1982). La sintesi di metionina, che rappresenta il precursore dell'acido mugineico, richiede un'ampia disponibilità di zolfo ridotto e quindi il maggiore accumulo di tioli non proteici osservato nelle foglie Fe-carenti potrebbe essere correlata alla sintesi dei fitosiderofori nelle radici. E' stato dimostrato (Nakanishi et al., 1999) che la metionina sintetizzata nella parte aerea della pianta non viene utilizzata per la sintesi dell'acido mugineico nelle radici; tuttavia, tale osservazione non esclude la possibilità che i composti tiolici (ad esempio glutathione o cisteina) prodotti a livello fogliare possano essere trasportati alle radici per essere utilizzati come fonte di zolfo ridotto per la sintesi di metionina e dei suoi derivati (i fitosiderofori).

Tali osservazioni ci hanno indotto ad ipotizzare che la disponibilità di ferro possa influenzare il metabolismo dello zolfo. Sono state quindi analizzate le variazioni dell'attività degli enzimi ATPs e OASTL, rispettivamente il primo e l'ultimo enzima del processo di riduzione assimilativa dello zolfo. Entrambi gli enzimi sono importanti nella regolazione dell'assimilazione del solfato e per la disponibilità di zolfo ridotto per varie funzioni cellulari. Le piante infatti assorbono lo zolfo dal suolo principalmente sotto forma di solfato, che successivamente viene traslocato attraverso lo xilema nelle foglie dove può essere ridotto in una reazione dipendente dalla luce ed utilizzato nella sintesi delle proteine e altri metaboliti contenenti zolfo. La stimolazione dell'attività degli enzimi ATPs e OASTL in risposta alla S-carenza è

stata ampiamente descritta in letteratura (Passera e Ghisi, 1982; Astolfi et al., 2001) e anche nelle nostre condizioni sperimentali si osservava un incremento dell'attività di entrambi gli enzimi, sia a livello fogliare che radicale, in risposta alla S-deprivazione. Infatti, sebbene i cloroplasti siano considerati il sito primario dell'assimilazione riduttiva del solfato, è stato dimostrato che l'assimilazione del solfato avviene anche a livello radicale (Kuske et al., 1996; Lappartient e Touraine, 1996) in quanto localizzati anche nei proplastidi delle cellule del parenchima corticale delle radici (Fankhauser e Brunold, 1978, 1979). E' interessante notare che l'attività di entrambi gli enzimi a livello fogliare era influenzata dalla disponibilità di ferro. In particolare, l'imposizione della Fe-carenza non solo determinava la scomparsa della stimolazione dell'attività di entrambi gli enzimi in risposta alla S-carenza, ma comportava anche un decremento dell'attività basale di entrambi gli enzimi, sia in condizioni di S-sufficienza che di S-carenza.

A livello radicale, l'imposizione della Fe-carenza determinava effetti diversi rispetto a quanto osservato nelle foglie. In particolare, la Fe-carenza determinava nelle piante S-sufficienti un incremento dell'attività sia dell'ATPs che dell'OASTL. L'aumento dell'attività degli enzimi nelle radici in risposta alla Fe-carenza è probabilmente indicativo di una risposta veloce della pianta, probabilmente dovuta alla necessità di disporre di una maggiore quantità di zolfo ridotto necessario per la sintesi dei fitosiderofori. Tale indicazione sembra essere supportata dall'incremento dei livelli di assorbimento e traslocazione del solfato osservato nelle stesse piante in risposta alla Fe-carenza. Nelle radici delle piante di mais S-carenti, invece, mentre l'attività dell'ATPs risultava diminuita dalla Fe-privazione, l'attività dell'OASTL non variava. Il diverso comportamento dei due enzimi in condizioni di carenza di zolfo può essere spiegato considerando il diverso ruolo che essi svolgono nel processo di assimilazione dello zolfo. L'ATPs catalizza la prima fase dell'assimilazione dello zolfo, cioè l'attivazione del solfato, ed è quindi dipendente dalla disponibilità di solfato, mentre l'OASTL, che catalizza la formazione di cisteina a partire dall'O-acetilserina e dal solfuro inorganico, può utilizzare per la sintesi di cisteina anche solfuro proveniente da fonti diverse dal cammino di riduzione assimilativa dello zolfo. I maggiori livelli di attività dell'OASTL, osservati nelle radici delle piante Fe-carenti in condizioni di carenza di zolfo, potrebbero quindi avere la funzione di

compensare il decremento dell'attività dell'ATPs in modo da mantenere il pool di zolfo ridotto ai livelli richiesti.

Inoltre, nelle radici delle piante S- e Fe-carenti, la diminuzione di attività dell'ATPs, era accompagnata dall'aumento della capacità di assorbire e traslocare il solfato. Tale osservazione sembra apparentemente contrastare con quanto generalmente riportato in letteratura, poiché di solito l'aumento della capacità di assorbire solfato è accompagnato da un'elevata attività di assimilazione. Tuttavia, può essere spiegata considerando che la richiesta di zolfo ridotto a livello radicale per la sintesi dei fitosiderofori viene probabilmente soddisfatta attraverso la traslocazione di composti tiolici dalle foglie verso le radici, in quanto le piante S-carenti vengono allevate in completa assenza di solfato, e pertanto l'accumulo di tioli a livello radicale può esercitare un effetto inibitorio sull'attività dell'ATPs (Lappartient et al., 1999; Bolchi et al., 1999)

I risultati finora ottenuti indicano che la disponibilità di zolfo influenza l'accumulo di ferro nella pianta ed, inoltre, che la disponibilità di ferro influenza il metabolismo dello zolfo determinando rapide variazioni dell'assorbimento e dell'assimilazione del solfato che probabilmente portano a una ridistribuzione del pool dello zolfo ridotto nella pianta. Queste modificazioni potrebbero essere correlate all'aumento della richiesta di sintesi dei fitosiderofori in condizioni di carenza di ferro.

4.1.2 Ruolo della disponibilità di zolfo nella risposta alla Fe-carezza in piante di orzo.

4.1.2.7 Parametri di crescita

Dopo 14 giorni di crescita, le piante allevate in soluzione nutritiva con diversa disponibilità di zolfo ($S0 = 0 \mu\text{M}$, $S1 = 60 \mu\text{M}$, $S2 = 1200 \mu\text{M}$ di SO_4^{2-}) in presenza o in assenza di ferro, mostravano differenze nello sviluppo (Fig. 4.6). In particolare, la riduzione della crescita indotta dalla completa assenza di zolfo nella soluzione nutritiva ($S0$) interessava maggiormente l'apparato fogliare che non quello radicale. Infatti la riduzione del peso fresco era approssimativamente del 30% per le foglie e del 10% per le radici con conseguente decremento del rapporto "shoot/root" (Fig. 4.6b riquadro). Anche le piante allevate in condizioni di moderata S-carezza ($S1$) presentavano la diminuzione del rapporto "shoot/root" (Fig. 4.6b riquadro), pur non mostrando significative differenze nei valori di peso fresco di foglie e radici. La Fe-carezza riduceva significativamente il peso fresco delle foglie, tuttavia l'entità del decremento era indipendente dalla disponibilità di zolfo nella soluzione nutritiva e risultava pari al 20% rispetto ai controlli Fe-sufficienti. D'altra parte, la Fe-carezza non aveva effetti significativi sulla crescita dell'apparato radicale (Fig. 4.6b).

I dati relativi al peso secco delle piante sono riportati nelle Fig. 4.6c e 4.6d e mostrano che la disponibilità di zolfo non influenzava il peso secco delle foglie, mentre, al diminuire della disponibilità di questo nutriente, si osservava un aumento del peso secco delle radici (+25 e +50% rispettivamente nelle piante $S1$ e $S0$) con conseguente diminuzione del rapporto "shoot/root" sia nelle piante allevate nella condizione $S0$ che in quella $S1$, rispetto alle piante cresciute nella condizione $S2$ (Fig. 4.6d riquadro). In seguito all'imposizione della carezza di ferro si osservava un significativo decremento nel peso secco delle foglie a prescindere dalla disponibilità di zolfo (-25% circa in tutte le condizioni nutritive) (Fig. 4.6c), mentre a livello radicale si evidenziava un effetto della Fe-carezza nelle sole piante $S1$ e $S0$ (-20% circa in entrambe le condizioni nutritive) (Fig. 4.6d).

Il tipico sintomo della carezza di zolfo è la comparsa di clorosi fogliare che, essendo lo zolfo un elemento poco mobile nella pianta, riguarda principalmente le foglie più

giovani. Tuttavia solo le piante allevate in completa assenza di solfato (S0) mostravano una clorosi significativa (-40% di unità SPAD) (Fig. 4.7a).

La carenza di ferro induceva invece la comparsa di clorosi fogliare in tutte le condizioni nutritive, anche se la differenza era meno evidente nelle piante S0.

Al fine di chiarire se la diminuzione del contenuto di clorofilla comporti una minore attività fotosintetica della pianta, abbiamo misurato la quantità di CO₂ incorporata dalla foglia utilizzando un analizzatore di gas a infrarossi.

I dati riportati nella Fig. 4.7b mostrano che solo la completa assenza di zolfo (S0) riduceva l'attività fotosintetica delle piante (-20% rispetto alle piante S2) mentre una moderata carenza di zolfo (S1) non influenzava tale parametro. D'altra parte l'imposizione della Fe-carenza riduceva l'attività fotosintetica solo nelle piante allevate nelle condizioni S2 e S1, con un decremento pari a circa il 40% in entrambi i casi, mentre non aveva praticamente effetto nelle piante S0.

4.1.2.8 Contenuto di zuccheri totali in foglie e radici

Al fine di determinare se alla diminuzione dell'attività fotosintetica osservata in condizioni di S-carenza e di Fe-carenza fosse associata una diminuzione della sintesi degli zuccheri, abbiamo determinato il contenuto di zuccheri totali nei tessuti delle piante di orzo allevate in soluzioni nutritive con diversa disponibilità di zolfo e in presenza o in assenza di ferro (Fig. 4.8).

La concentrazione degli zuccheri totali aumentava a livello radicale al diminuire della disponibilità di zolfo nella soluzione nutritiva (+30 e +75% rispettivamente nelle piante S1 e S0 rispetto alle piante S2) e al contrario diminuiva a livello fogliare (-20% sia nelle piante S1 che S0 rispetto alle piante S2).

L'imposizione della Fe-carenza determinava una riduzione del contenuto di zuccheri sia a livello fogliare che radicale, ma solo nelle piante S1 e S2. In particolare, nelle foglie la riduzione era pari al 40% e 50% rispettivamente, mentre nelle radici il decremento era molto minore (-20%).

4.1.2.9 Contenuto di ferro nelle foglie

Dai dati illustrati in Fig. 4.9 si osserva che l'aumento della disponibilità di zolfo nella soluzione nutritiva era associato all'incremento del contenuto di ferro a livello

fogliare. Tale incremento era pari al 36 e al 23%, rispettivamente nelle piante S1 e S2 rispetto alle piante S0.

Ovviamente, in seguito all'imposizione della Fe-carenza, si osservava una significativa diminuzione del contenuto fogliare di ferro, la cui entità era però indipendente dalla disponibilità di zolfo (-50% circa).

4.1.2.4 Rilascio di fitosiderofori

I fitosiderofori sono composti in grado di chelare il Fe(III) che vengono rilasciati nella rizosfera dalle graminacee in condizioni di carenza di ferro.

La presenza di fitosiderofori è stata evidenziata soltanto negli essudati delle piante Fe-carenti e tra i composti rilasciati il principale era l'epi-HMA.

Nella Fig. 4.10 è possibile osservare che la diminuzione della disponibilità di zolfo nella soluzione nutritiva determinava una forte riduzione della quantità di epi-HMA rilasciato dalle piante Fe-carenti (-25% e -75%, rispettivamente nelle piante S1 e S0).

4.1.2.5 Velocità di assorbimento del ferro

La velocità di assorbimento del ferro è stata misurata utilizzando come fonte ferrica l'idrossido di ferro marcato con ^{59}Fe .

La velocità di assorbimento del ferro dall'idrossido di ferro diminuiva al diminuire della disponibilità di zolfo nella soluzione nutritiva, sia in condizioni di Fe-sufficienza (-30% circa sia in S1 che in S0) che di Fe-carenza (-35 e -55% nelle piante S1 e S0 rispettivamente) (Tab. 4.2).

La carenza di ferro determinava un incremento dell'assorbimento che era tanto più elevato quanto maggiore era la disponibilità di zolfo nella soluzione nutritiva (2, 4 e 5 volte il valore controllo rispettivamente nelle piante S2, S1 e S0).

Al fine di valutare la capacità dell'apparato radicale di assorbire i complessi Fe-PS, è stato aggiunto alla soluzione di assorbimento delle piante Fe-sufficienti un componente della famiglia dell'acido mugineico, il DMA. La presenza del DMA aumentava la velocità di assorbimento del ^{59}Fe dall'idrossido di ferro in particolare nelle piante S-sufficienti (4 volte il valore controllo) (Tab. 4.2).

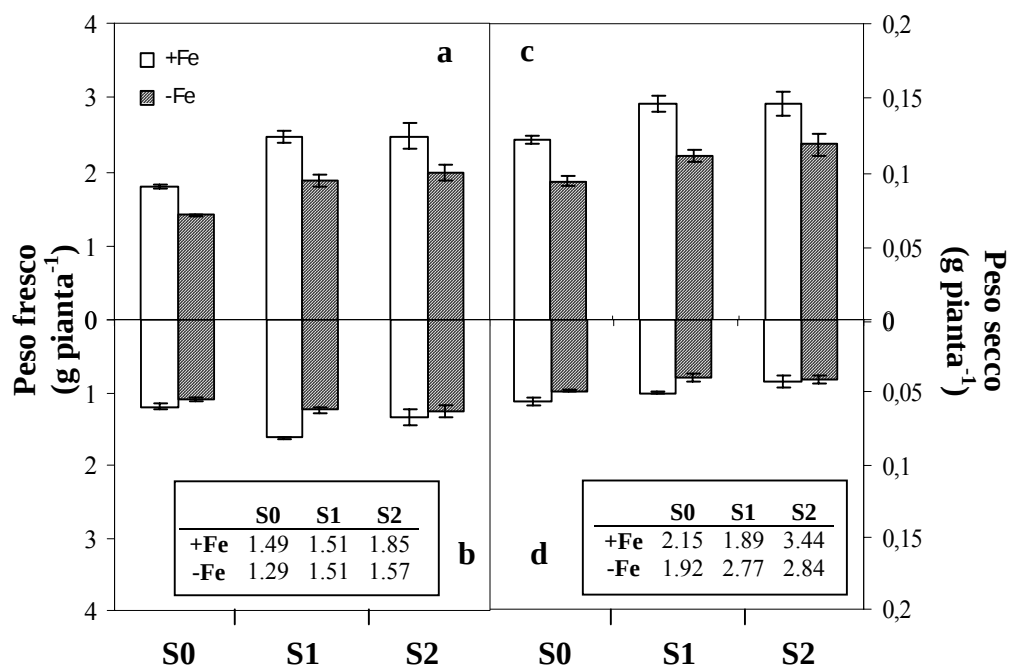


Fig. 4.6: Peso fresco di foglie (a) e radici (b) e peso secco di foglie (c) e radici (d) di piante di orzo. Le piante erano allevate per 14 giorni in soluzione nutritiva con diversa disponibilità di zolfo (S0 = 0 μM , S1 = 60 μM , S2 = 1200 μM di SO_4^{2-}) in presenza (+Fe) o in assenza (-Fe) di Fe(III)-EDTA 80 μM . Statistica come in Fig. 4.1. Nei riquadri: rapporti “shoot/root”.

