

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**

**FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE,
FISICHE E NATURALI**

TESI DI DOTTORATO

IN

**BIOLOGIA AVANZATA
XX CICLO**

**Meccanismi di risposta precoci allo
stress da metalli pesanti in piante
acquatiche**

**Tutor
Prof. Rosa Castaldo**

**Dottoranda
Dott.ssa Barbara Conte**

**Cotutor
Prof. Salvatore Cozzolino**

**Coordinatore
Prof. Silvana Filosa**

ANNO ACCADEMICO 2006/2007

INDICE

INTRODUZIONE

1. Inquinamento delle acque	pag. 4
2. Le piante come bioindicatori e bioaccumulatori	pag. 5
3. Vantaggi e svantaggi della fitodepurazione	pag. 11
4. Sostanze inquinanti	pag. 15
5. I metalli pesanti	pag. 18
5.1 Meccanismo di accumulo dei metalli pesanti nelle piante	pag. 21
5.2 Meccanismi di metallo-tolleranza	pag. 25
5.3 Effetti tossici dei metalli sulle piante	pag. 30
6. Attività dell'enzima fenilalanina ammoniac lasi (PAL)	pag. 35
7. Proteomica	pag. 44

Scopo della ricerca e sistema biologico

utilizzato

1. Scopo della ricerca	pag. 51
2. Sistema biologico utilizzato	pag. 54

Materiale e metodi

1. *Colture in vitro* pag. 62
2. Preparazione del terreno di Mohr sterile
a pH 7.5 (Kupra 1964) pag. 62
3. Attività dell'enzima fenilalanina ammoniaca
liasi (PAL) pag. 63
4. Proteomica pag. 65

Risultati

1. Attività dell'enzima fenilalanina ammoniaca
liasi (PAL) pag. 79
2. Proteomica pag. 84

Discussione pag. 91

Bibliografia pag. 99

Introduzione

1. Inquinamento delle acque

L'inquinamento dell'acqua è uno dei problemi ecologici che desta maggiore preoccupazione poiché l'acqua, una risorsa indispensabile per la vita, sta diventando sempre più scarsa nel mondo moderno.

La crescente domanda di acqua per usi civili, industriali ed agricoli deve tenere conto sempre più della diminuzione della disponibilità della risorsa, che talvolta assume aspetti particolarmente critici. Da dati FAO si può prevedere che a partire dall'anno 2025, oltre 50 nazioni nel mondo, per una popolazione complessiva di 3 miliardi di persone, si troveranno a fronteggiare croniche carenze idriche. Per questo motivo, ormai da alcuni anni, il mondo scientifico e tecnico è impegnato nella gestione del patrimonio idrico e rivolge sempre maggior attenzione al reperimento di risorse alternative, anche se di qualità scadente, da riservare a settori produttivi tradizionalmente più esigenti che potrebbero così liberare risorse più pregiate da destinare ad usi civili. In Italia la gestione della risorsa idrica è diventata materia su cui sempre più spesso si

confrontano il mondo della ricerca, quello della Pubblica Amministrazione, delle Aziende gestitrici e quello degli utenti civili, agricoli ed industriali. I consumi idrici italiani sono stimabili in 45,5 miliardi di metri cubi annui di cui 7,9, per usi civili e domestici, 28,1 per l'agricoltura e 9,5 per l'industria. Da questi dati risulta quindi che l'agricoltura è responsabile di circa il 60% dei consumi idrici totali del paese. Poiché l'uso urbano delle acque non è distruttivo ma soltanto modificativo delle caratteristiche fisiche e chimiche, è possibile dopo un adeguato trattamento, il riuso per altre finalità.

2. Le piante come bioindicatori e bioaccumulatori

Il progressivo deterioramento della qualità ambientale e il coinvolgimento dell'inquinamento sulla salute umana hanno promosso lo sviluppo di ricerche e tecnologie per il risanamento ambientale. In siti quali le discariche o i corsi d'acqua che convogliano rifiuti urbani, le piante sono i principali bersagli della contaminazione da metalli pesanti, pesticidi, farmaci ed altro. Tecnologie basate su metodi fisici (come flottazione, separazione magnetica e gravitazionale, setacci molecolari) procedure chimiche e trattamenti elettromagnetici sono divenute disponibili

per separare o concentrare i metalli. Tuttavia la maggior parte di questi trattamenti tecnologici hanno elevati costi di installazione e mantenimento e, in genere, richiedono specifiche conoscenze ingegneristiche (Bargagli, 1998a). L'uso di piante selezionate o geneticamente modificate in grado di accumulare metalli pesanti, da utilizzare nel disinquinamento ambientale, è una delle tecnologie emergenti di maggiore interesse (fig. 1).

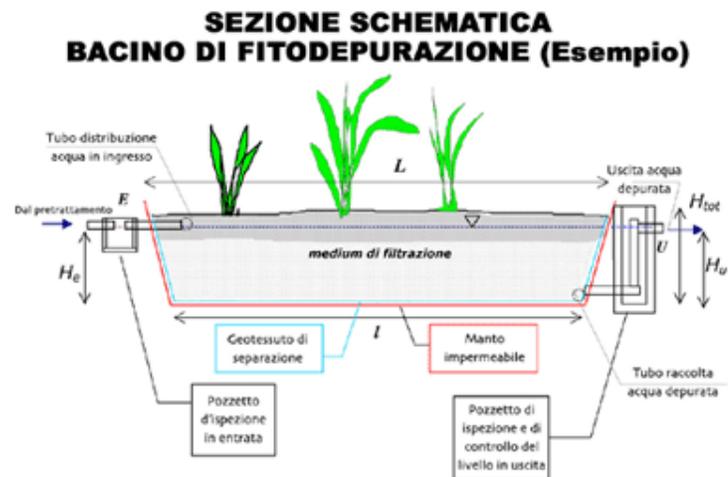


Fig. 1 - Schema di un impianto di fitodepurazione

L'impiego delle piante nel biorisanamento è stato denominata "*phytoremediation*" (Raskin, 1996) e può essere distinta in:

- a) *fitoestrazione*, ossia uso di piante per la rimozione di metalli pesanti tossici dal suolo;
- b) *rizofiltrazione*, che consiste nell'impiego di radici vegetali per il disinquinamento di acque inquinate;
- c) *fitostabilizzazione*, ossia uso di piante per stabilizzare il suolo evitando la diffusione di residui tossici trasportati da processi di dilavamento (Salt et al., 1995a).

Alla fine degli anni '60, scienziati svedesi utilizzarono per la prima volta i muschi per valutare l'inquinamento dei metalli pesanti in Scandinavia (Ruhling and Tyler, 1970). Dopo di allora, l'uso di tali organismi per il monitoraggio ambientale si è sistematicamente esteso (Samecka et al., 1997; Fernandez et al., 2000; Vasconcelos and Tavares, 1998). Il monitoraggio dell'inquinamento ambientale mediante l'uso degli organismi viventi è definito **biomonitoraggio**. Questo tipo di controllo si basa sul principio che una sostanza tossica è rilevata negli organismi viventi ad essa esposti, i quali sono in grado di indicarne la presenza e, in prima approssimazione, la quantità presente nell'ambiente. In genere ogni organismo vivente possiede una diversa risposta ai diversi fattori ecologici, sia naturali sia antropici; poiché l'inquinamento atmosferico determina

delle variazioni nell'ambiente interessato, queste si riflettono sugli organismi (Manning and Feder, 1980). Indipendentemente dalla presenza di manifestazioni visibili, è possibile sottoporre ad analisi chimica i tessuti vegetali per verificare la presenza e misurare le concentrazioni di inquinanti quali metalli pesanti. Per ciò che riguarda quest'ultimo aspetto, c'è da sottolineare che le foglie delle piante vascolari e i talli lichenici e briofitici possono svolgere la funzione di filtri che raccolgono questi inquinanti dall'aria. Siccome la deposizione degli inquinanti e il loro assorbimento da parte delle strutture vegetali è in funzione della loro concentrazione nell'aria, l'analisi elementare di queste può essere utilizzata nel biomonitoraggio ambientale. Per quel che riguarda la manifestazione e il tipo di sintomi, questi possono essere influenzati dalla concentrazione e dal tipo di inquinante, dai parametri ambientali, dalle caratteristiche intrinseche della pianta considerata (caratteristiche genetiche e ontogenetiche). I sintomi indotti sugli organismi vegetali dagli inquinanti possono essere raggruppati in tre categorie fondamentali: alterazioni della crescita, clorosi e necrosi; in condizioni naturali i sintomi possono essere associati o succedersi nel tempo. Gli organismi

biologici possono essere impiegati nel monitoraggio dell'inquinamento atmosferico sia come bioindicatori, sia come bioaccumulatori. Un organismo è considerato un "bioindicatore" quando presenta caratteristiche che compaiono in risposta a diversi gradi di inquinamento. I principali parametri utilizzati negli studi di biomonitoraggio sono: a) modificazione morfologiche, b) variazioni della vitalità (es. variazioni del grado di copertura dell'area in esame da parte del bioindicatore), c) alterazioni funzionali, d) eventuali capacità di accumulo di sostanze inquinanti. Un bioindicatore ottimale è quello per il quale è possibile stabilire una precisa correlazione tra le modificazioni biologiche (sintomi) e i livelli attuali di un dato inquinante tanto da permettere un'analisi quantitativa oltre che qualitativa del tasso di inquinamento. Vengono definiti "bioaccumulatori" quegli organismi grazie ai quali è possibile, misurando il contenuto di un dato inquinante nei loro tessuti, ricostruirne il profilo di deposizione sul territorio. E' evidente che è possibile utilizzare un organismo come bioaccumulatore solo se presenta date caratteristiche quali:

1. capacità di accumulare la sostanza in esame fino ad elevate concentrazioni;

2. alta tolleranza nei confronti della sostanza in esame (in mancanza di questo requisito l'organismo non permetterebbe di evidenziare livelli elevati di inquinamento poiché morirebbe prima);
3. possibilità di definirne l'età, dal momento che l'accumulo della sostanza è funzione della concentrazione nell'aria ma anche del tempo di esposizione; è quindi necessario analizzare sempre organismi o parti di essi che abbiano la stessa età e quindi lo stesso periodo di esposizione (Nimis, 1998; Cenci, 1998).

Bioindicatori e bioaccumulatori, quando consentono di ottenere realmente dati quantitativi e di identificare con precisione modificazioni di tassi di inquinamento nel tempo, vengono definiti "*biomonitors*". Purtroppo la maggior parte degli studi condotti con biomonitors, mostrano il grave handicap di non consentire di stabilire una relazione matematica precisa tra i dati biologici e i livelli di inquinamento.

Esistono due possibilità per attuare un programma di biomonitoraggio:

- 1) *monitoraggio passivo*, cioè osservazioni sulla flora locale o sulle piante coltivate;

2) *monitoraggio attivo*, cioè esposizione di specie indicatrici in condizioni standardizzate.

Per quello che riguarda la selezione dei bioindicatori per il monitoraggio passivo è necessario che essi possiedano, oltre alla suddetta evidente sensibilità al carico inquinante, anche:

- ampia distribuzione sull'area sorvegliata per rendere i dati raccolti attendibili dal punto di vista statistico;
- lungo ciclo vitale.

Attualmente vengono adottati vari sistemi per il disinquinamento, ma il problema è ancora ben lungi dall'essere risolto in modo soddisfacente. I rimedi da adottare devono essere non solo efficaci, ma anche di basso costo. Negli ultimi tempi l'attenzione si è focalizzata soprattutto su quegli organismi in grado di accumulare metalli pesanti: tra i sistemi impiegati, i più efficaci si sono dimostrati i molluschi bivalvi e alcuni tipi di piante.

3. Vantaggi e svantaggi della fitodepurazione

La legislazione UE è costantemente adattata a proteggere e migliorare la qualità delle risorse idriche europee. Molti pesticidi richiedono dei sistemi specifici

di trattamento a causa della loro alta stabilità chimica e/o bassa biodegradabilità (Oller et al., 2006)

Il termine "sistema naturale di depurazione" implica, nella sua accezione più rigorosa, che il processo avvenga senza l'utilizzo di macchine nè di energie esterne, come avveniva nel passato. Nell'accezione più moderna (D. Lgs. 152/2006) non è più possibile ritrovare l'integrità totale di questo concetto. Oggi annoveriamo più o meno propriamente, sotto la definizione di "sistema naturale di depurazione " sistemi quali :

- subirrigazione;
- fertirrigazione;
- vassoi fitoassorbenti;
- lagunaggio biologico;
- fitodepurazione in tutte le sue varianti.

