

Caratteristiche ecofisiologiche ed accumulo di cadmio in roverella (*Quercus pubescens* Willd.)

Claudia Coccozza*⁽¹⁾, Giuseppe Palumbo⁽²⁾, Claudio Colombo⁽²⁾, Valentina Pinto⁽¹⁾, Roberto Tognetti⁽¹⁾

(1) Dipartimento di Bioscienze e Territorio, Università del Molise, c.da Fonte Lappone, I-86090 Pesche (Isernia - Italy);

(2) Dipartimento di Agricoltura, Ambiente e Alimenti, Università del Molise, v. De Sanctis, I-86100 Campobasso (Italy). - *Corresponding Author: Claudia Coccozza (claudia.coccozza@unimol.it).

Abstract: *Ecophysiological characteristics and cadmium accumulation in Downy Oak (Quercus pubescens Willd.).* Heavy metals provoke environmental pollution with potentially toxic effects on human and plants systems. Recently, investigations are conducted on plants that may play a relevant role on pollutants absorption or stabilization, focusing on fast growing tree species in agronomic conditions; little is known on the effects of contaminants on tree species colonizing abandoned fields to be used in restoration ecology. The effects of Cd on photosynthetic performance and metal accumulation were investigated in *Quercus pubescens* Willd. seedlings grown in pots containing a mixture of sand, clay, turf and Cd-treatments (0, 25 and 75 mg kg⁻¹ dry soil). The studied photosynthetic parameters (A_{sat} = net photosynthesis; R_{day} = day respiration; Γ_{comp} = CO₂ compensation point; V_{cmax} = maximum carboxylation rate; J_{max} = electron transport rate; TPU = triose phosphate use; C_i/C_a = ratio of intercellular (C_i) to ambient (C_a) [CO₂] (C_i/C_a); $J_{\text{max}}/V_{\text{cmax}}$ = ratio; ($g_{\text{s,max}}$) = maximum stomatal conductance; (l_g) = stomatal conductance estimated relative to the photosynthetic rate; (F_v/F_m) = maximum quantum yield of PSII photochemistry; ($\Delta F/F_m$) = effective photochemical efficiency) varied progressively with increasing Cd concentration in the soil, highlighting a negative impact on photosynthetic potential and PSII functioning. Approximately 10% of added Cd was found to be extractable from the substrate, at the maximum concentration applied, with about 12 and 0.75 as bioaccumulation and translocation factors, respectively. Analogously, Cd accumulated up to 34, 30 and 46 mg kg⁻¹ in leaves, stem and roots, respectively. While it is not possible to extrapolate from the present study with seedlings to effects on mature oak trees, there are clear implications for regeneration in soils contaminated with heavy metals, which may lead to ecosystem deterioration.

Keywords: Cadmium pollution, Photosynthesis, *Quercus pubescens*

Received: May 28, 2012; Accepted: Aug 12, 2012; Published online: Oct 04, 2012

Citation: Coccozza C, Palumbo G, Colombo C, Pinto V, Tognetti R, 2012. Caratteristiche ecofisiologiche ed accumulo di cadmio in roverella (*Quercus pubescens* Willd.). Forest@ 9: 217-226 [online 2012-10-04] URL: <http://www.sisef.it/forest@contents/?id=efor0700-009>

Introduzione

L'inquinamento del suolo e dell'acqua da metalli pesanti, a causa delle attività antropiche, è un problema di primaria importanza a scala globale (Kabata-Pendias & Pendias 1989). Il cadmio (Cd) è fra i metalli pesanti che suscitano maggiori preoccupazioni per la sua diffusione e tossicità nell'ambiente. Il Cd si diffonde nell'atmosfera a seguito della combustio-

ne di carburanti di origine fossile oltre che per l'uso di lubrificanti e per il consumo dei pneumatici. L'accumulo e il trasferimento di questo metallo pesante dal suolo alle piante, utilizzate per le produzioni alimentari, possono avere serie implicazioni per la salute dell'uomo (Mench 1998). L'uso di fertilizzanti fosfatici ricchi di Cd ha aumentato sensibilmente la concentrazione di questo elemento nei suoli agricoli,

per cui si rileva un apporto medio nel suolo di 75 mg Cd per kg di P (Jones & Johnston 1989, Nziguheba & Smolders 2008). Particolarmente grave è l'aumento della concentrazione di Cd in suoli trattati con fanghi di depurazione di origine industriale, dove si stima che dopo circa venti anni di apporti si può verificare un incremento da 1 a 12 mg Cd kg⁻¹ suolo, in funzione della quantità di fanghi applicati. Applicazioni di concimi organici con basso tenore di metalli pesanti hanno determinato in suoli con simili caratteristiche un modesto incremento valutabile di circa 0.4 mg Cd kg⁻¹ suolo (Brooks 1995). I meccanismi d'accumulo del Cd nel suolo ed il trasferimento di questo inquinante in altri ecosistemi non sono ancora del tutto chiari. L'assorbimento di questo metallo nelle radici avverrebbe attraverso il sistema coinvolto nel trasporto dello Zn, altro metallo che le piante non sono capaci di differenziare dall'analogo Cd (Chaney & Ryan 1994).

Le specie forestali, a differenza delle principali colture agrarie, hanno un importante ruolo nel ridurre l'impatto degli inquinanti sulla catena alimentare per il loro ampio apparato radicale. Molte piante forestali sono ottime candidate per la stabilizzazione di suoli contaminati, tamponando la traslocazione dei metalli pesanti e, quindi, contribuendo al recupero ambientale del territorio (Robinson et al. 2000), oltre che offrendo la biomassa prodotta per la produzione d'energia (legna da ardere, *pellets*, ecc.). L'accumulo di Cd negli strati superficiali del suolo può però danneggiare la naturale rigenerazione delle specie arboree, e quindi contribuire al rallentamento del processo d'espansione della rinnovazione del bosco su suoli agricoli degradati, anche a concentrazioni relativamente basse (Hüttermann et al. 1999). Il Cd può essere assimilato dal suolo e accumulato nei tessuti vegetali degli alberi, causando alterazioni nel funzionamento stomatico, riduzione della concentrazione della clorofilla e dell'attività fotosintetica (Das et al. 1997). Di recente è stato osservato che l'interazione simbiotica della pianta con le micorrize può favorire il processo di assorbimento di Cd riducendo gli effetti tossici provocati dal metallo (Jentschke et al. 1999). La capacità d'assorbimento del Cd è funzione della "biodisponibilità" del metallo nel suolo, del tasso traspiratorio della pianta e dell'assorbimento selettivo del metallo da parte della pianta (Charonnens et al. 1998).

