

Phytoremediation



Lo sviluppo tecnologico-industriale dell'uomo ha portato con se sviluppo, ricchezza, potere e ha portato l'uomo a disinteressarsi dell'uso che stava facendo dell'ambiente, che per secoli e secoli ha dato sostentamento al genere umano. E questo ci ha portati a cosa?

A questo...



Però negli ultimi decenni si sono trovate e sviluppate nuove tecniche per la “pulizia “ dei suoli e delle acque inquinate:

- La frantumazione pneumatica dei suoli
- Processi di solidificazione/stabilizzazione
- Vetrificazione
- Rimozione dello strato del suolo contaminato e depurazione ex-loco
- Stabilizzazione fisica o lavaggi dei suoli contaminati con acidi

SVANTAGGI:

- Costosi
- Laboriosi
- Intensivi
- Invasivi per gli ambienti decontaminati
- Alcuni pericolosi per la salute della fauna e della flora che ripopoleranno l’ambiente

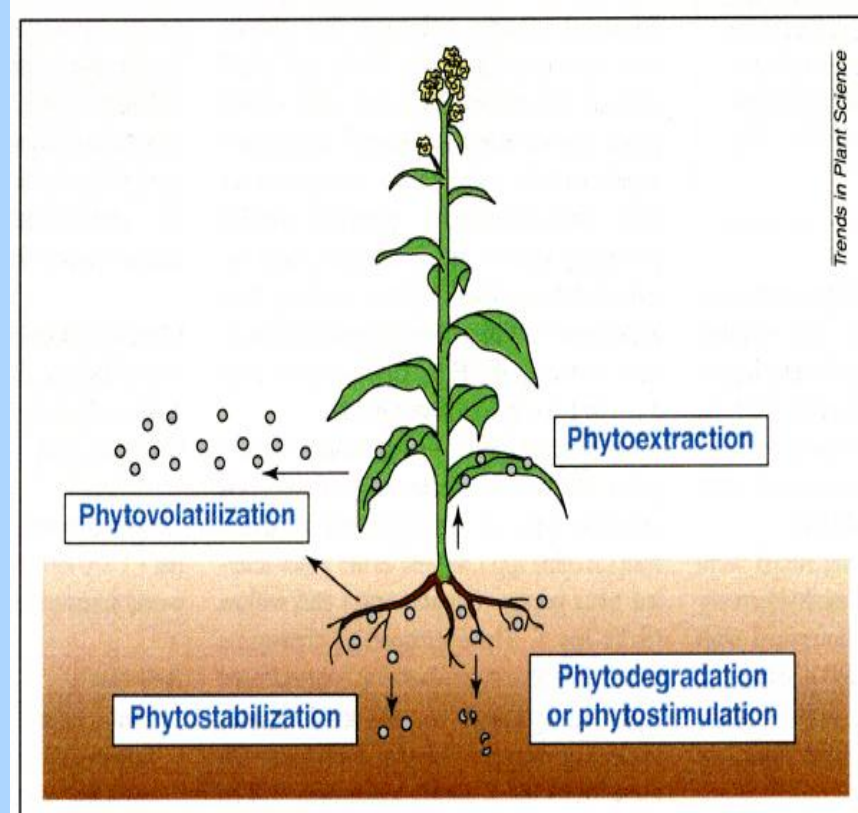
Quindi tra questi va ad inserirsi un sistema del tutto naturale per fare risanamento dei suoli e delle acque.... La PHYTOREMEDIATION!!!

VANTAGGI

- COSTI BASSI
- MANTENIMENTO DELLE PROPRIETA' NATURALI DEI TERRENI
- GENERAZIONE DI RESIDUI VEGETALI RICCHI IN METALLI DA POTER ESSERE RICICLATI
- SFRUTTA L'ENERGIA DEL SOLE COME MOTORE DEL RISANAMENTO

Tra le diverse tecnologie della Phytoremediation troviamo:

- Fitostabilizzazione
- Fitovolatilizzazione
- Fitofiltrazione
- Fitodegradazione
- **Fitoestrazione**



Cos'è la Phytoremediation?

La Phytoremediation è una tecnica per il risanamento dei terreni o delle acque inquinate tramite l'utilizzo di piante che riescono ad assorbire grandi quantità di agenti tossici (ad es. metalli pesanti) attraverso l'apparato radicale per poi trasportarli efficacemente attraverso lo xilema fino agli apparati fogliari dove vengono stoccati.

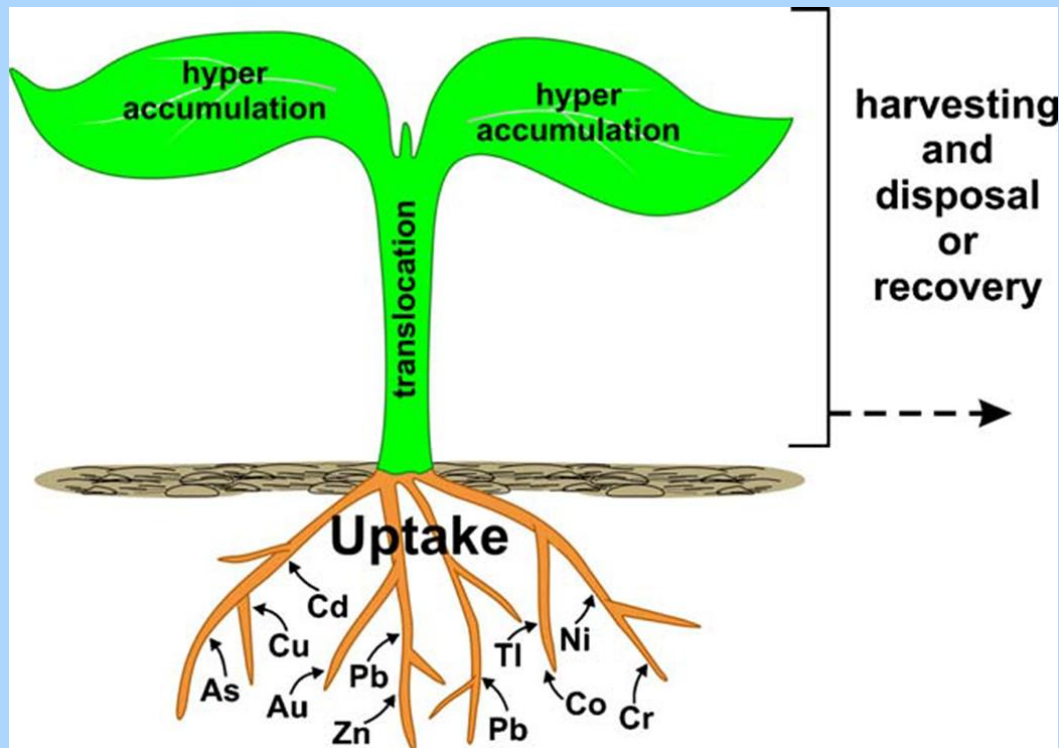
Allora tutte le piante potrebbero essere usate per decontaminare i suoli contaminati ?

La risposta è **NO**

Ci sono solo alcune piante che hanno la capacità di assorbire e immagazzinare grandi quantità di metalli pesanti senza risentire troppo della loro tossicità e sono chiamate piante IPERACCUMULATRICI.

Cos'è la Fitoestrazione?

La fitoestrazione è quella strategia usata dalle piante per assorbire i contaminanti dal suolo o dalle acque attraverso le radici per poi traslocarle rapidamente nel fusto o negli organi fogliari in modo da rimuovere i contaminanti e promuovere la pulizia dei suoli o delle acque inquinate.



Quindi ci si è focalizzati su come migliorare l'assorbimento dei metalli dal suolo attraverso le radici, e per farlo bisogna rendere i metalli più bio-accessibili all'apparato radicale delle piante.

Però prima vediamo quali sono le caratteristiche del suolo che influiscono maggiormente nella bio-accessibilità dei metalli alle piante:

- Capacità di assorbimento del terreno
- Il contenuto di metalli pesanti
- La capacità di scambio cationico
- **Il pH del suolo**
- Il contenuto di materia organica

Generalmente, infatti, la maggior parte dei metalli presenti in un suolo contaminato è già complessato con le particelle del suolo, che rende meno accessibili questi metalli, a causa della capacità di scambio cationico che ha il suolo, e a causa dell'alta affinità di legame dei cationi che ne diminuisce la solubilità e il movimento, utili per migliorare l'assorbimento.

pH del suolo

Il pH del suolo, infatti, influenza direttamente la mobilità dei metalli nel terreno e quindi il loro assorbimento da parte delle piante.

Le piante assorbono i metalli nella loro forma ionica in soluzione, e questa è influenzata dal pH.

Bassi valori di pH nel terreno aumentano la concentrazione dei metalli in soluzione, ma ne riducono l'assorbimento.

Nel suolo, le concentrazioni delle soluzioni di metalli contaminanti aumentano al diminuire del pH del terreno, a causa dello spostamento degli ioni metallici dai siti scambiabili sulla superficie solida, aumentando così l'attività degli ioni idrogeno che porta alla diminuzione del pH.

Tutto questo porta ad un aumento della solubilità dei metalli alle piante!!!

Cosa fare per migliorare l'accessibilità dei metalli contaminanti alle piante?

Come abbiamo già visto acidificare il terreno può aiutare ad aumentare la solubilità dei metalli, ma per migliorare l'*uptake* bisogna che questi vengano legati a qualcosa che ne migliori l'assorbimento.

Con l'uso dei **CHELANTI SINTETICI** si è notato un pronunciato rilascio dei metalli nei suoli e quindi un aumento del potenziale di assorbimento delle radici (compromettendo però la crescita della pianta in quanto aumenta la quantità di composti tossici che vengono assorbiti dalle radici).

Chelanti sintetici

Vari tipi di chelanti:

- EDTA (Acido EtilenDiaminaTetracetico)
- DTPA (Acido DietileneTriaminaPentacetico)
- CDTA
- EGTA
- EDDHA

Tra tutti questi il più conosciuto e diffuso è l'EDTA, il quale è già stato usato in altri esperimenti di fitoestrazione con risultati soddisfacenti .

SVANTAGGI:

- Possibile contaminazione da EDTA delle falde acquifere
- Possibile contaminazione della popolazione microbica presente nel terreno trattato
- Elevati costi

Come si può sostituire l'uso dei
chelanti sintetici per evitare che ciò
che uso per risanare sia fonte di
maggiore inquinamento???



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere



The improved phytoextraction of lead (Pb) and the growth of maize (*Zea mays* L.): the role of plant growth regulators (GA₃ and IAA) and EDTA alone and in combinations

Fazal Hadi^{a,b,*}, Asghari Bano^a, Michael P. Fuller^b

Breve descrizione dei attori in gioco:

- Zea mays L.cv. Pioneer-33556
- EDTA
- GA₃ : classificato tra le gibberelline, è nota la sua funzione di fitormone in grado di influenzare anche a basse concentrazioni i livelli di crescita e sviluppo della pianta
- IAA : prima molecola tra la famiglie delle Auxine ad essere scoperta, e coinvolta in molti processi di sviluppo e crescita come l'assorbimento o la produzione di soluti osmotici, il mantenimento della struttura della parete cellulare

Scopo dell'esperimento

Investigare che ruolo hanno i due fattori regolatori della crescita, l'acido gibberellico (GA_3) e l'acido indol-3-acetico (IAA), e il chelante sintetico EDTA, presi da soli e in combinazione, nel:

- Migliorare la crescita e la produzione di biomassa della pianta in terreni contaminati da piombo (Pb)
- Aumentare l'accumulo di Pb nella pianta
- Migliorare la fitoestrazione della pianta

Materiali e metodi



- Terreno: argilla, sabbia e humus in rapporto 2:1:1 e poi fatto seccare al sole e contaminato artificialmente con 800 mg Kg^{-1} di piombo nitrato ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) corrispondenti a 500 mg Kg^{-1} di Pb nel terreno.
- *Zea mays L.*: sono stati seminati 10 semi per *pot* e dopo germinazione si sono scelti i 3 più sani e si sono eradicati gli altri. L'esperimento è stato condotto con 8 trattamenti diversi ognuno dei quali ha usato 3 *pots*. Le piante poi sono state raccolte al 60° giorno di trattamenti. Le radici lavate con una soluzione 5 mM Tris HCl pH 6.0 e 5 mM EDTA, per eliminare ioni metallici legati alla superficie .

- GA_3 e IAA : per entrambe si è usata una soluzione stock da 0.1 M ottenuta sciogliendo i composti in 100 μ L di etanolo al 95% e portando a volume con acqua distillata. Si è ottenuta poi una soluzione 10^{-6} M alla quale è stata aggiunto un 3% (v/ v) di surfactante non ionico, l'Agral. Sono stati usati 2 sistemi di applicazione: 1) 12h in ammollo nella soluzione prima della semina 2) con lo spray sulle foglie ad intervalli di 15 gg a partire dal 15° giorno (usato anche per i trattamenti misti con l'EDTA).
- EDTA : 2 sistemi di applicazione. 1) singola dose di 400 mg Kg^{-1} 2) quattro dosi da 100 mg Kg^{-1} l'una con un intervallo di 7 gg a partire dal 25° giorno
- Analisi dei tessuti: si sono essiccati radici, germogli e foglie (biomassa) e macinati fino alla polvere sciolti in una soluzione acida lavati filtrati e analizzati tramite assorbimento atomico.

Prime osservazioni

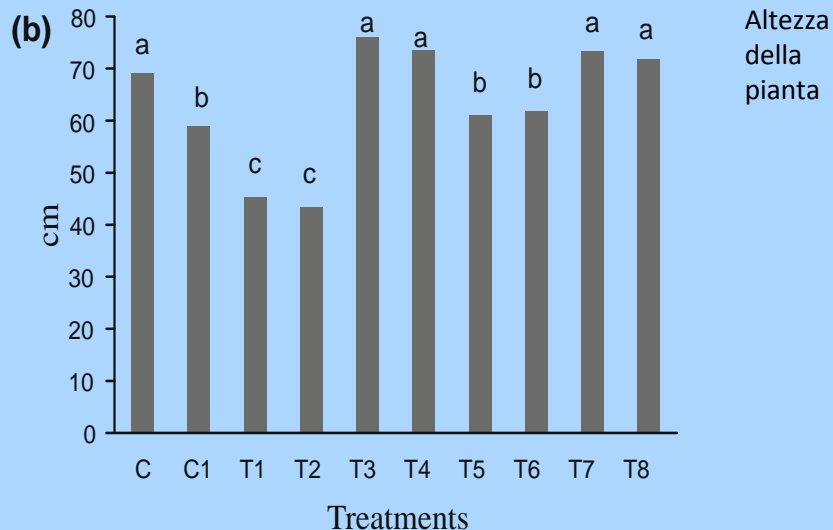
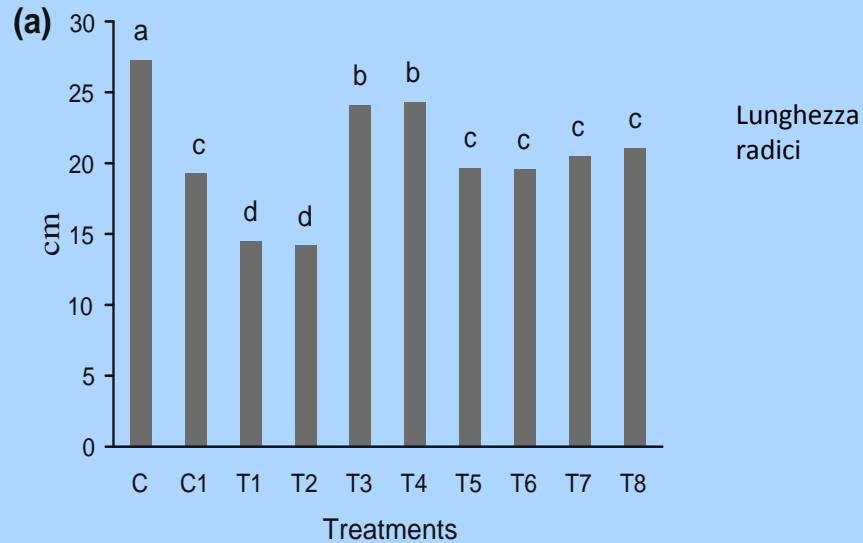
Il Piombo si è dimostrato non diminuire la germinazione dei semi di mais e i giovani germogli non mostravano nessun effetto tossico.

Però il Pb ha un effetto negativo sulla crescita delle radici della pianta, infatti si può notare una netta diminuzione sulla lunghezza delle radici:



con conseguente diminuzione dell'area di assorbimento delle radici e diminuzione dell'assorbimento di nutrienti e dei materiali tossici.

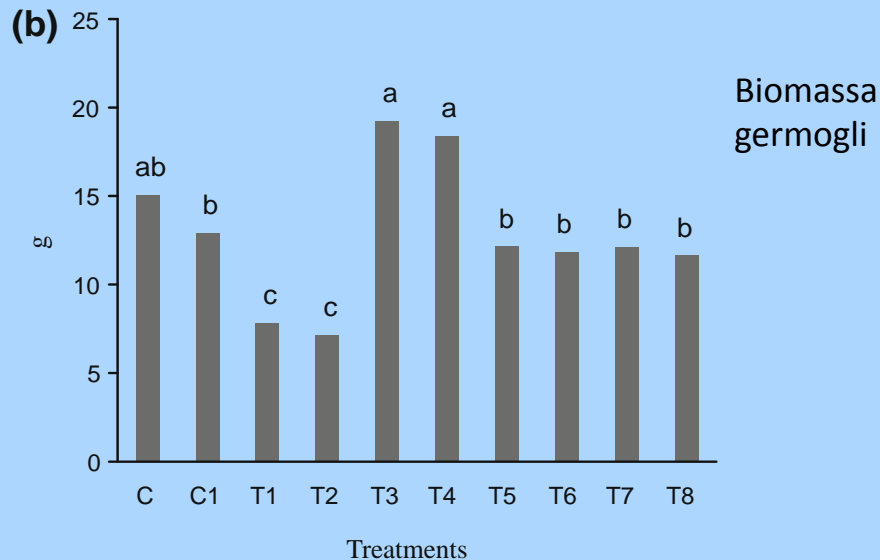
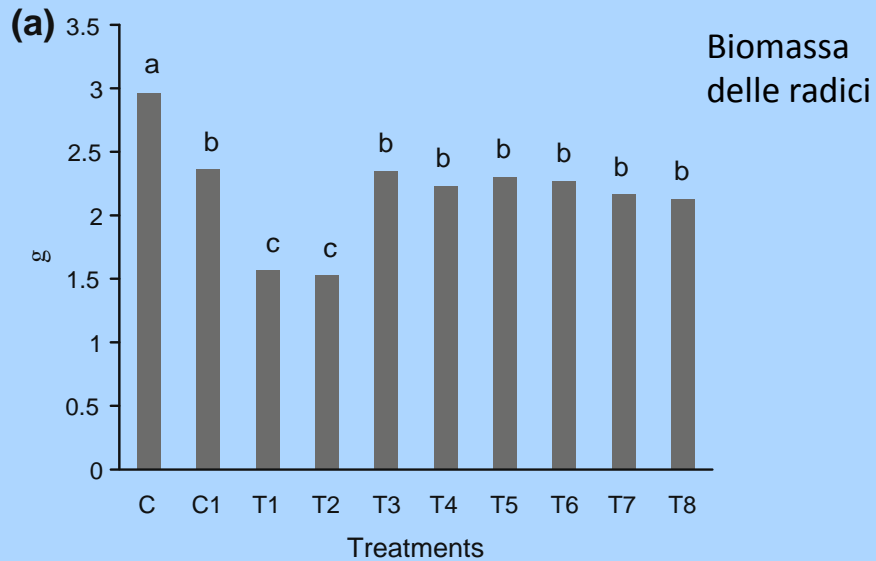
Effetti sulla crescita



EDTA riduce la lunghezza delle radici e l'altezza della pianta, mentre GA_3 e IAA aumentano la lunghezza delle radici e l'altezza della pianta, perché aumenta l'area di assorbimento nella zona delle radici.

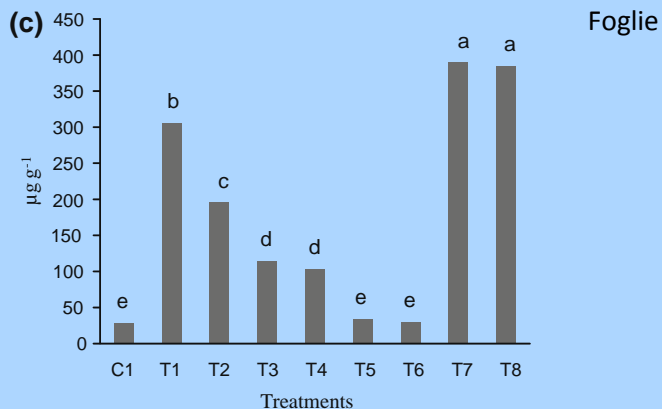
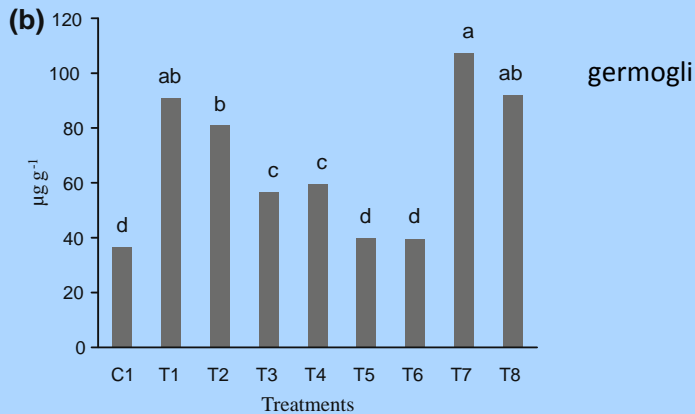
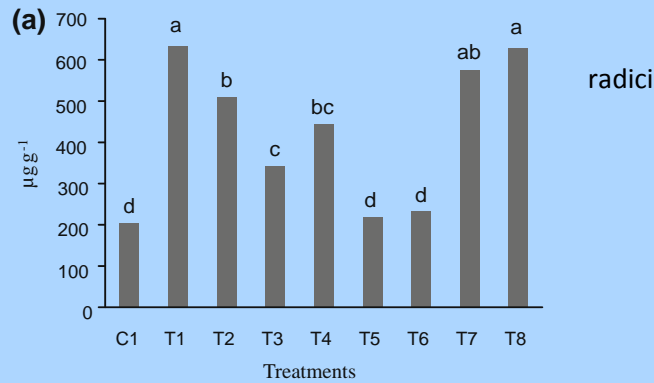
Fig. 1. Effect of different treatments on plant growth. (a) Root length, (b) plant height. Different letters indicate significantly different values (Tukey's honestly significant difference test at $p \leq 0.05$). Control without Pb (C), with Pb only (C1), EDTA split doses + Pb (T1), EDTA single dose + Pb (T2), GA_3 (FS) + Pb (T3), and IAA (FS) + Pb (T4), GA_3 (SS) + Pb (T5), IAA (SS) + Pb (T6), GA_3 (FS) + EDTA + Pb (T7), and IAA (FS) + EDTA + Pb (T8). FS (foliar spray), and SS (

Effetti sulla biomassa



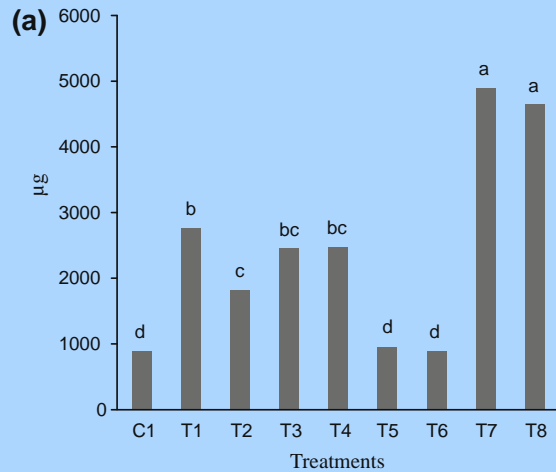
Anche qui l'EDTA riduce la produzione di biomassa sia nelle radici che nei germogli, probabilmente per l'aumentata mobilità dei metalli nei suoli. Invece le GA₃ e IAA promuovono lo sviluppo soprattutto dei germogli, probabilmente a causa della stimolazione alla divisione cellulare e all'aumento della resistenza agli stress indotti dall'uso di questi regolatori della crescita

Effetti sull'accumulo di Pb



Si osserva che l'accumulo del Pb nei germogli e nelle foglie è elevato probabilmente perché legato all'aumentato indice di traspirazione dovuto all'uso di regolatori della crescita endogeni che permettono una maggiore traslocazione dei nutrienti e anche dei metalli.

Accumulo e distribuzione del Pb nell'intera pianta



L'EDTA in combinazione con GA_3 e IAA mostra un significativo aumento dell'accumulo di Pb da parte della pianta con una rispettiva alta percentuale di traslocazione nei germogli. Quindi l'EDTA facilita l'assorbimento dei metalli e la loro traslocazione, mentre GA_3 e IAA aumentano l'indice di crescita, di biomassa prodotta, di traspirazione e anche la resistenza agli stress, equilibrando i danni che l'EDTA provoca alla crescita e allo sviluppo delle piante.