La fitodepurazione è un processo naturale per depurare le acque reflue che sfrutta i processi di autodepurazione tipici delle aree umide. L'etimologia della parola fitodepurazione (dal greco *phito* = pianta) può trarre in inganno nel far ritenere che siano le piante gli attori principali nei meccanismi di rimozione degli inquinanti. In realtà le piante hanno il ruolo di favorire la creazione di microhabitat idonei alla crescita della flora microbica, vera protagonista della depurazione biologica.

La rapida diffusione di questa tecnica è legata alla possibilità di ottenere elevati standard qualitativi negli effluenti a costi di costruzione, e soprattutto di gestione, più bassi rispetto alle tecnologie tradizionali.

Le tecniche di fitodepurazione esistenti possono essere classificate in base all'ecologia delle piante acquatiche utilizzate:

- sistemi a idrofite galleggianti (pleustofite);
- sistemi a idrofite radicate sommerse;
- sistemi a macrofite radicate emergenti (alofite);
- sistemi a microfite (alghe unicellulari).

Il successo dei sistemi di fitodepurazione è imputabile a fattori economici e pratici. Se non vi sono grandi differenze nei costi di realizzazione rispetto alla depurazione tradizionale lo stesso non si può dire per i costi di esercizio e manutenzione. Il funzionamento prescinde dal massiccio e costante impiego di energia elettrica e la manutenzione, limitata a periodici controlli, può essere eseguita da personale non specializzato. Il loro impatto paesaggistico è nullo, o addirittura positivo. In ultima analisi sono tecniche in grado di diminuire decisamente l'effetto antropico sull'ambiente, sia dal punto di vista dell'emissione di sostanze inquinanti sia come creazione di aree verdi.

Quando, però, la quantità di sostanze inquinanti è elevata, i processi sopra citati non risultano efficaci ai fini di una buona depurazione e si possono verificare diversi fenomeni che portano alla diminuzione di ossigeno disciolto nel mezzo acquatico, per esempio un arricchimento delle acque in sali di fosforo e azoto ha come conseguenza un aumento della produttività di alghe ed un cambiamento nella struttura della comunità fitoplanctonica, con una produzione eccessiva della biomassa di produttori primari rispetto a quella che può essere utilizzata dagli organismi erbivori. Inoltre l'eccesso di produzione primaria, non più controllata dalla catena del pascolo, fa sì che l'energia fissata venga trasferita alla catena del detrito. Questi composti, quindi vanno incontro ad un processo di mineralizzazione che avviene ad opera di microrganismi con un consumo di ossigeno disciolto, che se non è compensato da un adeguato rinnovo può dar luogo ad una carenza di ossigeno e quindi a forti perturbazioni a vari livelli delle comunità acquatiche, anche perchè in ambiente anaerobio compaiono sostanze tossiche quali ammoniaca, solfuri, ammine ecc... . Naturalmente per ogni sostanza che noi annoveriamo tra quelle inquinanti esiste una concentrazione che può essere emessa e/o tollerata

nell'ambiente definita come "limite di accettabilità" o "di emissione". A sua volta questo valore può essere definito o come "assoluto" quando è rappresentato da un valore unico che viene applicato a qualsiasi effluente ed in qualsiasi circostanza, o come "relativo" quando è diverso da caso a caso, per esempio in base alla natura dei contaminanti che vengono scaricati. Infine i danni che vengono provocati dall'inquinamento non sono soltanto ecologici, ma comportano anche problemi a livello igienico ed economico per le popolazioni che vivono nell'ambiente deteriorato. L'inquinamento delle acque costituisce un problema crescente con effetti sullo stato di salute dell'ambiente, dell'uomo e della sua qualità di vita.

4. Sostanze inquinanti

L'uomo, gli animali e le piante sono esposti ad una enorme varietà di sostanze chimiche estranee all'organismo, o xenobiotici, che possono essere di origine naturale o antropogenica. Queste sostanze potenzialmente tossiche comprendono metalli e altri composti inorganici ed un gran numero di complesse molecole organiche. L'uso di sostanze chimiche elaborate dall'uomo, e la loro immissione nell'ambiente, non è certo una pratica

recente, tuttavia solo verso la metà del 1900 il fenomeno ha assunto dimensioni più preoccupanti. Le principali fonti da cui provengono sono localizzate nel settore industriale, agricolo e domestico. Molte sostanze che l'uomo immette nell'ambiente possono essere lentamente trasformate dagli organismi viventi, specialmente dai decompositori, sino ad essere completamente demolite e sono definite biodegradabili; altre sostanze invece non sono biodegradabili (o lo sono molto lentamente). La maggior parte delle sostanze inquinanti che si riversano nelle acque sono in grado di accumularsi negli organismi perché sono prevalentemente idrofobiche e attraverso la catena trofica vengono trasferite da un organismo all'altro subendo un progressivo aumento di concentrazione mediante il processo di "amplificazione biologica" di una sostanza tossica, che, inizialmente presente nel terreno o nelle acque, si accumula prima nelle piante, successivamente negli erbivori che se ne nutrono e più tardi nei carnivori. L'accumulo delle sostanze inquinanti, che prende il nome di bioaccumulo, può avvenire attraverso due differenti meccanismi:

a) La bioconcentrazione: captazione diretta degli xenobiotici, disciolti nell'acqua attraverso le branchie o

la pelle. E' un fenomeno di natura fisica che dipende unicamente dalla lipofilicità del composto (le sostanze liposolubili vengono assorbite più facilmente di quelle idrosolubili).

b) La biomagnificazione: accumulo crescente di inquinanti, attraverso l'ingestione di cibo contaminato, che raggiunge in un organismo quantità più elevate rispetto agli organismi che lo precedono nella catena alimentare.

Una sostanza tossica è capace di produrre delle risposte dannose in un sistema biologico, alterandone seriamente le funzioni o producendone la morte. Una volta immessa in una catena alimentare si propaga rapidamente attraverso tutti i suoi anelli. Nel passaggio da un anello all'altro si concentra sempre più, raggiungendo livelli preoccupanti soprattutto in quegli organismi sfruttati dall'uomo a fini alimentari. Virtualmente ogni sostanza chimica, conosciuta e non, può produrre un danno o la morte se presente in concentrazioni sufficientemente elevate. Tutte le sostanze sono perciò potenzialmente tossiche, la dose è un fattore discriminante per determinare quando una sostanza produce effetti indesiderati, danni severi o la morte. Per produrre una manifestazione tossica, un agente chimico o un suo

metabolita deve potere interagire con specifici siti dell'organismo ed essere presente in una appropriata concentrazione per un periodo sufficientemente lungo: perciò l'eventuale manifestazione tossica dipende dalle proprietà chimico-fisiche dell'agente chimico, dall'esposizione e dalla sensibilità del sistema biologico.

Il compartimento ambientale più esposto all'inquinamento è quello acquatico infatti, nelle acque si riversano un'ampia varietà di composti tossici sotto forma di effluenti zootecnici, scarichi di processi industriali, rifiuti domestici (La Rocca, 2005).

5. I metalli pesanti

Il termine "*metallo pesante*" si riferisce a quegli elementi metallici che presentano densità superiore a 5 g/cm^3 (Holleman and Wiberg, 1985). I circa 40 elementi che rientrano in questa categoria si comportano usualmente come cationi e sono caratterizzati da diversi stati di ossidazione (*elementi metallici di transizione*), da bassa solubilità dei loro ossidi, da grande attitudine a formare complessi e da grande affinità per i solfuri (Riffardi and Levi-Minzi, 1989). In base a tali caratteristiche possono essere definiti *metalli pesanti* elementi chimici come piombo, cadmio e mercurio, questi

metalli non sono essenziali per il metabolismo e pertanto determinano fenomeni di tossicità anche a bassissima concentrazione intracellulare. Altri elementi *pesanti* quali ferro, rame, zinco, cobalto e manganese sono micronutrienti essenziali per il metabolismo (come attivatori o regolatori enzimatici ecc...); tuttavia il loro apporto eccessivo risulta estremamente tossico (Siedlecka, 1995; Bargagli, 1998a). Probabilmente, il termine *metallo pesante* è stato adottato in quanto evoca il concetto di tossicità e permanenza nei sistemi biologici, oltre che il lungo periodo di residenza o persistenza nell'ambiente che li caratterizza.

La quasi totalità delle piante è in grado di accumulare *metalli pesanti*, quali Fe, Zn, Mn, Cu, indispensabili ai loro processi vitali. Certe piante possono accumulare anche altri tipi di ioni metallici, che apparentemente non svolgono una funzione biologica, ma che al contrario risultano notevolmente tossici per la maggior parte degli organismi viventi.

L'inquinamento da metalli tossici di acque e suoli è aumentato notevolmente per effetto delle attività antropiche dovute principalmente a combustione di idrocarburi fossili, attività minerarie, uso di fertilizzanti, pesticidi e rifiuti urbani. I processi che

avvengono ad alta temperatura immettono nell'atmosfera metalli in fase gassosa o sottoforma di particolato. I metalli immessi nell'atmosfera (principalmente As, Cd, Cu, Hg, Pb, Sn e Zn), prima di essere depositati al suolo e in mare, sono trasportati dai venti in funzione della loro forma fisico-chimica. La maggior parte del particolato più grossolano è depositato in una fascia di 10 Km dalla fonte di emissione. Per i metalli in fase gassosa, la deposizione può avvenire a distanze molto superiori, fino a 10.000 Km dalle fonti di emissione. I metalli in traccia immessi nell'ambiente, depositati sulla terra, nelle acque e nei sedimenti, sono soggetti a cicli geochimici globali che ne determinano una continua circolazione tra i vari comparti ambientali (Zenk, 1996).

I metalli pesanti, giunti al suolo direttamente con le particelle aerotrasportate e depositate in forma umida o secca, oppure indirettamente, tramite le acque meteoriche che dilavano gli inquinanti depositati sulla vegetazione, possono subire diversi processi quali adsorbimento, complessazione e precipitazione in funzione delle caratteristiche chimico-fisiche del suolo (Aromolo et al., 1999). L'analisi di diverse specie vegetali sia terrestri che acquatiche ha mostrato che esse

bioaccumulano efficacemente metalli pesanti, in condizioni di inquinamento. Molte piante, tra cui briofite, alghe e piante superiori, hanno evoluto la capacità di accumulare elementi in traccia a livelli superiori di quelli presenti nel suolo o nelle acque o anche rispetto a specie che crescono nella stessa area. Le briofite, per l'elevato rapporto superficie/volume e la presenza di una cuticola molto sottile, accumulano efficacemente metalli pesanti. Esse, infatti, concentrano nei loro tessuti metalli pesanti in misura superiore rispetto all'ambiente e per tale motivo vengono utilizzate come bioindicatori dell'inquinamento ambientale (Brown, 1984; Tyler, 1990).

5.1 Meccanismo di accumulo dei metalli pesanti nelle piante

Le piante possiedono un efficace sistema di difesa intracellulare per chelare i metalli pesanti. Tale sistema è costituito dalle fitochelatine (PC), peptidi la cui massa molecolare si aggira intorno ai 2-3 KDa, costituiti da cisteina, acido glutammico, glicina o alanina. Le fitochelatine non sono sintetizzate sui ribosomi e non richiedono un mRNA: la loro struttura coinvolge il legame γ -glutamil-cisteinico che si forma per azione di

un enzima detto fitochelatin-sintetasi (PC-sintetasi). La sintesi delle fitochelatine è indotta nel momento in cui la pianta è esposta all'azione dei metalli pesanti. Tale induzione non si esercita a livello genetico come nel caso delle metallotioneine, ma a livello metabolico: gli ioni dei metalli pesanti attivano l'enzima PC-sintetasi, promuovendo un processo di polimerizzazione che porta alla formazione di molecole di PC che possono comprendere da 2 a 11 unità glutamilmcisteiniche (Zenk, 1996).

Il meccanismo di accumulo dei metalli pesanti nelle piante può essere suddiviso in tre fasi essenziali: assorbimento a livello radicale, trasporto dei metalli all'interno della pianta, meccanismi di detossificazione (Salt et al., 1995a). Spesso la maggior parte dei metalli nel suolo è legata ai suoi costituenti, per cui, affinché le piante possano accumularli, è necessario che questi elementi vengano resi solubili. La mobilitazione dei metalli legati al suolo può avvenire in diverso modo: molte piante rilasciano, attraverso le radici, delle specifiche molecole (fitosiderofori) che hanno la capacità di chelare e solubilizzare i metalli pesanti (un esempio può essere l'acido avenico delle graminacee). Altre piante sono in grado di ridurre e

conseguentemente mobilizzare gli ioni metallici, grazie all'intervento di specifici riducenti metallici legati alla membrana plasmatica delle cellule radicali. Analizzando delle piante di pisello si è notato, infatti, che individui carenti di nutrienti quali Fe e Cu manifestavano una maggiore capacità a ridurre il Fe(+3) e il Cu(+2); e parallelamente si assisteva ad un incremento nell'assorbimento di elementi quali Fe, Cu, Mn, Mg.