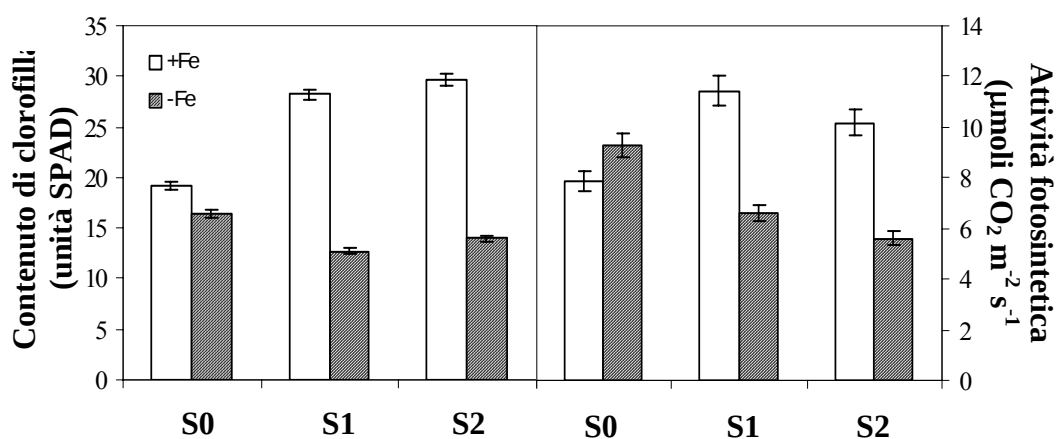


Fig. 4.7: Contenuto di clorofilla (a) e attività fotosintetica (b) di foglie di piante di orzo allevate per 14 giorni in soluzione nutritiva con diversa disponibilità di zolfo (S0 = 0 μM , S1 = 60 μM , S2 = 1200 μM di SO_4^{2-}) in presenza (+Fe) o in assenza (-Fe) di Fe(III)-EDTA 80 μM . Statistica come in Fig. 4.1.

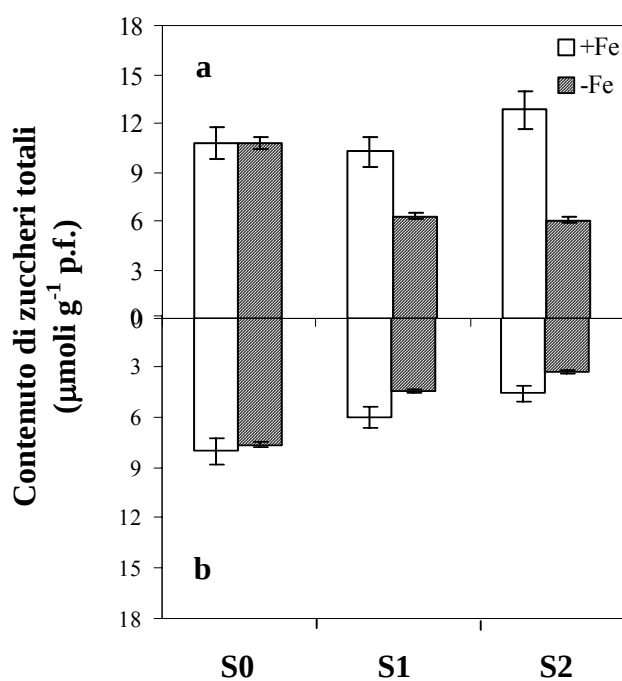


Fig. 4.8: Contenuto di zuccheri totali in foglie (a) e radici (b) di piante di orzo allevate per 14 giorni in soluzione nutritiva con diversa disponibilità di zolfo (S0 = 0 μM , S1 = 60 μM , S2 = 1200 μM di SO_4^{2-}) in presenza (+Fe) o in assenza (-Fe) di Fe(III)-EDTA 80 μM . Statistica come in Fig. 4.1.

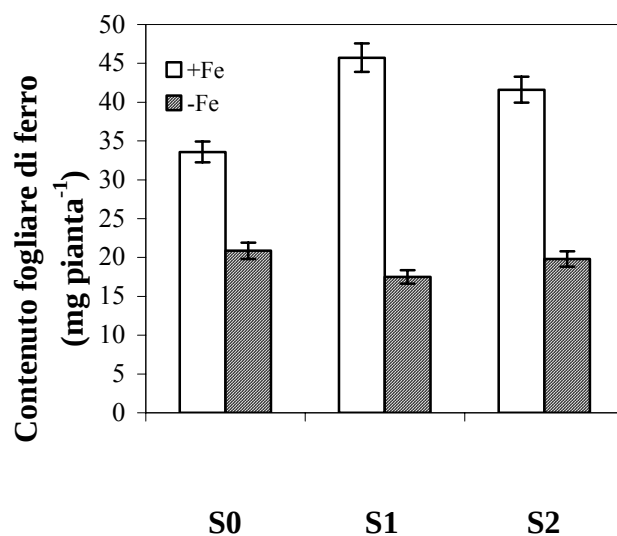


Fig. 4.9: Contenuto di ferro in foglie di piante di orzo allevate per 14 giorni in soluzione nutritiva con diversa disponibilità di zolfo (S0 = 0 μM , S1 = 60 μM , S2 = 1200 μM di SO_4^{2-}) in presenza (+Fe) o in assenza (-Fe) di Fe(III)-EDTA 80 μM . Statistica come in Fig. 4.1.

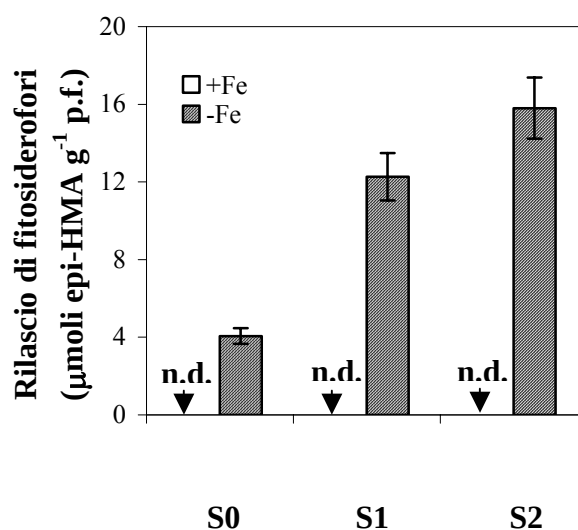


Fig. 4.10: Determinazione quantitativa dell'epi-HMA rilasciato da radici di piante di orzo allevate per 14 giorni in soluzione nutritiva con diversa disponibilità di zolfo (S0 = 0 μM , S1 = 60 μM , S2 = 1200 μM di SO_4^{2-}) in presenza (+Fe) o in assenza (-Fe) di Fe(III)-EDTA 80 μM . Statistica come in Fig. 4.1.

Trattamento	Assorbimento ($\mu\text{moli } ^{59}\text{Fe g}^{-1} \text{ p.s. radice h}^{-1}$)	
	con DMA esogeno	
S0 + Fe	1.12 ± 0.06	4.32 ± 0.18
S0 - Fe	3.25 ± 0.24	
S1 + Fe	1.08 ± 0.01	4.02 ± 0.52
S1 - Fe	4.64 ± 0.25	
S2 + Fe	1.44 ± 0.01	6.73 ± 0.04
S2 - Fe	7.07 ± 0.63	

Tab. 4.2: Velocità di assorbimento del ferro dall'idrossido di ferro da parte di piante di orzo allevate per 14 giorni in soluzione nutritiva con diversa disponibilità di zolfo (S0 = 0 μM , S1 = 60 μM , S2 = 1200 μM di SO_4^{2-}) in presenza (+Fe) o in assenza (-Fe) di Fe(III)-EDTA 80 μM . Dove indicato alla soluzione di assorbimento era aggiunto DMA libero alla concentrazione di 10 μM . Statistica come in Fig. 4.1.

4.1.2.6 Discussione

I risultati ottenuti dagli esperimenti condotti nella prima parte della tesi sulle piante di mais hanno evidenziato l'esistenza di una relazione tra la nutrizione solfatica e ferrica. In particolare, hanno indicato la possibilità che la condizione di Fe-carenza possa indurre nelle piante una maggiore richiesta di zolfo ridotto legata alla necessità di sintetizzare fitosiderofori.

Nella seconda parte di questo lavoro di tesi è stata quindi analizzata l'influenza della disponibilità di zolfo sul processo di rilascio dei fitosiderofori in condizioni di Fe-carenza.

La valutazione di questo aspetto ha però richiesto alcune variazioni del modello sperimentale. In particolare, le piante sono state allevate in presenza o in assenza di ferro, a tre differenti livelli di disponibilità di zolfo ($S0 = 0 \mu\text{M SO}_4^{2-}$, $S1 = 60 \mu\text{M SO}_4^{2-}$, $S2 = 1200 \mu\text{M SO}_4^{2-}$). Inoltre, è stata scelta come pianta modello l'orzo, poiché presenta un vantaggio sperimentale. Infatti, mentre il mais in condizioni di Fe-carenza rilascia piccole quantità di fitosiderofori durante tutto l'arco della giornata, l'orzo possiede la peculiarità di rilasciare quantità abbondanti di fitosiderofori con un picco di secrezione 2-3 h dopo l'inizio del periodo di luce (Takagi et al., 1984) e quindi in un momento ben determinato della giornata.

La completa assenza di zolfo nella soluzione nutritiva comportava una forte limitazione dello sviluppo delle piante, come mostrato dalla diminuzione dei valori di peso fresco e secco, ed inoltre la diminuzione del rapporto "shoot/root". La maggiore inibizione dello sviluppo dell'apparato fogliare rispetto a quello radicale, che risultava particolarmente evidente nelle piante S0, ma che era già presente nelle piante S1 (Fig. 4.6a e 4.6c riquadri), è un tipico sintomo della crescita in condizioni di privazione di macronutrienti come nitrato, fosfato e solfato (Marschner, 1995; Robinson, 1994) e può essere spiegata considerando la necessità della pianta di promuovere lo sviluppo dell'apparato radicale per poter esplorare volumi maggiori di terreno.

Un altro tipico sintomo della carenza di zolfo è rappresentato dalla comparsa di clorosi fogliare (Marschner, 1995). I dati ottenuti mostrano che solo le piante S0 presentavano una significativa riduzione del contenuto di clorofilla, mentre nelle piante sottoposte a limitata S-carenza questo sintomo era meno individuabile. Una

forte diminuzione del contenuto di clorofilla era invece osservabile nelle foglie delle piante Fe-carenti, in accordo con quanto ampiamente descritto in letteratura (Marschner, 1995) (Fig. 4.7a).

Abbiamo voluto quindi verificare se la diminuzione del contenuto di clorofilla fosse associata a una diminuzione della capacità fotosintetica della pianta (Fig. 4.7b). I dati mostrano che l'attività fotosintetica diminuiva significativamente solo nelle piante sottoposte a completa carenza di zolfo, mentre non si osservavano differenze tra le piante S1 e S2. Inoltre, un forte declino dell'attività fotosintetica si osservava nelle piante S2 e S1 in seguito all'imposizione della Fe-carenza.

Eccetto una diminuzione del rapporto "shoot/root", le piante cresciute in presenza di limitata disponibilità di solfato (S1), non mostravano nessun altro sintomo di S-carenza, quali la riduzione del contenuto fogliare di clorofilla e della capacità fotosintetica, indicando che tale livello di disponibilità del nutriente consentiva un tenore di crescita quasi ottimale. Tuttavia, l'andamento del rapporto "shoot/root" ci ha permesso di considerare il livello di disponibilità dello zolfo nella soluzione 2 come ottimale e quello della soluzione 1 e 0 rispettivamente come moderatamente e completamente carente.

I dati riportati in Fig. 4.9 mostrano l'esistenza di una specifica relazione tra la disponibilità di zolfo e il contenuto fogliare di ferro. In particolare, il contenuto di ferro nelle foglie delle piante Fe-sufficienti aumentava all'aumentare della disponibilità di zolfo nella soluzione nutritiva. Altri autori hanno precedentemente rilevato una correlazione tra la disponibilità di zolfo e il contenuto di ferro delle piante. In particolare, Bouranis et al. (2003) hanno dimostrato che piante di mais S-carenti accumulano nelle foglie minori quantità di ferro rispetto alle piante S-sufficienti. Inoltre, simili risultati sono riportati nella prima parte di questa tesi. L'effetto della carenza di zolfo sul contenuto fogliare di ferro può essere spiegata, almeno in parte, considerando che le graminacee rispondono alla carenza di ferro sintetizzando fitosiderofori (Strategia II) e che il processo di biosintesi richiede metionina come precursore di tali composti (Mori e Nishizawa, 1987). Di conseguenza, una riduzione della disponibilità di zolfo per le piante potrebbe facilmente indurre un calo del pool di metionina e quindi della produzione dei fitosiderofori.

Tale ipotesi è confermata dai dati relativi al rilascio dei fitosiderofori. La diminuzione della disponibilità di zolfo nella soluzione nutritiva determinava infatti una forte riduzione della quantità di fitosiderofori rilasciati dalle piante Fe-carenti, che era particolarmente evidente nelle piante S0. E' interessante notare che altri autori (Kuwajima e Kawai, 1997) hanno dimostrato che la disponibilità di solfato nel mezzo esterno può influenzare l'accumulo dei fitosiderofori in radici di piante di orzo Fe-carenti.

I risultati ottenuti dimostrano il coinvolgimento dello zolfo nella risposta alla Fe-carenza, tuttavia non ci permettono di stabilire se lo zolfo svolga un ruolo diretto, ed è quindi implicato nel processo di sintesi e/o di rilascio dei fitosiderofori, oppure indiretto, attraverso la sua influenza su altri processi fisiologici, quali la sintesi proteica o la sintesi dei carboidrati.