In Italia, l'espansione di formazioni forestali in suoli ex agricoli e/o contaminati può contribuire a recuperare paesaggi degradati a funzioni e servizi tipici degli ecosistemi naturali. Tuttavia, le piante espo-

ste ad alte concentrazioni di Cd possono mostrare effetti di tossicità, come clorosi fogliare, inibizione della crescita, riduzione dell'assorbimento d'acqua e di nutrienti, alterazione dell'attività enzimatica, limitazione degli scambi gassosi, senza per questo limitare l'assorbimento del metallo nei vari compartimenti della pianta (Sanità di Toppi & Gabbriellini 1999, Pietrini et al. 2003, Cocozza et al. 2008, Zacchini et al. 2009, Cocozza et al. 2011). L'obiettivo del presente studio è stato di valutare la risposta di semenzali di roverella (*Quercus pubescens* Willd.), specie che spesso invade suoli agricoli abbandonati e che può avere un ruolo in programmi di recupero ambientale di aree degradate, a 3 diverse concentrazioni di Cd (0, 25 e 75 mg kg⁻¹) somministrate al substrato di crescita, in termini di fotosintesi e di distribuzione di Cd nella pianta.

Materiali e metodi

Trattamento delle piante

L'esperimento è stato condotto in serra, presso il Dipartimento di Bioscienze e Territorio dell'Università degli Studi del Molise a Pesche (IS - 41°36'25"56 N e 14°16'42"60 E, circa 600 m a.s.l.). Il 15 marzo 2007, 21 semenzali di roverella di 1 anno (di cui 15 usati per le misure; i semenzali erano lunghi 10-15 cm), di provenienza certificata dal Vivaio di Campochiaro (Regione Molise), sono stati trapiantati in vasi di 6.5 L contenenti un substrato misto di sabbia:argilla:torba (30:50:20 in peso), con pH compreso tra 6 e 7. I vasi erano stati predisposti con un anticipo di 2 settimane, per consentire una stabilizzazione del trattamento, aggiungendo il Cd al suolo in forma di solfato - CdSO₄ 8/3 H₂O - in soluzione (questo sale è stato scelto poiché utilizzato frequentemente in esperimenti con Cd), in tre diverse concentrazioni (trattamenti), 0 mg Cd kg⁻¹ (controllo), 25 e 75 mg Cd kg⁻¹ p.s. substrato. Le concentrazioni di Cd somministrate sono state definite simulando condizioni di forte contaminazione e considerando i tempi sperimentali (Kim et al. 2003), in modo da indurre nelle piante effetti e, quindi, risposte identificabili nei parametri misurati. I semenzali sono stati fertilizzati dopo circa 10 giorni dal trapianto con un fertilizzante (Osmocote) a lento rilascio, per soddisfare il fabbisogno di micro e macroelementi. I contenitori sono stati allestiti secondo un disegno completamente randomizzato, rinnovato ogni settimana. A inizio esperimento tutti i vasi sono stati portati alla "capacità di campo". I vasi sono stati pesati con scadenza settimanale per determinare la quantità di acqua consumata, da for-

nire con gli adacquamenti, che sono stati regolari durante tutto il periodo di crescita delle piante, in modo da limitare la lisciviazione di nutrienti e normalizzare le relazioni idriche. I semenzali sono stati analizzati per la definizione di parametri fisiologici (curve A/C_i , fluorescenza della clorofilla) e campionati per la determinazione del contenuto di Cd nei tessuti al termine di 15 settimane di trattamento. La durata dell'esperimento è stata definita considerando i tempi di crescita della specie oggetto di studio.

Curve A/C_i

Le curve di risposta della fotosintesi alla concentrazione intercellulare di CO_2 (A/C_i) sono state misurate con analizzatore portatile all'infrarosso (IRGA - LI-6400, Li-Cor, USA) in 5 piante per trattamento su foglie completamente espanse e con simile disposizione sul fusto. L'IRGA era equipaggiato con un modulo di controllo della CO_2 e una sorgente di luce a diodi emettenti luce blu-rosso (LI-6400-02B). Le curve A/C_i sono state determinate misurando la risposta della fotosintesi netta (A_{sat}) al variare della concentrazione intercellulare di CO_2 (C_i). Le pressioni parziali esterne di CO_2 (C_a) sono state somministrate in passi successivi; il tasso d'assimilazione di CO_2 è stato prima misurato impostando la concentrazione di riferimento di CO_2 leggermente superiore a quella ambientale (40 Pa) e quindi a 30, 20, 10, 5, 40, 40, 60 e 80 Pa, con irradianza (Q) mantenuta a valori saturanti di PAR (radiazione fotosinteticamente attiva) di $600 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ (in serra). All'interno della *cuvette*, l'umidità relativa è stata regolata e mantenuta durante le misure a 60-70%. La temperatura fogliare media durante le misure è stata mantenuta a 28 °C mediante raffreddamento termoelettrico, ed il deficit di pressione di vapore fra foglia ed aria a 1.3 kPa. Le misure sono state registrate automaticamente a ogni C_a una volta che la fotosintesi rimaneva in equilibrio per almeno 3 minuti. Le misure sono iniziate dopo che la conduttanza stomatica (g_s) aveva raggiunto i valori massimi; g_s è rimasta elevata durante tutto il periodo di misura. L'effetto dell'eterogeneità stomatica sugli scambi gassosi è stato considerato insignificante, poiché gran parte della lamina fogliare occupava l'area della *cuvette* (6 cm²) durante la misura.

Le curve A/C_i sono state analizzate mediante il *software* PHOTOSYNTHESIS ASSISTANT (Dundee Scientific, UK). Il *software* analizza le curve A/C_i basandosi sul modello di Farquhar et al. (1980). Dalle curve A/C_i sono stati stimati 3 parametri biochimici che riassumono potenzialmente i limiti della fotosintesi: V_{max} (massimo tasso di carbossilazione), J_{max} (tasso di tra-

sporto elettronico a luce saturante) e TPU (tasso d'utilizzo del trioso fosfato per la sintesi di saccarosio ed amido).