Un'ulteriore modalità di solubilizzazione dei metalli pesanti può essere dovuta all'acidificazione del terreno grazie al rilascio di protoni dalle radici: un basso pH rilascia in soluzione gli ioni metallici. Una volta solubilizzati questi ioni possono entrare nelle radici o per via apoplastica (extracellulare) o per via simplastica (intracellulare); molti metalli entrano nelle cellule vegetali grazie ad un trasporto attivo mediato da carriers o canali specifici. Dalle radici gli ioni metallici possono passare al germoglio mediante i vasi xilematici e, successivamente, essere distribuiti al resto della pianta per mezzo del floema. Per poter giungere allo xilema questi ioni devono necessariamente attraversare l'endodermide che grazie alla banda del Caspary consente il trasporto simplastico, essendo la via apoplastica bloccata. Le piante che accumulano metalli

pesanti devono poter resistere ai loro effetti tossici; ciò si realizza o limitando l'assorbimento dei metalli a livello cellulare, o detossificando il metallo entrato, oppure sviluppando un meccanismo biochimico che sia in grado di renderle resistenti. Molte piante posseggono specifici enzimi per la resistenza ai metalli pesanti, per esempio, le fosfatasi acide della parete cellulare.

Una volta penetrati nelle cellule, i metalli devono essere detossificati e questo può avvenire per chelazione, per precipitazione o per compartimentalizzazione. Per esempio, lo Zn può essere chelato da acidi organici ed accumularsi nel vacuolo, o essere precipitato sottoforma di Zn-fitato. Anche il cadmio è accumulato nel vacuolo dove risulta associato a fitochelatine. Il vacuolo nella pianta può svolgere anche una funzione di difesa. Nel momento in cui la pianta si trova a contatto con i metalli pesanti sono accumulati nel vacuolo dei peptidi a base di glutatione, le fitochelatine, che legano il metallo. Il glutatione stesso, legandosi a numerosi composti potenzialmente tossici (mediante il residuo di cisteina; enzima glutatione S-trasferasi, GST), contribuisce a rimuoverli dal citoplasma trasportandoli nel vacuolo (Alpi et al., 2000).

5.2 Meccanismi di metallo-tolleranza

In presenza degli stessi elementi e nelle stesse condizioni ambientali, le piante possono mostrare tre differenti tipi di comportamento, per cui possono essere classificate in:

- 1) "excluders", piante che hanno sviluppato il meccanismo di "avoidance" (controllo dello stress), che consiste nel prevenire l'assorbimento e la traslocazione degli ioni metallici;
- 2) "indicators", che assorbono ed accumulano metalli tramite meccanismi come la chelazione, localizzazione ed inattivazione chimica, che ne riducono l'effetto tossico; esse sono utili per il biomonitoraggio in quanto la concentrazione dei metalli nei tessuti riflette la loro disponibilità ambientale;
- 3) "accumulators", che tollerano e possono accumulare elevate concentrazioni di metalli nei propri tessuti, spesso indipendentemente dal significato fisiologico o dal livello ambientale di tali metalli (Bargagli, 1998b).

Da quanto detto, si evince che la risposta delle piante allo stress causato dalla tossicità dei metalli risulta molto diversificata, dipendendo, in parte, anche dalla variabilità individuale. I meccanismi di resistenza delle piante alla tossicità dei metalli, dunque, sono

riconducibili a due tipi essenziali di strategia che consistono nel tollerare (indicators e accumulators) o nell'evitare lo stress (excluders), (Marchionni, 1999).

Il concetto di metallo-esclusione ed i meccanismi di protezione contro l'assorbimento e la traslocazione dei metalli non sono ancora ben chiari; si ritiene che la maggior parte delle piante "excluders" prevenga l'assorbimento e la traslocazione degli inquinanti presenti nel suolo immobilizzandoli nella membrana plasmatica delle radici o nelle micorrize. Tali piante riescono, così, a mantenere piuttosto costante la composizione elementare dei loro tessuti interni ed a prevenire eventuali effetti tossici degli inquinanti. (Bargagli, 1998a; Arduini et al., 1996). La relazione simbolica stabilita con i funghi micorrizici rappresenta un valido meccanismo di difesa di tali specie (Marchionni, 1999). Nelle piante "tolleranti", sono stati sviluppati, a livello cellulare, diversi meccanismi di metallo-resistenza, tra cui il sequestro a livello della parete cellulare, la presenza di membrane metallo-tolleranti e di pompe che trasportano attivamente i metalli all'esterno della cellula, la detossificazione enzimatica, la compartimentalizzazione, la riduzione della sensibilità dei target cellulari degli ioni metallici

(Bruins, 2000). La protezione della pianta contro gli effetti tossici dei metalli è assicurata, in primo luogo, dal controllo dell'assorbimento radicale e del trasporto a lunga distanza dei metalli (Briat and Lebrun, 1999). Le radici agiscono come una barriera che limita la traslocazione dei metalli verso il germoglio; la sua capacità di accumulo, tuttavia, varia a seconda della specie. Per esempio, rispetto al cadmio le piante di *pomodoro* risultano più tolleranti delle piante di *fagiolo*, in quanto il loro sistema radicale è più efficiente nell'accumulare il cadmio (Leita et al., 1991; Chung et al., 1992; Obata and Umebayashi, 1993; Salt et al., 1995b); in tal modo, nel sistema radicale si accumula la maggior quantità di metalli, mentre fusto, foglie, frutti e semi ne contengono quantità progressivamente minori. Tuttavia, l'assorbimento di metalli attraverso le foglie può diventare notevole nel caso di inquinanti atmosferici che le raggiungono direttamente attraverso le deposizioni atmosferiche (Bargagli, 1998a). In particolare, una delle ragioni dell'elevata metallo-tolleranza di alcune specie è data dalla capacità di accumulare metalli, soprattutto a livello cellulare, senza permettere ai metalli di penetrare all'interno del protoplasto, che è maggiormente sensibile all'azione tossica dei metalli. Le

cellule radicali a diretto contatto con le soluzioni circolanti nel suolo, sono esposte agli ioni tossici che possono danneggiare la membrana cellulare causando la perdita di potassio dalla cellula, o l'inibizione dell'attività degli enzimi superficiali (Carballeira et al., 1999). In questo caso, un efficiente meccanismo di resistenza contro i metalli ad attività redox è rappresentato da modificazioni strutturali nella membrana plasmatica tali da renderla meno vulnerabile alla perdita di nutrienti o all'inibizione enzimatica (Wainwright and Woolhouse, 1975). A livello intracellulare, le piante metallo-tolleranti possono adottare varie strategie per limitare l'azione tossica di quei metalli che, superando l'ostacolo della parete e della membrana cellulare, riescono a penetrare all'interno della cellula. La metallo-detossificazione all'interno delle cellule si può realizzare anche attraverso il legame con specifici ligandi organici, in questo modo si ha la formazione di complessi metallici non dannosi per la cellula. Ad esempio, sia nelle specie sensibili, sia in quelle metallo-tolleranti, il maggior apporto di alcuni metalli, il cadmio in particolare, può indurre la produzione di peptidi metallo-chelanti, ricchi di residui cisteinici, generalmente definiti fitochelatine. Molti ricercatori hanno ipotizzato che le PCs sono

direttamente coinvolte nel controllo omeostatico degli ioni metallici all'interno della cellula vegetale.

Un ulteriore meccanismo di metallo-resistenza è rappresentato dall'accumulo preferenziale dei metalli in organi senescenti, per esempio le foglie, in modo che, con l'abscissione di tali organi, si ottenga anche la rimozione dell'eccesso di metalli dalla pianta (Bargagli, 1998a). La metallo-tolleranza può essere una proprietà costitutiva (determinata geneticamente), indotta (in seguito all'esposizione preventiva a metalli pesanti), oppure di natura mista, in quanto risulta determinata geneticamente, ma il suo grado di espressione dipende dalle condizioni ambientali. La metallo-tolleranza costitutiva è stabile e non influenzabile dalle condizioni ambientali, mentre la metallo-tolleranza indotta, essendo una forma di acclimatazione all'ambiente (Okland et al., 1997), persiste finché sussistono gli specifici fattori di stress che ne hanno determinato l'insorgenza (Shaw, 1990; Godbolb and Kettner, 1991; Subhadra and Panda, 1994; Rout et al., 2000).

5.3 Effetti tossici dei metalli sulle piante

Molti metalli non sono essenziali per il metabolismo e sono potenzialmente dannosi per gli organismi viventi. Ad alta concentrazione intracellulare, tuttavia, sia i metalli essenziali, sia quelli non essenziali risultano tossici, in quanto possono danneggiare la membrana cellulare, alterare la specificità enzimatica, disorganizzare le funzioni cellulari e danneggiare la struttura del DNA con effetti genotossici per la cellula. Gli effetti tossici dei metalli insorgono a causa delle interazioni che essi stabiliscono con componenti cellulari essenziali tramite legami ionici e/o covalenti, risultanti in una alterazione delle attività metaboliche cellulari (Bruins et al., 2000). Studi condotti in laboratorio su numerose specie vegetali esposte *in vitro* ai metalli hanno evidenziato che questi elementi colpiscono molti processi essenziali per la vita della cellula vegetale. In particolare, i metalli possono determinare:

- Inibizione della crescita radicale: lo sviluppo delle radici è molto sensibile all'azione dei metalli e, per tale ragione, la riduzione della crescita radicale è spesso usata come parametro per stimare la tossicità dei metalli (Arduini et al., 1996; Bargagli, 1998a;

Goldbold and Kettner, 1991; Sorrentino et al., 1997; Vázquez et al., 1987; Wierzbicka, 1988). Nonostante numerosi studi, resta tuttora da chiarire se la riduzione della crescita radicale sia determinata dalla inibizione della crescita per divisione cellulare, o da quella per distensione, oppure da entrambe. Fattore essenziale per lo sviluppo radicale è la conservazione dell'integrità della regione apicale del sistema radicale, comprendente le cellule meristematiche e la zona di distensione. È stato dimostrato che il cromo VI e il rame influenzano lo sviluppo radicale danneggiando l'integrità della membrana cellulare delle cellule meristematiche (Arduini et al., 1996). I danni a livello radicale determinano importanti effetti secondari come la riduzione dell'assorbimento e della traslocazione degli elementi nutritivi e dell'acqua e, quindi, la riduzione della crescita del germoglio, la clorosi delle foglie, ecc... (Leita et al., 1991).

- Riduzione della crescita del germoglio: la riduzione della crescita del germoglio rappresenta, nella maggior parte dei casi, una conseguenza secondaria degli effetti tossici causati direttamente dai metalli. Essa può essere conseguenza di danni a livello

radicale, di un ridotto apporto di elementi nutritivi ed acqua a causa della compartimentazione tra essi ed i metalli per l'assorbimento e la traslocazione (Moral et al., 1994; Ouzounidou, 1994; Siedlecka, 1995). La riduzione dello sviluppo del germoglio può essere addebitata anche alla inibizione da parte dei metalli, della sintesi e/o traslocazione delle citochine.

- Diminuzione attività fotosintetica: in alcune specie, il trattamento con metalli pesanti determina un rallentamento nel trasferimento degli elettroni a livello del PSII (Ouzounidou, 1994).
- Diminuzione contenuto clorofilla: diversi metalli come rame o mercurio hanno elevata affinità per i gruppi sulfidrilici e possono causare l'inibizione della biosintesi della clorofilla (Brune et al., 1995; Bargagli, 1998a).
- Riduzione dell'apporto e della traslocazione di elementi nutritivi ed acqua: l'assorbimento e la traslocazione dei metalli tossici all'interno delle piante risulta spesso in competizione con quella degli elementi chimici essenziali, per cui si determina una notevole alterazione della nutrizione minerale delle piante (Ouzounidou, 1994; Moral et al., 1994; Siedlecka, 1995).

- Alterazione degli organelli cellulari e della parete: in *Chara vulgaris* (alga verde macrofita), l'esposizione *in vitro* a piombo (in forma organica ed inorganica), cadmio e mercurio provoca diverse conseguenze a livello cellulare, tra cui la disorganizzazione delle microfibrille di parete con la formazione di protuberanze (in seguito ad esposizione a cadmio e piombo inorganico), la dilatazione del RER e l'incremento dei grana plastidiali (mercurio), nonché l'alterazione del sistema di membrane tilacoidali (piombo organico), (Heumann, 1987). I danni ultrastrutturali prodotti da metalli pesanti spesso inducono una prematura senescenza degli organi colpiti (Ouzounidou et al., 1997).
- Modificazione delle funzioni della membrana plasmatica: gli elementi metallici che hanno elevata affinità per i gruppi carbossilici e sulfidrilici possono indurre un decremento dell'attività dell'ATPasi plasmatica che funge da pompa protonica e che, quindi, è coinvolta nel mantenimento del potenziale di membrana (Bargagli, 1998a).
- Inibizione dei movimenti fototattici e gravitattici: nell'alga verde flagellata *Haematococcus lacustris* la somministrazione *in vitro* di Cu^{2+} determina la

perdita immediata della capacità di rispondere fototatticamente agli stimoli luminosi, in quanto inibisce la trasduzione di tale stimolo (Brune et al., 1995); in *Euglena gracilis*, il rame e il mercurio causano l'alterazione dei movimenti gravitattici che da positivi divengono negativi, mentre il piombo provoca una forte riduzione della velocità di movimento (Stallwitz and Header, 1994).