A questo proposito, appare inverosimile che la diminuzione del rilascio dei fitosiderofori sia ascrivibile ad una limitata disponibilità di carboidrati. I dati riguardanti l'analisi degli zuccheri totali mostrano infatti che le concentrazioni degli zuccheri subivano delle variazioni soprattutto a livello fogliare e non a livello radicale dove i fitosiderofori sono effettivamente prodotti (Nakanishi et al., 1999). Tale risposta può essere spiegata considerando che la carenza di ferro determina la riduzione del rapporto "shoot/root". Di conseguenza, la riduzione delle concentrazioni di zuccheri nelle foglie avrebbe lo scopo di sostenere una maggiore velocità di crescita dell'apparato radicale in condizioni di carenza di ferro. Tali considerazioni sono confermate da precedenti lavori (Koch et al., 1996; Thoiron e Briat, 1999) che mostrano un aumento del contenuto di zuccheri a livello radicale indotto dalla Fe-carenza probabilmente dovuto ad una ridistribuzione dei fotoassimilati in favore delle radici. D'altra parte, alcuni autori hanno dimostrato che il livello di saccarosio nelle foglie rimaneva costante in condizioni di Fe-carenza (Thoiron e Briat, 1999) e, al contrario, altri hanno rilevato una diminuzione nell'accumulo di saccarosio nelle foglie di canna da zucchero in condizioni di moderata o severa Fe-carenza (Arulanantham et al., 1990).

Un dato molto interessante è stato ottenuto valutando la capacità delle piante di assorbire il ferro dal mezzo esterno. Nelle piante Fe-sufficienti, infatti, l'assorbimento del ferro da una fonte scarsamente solubile, come l'idrossido di ferro,

diminuiva al diminuire della disponibilità di zolfo nella soluzione nutritiva sia in condizioni di Fe-sufficienza che di Fe-carenza. E' inoltre importante osservare che la condizione di limitata disponibilità di solfato (S1), che non influiva né a livello di produzione di biomassa, né di attività fotosintetica, riduceva significativamente la capacità dell'apparato radicale di assorbire ferro (-40% e -25% con e senza DMA rispettivamente). Questo risultato non può essere attribuito alla diminuita disponibilità di carboidrati, in quanto in queste piante l'attività fotosintetica non era influenzata dalla disponibilità di zolfo e la concentrazione di zuccheri totali addirittura aumentava al diminuire della disponibilità di zolfo.

Nell'insieme i risultati forniscono un'importante indicazione di come la disponibilità di zolfo sia in grado di modificare la capacità della pianta di rispondere alla carenza di ferro, operando a diversi livelli ed in particolare sulla capacità della pianta di rilasciare fitosiderofori e di assorbire ferro dal mezzo esterno.

4.1.3 Modificazioni nella capacità di acquisizione e assimilazione dello zolfo indotte dalla carenza di ferro in piante di orzo.

4.2.3.1 Contenuto di zolfo totale in foglie e radici

In Fig. 4.11a e 4.11b sono riportati rispettivamente i livelli di zolfo totale misurati nelle foglie e nelle radici delle piante cresciute nelle diverse condizioni nutritive. Come atteso, il contenuto di zolfo totale nelle piante diminuiva al diminuire della disponibilità di zolfo nella soluzione nutritiva. In particolare, le piante allevate nelle condizioni S0 ed S1 presentavano un decremento del contenuto di zolfo totale pari al 96% e al 48%, a livello fogliare e al 75% e 70%, a livello radicale, rispetto al controllo. Risultati analoghi erano ottenuti anche nelle piante Fe-carenti.

Tale quadro si accompagnava però ad un considerevole aumento del contenuto di zolfo totale nelle foglie pari a circa il 45% e del 60% rispettivamente nelle piante S0 e S1, rispetto al controllo in seguito all'imposizione della Fe-carenza. Relativamente alla condizione di S-sufficienza (S2), si rilevava ancora un aumento del contenuto di zolfo totale nelle foglie indotto dalla Fe-carenza, sebbene di entità minore (+5%). D'altra parte, a livello radicale si osservavano variazioni significative del contenuto di zolfo totale esclusivamente nelle piante S1 (+70%).

4.2.3.2 Contenuto di cisteina e GSH in foglie e radici.

I risultati delle analisi cromatografiche sui livelli dei due metaboliti solforati, cisteina e GSH, sono riportati in Fig. 4.12.

La crescita in presenza di una limitata disponibilità di solfato (S1) determinava un incremento dei livelli di cisteina nelle radici pari al 20% rispetto al controllo e, parallelamente, una riduzione pari al 70% dello stesso parametro a livello fogliare. Inoltre, l'imposizione della Fe-carenza determinava l'aumento dei livelli di cisteina nei tessuti radicali, a prescindere dalla disponibilità di zolfo nella soluzione nutritiva (Fig. 4.12b). In particolare, nella condizione S1, il contenuto di cisteina nelle radici raggiungeva il valore più elevato, pari a cinque volte quello del controllo Fe-sufficiente, mentre nelle radici delle piante S0 e S2 i livelli di cisteina erano solo due volte più alti del controllo Fe-sufficiente. Contrariamente a quanto osservato nelle radici, a livello fogliare l'imposizione della Fe-carenza determinava il decremento

del contenuto di cisteina, eccetto nelle piante S1, dove si poteva osservare un incremento di tale parametro pari al 70% (Fig. 4.12a).

Analizzando i dati relativi al GSH, si nota l'esistenza di una chiara correlazione tra i livelli di GSH e la disponibilità di solfato, sia a livello fogliare che radicale (Fig. 4.12c e 4.12d rispettivamente). In seguito all'imposizione della Fe-carenza, invece, i livelli di GSH non subivano alcuna variazione significativa sia a livello fogliare che radicale.

4.2.3.3 Espressione del gene HvST1 nei tessuti radicali.

La Fig. 4.13 riporta i risultati relativi allo studio dei livelli di espressione del gene *HvST1* che codifica per un trasportatore ad alta affinità del solfato nei tessuti radicali, in risposta alle diverse condizioni di crescita.

La crescita in totale assenza di solfato determinava un forte aumento dei livelli di trascritto di *HvST1* a livello radicale. D'altra parte, l'imposizione della Fe-carenza aumentava il livello di trascritto di *HvST1*, ma solo nelle piante S1. L'espressione del gene che codifica per il trasportatore del solfato ad alta affinità della radice (*HvST1*) risultava infatti non influenzata o addirittura diminuita in risposta all'esposizione a Fe-carenza, rispettivamente nelle radici delle piante S0 e S2.

4.2.3.4 Assorbimento del solfato.

La crescita delle piante in totale assenza di solfato nella soluzione nutritiva determinava un aumento della capacità della radice di assumere solfato dal mezzo esterno. In particolare l'incremento era pari a 8 volte il valore controllo nelle piante S0 (Tab. 4.3). Anche le piante cresciute in condizioni di moderata carenza di zolfo (S1) mostravano un incremento della capacità di assorbire solfato che era pari al 30% e quindi di entità minore rispetto a quanto osservato per le piante S0 (Tab. 4.3). Analoghi incrementi in risposta alla diminuita disponibilità di zolfo erano osservabili anche nelle piante allevate in assenza di ferro.

Infine, l'imposizione della Fe-carenza determinava un ulteriore aumento della velocità di assorbimento del solfato nelle piante S1 (+76%), ma non modificava il parametro nelle piante S2 e S0 (Tab. 4.3).

4.2.3.5 Attività dell'enzima ATPs e OASTL in foglie e radici

L'ultima fase del lavoro è stata dedicata alla valutazione dell'effetto della Fe-carenza sulla fase riduttiva del metabolismo dello zolfo, attraverso la determinazione dell'attività dell'ATPs e dell'OASTL, rispettivamente il primo e l'ultimo enzima di tale processo.

La carenza di zolfo induceva un aumento dell'attività di entrambi gli enzimi sia a livello radicale che fogliare. Tuttavia, non si osservava alcuna differenza significativa tra le piante allevate nelle condizioni S1 e S2 (Fig. 4.14). Inoltre, tale incremento scompariva quando le piante erano sottoposte a Fe-carenza.

L'imposizione della Fe-carenza aveva effetti diversi sull'attività dei due enzimi considerati. La condizione di Fe-carenza determinava un forte incremento dell'attività dell'ATPs esclusivamente nelle radici delle piante cresciute in totale assenza di solfato (+77% rispetto al controllo Fe-sufficiente). D'altra parte, a livello fogliare, in seguito all'imposizione della Fe-carenza si osservava un significativo incremento dell'attività di questo enzima solo nelle piante S1 e S2 (+35 e +60% rispettivamente).

Al contrario, l'attività dell'OASTL era negativamente influenzata dal trattamento di Fe-privazione sia a livello fogliare che radicale, con percentuali di inibizione variabili dal 10 al 30% in funzione della disponibilità di solfato nella soluzione nutritiva.

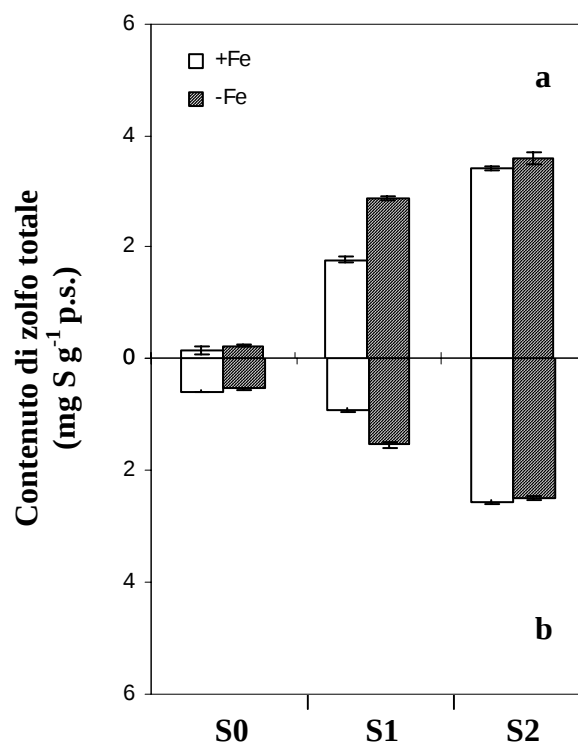


Fig. 4.11: Contenuto di zolfo totale in foglie (a) e radici (b) di piante di orzo allevate per 14 giorni in soluzione nutritiva con diversa disponibilità di zolfo (S0 = 0 μ M, S1 = 60 μ M, S2 = 1200 μ M di SO_4^{2-}) in presenza (+Fe) o in assenza (-Fe) di Fe(III)-EDTA 80 μ M. Statistica come in Fig. 4.1.

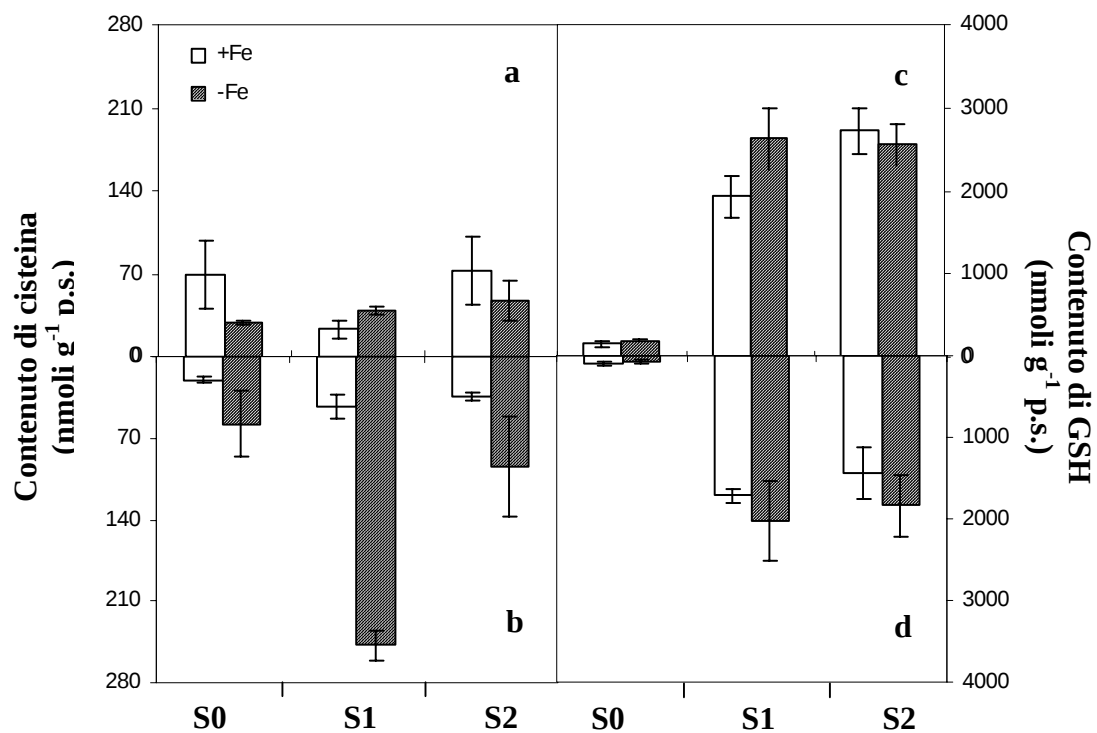


Fig. 4.12: Contenuto di cisteina in foglie (a) e radici (b) e contenuto di GSH in foglie (c) e radici (d) di piante di orzo allevate per 14 giorni in soluzione nutritiva con diversa disponibilità di zolfo (S0 = 0 μ M, S1 = 60 μ M, S2 = 1200 μ M di SO_4^{2-}) in presenza (+Fe) o in assenza (-Fe) di Fe(III)-EDTA 80 μ M. Statistica come in Fig. 4.1.

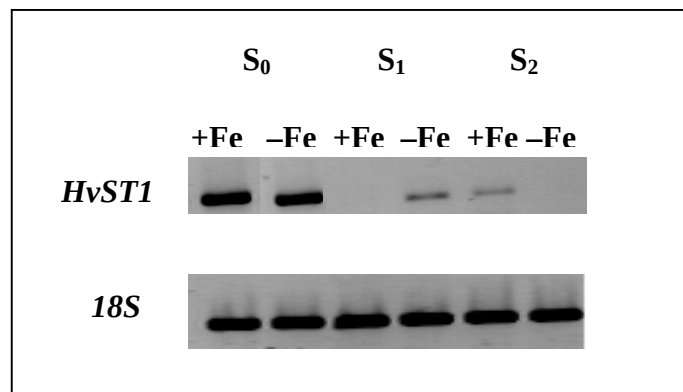


Fig. 4.13: Analisi RT-PCR dell'espressione del gene codificante il trasportatore del solfato *HvST1* nelle radici di piante di orzo allevate per 14 giorni in soluzione nutritiva con diversa disponibilità di zolfo (S₀ = 0 μM, S₁ = 60 μM, S₂ = 1200 μM di SO₄²⁻) in presenza (+Fe) o in assenza (-Fe) di Fe(III)-EDTA 80 μM. La quantificazione era effettuata rapportando il livello di trascritto a quello di un gene di controllo, il 18S.

Trattamento	Assorbimento	
	μmol ³⁵ S g ⁻¹ p.s. radice h ⁻¹	
	+ Fe	- Fe
S ₀	28.20 ± 0.25	29.56 ± 0.63
S ₁	4.11 ± 0.63	7.24 ± 1.05
S ₂	3.22 ± 0.49	2.62 ± 0.49

Tab. 4.3: Assorbimento del ³⁵SO₄²⁻ in piante di orzo allevate per 14 giorni in soluzione nutritiva con diversa disponibilità di zolfo (S₀ = 0 μM, S₁ = 60 μM, S₂ = 1200 μM di SO₄²⁻) in presenza (+Fe) o in assenza (-Fe) di Fe(III)-EDTA 80 μM. Statistica come in Fig. 4.1.