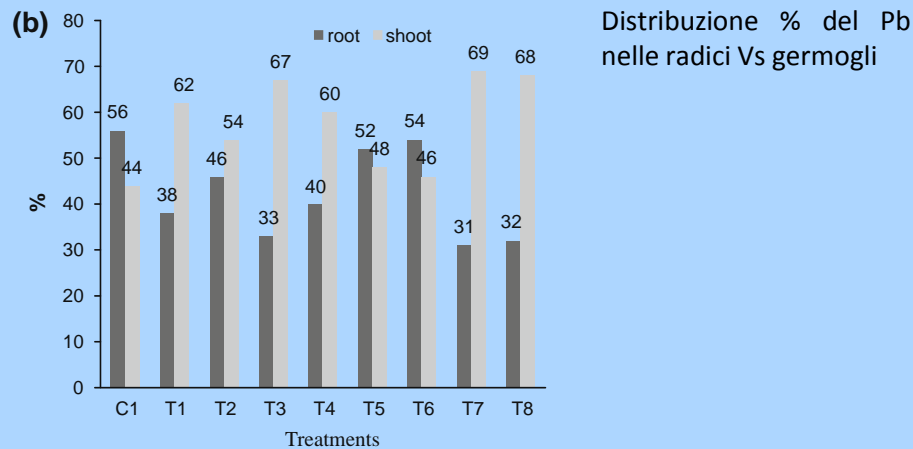


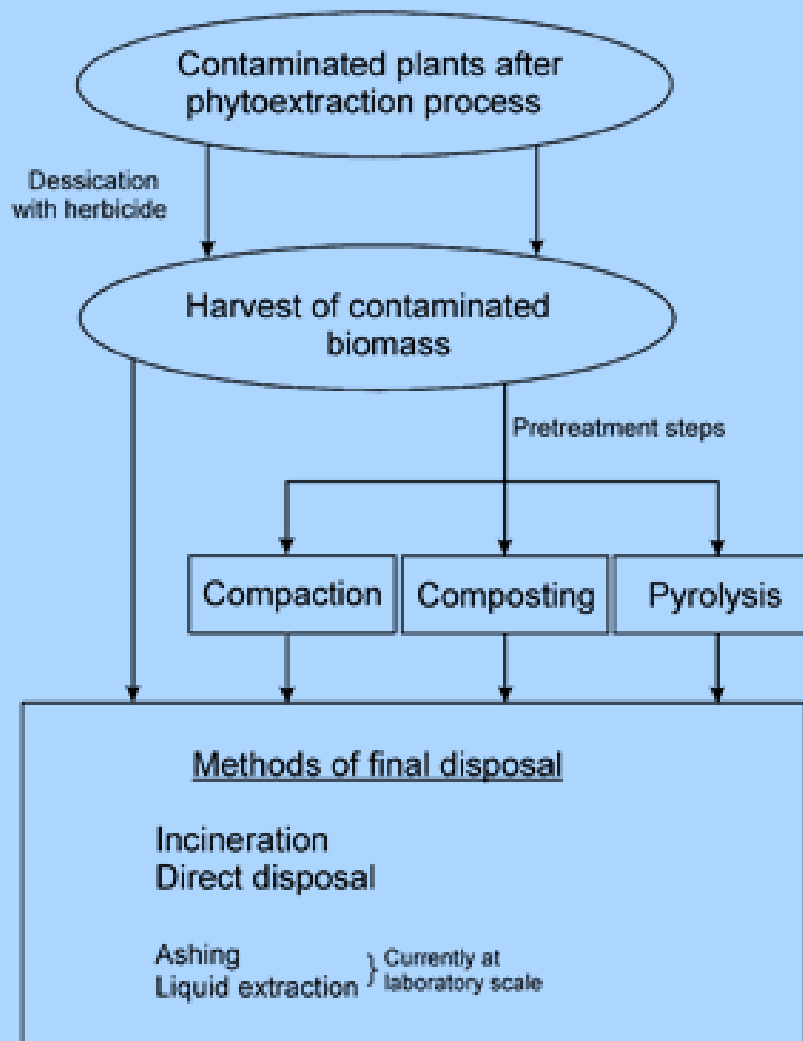
Fig. 5. Accumulation and distribution of Pb in entire plant. (a) Total Pb accumulation in entire plant, (b) percent (%) distribution of total Pb in roots vs. shoot. Different letters indicate significantly different values (Tukey's honestly significant difference test at $p < 0.05$).

conclusioni

1. L'aumento dell'accumulo di Pb associato all'aumento della biomassa secca è attribuibile ai trattamenti che usano le GA₃ e IAA somministrate attraverso lo spray fogliare.
2. L'EDTA aumenta l'indice di traslocazione nei germogli, ma provoca diminuzioni importanti sulla quantità di biomassa prodotta e conseguentemente riduce anche la fitoaccumulazione totale del Pb.
3. Però l'EDTA in combinazione con GA₃ o IAA aumentano l'accumulo di Pb, e GA₃ si è osservato avere un ruolo migliore nella traslocazione del Pb.

In conclusione si suggerisce di investigare più approfonditamente sul possibile impiego di soluzioni di Acido Gibberellico in associazione con basse concentrazioni di EDTA (per limitarne la possibile tossicità per le falde acquifere).

Cosa fare di tutta la biomassa ottenuta?



Pre-trattamenti

- Compostaggio: la biomassa disintegrata (particelle < 0,16 cm) viene messa in bottiglie di boro-silicato in continua aereazione per 2 mesi. Perdita di peso secco del 25%.
- Compattazione: la biomassa viene compattata attraverso l'uso di una pressa.
- Pirolisi: si decompone la biomassa prodotta in condizioni anaerobiche e a temperature moderate (400-800 C°). I prodotti finali sono gas pirolitici che vengono raccolti, in quanto il procedimento avviene in ambiente ermetico senza nessun rilascio nell'atmosfera, e carbone.

Table 1
Comparison of pretreatment methods

Process	Costs of transportation ^a in situ—no costs (E/t/km)	Costs of site preparation (E/m ²)	Costs of leachate utilization (E/t)	Costs of processing (E/t)	Advantages	Disadvantages
Composting	1–2	3–5	–	10–25	Volume and water content reduction	Time consuming (2–3 month). Special equipment is required. End-product as hazardous waste
Compaction	1–2	3–5	135	Not available	Volume reduction Recovery of metals	Special equipment is required. End-products as hazardous waste (remaining biomass, leachates)
Pyrolysis	1–2	–	–	20–30	Significant volume reduction. Useful end-product (pyrolytic gas)	End-product as hazardous waste (coke breeze)

^a Dump truck for hazardous wastes.

Tecniche di smaltimento

- Incenerimento: la biomassa prodotta viene incenerita in fonderie di piombo e zinco; il processo elimina tutta la materia organica e lascia intatti i metalli sotto forma di ossidi, per un'eventuale riciclo dei metalli stessi. I metalli finiscono poi nelle scorie della fonderia. Riduce fino al 90% il peso secco della biomassa prodotta.
- Diretto smaltimento in siti appositi per rifiuti tossici.
- *Ashing*: si usa una combustione assistita per rendere la biomassa in polvere. Riduzione della biomassa fino al 90%
- Estrazione liquida: si tratta la biomassa prodotta con degli agenti chelanti (es. EDTA) e con un ambiente acido (pH 4.5) in modo da riuscire ad estrarre i metalli pesanti dalla biomassa.

Table 2
Comparison of methods of contaminated crop disposal

Process	Costs of transportation ^a (E/t/km)	Costs of processing (E/t)	Advantages	Disadvantages
Incineration	1-2	180-220	Recovery of metals? Significant reduction of biomass	None
Direct disposal at a hazardous waste site	1-2	135-1136	Time effectiveness	High costs. Limitation of dumping sites. Trend towards incineration. Slow reduction of contaminated biomass
Ashing	1-2	Not available	Recovery of metals. Significant reduction of biomass	No technology
Liquid extraction	1-2	Not available	Recovery of metals	No technology

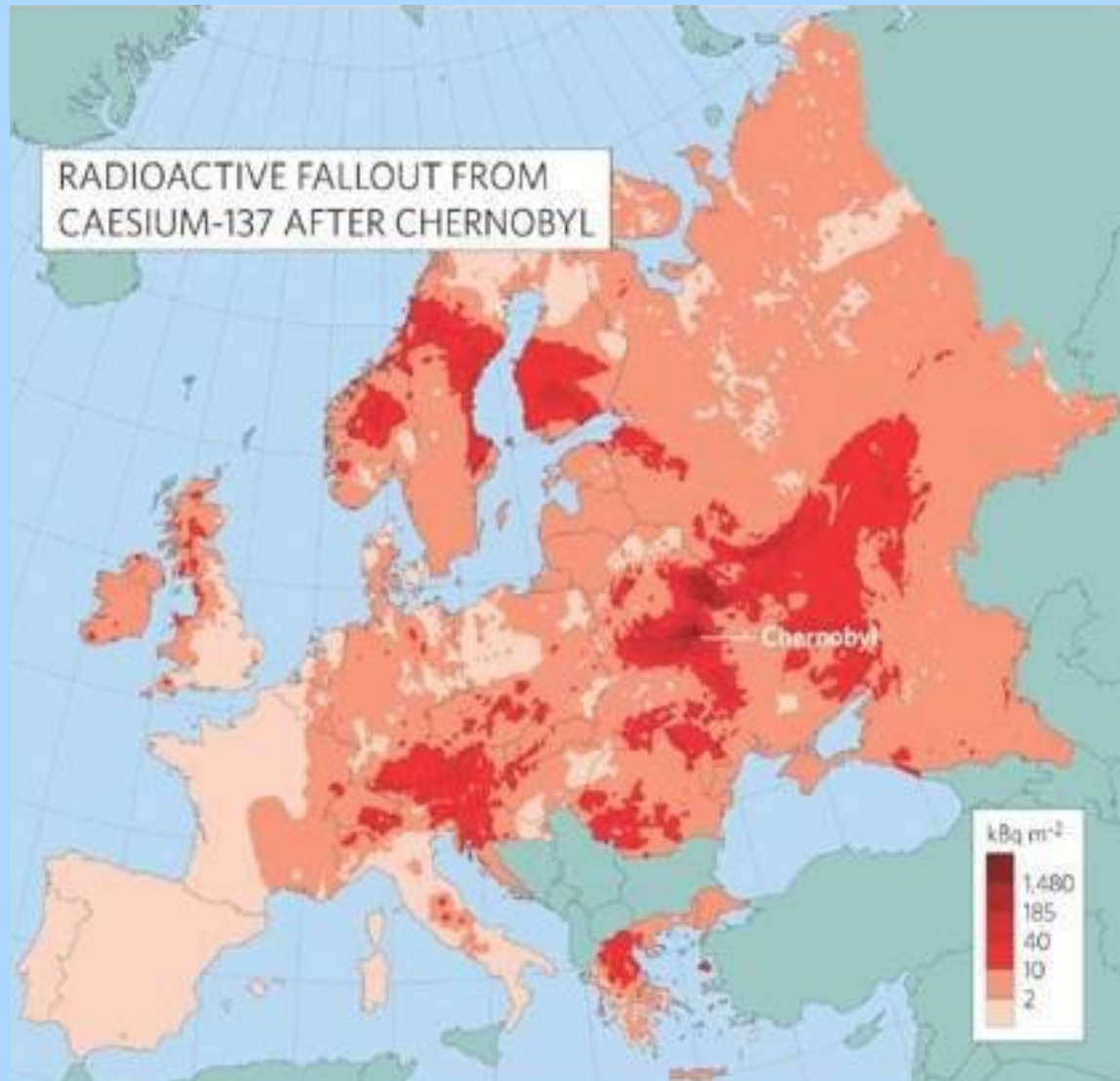
^a Dump truck for hazardous wastes

Phytoremediation:

**Effetti e ruolo delle micorrize
nell'assorbimento e accumulo di radiocesio
nelle piante**

Introduzione

- La disponibilità dei radionuclidi agli organismi terrestri e acquatici è dovuta ai collaudi degli armamenti nucleari, agli incidenti nucleari (Černobyl Černobyl' 26/04/1986; Fukushima Daiichi, 11/03/2011) e alla produzione di energia
- $\text{Cs}^{134/137}$ sono radioisotopi che emettono onde β/γ
- Il cesio, come il rubidio, ha comportamenti biogeochimici analoghi al potassio
- In Europa sono state verificate alte concentrazioni di radionuclidi, in particolare Cs^{134} e Cs^{137} , nell'Europa orientale e centro-orientale, nelle penisole scandinava e balcanica



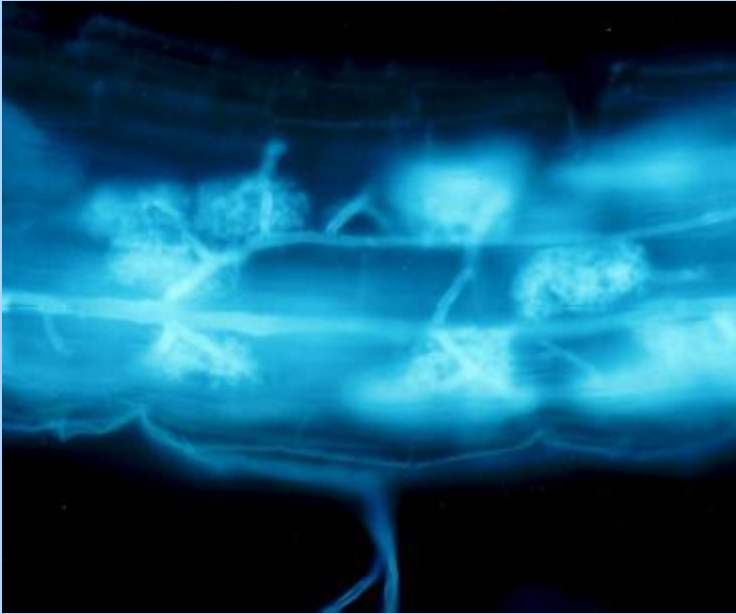
Pulviscolo radioattivo di Cs¹³⁷ in Europa dopo l'incidente nell'impianto nucleare a Černobyl (26-04-1986)

- Le vie di contaminazione dei radionuclidi sono dovute alla scarsa mobilità di questi nel suolo a causa delle caratteristiche chimico-fisiche del terreno

- Dato il pericolo ambientale e per la salute umana sono state disposte risorse e mezzi per il biorisanamento delle aree contaminate (es. progetto europeo MYRRH -“Use of mycorrhizal fungi for the phytostabilisation of radio-contaminated environments”)

Classificazione delle micorrize

- **Ectomicorrize**
- **Endomicorrize delle *Ericales***
- **Endomicorrize vescicolo-arbuscolari**
- **Endomicorrize delle Orchidee**
- **Ectoendomicorrize delle *Ericales***
- **Ectoendomicorrize delle *Pinaceae***



Arbuscoli e miceli di *Glomus coronatum*
Glomeromycota – VA funghi



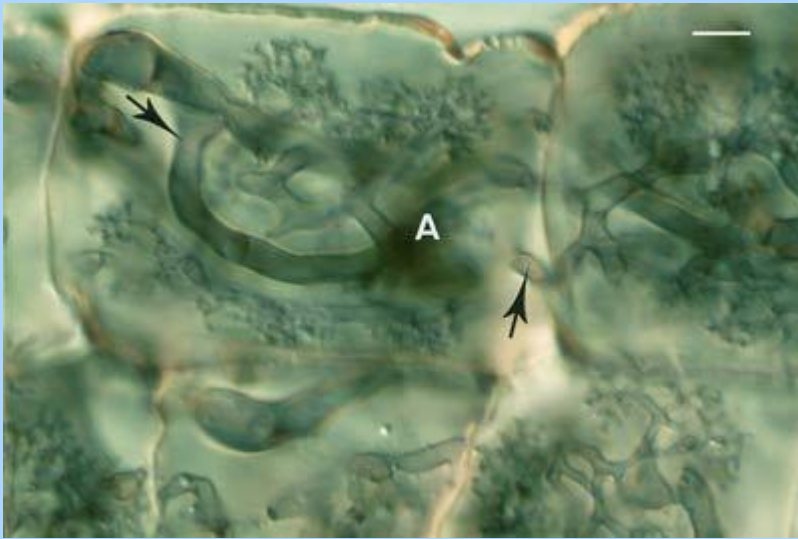
Carpoforo di *Amanita muscaria*
Basidiomycota



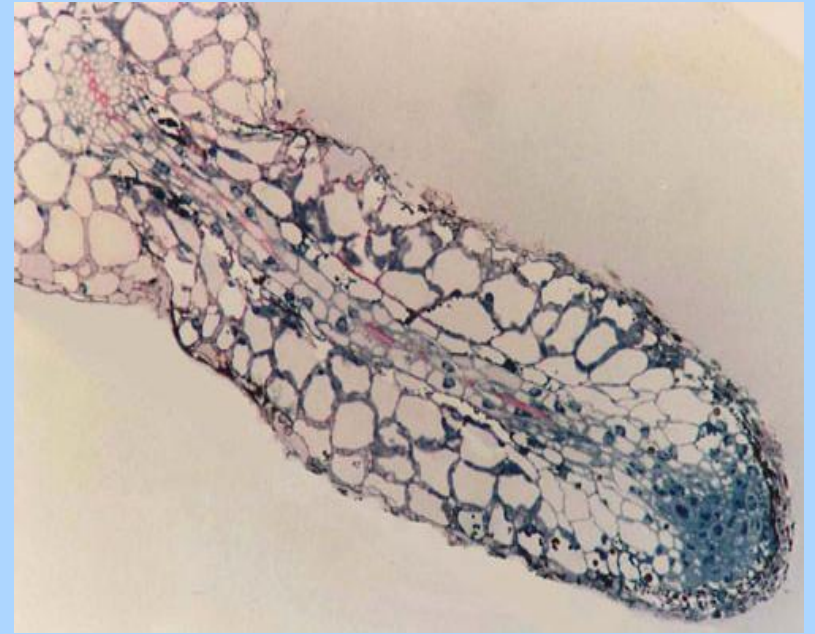
Carpoforo di *Boletus edulis*
Basidiomycota



Corpo fruttifero (peridio e gleba) do *Tuber magnatum*
Ascomycota



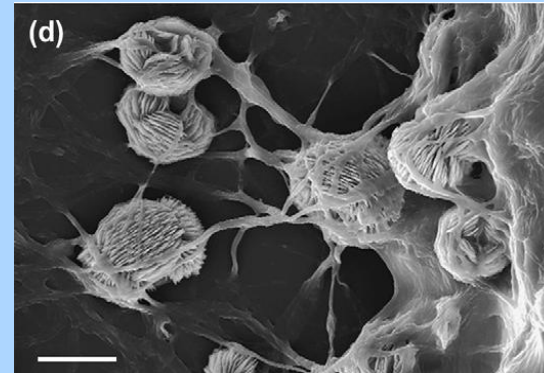
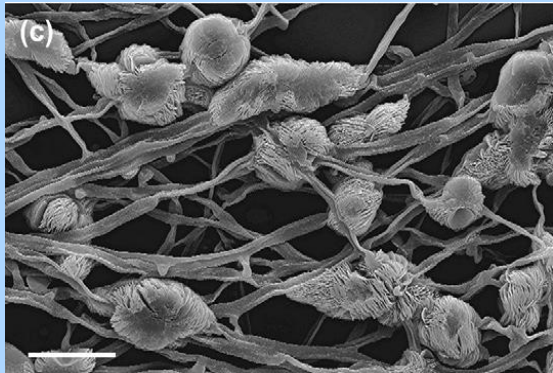
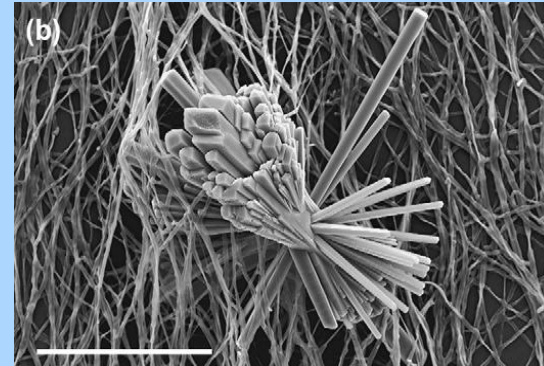
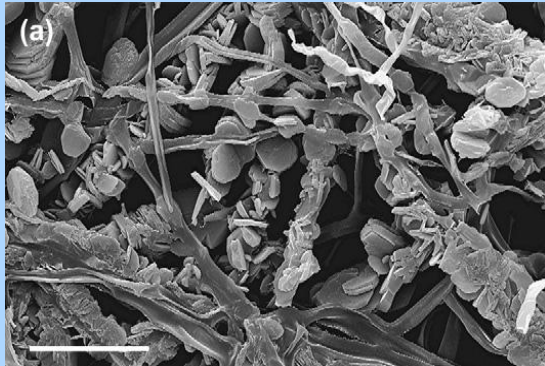
Arbuscoli di *Asarum canadense*
Glomeromycota



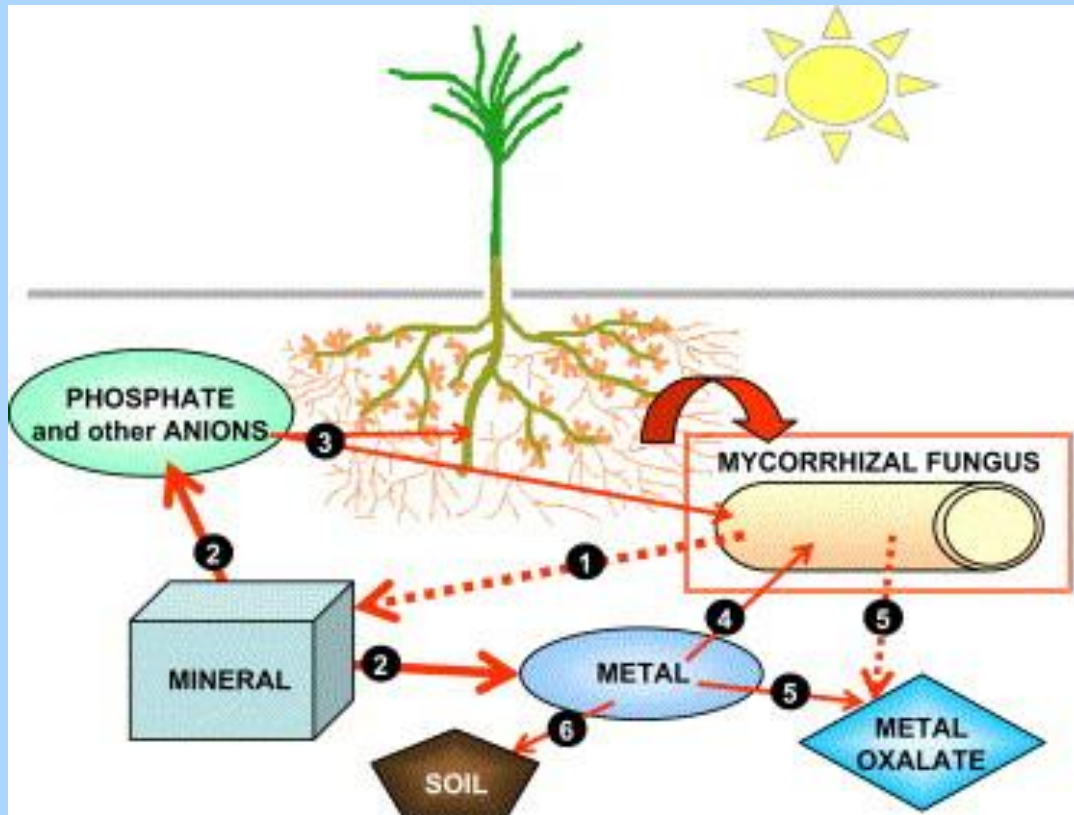
Reticolo di Hartig
Ectomicorrize

Modalità di *bioremediation* delle micorrize

- Bioadsorbimento e stabilizzazione nel terreno
 - Accumulo intracellulare
- Cristallizzazione e inattivazione dei radionuclidi
 - Fitoestrazione



Mycogenic oxalates. (A) Magnesium oxalate dihydrate ($\text{MgC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, glushinskite) and hydromagnesite [$\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] precipitated on *Penicillium simplicissimum*; (B) strontium oxalate hydrate ($\text{SrC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $\text{SrC}_2\text{O}_4 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$) on *Serpula himantoides*; (C) calcium oxalate monohydrate (whewellite) and calcium oxalate dihydrate (weddellite) on *S. himantoides*; and (D) copper oxalate hydrate [$\text{CuC}_2\text{O}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n < 1$), moolooite] precipitation on *Beauveria caledonica*



Simple biogeochemical model for metal mineral transformations in the mycorrhizosphere (the role of the plant and other microorganisms contributing to the overall process is not shown). (1) Proton-promoted (proton pump, cation–anion antiport, organic anion efflux, dissociation of organic acids) and ligand-promoted (organic acids) dissolution of metal minerals; (2) release of anionic (e.g. phosphate) nutrients and metal cations; (3) nutrient uptake; (4) intra and extracellular sequestration of toxic metals: biosorption, transport, compartmentation, precipitation, etc; (5) immobilization of metals as oxalates; (6) binding of soluble metal species to soil constituents, e.g. clay minerals, metal oxides, humic substances

Condizioni per la fitoestrazione con VAM

- Tipo di suolo
- pH del suolo
- Concentrazioni di K e P
- Divisione/classe di VAM
- Specie di pianta

Esperimento

Obiettivo: effetti di fosforo e potassio sul trasporto di radiocesio dalle VAM

Organismi studiati: *Medicago truncatula* Jemalong A17 e *Glomus lamellosum*

Condizioni: crescita di entrambi gli organismi *in vitro* in ambienti separati e comunicanti compartimenti (compartimento delle ife, HC, e delle radici, RC), in HC sono state introdotte concentrazioni di 0, 1, 10 mM di K, 30, 3000 μM di P e 1531 +/- 150 $\text{Bq ml}^{-1}\text{CsNO}_3$; sei repliche per ciascun esperimento

Durata: 12 settimane

Metodi statistici: ANOVA ad una via e a due vie per confrontare le variabili di pianta e VAM, e comparare gli effetti delle diverse dosi di K e P

Risultati:

Table 2

Influence of different P and K addition levels on radiocesium partitioning (total Bq/AM-P in vitro culture system) and root/shoot ratio

Addition levels in HC		Root	Shoot	Medium and fungal biomass in RC	Fungal biomass in HC	Medium in HC	Root/shoot ratio
P (μ M)	K (mM)						
30	0	2996 \pm 209 ^a	381 \pm 45	137 \pm 53	16 \pm 5	4173 \pm 261	7.8 \pm 1.4
	1	2317 \pm 410	245 \pm 73	374 \pm 139	21 \pm 6	4834 \pm 502	9.8 \pm 1.1
	10	1471 \pm 197	145 \pm 25	369 \pm 145	17 \pm 6	5400 \pm 393	10.1 \pm 1.1
3000	0	3624 \pm 368	707 \pm 101	199 \pm 32	79 \pm 16	3068 \pm 451	5.1 \pm 0.7
	1	3183 \pm 320	517 \pm 92	132 \pm 29	39 \pm 9	3961 \pm 424	6.2 \pm 1.1
	10	2407 \pm 185	427 \pm 93	241 \pm 44	18 \pm 7	4419 \pm 328	5.7 \pm 1.3
<i>Significance^b of</i>							
Phosphorus (P)		<0.001 ^c	<0.001	<0.001	<0.001	<0.01	<0.001
Potassium (K)		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	NS
P \times K		<0.001	<0.05	<0.001	<0.001	NS	NS

NS: not significant.