- Effetti genotossici come alterazione della mitosi, effetti clastogenesi: i metalli di transizione sono genotossici in quanto sono capaci di legarsi al nucleo cellulare causando danni promutagenici, che includono modificazione delle basi azotate del DNA, rottura della doppia elica del DNA, riarrangiamenti e depurinazione. Questi danni sono conseguenza dell'azione ossidante sul DNA esercitata dall'ossigeno attivo ed altri radicali liberi prodotti in reazioni redox catalizzate dai metalli (Kasprzak, 1995). Il cloruro ed il nitrato di piombo, ad elevate concentrazioni, inducono riduzione all'attività mitotica (a causa del disassemblaggio dei microtubuli del fuso mitotico). A basse concentrazioni, invece, determinano la rottura dei cromosomi, inducendo quindi un effetto clastogenico (Wierzbicka, 1988).

- Formazione di radicali liberi: diversi componenti cellulari possono essere danneggiati dai radicali liberi ad azione antiossidante, che si originano in reazioni redox catalizzate da metalli (Hiramoto et al., 1996; Fry, 1998). Le cellule vegetali sono dotate di specifici meccanismi per la rimozione di questi radicali liberi che coinvolgono sistemi antiossidanti enzimatici.

6. Attività dell'enzima fenilalanina ammoniacca liasi (PAL)

Una specie per affermarsi e persistere in un determinato ambiente deve essere in grado di accrescersi, svilupparsi e riprodursi, competendo favorevolmente con le altre specie di quell' habitat non solo per le risorse ambientali, ma anche per la capacità di resistere ai fattori limitanti, quali ad esempio le condizioni avverse.

Siccità, estremi termici, vento, salinità dei terreni, anossia, pH troppo acidi o troppo basici, sono i principali fattori abiotici che inducono stress nelle piante, a cui bisogna aggiungere la presenza di inquinanti. Solo gli organismi capaci di resistere a tali stress saranno in grado di sopravvivere ed in molti casi di riprodursi. In condizioni gravi di stress le piante non sono in grado di

accrescersi né di svilupparsi, ma si adoperano per resistere alle condizioni sfavorevoli per poi riprendere a crescere e svilupparsi nelle condizioni più idonee. Pertanto i meccanismi di resistenza agli stress sono finalizzati alla sopravvivenza della specie in condizioni sfavorevoli.

Esistono fondamentalmente due tipi di resistenza agli stress: l'evitamento, si ha quando la pianta riesce a far fronte al problema (es: la caduta delle foglie all'arrivo delle stagioni avverse, come risposta allo stress da freddo) e la tolleranza che invece consiste nella resistenza attiva alle condizioni sfavorevoli attraverso modificazioni biochimico-fisiologiche come per esempio la produzione di metaboliti secondari.

La tossicità di numerosi elementi xenobiotici induce l'attivazione del **processo di detossificazione** da parte delle piante che prevede l'attivazione di numerosi enzimi; si tratta principalmente di isoforme del citocromo P-450, -glucosil, -manonil, e glutatione transferasi, alcuni degli enzimi sono presenti in modo costitutivo, ma altri, come ad esempio le varie forme di citocromo P-450, vengono indotti dalla presenza di ioni metallici e di agenti stressanti in genere.

In tabella 1 sono riportati alcuni enzimi coinvolti nel processo di detossificazione da molecole abiotiche e le piante da cui sono state isolate (Sandermann, 1994).

Enzima	Pianta
O-glucosiltrasferasi	Soia
O-glucosiltrasferasi	Brassica
N-maloniltrasferasi	Fagiolo mungo
GSH tansferasi	Mais
GSH tansferasi	Abete
Cit P-450	Tulipano
Epossido idrolasi	Soia

Tab.1 - Alcuni enzimi coinvolti nel processo di detossificazione e le rispettive specie da cui sono stati isolati.

Le piante sottoposte a stress reagiscono modulando la produzione di varie molecole organiche, oltre agli enzimi, entrano in gioco anche i metaboliti secondari che per definizione non hanno una diretta funzione nei processi di crescita e di sviluppo. A differenza dei metaboliti

primari, i prodotti secondari non sono presenti in modo regolare nelle piante e non prendono parte ai processi di assimilazione, respirazione, trasporto e differenziamento, essenziali per la vita di un organismo vegetale.

I prodotti secondari possono essere divisi in tre gruppi a seconda della via biosintetica che li origina: terpeni, fenoli ed alcaloidi.

I composti fenolici rappresentano una delle principali classi di metaboliti secondari, la quale comprende un ampio spettro di sostanze molto eterogenee, ma tutte caratterizzate dalla presenza di un anello aromatico con uno o più sostituenti ossidrilici. Sebbene un cospicuo numero di sostanze fenoliche sia stato ritrovato in organismi animali, la presenza di una frazione fenolica è una caratteristica peculiare dei tessuti vegetali. Il contenuto dei composti fenolici nei tessuti vegetali varia in funzione della specie, della varietà, dell'organo considerato, dello stadio fisiologico e delle condizioni di crescita.

In tabella 2 sono riportate alcune tra i principali tipi di sostanze fenoliche presenti in diversi taxa.

Organismi	Pattern fenolico
Batteri	Derivati polichetidici dei fenoli, occasionale presenza di chinoni
Funghi	Fenoli semplici, chinoni, fenilpropanoidi, occasionale presenza di flavonoidi
Alghe	Derivati di floroglucinolo nelle pareti cellulari
Licheni	Xantoni, antrachinoni
Briofite	Fenilpropanoidi, flavonoidi, fenoli della parete cellulare
Felci, Gimnosperme, Angiosperme	Lignine, fenoli appartenenti alle diverse classi

Tab. 2 - Tipo di composti fenolici presenti nei diversi taxa.

Data la diversa natura, i composti fenolici giocano ruoli diversi nella crescita e sviluppo di una pianta, ma condividono una comune via biosintetica. Nelle piante superiori la via dell'acido scichimico è responsabile della formazione di tre aminoacidi aromatici essenziali per il metabolismo secondario: tirosina, fenilalanina e triptofano (Matsuki, 1996). Dalla fenilalanina e dalla tirosina si originano molti composti fenolici e il passaggio chiave di questa sintesi è la conversione della L-fenilalanina in acido trans-cinnamico. L'enzima chiave di questa via biosintetica è la fenilalanina ammoniacca liasi (PAL), il quale catalizza la deaminazione della L-fenilalanina con conseguente formazione di quantità equimolari di acido trans-cinnamico e ione ammonio, il quale fornisce un legame tra metabolismo primario e metabolismo fenilpropanoico. L'acido cinnamico rappresenta un fondamentale precursore di molti composti fenilpropanoici che si formano dopo metilazione ed idrossilazione.

Un enzima analogo alla PAL, la tirosina ammoniacca liasi (TAL), ritrovato essenzialmente nelle graminacee, catalizza in maniera analoga la deaminazione della tirosina con formazione dell'acido trans-p-cumarico (Noel et al., 2005; Dixon and Paiva, 1995).

L'attività PAL è regolata da molti fattori sia interni che esterni quali, ad esempio, lo stato di crescita della pianta, il tipo cellulare, le concentrazioni ormonali, la luce UV, la temperatura, le infezioni fungine o i danni provocati da lesioni.

La PAL si trova nelle piante e in pochi funghi e batteri nei quali al contrario è più diffusa l'istidina ammonia lisi (HAL). Sia l'HAL batterica che la PAL di funghi e piante sono tetrameri di α -elica (Dixon et al., 1992; Lewis and Yamamoto, 1990; Dixon and Paiva, 1995). L'enzima PAL è stato purificato in numerosissime specie vegetali e la sua attività è correlata positivamente alla quantità di fenilalanina presente nella cellula (Margna, 1977). L'enzima presenta una certa omogeneità nelle diverse preparazioni: l'enzima estratto dalle piante superiori ha un peso molecolare di circa 330.000 Da, più grande di quello estratto da *Streptomyces verticillatus* che ha un peso di 226.000 Da, ed è composto da 4 subunità, probabilmente identiche.

Il prodotto della deaminazione della fenilalanina, l'acido trans-cinnamico viene, successivamente, convertito in acido 4-idrossicinnamico sotto l'azione catalitica dell'acido cinnamico 4-idrossilasi (C4H), un'ossidasi che richiede ossigeno molecolare ed NADPH come cofattori.

L'acido p-cumarico, a sua volta, viene convertito nel suo corrispondente derivato attivato, il p-cumaroil-coenzima A tioestere, ad opera di un idrossicinnamato: CoA ligasi (4CL), un enzima con alta specificità il quale richiede ATP e CoASH come cofattori. Il derivato attivato dell'acido p-cumarico, oltre che da prodotto finale del metabolismo fenolpropanoico, funge da precursore nella biosintesi di altri composti fenolici

L'ultimo stadio nel metabolismo fenilpropanoico è l'attivazione dei derivati dell'acido cinnamico con conseguente formazione dei CoA tioesteri, precursori nella biosintesi di lignina, flavonoidi, acidi benzoici e vari esteri ed ammidi (fig. 2). Queste reazioni fanno sì che i composti fenolici svolgano delle precise funzioni fisiologiche all'interno della pianta, e partecipino attivamente ai processi di detossificazione e di accumulo nel vacuolo (in quanto prodotti secondari del metabolismo cellulare), in una forma ed in un sito dove i fenoli non possano interferire con i processi vitali del metabolismo vegetale.

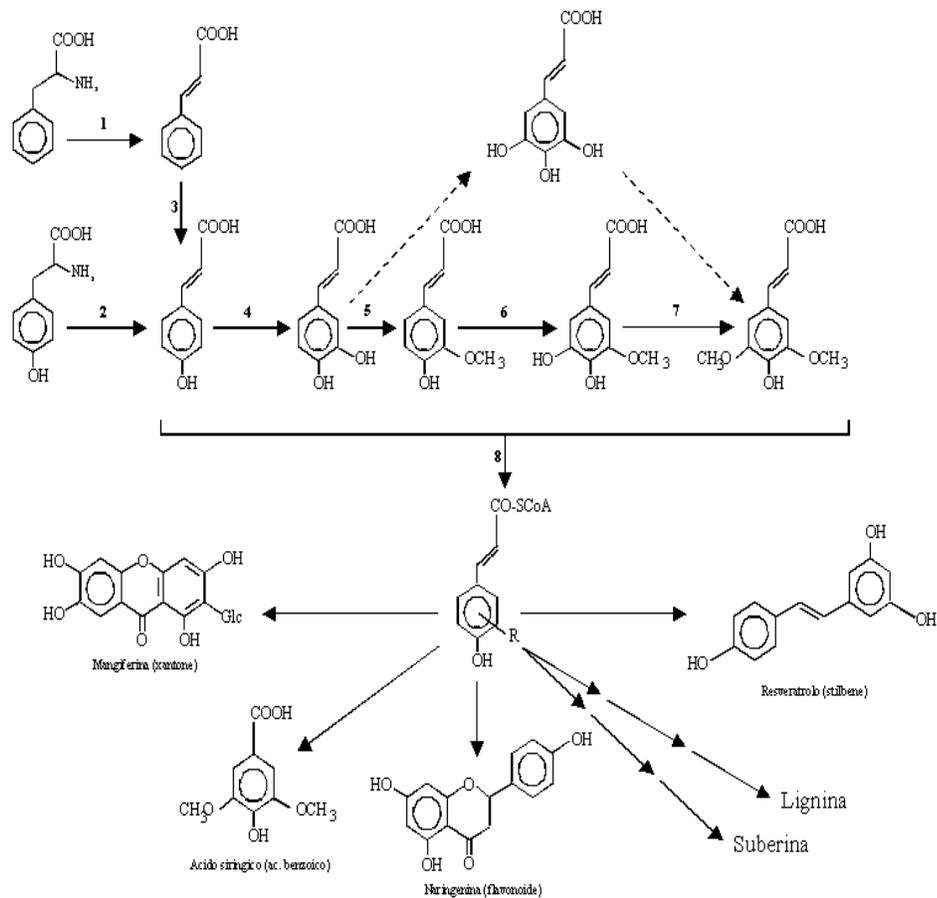


Fig. 2 - Schema della via biosintetica dei composti fenolici. Gli enzimi sono: 1= fenilalanina ammoniacaliasi; 2= tiroxina ammoniacaliasi; 3= Acido t-cinnamico 4-idrossilasi; 4= p-cumarato 3-idrossilasi; 5 e 7= catecolo O-metiltransferasi; 6= ferulato 5-idrossilasi.