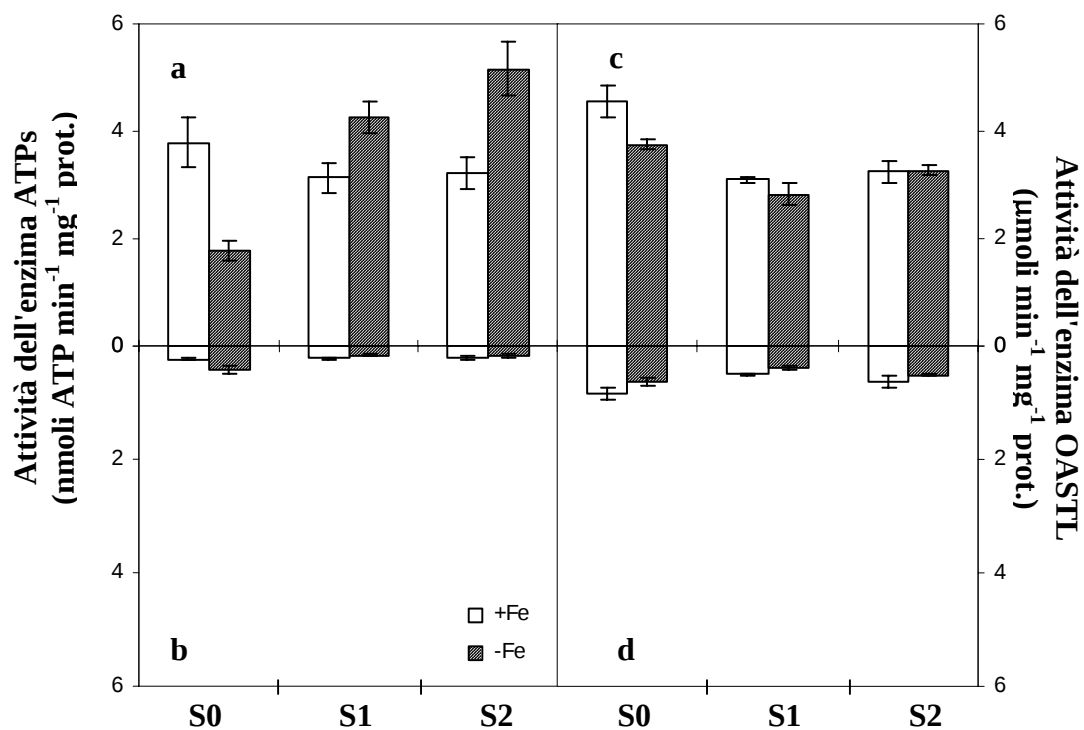


Fig. 4.14: Variazioni dell'attività dell'enzima ATP-s nelle foglie (a) e nelle radici (b) e variazioni dell'attività dell'enzima OASTL nelle foglie (c) e nelle radici (d) di piante di orzo allevate per 14 giorni in soluzione nutritiva con diversa disponibilità di zolfo (S0 = 0 μ M, S1 = 60 μ M, S2 = 1200 μ M di SO_4^{2-}) in presenza (+Fe) o in assenza (-Fe) di Fe(III)-EDTA 80 μ M. Statistica come in Fig. 4.1.

4.1.3.6 Discussione

Lo scopo di questa parte di tesi era quello di valutare l'influenza della disponibilità di ferro sul metabolismo dello zolfo, in particolare mettendo in relazione le variazioni dei livelli di alcuni metaboliti chiave (cisteina e GSH) con le variazioni di attività degli enzimi coinvolti nella via assimilativa dello zolfo (ATPs e OASTL), la capacità delle piante di assorbire solfato dal mezzo esterno e l'espressione del gene *HvST1*, codificante per un trasportatore ad alta affinità del solfato.

I risultati delle indagini condotte sulle piante allevate nelle diverse condizioni nutritive hanno evidenziato un effetto del ferro sul contenuto di zolfo totale. Infatti, sebbene il contenuto di zolfo totale nelle foglie diminuisse al diminuire della disponibilità di zolfo nella soluzione nutritiva, esso aumentava significativamente nelle foglie delle piante allevate in assenza di ferro. Un simile comportamento può essere interpretato come un possibile meccanismo di regolazione dei livelli di zolfo nelle foglie, dove questo nutriente viene effettivamente assimilato (Herschbach et al., 2002), indotto dal ferro.

L'orzo è una pianta a Strategia II e quindi risponde alla Fe-carenza rilasciando composti in grado di chelare il Fe(III), i fitosiderofori. e diversi autori (Mori e Nishizawa, 1987; Ma et al., 1995) hanno evidenziato che la metionina è il precursore dei fitosiderofori. Pertanto, l'induzione del processo di sintesi dei fitosiderofori in condizioni di Fe-carenza potrebbe determinare in queste piante un aumento della domanda metabolica di zolfo ridotto.

Tale ipotesi sembra essere supportata dai maggiori livelli di attività dell'ATPs osservati nelle foglie delle piante S1 e S2, e di cisteina nelle radici delle piante Fe-carenti.

Inoltre, la stessa ipotesi è in accordo con i risultati precedentemente descritti in questa tesi, che dimostravano che al diminuire della disponibilità di zolfo nella soluzione nutritiva diminuiva il rilascio di fitosiderofori da parte delle piante Fe-carenti (Astolfi et al., 2006).

I risultati delle analisi cromatografiche sui livelli di alcuni composti tiolici non proteici mostrano che la Fe-carenza non determinava variazioni del contenuto del GSH rispetto ai livelli costitutivi, mentre d'altra parte favoriva l'accumulo di cisteina nelle radici delle piante a prescindere dalla disponibilità di zolfo nella soluzione

nutritiva. Tale risposta suggerisce che, tra i tioli, la cisteina, e non il GSH, potrebbe svolgere un ruolo importante nella risposta alla Fe-carenza.

Tale aumento dei livelli di cisteina osservati nelle radici delle piante S1 e S2 Fe-carenti potrebbe essere garantito, da un lato, da una maggiore velocità di assorbimento del solfato dal mezzo esterno e/o, dall'altro, dalla traslocazione di composti tiolici dalle foglie.

I risultati hanno però mostrato che la risposta alla Fe-carenza delle piante cresciute in condizioni di moderata carenza (S1) e sufficienza di zolfo (S2) non era associata ad un aumento dei livelli di assimilazione del solfato nelle radici. Infatti, nelle condizioni di crescita analizzate, non si osservava alcun aumento dell'attività dei due enzimi coinvolti nell'assimilazione riduttiva dello zolfo, l'ATPs e l'OASTL. L'incremento dell'attività dell'ATPs a livello fogliare indicherebbe piuttosto un aumento dell'assimilazione dello zolfo in tale sede, seguito dalla traslocazione dei tioli in particolare cisteina, verso le radici. Diversi autori hanno evidenziato infatti che la metionina sintetizzata nella parte superiore della pianta non viene utilizzata per la sintesi dell'acido mugineico nelle radici (Nakanishi et al., 1999), ma tale assunzione non esclude che i composti tiolici prodotti nella parte superiore della pianta possano essere traslocati nelle radici, dove contribuirebbero a soddisfare la domanda di zolfo ridotto per la sintesi della metionina e dei suoi derivati (i fitosiderofori).

D'altra parte, nelle piante cresciute in totale assenza di solfato (S0), all'accumulo di cisteina a livello radicale contribuirebbe, oltre che la traslocazione dei tioli dalle foglie, anche un aumento dei livelli di assimilazione del solfato nelle radici (aumento dell'attività dell'ATPs).

Ponendo in relazione l'aumento del contenuto di cisteina nelle radici delle piante Fe-carenti con la capacità delle piante di assorbire solfato, si osserva che la Fe-carenza determinava un aumento della capacità di assorbire solfato solo nelle piante S1.

Il quadro dei risultati ottenuti indica che, in condizioni di debole S-carenza, l'imposizione della Fe-carenza determina una maggiore capacità di assorbire solfato, una maggiore velocità di assimilazione del solfato a livello fogliare e una intensa traslocazione dei tioli dalle foglie verso le radici. L'induzione di queste risposte

avrebbe la funzione di contribuire a soddisfare la domanda metabolica di zolfo ridotto per la sintesi dei fitosiderofori nelle radici.

Allo scopo di verificare se l'aumento del fabbisogno di composti tiolici fosse sostenuto dall'induzione del trasporto di solfato, è stata valutata l'espressione del gene *HvST1* che codifica per il trasportatore di solfato ad alta affinità.

Le piante possiedono diversi geni codificanti per i trasportatori del solfato, i quali sono suddivisi in cinque gruppi differenti a seconda della loro funzione (Hawkesford, 2003). Il trasportatori appartenenti al gruppo 1 sono considerati responsabili del processo di assorbimento primario del solfato da parte delle radici e sono caratterizzati da elevata affinità per il substrato. La trascrizione dei geni codificanti i trasportatori e l'assorbimento dei nutrienti sono generalmente regolati dallo stato nutrizionale della pianta.

I risultati mostravano che l'espressione del gene *HvST1* era indotta nelle piante allevate in S-carezza (S0) rispetto alle piante S1 e S2 (allevate in moderata carezza e sufficienza di zolfo, rispettivamente). L'imposizione della Fe-carezza provocava effetti contrastanti, in quanto solo nelle piante S1 si osservava un aumento dei livelli di trascritto di *HvST1*, mentre in quelle S0 e S2 si aveva una notevole diminuzione dell'espressione.

Il comportamento delle piante S0 e S2 è simile ad altri casi riportati in letteratura (Smith et al., 1999) e può essere interpretato come un tentativo della pianta di mantenere inalterata la velocità di assorbimento del solfato quando la sua disponibilità nel mezzo esterno è non limitante (S2) o severamente limitante (S0).

Nella condizione di debole S-carezza (S1), la risposta alla Fe-carezza è accompagnata dall'aumento della velocità di assorbimento di solfato e dall'induzione dell'espressione del gene *HvST1*, riflettendo la maggiore necessità di zolfo ridotto della pianta per la sintesi dei fitosiderofori.

I risultati, nel loro complesso, evidenziano che la carezza di ferro induce una modulazione del metabolismo del solfato e dell'attività di trascrizione del gene *HvST1*, che codifica per un trasportatore del solfato ad alta affinità della radice. Inoltre, sostengono l'ipotesi che la disponibilità del ferro sia in grado di modulare la distribuzione del pool di zolfo ridotto, inducendo la traslocazione di tioli dall'apparato fogliare a quello radicale.

4.2. STUDIO DELLA RELAZIONE TRA LA NUTRIZIONE SOLFATICA E FERRICA IN PIANTE A STRATEGIA I

4.2.2 Effetto della disponibilità di zolfo sulla risposta alla Fe-carezza di piante a Strategia I

4.2.2.1 Parametri di crescita

La condizione di S-carezza comportava la riduzione della crescita delle piante sia a livello fogliare che a livello radicale (-40 e -20%, rispettivamente), come dimostrato dai dati riportati rispettivamente in Fig. 4.15a e 4.15b, riguardanti il peso fresco. Tuttavia, tale effetto risultava maggiormente evidente a livello della parte aerea della pianta rispetto all'apparato radicale, con conseguente diminuzione del rapporto "shoot/root" (4.61 e 3.17 rispettivamente nelle piante +S e -S) (Fig. 4.15 b riquadro). Anche l'imposizione della Fe-carezza determinava un decremento dei valori di peso fresco sia delle foglie (-25% sia nelle piante +S che nelle -S), che delle radici (-30 e -20% rispettivamente nelle piante +S e -S).

La crescita in condizioni di S-carezza influenzava anche i valori del peso secco che mostravano decrementi del 65% sia nelle foglie che nelle radici (Fig. 4.15c e 4.15d rispettivamente). Tuttavia, era comunque evidente la diminuzione del rapporto "shoot/root" in risposta alla S-carezza (Fig. 4.15d riquadro). La Fe-carezza determinava la diminuzione del peso secco sia nelle foglie (-40% e -10% rispettivamente nelle piante +S e -S) che nelle radici (-30 e -20% rispettivamente nelle piante +S e -S) (Fig 4.15c e 4.15d).

L'osservazione della morfologia delle radici metteva in evidenza la formazione di molti ispessimenti sub-apicali, indicati dai cerchi rossi nella Fig. 4.16 nelle piante S-sufficienti come risposta alla Fe-carezza. E' interessante notare che la contemporanea imposizione della carezza di zolfo e ferro limitava lo sviluppo di questa tipica risposta alla Fe-carezza.

La crescita in condizioni di S-carezza determinava la comparsa di clorosi fogliare nelle foglie più giovani (-25% di unità SPAD) (Fig. 4.17). La comparsa di clorosi fogliare è tipica anche delle piante cresciute in carezza di ferro, tuttavia quattro

giorni di trattamento in Fe-carenza non risultavano sufficienti per influenzare tale parametro, come evidenziato dai dati riportati in Fig. 4.17.

4.2.1.2 Contenuto di ferro nelle foglie

Il contenuto di ferro nelle foglie diminuiva in condizioni di S-carenza (-59%), come riportato in Fig. 4.18. Ovviamente, anche la condizione di Fe-carenza risultava associata a una diminuzione del contenuto di ferro nelle foglie che era pari al 60% nelle piante S-sufficienti, ma mostrava un ulteriore decremento pari al 38% nelle foglie delle piante private sia dello zolfo che del ferro.

4.2.1.3 Produzione dell'etilene

Il coinvolgimento dell'etilene nei meccanismi di risposta a vari stress sia biotici che abiotici, tra i quali i disordini nutrizionali è stato provato. La Fig. 4.19 riporta i dati riguardanti la produzione di etilene da parte di foglie di piante di pomodoro S-sufficienti e S-carenti allevate per quattro giorni in condizioni di Fe-carenza. La condizione di S-carenza determinava un incremento della produzione di etilene a livello fogliare che era pari al 60% rispetto al controllo S-sufficiente. L'imposizione della Fe-carenza comportava un forte incremento (+130%) del parametro, ma solo nelle piante S-sufficienti.

4.2.1.4 Attività Fe(III)-riduttasica a livello radicale

Le piante a Strategia I rispondono alla Fe-carenza incrementando la loro capacità di ridurre il Fe(III) a Fe(II), che può essere assorbito dalla radice.

Nella Fig. 4.20 è riportato l'andamento dell'attività delle piante di pomodoro S-sufficienti e S-carenti durante un periodo di sei giorni di Fe-carenza.

Durante tutto il periodo osservato le piante allevate in carenza di zolfo presentavano un'attività Fe(III)-riduttasica molto minore rispetto alle piante allevate in condizioni di S-sufficienza.