La limitazione stomatica relativa per la fotosintesi (l_g), quale stima della proporzione di riduzione della fotosintesi attribuibile alla diffusione di CO_2 fra l'atmosfera e i siti di carbossilazione, è stata calcolata dalle curve A/C_i come $l_g = (1 - A/A_o) \cdot 100$, dove A il tasso netto di fotosintesi a C_a (36 Pa) di crescita e A_o il tasso fotosintetico quando C_i (36 Pa) equivale C_a . In queste condizioni, A_o rappresenta il tasso di fotosintesi senza limitazioni di tipo diffusivo al trasferimento di CO_2 dall'atmosfera ai siti di carbossilazione. Per questo calcolo, la conduttanza del mesofillo è stata considerata infinitamente grande. Il rapporto fra concentrazione intercellulare ed ambientale di CO_2 (C_i/C_a), la fotosintesi a saturazione (A_{sat}) e la conduttanza stomatica massima ($g_{s,max}$) sono stati determinati dalle curve A/C_i a luce saturante (per le condizioni di serra) e pressione parziale di CO_2 ambiente (circa $400 \mu mol mol^{-1}$).

La respirazione alla luce (mitocondriale) o CO_2 rilasciata alla luce tramite processi diversi dalla fotorespirazione è stata indicata come R_{day} . Il punto di compensazione alla CO_2 (Γ_{comp}) è stato calcolato come il punto in cui la funzione del modello intercetta l'asse delle x ($A = 0$).

Fluorescenza della clorofilla

Sulle stesse foglie usate per le curve A/C_i è stata misurata l'emissione della fluorescenza clorofilliana dopo 30 minuti di acclimatazione al buio ed in piena luce (serra), tramite un sistema portatile (PAM-2000, Walz, Germania). Sulle foglie in precedenza ambientate al buio sono state determinate, la fluorescenza di fondo (F_o), la fluorescenza massima (F_m), e l'efficienza fotochimica potenziale del fotosistema II (PSII): $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$. La fluorescenza stabile determinata prima dell'impulso di luce (F_i) è stata misurata in condizioni di luce simili a quelle osservate durante la misura della fotosintesi ($600 \mu mol m^{-2} s^{-1}$), ed è stata ottenuta la massima fluorescenza alla luce (F_m'). L'efficienza fotochimica effettiva (o resa quantica) del PSII è stata calcolata come: $\Delta F/F_m' = (F_m' - F_i)/F_m'$.

Accumulo di Cd

Dopo aver effettuato le misure ecofisiologiche, le piante sono state raccolte e suddivise in radici, fusto e foglie. Le radici sono state accuratamente lavate in acqua distillata e poi asciugate. Infine, è stato campionato il substrato di ciascuno dei 3 trattamenti (più la prova in bianco senza pianta). La determinazione

del Cd, nei campioni di substrato ed in quelli dei semenzali, è stata effettuata seguendo le metodiche indicate dalla Società Italiana di Scienze del Suolo (MIPAF 1999). La parte vegetale, prima della digestione chimica, è stata fatta essiccare in stufa ventilata a 70 °C fino a peso costante. Successivamente è stata macinata per migliorare il processo di digestione. Invece, i campioni di substrato sono stati essiccati all'aria, macinati e setacciati con setaccio a maglie di 2 mm.

Per la digestione, è stato utilizzato 1 g di ciascun campione, che è stato trattato in un primo momento con 2 ml di H₂O₂ per degradare la sostanza organica presente, e lasciato a riposo per circa 20 minuti. Dopo il raffreddamento, è stata aggiunta una miscela acida (acqua regia) costituita da 9 ml di HCl e 3 ml di HNO₃ (3:1 in volume). La digestione dei campioni è stata effettuata utilizzando un mineralizzatore (DK6, HEATING DIGESTER) con piastra riscaldante a riflusso, e portata ad una temperatura di 140 °C (per i campioni di substrato) e di 80 °C (per i campioni vegetali), per la digestione. Il mineralizzato è stato filtrato con fogli di nitrocellulosa in matracci conici ERLNMEYER da 50 ml e poi portato a volume con acqua deionizzata. La prova in bianco è stata effettuata con le medesime modalità omettendo il campione. Per la preparazione della curva di taratura del Cd, sono stati preparati degli standard (1 e 0.5 ppm). Il contenuto dei metalli è stato determinato per spettrofotometria in assorbimento atomico (PU9200X) con atomizzazione a fiamma aria-acetilene (FAAS).

Il contenuto di Cd estraibile (in acqua regia) nel substrato in mg kg⁻¹ è stato determinato tramite la seguente formula (eqn. 1):

$$CE = (A - B)DVm^{-1}$$

dove CE è il contenuto del metallo pesante espresso in mg kg⁻¹; A è la concentrazione del metallo nella soluzione in mg L⁻¹; B è la concentrazione del metallo nella soluzione della prova in bianco in mg L⁻¹; D è il fattore di diluizione (D = 1); V è il volume finale espresso in ml (50 ml); m è la massa del campione espresso in grammi.

I fattori di bioaccumulo (BC) e traslocazione (TF) per il Cd (Baker et al. 1994) sono stati calcolati come segue (eqn. 2, eqn. 3):

$$BC = \frac{[Cd]mg\ kg^{-1}\ p.s.\ pianta}{[Cd]mg\ kg^{-1}\ estraibile\ p.s.\ substrato}$$

$$TF = \frac{[Cd]mg\ kg^{-1}\ p.s.\ foglie}{[Cd]mg\ kg^{-1}\ p.s.\ radici}$$

Statistica

I dati mostrati sono medie di 5 repliche per trattamento. Il modello lineare generalizzato del programma STATISTICA® (StatSoft, USA) è stato applicato per stimare statisticamente gli effetti delle differenti concentrazioni di Cd. Le medie per trattamento sono state comparate attraverso la procedura dei minimi quadrati (LSD). I confronti statistici sono stati considerati significativi ad un livello di $P \leq 0.05$.

Risultati e discussione

Curve A/C_i

Dopo 15 settimane di trattamento con Cd, sono stati osservati cambiamenti significativamente negativi per molti parametri correlati con il potenziale fotosintetico ed il funzionamento del PSII (Tab. 1). Il Cd è un inibitore consistente della fotosintesi (Greger et al. 1994). Krupa et al. (1993) hanno osservato inibizione della fotosintesi in piante di *Phaseolus vulgaris* L., per l'aumento delle resistenze stomatiche e mesofillari all'ingresso di CO₂. È stata osservata una relazione lineare fra assimilazione netta ed inibizione della traspirazione nella soia da Huang et al. (1974). Questi autori suggeriscono un effetto negativo del Cd sull'apertura stomatica. La chiusura stomatica prolungata e la diminuzione dell'espansione cellulare possono essere responsabili della senescenza con elevate concentrazioni di Cd.