^a Values correspond to the means \pm the standard errors (SE) of six replicates.

^b By analysis of variance.

^c P value obtained by the analysis of variance.

A prescindere dalle concentrazioni di K 37 \pm 2.6% e 50 \pm 2.9% del Cs posto in HCs assorbito da VAMs, rispettivamente alle concentrazioni di 30 to 3000 mM P; nelle piante sono state rilevate 33 \pm 3.2% and 47 \pm 3.2% del Cs somministrato rispettivamente alle stesse concentrazioni di P, pari alle 88 \pm 3.5% e 94 \pm 0.6% del Cs assorbito dalle VAM

Indipendentemente dalle concentrazioni di P, furono assorbiti i 53 +/- 3.8%, 44 +/- 4.0% and 34 +/- 3.4% di Cs¹³⁴ da VAM rispettivamente alle concentrazioni di 0, 1, 10 mM di K

La 90 +/- 0.9% Cs fu immobilizzata nelle radici di *M. truncatula* alla concentrazione di 30 mM P, laddove il valore fu di 84 +/- 1.3% a 3000 mM di P

L'effetto combinato di K e P non diede evidenze significative che questi due nutrienti fossero influenti positivamente per il miglioramento dell'assorbimento del radiocesio

I rapporti tra le concentrazioni di Cs¹³⁴ nelle radici e nell'apparato epigeo delle piante non variano alle differenti concentrazioni di K

Gli effetti di K e P sono antagonisti

Table 3

Influence of different P and K addition levels on the activity concentration (Bq mg^{-1} FW) of different plant parts and the root/shoot ratio

Addition levels in HC		Root	Shoot	Root/shoot ratio
P (μM)	K (mM)			
30	0	2.4 ± 0.2^a	0.8 ± 0.2	3.1 ± 0.6
	1	2.0 ± 0.4	0.6 ± 0.2	3.1 ± 0.7
	10	1.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	4.2 ± 1.1
3000	0	3.0 ± 0.6	1.5 ± 0.5	2.0 ± 0.6
	1	2.4 ± 0.3	1.1 ± 0.2	2.2 ± 0.5
	10	1.9 ± 0.3	0.7 ± 0.1	2.9 ± 0.7
Significance ^b of				
Phosphorus (P)		$<0.001^c$	<0.001	NS
Potassium (K)		<0.001	<0.001	NS
P \times K		<0.05	<0.001	NS

NS: not significant.

^a Values correspond to the means \pm the standard errors (SE) of six replicates.

^b By analysis of variance.

^c P value obtained by the analysis of variance.

La diminuzione della concentrazione di Cs nella pianta intera è stata del 18% a 1 mM e del 43% a 10 mM di K

Discussioni e conclusioni

- Effetti opposti di K E P
- Il caricamento xilematico sembra essere dipeso da VAM
- Si ipotizza che i trasportatori e i canali di K e P siano simili tra le piante maggiormente studiate e VAM (trasportatori simporto K-PO₄)
- È necessario uno studio in campo con caratterizzazione degli ecotipi di VAM e piante coltivate per quanto riguarda resistenza ai radionuclidi e trasporto di questi
- È necessaria la caratterizzazione dei suoli
- È necessario lo studio dell'espressione dei trasportatori

Limiti del metodo sperimentale

- VAM sono biotrofi obbligati
- Le interazioni dei metalli con il suolo sono variabili e analogamente le dinamiche di interazione VAM-pianta
- La concentrazione massima alla quale K influisce maggiormente è 1 mM, pertanto sono necessari studi in un intervallo tra 0 e 1 mM di K
- Le concentrazioni di P variano da 1 a 2 μM nel suolo
- Per valutare il ruolo preciso dei trasportatori è necessario mantenere le concentrazioni costanti di K e Cs
- Limiti dei mezzi strumentali

References

- Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation - Geoffrey M. Gadd
- Role and influence of mycorrhizal fungi on radiocesium accumulation by plants - H. Dupre´ de Boulois, E.J. Joner, C. Leyval, I. Jakobsen, B.D. Chen, P. Roos, Y. Thiry, G. Rufyikiri, B. Delvaux, S. Declerck
- Miglioramento del suolo e biostabilizzazione di metalli pesanti mediati da glomalina - Stefano Bedinia, Elisa Pellegrinob, Emanuele Argesea, Manuela Giovannetti
- Fungi and ionizing radiation from radionuclides - John Dighton, Tatyana Tugay, Nelli Zhdanova
- Availability of radiocesium in plant from soil: facts mechanisms and modelling – N.V. Goncharova
- Nickel-tolerant *Brevibacillus brevis* and arbuscular mycorrhizal fungus can reduce metal acquisition and nickel toxicity effects in plant growing in nickel supplemented soil - A. Vivasa, B. Biro´ , T. Ne´meth, J.M. Barea, R. Azco´n
- Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and the expression of K⁺/Cs⁺ transporters on the accumulation of caesium by plants - Lea Wiesel
- Effect of potassium and phosphorus on the transport of radiocesium by arbuscular mycorrhizal fungi - Veronika Gyuricza, Herve´ Dupre´ de Boulois, Ste´phane Declerck
- Microbiologia Ambientale - Biavati Bruno e Sorlini Claudia
- Botanica generale e diversità vegetale – Pasqua Gabriella, Abbate giovanna, Forni Cinzia

Phytoremediation: Identificazione dei geni coinvolti nell'accumulo di metalli pesanti



Hyperaccumulators

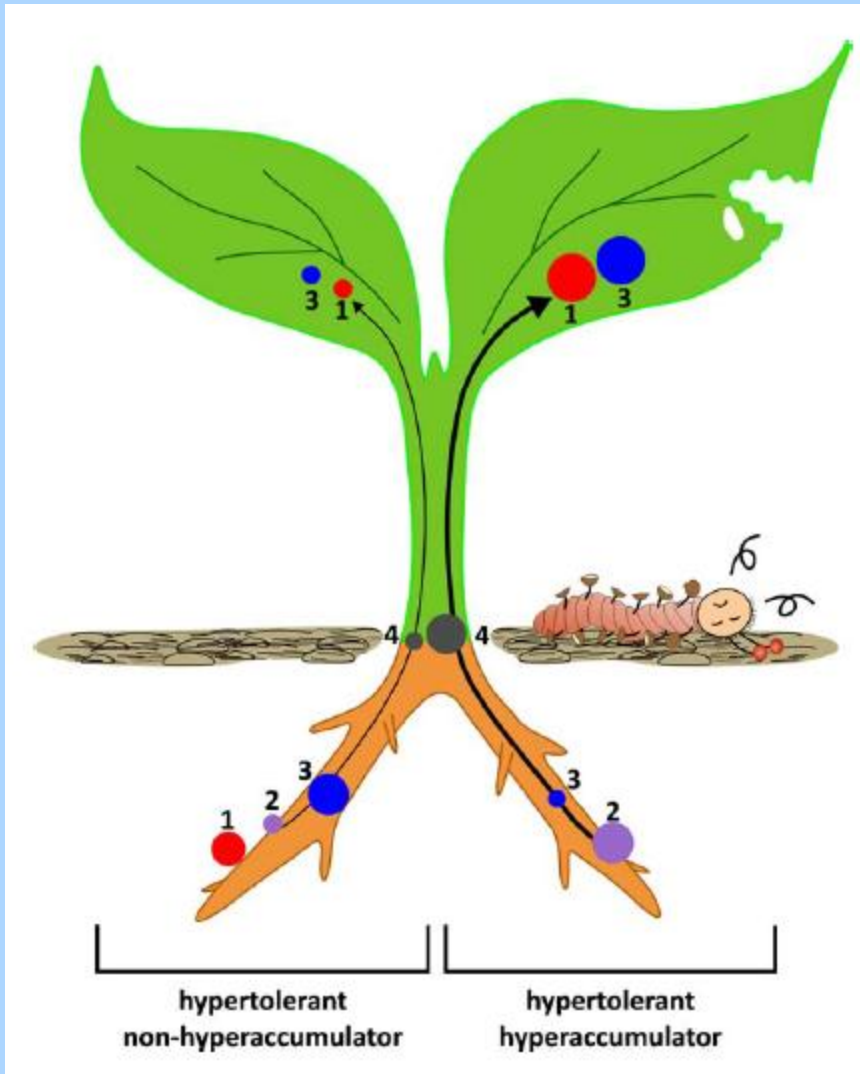
➤ Con il termine “hyperaccumulators” definiamo un ampio gruppo di specie vegetali che, pur appartenendo a famiglie distanti dal punto di vista evolutivo, sono in grado di:

- crescere su suoli metalliferi (calamina, serpentino)
- accumulare quantità straordinarie di metalli pesanti nei loro organi superiori senza subire effetti tossici.

Tali specie possiedono, con differenze sensibili da caso a caso:

1. Velocità di *uptake* del metallo pesante maggiore
 2. Sistema di traslocazione xilematica coinvolto nel trasporto
 3. Caratteristica di sequestrare metalli pesanti nelle foglie per la loro detossificazione.
- Queste proprietà sono fondate anche sull'espressione differenziale di alcuni geni presenti sia nelle piante accumulatrici che in quelle non-accumulatrici.

Hyperaccumulators



Le piante accumulatrici hanno sviluppato diverse strategie per ottenere micronutrienti sia essenziali come Co, Zn, Fe, Cu, Ni, Mo, Mn, che non-essenziali come As, Cd, Hg, Pb e Se, prevenendone la tossicità.

Essendo organismi multicellulari, hanno adottato un *uptake* e un efflusso a livello cellulare coordinato con le necessità della pianta di mantenere l'omeostasi degli ioni metallici.

I proteomi che comprendono i trasportatori metallici si differenziano nelle specificità di substrato, nei *pattern* di espressione, nella localizzazione cellulare, per coordinare a seconda dei casi la traslocazione del metallo attraverso la pianta.

Hyperaccumulators

Sono state identificate 450 specie circa definibili come iperaccumulatrici di metalli pesanti (0,2 % delle specie conosciute). In alcuni casi però c'è un'asimmetria tra campioni prelevati e ottenuti in condizioni controllate sperimentalmente.

Rientrano nella categoria di piante iperaccumulatrici le specie vegetali che, crescendo sul suolo nativo e senza subire alcun effetto tossico, concentrano una quantità:

- ✓ > 10 mg/g di Mn o Zn
- ✓ > 1 mg/g di As, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Se o Tl

Più del 75% dei *taxa* finora studiati può accumulare Ni, mentre pochissime specie mostrano tolleranza ed accumulo di Cd, il composto n.7 nella “Top 20 List” stilata dalla **Agency for Toxic Substances and Disease Registry**.

Accumulatori **Ni**: famiglia *Brassicaceae*, in particolare i generi *Thlaspi* e *Alyssum*.

Accumulatori **Zn**: *Arabidopsis halleri*, *Sedum alfredii*, genere *Thlaspi*.

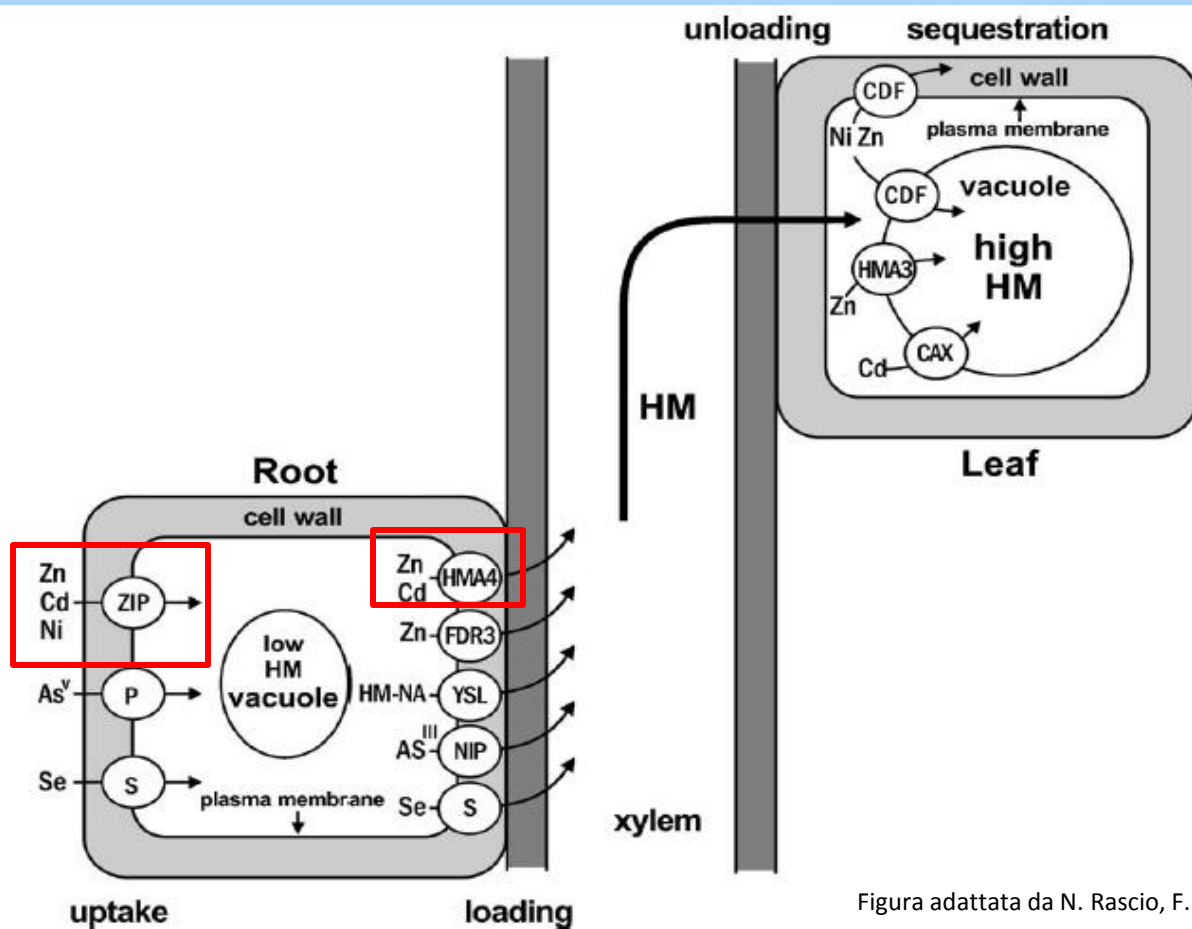
Accumulatori **Se**: famiglia *Fabaceae*, *Asteraceae*, *Rubiaceae*, *Brassicaceae*, *Scrophulariaceae* ...

Accumulatori **Cd**: *A. halleri*, *S. alfredii*, *Thlaspi caerulescens*, *Thlaspi praecox*, *Solanum nigrum*.

Accumulatori **As**: alcune Angiosperme, come *Isatis cappadocica* e *Hesperis persica*, alcune felci del genere *Pteris*.

Sistemi di trasporto sovraespressi alla base della fitoaccumulazione

Progressi significativi nella comprensione dei meccanismi alla base dell'iperaccumulo di metalli pesanti sono stati compiuti mediante studi comparativi fisiologici, genomici e proteomici tra *hyperaccumulators* e *non-hyperaccumulators*. Le due specie ormai considerate come specie modello per questi studi sono *T.caerulescens* e *A.halleri*.

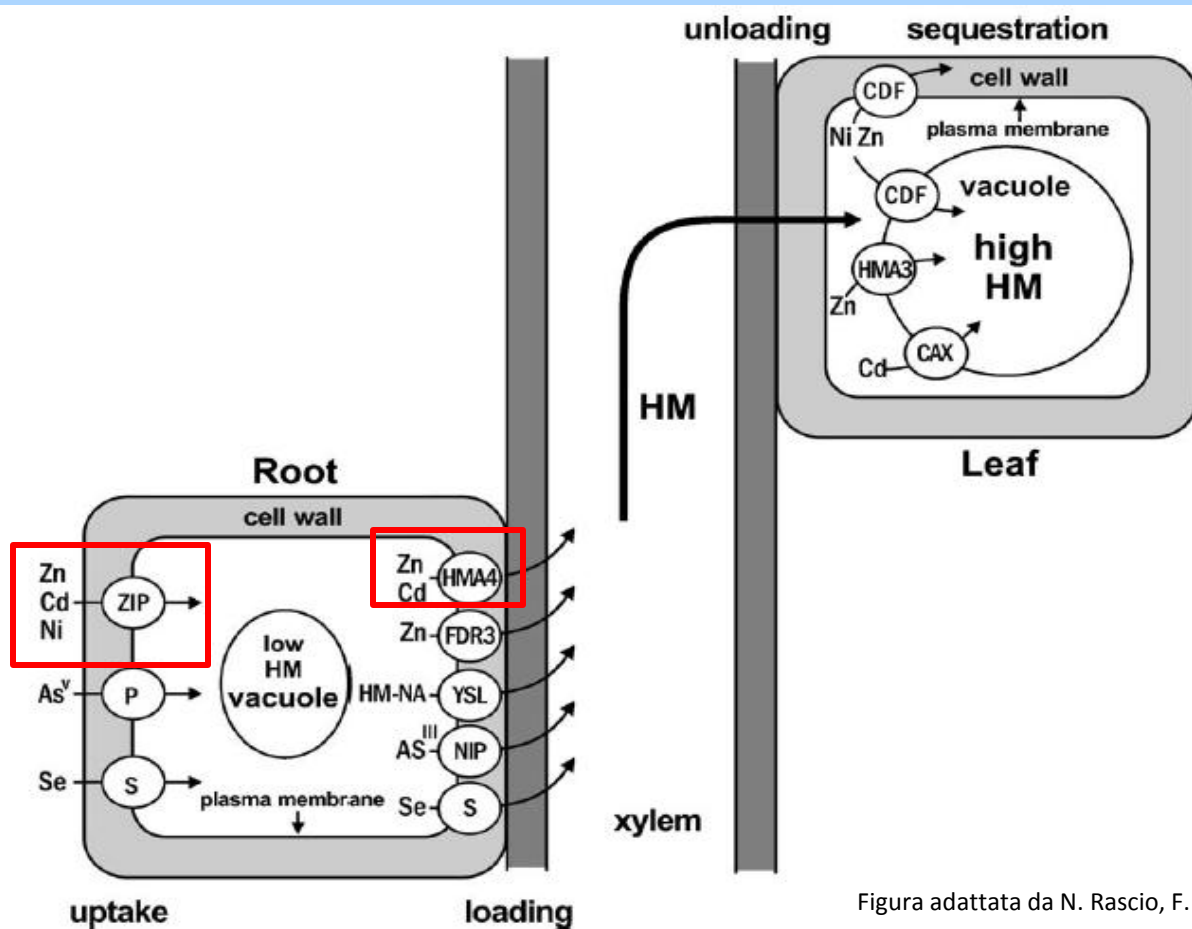


ZIP genes: codificano per trasportatori cationici di membrana (Zinc-regulated transporter Iron-regulated transporter Proteins). La loro espressione nelle piante accumulatrici persiste anche con elevate quantità di Zn nel terreno. Dimostrata una correlazione tra *uptake* di Cd e Zn in *A.halleri*, in parte smentita da uno studio su *T.caerulescens*.

Sistemi di trasporto **fosfato/arsenato** permettono alle felci di estrarre As.

Sistemi di trasporto sovraespressi alla base della fitoaccumulazione

La possibilità di trasportare i metalli pesanti in modo rapido ed efficiente ai germogli attraverso lo xilema deriva da un ridotto sequestro a livello delle radici in favore di un efflusso in uscita dai vacuoli. Questo efflusso sembra essere permesso da caratteristiche particolari del tonoplasto della cellula della radice.



In *T. caerulescens* e *S. alfredii* la quantità di Zn presente nei vacuoli delle cellule radicali e l'efflusso in uscita da queste è risp. tre volte minore e almeno due volte maggiore rispetto a piante non accumulatrici.

Acidi organici come malati e citrati svolgono una funzione chelante a pH acido (nel vacuolo).

Sistemi di trasporto sovraespressi alla base della fitoaccumulazione

Un ruolo chiave nell'iperaccumulo sembra essere rivestito dagli aa liberi, come l'istidina e la nicotinammina, che formano complessi stabili con cationi bivalenti.

In un Ni *hyperaccumulator*, *Alyssum lesbiacum*, il gene *TP-PRT1* che codifica per l'enzima ATP-fosforibosil transferasi presente nel primo step del pathway biosintetico di His, è

sovraespresso in modo costitutivo. Il *pool* maggiore di His facilita così il caricamento xilematico del complesso **Ni-His**.

I geni che codificano per il pathway biosintetico della nicotinammina sono overespressi nelle radici di *T.caerulescens* e *A.halleri* con una quantità di aa prodotto pari a 3-4 volte quella di una pianta non-accumulatrice.