L'imposizione della Fe-carenza aveva un effetto diverso sulle piante allevate con differente disponibilità di zolfo. Nelle piante S-sufficienti, infatti, la Fe-carenza determinava un forte aumento dell'attività della Fe(III)-riduttasi. In particolare, in queste piante l'attività iniziava ad aumentare dal secondo giorno di Fe-carenza, ma

raggiungeva valori significativamente più alti del controllo (+70%) solo a partire dal terzo giorno e presentava un picco massimo (+400%) il quarto. D'altra parte, nelle piante S-carenti l'incremento dell'attività Fe(III)-riduttasica si aveva solo dopo quattro giorni di Fe-privazione ed era pari al 30% del controllo Fe-sufficiente.

4.2.1.5 Velocità di assorbimento del ferro

Tali esperimenti sono stati condotti utilizzando idrossido di ferro marcato con ^{59}Fe come fonte ferrica. I dati riportati in Tab. 4.4 mostrano che le piante allevate in condizioni di zolfo carenza presentavano una minore capacità di assorbire il ferro dall'idrossido di ferro (-12%). D'altra parte, le piante allevate in carenza di ferro mostravano un considerevole aumento della velocità di assorbimento del $^{59}\text{Fe(III)}$, che nella condizione di S-sufficienza raggiungeva un valore pari a quasi tre volte il valore controllo. Tuttavia, tale incremento era pari solo al 55% nelle piante allevate in condizioni di S-carenza. Dalla stessa tabella si evidenziava che anche la velocità di assorbimento del $^{59}\text{Fe(II)}$ era negativamente influenzata dalla carenza di zolfo. In particolare, le piante S-carenti mostravano una riduzione della capacità di assorbire il Fe(II) pari al 30% rispetto al controllo S-sufficiente. L'imposizione della Fe-carenza comportava un incremento considerevole dell'assorbimento del Fe(II), che nelle piante allevate in condizioni di S-sufficienza, raggiungeva valori sei volte più alti del controllo, mentre nelle piante S-carenti era pari a cinque volte il controllo.

4.2.1.6 Espressione del gene $LeIRT1$ nei tessuti radicali

Il gene *LeIRT1* codificante per un trasportatore del ferro, risultava meno espresso nelle radici delle piante allevate in condizioni di S-carenza. D'altra parte, l'imposizione della Fe-carenza determinava un aumento del livello dei trascritti sia nelle piante S-sufficienti che in quelle S-carenti (Fig. 4.21). Tuttavia, l'aumento della quantità di trascritto era maggiormente evidente nelle piante S-sufficienti rispetto a quelle S-carenti.

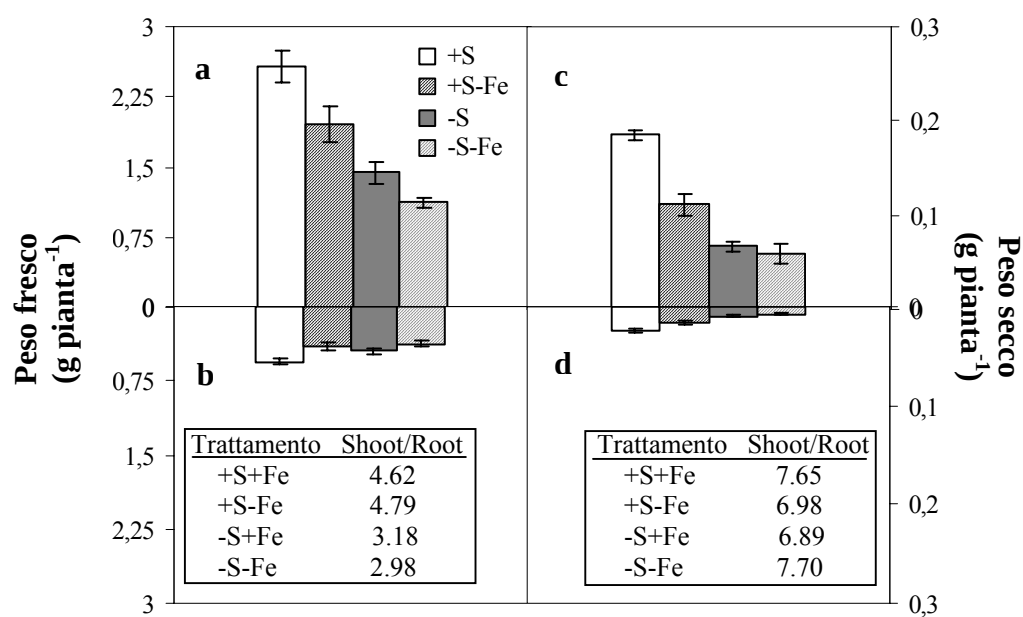


Fig. 4.15: Peso fresco di foglie (a) e radici (b) e peso secco di foglie (c) e radici (d) di piante di pomodoro S-sufficienti (+S) e S-carenti (-S) allevate per quattro giorni in presenza (+Fe) o in assenza (-Fe) di Fe(III)-EDTA 40 μ M. Statistica come in Fig. 4.1. Nei riquadri: rapporti “shoot/root”.

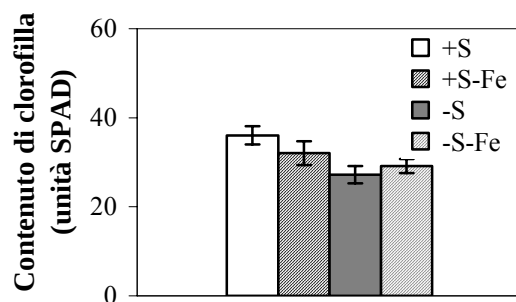


Fig. 4.17: Contenuto di clorofilla di foglie di piante di pomodoro S-sufficienti (+S) e S-carenti (-S) allevate per quattro giorni in presenza (+Fe) o in assenza (-Fe) di Fe(III)-EDTA 40 μ M. Statistica come in Fig. 4.1.

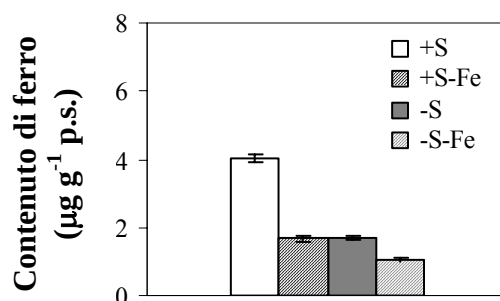


Fig. 4.18: Contenuto di ferro di foglie di piante di pomodoro S-sufficienti (+S) e S-carenti (-S) allevate per quattro giorni in presenza (+Fe) o in assenza (-Fe) di Fe(III)-EDTA 40 μ M. Statistica come in Fig. 4.1.

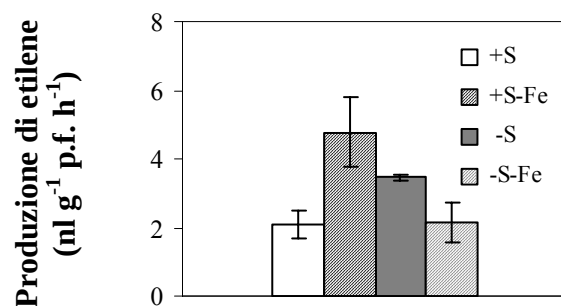


Fig. 4.19: Produzione fogliare di etilene in piante di pomodoro S-sufficienti (+S) e S-carenti (-S) allevate per quattro giorni in presenza (+Fe) o in assenza (-Fe) di Fe(III)-EDTA 40 μ M. Statistica come in Fig. 4.1.

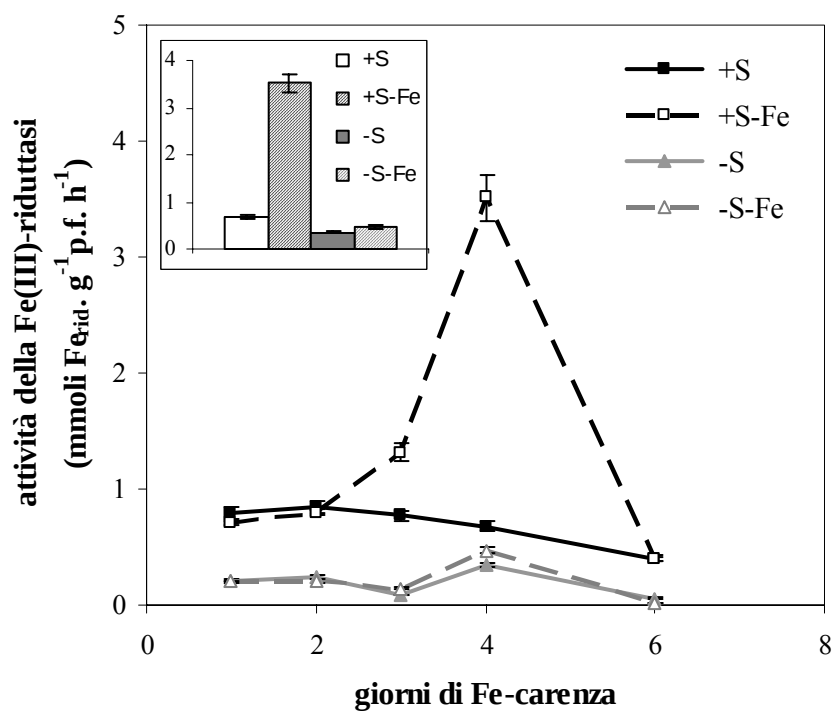


Fig. 4.20: Variazioni dell'attività della Fe(III)-riduttasi nelle radici di piante di pomodoro S-sufficienti (+S) e S-carenti (-S) allevate per sei giorni in presenza (+Fe) o in assenza (-Fe) di Fe(III)-EDTA 40 μ M. Nel riquadro variazioni dell'attività dell'enzima nel il quarto giorno di Fe-carezza. Statistica come in Fig. 4.1.

Trattamento	Assorbimento	
	(nmoli $^{59}\text{Fe(III)}$ g $^{-1}$ p.s. radice h $^{-1}$)	(μmoli $^{59}\text{Fe(II)}$ g $^{-1}$ p.s. radice h $^{-1}$)
+S+Fe	5.57 $\pm$ 2.13	3.37 $\pm$ 0.03
+S-Fe	14.93 $\pm$ 4.12	18.27 $\pm$ 1.60
-S+Fe	4.86 $\pm$ 1.76	2.39 $\pm$ 0.57
-S-Fe	7.58 $\pm$ 1.70	10.30 $\pm$ 2.44

Tab. 4.4: Assorbimento del $^{59}\text{Fe(III)}$ e del $^{59}\text{Fe(II)}$ in piante di pomodoro S-sufficienti (+S) e S-carenti (-S) allevate per quattro giorni in presenza (+Fe) o in assenza (-Fe) di Fe(III)-EDTA 40 μM . Statistica come in Fig. 4.1.

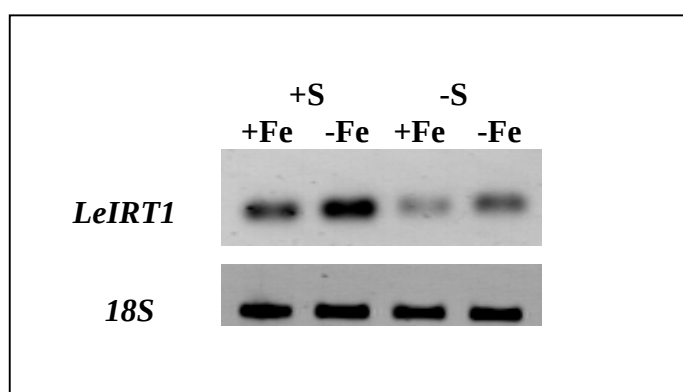


Fig. 4.21: Analisi RT-PCR dell'espressione del gene codificante il trasportatore del ferro *IRT1* nelle radici di piante di pomodoro S-sufficienti (+S) e S-carenti (-S) allevate per quattro giorni in presenza (+Fe) o in assenza (-Fe) di Fe(III)-EDTA 40 μM . La quantificazione era effettuata rapportando i livelli dei trascritti a quello di un gene di controllo, il *18S*.

4.2.1.7 Discussione

Le ben note strategie di risposta alla Fe-carezza (la Strategia I e la Strategia II) pur essendo molto diverse tra loro, presentano alcuni elementi in comune, tra i quali la metionina, a partire dalla quale vengono sintetizzati sia l'etilene che i fitosiderofori (Roje, 2006).

L'etilene è un ormone coinvolto nei meccanismi di risposta a vari stress sia biotici, che abiotici, tra i quali i disordini nutrizionali (Morgan e Drew, 1997). Alcuni autori hanno ipotizzato il coinvolgimento dell'etilene nel meccanismo di risposta alla Fe-carezza delle piante a Strategia I. In particolare, Romera e Alcántara (1994, 2004) hanno mostrato che l'etilene induce tutti i componenti del meccanismo di risposta alla Fe-carezza nel cetriolo, tra i quali la capacità di ridurre il ferro ferrico e di acidificare il mezzo esterno.

Appare quindi ragionevole supporre che la Fe-carezza possa determinare anche nelle piante a Strategia I un'alterazione del ciclo della metionina e dei metabolismi ad esso connessi, attraverso la regolazione dei flussi di solfato e che, viceversa, la disponibilità di solfato possa condizionare le capacità della pianta di rispondere alla Fe-carezza.

Abbiamo infatti precedentemente dimostrato che nelle piante a Strategia II il metabolismo dello zolfo è sensibile alla disponibilità di ferro e che la carenza di zolfo limita la capacità di risposta alla Fe-carezza determinando un significativo decremento del rilascio dei fitosiderofori da parte delle piante Fe-carenti.

Scopo di questa ultima parte del lavoro di tesi è stato quindi quello di verificare se la disponibilità di zolfo possa influenzare la capacità delle piante a Strategia I di rispondere alla Fe-carezza.

L'assenza di solfato nella soluzione nutritiva determinava la riduzione dello sviluppo delle piante di pomodoro sia a livello dell'apparato fogliare che radicale. Tuttavia, tale effetto era maggiormente evidente a livello della parte aerea della pianta con conseguente diminuzione del rapporto "shoot/root", una tipica risposta della pianta alla crescita in condizioni di limitata disponibilità di macronutrienti tra i quali lo zolfo (Robinson, 1994).

La comparsa di clorosi fogliare è un caratteristico sintomo della crescita in condizioni di limitata disponibilità sia di solfato che di ferro (Marschner, 1995). Nelle nostre

condizioni sperimentali, l'assenza di solfato nella soluzione nutritiva comportava la diminuzione del contenuto di clorofilla nelle foglie, mentre quattro giorni di Fe-carenza non risultavano sufficienti per indurre la comparsa di clorosi fogliare nelle piante di pomodoro.

I risultati delle indagini condotte sull'apparato fogliare delle piante per determinare il contenuto di ferro, hanno mostrato l'esistenza di una stretta relazione fra la disponibilità di zolfo e la capacità di acquisire il ferro nelle piante a Strategia I. In particolare, il contenuto di ferro risultava diminuire nelle piante allevate in assenza di solfato.