7. Proteomica

Cos'è la proteomica? Questo termine è stato proposto nel 1994 durante la *Conference on Genoma and Protein Maps* tenutasi a Siena, come "PROTEin espresse dal completamento di un genOME" (Wilkin et al., 1995; Brygo and Joyard, 2004). Quindi uno studio del proteoma dovrebbe rappresentare un esauriente quadro di tutte le proteine espresse in un dato tempo, nelle condizioni date, nell'organismo in esame. La proteomica ricopre l'analisi sistematica di proteine espresse da un genoma, dall'identificazione delle loro sequenze amminoacidiche primarie fino alla determinazione delle loro relative quantità, il loro stato di modificazione e associazione con altre proteine o molecole di differenti tipi. Notevoli progressi sono stati fatti in questo campo negli ultimi anni, specialmente nella biologia delle piante, per lo più dovuti al maggiore sviluppo della spettrometria di massa dedicata all'analisi delle proteine e ad avanzate informazioni tecnologiche. Inoltre, in aggiunta alla loro sequenza amminoacidica primaria, altre proprietà delle proteine come la loro relativa quantità, l'attività specifica, la localizzazione subcellulare, e le strutture tridimensionali, rappresentano cruciali informazioni per la descrizione dei sistemi biologici. Il

termine proteomica non è più limitato alla costruzione dei repertori di proteine, ma indica anche gli studi delle proprietà delle proteine (livelli di espressione, interazioni...) su larga scala per ottenere una visione globale, dei processi cellulari a livello delle proteine (Aebersold and Mann, 2003; Tyers and Mann, 2003; Von Mering et al. 2002).

Lo scopo ultimo della proteomica è l'analisi della dinamica delle proteine all'interno di un organismo, di un tessuto o anche di una cellula. Pertanto lo sviluppo di tecnologie sistematiche e di routine per determinare le dinamiche di un proteoma sarebbe un risultato importante.

Quando si effettuano studi sul proteoma abbiamo di fronte notevoli problemi come le differenze dei livelli nell'espressione proteica all'interno delle cellule. Proteine rare sono presenti a livelli dell'ordine di 10-100 molecole per cellula laddove le proteine più abbondanti sono presenti a livelli tra 10^5 e 10^7 molecole per cellula. Questo range estremamente largo di espressione (da 10 a 10^7) chiaramente non permette una esaustiva visualizzazione e caratterizzazione delle proteine minori negli estratti cellulari integrali. Ciò significa che proteine poco presenti, incluse proteine di regolazione e proteine rare della membrana sono al di fuori della

portata della maggior parte delle tecniche proteomiche a meno di non sviluppare specifiche strategie.

L'eterogeneità chimica delle proteine, che è direttamente collegata alla diversità delle loro funzioni nella cellula, è un altro grosso problema per la proteomica. In generale, le proteine coprono un range di punto isoelettrico (pI) da 3 ad oltre 12 e hanno massa relativa (Mr) tra meno di 5000 a oltre 3000 Da. Malgrado i nuovi sviluppi questa eterogeneità è una maggiore sfida per le procedure elettroforetiche per i gel 2-D basate per la separazione su pI e Mr. Le varie proteine cellulari mostrano un continuum di idrofilicità/idrofobicità a partire dalle proteine solubili in acqua, presenti in compartimenti come il citosol o la matrice mitocondriale, fino a proteine altamente idrofobiche contenenti diversi domini transmembrana immersi nelle differenti membrane cellulari. Contrariamente alle proteine solubili, le proteine di membrana altamente idrofobiche in gran parte sfuggono all'analisi proteomica basata sulla tecnologia dei gel 2-D, a causa della loro bassa quantità e della loro limitata solubilità nell'acqua.

Un modo per rivelare le proteine minori, basiche o idrofobiche è quello di sviluppare studi di sub-proteomi

basati su compartimentazione subcellulare e/o criteri fisico-chimici. La maggior parte di queste analisi utilizza la spettrometria di massa per l'identificazione proteica, eventualmente indicando il sito e la natura della modificazione post-trascrizionale. Questi studi sono notevolmente in aumento, grazie ad una serie di miglioramenti metodologici riguardanti la manipolazione e il frazionamento di campioni biologici, lo sviluppo di pubblici database e programmi di predizione al computer. Negli ultimi anni sono stati fatti significativi progressi verso l'identificazione e la catalogazione di proteine da tessuti vegetali e da organelli. Il crescente numero di studi proteomici sul riso (Haezlewood et al., 2003; Komatsu et al., 2003; Shen et al., 2003; Trisiriroj et al., 2004), sui semi (Bak-Jensen et al., 2004; Gallardo et al., 2001; Gallardo et al., 2003; Mooney and Thelen, 2004) o sui cloroplasti (Baginsky and Gruissem, 2004; Jarvis, 2004; Rolland et al., 2003; Schröder and Kieselbach, 2003) dimostra il crescente interesse nell'analisi di proteomi di pianta, tessuti specifici o compartimenti subcellulari. Nonostante i grandi progressi fatti nella tecnologia proteomica, l'efficienza di questa strategia si basa fermamente sulla qualità del campione biologico analizzato. Probabilmente la

preparazione dei campioni e il maneggiamento sono i punti più critici nella proteomica. Infine, costruire elenchi di proteine è solo una tappa verso la conoscenza della dinamica del proteoma all'interno di una data cellula o di un organismo.

Inoltre, un proteoma è molto più dinamico di un genoma: esso cambia durante lo sviluppo e in risposta a diversi stimoli, e le proteine formano grandi reti d'interazione e regolazione (Von Mering et al., 2002). Le piante sottoposte a stress biotici o abiotici reagiscono con cambiamenti biochimici e fisiologici (Hirai and Saito, 2004; Knight and Knight, 2001). La proteomica è uno degli strumenti che può aiutare a capire il *cross-talk* tra i differenti segnali dei pathway. Tuttavia, per capire completamente le complesse strategie, non è sufficiente fare l'elenco delle proteine: ma devono essere delineate tutte le interazioni tra loro (Tyers and Mann, 2003; Von Mering et al., 2002) ed è necessario fare un profilo quantitativo delle proteine.

Metodi convenzionali per studiare le dinamiche del proteoma si basano maggiormente sui gel elettroforetici 2-D. L'elettroforesi classica 2-D ha dei limiti nella risoluzione e nella riproducibilità dei gel, tali limiti sono

stati superati utilizzando strip immobilized pH gradients (IPG) (Gorg, 1991). In questo metodo:

- a) la mistura di proteine è separata mediante 2-D PAGE;
- b) le proteine sono visualizzate mediante tecniche di colorazione non specifiche;
- c) dopo la colorazione, le immagini dei gel sono quantificate mediante densitometria, per cui le differenze nell'intensità di colorazione sono correlate alla diversa quantità di proteine.

Attualmente, i più versatili metodi proteomici per lo studio di misture complesse di proteine sono basati sulla spettrometria di massa (Aebersold and Mann, 2003) secondo il seguente profilo: le proteine di campioni più o meno complessi (derivate da gel 1-D o 2-D) sono proteoliticamente suddivise in peptidi più piccoli che successivamente sono analizzati utilizzando la spettrometria di massa (MALDI-TOF, LC-MS, LC-MS/MS...). I dati sono poi processati attraverso una serie di algoritmi al computer che determinano l'identità della sequenza delle proteine e il loro stato di modificazione. Le analisi MS-based possono essere estremamente accurate quantitativamente, a condizione che siano disponibili idonei standards di riferimento. Questi standards sono normalmente generati marcando

un campione di riferimento a una concentrazione conosciuta con isotopi stabili, generando paia di molecole che sono chimicamente identiche ma di massa differente, così che loro possono essere distinti mediante uno spettrometro di massa (Brygo H. B. and Joyard J. 2004).

Mentre la ricerca proteomica è avanzata negli animali e nei lieviti, nelle piante è ancora in una fase iniziale (Zivy and de Vienne, 2000; van Wijk, 2001; Park, 2004) anche perché ci sono pochi database che riportano le sequenze proteiche delle piante. I progressi nella proteomica degli organismi vegetali sono largamente dovuti alla tecnica 2DE-based.

Scopo della ricerca

e

sistema biologico utilizzato

1. Scopo della ricerca

Scopo del lavoro di dottorato è stato lo studio dei meccanismi di risposta precoci allo stress da metalli pesanti (Cd, Cu, Pb e Zn) su piante acquatiche e la messa a punto di nuove tecniche di analisi (proteomica). Gli studi sono stati condotti su una Briofita: in particolare è stato scelto il muschio acquatico *Leptodictyum riparium* (Hedw.) e su due monocotiledoni: una flottante (*Lemna minor* L.) ed una sommersa (*Elodea canadensis* Mich.).

Da dati bibliografici è noto che le piante presentano diversi meccanismi di risposta allo stress come ad es. glutatione, fitochelatine, proteine da stress ecc.. (Sanità di Toppi and Gabbrielli, 1999). Per tale motivo si è scelto di studiare quali effetti possono avere due diverse concentrazioni (10^{-4} M e 10^{-5} M) di Cd, Cu, Pb e Zn sull'attività enzimatica. In particolare si è

focalizzata l'attenzione su un enzima della via metabolica dei fenilpropanoidi (Dixon and Paiva, 1995).

Essi derivano dall'acido cinnamico, che è formato da fenilalanina mediante l'azione di fenilalanina ammoniacaliase (PAL), enzima chiave (Herrmann, 1995) tra il metabolismo primario e secondario (fenilpropanoidi) (Harborne, 1988; Hahlbrock and Scheel, 1989; Lewis and Yamamoto, 1990; Dixon et al., 1992). Per tale motivo si è scelto di studiare la fenilalanina ammoniacaliase (PAL).

Altro scopo del lavoro è stato vedere se lungo l'asse evolutiva vi era un cambiamento nella sintesi della PAL in presenza dei metalli. Sono in corso, inoltre, studi sulla variazione del contenuto di clorofilla totale e il rapporto tra le clorofille; per il muschio si sta anche analizzando la variazione del contenuto dei fenoli totali.

Dati precedentemente ottenuti mostrano che *L. riparium* è un buon accumulatore di metalli, è in grado di rigenerarsi in presenza di metalli e, soprattutto, attiva la sintesi di fitochelatine, come meccanismo di risposta allo stress.

Si è quindi ritenuto opportuno verificare se a livello della sintesi proteica vi fossero delle variazioni. Per tale studio è stato scelto il metallo più tossico e che nel

corso degli anni ha dato i migliori risultati: il cadmio. La concentrazione saggiata è stata quella di 10^{-4} M, in quanto risulta essere di un ordine di grandezza superiore a quella presente in ambiente in casi estremi. Con l'ausilio della proteomica è stato messo a punto il protocollo più idoneo per l'estrazione delle proteine.

L'applicazione della proteomica in campo vegetale prevede:

- 1) l'ottenimento di una buona concentrazione di proteine da una piccola quantità di campione;
- 2) l'eliminazione dell'interferenza di composti come carboidrati, pigmenti e fenoli;
- 3) l'identificazione delle proteine con possibilità di confrontare i dati ottenuti con quelli presenti nelle banche dati.

In particolare per le Briofite esistono pochissimi dati bibliografici che riportino l'utilizzo della proteomica per la caratterizzazione delle proteine (Sarnighausen et al., 2004).

Per individuare il protocollo più idoneo da applicare in studi di "mass finger printing" di peptidi del muschio acquatico *Leptodictyum riparium* (Hedw.) sono stati messi a confronto diversi metodi utilizzati per le piante superiori. I pattern proteici ottenuti dai diversi

trattamenti sono stati confrontati in digitale utilizzando il programma della Bio-Rad (PD-Quest).

Leptodictyum riparium, *Lemna minor* ed *Elodea canadensis* infatti, potrebbero costituire un ottimo sistema nel biorisanamento ambientale mediante il processo di "phytoremediation".

2. Sistema biologico utilizzato

Leptodictyum riparium (Hedw.) (fig. 3), è un muschio idroigrofilo, pleurocarpo, appartenente alla famiglia delle Amblistegiaceae.