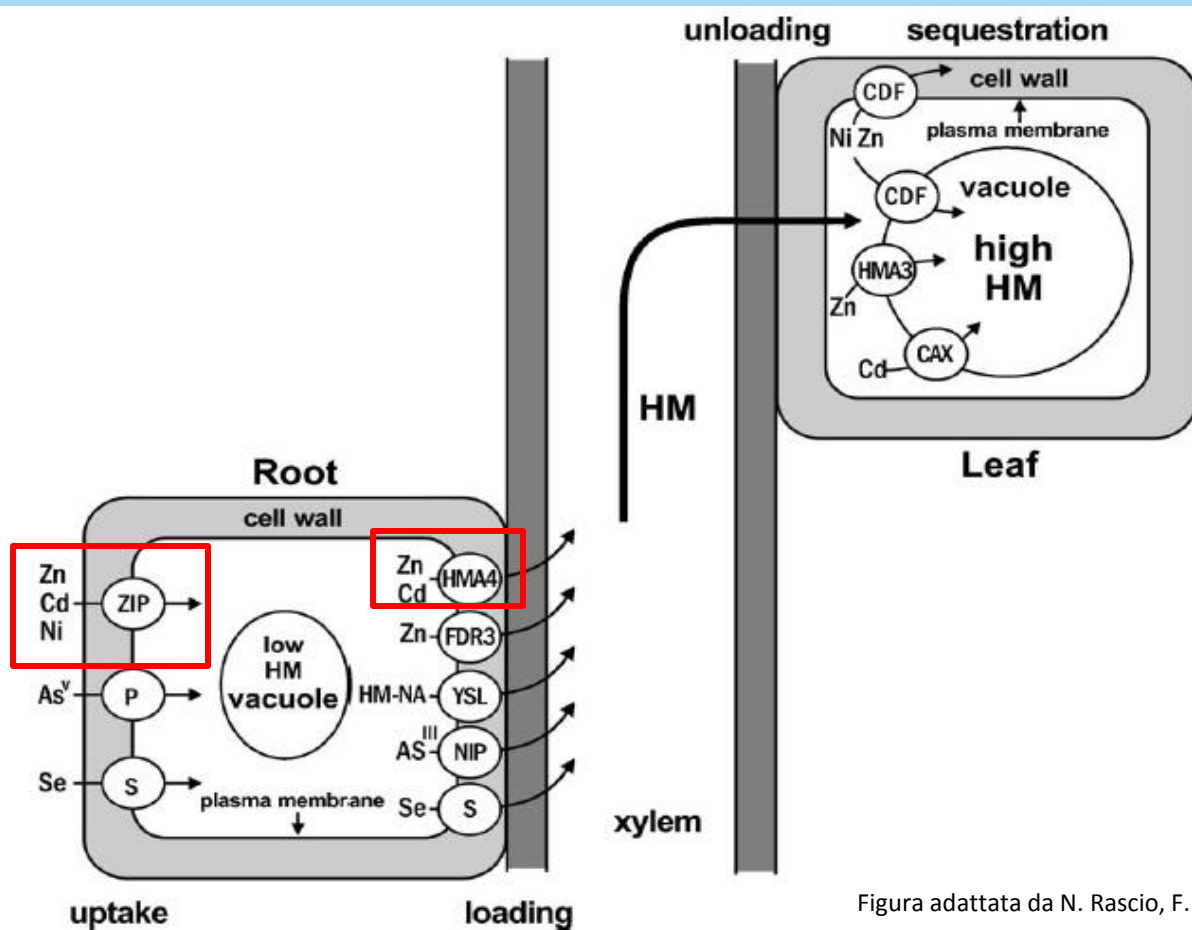
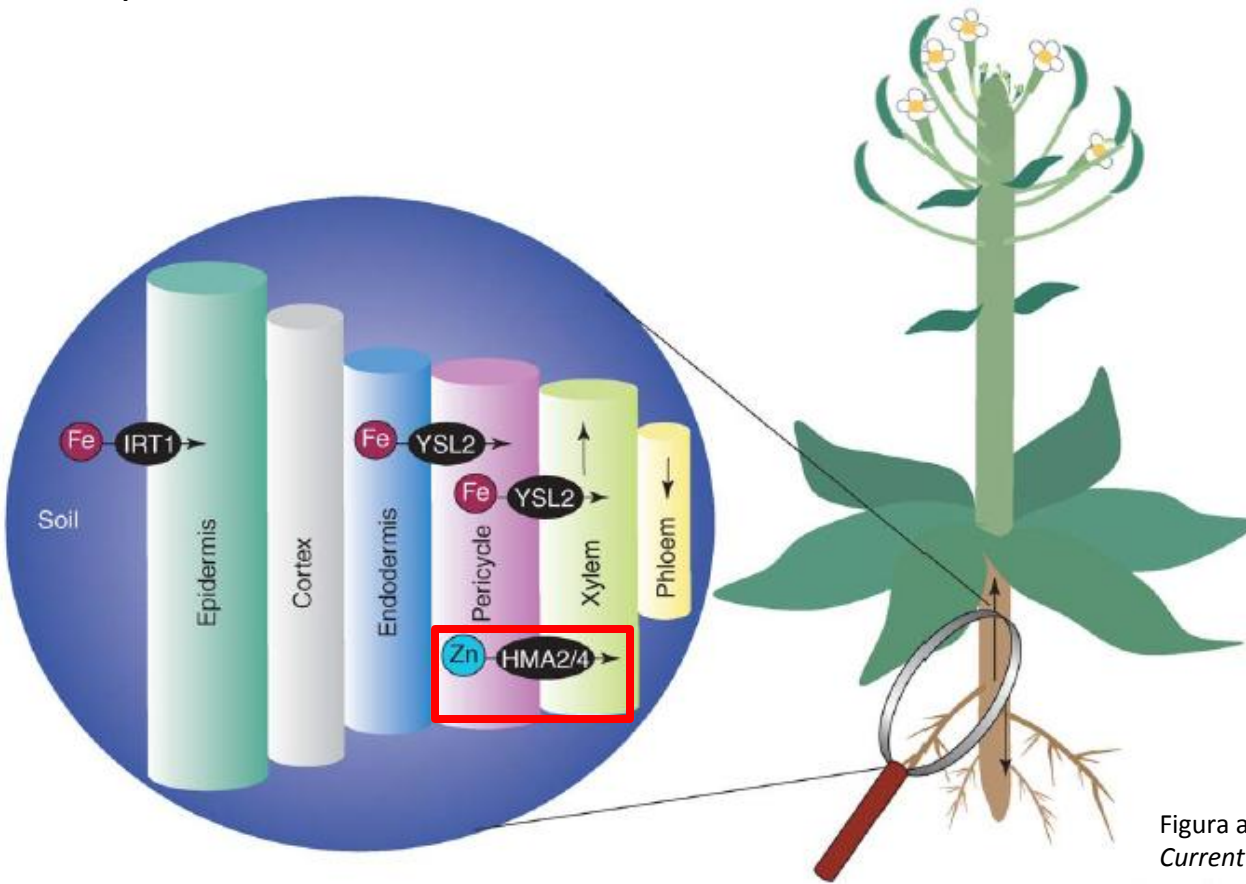


Figura adattata da N. Rascio, F. Navari-Izzo, *Plant Science* 180 (2011), 172

Sistemi di trasporto sovraespressi alla base della fitoaccumulazione

Numerosi studi hanno dimostrato l'importanza particolare di una classe di proteine, dette **ATPasi di tipo P_{1B} o HMA** (Heavy Metal transporting ATPases) nel trasporto, nell'omostasi e nella tolleranza al metallo pesante. Geni che codificano per trasportatori di cationi bivalenti che appartengono alla classe delle HMA sono overespressi nelle radici e nei germogli degli iperaccumulatori di Zn/Cd *T. caerulescens* e *A. halleri*.

Il gene *HMA4* è sovraespresso se queste specie sono esposte a livelli alti di Cd e Zn, mentre è downregolato in piante non-hyper. Hma4 è localizzata a livello della membrana plasmatica del parenchima xilematico e favorisce l'efflusso dei metalli nello xilema.



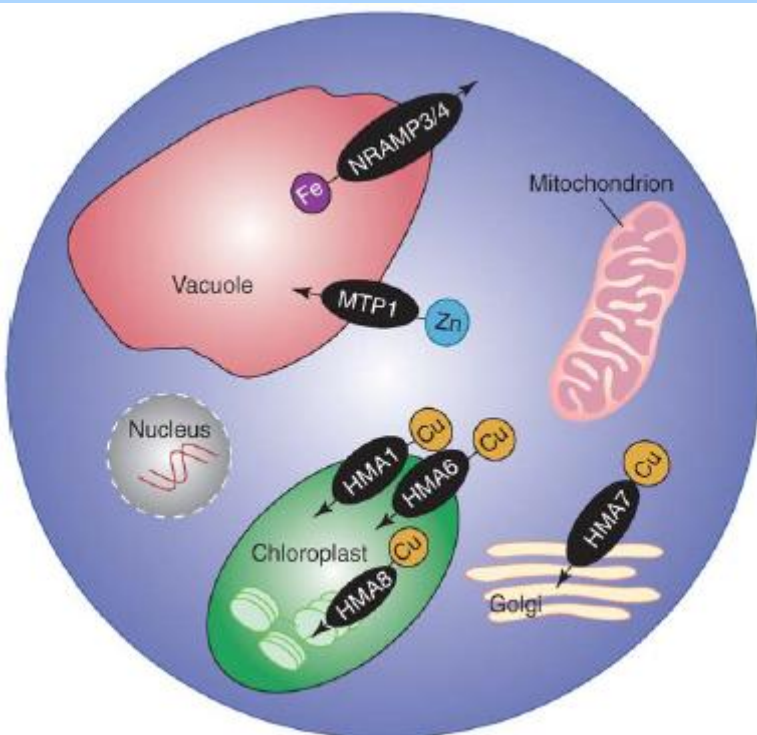
Si è osservato anche un effetto positivo nei confronti di altri geni coinvolti nell'accumulo da parte di *HMA4*, infatti, una sua aumentata espressione induce l'espressione di geni ZIP.

Si sta ancora dibattendo se il trasporto via xilema dei metalli pesanti avviene in forma ionica libera o in complessi con gli acidi organici.

Zn, Cd: cationi idratati

Ni: complesso con citrato

P_{1B}-ATPasi



Le ATPasi di tipo P_{1B} impiegano l'energia risultante dall'idrolisi dell'ATP per traslocare cationi attraverso le membrane biologiche. Le principali caratteristiche strutturali di questi enzimi consistono in:

- otto domini transmembrana putativi
- un motivo CPx che si pensa coinvolto nella traslocaz.
- un dominio di legame per i metalli putativo in posizione N- o C-terminale che lo distingue dalle altre ATPasi di tipo P.

In *A. thaliana* sono presenti otto HMA: HMA1-4 per il trasporto di cationi divalenti Zn/Cd/Pb/Co e HMA5-8 codificano per trasportatori dei cationi monovalenti Cu/Ag.

Figura adattata da P.Colangelo, M.L. Guerinot, *Current Opinion in Plant Biology* 9, 324 (2006)

In base a studi genetici si sono ottenute maggiori informazioni circa la funzione delle HMA nella pianta. Non sono stati osservati fenotipi in crescita in mutanti singoli *hma2*, *hma3* o *hma4*. Il mutante doppio per *hma2* e *hma4* è invece andato incontro a clorosi, ha mostrato difficoltà nella formazione dei semi, ma il recupero del fenotipo è avvenuto con l'aggiunta di alti livelli di Zn (1 o 3mM), non di Co o Cu. Il fenotipo severo del doppio mutante ha quindi evidenziato un difetto specifico nell'omeostasi dello Zn.

Caratterizzazione di una nuova ATPasi trasportatrice di metalli pesanti in *T. caerulescens*

Identification of *Thlaspi caerulescens* Genes That May Be Involved in Heavy Metal Hyperaccumulation and Tolerance. Characterization of a Novel Heavy Metal Transporting ATPase¹

Ashot Papoyan and Leon V. Kochian*

United States Plant, Soil and Nutrition Laboratory, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Cornell University, Ithaca, New York 14853

Plant Physiology, November 2004, Vol. 136, pp. 3814–3823, www.plantphysiol.org © 2004 American Society of Plant Biologists

OBIETTIVI DELL'ESPERIMENTO

- Saggio di complementazione in lievito per scoprire i geni inseriti mediante trasformazione di cDNA di *T.caerulescens* che conferiscono le particolari proprietà di tolleranza e capacità di espellere metalli pesanti nelle cellule di lievito.
- Analisi dell'espressione genica tessuto specifica in *T.caerulescens* ed esperimenti per verificare l'efflusso da parte delle cellule di lievito.

Caratterizzazione di una nuova ATPasi trasportatrice di metalli pesanti in *T. caerulescens*

Breve descrizione delle metodologie utilizzate

- Le piante di *T. caerulescens* sono state coltivate su una soluzione di Johnson modificata con una composizione specifica di macronutrienti (1,2 mM MgSO_4 , 0,8 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,2 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e 0,2 mM MgSO_4) e di micronutrienti (50 μM KCl, 1 μM MnSO_4 , 0,5 μM CuSO_4 , 0,1 μM Na_2MoO_4 , 0,1 μM NiSO_4 , 7,5 μM Fe-EDDHA). Una volta fatti crescere i semi ottenuti dal passaggio precedente in una camera a 20°C (light:dark, 16:8 h) per due settimane, le pianticelle sono state trasferite nuovamente nel Johnson modificato supplementato con conc. specifiche di Zn (0, 1, 5, 100 mM) o di Cd (10 o 100 mM) e raccolte dopo 20 giorni.
- Il ceppo di lievito wild-type DY1457 è stato trasformato sia con il vettore di espressione vuoto pFL61 che con pFL61 contenente il cDNA di *T. caerulescens*. Per testare la tolleranza al metallo pesante da parte del lievito di controllo e *Thlaspi*-transformed si è somministrato CdCl_2 90 μM nel terreno di coltura SD.
- E' stata costruita una libreria con RNA (unito a polyA) estratto dalle radici e dalle foglie di *T.caerulescens*. Il cDNA è stato ligato usando degli adattatori specifici nel plamide di espressione bifunzionale lievito/*E.coli* pFL61. Dopo 3 giorni di trattamento, sono state individuate 35 colonie di lievito in grado di crescere ad alte [Cd]. Estrazione del DNA da ciascuna colonia e sequenziamento.

Risultati screening di complementazione in lievito

Figura adattata da A. Popayan, L. Kochian, Plant Physiology, 136, 3815 (2004)

Table 1. *T. caerulescens* genes that confer Cd tolerance in yeast
All the accession numbers provided are GenBank accession numbers.

Clone	Closest Match and Function	Accession No.	GenBank Hit and % Identity
1	<i>B. juncea</i> metallothionein-like protein	AY486002	Y10849 (82%)
2	<i>Arabidopsis</i> metallothionein	AY486003	L15389 (78%)
3	<i>Arabidopsis</i> integral membrane putative protein	AY486006	NM_118925 (83%)
4	<i>Sinapis alba</i> subunit of oxygen evolving system of PSII	AY486007	Y07498 (85%)
5	<i>Arabidopsis</i> light-regulated kinase	AY486008	Z12120 (93%)
6	<i>Arabidopsis</i> chloroplast inner membrane putative protein	AY486009	NM_116206 (79%)
7	<i>Arabidopsis</i> putative heavy metal P-type ATPase	AY486001	AF412407 (71%)

➤ 7 geni unici rilevati con possibile correlazione con la tolleranza al Cd (7 putativi).

➤ geni dei cloni 1 e 2 mostrano un'elevata similarità con i geni della metallothioneina in *B. juncea*

➤ geni dei cloni 3-6 legati a funzioni non trattate in questo studio

➤ gene dell'ultimo clone è dato da due cDNA parziali di lunghezza diversa (423 e 1152 bp), che hanno una forte similarità con il AtHMA4 (codifica per una HMA in *A. thaliana*).

• si procede con la caratterizzazione dettagliata della **TcHMA4** (RACE-PCR).



Thlaspi caerulescens

Risultati Caratterizzazione TcHMA4

- Allineamenti della sequenza nucleotidica e amminoacidica confermano l'appartenenza alla famiglia delle ATPasi di tipo P, sottofamiglia P_{1B}.

La full-length TcHMA4 ha un ORF di 3561 bp e codifica per un peptide di 1186 aa.

- **TcHMA4 è identica per il 71% a AtHMA4**, contiene molti dei motivi predetti in AtHMA4, tra cui gli otto domini transmembrana, ma soprattutto un'estesa coda C-terminale nel citoplasma che ospita molti domini putativi di legame ai metalli.

- In posizione C-terminale sono presenti 9 His consecutive, 13 coppie di Cys e numerose His singole.

Com'è noto anche per il suo sfruttamento nei metodi di purificazione per affinità delle proteine, i gruppi imidazolici di His e tiolici di Cys formano un legame di coordinazione con ioni metallici quali Cu²⁺, Zn²⁺, Hg²⁺, Cd²⁺, Co²⁺ e Ni²⁺. In base alla loro sequenza amminoacidica predetta, i due cloni parziali di TcHMA4 mancano di ogni dominio per il legame in membrana e sono di dimensioni troppo piccole per fungere da trasportatori. Potrebbero quindi essere dei ligandi del Cd nel citoplasma di lievito.

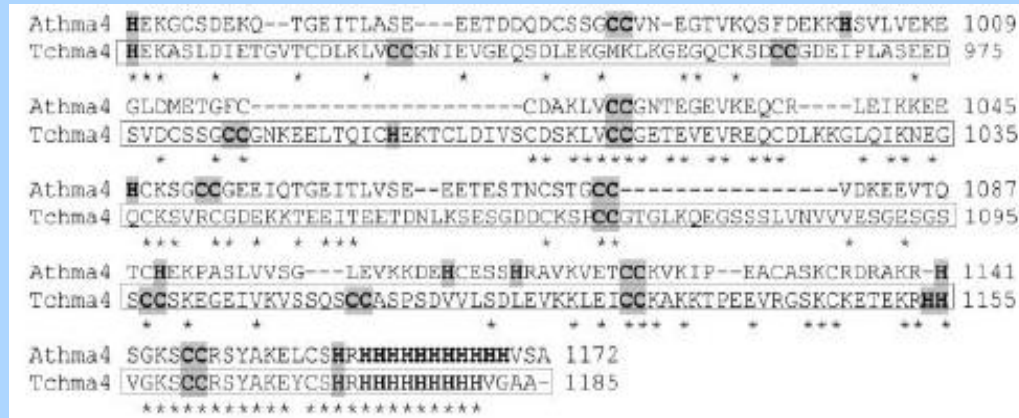
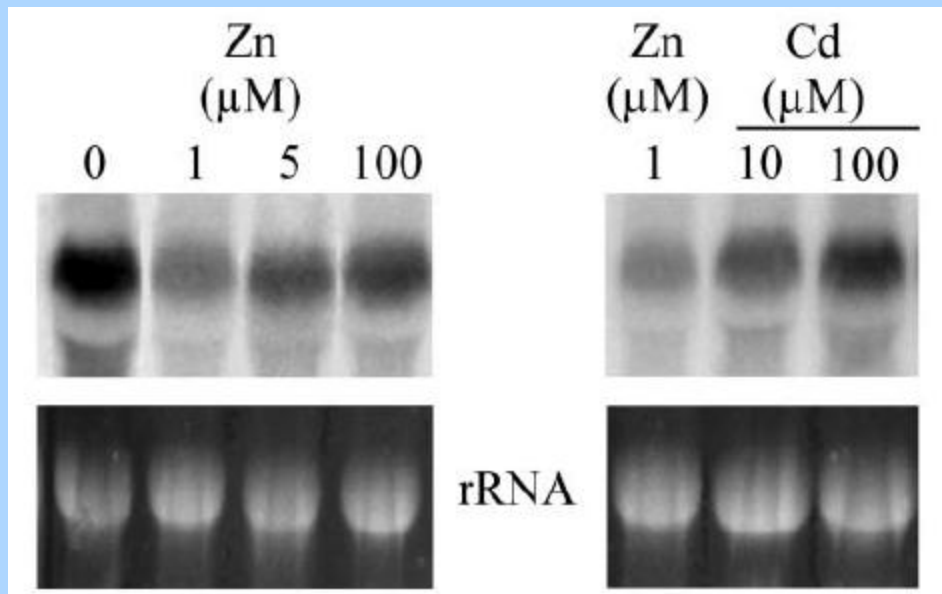


Figura adattata da A. Popayan, L. Kochian, Plant Physiology, 136, 3816 (2004)

Risultati dell'espressione tessuto-specifica di TcHMA4 in T.Caerulescens

- Piante di *T. caerulescens* sono state coltivate in una soluzione nutriente di Johnson modificata. Gli RNA totali sono stati isolati dalle radici e dai germogli, denaturati, separati in gel elettroforesi e poi trasferiti in una membrana di nylon.
- Per il Northern blot è stato scelto un probe di 1500 bp (marcato con [α - 32 P]dCTP) dalla regione C-term di TcHMA4 per evitare la cross-ibridazione con altri HMAs.



➤ TcHMA4 è fortemente espresso nelle radici, sia in assenza di Zn che ad alti livelli di Zn o di Cd.

In *Arabidopsis* l'espressione di AtHMA4 è down-regolata con l'esposizione a Cd. (Mills et al., *Plant J* 35, 164-176 (2003))

Figura adattata da A. Popayan, L. Kochian, *Plant Physiology*, 136, 3818 (2004)

Risultati dell'espressione di TcHMA4 in lievito

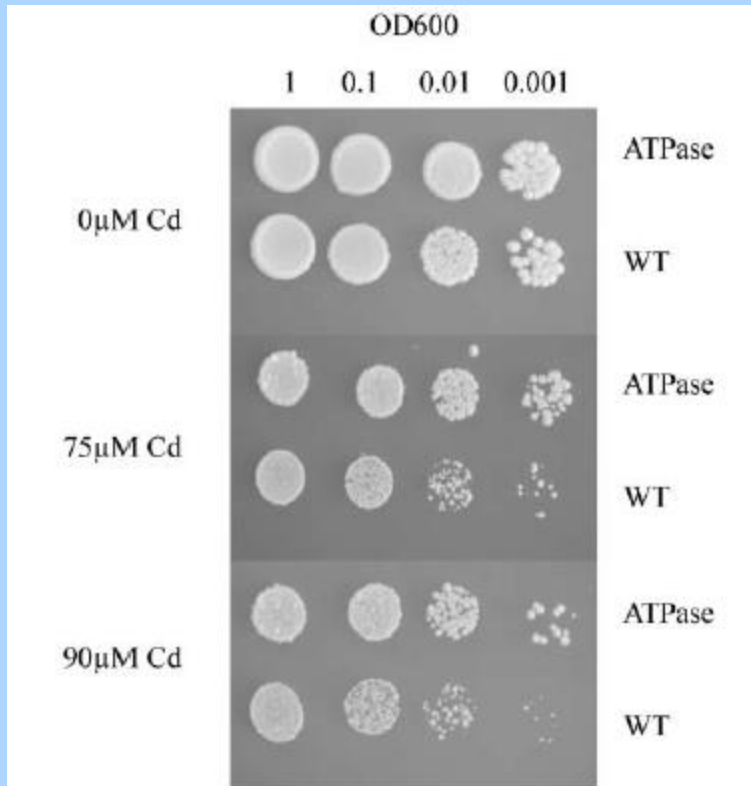


Figure 2. Cd tolerance test for wild-type (transformed with empty pFL61 vector) and *TcHMA4*-transformed yeast cells. Yeast cells were grown to an OD_{600} of 1.0, serially diluted to an OD_{600} of 0.1, 0.01, and 0.001, and then 20- μ L drops spotted on SD plates containing 0, 75, and 90 μ M $CdCl_2$. WT, Wild type.

Figura adattata da A. Popayan, L. Kochian, *Plant Physiology*, 136, 3817 (2004)

➤ lievito wt trasformato con full-length *TcHMA4* mostra un significativo aumento nella tolleranza a elevate concentrazioni di Cd rispetto al wt.

➤ La crescita di lievito GM avviene fino alla concentrazione limite di Cd di 120 μ M.



T. caerulescens

Risultati dell'accumulazione di Cd in lievito trasformato con TcHMA4

- Il ceppo WT DY1457 contenente il vettore pFL61 vuoto e il lievito trasformato con TcHMA4, una volta giunti a metà circa della fase di crescita logaritmica, sono stati trattati con CdCl_2 o PbCl_2 nel terreno di coltura con una concentrazione finale di 20 e 10 μL rispettivamente.
- Prelevate aliquote a 5, 30 e 70 min, si è centrifugato, lavato con CaCl_2 5mM e centrifugato nuovamente per separare il surnatante ricco in metalli dalle cellule di lievito.
- Il pellet è stato sottoposto a misurazioni con uno spettrometro ICAP.

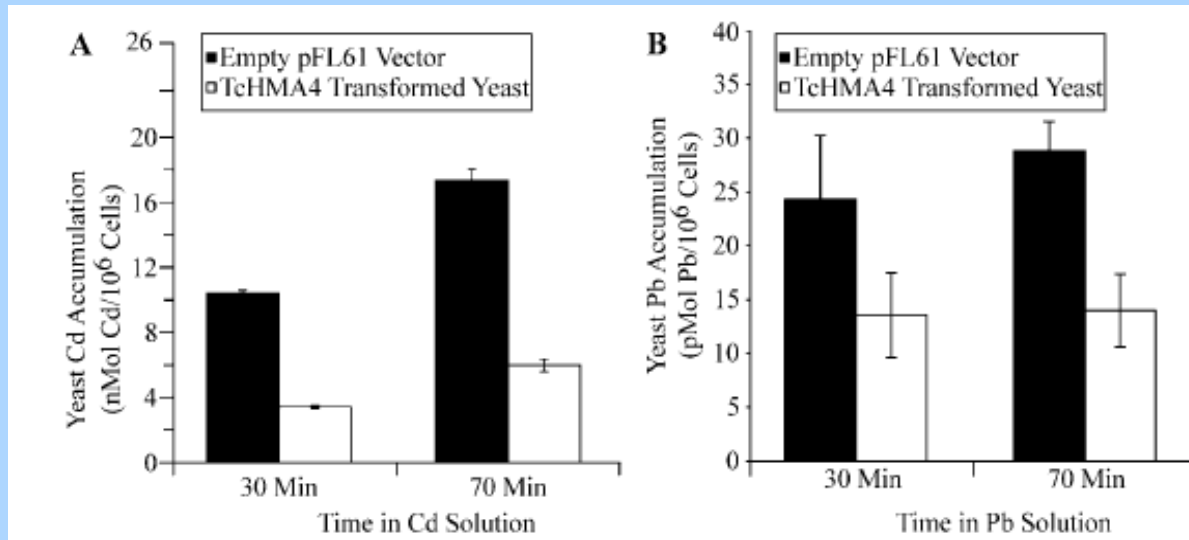
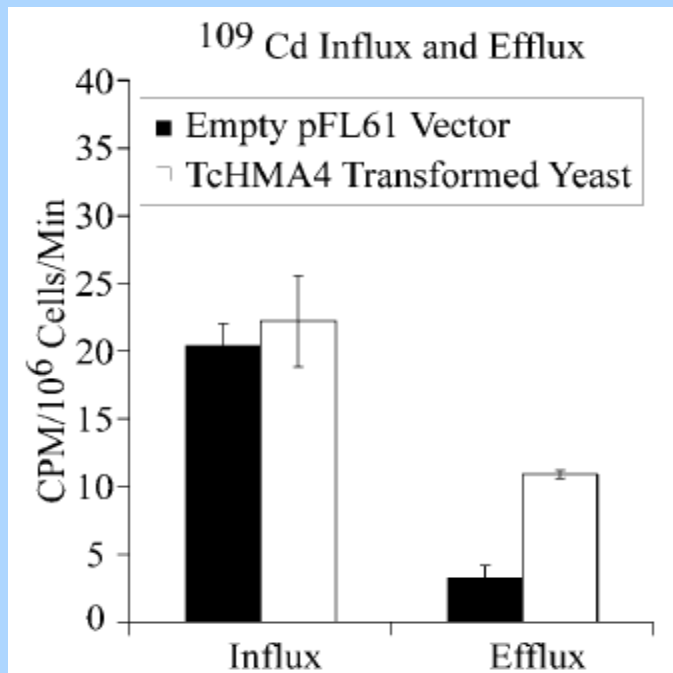


Figura adattata da A. Popayan, L. Kochian, Plant Physiology, 136, 3817 (2004)

- A 30 min e a 70 min le cellule trasformate hanno accumulato il 50 % in meno di Pb e il 70% in meno di Cd.
- Questi dati ci fanno pensare che la funzione di TcHMA4 sia di pompare i metalli fuori dalla cellula e di trasportare un numero ingente di micronutrienti.