Sono stati quindi analizzati alcuni dei componenti del meccanismo di risposta alla Fe-carenza delle piante a Strategia I: l'attività dell'enzima Fe(III)-riduttasi, la velocità di assorbimento del ferro e l'espressione del gene *LeIRT1* codificante per il trasportatore del ferro.

Nelle piante S-sufficienti, la Fe-carenza determinava l'aumento dell'attività della Fe(III)-riduttasi a livello radicale e della produzione di etilene a livello fogliare. Tale risposta era associata, a livello radicale, all'aumento della velocità di assorbimento del Fe(III) e all'aumento dei livelli di trascritto del gene *LeIRT1*. Inoltre, si osservava la comparsa di ispessimenti degli apici radicali, che sono una tipica risposta di molte specie vegetali alla carenza di ferro (Römheld e Marschner, 1981).

D'altra parte, la crescita in condizioni di totale assenza di solfato riduceva, senza però annullarle completamente, tutte le risposte indotte dalla carenza di ferro. In particolare, si osservava ancora una lieve induzione dell'attività della Fe(III)-riduttasi e una maggiore velocità di assorbimento del Fe(III). Infine, si osservava ancora la comparsa di ispessimenti subapicali, anche se in numero inferiore rispetto a quanto osservato nelle piante S-sufficienti.

Allo scopo di verificare se la diminuzione della velocità di assorbimento del ferro osservata nelle piante S-carenti fosse legata alla diminuzione dell'attività della Fe(III)-riduttasi, è stata valutata anche la velocità di assorbimento del Fe(II). I risultati delle analisi mostrano che, in seguito all'imposizione della carenza di ferro, la velocità di assorbimento del Fe(III) non aumentava quanto quella del Fe(II) (136% contro 305% rispetto al controllo S- e Fe-sufficiente), suggerendo l'ipotesi che parte dell'inibizione fosse legata ad una minore attività della Fe(III)-riduttasi. Tuttavia,

L'effetto osservato potrebbe essere determinato anche dipendente dalle variazioni di espressione del trasportatore del ferro indotte dalle condizioni di crescita in assenza di zolfo. Tale ipotesi era confermata dallo studio dell'espressione del gene *LeIRT1* codificante per il trasportatore del ferro. Il gene era infatti maggiormente espresso in condizioni di Fe-carezza in entrambe le condizioni nutritive (+S e -S). Tuttavia, il livello del trascritto era minore nelle piante S-carenti.

E' interessante notare che, se le piante erano private sia dello zolfo che del ferro, la produzione di etilene a livello fogliare risultava inibita, mentre la stessa risultava aumentata sia in condizioni di sola Fe-carezza, come descritto precedentemente, sia in condizioni di sola S-carezza.

L'aumento della produzione di etilene è stato descritto in piante di mais allevate in carezza di diversi macronutrienti quali azoto, fosforo e potassio e alcuni autori spiegano questo tipo di risposta ipotizzando lo sviluppo di un processo necrotico a carico dei tessuti delle piante allevate in tali condizioni di crescita (Lynch e Brown, 1997). D'altra parte, altri autori hanno associato l'aumento della produzione di etilene con l'accumulo di composti azotati all'interno dei tessuti (Feng e Barker, 1993). Nelle nostre condizioni, quindi, l'aumento della produzione di etilene osservato nelle piante S-carenti, potrebbe essere dovuto proprio all'accumulo di composti azotati dovuto all'arresto della sintesi proteica indotto dalla carezza di zolfo (Nikiforova et al., 2005).

Tale aumento avrebbe però un significato diverso: a differenza di quanto avveniva in seguito all'imposizione della Fe-carezza, l'aumento del rilascio di etilene osservato in S-carezza non si traduceva in una maggiore attività della Fe(III)-riduttasi, né in una maggiore capacità della pianta di assorbire ferro.

L'apparente discrepanza osservata fra l'effetto dell'aumento del rilascio di etilene in Fe-carezza e in S-carezza potrebbe essere spiegata ipotizzando che l'etilene non agisca come unico segnale, bensì come componente di una serie di fattori, nell'induzione delle risposte alla Fe-carezza nelle piante a Strategia I.

Concludendo, i risultati indicano la possibilità che anche in piante a Strategia I la carezza di zolfo possa influenzare il meccanismo di risposta Fe-carezza.

5. CONCLUSIONI

Nel settore delle ricerche agricole assume sempre maggior rilievo la comprensione dell'effetto dei fattori ambientali sulla crescita e sullo sviluppo delle piante. Tra questi fattori, la disponibilità di elementi nutritivi è quello che può maggiormente agire da fattore limitante.

Le piante, infatti, come ogni altro organismo vivente, necessitano di alcuni elementi minerali per un corretto sviluppo. Partendo da questo concetto si comprende facilmente l'importanza dell'ambiente di crescita che deve contenere tutti i nutrienti essenziali per la pianta (macro- e micronutrienti) in un equilibrato rapporto tra loro per non creare situazioni di carenza che porterebbero a riduzioni della produzione.

Nell'ambito dei micronutrienti, il problema della disponibilità di ferro per le colture agrarie è particolarmente rilevante, in quanto, sebbene il ferro sia generalmente presente in abbondanza nei terreni, esso risulta scarsamente biodisponibile per le piante (Marschner, 1995).

Le due strategie sviluppate dalle piante per rispondere alla Fe-carenza (la Strategia I e la Strategia II) pur essendo molto diverse tra loro, presentano alcuni elementi in comune, tra i quali la metionina, attraverso la quale vengono sintetizzati sia l'etilene che i fitosiderofori (Roje, 2006).

Appare quindi ragionevole supporre che la Fe-carenza possa determinare in entrambi i casi un'alterazione del ciclo della metionina e dei processi metabolici ad esso connessi, attraverso la regolazione dei flussi di solfato e che, viceversa, la disponibilità di solfato possa condizionare le capacità della pianta di rispondere alla Fe-carenza.

In questo lavoro di tesi è stata quindi analizzata la relazione tra la nutrizione solfatica e ferrica in piante a Strategia I e in piante a Strategia II.

La prima parte del lavoro di tesi ha riguardato le piante a Strategia II ed in particolare è stato condotto prima uno studio su piante di mais al fine di accertare l'esistenza di tale relazione.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che la disponibilità di zolfo influenza l'accumulo del ferro nella pianta e che, d'altro canto, la disponibilità di ferro influenza il metabolismo dello zolfo determinando rapide variazioni

dell'assorbimento e dell'assimilazione del solfato che, probabilmente, portano a una ridistribuzione del pool dello zolfo ridotto nella pianta.

In base a quanto osservato è stato ipotizzato che tali modificazioni possano essere correlate all'aumento della richiesta di zolfo per la sintesi dei fitosiderofori in condizioni di carenza di ferro.

Tali evidenze hanno suggerito di indagare, in una seconda fase, sull'influenza della disponibilità di zolfo sulla capacità della pianta di assorbire il ferro, allo scopo di chiarire se l'effetto della carenza di zolfo sia riconducibile ad un'alterazione del processo di sintesi e/o rilascio dei fitosiderofori, o si manifesti indirettamente, attraverso l'influenza su processi fisiologici primari (ad es. la sintesi dei carboidrati). Per valutare questo aspetto è stata scelta come pianta modello l'orzo che presenta il vantaggio sperimentale di rilasciare quantità abbondanti di fitosiderofori in un periodo determinato della giornata (Takagi et al., 1984).

I risultati ottenuti supportano l'idea che la capacità della pianta di rispondere alla carenza di ferro sia influenzata dalla disponibilità di zolfo. Infatti, la capacità di rilasciare fitosiderofori e di assorbire ferro dal mezzo esterno diminuiscono al diminuire della disponibilità di zolfo nel mezzo esterno. Inoltre, appare evidente come la diminuzione del rilascio dei fitosiderofori in condizioni di limitata disponibilità di zolfo non possa essere attribuita né a una limitata attività fotosintetica, né alla diminuita disponibilità di carboidrati. In queste piante, infatti, l'attività fotosintetica risultava indipendente dalla disponibilità di zolfo e la concentrazione di zuccheri totali addirittura aumentava al diminuire della disponibilità di zolfo.

Data l'importanza della disponibilità di zolfo nella risposta della pianta alla Fe-carenza, si può supporre che la disponibilità del ferro determini a sua volta variazioni del ciclo della metionina e dei processi metabolici ad esso connessi, attraverso la regolazione dei flussi di solfato.

Quindi successivamente è stata studiata l'influenza della disponibilità di ferro sul metabolismo dello zolfo, in particolare, mettendo in relazione le variazioni dei livelli di alcuni metaboliti chiave (cisteina e GSH) con le variazioni di attività degli enzimi coinvolti nella via assimilativa dello zolfo (ATPs e OASTL), la capacità delle piante

di assorbire solfato dal mezzo esterno e l'espressione del gene *HvST1* codificante per un trasportatore ad alta affinità del solfato.

I dati ottenuti mostrano che l'assorbimento e l'assimilazione dello zolfo sono influenzati dalla disponibilità di ferro, confermando i dati già ottenuti nella prima parte di questo lavoro di tesi. E' stato inoltre dimostrato che la Fe-carenza influenza i livelli dei composti tiolici, e in particolar modo della cisteina, e la loro distribuzione nei tessuti della pianta, inducendone la traslocazione dalle foglie alle radici per sostenere la sintesi dei fitosiderofori.

Nell'ultima parte del lavoro di tesi, è stata analizzata la relazione tra la nutrizione solfatica e ferrica anche nelle piante a Strategia I, studiando in particolare l'influenza della disponibilità di zolfo sul meccanismo di assorbimento del ferro.

I risultati indicano la possibilità che anche in piante a Strategia I la carenza di zolfo possa influenzare il meccanismo di risposta alla Fe-carenza. L'imposizione della S-carenza limita infatti fortemente la capacità della pianta di rispondere alla Fe-carenza, con un effetto particolarmente accentuato a livello di uno dei componenti coinvolti nell'acquisizione del micronutriente, la Fe(III)-riduttasi. Inoltre, i risultati ottenuti portano a considerare l'etilene come uno dei fattori coinvolti nel fenomeno.

Concludendo, i risultati di questa tesi hanno portato alla dimostrazione dell'esistenza di rilevanti interconnessioni metaboliche tra le vie di acquisizione di due elementi essenziali per la pianta, quali lo zolfo e il ferro. Questi aspetti possono avere importanti implicazioni per la valutazione delle potenzialità nutrizionali dei suoli, dell'efficienza d'uso dei nutrienti da parte delle colture e ai fini di migliorare la qualità dei prodotti agricoli. Lo studio dei riflessi di queste stesse interazioni a livello rizosferico potrebbe fornire un valido sostegno per lo sviluppo di pratiche agronomiche utili a supportare la pianta durante il processo di adattamento alle mutabili condizioni di disponibilità dei nutrienti, influenzando positivamente la crescita, la capacità riproduttiva e di conseguenza la produttività delle piante.

Inoltre, i risultati permettono di ipotizzare che una maggiore disponibilità di solfato possa facilitare l'assorbimento del ferro e sarebbe quindi utile valutare la potenzialità di utilizzare un nutriente in eccesso (S) per superare la carenza di un altro elemento (Fe).

6. BIBLIOGRAFIA

1. Abadia J., Abadia A. (1993) Iron and plant pigments. In: Iron chelation in plants and soil microorganisms. Barton L.L., Hemming B.C. (eds) Academic Press San Diego pp. 327-343.
2. Anderson J.W. (1990) Sulfur metabolism in plants. In: The biochemistry of plants. Mifflin B.J., Lea P.J. (eds.) Academic Press New York pp. 327-381.
3. Arulanantham A.R., Rao I.M., Terry N. (1990) Limiting factors in photosynthesis. VI. Regeneration of ribulose 1,5-biphosphate limits photosynthesis at low photochemical capacity. *Plant Physiology* 93, 1466-1475.
4. Astolfi S., Cesco S., Zuchi S., Neumann G., Römheld V. (2006) Sulfur starvation reduces phytosiderophores release by iron-deficient barley plants. *Soil Science and Plant Nutrition* 52, 43-48.
5. Astolfi S., De Biasi M.G., Passera C. (2001) Light-sulphur interactions on enzymes of carbon, nitrogen, and sulphur metabolism in maize plants. *Photosynthetica* 39, 177-181.
6. Bardsley C.E., Lancaster J.D. (1962) Determination of reserve sulphur and soluble sulphate in soils. *Soil Science Society American Proceedings* 24, 265-268.
7. Bienfait H.F., van den Briel W., Mesland-Mul N.T. (1985) Free space iron pools in roots. *Plant Physiology* 78, 596-600.
8. Blakeney A.B., Mutton L.L. (1980) A simple colorimetric method for the determination of sugars in fruit and vegetables. *Journal Sci. Agri.* 31, 889-897.
9. Bolchi A., Petrucco S., Tenca P.L., Foroni C., Ottonello S. (1999) Coordinate modulation of maize sulfate permease and ATP sulfurylase mRNAs in response to variations in sulfur nutritional status: stereospecific down-regulation by L-cysteine. *Plant Molecular Biology* 39, 527-537.

10. Bolchi A., Petrucco S., Tenca P.L., Foroni C., Ottonello S. (1999) Coordinate modulation of maize sulfate permease and ATP sulfurylase mRNA in response to variation in sulfur nutritional status: stereospecific down-regulation by L-cysteine. *Plant Molecular Biology* 39, 527-537.
11. Bouranis D.L., Chorianopoulou S.N., Protonotarios V.E., Siyannis V.F., Hopkins L., Hawkesford M.J. (2003) Leaf response of young iron-inefficient maize plants to sulphur deprivation. *Journal of Plant Nutrition* 26, 1189-1202.
12. Bradford M.M.(1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
13. Brantley S.L., Liermann L., Kalinowski B., Givens S., Pantano C.G., Barnes A. (1999) Abiotic vs. biotic dissolution of horneblende. In: *Geochemistry of the earth's surface*. Ármannsson H. (ed.) Rotterdam Netherlands Balkema pp.357-359.
14. Briat J.F., Lobréaux S. (1997) Iron transport and storage in plants. *Trends in Plants Science* 2, 187-193.
15. Bughio N., Yamaguchi H., Nishizawa N.K., Nakanishi H., Mori S (2002) Cloning an iron-regulated metal transporter from rice. *Journal of Experimental Botany* 53, 1677-1682.
16. Bürstenbinder K., Rzewuski G., Wirtz M., Hell R., Sauter M. (2007) The role of methionine recycling for ethylene synthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 49, 228-237.
17. Cesco S., Nikolic M., Römheld V., Varanini Z., Pinton R. (2002) Uptake of ⁵⁹Fe from soluble ⁵⁹Fe-humate complexes by cucumber and barley plants. *Plant and Soil* 241, 121-128.
18. Cesco S., Römheld V., Varanini Z., Pinton R. (2000) Solubilisation of iron by water-extractable humic substances. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 163, 285-290.
19. Cesco S., Römheld V., Varanini Z., Pinton R. (2000) Solubilization of iron by water-extractable humic substances. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 163, 285-290.