Leptodictyum termine che significa "fine" (leptos), "filo" (diktuon) in riferimento all'areolazione, *riparium* che significa "sulla riva ". (Augier, 1966). La classe delle Briofite, a cui appartiene questo muschio, è costituita da organismi vegetali diffusi in tutto il mondo, di dimensioni limitate, dotate di una grossa capacità di adattamento. Esse sono in grado di vivere in condizioni ambientali sfavorevoli (siccità, eccessiva umidità, livelli elevati di inquinamento) e quindi possono colonizzare le nicchie ecologiche più svariate. Il loro ciclo è caratterizzato da una chiara alternanza di generazione con predominanza del gametofito aploide.

L. riparium presenta foglie ovate-lanceolate pressoché distinte, non pieghettate di lunghezza 1-2 mm, non auricolate, cellule basali gradualmente più corte e più larghe, cellule apicali affusolate. La nervatura abbastanza spessa e lunga raggiunge i $\frac{3}{4}$ della lunghezza della foglia, senza mai giungere all'apice. Il margine del lembo fogliare è liscio-continuo (Augier, 1966). Il fusticino può superare i 20 cm di lunghezza, non tomentoso; con ramificazioni sparse e irregolari (alterna e spiralata). La capsula, inclinata di circa 45° rispetto alla seta, presenta cellule rettangolari. Le spore mature appaiono di colore scuro.

***Lemna minor* L.** (fig. 4 e 5) è una monocotiledone acquatica appartenente alla classe delle Anthophyta. Le Lemnaceae sono vegetali che nascono e vegetano alla superficie delle acque stagnanti e sono conosciuti sotto il nome volgare di Lente d'acqua. Esse sono composte ordinariamente da due o tre foglie a forma di lenti, di consistenza poco solida, dalla congiunzione delle quali escono superiormente le parti della fruttificazione, ed inferiormente un mazzetto di radici che pendono nell'acqua. La natura ha destinato queste piante singolari a purificare l'aria delle paludi per renderle abitabili agli animali; durante il giorno assorbono i principi pestiferi

dell'aria ed esalano durante la notte ossigeno. Da questa "lente d'acqua" ha preso origine la denominazione della famiglia delle Lemnaceae. Sono piante perenni senza radici o con radici ridotte allo stato di sottili rizoidi non ramificati, penduli nell'acqua. L'intero apparato vegetativo è ridotto ad una minuta lamina verde parenchimatosa (con pochissimi vasi conduttori spirali) che, nella faccia inferiore può essere provvista di una radice e che per gemmazione è in grado di procreare altre simili radichette che si differenziano dalla pianta madre e vivono successivamente di vita indipendente. Le Lemnaceae sono largamente diffuse e costituiscono una interessante famiglia. Tutte le specie di questa famiglia vivono nelle acque dolci e stagnanti della maggior parte del globo a clima temperato, sub-tropicale o tropicale; e ricoprono la superficie acquosa con formazioni a colonia talvolta di grande o grandissima estensione costituite sempre da numerosi individui. Sono piante molto antiche, di esse si sono trovate impronte fossili sia nei relitti del Terziario dell'Europa che in quelli dell'America Settentrionale e dell'Argentina, per la loro piccolezza possono essere considerate come le piante minime tra i vegetali spermatofiti. Quando occasionalmente queste piante infestano un laghetto esse ne costituiscono una

peste dalla quale ci si può liberare o rialzando il livello delle acque o immettendo nel bacino carpe o pesci rossi che si nutrono di *Lemna*. Le Lemnaceae si moltiplicano quasi esclusivamente per via vegetativa, per tanto la loro fioritura (e la conseguente fruttificazione) è un fenomeno molto raro, quasi eccezionale. La più conosciuta e diffusa nelle acque è *Lemna minor* volgarmente detta "Lenticchia d'acqua" (Enciclopedia di Scienze Naturali).

Lemna possiede capacità depurative di acque inquinate, è in grado di accumulare diverse sostanze inquinanti (Vermaat et al., 1998; Migliore et al., 2001).



Fig. 3 - *Leptodictyum riparium* (Hedw.)



Fig. 4 - *Lemna minor* L.



Fig. 5 - Tavola illustrante i principali organi delle specie del genere Lemna

Elodea canadensis Mich. (fig. 6) è una monocotiledone acquatica appartenente alla famiglia delle Hydrocharitaceae. Sono piante erbacee d'acqua dolce o salina, che in parte o completamente vivono sommerse e solo raramente sono galleggianti; l'apparato radicale può essere costituito da organi che si affondano nel terreno come anche da organi che galleggiano nell'acqua. Sono provviste di foglie radicali spesso riunite in rosetta o cauline su fusti allungati, usualmente sessili e molto variabili tanto in grandezza quanto in forma. Hanno infiorescenze o fiori singoli sottesi da brattee opposte; ed i fiori sono bisessuati o più comunemente unisessuati. La famiglia non è molto numerosa ma è largamente distribuita in quasi tutti i climi dei due emisferi ed include, diversi dei pochi generi delle piante a fiore che vivono nell'acqua di mare. Le specie delle Idrocaritacee preferiscono le acque delle regioni più calde di tutto il mondo. Ciò spiega perché solo pochissimi di questi vegetali vivono anche nel nostro clima: nei generi *Helodea* *Vallisneria*, *Stratiotes*.

Dal punto di vista del contributo diretto fornito dalle *Hydrocaritaceae* alla vita dell'uomo possiamo ricordare che tutti e quattro i generi proprii della nostra flora spontanea entrano, tutti, anche nella coltivazione come

piante ornamentali da acquario o da laghetti. Le piante di *Elodea* ed in particolare *Elodea canadensis* sono state usate in Europa sia come foraggio per gli animali domestici, sia, allo stato essiccato, come lettiera per bovini ed equini finendo successivamente nella concimaia.

Sono state scelte queste tre specie in quanto rappresentano due diversi modelli di sviluppo nell'ambito del regno piante.



Fig. 6 - *Elodea canadensis* Mich.

Materiale e metodi

1. Colture *in vitro*

Gametofiti di *L. riparium*, piante di *L. minor* e di *Elodea canadensis*, raccolti in vasche dell'Orto Botanico dell'Università degli Studi di Napoli Federico II, sono stati disposti in capsule di Petri contenenti 25 ml terreno di Mohr sterile.

Per verificare l'effetto dei metalli pesanti 150 mg di piantine sono state inoculate nel terreno di coltura addizionato con diversi metalli. I metalli saggiati sono stati cloruro di cadmio, nitrato di piombo, nitrato di rame e cloruro di zinco a due diverse concentrazioni: $10^{-4}M$ e $10^{-5}M$.

Per rimuovere eventuali organismi epifiti, le piante sono state sciacquate diverse volte con acqua distillata.

2. Preparazione del terreno di Mohr sterile a pH 7.5 (Krupa, 1964)

Per preparare 1L di terreno di coltura è stato seguito il seguente protocollo:

Nitrato di potassio (KNO_3) 100 mg

Tetraidrato di cloruro di calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) 10 mg

Solfato di Magnesio (MgSO_4) 10 mg

Fosfato di potassio ($\text{K H}_2\text{PO}_4$) 136 mg

Fosfato di ferro (FeSO_4) 0.4 mg

Bold Basal Medium (B.B.M.)¹ 1 ml (Nichols, 1973)

Il tutto è stato messo in una bottiglia da 1L, portato a volume con acqua bidistillata e posto poi in autoclave a 120° per 30 minuti per la sterilizzazione.

3. Attività dell'enzima fenilalanina ammoniacica liasi (PAL)²

Il dosaggio dell'attività PAL è stato eseguito al tempo zero e dopo 6, 12 e 24 ore di trattamento, estraendo l'enzima secondo il metodo di Dube et al. (1993). Ogni campione (125 mg) è stato omogenizzato in un potter immerso in ghiaccio contenente 5 ml 80% (v/v) di acetone freddo e 5 mM di β -mercaptoetanololo (Sigma). Gli omogenati sono stati centrifugati a 3000 rpm per 10

¹ Soluzione 1000x: $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 7.0g, $\text{Mn}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3.04g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.2g, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0736g, $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.238g, H_3BO_3 0.572g, $\text{NaVO}_4 \cdot 16\text{H}_2\text{O}$ 0.0463g, sciolti in 0.05% sol.acquosa di acido 5-sulfosalicilico e portare ad 1 litro con acqua distillata.

² Gli esperimenti sono stati condotti presso il Dipartimento di Biologia, laboratorio della Prof. Cinzia Forni, Università di Roma "Tor Vergata".

min., ed i pellet sono stati lavati con 5 ml 80% (v/v) di acetone freddo, fino alla rimozione della clorofilla (per *Lemna* e *Leptodictyum* occorrono 2 lavaggi mentre per *Elodea* 3). Infine, i pellet sono stati asciugati e risospesi in 3 ml di 0.02 M tampone sodio borato pH 8.8 e centrifugati nuovamente. L'attività dell'enzima è stata determinata utilizzando il soprannatante ed iniziando la reazione enzimatica aggiungendo all'estratto 60 μmol del substrato fenilalanina secondo il metodo di Kakegawa et al. (1995), dopo 1 ora di reazione a T ambiente, l'attività dell'enzima è stata bloccata mediante precipitazione delle proteine con 10% (w/v) acido tricloroacetico (TCA). La concentrazione di acido trans-cinnamico è stata determinata ad una lunghezza d'onda di 280 nm mediante spettrofotometro (UVIKON 860-spectra) utilizzando una retta di taratura.

La quantità di proteine dell'estratto è stata determinata secondo il metodo di Bradford (1976) utilizzando l'albumina di siero bovino (Sigma) come standard.

L'attività enzimatica è stata espressa in:

$$\mu\text{g acido t-cinnamico} / \text{min.} / \mu\text{g di proteine}$$

I dati sono la media di tre determinazioni \pm ES.

4. Proteomica³

Estrazione delle proteine

Tre differenti metodi d'estrazione sono stati saggiati per estrarre le proteine totali dal muschio: precipitazione in TCA (Damerval et al., 1986), precipitazione in TCA e PVPP e precipitazione in 1.5 M TRIS HCl pH 8.8.

Estrazione in TCA

Le proteine sono state estratte da gametofiti di muschio (150 mg) secondo il metodo Conte et al. (2007). I gametofiti sono stati omogeneizzati in un mortaio sterile con azoto liquido e risospesi in 500 µl di Extraction Buffer (20% TCA, inibitore delle proteasi (Sigma), 0,2% DTT in acetone freddo). Gli estratti sono stati centrifugati a 13000 rpm per 15 min a 4 °C . Al supernatante recuperato è stato aggiunto 1 ml di acetone freddo 99,8% fino ad una concentrazione finale dell' 80%. Le proteine contenute nella soluzione sono state lasciate a precipitare *over-night* a -20 °C.

³ Gli esperimenti sono stati condotti presso il Dipartimento di Biologia, laboratorio della Prof. Cinzia Forni, Università di Roma "Tor Vergata", presso l'EBRI, fondazione Santa Lucia di Roma e il Policlinico di "Tor Vergata", Dipartimento di Medicina interna, Università di Roma "Tor Vergata".

Il giorno seguente i campioni sono stati centrifugati per 1 ora a 13000 rpm a 4 °C. Dopo aver prelevato il supernatante i pellet, senza essere risospesi, sono stati lavati con 1,5 ml di *Rinsing solution* (RS) (tab. 3).

Sostanza	Quantità
Acetone freddo	99,8 %
DTT	0,2 %

Tab. 3 - *Rinsing solution*

Dopo 1 ora a -20 °C le proteine sono state lavate di nuovo e centrifugate per 30 min a 13000 rpm a 4 °C. I lavaggi sono stati effettuati fino alla completa rimozione della clorofilla. Eliminati i supernatanti i pellet sono stati seccati per un breve tempo in speed-vac (SC 110 Savant), fino alla completa evaporazione dell'acetone, quindi le proteine sono state risospese in 100 µl di *Lysis buffer* (tab. 4) e lasciate per 1 ora in agitazione a temperatura ambiente. Infine, per rimuovere tutto il materiale insolubile i campioni sono stati centrifugati per 30 min a 13000 rpm a 18 °C.

Sostanza	Quantità
Urea	7 M
Thiourea	2 M
CHAPS (3-[(3-cholamido propyl)- dimethylammonio]-1-propane sulfonate)	4%
IPG-buffer pI 3-10 NL	0,8%
DTT	1%

Tab. 4 - *Lysis buffer*

Estrazione in acetone-TCA e PVPP

Le proteine sono state estratte da gametofiti di muschi secondo il metodo Conte et al. (2007). Con questo metodo i campioni polverizzati sono stati risospesi in 500 µl di *Extraction Buffer* (20% TCA, 0,2% DTT, 5% Polyvinil Pirrolidone (PVPP) (Sigma) e inibitore delle proteasi (Sigma), in acetone freddo). Il PVPP veniva rimosso mediante centrifugazione.