Nei semenzali di roverella è stata osservata una diminuzione consistente e graduale, in funzione dell'aumento della concentrazione di Cd nel substrato di crescita, per A_{sat} (35 e 67%, rispettivamente per il trattamento con 25 e 75 mg Cd kg⁻¹ p.s. substrato, rispetto al controllo). I valori di R_{day} sono rimasti, invece, pressoché invariati. Sia V_{cm_{max}} che J_{max} hanno subito una diminuzione progressiva in funzione dell'aumento della concentrazione di Cd nel substrato (21 e 46%, e 29 e 56%, rispettivamente per il trattamento con 25 e 75 mg Cd kg⁻¹ p.s. substrato, rispetto al controllo). L'analogo andamento in riduzione di V_{cm_{max}} e J_{max} in funzione dell'aumento della dose di Cd somministrata, ha mostrato una buona correlazione fra i due parametri delle curve A/C_i (Fig. 1, Tab. 1). Tale andamento di V_{cm_{max}} e J_{max} indica uno stretto accoppiamento fra l'attività dei tilacoidi e le proteine solubili (Wullschlegler 1993). Le foglie di roverella hanno perso, durante le fasi sperimentali, l'attitudine di ottimizzare l'allocazione di risorse (N) per mantenere un equilibrio fra capacità enzimatica (Rubisco) ed idoneità alla cattura della luce (clorofilla - Thompson et al. 1992). I valori di TPU non hanno subito forti di-

Tab. 1 - Parametri fotosintetici in *Quercus pubescens* Willd. dopo 15 settimane di esposizione a trattamento con Cd (0 mg kg⁻¹, 25 e 75 mg kg⁻¹ p.s. substrato). (A_{sat}): fotosintesi netta a saturazione; (R_{day}): respirazione mitocondriale; (Γ_{comp}): punto di compensazione alla CO₂; (V_{cmax}): massimo tasso di carbossilazione; (J_{max}): tasso di trasporto elettronico a luce saturante; (TPU): tasso d'utilizzo del trioso fosfato; (C_i/C_a): rapporto fra concentrazione intercellulare e ambientale di CO₂; (J_{max}/V_{cmax}): ratio; (g_s,max): conduttanza stomatica massima; (l_g): limitazione stomatica relativa alla fotosintesi; (F_v/F_m): efficienza fotochimica potenziale; ($\Delta F/F'_m$): efficienza fotochimica effettiva. I valori sono la media di 5 campioni per trattamento e sono stati analizzati indipendentemente mediante ANOVA ad una via. (ns): non significativo; (ns¹): $P = 0.0639$; (*): $P \leq 0.05$; (**): $P \leq 0.001$; (***) : $P \leq 0.0001$. Lettere differenti riportate a fianco dei valori medi indicano differenze significative a $P \leq 0.05$.

Parametri fotosintetici	Trattamento Cd (mg kg ⁻¹ p.s. substrato)			
	0	25	75	P level
A_{sat} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	11.54 ^a	7.53 ^b	3.76 ^c	***
R_{day} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	2.142	2.48	2.38	ns
Γ_{comp} ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	7.81 ^a	9.71 ^b	12.41 ^c	***
V_{cmax} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	44.24 ^a	34.88 ^b	23.94 ^c	***
J_{max} ($\mu\text{mol electrons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	133.32 ^a	94.71 ^b	58.82 ^c	**
TPU ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	7.32	6.91	6.44	ns
C_i/C_a	0.79 ^a	0.77 ^a	0.72 ^b	*
J_{max}/V_{cmax}	2.99 ^a	2.71 ^{ab}	2.46 ^b	*
g_s,max ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0.29 ^a	0.17 ^b	0.09 ^c	**
l_g (%)	33.89 ^a	40.48 ^b	45.86 ^c	**
F_v/F_m	0.83	0.76	0.65	ns ¹
$\Delta F/F'_m$	0.82 ^a	0.74 ^{ab}	0.54 ^b	*

minuzioni in seguito al trattamento con Cd. Come nel caso di A_{sat} , g_s,max ha subito una diminuzione consistente ($P = 0.0602$) con l'aumentare delle dosi di Cd (41 e 69%, rispettivamente per il trattamento con 25 e 75 mg Cd kg⁻¹ p.s. suolo, rispetto al controllo), mentre il valore di C_i/C_a è diminuito poco. I valori di l_g , viceversa, hanno subito un aumento consistente con il trattamento di Cd (19 e 35%, rispettivamente

per il trattamento con 25 e 75 mg Cd kg⁻¹ p.s. suolo, rispetto al controllo). Limitazioni biochimiche ed anatomiche possono essere entrambe coinvolte nel ridurre la diffusione interna di CO₂, e quindi la capacità fotosintetica (e.g., Marchi et al. 2008), influenzando la relazione fra limiti strutturali e funzionali del processo fotosintetico.

I cationi bivalenti hanno un ruolo importante an-

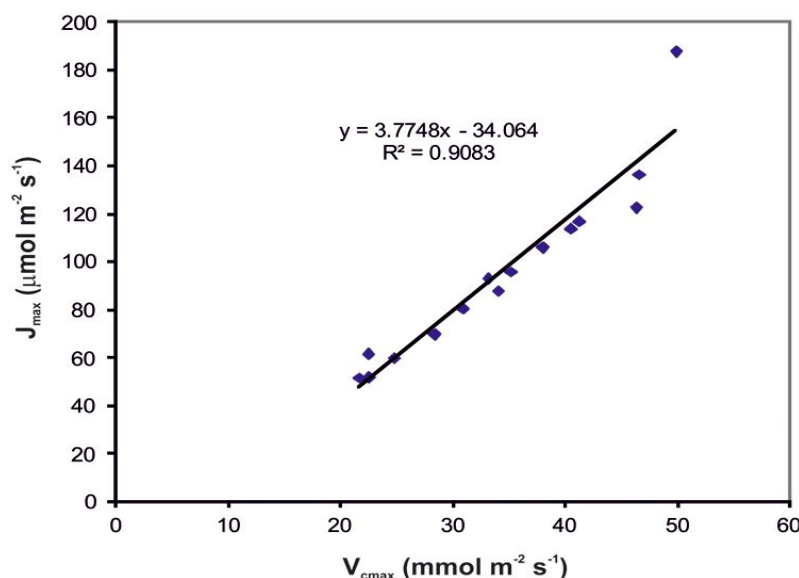


Fig. 1 - Relazione dei parametri fotosintetici V_{cmax} (massimo tasso di carbossilazione) e J_{max} (tasso di trasporto elettronico a luce saturante) in semenzali di *Quercus pubescens* Willd. sottoposti a trattamento con Cd (0 mg kg⁻¹, 25 e 75 mg kg⁻¹ p.s. substrato).