20. Chen Y. (1996) Organic matter reactions involving micronutrients in soils and their effect on plants. In: Humic substances in terrestrial ecosystems. Piccolo A. (ed.) Elsevier Science BV Amsterdam Netherlands pp. 507-529.
21. Chen Y., Aviad T. (1990) Effects of humic substances on plant growth. In: Humic substances in soil and crop sciences: selected readings. MacCarthy P et al. (eds.) American Society of Agronomy and Soil Sciences of America Madison WI pp. 161-186.
22. Clarkson D.T., Saker L.R., Purves J.V. (1989) Depression of nitrate and ammonium transport in barley plants with diminished sulfate status-evidence of co-regulation of nitrogen and sulfate intake. *Journal of Experimental Botany* 40, 953-963.
23. Cohen C.K., Garvin D.F., Kochian L.V. (2004) Kinetic properties of a micronutrient transporter from *Pisum sativum* indicate a primary function in Fe uptake from the soil. *Planta* 218, 784-792.
24. Colangelo E.P., Guerinot M.L. (2004) The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *Plant Cell* 16, 3400-3412.
25. Connolly E.L., Fett J.P., Guerinot M.L. (2002) Expression of the IRT metal transporter is controlled by metals at the level of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* 14, 1347-1357.
26. Connolly E.L., Nathan H.C., Grotz N., Prichard C.L., Guerinot M.L. (2003) Overexpression of the FRO2 ferric chelate reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control. *Plant Physiology* 133, 1102-1110.
27. Cornell R.M., Schwertmann U. (1996) The iron oxides. Structure, properties, reactions, occurrence and uses. VCH Weinheim New York USA.
28. Curie C., Alonso J.M., Le Jean M., Ecker J.R., Briat J.F. (2000) Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochemical Journal* 3, 749-755.
29. Curie C., Briat J.F. (2003) iron transport and signalling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 54, 183-206.

30. Curie C., Panaviene Z., Loulergue C., Dellaporta S.L., Briat J.F., Walker E.L. (2001) Maize *yellow stripe1* encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* 409, 346-349.
31. Dämmgen U., Walker K., Grünhage L., Jäger H.J. (1998) The atmospheric sulphur cycle. In: *Sulphur in Agroecosystems*. Scnugh E. (ed.) Kluwer Academic Publishing Dordrecht pp. 75-114.
32. De Knecht J.A., van Dillen M., Koevoets P.L.M., Schat H., Verkleij J.A.C., Ernst W.H.O. (1994) Phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*: chain length distribution and sulphide incorporation. *Plant Physiology* 104, 255-261.
33. Dell'Orto M., Santi S., De Nisi P., Cesco S., Varanini Z., Zocchi G., Pinton R. (2000) Development of Fe-deficiency responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots: involvement of plasma membrane H⁺-ATPase activity. *Journal of Experimental Botany* 51, 695-701.
34. Douchkov D., Herbig A., Mock H.P., Melzer M., Stephan U.W., Bäumlein H. (2002) Nicotianamine synthase: gene isolation, gene transfer and application for the manipulation of plant iron assimilation. *Plant and Soil* 241, 115-119.
35. Eckhardt U., Mas Marques A., Buckhout T.J. (2001) Two iron-regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants. *Plant Molecular Biology* 45, 437-448.;
36. Eide D., Broderius M., Feit J., Guerinot M.L. (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 5624-5628.
37. Ewart J.A.D. (1978) Glutamin and dough tenacity. *Journal of Science of Food and Agriculture* 29, 551-556.
38. Fankhauser H., Brunold C. (1978) Localization of adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase in spinach leaves. *Planta* 143, 285-289.
39. Fankhauser H., Brunold C. (1979) Localization of O-acetyl-L-serine sulphydrylase in *Spinacia oleracea* L. *Plant Science Letters* 14, 185-192.
40. Feng J., Barker A.V. (1993) Polyamine concentration and ethylene evolution in tomato plants under nutritional stress. *Horticultural Science* 28, 109-110.

41. Ferretti M., Ghisi R., Merlo L., Dalla Vecchia F., Passera C. (1993) Effect of cadmium on photosynthetic sulfate and nitrate assimilation. *Photosynthetica* 29, 49-54.
42. Finlayson S.A., Foster K.R., Reid M. (1991) Transport and metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in sunflowers (*Helianthus annuus* L.) seedlings. *Plant Physiology* 96, 1360-1367.
43. Friml J., Palme K. (2002) Polar auxin transport – old question and new concepts. *Plant Molecular Biology* 49, 273-284.
44. Grill E., Winnacker E.L., Zenck M.H. (1987) Phytochelatins, a class of heavy metal binding peptides from plants are functionally analogous to metallothioneins. *Proceedings of National Academy of Science (U.S.A.)* 84, 439-443.
45. Gueriot M.L., Salt D.E. (2001) Fortified foods and phytoremediation. Two sides of the same coin. *Plant Physiology* 125, 164-167.
46. Harrington G.N., Franceschi V.R., Offler C.E., Patrick J.W., Tegeder M., Frommer W.B., Harper J.F., Hitz W.D. (1997) Cell specific expression of three genes involved in plasma membrane sucrose transport in developing *Vicia faba* seeds. *Protoplasma* 197, 160-173.
47. Hawkesford M.J. e De Kok L.J. (2006) Managing sulphur metabolism in plants. *Plant, Cell and Environment* 29, 382-395.
48. Hawkesford M.J. (2000) Plant responses to sulphur deficiency and genetic manipulation of sulphate transporter to improve S-utilization efficiency. *Journal of Experimental Botany* 51, 131-138.
49. Hawkesford M.J. (2003) Transporter gene families in plants: the sulphate transporter gene family – redundancy or specialization? *Physiologia Plantarum* 117, 155-163.
50. Hawkesford M.J., Davidian J.C., Grignon C. (1993) Sulphate/H⁺ co-transport in plasma membrane vesicles isolated from *Brassica napus*: increased transport in membranes isolated from sulphur-starved plants. *Planta* 190, 297-304.
51. Hell R. (1997) Molecular physiology of plant sulphur metabolism. *Planta* 202, 138-148.

52. Hell R., Hillebrand H. (2001) Plant concepts for mineral acquisition and allocation. *Current Opinion in Biotechnology* 12, 161-168.
53. Hell R., Stephan U.W. (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* 216, 541-551.
54. Herschbach C., Pilch B., Tausz M., Rennenberg H., Grill D. (2002) Sulfate uptake and xylem loading of young pea (*Pisum sativum* L.). *Plant and Soil* 242, 227-233
55. Herschbach C., Rennenberg H. (1994) Influence of glutathione (GSH) on net uptake of sulphate and sulphate transport to tobacco plants. *Journal of Experimental Botany* 45, 1069-1076.
56. Higuchi K., Suzuki K., Nakanishi H., Yamaguchi H., Nishizawa N.K., Mori S. (1999) Cloning a nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores. *Plant Physiology* 119, 471-479.
57. Hinsinger p., Fernandes Barros O.N., Benedetti M.F., Noack Y., Callot G. (2001) Plant-induced weathering of a basaltic rock: experimental evidence. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65, 137-152.
58. Ishimaru Y., Motofumi S., Tsukamoto T., Suzuki K., Nakazono M., Kobayashi T., Wada Y., Watanabe S., Matsushashi S., Takahashi M., Nakanishi H., Mori S., Nishizawa N.K. (2006) Rice plants take up iron as an Fe(III)-phytosiderophore and as Fe(II). *The Plant Journal* 45, 335-346.
59. Jackoby M., Wang H.Y., Reidt W., Weisshaar B., Bauer P. (2004) FRAU (BLHH029) is required for induction of iron mobilization genes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 577, 528-534
60. Jones D.L. (1998) Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant and Soil* 205, 25-44.
61. Jones D.L., Darrah P.R., Kochian L.V. (1996) Critical evaluation of organic acid mediated iron dissolution in the rhizosphere and its potential role in root iron uptake. *Plant and Soil* 180, 57-66.
62. Jost R., Scholze P., Hell R. (2003) New approaches to study “sulphur induced resistance” against fungal pathogens in *Arabidopsis thaliana*. In: *Sulphur transport and assimilation in plants: regulation, interaction and signaling*.

- Davidian J.C., Grill D., De Kok L.J., Stulen I., Hawkesford M.J., Schnug E., Rennenberg H. (eds.) Backhuys Publishers Leiden pp. 243-246.
63. Kanno N., Nagahisa E., Saito M., Sato Y. (1996) Adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase from the marine macroalga *Porphyra yezoensis* Ueda (Rhodophyta): stabilization, purification and properties. *Planta* 198, 282-289.
 64. Koch K.E., Wu Y., Xu Y. (1996) Sugar and metabolic regulation of genes for sucrose metabolism: potential influence of maize sucrose synthase and soluble invertase responses on carbon partitioning and sensing. *Journal of Experimental Botany* 47, 1179-1185.
 65. Koike S., Inoue H., Mizuno D., Takahashi M., Nakanishi H., Mori S., Nishizawa N.K. (2004) OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *The Plant Journal* 39, 415-424.
 66. Kuske C.R., Hill K.K., Guzman E., Jackson P.J. (1996) Subcellular location of *O*-acetylserine sulphydrylase isoenzymes in cell cultures and plant tissues of *Datura Innoxia* mill. *Plant Physiology* 112, 659-667.
 67. Kutz A., Muller A., Hennig P., Kaiser W.M., Piotrowski M., Weiler E.W. (2002) A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 30, 95-106.
 68. Kuwajima K., Kawai S. (1997) Relationship between sulphur metabolism and biosynthesis of phytosiderophores in barley roots. In: *Plant nutrition-for sustainable food production and environment*. Ando T., Fujita K., Nae T., Matsunoto H., Nori S., Sekiya J. (eds.) Kluwer Academic Publisher The Netherlands pp. 285-286.
 69. Lappartient A.G., Touraine B. (1996) Demand-driven control of root ATP sulphurylase activity and SO_4^{2-} uptake in intact canola. *Plant Physiology* 111, 147-157.
 70. Lappartient A.G., Vidmar J.J., Leustek T., Glass A.D.M., Touraine B. (1999) Inter-organ signalling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulphate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compounds. *Plant Journal* 18, 89-95.

71. Leustek T., Martin M.N., Bick J.A., Davies J.P. (2000) Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 51, 141-165.
72. Lindsay W.L. (1979) Chemical equilibria in soils. John W. and Sons Chuchester Sussex UK.
73. Lindsay W.L., Schwab A.P. (1982) The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *Journal of Plant Nutrition* 5, 821-840.
74. Ling H.Q., Bauer P., Berczky Z., Keller B.M. (2002) The tomato fer gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. *Proceedings of National Academy of Science USA* 99, 13938-13943.
75. Lobartini J.C., Oriolo G.A. (1988) Absorption of iron Fe-humate in nutrient solution by plants. *Plant and Soil* 106, 153-157.
76. López-Bucio J., Cruz-Ramírez A., Herrera-Estrella L. (2003) the role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 280-287.
77. Louet E. (1986) Le fer. In: *Les oligoéléments en agriculture*. Agri-Nathan (eds.) Paris France pp. 45-85.
78. Lynch J., Brown K.M. (1997) Ethylene and plant responses to nutritional stress. *Physiologia Plantarum* 100, 613-619.
79. Ma J.F. (2005) Plant root responses to three abundant soil minerals: silicon, aluminum and iron. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24, 267-281.
80. Ma J.F., Ueno H., Ueno D., Rombolà A.D., Iwashira I. (2003) Characterization of phytosiderophore secretion under Fe deficiency stress in *Festuca rubra*. *Plant and Soil* 256, 131-137.
81. Ma J.F., Shinada T., Matsuda C., Kyosuke N. (1995) Biosynthesis of phytosiderophores, mugineic acid, associated with methionine cycle. *Journal of Biological Chemistry* 270, 16549-16554.
82. Marschner H. (1995) Mineral nutrition of higher plants. 2nd edn. Academic Press, San Diego.

83. Marschner H., Römheld V., Kissel M. (1986) Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *Journal of Plant Nutrition* 9, 695-713.
84. Masucci J.D., Schiefelbein J.W. (1994) The *rh6* mutation of *Arabidopsis thaliana* alters root-hair initiation through an auxin- and ethylene-associated process. *Plant Physiology* 106, 1335-1346.
85. McGrath S.P., Zhao F.J. (1995) A risk assessment of sulphur deficiency in cereals using soil and atmospheric deposition data. *Soil Use Manage* 11, 110-114.
86. Morgan P.W., Drew M.C. (1997) Ethylene and plant responses to stress. *Physiologia Plantarum* 100, 620-630.
87. Mori S. (2001) The role of mugineic acid in iron acquisition: progress in cloning the genes for transgenic rice. In: Plant nutrient acquisition. Ae N., Arihara K., Okada A., Srinivasan A. (eds.) Springer-Verlag Tokyo pp. 120-139.
88. Mori S., Nishizawa N. (1987) Methionine as a dominant precursor of phytosiderophores in Gramineae plants. *Plant Cell Physiology* 28, 1081-1092.
89. Murata Y., Ma J.F., Yamaji N., Ueno D., Nomoto K., Takashi I. (2006) A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore in barley roots. *The Plant Journal* 46, 563-572.
90. Nakanishi H., Bughio N., Matsushashi S., Ishioka N.S., Uchida H., Tsuji A., Osa A., Sekine T., Kume T., Mori S. (1999) Visualizing real time (¹¹C) methionine translocation in Fe-sufficient and Fe-deficient barley using a positron emitting tracer imaging system (PETIS). *Journal of Experimental Botany* 50, 637-643.
91. Nakanishi H., Okumura N., Umehara Y., Nishizawa N.K., Chino M., Mori S. (1993) Expression of a gene specific for iron deficiency (*Ids3*) in the roots of *Hordeum vulgare*. *Plant Cell Physiology* 34, 401-410.
92. Negishi T., Nakanishi H., Yazaki J., Kishimoto N., Fujii F., Shimbo K., Yamamoto K., Sakata K., Sasaki T., Kikuchi S., Mori S., Nishizawa N.K. (2002) cDNA microarray analysis of gene expression during Fe-deficiency stress in barley suggests that polar transport of vesicles is implicated in

- phytosiderophore secretion in Fe-deficient barley roots. *The Plant Journal* 30, 83-94.
93. Neumann G., Haake C., Römheld V. (1999) Improved HPLC-method for determination of phytosiderophores in root washings and tissue extracts. *Journal of Plant Nutrition* 22, 1389-1402.
 94. Nikiforova V.J., Gakière B., Kempa S., Adamik M., Willmitzer L., Hesse H., Hoefgen R. (2004) Towards dissecting nutrient metabolism in plants: a systems biology case study on sulphur metabolism. *Journal of Experimental Botany* 55, 1861-1870.
 95. Nikiforova V.J., Kopka J., Tolstikov V., Fiehn O., Hopkins L., Hawkesford M.J., Hesse H., Hoefgen R. (2005) Systems rebalancing of metabolism in response to sulphur deprivation, as revealed by metabolome analysis of *Arabidopsis* Plants. *Plant Physiology* 138, 304-318.
 96. Offler C.E., Mc Curdy D.W., Patrick J.W., Talbot M.J. (2003) Transfer cells: cells specialized for a special purpose. *Annual Review of Plant Biology* 54, 431-454.
 97. Okumura N., Nishizawa N.K., Umehara Y., Ohata T., Mori S (1991) An iron deficiency specific cDNA from barley roots having two homologous cysteine-rich MT domains. *Plant Molecular Biology* 17, 531-533.
 98. Olsen R.A., Brown J.C. (1980) Factors related to iron uptake by dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Journal of Plant Nutrition* 2, 629-660.
 99. Palmgren M.G., Harper J.F. (1999) Pumping with plant P-type ATPases. *Journal of Experimental Botany* 50, 883-893.
 100. Passera C., Ghisi R. (1982) ATP sulphurylase activity and *O*-acetylserine sulphydrylase in isolated mesophyll protoplasts and bundle sheath strands of deprived maize leaves. *Journal of Experimental Botany* 83, 432-438.
 101. Peng Z., Verma D.P.S. (1995) A rice *HAL2*-like gene encodes a Ca^{2+} -sensitive 3'(2'),5'-diphosphonucleoside 3'(2')-phosphohydrolase and complements yeast *met22* and *Escherichia coli cysQ* mutation. *Journal of Biological Chemistry* 270, 29105-29110.