Estrazione in Tris-HCl

Le proteine sono state estratte da gametofiti di muschio secondo il metodo Conte et al. (2007). I campioni polverizzati sono stati risospesi in 500 µl di *Extraction Buffer* (1,5 M TRIS-HCl pH 8.8 e inibitore delle proteasi (Sigma)). I passaggi successivi sono uguali a quelli descritti per l'estrazione in TCA-acetone.

Determinazione quantitativa delle proteine

Per tutti i metodi la determinazione della concentrazione proteica è stata effettuata con il metodo Bradford (1976).

Dopo la determinazione del contenuto proteico, gli estratti venivano suddivisi in aliquote contenenti 100 µg di proteine che venivano conservate a -80 °C fino al momento dell'analisi.

Isoelettrofocalizzazione su gradiente di pH immobilizzati (IEF su IPG) (1D)

Le proteine sono state scongelate ed è stato aggiunto *Rehydration buffer* (tab. 5) per un volume totale di 400 µl.

Per la 1D sono state utilizzate le "immobiline DryStrip gel" (Amersham Biosciences) lunghe 7 cm e 13 cm, pH 3-10 NL. Le prime sono state utilizzate per la messa a punto e l'identificazione del metodo d'estrazione migliore tra i tre saggiati. Una volta identificato il protocollo più idoneo per l'estrazione si è deciso di scegliere strip più lunghe (13 cm) in maniera tale da ottenere una migliore separazione delle proteine.

Sostanza	Quantità
Urea	6 M
Thiourea	2 M
CHAPS (3-[(3-cholamido propyl)- dimethylammonio]-1-propane sulfonate)	0,5%
Glicerolo	10%
Bromofenolo Blu	0,002%
IPG-buffer pI 3-10 NL	0,5%
DTT	0,28%

Tab. 5 - Rehydration buffer

Ogni strip è stata posta nel *Rehydration tray* (Amersham) a contatto con 400 µl della soluzione contenente *Rehydration buffer* e 100 µg di proteine e ricoperta con un'olio minerale (Amersham) per impedire l'evaporazione. La reidratazione delle strip è stata fatta avvenire *over-night* a temperatura ambiente.

Le strip reidratate sono state poste sul supporto di ceramica "Ettan IPGphor manifold" (Amersham Biosciences) e sottoposte a isoelettrofocalizzazione utilizzando l'apparecchiatura dell'Amersham Biosciences Ettan IPGphor IEF System ad una temperatura di 20°C secondo le condizioni descritte nelle tabelle 6 e 7.

Al termine della prima dimensione le strip sono state conservate a -80 °C.

Step	Time	V		W	mA/STRIP
1	30 min	0-300	gradient	5	0.5
2	1 ora	300		5	0.5
3	3 ore	300-3500	gradient	5	0.5
4	1 ora	3500		5	0.5
5	2 ore	3500-6500	gradient	5	0.5
6	1 ora	6500		5	0.5

Tab. 6 - Condizioni di corsa per strip lunghe 7 cm

Step	Time	V		W	mA/STRIP
1	1 ora	0-300	gradient	5	0.5
2	2 ore	300		5	0.5
3	3 ore	300-3500	gradient	5	0.5
4	3 ore	3500		5	0.5
5	2 ore	3500-6500	gradient	5	0.5
6	5 ore	6500		5	0.5
7	1 ora	6500-500	gradient	5	0.5

Tab. 7 - Condizioni di corsa per strip lunghe 13 cm

Equilibratura delle "strip"

Prima di subire la seconda dimensione le strip sono state riequilibrate mediante due successivi passaggi di 30 min. prima in 5 ml di soluzione A su un agitatore (tab. 8) e poi in 5 ml di soluzione B (tab. 9) in agitazione. L'importanza di questo passaggio è relativa alla funzione delle singole sostanze che compongono le due soluzioni: il TRIS impedisce cambiamenti di pH che potrebbero denaturare le proteine; l'Urea serve come agente solubilizzante; il Glicerolo preserva le proteine; il trattamento con SDS maschera la carica intrinseca delle proteine; il DTT, DL-ditiotreitolo, apre i ponti disolfuro permettendo una maggior denaturazione. Nel

secondo passaggio, con la soluzione B, la Iodoacetammide alchila i ponti disolfuro aperti nel trattamento con DTT in modo da impedire con l'ingombro sterico la loro riformazione.

Sostanza	Quantità
Urea	6 M
Glicerolo	30%
SDS	2%
Bromofenolo Blu	0,002%
TRIS-HCl pH 8.0	50 mM
DTT	4,6 mM

Tab. 8 - Soluzione A

Sostanza	Quantità
Urea	6 M
Glicerolo	30%
SDS	2%
Bromofenolo Blu	0,002%
TRIS-HCl pH 8.0	50 mM
Iodoacetammide	0,22 mM

Tab. 9 - Soluzione B

Migrazione su gel di poliacrilammide (2D)

Superata la fase dell'equilibratura le "strip" sono state poste su di un gel di poliacrilammide al fine di compiere la seconda dimensione della separazione che distinguerà le proteine in base al loro peso molecolare. Il gel utilizzato nella seconda dimensione è stato preparato utilizzando il "caster", uno strumento dell'Amersham Bioscience costituito da un supporto capace di sostenere due coppie di vetri tra i quali è stata colata la soluzione contenente acrilammide (tab. 10).

Sostanza	Quantità
Acrilammide 12,5 %	41,7%
Tris-HCl 1,5 M pH 8.8	25%
SDS 10%	1%
APS 10%	1%
TEMED	0,034%
Acqua bidistillata	31,3%

Tab. 10 - Casting del gel

Trascorsa 1 ora durante la quale è avvenuta la polimerizzazione della soluzione, le "strip" riequilibrata sono state poste in cima al gel e sigillate con la *Sealing solution* (tab. 11).

Sostanza	Quantità
Agarosio	0,5%
Bromofenolo Blu	0,002%

Tab. 11 - *Sealing solution*

L'insieme del gel e della "strip" supportato dai due vetri è stato inserito all'interno di un sistema di elettroforesi verticale, l'Hoefer SE 600 Ruby vertical slab electrophoresis unit, opportunamente riempito di "lower buffer" nella camera inferiore e "upper buffer" nella camera superiore; entrambi i tamponi di corsa usati sono ottenuti diluendo rispettivamente 1:10 e 1:3 la soluzione madre di *Running Buffer* (tab. 12). La migrazione delle proteine in base al loro peso molecolare è stata eseguita a 4°C secondo le condizioni di cui tab. 13.

Sostanza	Quantità
Tris/Base (2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol) NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃	250 mM
Glycina	1,92 M
SDS 10%	1%

Tab. 12 - *Running Buffer*

Step	Time	V	W/gel	mA/gel
1	1 ora	90	2	25
2	5 ore	250	6	25

Tab. 13 - Condizioni di corsa per la 2D

Trascorso il tempo della seconda dimensione il gel è stato trasferito in un recipiente contenete 100 ml di fixing solution (tab. 14) e lasciato in agitazione a temperatura ambiente per tutta la notte.

Sostanza	Quantità
Metanolo	50%
Acido acetico	12%
Acqua bidistillata	38%

Tab. 14 - Fixing solution

Colorazione con Nitrato d'Argento

Ultimate le fasi di separazione le proteine, incorporate nei gel, sono pronte per essere colorate. La tecnica di colorazione è composta da una serie di passaggi consecutivi che prevedono l'incubazione del gel in diverse soluzioni; ogni fase è stata effettuata mantenendo una leggera agitazione dei gel all'interno dei contenitori (fig. 7).

Al termine della colorazione i gel sono stati conservati sotto vuoto in una soluzione di Acido acetico all'1%.

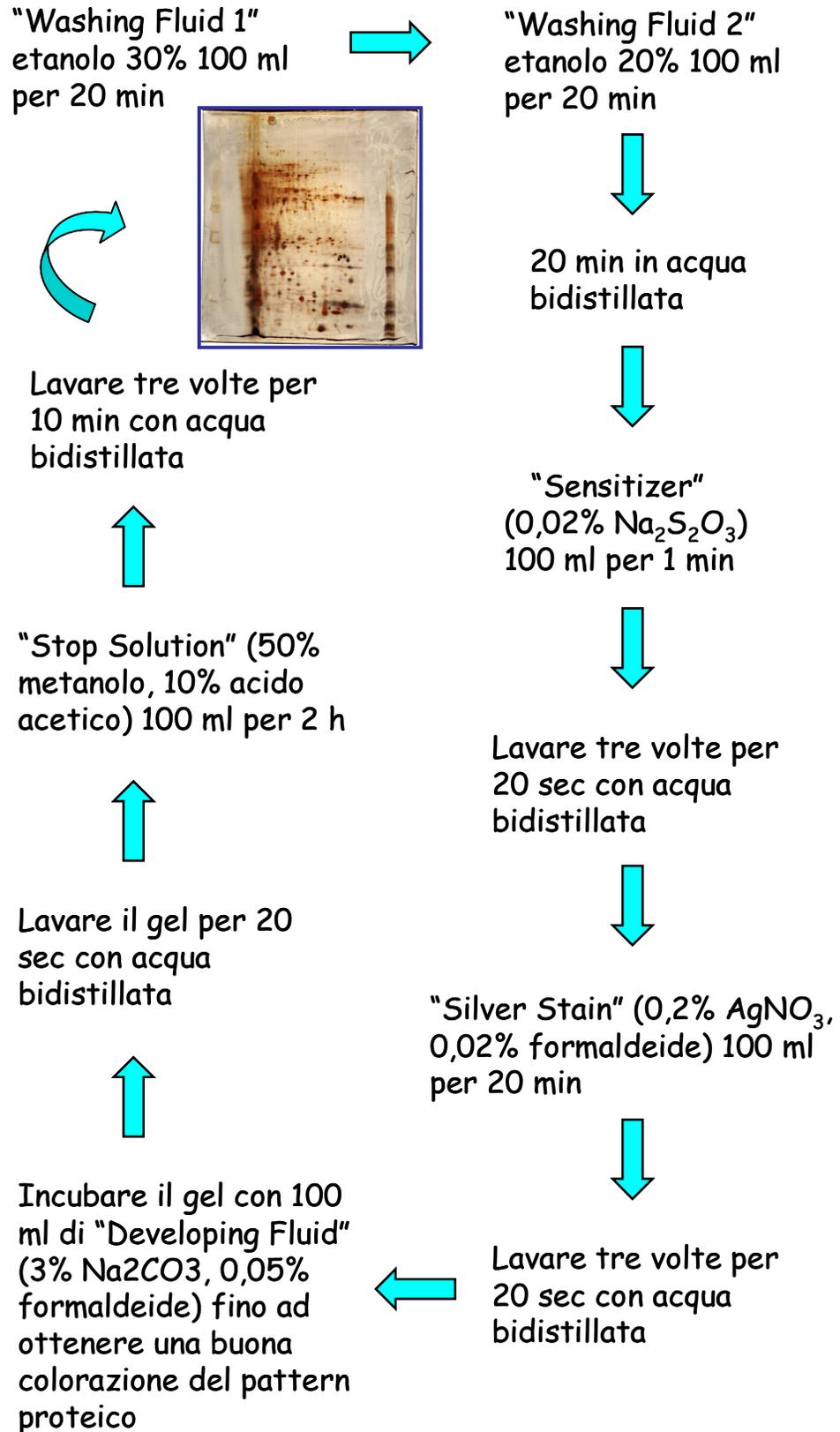


Fig. 7 - Fasi della colorazione dei gel

Acquisizione delle immagini e analisi dei dati

I gel sono stati acquisiti attraverso uno scanner e le immagini digitali sono state analizzate con l'ausilio del programma PD-Quest 2-D Analysis Software (Biorad). Per ogni campione sono stati scelti tre gel rappresentativi. L'analisi è stata condotta valutando l'intensità degli spot rilevati nei vari campioni trattati rispetto a quella riscontrata nei campioni di controllo e considerando come significative le differenze di 4 volte (incremento o diminuzione della sintesi) e di 10 volte (proteine presenti o assenti).

Risultati

3. Attività dell'enzima fenilalanina ammoniacica liasi (PAL)

In seguito ai trattamenti effettuati è stato osservato che:

Lemna minor : risponde alla tossicità dei metalli pesanti aumentando l'attività dell'enzima PAL. I trattamenti delle piante con due diverse concentrazioni di metalli (10^{-4} e 10^{-5} M), causano un aumento del livello dell'enzima, soprattutto nelle prime 6 ore (fig. 8), con valori pari a circa 40 volte il controllo nei campioni trattati con Pb e Cu. La risposta di *L.minor* varia a seconda del metallo considerato, in quanto lo Zn causa un minore incremento dell'attività rispetto agli altri metalli. In generale, la risposta è correlata alla concentrazione dello ione. Il livello dell'enzima aumenta ulteriormente a 12 ore. Dati preliminari mostrano che a 24 ore dal trattamento, soprattutto alle concentrazioni più elevate di Pb, Cd e Cu, l'attività aumenta ulteriormente (Conte et al, 2005).