che nell'attivazione della Rubisco (Tukendorf 1993). L'esposizione prolungata al Cd in piante d'orzo ha influenzato la funzionalità delle clorofille, con negative conseguenze per lo sviluppo dei cloroplasti in foglie giovani e con l'inibizione della fotosintesi in foglie mature (Stiborova et al. 1986); inoltre è stato osservato che la diminuzione dell'area fogliare nelle piante trattate non era dovuta solo alla minore dimensione delle cellule, ma anche alla riduzione degli spazi intercellulari. Krupa et al. (1993) hanno evidenziato che il Cd influenza principalmente i pigmenti fotosintetici (soprattutto clorofilla totale, meno i carotenoidi), prima delle funzioni fotosintetiche, risultando in un'inibizione del PSII in mais. Utilizzando la procedura di valutazione delle curve A/C_i messa a punto da Sharkey et al. (2007), interpolando i dati con il metodo dei minimi quadrati, è stata stimata la conduttanza del mesofillo (g_m) delle piantine di roverella esposte ad eccesso di Cd. Il trattamento con Cd ha provocato una riduzione consistente di g_m , che è passata da circa $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ nel controllo, a 1.41 e $0.74 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$, nelle piantine trattate con 25 e 75 mg Cd kg^{-1} p.s. suolo, rispettivamente.

La diminuzione progressiva di A_{sat} , V_{cmax} e J_{max} , che si verificava con l'aumentare delle dosi di Cd nel substrato di crescita conferma quanto riscontrato in esperimenti condotti su talee di cloni di *Populus* spp. (Eridano ed I-214) in vaso (Tognetti R, com. pers.), in cui si osservava un danno metabolico sostanziale alla fotosintesi. Nonostante ciò, il valore di $J_{\text{max}}/V_{\text{cmax}}$ è rimasto relativamente costante, indicando che la capacità per una ripartizione ottimale delle risorse nelle diverse funzioni fotosintetiche non è stata alterata dal trattamento con Cd. I valori pressoché stabili di C_i/C_a con l'eccesso di Cd però indicano che l'attività di carbossilazione e la conduttanza del mesofillo sono stati solo parzialmente influenzati dal trattamento. L'aumento di Γ_{comp} suggerisce un aumento della fotorespirazione associato all'aumento delle dosi di Cd nel substrato. Tale meccanismo potrebbe rappresentare un modo per evitare la fotoinibizione, dissipando l'eccesso di ATP e NADPH, producendo CO_2 interna (mantenendo l'attività della Rubisco), e consumando ossidanti (come H_2O_2) mediante catalisi. L'effetto negativo del Cd sul potenziale fotosintetico si è manifestato anche a carico del cattivo funzionamento stomatico, con un aumento di l_g ed una diminuzione di $g_s \text{max}$. In ogni caso l'effetto negativo dei trattamenti sugli scambi gassosi potrebbe rallentare lo sviluppo dei semenzali di roverella su suoli contaminati da Cd. I risultati ottenuti suggeriscono l'opportunità di proseguire la sperimentazione in

ambiente controllato, valutando più approfonditamente la risposta delle piante ai vari trattamenti, anche utilizzando diversi genotipi. In seguito, la sperimentazione in campo potrebbe consentire di verificare la persistenza delle risposte nel lungo periodo.

Fluorescenza della clorofilla

I valori di F_v/F_m hanno subito variazioni meno marcate rispetto ai parametri delle curve A/C_i (8 e 22% , rispettivamente per il trattamento con 25 e 75 mg Cd kg^{-1} p.s. substrato, rispetto al controllo), mentre per $\Delta F/F'_m$ la diminuzione è stata relativamente più consistente (10 e 34% , rispettivamente per 25 e 75 mg Cd kg^{-1} p.s. substrato, rispetto al controllo). La relativa resilienza dell'efficienza massima del PSII (F_v/F_m) e della resa quantica reale ($\Delta F/F'_m$) associate al trattamento con Cd potrebbe indicare che il fotosistema della roverella non è stato danneggiato irrimediabilmente dalle dosi di Cd utilizzate.

Pietrini et al. (2003) hanno osservato una diminuzione progressiva di A_{sat} e V_{cmax} (mentre J_{max} presentava valori pressoché costanti) in piante di *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steudel cresciute per 3 settimane in soluzione idroponica a concentrazioni di $50 \mu\text{M}$ di Cd, aggiunto alla soluzione sotto forma di CdSO_4 . Gli stessi autori riportano una sensibile diminuzione dei valori di $\Delta F/F'_m$ e valori costanti di F_v/F_m con l'aumentare delle concentrazioni di Cd, mostrando che i cloroplasti riuscivano ad assorbire $0.83 \text{ nmol Cd mg clorofilla}^{-1}$ (le foglie $8.5 \text{ nmol Cd mg clorofilla}^{-1}$), senza alcuna alterazione della struttura del cloroplasto e dell'efficienza del PSII. Pietrini et al. (2003) osservano anche che l'attività antiossidante era stimolata dal Cd, per l'aumento di glutazione, suggerendo un importante ruolo protettivo del glutazione sulla fotosintesi. L'apparato fogliare non mostrava sintomi di necrosi, clorosi e di *leaf rolling*, in funzione dell'aumento delle concentrazioni. Cosio et al. (2006) riportano sintomi visivi di clorosi e di necrosi in *Salix viminalis* L. in soluzione idroponica a concentrazioni di Cd $50 \mu\text{M}$, rispettivamente dopo 5 e 14 settimane di trattamento.

Accumulo di Cd

Un effetto significativo del trattamento con Cd è stato osservato sulle concentrazioni del metallo nei diversi comparti della pianta (Tab. 2). La concentrazione di Cd è aumentata in modo progressivo nei tessuti dei semenzali di roverella all'aumentare della concentrazione del Cd. L'accumulo di Cd è stato particolarmente evidente nelle radici. In genere, le piante arboree non sono capaci d'escludere i metalli pe-

Tab. 2 - Concentrazione di Cd (su peso secco) nei comparti di semenzali di *Quercus pubescens* Willd. dopo 15 settimane di esposizione a trattamento con Cd (0 mg kg⁻¹, 25 e 75 mg kg⁻¹ p.s. substrato). I valori sono la media di 5 campioni per trattamento e sono stati analizzati indipendentemente mediante ANOVA ad una via. (ns): non significativo; (ns¹): *P* compreso fra 0.06 e 0.07); (*): *P* ≤ 0.05.