102. Pinton R., Cesco S., de Nobili M., Santi S., Varanini Z. (1998) Water- and pyrophosphate- extractable humic substances fractions as a source of iron for Fe-deficient cucumber plants. *Biology and Fertility of Soils* 26, 23-27.
103. Pinton R., Cesco S., Santi S., Agnoloni F., Varanini Z. (1999) Water-extractable humic substances enhance iron deficiency responses by Fe-deficient cucumber plants. *Plant and Soil* 210, 145-157.
104. Poletti S., Gruissem W., Sautter C. (2004) The nutritional fortification of cereals. *Current Opinion in Biotechnology* 15, 162-165.
105. Pushnik J.C., Miller G.W. (1989) Iron regulation of chloroplast photosynthetic function: mediation of PSI development. *Journal of Plant Nutrition* 12, 407-421.
106. Rauser W.E. (1990) Phytochelatins. *Annual Review of Biochemistry* 59, 61-86.
107. Reeves R.D., Baker A.J.M. (2000) Phytoremediation of toxic metals. Raskin I., Ensley B.D. (eds.) John Wiley & Sons, New York pp. 193-229
108. Reichard P.U., Kraemer S.M., Frazier S.W. Kretzschmar R. (2005) Goethite dissolution in the presence of phytosiderophores: rates, mechanisms, and the synergistic effect of oxalate. *Plant and Soil* 276, 115-132.
109. Renault S., Despeghel-Caussin C., Bonnemain J.L., Delrot S. (1989) The proton electrochemical transmembrane gradients generated by the transfer cells of the haustorium of *Polytrichum formosum* and their use in the uptake of amino acids. *Plant Physiology* 90, 913-920.
110. Rennenberg H. (1982) Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry* 21, 2771-2781.
111. Robinson D. (1994) The responses of plants to non-uniform supplies of nutrients. *New Phytologist* 127, 635-674.
112. Robinson N.J., Procter C.M., Connolly E.L., Guerinot M.L. (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 397, 694-697.
113. Roje S. (2006) S-adenosyl-L-methionine: beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry* 67, 1686-1698.

114. Romera F.J., Alcántara E. (1994) Iron-deficiency stress responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots: a possible role for ethylene? *Plant Physiology* 105, 1133-1138.
115. Romera F.J., Alcántara E. (2004) Ethylene involvement in the regulation of Fe-deficiency stress responses by Strategy I plants. *Functional Plant Biology* 31, 315-328.
116. Romera F.J., Lucena C., Alcántara E. (2006) Plant hormones influencing iron uptake in plants. In: *Iron nutrition in plants and microorganisms*. Barton L.L., Abadia J. (eds.) Kluwer Academic Publishers pp.251-278.
117. Römheld V. (1987) Different strategies for iron acquisition in higher plants. *Physiologia Plantarum* 70, 231-234.
118. Römheld V., Kramer D. (1983) Relationship between proton efflux and rhizodermal transfer cells induced by iron deficiency. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 113, 73-83.
119. Römheld V., Marschner H. (1981) Iron-deficiency-stress-induced morphological and physiological changes in root tips of sunflower. *Physiologia Plantarum* 53, 354-360.
120. Römheld V., Marschner H. (1986) Evidence for a specific uptake system for iron uptake system for iron phytosiderophores in root of grasses. *Plant Physiology* 80, 175-180.
121. Rudolph A., Becker R., Scholz T., Procházka Z., Toman J., Macek T., Herout V. (1985) The occurrence of the amino acid nicotianamine in plants and microorganisms. A reinvestigation. *Biochemistry and Physiology of Pflanzen* 180, 557-563.
122. Rutherford A.W. (1989) Photosystem II, the water-splitting enzyme. *Trends in Biochemistry Science* 14, 227-232.
123. Saito K. (2000) Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino acids. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 188-195.
124. Sakaguchi T., Nishizawa N.K., Nakanishi H., Yoshimura E., Mori S. (1999) The role of potassium in the secretion of mugineic acids family phytosiderophores from iron-deficient barley roots. *Plant and Soil* 215, 221-227.

125. Santi S., Cesco S., Varanini Z., Pinton R. (2005) Two plasma membrane H⁺-ATPase genes are differentially expressed in iron-deficient cucumber plants. *Plant Physiology* 43, 287-292.
126. Schmidt W. (1999) Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytologist* 141, 1-26.
127. Schmidt W., Michalke W., Schikora A. (2003) Proton pumping by tomato roots. Effect of Fe deficiency and hormones on the activity and the distribution of plasma membrane H⁺-ATPase in rhizodermal cells. *Plant Cell and Environment* 26, 361-370.
128. Schmidt W., Tittel J., Schikora A. (2000) Role of hormones in the induction of iron deficiency responses in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology* 122, 1109-1118.
129. Schmutz D., Brunold C. (1982) Rapid and simple measurement of ATP sulfurylase activity in crude plant extracts using an ATP meter for bioluminescence determination. *Analytical Biochemistry* 121, 151-155.
130. Schnug E., Haneklaus S., Booth E., Walker K.C. (1995) Sulphur supply and stress resistance in oilseed rape. *Proceedings of 9th International Rapeseed Congress of Cambridge* 1, 229-231.
131. Schwertmann U. (1991) Solubility and dissolution of iron oxides. *Plant and Soil* 130, 1-25.
132. Schwertmann U. (1991) Solubility and dissolution of iron oxides. *Plant and Soil* 130, 1-25.
133. Schwertmann U., Taylor R.M. (1989) Iron oxides In: *Minerals in soil environment*. Dixon J.B., Weed S.B. (eds.) Soil Sciences Society of America Madison WI USA pp. 379-438.
134. Seckbach S. (1982) Ferreting out the secrets of plant ferritin. *Journal of Plant Nutrition* 5, 369-394.
135. Segalen P. (1964) *Le fer dans le sols*. Paris France: Office de la reserche scientifique et technique outre-mer.
136. Shaaf G., Ludewig U., Erenoglu B.E., Mori S., Kitahara T., von Würen N. (2004) ZmYS1 functions as a proton coupled symporter for

- phytosiderophores and nicotianamine-chelated metals. *Journal of Biological Chemistry* 279, 9091-9096.
137. Shikora A., Thimm O., Linke B., Buckhout T.J., Müller M., Schmidt W. (2006) Expression, localization, and regulation of the iron transporter LeIRT1 in tomato roots. *Plant Soil* 284, 101-108.
 138. Smith F.W., Cybinski D., Rae A.L. (1999) Regulation of expression of genes encoding phosphate transporters in barley roots. In: *Plant nutrition-molecular biology and genetics*. Nielsen G.G., Jensen A. (eds.) Kluwer academic Publishers Dordrecht pp. 145-150.
 139. Spiller S., Terry N. (1980) limitino factors in photosynthesis. II. Iron stress diminished photochemical capacity by reducing the number of photosyntetic units. *Plant Physiology* 65, 121-125.
 140. Stephan U.W., Rudolph A.(1984) An improved and standardized method for extraction of nicotianamine from plants tissue. *Biochim. Physiol. Pflazen* 179, 517-523.
 141. Stevenson F.J. (1994) *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. Winley J. and Sons New York USA.
 142. Stocking C.R. (1975) Iron deficiency and the structure and physiology of maize chloroplasts. *Plant Physiology* 55, 626-631.
 143. Suter M., von Ballmoos P., Kopriva S., den Camp R.O., Schaller J. et al. (2000) Adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase and adenosine 5'-phosphosulfate reductase are identical enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 275, 930-936.
 144. Swarup R., Parry G., Graham N., Allen T., Bennett M. (2002) Auxin cross-talk: integration of signalling pathways to control plant development. *Plant Molecular Biology* 49, 411-426.
 145. Takagi S., Nomoto K., Takemoto T. (1984) Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. *Journal of Plant Nutrition* 7, 469-477.
 146. Takahashi M., Terada Y., Nakai I., Nakanishi H., Yoshimura E., Mori S., Nishizawa N.K. (2003) Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell* 15, 1263-1280.

147. Takahashi M., Yamaguchi H., Nakanishi H., Shioiri T., Nishizawa N.K., Mori S (1999) Cloning two genes for nicotianamine aminotransferase, a critical enzyme in iron acquisition (Strategy II) in graminaceous plants. *Plant Physiology* 121, 947-956.
148. Takizawa R., Nishizawa N.K., Nakanishi H., Mori S. (1996) Effect of iron deficiency on S-adenosyl methionine synthetase in barley roots. *Journal of Plant Nutrition* 19, 1189-1200.
149. Tandon H.L.S. (1995) Sulphur fertilizer for Indian agriculture. A guidebook. In: Fertilizer development and consultation organization, 2nd Ed. New Delhi pp.1-23.
150. Tanimoto M., Roberts K., Dolan L. (1995) Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 8, 943-948.
151. Terry N. (1980) Limiting factors in photosynthesis I. Use of iron stress to control photochemical capacity *in vivo*. *Plant Physiology* 65, 114-120.
152. Terry N., Abadia J. (1986) Function of iron in chloroplast. *Journal of Plant Nutrition* 9, 609-646.
153. Thoirion S., Briat J.F. (1999) Differential expression of maize sugar responsive genes in response to iron deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry* 37, 759-766.
154. Toulon V., Sentenac H., Thibaud J.B., Davidian J.C., Moulineaz C., Grignon C. (1992) Role of apoplast acidification by H⁺ pump. Effect on the sensitivity to pH and CO₂ of iron reduction by roots of *Brassica napus* L. *Planta* 186, 212-218.
155. Tukendorf A. e Rauser W.E. (1990) Changes in glutathione and phytochelatins in roots of maize seedlings exposed to cadmium. *Plant Science* 16, 557-564.
156. Underwood B.A. (2003) Scientific research: essential, but is it enough to combat world food insecurities? *Journal of Nutrition* 133, 1434S-1437S.
157. Van Hees P.A.W., Lundström U.S. (2000) Equilibrium models of aluminium and iron complexation with different organic acids in soil solution. *Geoderma* 94, 201-221.

158. Varanini Z., Pinton R. (1995) Humic substances and plant nutrition. In: Progress in botany: structural botany, physiology, genetics, taxonomy, geobotany. Lüttge U. (ed.) Springer-Verlag Berlin Germany pp. 97-117.
159. Varanini Z., Pinton R. (2001) Direct versus indirect effects of soil humic substances on plant growth and nutrition. In: The rhizosphere. Pinton R., Varanini Z., Nannipieri P. (eds.). Marcel Dekker Inc. New York USA pp. 141-157.
160. Vert G., Briat J.F., Curie C. (2001) *Arabidopsis IRT1* gene encodes a root-periphery iron transporter. The Plant Journal 26, 181-189.
161. Winterman J.F., De Mots A. (1965) Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. Biochimical Biophysical Acta 109, 448-453
162. Yang S.F., Hoffman N.E. (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annual Review of Plant Physiology 35, 155-189.
163. Yi Y., Guerinot M.L. (1996) Genetic evidences that induction of root Fe(III) chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency. The Plant Journal 10, 835-844.
164. Yoshida S. (1981) Fundamentals of rice crops science. Laguna International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.
165. Yu Y., Yang S.F. (1979) Auxin-induced ethylene production and its inhibition by aminoethoxyvinylglycine and cobalt ion. Plant Physiology 64, 1074-1077.
166. Zenk M.H. (1996) Heavy metal detoxification in higher plants - a review. Gene 179, 21-30.
167. Zhang F.S., Römhild V., Marschner H. (1991) Role of the root apoplasm for iron acquisition by wheat plants. Plant Physiology 97, 1302-1305.
168. Zhao F.J., Hawkesford M.J., McGrath S.P. (1999) Sulphur assimilation and effects on yield and quality of wheat. Journal of Cereal Science 30, 1-17.
169. Zhao F.J., Salmon S.E., Withers P.J.A., Monaghan J. M., Evans E.J., Shewry P.R., McGrath S.P. (1999) Variation in the breadmaking quality and rheological properties of wheat in relation to sulphur nutrition under field conditions. Journal of Cereal Science 30, 19-31.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Dr. Stefania Astolfi (Università della Tuscia) per avermi trasmesso l'amore per la Fisiologia e la Biochimica vegetale, per i fondamentali insegnamenti scientifici, per aver reso possibile la realizzazione di questo lavoro di tesi ed infine per il sostegno e l'amicizia dimostratami durante questi anni.

Ringrazio il Prof. Pinton (Università di Udine) per i fondamentali suggerimenti nella fase di svolgimento del lavoro di tesi, per avermi ospitato nel suo laboratorio e per aver letto criticamente questo manoscritto.

Ringrazio il Prof. Stefano Cesco per la sua amicizia e per l'assistenza tecnica e scientifica negli esperimenti per la valutazione della velocità di assorbimento del ^{59}Fe e dello ^{35}S da parte delle radici delle piante oggetto di studio.

Ringrazio il Dr. Luigi Sanità di Toppi (Università di Parma) per il supporto tecnico e scientifico nella determinazione del contenuto di glutathione ridotto e cisteina nei tessuti vegetali.

Ringrazio il Prof. Volker Römheld e il Prof. Günter Neumann (Università di Hohenheim) per l'assistenza tecnica e scientifica nella determinazione del contenuto di fitosiderofori negli essudati radicali delle piante di orzo.

Ringrazio la Dr. Daniela Pirazzi per aver condiviso con me la vita di laboratorio e per l'aiuto nello studio dell'espressione genica del trasportatore di solfato delle radici delle piante di orzo.