Risultati dell'efflusso di ^{109}Cd

- Per determinare la direzionalità del flusso di Cd attraverso la membrana delle cell di lievito, sono state utilizzate delle tecnologie di flusso del **radiotracciante** ^{109}Cd sia in cellule trasformate che in cell di controllo.
- I due ceppi di lievito wt e trasformato sono stati fatti crescere in medium liquido SD e, a metà della fase di crescita logaritmica, è stato aggiunto $^{109}\text{CdCl}_2$ per raggiungere $[\text{Cd}]$ $10\ \mu\text{M}$.
- In base a studi preliminari è stato fissato a 30 s il tempo necessario per l'associazione del ^{109}Cd con la parete delle cell di lievito, è un valore da sottrarre a quelli successivi nel tempo per calcolare l'influsso. L'andamento dell'accumulo è stato lineare fino a 15 min.
- Negli esperimenti di efflusso le cell sono state a contatto con $^{109}\text{CdCl}_2$ $10\ \mu\text{M}$ per 90 min, per poi risospenderle in un medium senza radiotracciante.

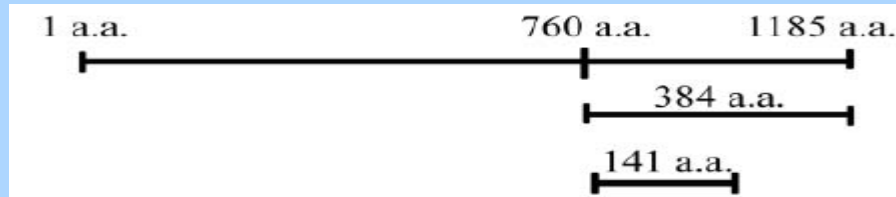


➤ **Non** sono state registrate differenze **sensibili** nell'**influsso** di Cd tra wt e trasformato.

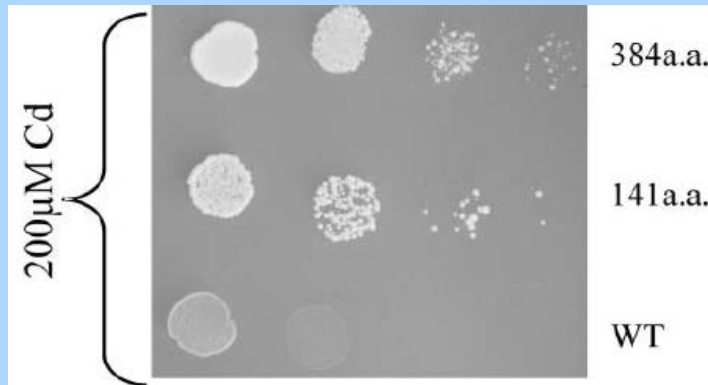
➤ Negli esperimenti di **efflusso** il ceppo **trasformato** con TcHMA4 ha evidenziato una ritenzione del metallo pesante **3,5 volte superiore** rispetto al wt. E' da notare che la velocità di influsso di Cd in queste cell è da 2 a 6 volte maggiore che la velocità di efflusso.

Analisi dei cloni di cDNA parziale di TchMA4

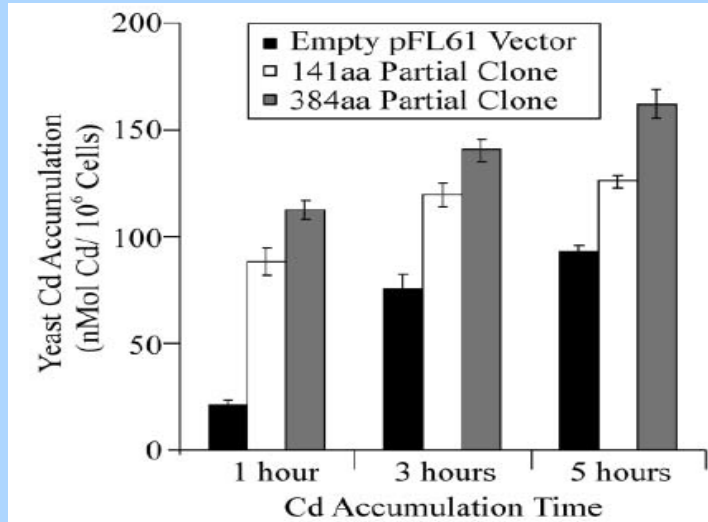
- Dallo screening di complementazione sono emersi cloni parziali di TchMA4 in grado di conferire al ceppo di lievito un grado rilevante di tolleranza al Cd.



- Data l'assenza di domini di membrana putativi, si è giunti ad ipotizzare una loro funzione di ligandi di metalli pesanti e non di trasportatori di metalli.



- In seguito a trattamento in terreno supplementato con CdCl_2 $200 \mu\text{M}$ sia il peptide da 141- che quello da 341-aa ha conferito al ceppo di lievito una notevole resistenza al Cd. Il risultato è particolarmente rilevante se confrontato con quello ottenuto con TchMA4 intero, che si fermava a CdCl_2 $120 \mu\text{M}$.



- Il peptide da 341-aa contiene un concatamero di 9H assente nel peptide da 141-aa. Si pensa che questa sequenza nella ATPasi completa possa essere coinvolta nel legame con Cd, Zn, Co e Ni.
- Le cell trasformate con il cDNA parziale di 384aa mostrano un accumulo di Cd da 4 a 6 volte maggiore rispetto al wt con pFL61 vuoto.
- Il livello di accumulo di Cd in ceppi trasformati con questi peptidi è 10 volte maggiore circa di quello full-length.**

Conclusioni principali

- Sono stati isolati e caratterizzati: una nuova P_{1B}-ATPasi, TcHMA4, nonché due suoi cDNA parziali da 141- e 384-aa localizzati nella porzione C-terminale.
- I ceppi trasformati con TcHMA4 cDNA *full-length* e parziali hanno conferito maggiore tolleranza al Cd.
- *T. caerulescens* è quindi in grado di tollerare alti livelli di metalli pesanti nel suolo e di assorbirli inoltre può trasferire velocemente i metalli assorbiti tramite il sistema xilematico. E' stata dimostrata anche la capacità di *T. caerulescens* di accumulare alti livelli del metallo nelle cellule dell'epidermide fogliare. (Lasat et al., *Plant Physiol* 118, 857-883 (1998))
- In base agli studi di espressione di TcHMA4 si può dedurre che tale trasportatore agisca a livello del caricamento del sistema xilematico attraverso la mediazione dell'efflusso di metalli pesanti dal parenchima al tessuto vascolare xilematico.
- I due peptidi di 384- e 141-aa, se espressi ad alto livello nelle piante, potrebbero portare a un aumento sensibile nella tolleranza e nell'accumulo di metalli pesanti: questa proprietà potrebbe essere sfruttata in campo biotecnologico per aumentare la *phytoremediation* di specie con biomasse opportune.

Profilo d'espressione in *Arabidopsis halleri* con cDNA Microarray

Genes Associated with Heavy Metal Tolerance and Accumulation in Zn/Cd Hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*: A Genomic Survey with cDNA Microarray

HUAI-CHIH CHIANG, JING-CHI LO, AND KUO-CHEN YEH*

Agriculture Biotechnology Research Center, Academia Sinica, 128 Academia Road Section 2, Taipei, Taiwan 11529, ROC

VOL. 40, NO. 21, 2006 / ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY

OBIETTIVI DELL'ESPERIMENTO

- Anche i *genomic tools* possono aiutare la ricerca nella comprensione degli eventi molecolari che sono coinvolti nell'iperaccumulazione.
- In questo studio si è impiegato cDNA microarray di *Arabidopsis* contenente 12000 elementi di DNA per mettere a confronto il pattern di espressione di *A. halleri* e *A. thaliana*: si è posta particolare attenzione ai geni legati al trasporto ed alla chelazione di metalli pesanti. E' stata osservata anche l'espressione di geni legati alle capacità antiossidanti delle piante in grado di iperaccumulare i metalli pesanti.

Profilo d'espressione in *Arabidopsis halleri* con cDNA Microarray

Breve descrizione della preparazione del campione per microarray

- Per ottenere l'RNA di partenza con cui poi realizzare i microarray si è partiti con la coltivazione di semi di *A.halleri* e *A.thaliana* fatti germinare in una camera di crescita con un'intensità luminosa di $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e un ciclo luce-buio di 16:8 h a 22°C .
- Dopo aver raggiunto lo stadio di crescita a due foglie, i campioni sono stati trasferiti in una coltura liquida in fiasche contenenti $\frac{1}{2}$ sale MS, 500 mg/L MES, 1% saccarosio, pH 5,7 e fatte crescere sotto luce continua a $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 22°C .
- Le pianticelle di *Arabidopsis* giunte allo stadio di 10 foglie sono state raccolte per gli esperimenti di microarray. Per tre esperimenti distinti di microarray sono state impiegate *A. halleri* iperaccumulatrici di Zn/Cd di tre differenti provenienze: due dal Giappone (Ah-JF e Ah-JT) e una dalla Germania (Ah-G).

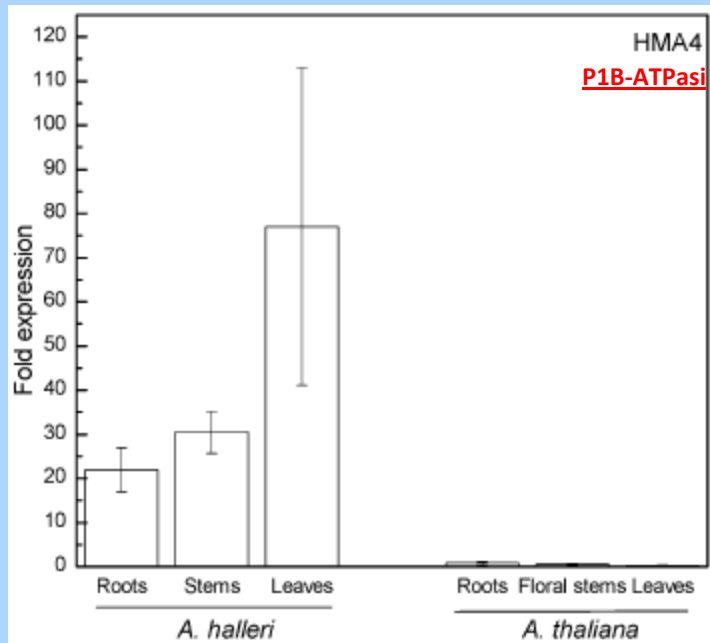
Risultati dell'espressione dei trasportatori di Zn

- Tramite microarray è stata analizzata l'espressione di 235 trasportatori di metalli pesanti, tra cui membri della famiglia **ABC**, i trasportatori legati all'**efflusso** di come le P_{1B}-ATPasi e i facilitatori della diffusione dei cationi (CDF), i trasportatori legati all'**uptake** tra cui le Nramp e le ZIP (*ion-regulated transporter like proteins*).

gene name (locus)	expression (ratio) ^a			hyperaccumulator with predominant expression	related reports
	Ah-G	Ah-JF	Ah-JT		
ABC Transporter					
→ WBC11	4.749	2.391	3.394		
Efflux Transporters					
P _{1B} -ATPase ^e					
HMA3 (At4g30120)	3.343	3.874	3.034	<i>A. halleri</i>	(Becher et al., 2004) ^b
→ HMA4 (At2g19110)	1.585	8.973	11.050	<i>T. caerulescens</i>	(Bernard et al., 2004; Papoyan and Kochian, 2004) ^c
CDF ^e					
ZAT (At2g46800)	10.65	4.112	5.174	<i>A. halleri</i> <i>T. caerulescens</i> <i>T. goesingense</i>	(Becher et al., 2004; Drager et al., 2004) ^b (Assuncao et al., 2001) ^c (Persans et al., 2001; Kim et al., 2004) ^d
MTPa1 (At3g61940)	6.026	2.972	7.362		
MTPa2 (At3g58810)	6.051	3.404	6.091		
Uptake Transporters					
ZIP ^e					
→ IRT3 (At1g60960)	4.158	6.072	4.154		
→ ZIP3 (At2g32270)	1.737	9.700	6.665		
ZIP6 (At2g30080)	3.494	2.272	3.938	<i>A. halleri</i>	(Becher et al., 2004) ^b
ZIP9 (At4g33020)	2.497	2.531	3.923	<i>A. halleri</i>	(Weber et al., 2004) ^b
→ ZIP12 (At5g62160)	4.445	9.482	16.430		
Nramp ^e					
Nramp3 (At2g23150)	2.677	2.595	3.815	<i>A. halleri</i>	(Weber et al., 2004) ^b
→ Nramp5 (At4g18790)	2.492	2.436	2.978		

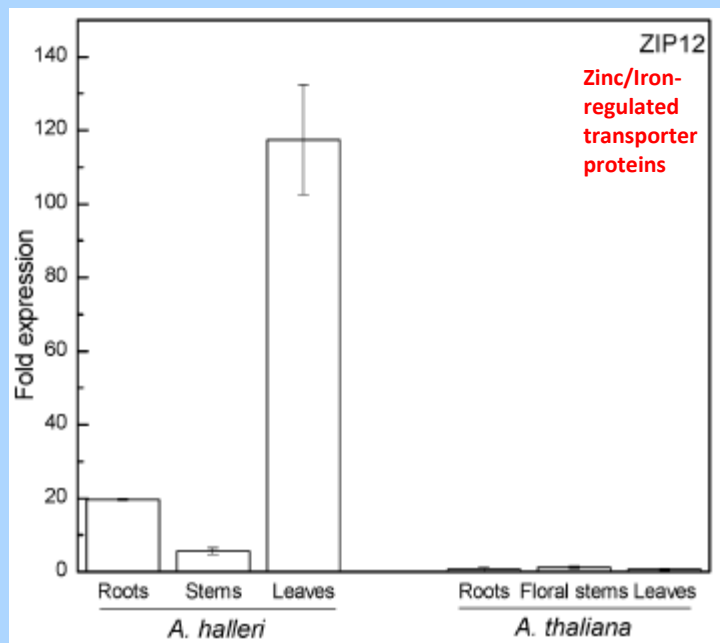
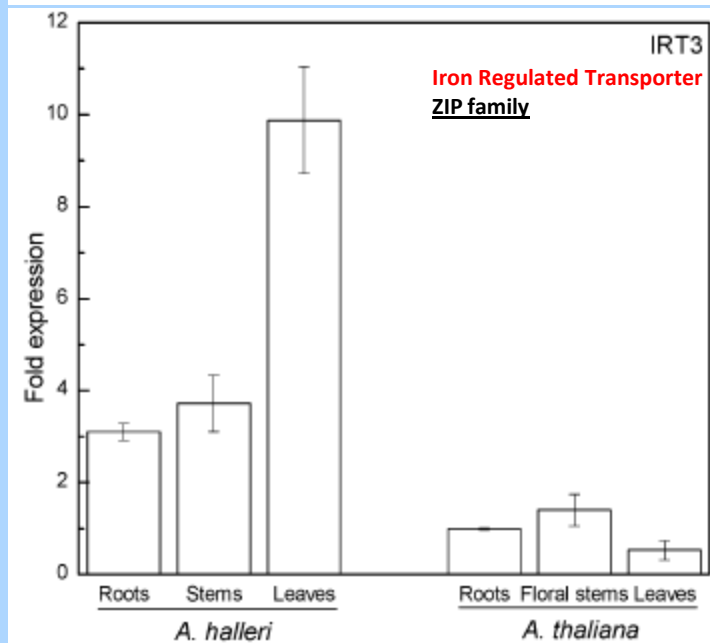
figura adattata da Chiang HC, Lo JC, Yeh KC, *Environ. Sci. Technol.* 40, 6793 (2006)

Analisi dell'espressione dei trasportatori di Zn



➤ I dati ottenuti mediante Q-PCR hanno confermato i risultati positivi dell'analisi con cDNA microarray. L'espressione di alcuni geni si è rilevata maggiore nelle foglie piuttosto che nelle radici.

➤ L'elevata espressione di questi trasportatori è direttamente legata nell'omeostasi del Zn/Cd in *A. halleri*.



Risultati dell'espressione dei chelanti di metalli pesanti

gene name (locus)	expression (ratio) ^a		
	Ah-G	Ah-JF	Ah-JT
<i>MT2A</i> (At3g09390)	2.626	1.798	4.134
<i>MT2B</i> (At5g02380)	2.489	2.460	4.327
<i>MT3</i> (At3g15353)	1.850	2.402	1.736

Figura adattata da Chiang HC, Lo JC, Yeh KC, *Environ. Sci. Technol.* 40, 6795 (2006)

➤ L'accumulo di chelanti di metalli pesanti come le metallothioneine (MT), le fitochelatine (PC) e le nicotianammine (NA) rafforzano la tolleranza agli stress da metalli pesanti, facilitano il movimento degli ioni e riducono la fitotossicità di questi elementi nell'organismo vegetale.

1. EST multiple per quattro **MTs** sono state inserite nel cDNA microarray mettendo in luce l'overespressione di tre locus genici in tutte e tre le specie di *A.halleri* rispetto agli omologhi in *A.thaliana*.

2. Nella biosintesi delle PC, l'espressione della O-acetilserina-tioliasi (OAS-TL) non differisce tra *A.halleri* e *A.thaliana*.

3. Il contenuto di **NA** e l'espressione dei geni NAS2 e NAS3 sono risultati maggiori nelle radici di *A.halleri* rispetto a quelle di *A.thaliana* conferendo una maggiore tolleranza allo Zn.

Risultati dell'attività delle perossidasi

- L'esposizione a livelli tossici di metalli pesanti porta ad una condizione di stress ossidativo con la formazione di alti livelli di ROS negli organismi.
- Per indagare sui meccanismi di detossificazione da ROS nelle due specie di *Arabidopsis*, sono stati valutati i livelli di espressione degli enzimi legati all'attività antiossidante.

TABLE 3. Enzymatic Activities of Catalases, Ascorbic Peroxidases, and Class III Peroxidases in *A. halleri* and *A. thaliana*^a

	<i>A. halleri</i>	<i>A. thaliana</i>	Ah/At ^b
catalase (CAT)	49.73 ± 4.82	45.64 ± 8.04	1.09 ± 0.22
ascorbic acid peroxidase (APX)	1.34 ± 0.43	0.19 ± 0.04	6.99 ± 2.79
class III plant peroxidase (POX)	3.69 ± 1.03	0.23 ± 0.02	15.97 ± 4.72

^a Enzymatic activity (U mg-protein⁻¹). ^b Ratio of activity of *A. halleri* to *A. thaliana*.

Figura adattata da Chiang HC, Lo JC, Yeh KC, *Environ. Sci. Technol.* 40, 6795 (2006)

- Le perossidasi APX e POX hanno mostrato un'attività 7 e 16 volte superiore in *A. halleri* rispetto che in *A. thaliana*. I geni POX At2g38380 e At5g64120 sono risultati fortemente espressi in tutti e tre i campioni di *A. halleri*.
- L'attività elevata delle perossidasi favorisce una conversione più efficiente di H₂O₂.

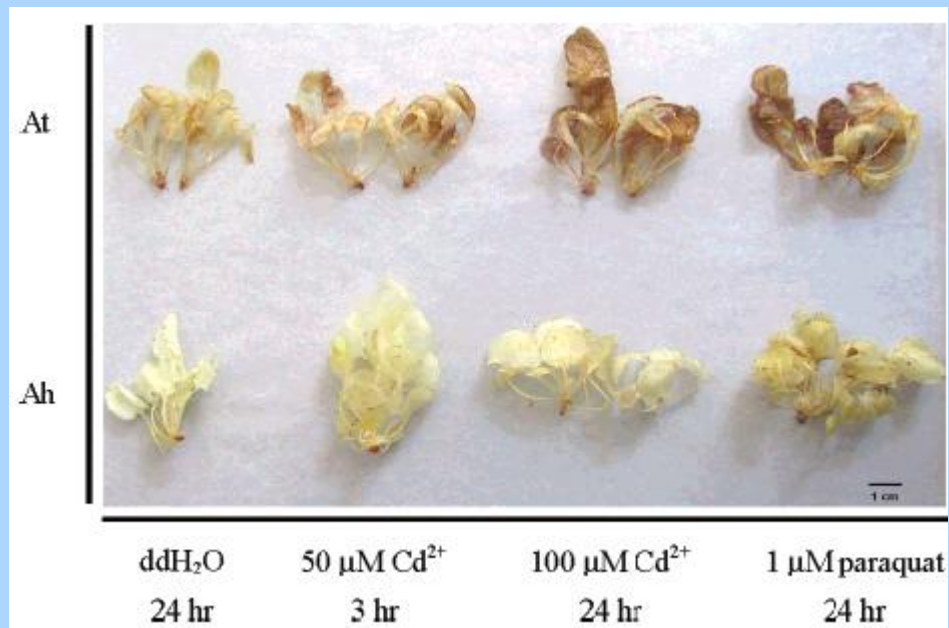


Figura adattata da Chiang HC, Lo JC, Yeh KC, *Environ. Sci. Technol.* 40, 6795 (2006)

- Come fissante per l'H₂O₂ è stato utilizzato il DAB (3,3'-diaminobenzidina) dissolto con HCl e corretto a pH 3,8 con NaOH. La soluzione DAB è stata preparata a fresco per evitare l'auto-ossidazione del DAB.
 - Tessuti fogliari da *A.thaliana* di 3 settimane e da *A.halleri* di 8 settimane sono stati estratti e sottoposti a passaggi preliminari prima di essere immersi overnight in una soluzione DAB 1 mg/mL.
 - Questi sono poi stati sottoposti a trattamento di controllo con acqua e con induttori di stress come il Cd (50 μM per 3h, 100 μM per 24h) e il paraquat (1 μM per 24h).
 - Con un passaggio in acqua bollente si è rimossa completamente la clorofilla dalle foglie, che sono state poi conservate in etanolo 96% fino all'esecuzione delle fotografie (vd. Figura sopra).
- L'accumulo endogeno di H₂O₂ risulta molto minore in *A.halleri* che in *A.thaliana*, anche nell'esperimento di controllo. Questi dati suggeriscono come l'attività antiossidante possa essere fondata in parte sull'elevata attività delle perossidasi APX e POX.

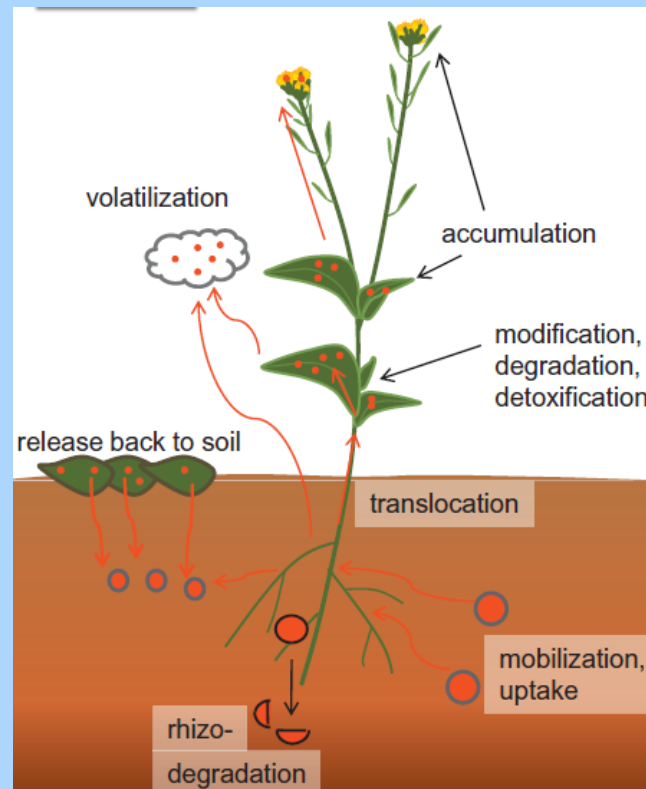
Conclusioni principali

- Numerosi trasportatori legati all'uptake hanno mostrato alti livelli di espressione in *A.halleri*, tra i quali gli Nramp3 e Nramp5 e diversi trasportatori ZIP, come IRT3, ZIP3, ZIP6, ZIP9, ZIP12.
 - Inoltre l'espressione predominante degli MTP (Metal tolerance protein) in *A.halleri* suggerisce un possibile sequestro del metallo pesante a livello intracellulare, in quanto AtMTP1 è localizzato nelle membrane vacuolari delle cellule della radice e delle foglie.
 - I geni overespressi appartenenti alle P_{1B}-ATPasi HMA3 e HMA4 sono coinvolti nel trasporto a lunga distanza via xilema in *A.halleri*.
 - L'elevata espressione di APX1 protegge sensibilmente *A.halleri* dal danno ossidativo in presenza di alti livelli di Zn/Cd. Inoltre l'overespressione di geni legati al ciclo dell'ascorbato-glutatione, tra cui spicca APX, può avere una parte importante nella resistenza a stress ossidativi indotti dai metalli pesanti.
 - L'alta espressione di MTs e APX potrebbero essere associate con la tolleranza agli stress ossidativi prodotti da alte concentrazioni di Zn e Cd in *A.halleri*.
- La co-espressione di molecole antiossidanti con trasportatori di metalli potrebbe essere una strategia valida per l'esigenza di una *phytoremediation* basata su piante GM.