Accumulo Cd (mg kg ⁻¹)	Trattamento Cd (mg kg ⁻¹ p.s. substrato)		
	25	75	<i>P</i> level
Foglie	19.5	34.1	*
Fusto	24.6	29.7	ns ¹
Radici	33.3	45.6	ns ¹
Totale	77.4	109.4	ns ¹

santi presenti nel suolo dalle radici, anche se vengono raggiunti livelli tossici (Kahle 1993). Un sensibile accumulo di Cd (4 mg kg⁻¹) è stato osservato nelle radici fini di semenzali di faggio, sebbene le concentrazioni nel substrato (1.4 mg kg⁻¹) fossero inferiori a quelle riscontrate nelle radici (Breckle & Kahle 1992). Kelly et al. (1979) riportano alti livelli di Cd in radici di *Liriodendron tulipifera* L. (1167 mg kg⁻¹) e *Pinus taeda* L. (1233 mg kg⁻¹) senza riduzione significativa dei tassi d'accrescimento radicale. Sebbene le concentrazioni di Cd fossero tendenzialmente inferiori nelle foglie che nel fusto a 25 mg Cd kg⁻¹ p.s. substrato, a 25 mg Cd kg⁻¹ p.s. substrato le concentrazioni di Cd erano superiori nelle foglie. Tale comportamento potrebbe essere il risultato di danni subiti dai meccanismi preposti alla resistenza nel fusto e nelle radici. La struttura dell'apparato radicale mostrava un aumento di radici secondarie in funzione dell'aumento della concentrazione di Cd nel substrato (dati non

Tab. 3 - Fattori di estrazione, bioaccumulo e traslocazione di Cd in semenzali di *Quercus pubescens* Willd. dopo 15 settimane di esposizione a trattamento con Cd (0 mg kg⁻¹, 25 e 75 mg kg⁻¹ p.s. substrato). I valori sono la media di 5 campioni per trattamento e sono stati analizzati indipendentemente mediante ANOVA ad una via. (ns): non significativo; (*): *P* ≤ 0.05.

Disponibilità Cd (mg kg ⁻¹)	Trattamento Cd (mg kg ⁻¹ p.s. substrato)		
	25	75	<i>P</i> level
CE	4.3	9.5	*
BC	18	11.5	*
TF	0.59	0.75	*

mostrati). Breckle & Kahle (1992) hanno osservato cambiamenti dell'architettura dell'apparato radicale dopo due mesi di esposizione (radici più ramificate e dense, con un più elevato numero di radici secondarie, e inibizione della formazione di peli radicali) in giovani piantine di faggio cresciute in vaso con substrati contenenti 44 mg kg⁻¹ p.s. di Cd(NO₃)₂. L'attecchimento dei semenzali di roverella, quindi, potrebbe essere compromesso da uno sviluppo radicale anomalo.

Questa ricerca ha evidenziato una buona biodisponibilità del Cd nel substrato utilizzato (Tab. 3). La proporzione di Cd estraibile (CE) rispetto al totale applicato è stata del 17 e 13% circa per il trattamento con 25 e 75 mg Cd kg⁻¹ p.s. substrato, rispettivamente. Le proporzioni riscontrate in questo studio sono state simili a quelle riportate in altri lavori su semenzali di specie forestali (17-20%) da Burton et al. (1984) in *Picea sitchensis* (Bong.) Carrière e Kim et al. (2003) in *Pinus sylvestris* L. Ciò indicherebbe che potrebbe instaurarsi un equilibrio fra Cd solubile ed il substrato nel suo complesso in un periodo di 15 settimane (durata dell'esperimento, rispetto a 14 e 11 settimane dei lavori citati, anche nel caso di pH relativamente più alto). Dixon (1988) riporta che 50-30% del Cd totale addizionato è stato estratto da un suolo sabbioso-limoso trattato con 10 e 100 mg Cd kg⁻¹ p.s. suolo (come nel presente caso i valori di CE erano maggiori nel trattamento con quantitativi di Cd aggiunto più elevati), sebbene il pH del suolo fosse 6. Oltre che il pH, anche il basso contenuto di sostanza organica nel substrato utilizzato per l'esperimento sulla roverella può aver contribuito all'aumento della mobilità del Cd. In effetti, lo studio di Dixon (1988), su *Quercus rubra* L., riporta contenuti di sostanza organica particolarmente bassi (1.5%), in confronto agli studi di Kim et al. (2003 - 15%) e Burton et al. (1984 - 45%).

Sebbene i valori di CE siano più che raddoppiati nell'aggiungere 25 o 75 mg Cd kg⁻¹ p.s. substrato, un tale incremento non è stato osservato per le concentrazioni di Cd trovate nei tessuti dei semenzali di roverella. Sembrerebbe, quindi, che la roverella riduca l'assorbimento di Cd ad alte concentrazioni di Cd nel substrato. Arduini et al. (1996) riportano un simile andamento in *Pinus pinaster* Aiton, *Pinus domestica* L. e *Fraxinus ornus* L., cresciuti in soluzione nutritiva con concentrazioni crescenti di Cd (0.01-0.6 mg Cd l⁻¹), suggerendo la presenza di un meccanismo di regolazione per ridurre l'assorbimento di Cd, come l'accumulo nella corteccia radicale e/o messa in atto di una barriera fisica a livello di capsula radicale. Il

movimento del Cd durante il processo di distribuzione interno alla pianta è regolato dai tessuti vascolari, e in genere la maggior parte viene confinata nelle radici. La traslocazione del Cd verso le foglie dipenderebbe, quindi, sia dalle capacità di assorbimento sia dal flusso traspiratorio.