Bibliografia

- Assunção A.G.L. et al., Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *Plant Cell Environment* 24, 217–226 (2001)
- Chiang HC, Lo JC, Yeh KC, Genes associated with heavy metal tolerance and accumulation in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*: A genomic survey with cDNA microarray, *Environmental Science & Technology* 40, 6792-6797 (2006)
- Colangelo E.P., Guerinot M.L., Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants, *Current opinion in Plant Biology* 9, 322-330 (2006)
- Hanikenne M. et al., Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4, *Nature* 453, 391–395 (2008)
- Papoyan A., Kochian L.V., Identification of *Thlaspi caerulescens* genes that may be involved in heavy metal hyperaccumulation and tolerance. Characterization of a novel heavy metal transporting ATPase, *Plant Physiology* 136, 3814-3823 (2004)
- Rascio N., Navari-Izzo F., Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why they do it? And what makes them so interesting?, *Plant Science* 180, 169-181 (2011)
- Sun YB, Zhou QX, An J., Liu WT, Liu R, Chelator-enhanced phytoextraction of heavy metals from contaminated soil irrigated by industrial wastewater with the hyperaccumulator plant (*Sedum alfredii*) *Geoderma* 150, 106-112 (2009)
- Talke I.N., Hanikenne M., Krämer U., Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*, *Plant Physiology* 142, 148–167 (2006).

Phytoremediation: Fitoaccumulo e Fitovolatilizzazione del Selenio



Introduzione

Le piante possono anche rimuovere le sostanze tossiche, dal suolo attraverso la fitovolatilizzazione. In questo processo i contaminanti solubili sono assorbiti con l'acqua dalle radici, trasportati alle foglie, e volatilizzati nell'atmosfera attraverso gli stomi. Il selenio (Se) è un caso particolare di un metallo che viene assorbito dalle piante e volatilizzato. Il selenio è un nutriente essenziale per gli animali, microrganismi e alcuni altri eucarioti. Gli effetti tossici prodotti da un eccesso di selenio sono noti da tempo.

A breve termine il consumo di alti livelli di selenio possono causare nausea, vomito e diarrea, mentre il consumo cronico di alte concentrazioni di composti di selenio può causare una malattia chiamata selenosi. Il riconoscimento del bioaccumulo del Se e la conseguente tossicità nella fauna selvatica a Kesterson, riserva della California, e in altri siti ha portato ad un aumento di interesse per la phytoremediation del Se. In particolare ci sono due vie biochimiche in grado di convertire la SeCys ad un composto volatile, il dimetil-seleniuro o il dimetil-diseleniuro. La sovraespressione di SMT da *A. bisulcatus* in *Arabidopsis* e *B. juncea* ha aumentato la tolleranza al Se, e ha favorito l'accumulo di MeSeCys e la conseguente volatilizzazione del Se.



Chimica del Se

Le somiglianze fisiche e chimiche di selenio (Se) e zolfo (S) aiutano a spiegare l'associazione tra selenio e il metabolismo dello S nelle piante. Sia S che Se sono elementi che appartengono al gruppo dei calcogeni.

Il selenio mostra diversi stati ossidativi:

- +6 nei selenati (HSeO_4^{2-} , SeO_4^{2-}) il tioselenato ($\text{Se}_2\text{O}_3^{2-}$) ed acido selenico ($\text{H}_2\text{SeO}_4^{2-}$),
- +4 nei seleniti (HSeO_3^{2-} , SeO_3^{2-}) ed acido selenoso ($\text{H}_2\text{SeO}_3^{2-}$),
- 0 nel selenio elementare (Se^0)
- -2 nei seleniuri (Se^{2-} , HSe^-), idrogeno seleniuro (H_2Se) e i seleniuri organici (R_2Se) (Milne, 1998).

Le forme predominanti di S e Se disponibili per le piante sono il solfato, il seleniato e selenito, in quanto il selenio elementare è moderatamente stabile nei suoli e quindi non prontamente biodisponibile per le piante., mentre il seleniuro è molto insolubile. L'atomo di Se ha un raggio maggiore dello S: 0,5 Å rispetto a 0,37 Å.

Di conseguenza, il legame tra due atomi di selenio è di circa un settimo più lungo e un quinto più debole del legame disolfuro.



Tossicità del Se

L'inquinamento da selenio è poco comune, ma elevate quantità di questo elemento possono essere scaricate nell'ambiente a causa di alcune attività industriali, come nel caso:

- Dell'estrazione e della raffinazione di alcuni metalli, come rame, nichel, zinco, i cui minerali sono spesso associati al selenio.
- La raffinazione e la purificazione del selenio stesso, sia dai minerali, sia da scarti, e l'uso dell'elemento in diverse applicazioni industriali.
- Quando vengono bruciati combustibili fossili, in particolare il carbone, o durante l'incenerimento dei rifiuti domestici ed industriali.
- La presenza di eccessive quantità di selenio nelle acque superficiali e profonde può essere dovuta anche alla concimazione superficiale dei campi con materiale organico ricco dell'elemento o dall'uso eccessivo di fertilizzanti arricchiti.



Tossicità del Se

Il bestiame allevato in terreni ricchi di Se, nella parte occidentale degli Stati Uniti, manifesta sintomi di tossicità (Cosgrove2001). Ci sono due tipi generali di tossicità, acuta e cronica:

- Tossicità acuta, causata dal consumo, in genere in una singola alimentazione, di alti livelli di selenio. Di solito, la morte avviene in poche ore. I sintomi includono: movimento anormale, nausea, vomito e diarrea.

- Tossicità cronica, che è determinata dal consumo cronico di alte concentrazioni di composti di selenio, e può causare una malattia chiamata selenosi. Solo una forma di Se, solfuro di selenio, è stato implicato come cancerogeno.



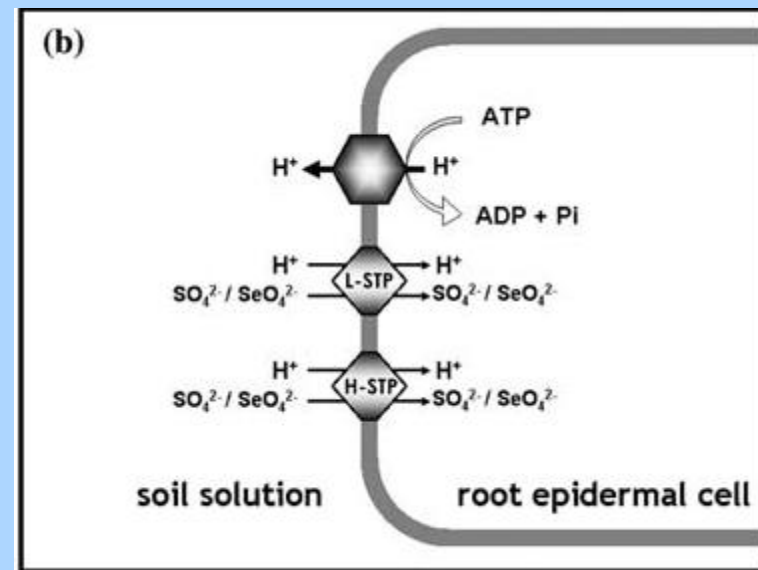
Assorbimento e Trasporto

Selenato, Selenito e composti organici del Se

E' stato osservato che il solfato compete con il seleniato per l'assorbimento nelle radici (Ulrich e Shrift 1968), suggerendo che il trasporto di anioni è mediato da un trasportatore del solfato, come indicato in lievito (Shibagaki et al. 2002). Sia seleniato e solfato sono trasportate attraverso la membrana plasmatica delle cellule epidermiche delle radici contro i loro gradienti elettrochimici, essendo pilotati dal co-trasporto di tre protoni per ogni ione (Hawkesford et al. 1993).

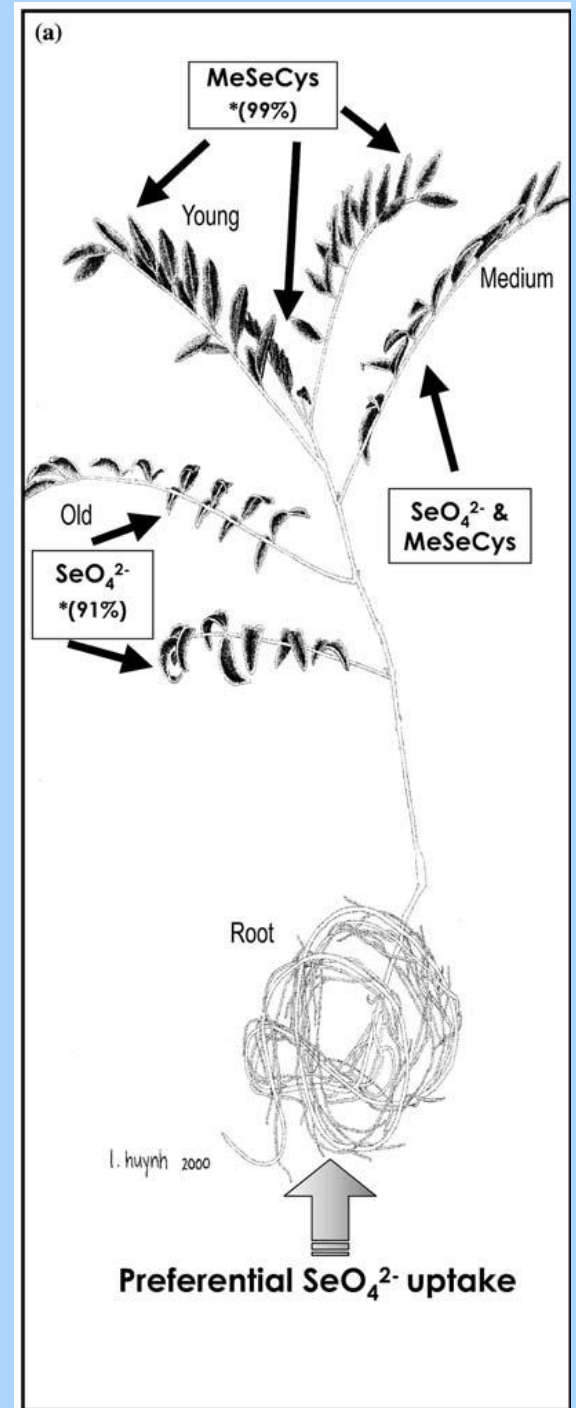
L'assorbimento del seleniato e dei composti organici del Se nelle piante sono processi attivi, mentre il selenito sembra essere accumulato mediante diffusione passiva e può essere inibito da fosfato (Abrams et al. 1990).

La traslocazione del seleniato dalle radici ai germogli si verifica più facilmente rispetto al selenito, o ai composti organici (Shrift 1969).



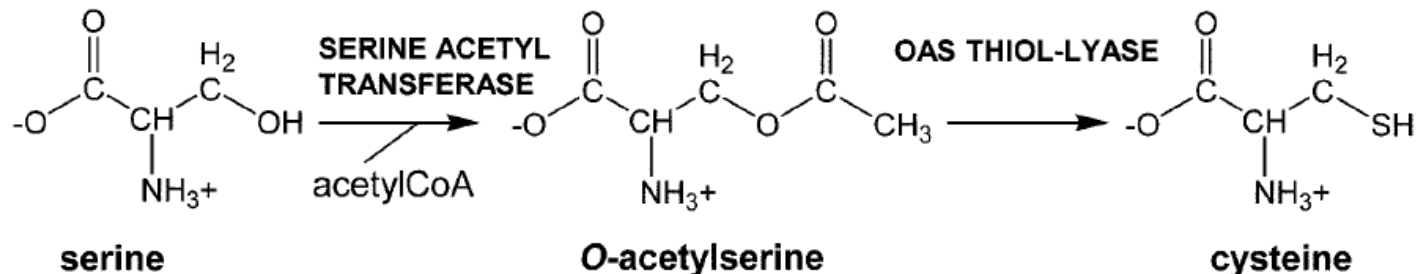
Attraverso la spettroscopia di assorbimento X-ray è stato rivelato che la forma chimica e la diversa distribuzione dei composti di Se sembra essere evolutivamente coordinato, con il seleniato più concentrato nelle foglie vecchie e composti organici del Se come MeSeCys nei tessuti giovani di *A. Bisulcatus* (Pickering et al. 2000)

Da questi dati, sembra probabile che i composti organici del Se, per lo più MeSeCys, sono trasferiti dai tessuti dei germogli giovani a quelli ancora più giovani durante lo sviluppo. La differente distribuzione di seleniato negli iperaccumulatori del Se rispetto ai non accumulatori suggerisce anche che la riduzione di seleniato a composti organici è una componente essenziale per l'accumulo e la tolleranza del Se nelle piante.



Riduzione ed assimilazione del selenato

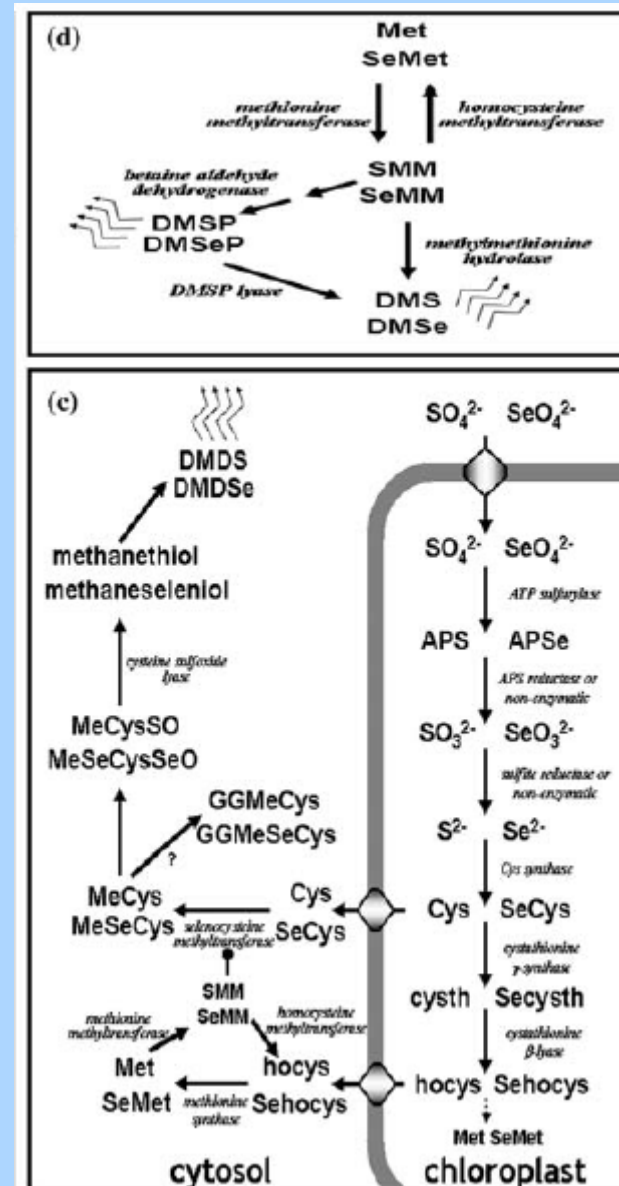
- 1. ATP Sulfurilasi**, è il primo enzima nella via di assimilazione di solfato nelle piante (Leustek et al 1994). Questo enzima catalizza la formazione sia di adenosina 50-fosfosolfato (APS) e adenosina 50-phosphoseleniate (APSe) da ATP e solfato o seleniato (Murrillo e Leustek 1995).
- 2. APS Reduttasi**, catalizza la riduzione di APS a solfito nelle piante, ed è considerato un enzima essenziale per controllare l'assimilazione del solfato (Suter et al 2000.). Inoltre, considerando che l'equilibrio di reazione di ATP sulfurilasi favorisce la direzione inversa, APS reduttasi è essenziale affinché APS venga rapidamente metabolizzato (Saito 2004).
- 3. Cys Sintasi**, le fasi metaboliche finali nella produzione di Cys sono catalizzate dall'enzima serina acetiltransferasi (SAT) e O-acetilserinatioliasi (OAS-TL). SAT catalizza la formazione di O-acetil-L-serina (OAS) da serina e acetyl-CoA, e OAS-TL assimila solfuro con OAS per formare Cys.



Metabolismo della SeCys e SeMet

4. Cistationina- γ -sintasi : Cys / SeCys può entrare nella via biosintetica della Met via cistationina / selenocistationine (cysth / Secysth) per formare infine Met /SeMet (Lauchli 1993). Dawson e Anderson (1988) hanno dimostrato che gli spinaci cistationina- γ -sintasi mostra una maggiore affinità per SeCys che Cys. Infine la SeMet può essere metilata e convertita a dimetilseleniuro (DMSe), che è la forma principale di composti volatili prodotti da Se (Lewis et al.1974)

5. SeCys metiltransferasi : una delle caratteristiche distintive di alcune piante Se-iperaccumulatori è la loro capacità di accumulare grandi quantità di S-MeCys rispetto alle loro controparti (Sors et al. 2005). La sintesi di MeCys è anche in parallelo con la capacità di accumulare MeSeCys quando queste piante sono esposte a selenato, suggerendo che la biosintesi di MeCys e MeSeCys sono collegati in un percorso comune (Shrift 1969).



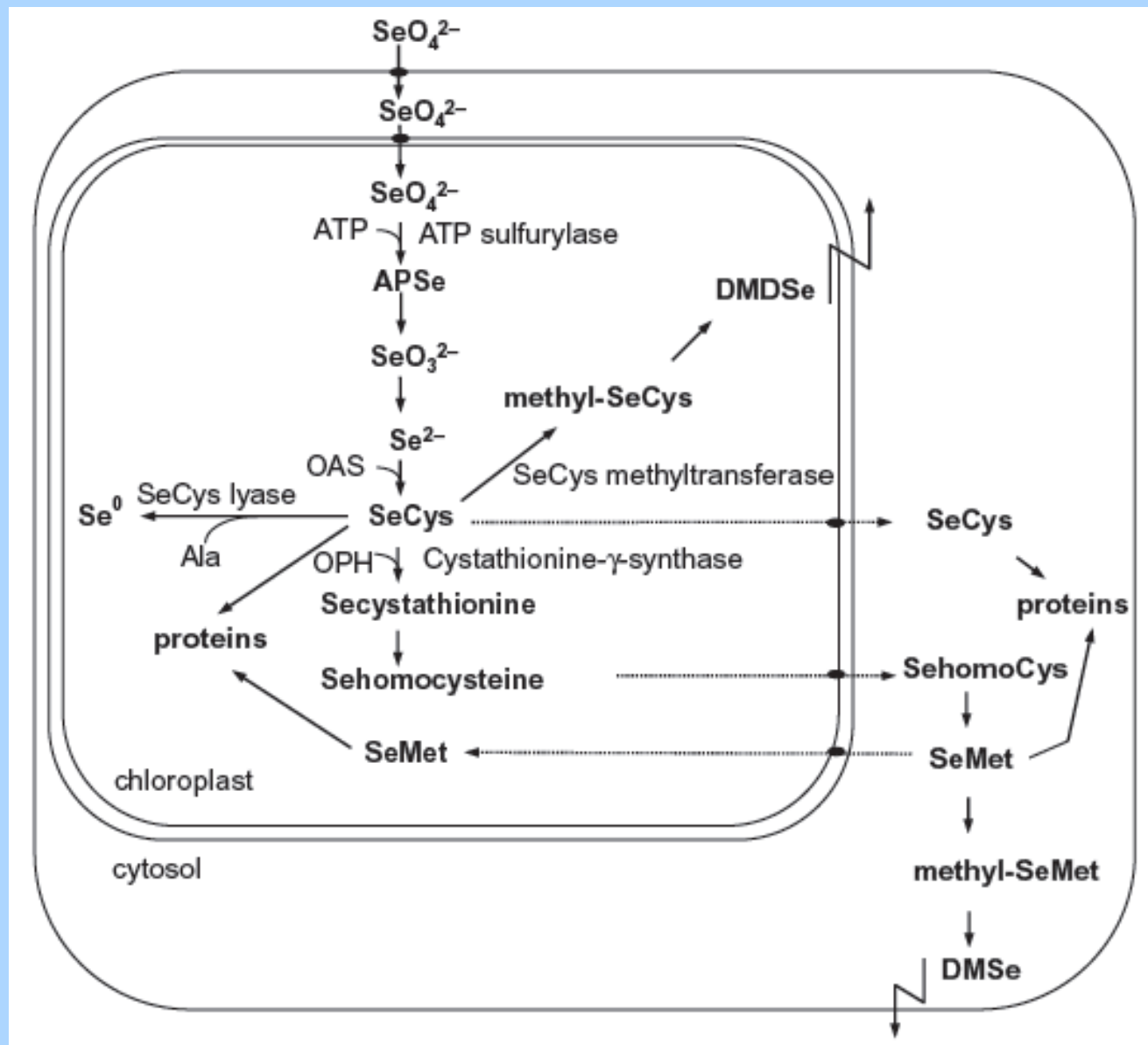


Figure 20.3 • Schematic overview of Se metabolism in plants, showing (in *italics*) enzymes that were used to alter plant properties with respect to Se tolerance, accumulation, and/or volatilization. APSe: adenosine phosphoselenate; OAS: O-acetylserine; OPH: O-phosphohomoserine; SeCys: selenocysteine; SeMet: selenomethionine; DMSe: dimethylselenide; DMDSe: dimethyldiselenide.



Strategie di Phytoremediation

- 1) VanHuysen et al. 2004.
 - a. Quando l'ATP sulfurilasi, è stato sovraespresso in *B. juncea*, l'accumulo di selenio nei germogli era il doppio in biomassa rispetto alla *Stanleya pinnata* (iperaccumulatore di Se) e ciò ne indica il potenziale fitorimedio per siti contaminati selenio.
 - b. Attraverso due vie biochimiche la SeCys può essere convertita ad un composto volatile: dimetil-seleniuro o dimetil-diseleniuro. La Cistationina- γ -sintasi catalizza la formazione di dimetil-seleniuro da Se-Cys, e la sovraespressione di cistationina- γ -sintasi in *B. juncea* ha portato ad una maggiore tolleranza e una maggiore volatilizzazione del Se
- 2) Pilon et al. 2003.

Altri studi si sono concentrati sulla sovraespressione degli enzimi del metabolismo del Se. La sovraespressione della liasi selenocisteina dei mammiferi, che converte SeCys a Se elementare e alanina, in *Arabidopsis* aumenta leggermente la quantità di selenio accumulata e riduce leggermente la quantità di selenio incorporato nelle proteine.