Per quanto riguarda la capacità d'intercettazione dell'inquinante, il valore di BC è diminuito all'aumento della concentrazione di Cd somministrata (Tab. 3). Cosio et al. (2006) riportano che in piante di *Salix viminalis* L., cresciute in soluzione idroponica a concentrazioni crescenti di Cd per 6 settimane, erano: (i) per le foglie di 519 e di 260 mg kg⁻¹ (rispettivamente per il trattamento 50 µM e 100 µM); (ii) e per le radici 4048 e 798 mg kg⁻¹ (rispettivamente per il trattamento 50 µM e 100 µM). Cosio et al. (2005) hanno osservato lo stesso andamento in due ecotipi di *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl., in soluzione idroponica a concentrazioni crescenti di Cd per tre mesi. In particolare, i due ecotipi nel trattamento più alto (100 µM), mostravano alti valori di BC nelle foglie (> 5000 mg kg⁻¹). Analogamente, Zhao et al. (2006) in *Arabidopsis halleri* L. hanno trovato valori alti di BC nelle foglie (> di 1000 mg kg⁻¹), trattate con 5 µM di Cd in soluzione idroponica per 3 settimane. I valori di TF sono risultati per entrambi i trattamenti inferiori a 1 (Tab. 3), per cui la roverella potrebbe essere considerata una candidata per le tecniche di fitostabilizzazione (Baker et al. 1994). I valori di TF sono stati tendenzialmente più alti nel trattamento a maggiore concentrazione di Cd, confermando l'elevata mobilità del metallo e quindi la sua disponibilità all'assorbimento da parte delle piante. In ogni caso, valori di TF inferiori a 1 denotano una strategia che favorisce l'esclusione del Cd rispetto all'accumulo del metallo.

Conclusioni

In questa ricerca sono stati evidenziati i possibili meccanismi d'alterazione della resistenza al Cd, a livello di scambio gassoso, su semenzali di roverella (vedi Hagemeyer et al. 1993a, 1993b). I semenzali di roverella, hanno mostrato un abbassamento della capacità fotosintetica all'aumentare delle concentrazioni di Cd mentre lo PSII non è stato danneggiato irrimediabilmente dalle dosi di Cd utilizzate. I bassi fattori di traslocazione del metallo nella parte aerea suggeriscono che questa specie è capace di attecchire fin dai primi stadi di sviluppo in suoli contaminati, e di stabilizzare i metalli prevalentemente attorno alla rizosfera. L'effetto negativo dei trattamenti sugli scambi gassosi potrebbe però rallentare lo sviluppo

dei semenzali di roverella su suoli eccessivamente contaminati da Cd.

Nel realizzare una messa in opera di un impianto per la fitostabilizzazione è consigliabile scegliere le specie vegetali più resistenti, perché devono coprire permanentemente il terreno, e siti marginali, dove i costi di recupero con movimento terra sarebbero proibitivi. Alla luce di questi primi risultati, la roverella può essere considerata una candidata alla fitostabilizzazione. In ogni caso, in ambiente mediterraneo collinare la roverella potrebbe mostrare vantaggi, sia per la capacità di resistere a stress multipli (idrico, termico, ecc.) sia per la funzione paesaggistica (filari alberati, alberi fuori foresta, fasce tampone). Sebbene non sia possibile estrapolare riguardo agli effetti su piante adulte dal presente esperimento, le implicazioni per la fase di ricolonizzazione sono chiare.

Bibliografia

- Arduini I, Godbold DL, Onnis A (1996). Cadmium and copper uptake and distribution in Mediterranean tree seedlings. *Physiologia Plantarum* 97: 111-117. - doi: [10.1111/j.1399-3054.1996.tb00486.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00486.x)
- Baker AJM, Reeves RD, Hajar ASM (1994). Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl (Brassicaceae). *New Phytologist* 127: 61-68. - doi: [10.1111/j.1469-8137.1994.tb04259.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb04259.x)
- Breckle SW, Kahle H (1992). Effect of toxic heavy metals (Cd, Pb) on growth and mineral nutrition of beech (*Fagus sylvatica* L.). *Vegetatio* 101: 43-53. - doi: [10.1007/BF00031914](https://doi.org/10.1007/BF00031914)
- Brooks KM (1995). Assessment of the environmental risks associated with the use of treated wood in lotic systems. Western Wood Preservers' Institute, Vancouver, Canada, pp. 37.
- Burton KW, Morgan E, Roig A (1984). The influence of heavy metals upon the growth of Sitka-spruce in South Wales forests. II. Greenhouse experiments. *Plant and Soil* 78: 271-282. - doi: [10.1007/BF02450361](https://doi.org/10.1007/BF02450361)
- Chaney RL, Ryan JA (1994). Risk based standards for arsenic, lead, and cadmium in urban soils. DECHEMA, Frankfurt, Germany.
- Chardonens AN, ten Bookum WM, Kuijper LDJ, Verkleij JAC, Ernst WHO (1998). Distribution of cadmium in leaves of cadmium tolerant and sensitive ecotypes of *Silene vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 104: 75-80. - doi: [10.1034/j.1399-3054.1998.1040110.x](https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1040110.x)
- Cocozza C, Minnocci A, Tognetti R, Iori V, Zacchini M, Scarascia Mugnozza G (2008). Distribution and concentration of Cd in root tissue of *Populus alba* determined by

- scanning electron microscopy and energy-dispersive x-ray microanalysis. *iForest* 1: 96-103. - doi: [10.3832/ifo-r0458-0010096](https://doi.org/10.3832/ifo-r0458-0010096)
- Cocozza C, Maiuro L, Tognetti R (2011). Mapping Cadmium distribution in roots of Salicaceae through scanning electron microscopy with x-ray microanalysis. *iForest* 4 (3): 113-120. - doi: [10.3832/ifo-r0563-004](https://doi.org/10.3832/ifo-r0563-004)
- Cosio C, DeSantis L, Frey B, Diallo S, Keller C (2005). Distribution of cadmium in leaves of *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany* 56: 765-775. - doi: [10.1093/jxb/eri062](https://doi.org/10.1093/jxb/eri062)
- Cosio C, Vollenweider P, Keller C (2006). Localization and effects of cadmium in leaves of cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.). I. Macrolocalization and phytotoxic effects of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 58: 64-74. - doi: [10.1016/j.envexpbot.2005.06.017](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.06.017)
- Das P, Samantaray S, Rout G (1997). Studies on cadmium toxicity in plants: A review. *Environmental Pollution* 98 (1): 29-36. - doi: [10.1016/S0269-7491\(97\)00110-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(97)00110-3)
- Dixon RK (1988). Response of ectomycorrhizal *Quercus rubra* to soil cadmium, nickel and lead. *Soil Biology & Biochemistry* 20: 555-559. - doi: [10.1016/0038-0717\(88\)90072-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(88)90072-7)
- Farquhar GD, von Caemmerer S, Berry JA (1980). A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* 149: 78-90. - doi: [10.1007/BF00386231](https://doi.org/10.1007/BF00386231)
- Greger M, Johansson M, Stihl A, Hamza K (1994). Foliar uptake of Cd by pea (*Pisum sativum*) and sugar beet (*Beta vulgaris*). *Physiologia Plantarum* 88: 563-570. - doi: [10.1111/j.1399-3054.1993.tb01372.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb01372.x)
- Hagemeyer J, Lohrmann D, Breckle S-W (1993a). Development of annual xylem rings and shoot growth of young beech (*Fagus sylvatica* L.) grown in soil with various Cd and Zn levels. *Water Air & Soil Pollution* 69: 351-361. - doi: [10.1007/BF00478170](https://doi.org/10.1007/BF00478170)
- Hagemeyer J, Heppel T, Breckle S-W (1993b). Effects of Cd and Zn on the development of annual xylem rings of young Norway spruce (*Picea abies*) plants. *Trees* 8 (5): 223-227. - doi: [10.1007/BF00196625](https://doi.org/10.1007/BF00196625)
- Huang CY, Bazzaz FA, Vanderhoff LN (1974). The inhibition of soybean metabolism by cadmium and lead. *Plant Physiology* 54: 122-124. - doi: [10.1104/pp.54.1.122](https://doi.org/10.1104/pp.54.1.122)
- Hüttermann A, Arduini I, Godbold DL (1999). Metal pollution and forest decline. In: "Heavy metal stress in plants" (Prasad MNV, Hagemeyer J eds). Springer, Berlin, Germany, pp. 253-272.
- Jentschke G, Winter S, Godbold DL (1999). Ectomycorrhizas and cadmium toxicity in Norway spruce seedlings. *Tree Physiology* 19: 23-30. - doi: [10.1093/treephys/19.1.23](https://doi.org/10.1093/treephys/19.1.23)
- Jones KC, Johnston AE (1989). Cadmium in cereal grain and herbage from long term experimental plots at Rothamsted. *Environmental Pollution* 57: 199-216. - doi: [10.1016/0269-7491\(89\)90012-2](https://doi.org/10.1016/0269-7491(89)90012-2)
- Kabata-Pendias A, Pendias H (1989). Trace elements in the soil and plants. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Kahle H (1993). Response of roots of trees to heavy metals. *Environmental and Experimental Botany* 33: 99-119. - doi: [10.1016/0098-8472\(93\)90059-O](https://doi.org/10.1016/0098-8472(93)90059-O)
- Kelly JM, Parker GR, McFee WW (1979). Heavy metal accumulation and growth of seedlings of five forest species as influenced by soil cadmium level. *Journal of Environmental Quality* 8: 361-364. - doi: [10.2134/jeq1979.00472425000800030019x](https://doi.org/10.2134/jeq1979.00472425000800030019x)
- Kim CG, Bell JNB, Power SA (2003). Effects of soil cadmium on *Pinus sylvestris* L. seedlings. *Plant and Soil* 257: 443-449. - doi: [10.1023/A:1027380507087](https://doi.org/10.1023/A:1027380507087)
- Krupa Z, Oquist G, Huner NPA (1993). The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* - a fluorescence analysis. *Physiologia Plantarum* 88: 626-630. - doi: [10.1111/j.1399-3054.1993.tb01381.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb01381.x)
- Marchi S, Tognetti R, Minnocci A, Borghi M, Sebastiani L (2008). Variation in mesophyll anatomy and photosynthetic capacity during leaf development in a deciduous mesophyte fruit tree (*Prunus persica*) and an evergreen sclerophyllous Mediterranean shrub (*Olea europaea*). *Trees* 22: 559-571. - doi: [10.1007/s00468-008-0216-9](https://doi.org/10.1007/s00468-008-0216-9)
- Mench MJ (1998). Cadmium availability to plants in relation to major long-term changes in agronomy systems. *Agriculture Ecosystems Environment* 67: 175-187. - doi: [10.1016/S0167-8809\(97\)00117-5](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(97)00117-5)
- MIPAF (1999). Metodi di analisi chimica del suolo (P. Violante Coord.). Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. Franco Angeli Editore, Roma.
- Nziguheba G, Smolders E (2008). Inputs of trace elements in agricultural soils via phosphate fertilizers in European countries. *Science of Total Environment* 390: 53-57. - doi: [10.1016/j.scitotenv.2007.09.031](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.09.031)
- Pietrini F, Iannelli M, Pasqualini S, Massacci A (2003). Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Plant Physiology* 133: 829-837. - doi: [10.1104/pp.103.026518](https://doi.org/10.1104/pp.103.026518)
- Robinson BH, Mills TM, Petit D, Fung LE, Green S, Clothier B (2000). Natural and induced cadmium accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. *Plant and Soil* 227: 301-306. - doi: [10.1023/A:1026515007319](https://doi.org/10.1023/A:1026515007319)
- Sanità di Toppi LS, Gabbriellini R (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41: 105-130. - doi: [10.1016/S0098-8472\(98\)00058-6](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(98)00058-6)
- Sharkey TD, Bernacchi CJ, Farquhar GD, Singaas EL (2007). Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C₃ leaves. *Plant, Cell and Environment* 30: 1035-1040. - doi: [10.1111/j.1365-3040.2007.01710.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01710.x)

- Stiborova M, Doubravova M, Brezcinova A, Friedrich A (1986). Effect of heavy metal ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley *Hordeum vulgare* L. *Photosynthetica* 20: 418-425.
- Thompson WA, Huang LK, Kriedemann PE (1992). Photosynthetic response to light and nutrients in sun-tolerant and shade-tolerant rainforest trees. II. Leaf gas exchange and component processes of photosynthesis. *Australian Journal of Plant Physiology* 19: 19-42. - doi: [10.1071/PP9920019](https://doi.org/10.1071/PP9920019)
- Tukendorf A (1993). The response of spinach plants to excess of copper and cadmium. *Photosynthetica* 28: 573-575.
- Wullschlegel SD (1993). Biochemical limitations to carbon assimilation in C₃ plants - A retrospective analysis of the A/Ci curves from 109 species. *Journal of Experimental Botany* 44: 907-920. - doi: [10.1093/jxb/44.5.907](https://doi.org/10.1093/jxb/44.5.907)
- Zacchini M, Pietrini F, Scarascia Mugnozza G, Iori V, Pietrosanti L, Massacci A (2009). Metal tolerance, accumulation, and translocation in poplar and willow clones treated with cadmium in hydroponics. *Water, Air and Soil Pollution* 197: 23-34. - doi: [10.1007/s11270-008-9788-7](https://doi.org/10.1007/s11270-008-9788-7)
- Zhao FJ, Jiang RF, Dunham SJ, Mcgrath SP (2006). Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist* 172: 646-654. - doi: [10.1111/j.1469-8137.2006.01867.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01867.x)