Production of Se-methylselenocysteine in transgenic plants expressing selenocysteine methyltransferase

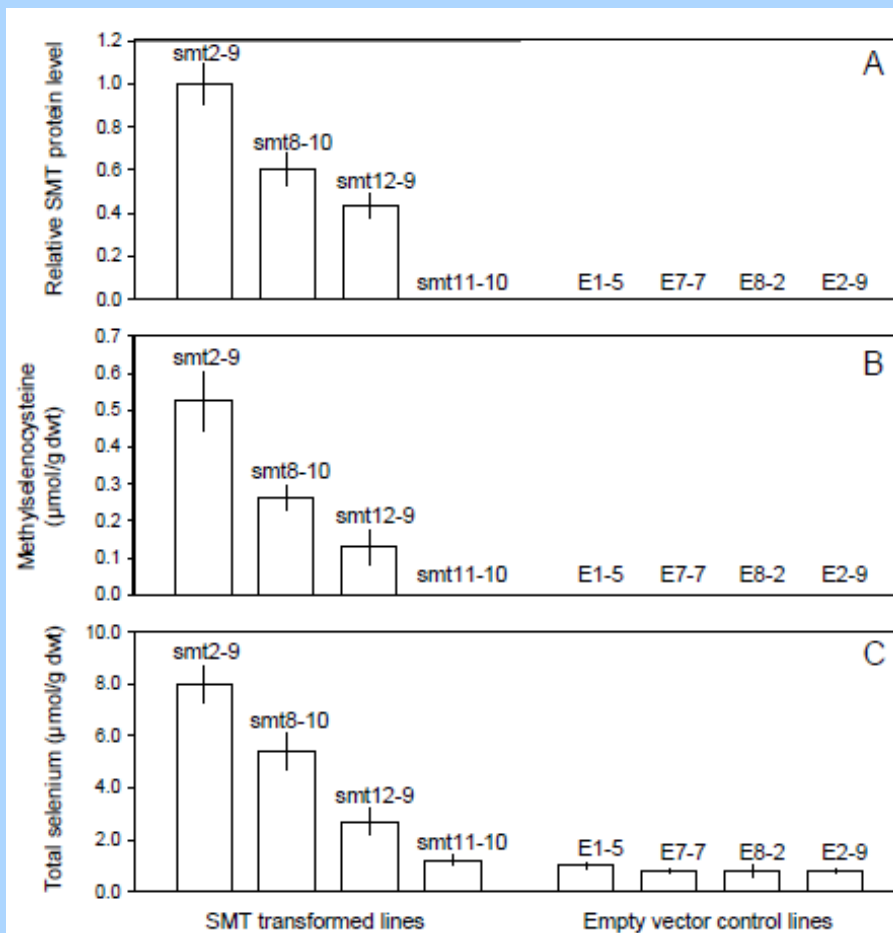
Danielle R Ellis^{1,2}, Thomas G Sors¹, Dennis G Brunk¹, Carrie Albrecht¹, Cindy Orser³, Brett Lahner¹, Karl V Wood⁴, Hugh H Harris^{5,6}, Ingrid J Pickering^{5,7} and David E Salt*¹

Address: ¹Center for Plant Environmental Stress Physiology, 1165 Horticulture Building, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA, ²Visiting Scientist: NuCycle Therapy, Inc, Hillside, NJ, 07205, USA, ³Arete Associates, Gaithersburg, MD 20878, USA, ⁴Chemistry Department, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA, ⁵Stanford Synchrotron Radiation Laboratory, Stanford Linear Accelerator Center, Menlo Park, CA 94025, USA, ⁶School of Chemistry, University of Sydney, NSW, 2006, Australia and ⁷Department of Geological Science, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK S7N 5E2, Canada

Successo nell'uso del materiale genetico di *A. bisulcatus* per ingegnerizzare il metabolismo dell'MeSeCys nella pianta non accumulatore di Se *A. thaliana*. , attraverso la sovraespressione dell'enzima SMT di *A. bisulcatus* in *A. thaliana*.



Risultati e Discussioni



L'accumulo di MeSeCys varia da zero, nelle piante controllo, ad una media di $0,5\mu\text{mol g}^{-1}$ in peso secco nella linea che accumula maggiormente SMT, con la concentrazione di MeSeCys che variano da $0.09 - 1.3\mu\text{mol g}^{-1}$ in peso nelle singole piante di questa linea. Il Se totale aumenta da $1\mu\text{mol g}^{-1}$ in peso nei controlli a $8\mu\text{mol g}^{-1}$ nella linea smt2-9.

Figure 1

Impact of SMT protein levels on accumulation of MeSeCys and total Se. (A) Relative SMT protein accumulation. Relative SMT protein levels were determined from digitized immunoblots, and represent the average band intensity (\pm SE) from 12 – 18 individual plants for each line. (B) Concentration of MeSeCys in transgenic plants. MeSeCys was quantified using HPLC (AccQ Tag amino acid analysis system) and its identify confirmed using MALDI-MS. Data represents the average (\pm SE) MeSeCys concentrations in 11 – 18 individual plants for each line. (C) Concentration of total Se in transgenic plants. Total Se was quantified by ICP-MS, and data represents the average (\pm SE) of 7 – 13 individual plants for each line.



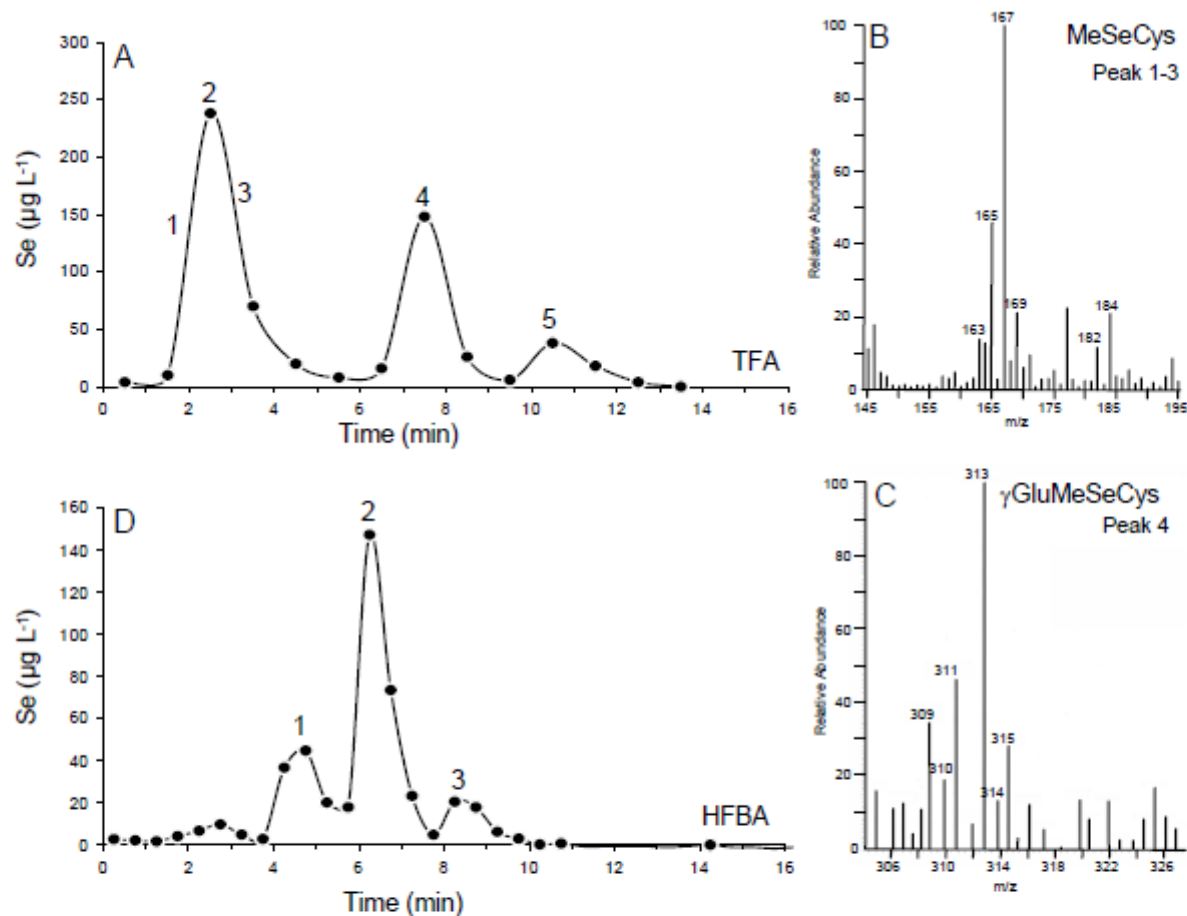


Figure 2

Speciation of Se in shoots of *A. thaliana* over-producing SMT. (A) *Arabidopsis thaliana* smt2-9 HCl extract injected onto a reverse phase C8 column, eluted with water:methanol (99:1 v/v) containing 0.1% TFA, and fractions analyzed for Se using ICP-MS with 83% recovery of injected Se. (B) Mass spectrum collected in the region of peak 1–3 from the chromatogram shown in Figure 2A, revealing the expected $[M+H]^+$ $m/z = 184$ and $[M+H-NH_3]^+$ $m/z = 167$ for MeSeCys, as well as the expected Se isotopic signature. (C) Mass spectrum collected in the region of peak 4 from chromatogram shown in Figure 2A, revealing the expected ion $m/z = 313$ for γ GluMeSeCys, as well as the expected Se isotopic signature. (D) *Arabidopsis thaliana* smt2-9 HCl extract injected onto a reverse phase C8 column, eluted with water:methanol (99:1 v/v) containing 0.1% HFBA, and fractions analyzed for Se using ICP-MS with 55% recovery of injected Se.

MeSeCys e il suo derivato γ GluMeSeCys comprendono il 75% del Se totale estratto, o $3.9 \mu\text{mol g}^{-1}$ in peso secco dei germogli nelle linee di *A. Thaliana* smt2-9.



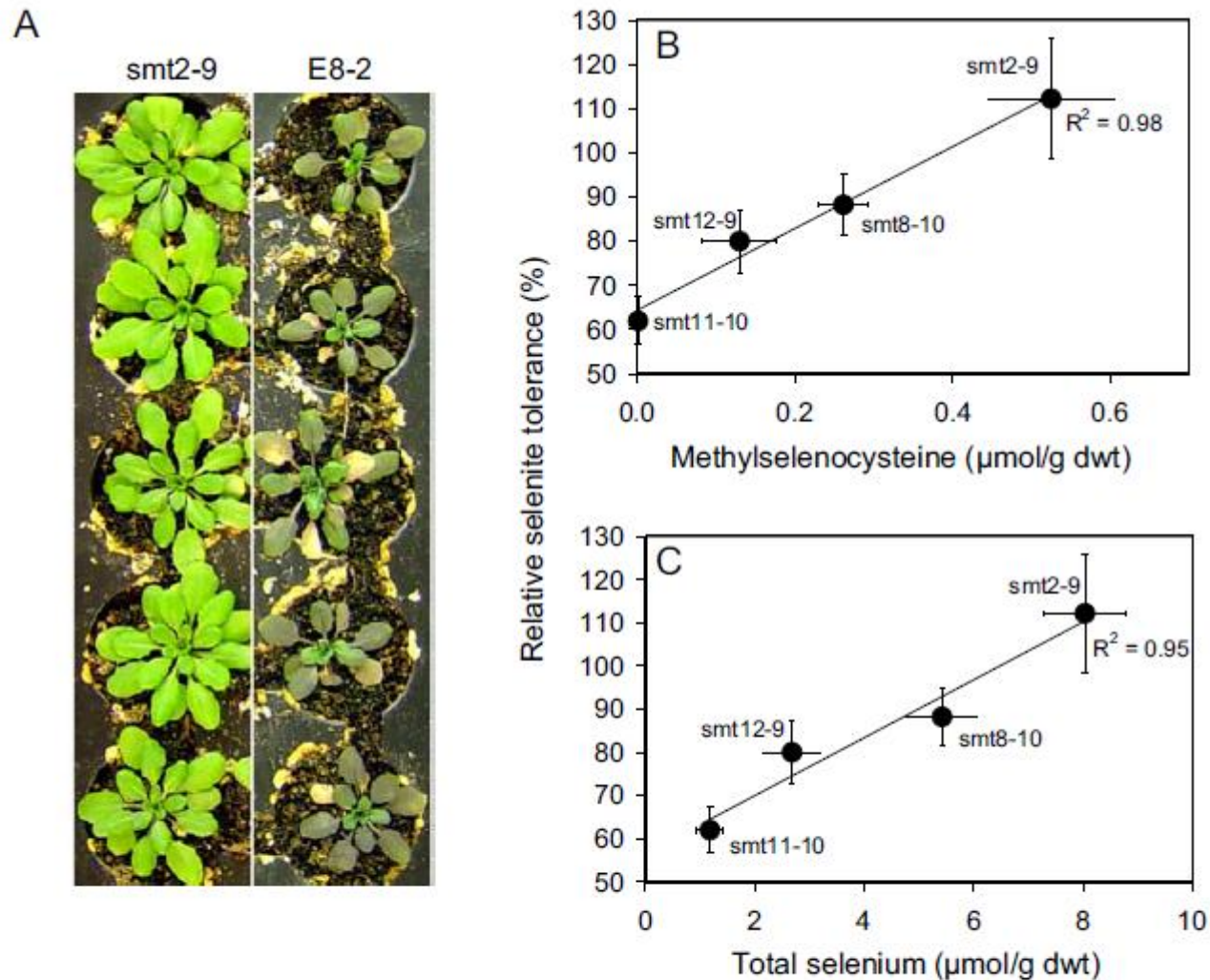


Figure 4
Selenite tolerance of SMT over-producing *A. thaliana*. (A) Growth of SMT over-producing and empty vector control plants in soil treated with selenite. (B) Relative selenite tolerance in soil grown plants is positively correlated with the concentration of methylselenocysteine, and (C) total shoot Se concentration. Relative tolerance is quantified as the percent fresh weight of selenite treated plants relative to the same line grown in the absence of selenite. Data represents averages (\pm SE) from between 10 – 16 individual plants from each line.



Conclusioni

Table 1: Identity and percent composition of Se species in shoot tissue of SMT over-producing *A. thaliana* line smt2-9.

Se species	Peak #	t _R (min)	m/z	μmol g ⁻¹ dry weight	% of extractable shoot Se
¹ Selenite	nd	nd	nd	0.16	3
² MeSeCys	1	4.75	167 (M+H-NH ₃) ⁺	0.71	12
² MeSeCys	2	6.25	167 (M+H-NH ₃) ⁺	1.68	31
² Unidentified	3	8.75	nd	0.27	5
³ γGluMeSeCys	4	7.5	313 (M+H) ⁺	1.16	26
³ Unidentified	5	10.5	nd	0.37	6
³ Unaccounted	-	-	-	-	17

¹Calculated using XAS data. ²Mobile phase water-methanol (99:1, v/v) 0.1% HFBA. ³Mobile phase water-methanol (99:1, v/v) 0.1% TFA. HPLC fractions (0.5 – 1.0 ml) were collected and analyzed for total Se by ICP-MS. Replicate chromatography was also performed using HPLC-ESI-MS to confirm the identity of the compounds in the Se containing peaks. The various Se compounds were quantified based on their Se content. Chromatography and mass spectroscopy data shown in Figure 2.

La modificazione genetica delle piante per aumentare i livelli degli enzimi coinvolti nel metabolismo del Se in MeSeCys fornirebbe una possibile fonte di questa molecola.

Il tessuto dei germogli di *A. thaliana* che sovraesprime SMT ha prodotto elevate concentrazioni di MeSeCys, e il suo equivalente funzionale γ-GluMeSeCys, fino a 3,9 g mol⁻¹ di peso a secco (Tabella 1), dopo solo 6 settimane di crescita tra cui una di 2 settimane esposizione al selenito. L'eccessiva produzione di SMT in *A. thaliana* porta anche alla aumentato accumulo di selenio e resistenza selenito. Ulteriore importante passaggio di questo processo sarà la progettazione di una maggiore assorbimento di seleniato e la sua riduzione a selenito.



Phytoremediation: **FITODEGRADAZIONE**



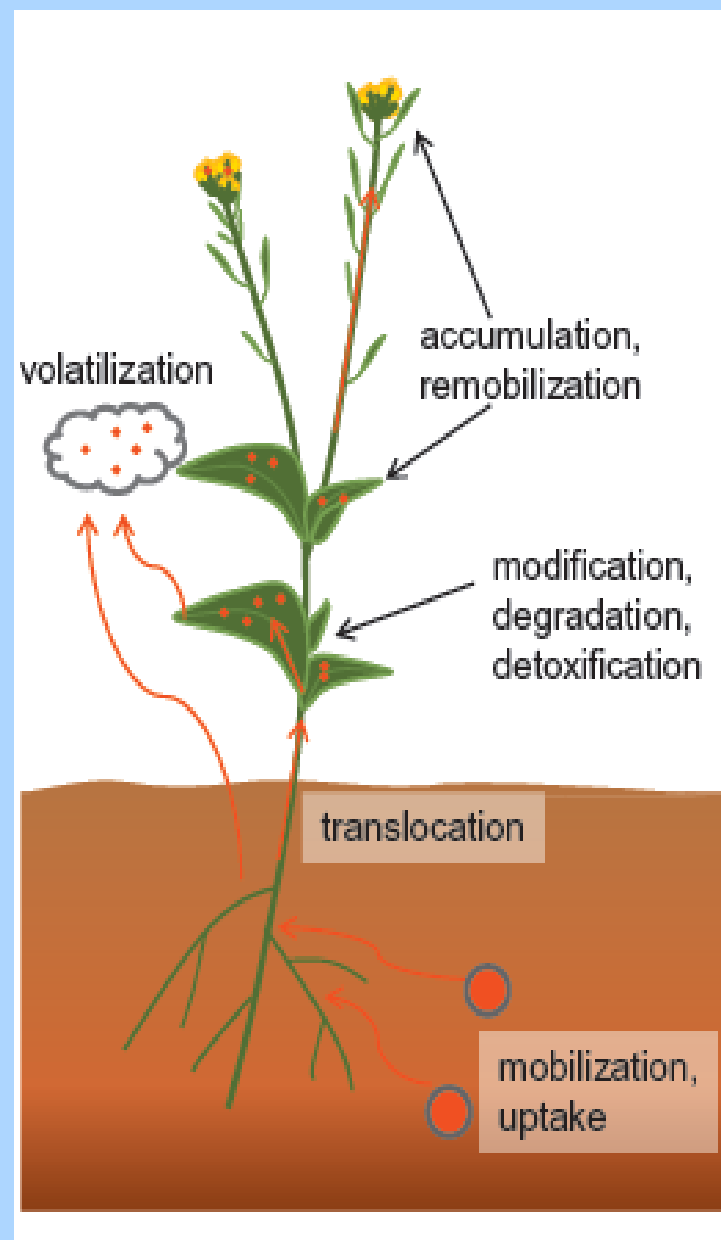
Per fitodegradazione si intendono quelle tecniche che sfruttano le piante ed i loro meccanismi di detossificazione endogeni per poter captare e degradare molecole recalcitranti di matrice organica.

Tale competenza non è universale ma deve essere valutata caso per caso.

I meccanismi di detossificazione sono caratteristici delle singole varietà e, addirittura, degli ecotipi che le compongono.

Gli xenobiotici assorbiti dalle piante possono seguire differenti vie:

- Accumulazione e delocalizzazione nei tessuti
- Degradazione completa
- Degradazione parziale e volatilizzazione



vantaggi

Necessità di input bassa

Costi contenuti

Capacità di decontaminare e, nel contempo, distabilizzare i terreni contaminati

Decontaminazione attiva anche in profondità

svantaggi

Volatilizzazione

Tempi lunghi

Capacità di assorbimento medio-basse

Fitotossicità degli xenobiotici

VOLATILIZZAZIONE

In seguito ad una parziale degradazione alcuni xenobiotici, come il tricloroetilene, possono diventare volatili ed essere traspirati dalle piante tramite foglie e fusto.

Tale fenomeno, quando si trattano composti di per loro tossici, potrebbe generare cataboliti volatili di maggiore tossicità, che una volta traspirati si diffonderebbero nell'ambiente, rendendo nulli gli sforzi di decontaminazione.

Possibili applicazioni

- Solventi (TCE, ecc...)
- Derivati del petrolio (PAH, PCB, ecc..)
- Pesticidi (atrazina, ecc)
- Esplosivi (TNT, RDX, ecc..)

Queste sono le classi alle quali appartengono gli xenobiotici più diffusi e la cui pericolosità è nota.

Sono numerosi gli studi condotti sull'utilizzo di piante in grado di trasformare in composti meno pericolosi, o **degradare completamente**, contaminanti di matrice organica.

Tra le varietà più interessanti vi è il Pioppo (*Populus sp.*), la cui rapida crescita, la profondità che raggiungono le sue radici e l'ingente biomassa che è in grado di produrre, sia verde che legnosa, lo hanno eletto come buon candidato per studi di fitodegradazione.

L'estensione dell'apparato radicale del pioppo permetterebbe non solo la decontaminazione del suolo, ma addirittura delle acque percolanti, consentendo di **catturare i contaminanti prima che arrivino alla falda acquifera.**

Alcune delle piante impiegate nella fitodegradazione

Table 1

Summary of contaminants and plants discussed in the text¹.

Class	Contaminant	Plants studied	Effect studied
Chlorinated	TCE	Poplar	Metabolism [1], volatilization from trunk [2**]
	CT, tetrachloroethane	Poplar [3]	Volatilization from trunk
	TCE	<i>Leuceana</i> [4], poplar rhizosphere [26]	Metabolism
De-icing agents	2,4-Dichlorophend	<i>Brassica</i> [5]	Metabolism
	Benzotriazoles	<i>Helianthus</i> [6]	Metabolism
Gasoline additives	MTBE	Herbaceous plants [7], pine [10**]	Metabolism
	MTBE	Poplar [9]	Volatilization from trunk
Pesticides	EDB	<i>Leuceana</i> [4]	Metabolism
	Trifluralin, lindane	Rye [11]	Uptake
	DDE	<i>Curcubita</i> [12, 13**, 15**, 16]	Uptake
	Simazine	Parrot feather, canna	Uptake [14]
Energetics	TNT	Parrot feather [18], <i>Arabidopsis</i> [21]	Metabolism
	HMX	Poplar [22], bean, alfalfa, canola [23]	Metabolism
	TNT, RDX, HMX	Poplar endophytes	Metabolism
	Perchlorate	Tobacco [24], poplar [25]	Metabolism
PAH/TPH		Sorghum [27], alfalfa [39], clover, rye [40], poplar [42, 43], willow [44]	Rhizosphere effects
	Pyrene	Rye [28], fescue [30**], <i>Kandelia</i> [42], <i>Bruguiera</i> [47]	Rhizosphere effects
	Gasoline	Pothos [48]	Atmospheric remediation
	Jet fuel	Fescue [33]	Rhizosphere effects
	TPH	Poplar [42, 43]	Rhizosphere effects
	Mineral oil	Willow [44]	Rhizosphere effects
	Diesel, heavy oil	Grasses native to California (US) [35]	Rhizosphere effects
PCBs	<i>Brassica</i> [41]	Rhizosphere effects	

¹This does not reflect what was done in previous studies and should not be considered an inclusive list of all plant and contaminants studied. CT, carbon tetrachloride; DDE, 2,2-bis(p-chlorophenyl)-1,1-dichloroethylene; EDB, ethylene dibromide; HMX, octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5-tetrazocine; RDX, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine.

Potential of the TCE-degrading endophyte *Pseudomonas putida* W619-TCE to improve plant growth and reduce TCE phytotoxicity and evapotranspiration in poplar cuttings

Nele Weyens^a, Sascha Truyens^a, Joke Dupae^a, Lee Newman^b, Safiyh Taghavi^b, Daniel van der Lelie^b, Robert Carleer^a, Jaco Vangronsveld^{a,*}

^aHasselt University, Centre for Environmental Sciences, Agoralaan Building D, B-3590 Diepenbeek, Belgium

^bBrookhaven National Laboratory (BNL), Biology Department, Building 463, Upton NY 11973, USA

The endophyte P. putida W619-TCE degrades TCE during its transport through the xylem, leading to reduced TCE concentrations in poplar, and decreased TCE evapotranspiration.

Esistono in letteratura numerose pubblicazioni riguardanti l'uso del pioppo nella decontaminazione di siti inquinati da tricloroetilene (TCE). Qui si è utilizzato un endofita in grado di degradare il TCE per **migliorare la tolleranza delle piante, la ratio di degradazione e ridurre la volatilizzazione** dello xenobiotico e dei suoi cataboliti dalla pianta.

Due differenti condizioni sperimentali:

- **Breve termine:** talee inoculate con *P.Putida* W619-TCE in coltura idroponica ermetica per tre giorni.
- **Medio termine:** talee inoculate con l'endofita ma coltivate per tre settimane in vaso

Piante esposte a 0, 200 e 400mg/l di TCE. Per 10 piante inoculate altrettante non sono state inoculate con l'endofita.



Biomassa in funzione all'esposizione al TCE

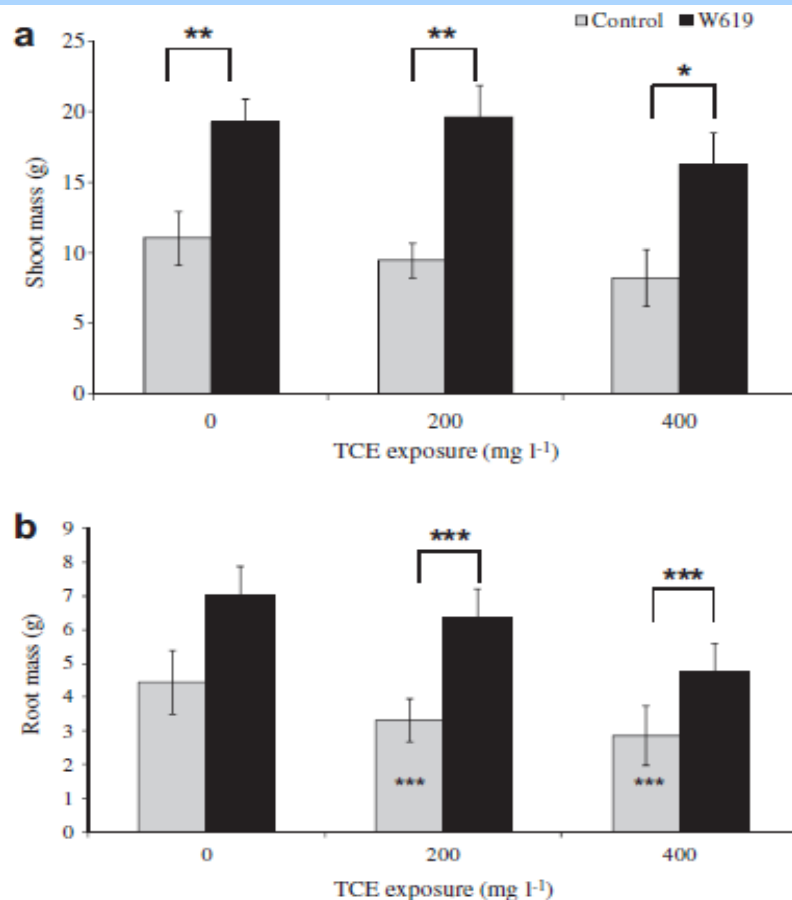


Fig. 2. Root and shoot biomass (g) of poplar cuttings grown hydroponically and exposed to 0, 200 or 400 mg l⁻¹ TCE for 3 days. Control: non-inoculated cutting; W619: cuttings inoculated with *P. putida* W619-TCE. Values are mean ± standard error of 10 biological independent replicates (significance levels: *; $p < 0.1$; **; $p < 0.05$; ***; $p < 0.01$). Significance levels shown inside the bars are referring to comparison (a) between non-inoculated cuttings exposed to 200 and 400 mg l⁻¹ TCE and non-inoculated cuttings exposed to 0 mg l⁻¹ TCE and (b) between inoculated cuttings exposed to 200 and 400 mg l⁻¹ TCE and inoculated cuttings exposed to 0 mg l⁻¹ TCE.

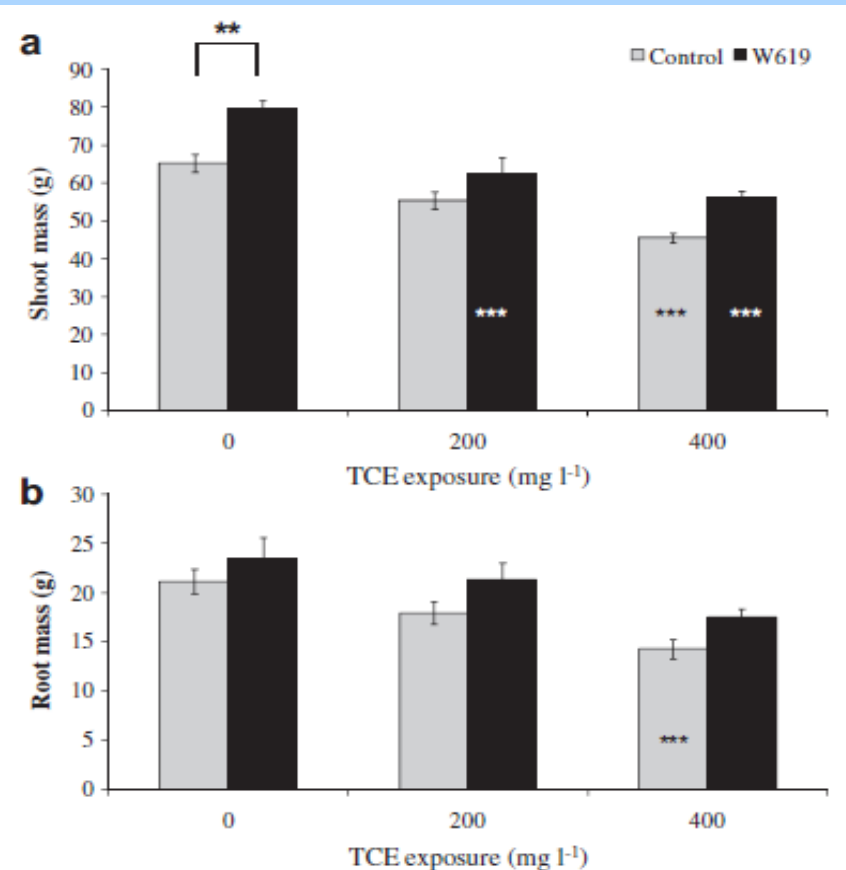


Fig. 3. Root and shoot biomass (g) of poplar cuttings grown in potting soil. 0, 200 or 400 mg l⁻¹ TCE was supplied for 3 weeks. Control: non-inoculated cuttings; W619: cuttings inoculated with *P. putida* W619-TCE. Values are mean ± standard error of 10 biological independent replicates (significance levels: **; $p < 0.05$; ***; $p < 0.01$). Significance levels shown inside the bars are referring to comparison (a) between non-inoculated cuttings exposed to 200 and 400 mg l⁻¹ TCE and non-inoculated cuttings exposed to 0 mg l⁻¹ TCE and (b) between inoculated cuttings exposed to 200 and 400 mg l⁻¹ TCE and inoculated cuttings exposed to 0 mg l⁻¹ TCE.

TCE nelle radici e foglie di talee in coltura idroponica

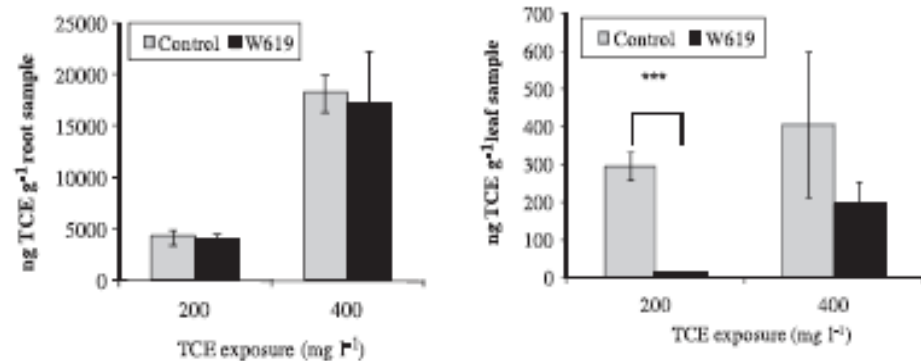


Fig. 4 Amount of TCE (ng) in the roots (left) and leaves (right) of poplar cuttings grown hydroponically and exposed to 200 or 400 mg l⁻¹ TCE for 3 days. Control: non-inoculated cuttings; W619: cuttings inoculated with *P. putida* W619-TCE. Values are mean ± standard error of 6 biological independent replicates (significance level: ***: $p < 0.01$).

TCE in radici e foglie in vaso

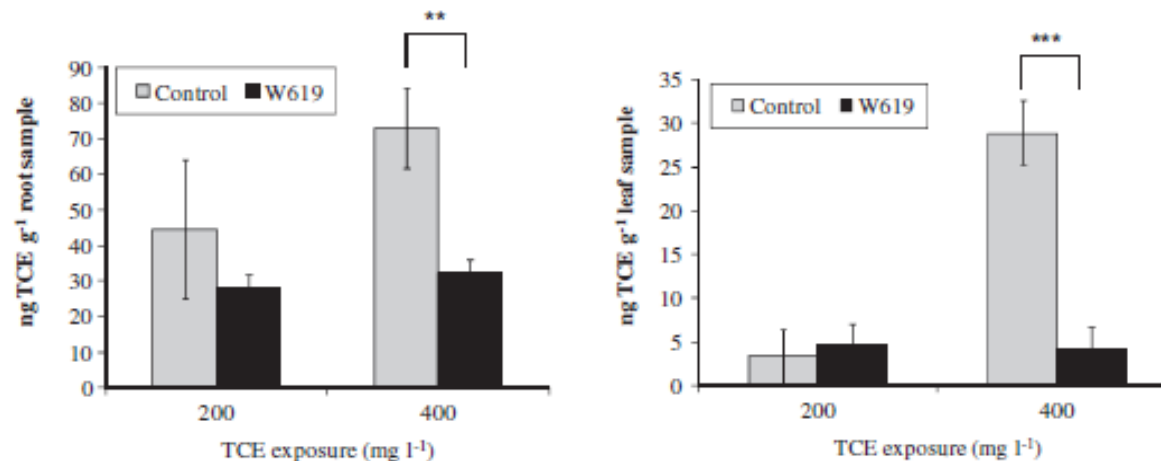
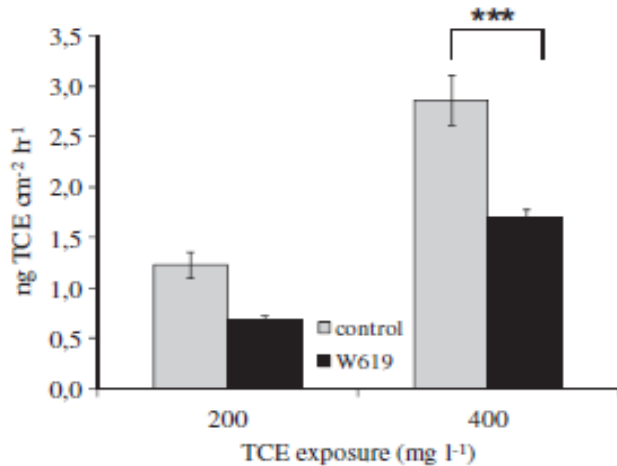


Fig. 5. Amount of TCE (ng) in the roots (left) and leaves (right) of poplar cuttings grown in potting soil 200 or 400 mg l⁻¹ TCE was supplied for 3 weeks. Control: non-inoculated cuttings; W619: cuttings inoculated with *P. putida* W619-TCE. Values are mean ± standard error of 6 biological independent replicates (significance levels: **: $p < 0.05$; ***: $p < 0.01$).



TCE evapotraspirato da talee inoculate e non inoculate

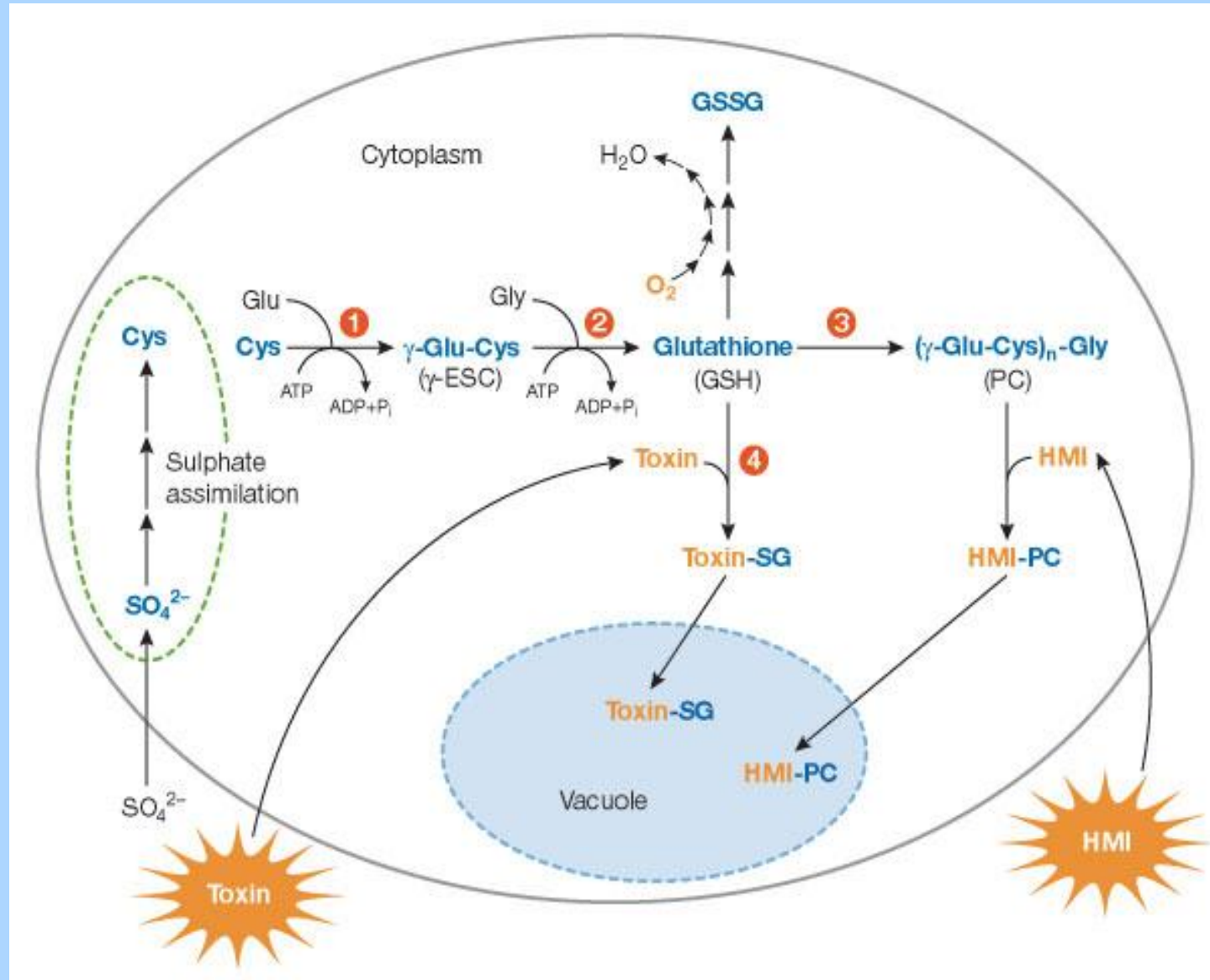
L'inoculazione con il ceppo di *P. Putida* W619 ha ridotto la quantità di TCE evapotraspirato.

Fig. 6. Total amount of TCE ($\text{ng cm}^{-2} \text{h}^{-1}$) evapotranspired through the leaves of non-inoculated poplar cuttings and cuttings inoculated with *P. putida* W619-TCE, supplied with 200 and 400 mg l^{-1} TCE. Values are mean \pm standard error of 3 biological independent replicates (significance level: ***; $p < 0.01$).

Dai risultati dell'estrazione di TCE ad opera di radici e foglie e dall'evapotraspirazione attraverso le foglie si può dedurre che il ceppo di *P. putida* W619-TCE protegge il suo ospite dagli effetti fitotossici del TCE e ne incrementa la degradazione, ne consegue un minor accumulo del solvente nei tessuti vegetali e di una minor evapotraspirazione nell'ambiente dello stesso.

Questi risultati hanno grande significato visto che l'evapotraspirazione dei contaminanti e la loro fitotossicità sono ostacoli all'applicazione sul campo delle tecniche di phytoremediation.

IL GLUTATIONE ED I SUOI RUOLI



Detossificazione mediata dal glutatione (GSH)

Coniugazione con GSH

**Catabolismo ad opera delle
fitochelatina sintasi**

**Compartimentazione
vacuolare e
degradazione mediata da
gamma glutammil
transpeptidasi**

Il glutatione riveste grande importanza negli organismi vegetali poichè non solo è coinvolto nei processi di detossificazione ma è fondamentale in alcune vie biosintetiche secondarie e nel sensing dello stato ossidoriduttivo cellulare.

Function of phytochelatin synthase in catabolism of glutathione-conjugates

Ralph Blum^{1,†}, Andreas Beck^{1,†,‡}, Arthur Korte¹, Anna Stengel¹, Thomas Letzel², Klaus Lenzian¹ and Erwin Grill^{1,*}

¹*Lehrstuhl für Botanik, and*

²*Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere, Technische Universität München, D-85350 Freising, Germany*

Received 1 September 2006; revised 18 October 2006; accepted 19 October 2006.

*For correspondence (fax +49 8161 715432; e-mail erwin.grill@wzw.tum.de).

†These authors contributed equally to this work.

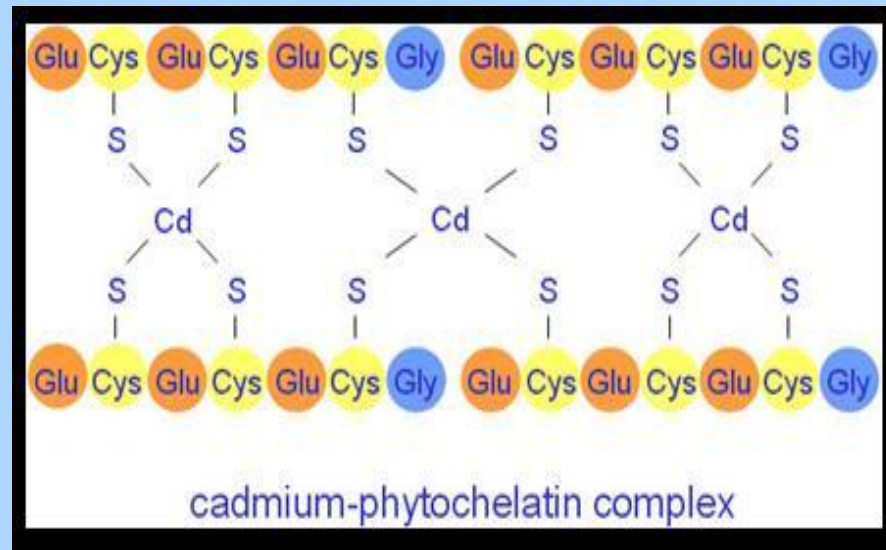
‡Present address: Botanische Staatssammlung München, D-80638 München, Germany.

Questo articolo si focalizza sul ruolo della fitochelatina sintasi nel determinare il catabolismo dei composti coniugati al glutatione.

In questo lavoro sono stati utilizzati mutanti di *Arabidopsis* per i due geni che codificano le fitochelatina sintasi. L'uso di MCB come substrato per il glutatione ha permesso di tracciare la via degradativa regolata dalle PCS.

FITOCHELATINE

- Le fitochelatine hanno un ruolo molto importante nella detossificazione dei metalli pesanti e nel catalizzare la degradazione dei composti coniugati al glutatione
- Sono formate da GSH e due molecole di gamma glutammil cisteina
- Prodotte dalle fitochelatine sintasi (PCS) che aggiungono, o rimuovono, gamma glutammil cisteina dal glutatione (Glu-Cys-Gly)
- Le PCS sono overespresso in presenza di metalli pesanti
- I gruppi tiolici delle fitochelatine possono coordinarsi con conspecie elettrofile ed immobilizzarle



CATABOLISMO DEL GS-BIMANE IN SEEDLING E COLTURA CELLULARE TRAMITE SPETTROMETRIA DI MASSA

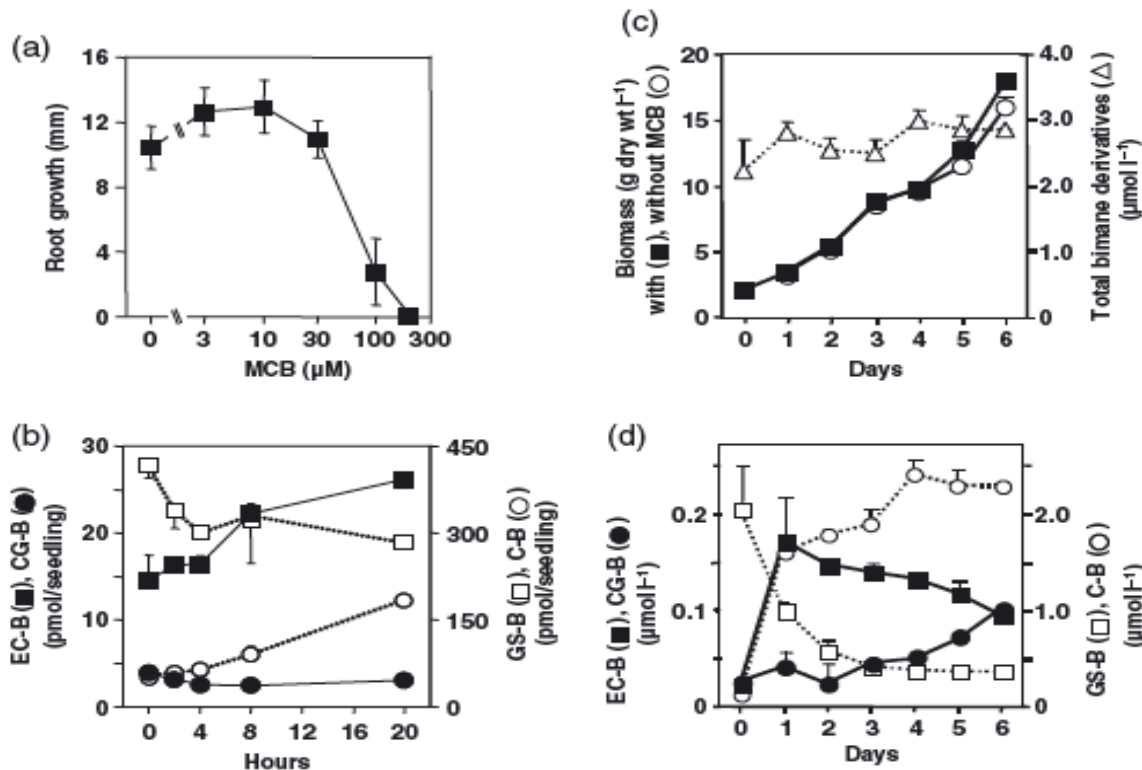


Figure 1. Metabolism of bimane-GS-conjugate (GS-bimane) in Arabidopsis.

(a) Effect of varying monochlorobimane (MCB) concentrations on root growth of Arabidopsis seedlings. Four-day-old seedlings were transferred to a medium containing MCB. Root growth was determined after 3 days. Mean values and SD include 20 seedlings for each data point.

(b) Turnover of GS-bimane. Arabidopsis seedlings were exposed to $5 \mu\text{M}$ MCB for 4 h, were washed and transferred into medium without MCB. At this time point, bimane derivatives of seedlings were analysed from cell-free extracts ($t = 0$ h).

(c,d) Growth of a cell-suspension culture in the presence and absence of $5 \mu\text{M}$ MCB. (c) Total amount of bimane derivatives within the cells; (d) levels of catabolites from GS-bimane. The first sample was analysed 10 min after administration of MCB. Values represent means of duplicates (\pm SD).

- Dopo 6 giorni la maggior parte del GS-Bimane è stato catabolizzato a C-Bimane
- La comparsa di CG-Bimane indica la presenza di un secondo pathway catabolico

I doppi mutanti per AtPCS1 E AtPCS2 hanno palesato l'esistenza di una seconda via di degradazione dei composti coniugati al glutatione

Sia le fitochelatine sintasi che la gamma glutammil transferasi producono X-Cys, la quale può persistere nella pianta o soggetta ad ulteriori processi catabolici.

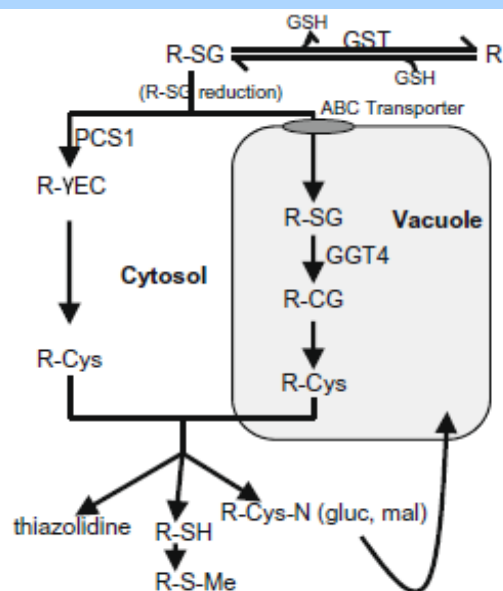
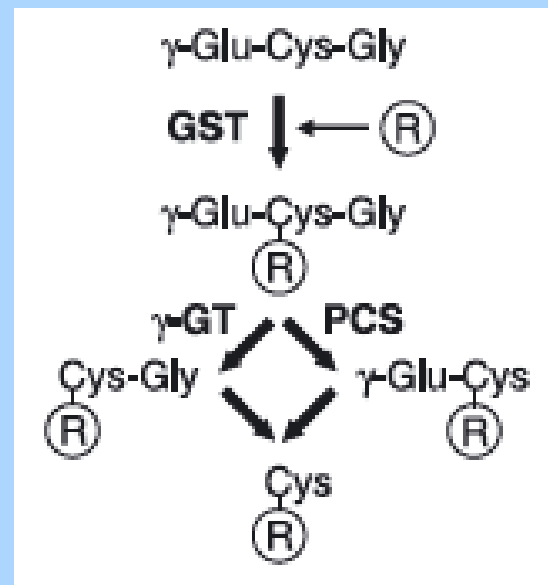


Fig. 2. Schematic of two alternative glutathione conjugate degradation pathways observed in Arabidopsis. Pathway one proceeds via initial degradation from the amino terminus following import to the vacuole by an ABC transporter. Pathway two is cytosolic and proceeds via initial degradation from the carboxy terminus. In both cases prior reduction of a keto to an alcohol group will prevent elimination of GSH. The dipeptidases required to produce cysteine conjugates for both pathways have not been identified in Arabidopsis. Phytochelatin synthase 1 (PCS1) requires divalent metal ions to promote the carboxypeptidase activity. γ -Glutamyl transpeptidase 4 (GGT4) activity is greater in roots than leaves however *ggt-4* plants demonstrate that this GGT mediates the majority of GSH-conjugate degradation in both tissues (Ohkama-Ohtsu et al., 2007).

Questi meccanismi detossificanti sono alla base dei sistemi di protezione delle piante da molecole tossiche, esogene od endogene, e sono state sfruttate nello sviluppo di piante d'interesse agronomico resistenti ai pesticidi.

Conclusioni

- Nella prospettiva di un possibile miglioramento biotecnologico la comprensione dei meccanismi degradativi presenta numerose applicazioni nelle piante destinate alla fitodegradazione.
- Manipolando il turnover dei GS-coniugati potremmo essere in grado **rendere più efficiente il processo di detossificazione**.
- Parallelamente l'uso di endofiti garantirebbe una minor fitotossicità, una maggior crescita (e quindi di biomassa) e performance degradative.
- L'uso integrato di piante e microrganismi geneticamente modificati che lavorino accoppiati potrebbe condurre ad un aumento della capacità fitodegradativa, favorendo l'applicazione in campo di tecniche di phytoremediation.