Elodea canadensis in presenza dei metalli l'attività di quest'enzima contrariamente a quanto visto per le altre specie diminuisce già nelle prime 6 ore di trattamento, soprattutto nei trattati con Cu 10^{-4} M e Zn 10^{-5} M (fig. 10) e dopo 24 ore di trattamento con il Cd l'attività decresce ulteriormente rispetto al controllo.

Leptodictyum riparium : risponde, come Lemna alla tossicità indotta. Nelle piante esposte ai metalli pesanti con due diverse concentrazioni (10^{-4} e 10^{-5} M). I campioni osservati dopo 12 e 24 ore di esposizione non mostrano sensibili variazioni rispetto al controllo. Solo nei trattati con Zn 10^{-5} M vi è un decremento dell'attività PAL rispetto al controllo. Dagli studi effettuati si evince che *L. riparium* è più sensibile all'azione del Cd rispetto a *L. minor*, più sensibile al Pb e al Cu. *E. canadensis* invece non risponde allo stress indotto dai metalli al punto che l'attività della PAL decresce rispetto al controllo già dopo 6 ore nei trattati con Cd e dopo 24 ore raggiunge valori inferiori allo zero. Già dopo 6 ore dall'inizio del trattamento l'attività dell'enzima PAL aumentava nei trattati con Cd 10^{-4} M (fig. 9).

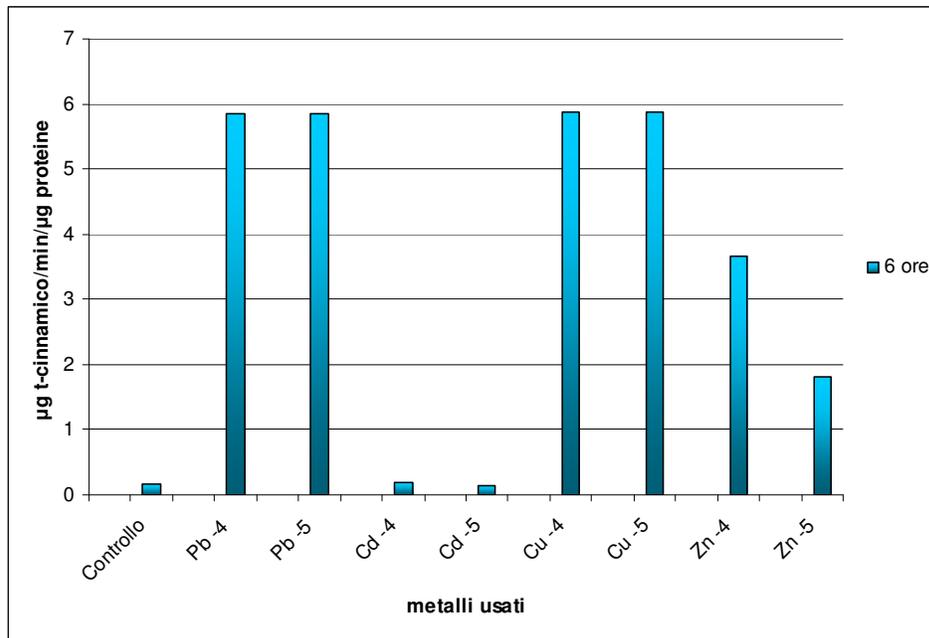


Fig. 8 - Attività enzimatica della fenilalanina ammoniaca liasi (PAL) in *Lemna minor* a 6 ore di trattamento

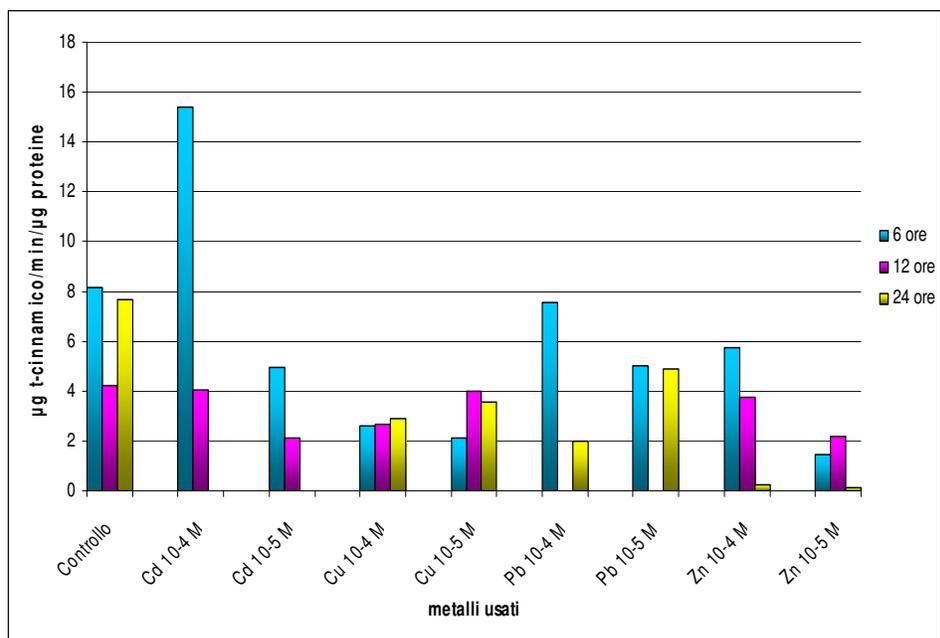


Fig. 9 - Attività enzimatica della fenilalanina ammoniaca liasi (PAL) in *Leptodictyum riparium* a 6, 12 e 24 ore di trattamento

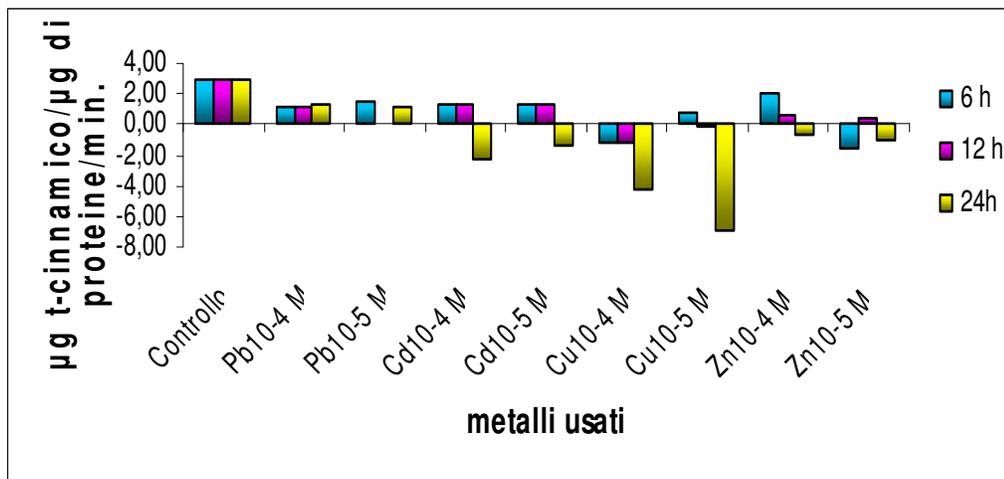


Fig. 10 - Attività enzimatica della fenilalanina ammoniacica liasi (PAL) in *Elodea canadensis* a 6, 12 e 24 ore di trattamento

4. Proteomica

Dalla comparazione dei tre metodi usati per l'estrazione delle proteine, si può affermare che ogni procedura ha i suoi pro e contro e ciascun metodo necessita di una piccola quantità di materiale per l'estrazione, inoltre:

- 1) la presenza nel tampone di estrazione del PVPP, utilizzato per precipitare i composti fenolici, non migliora la qualità dei gel (dato non mostrato) e pertanto tale metodo è stato scartato.
- 2) la quantità di proteine totali ottenuta con il metodo TRIS-HCl è più alta (circa 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) rispetto a quella ottenuta con il metodo acetone-TCA (circa 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).
- 3) buoni risultati possono essere ottenuti facendo precipitare le proteine con TCA (fig. 11).
- 4) usando il metodo TRIS-HCl (fig. 12) il gel risultava più pulito e con un alto numero di spot.

Sebbene il metodo TRIS-HCl risulta più efficiente nell'estrazione delle proteine del muschio (Conte et al. 2007), nell'applicare la metodica in presenza di metalli pesanti si notano delle interferenze come ad esempio la formazione di cristalli, pertanto è stato adottato il protocollo che prevedeva l'estrazione proteica in acetone -TCA.

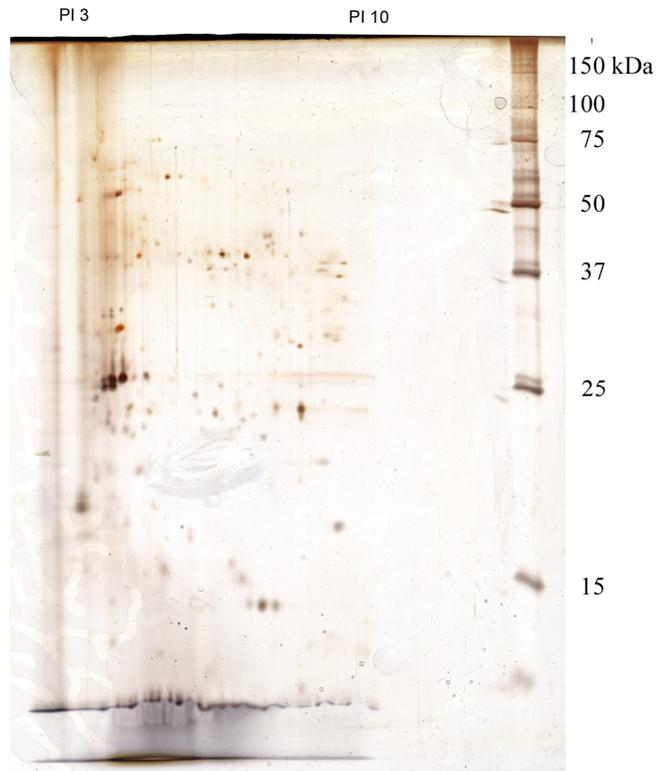


Fig. 11 - pattern proteico di *L. riparium* estratto con acetone-TCA

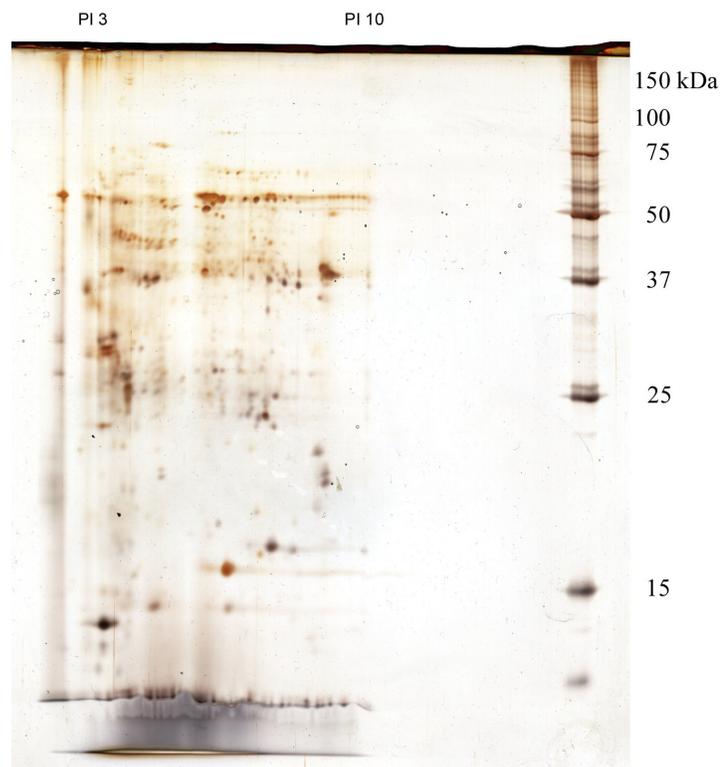


Fig. 12 - pattern proteico di *L. riparium* estratto con Tris-HCl

Dall'analisi dei pattern elettroforetici è stato possibile rilevare una marcata alterazione dell'espressione proteica (fig. 13 e 14) indotta dal trattamento con CdCl₂. Il proteoma, consistente in 358 spot (tab. 15), mostrava infatti rispetto a quello di controllo le seguenti differenze:

3 proteine *de novo* sintesi (fig. 14, tab. 16)

7 proteine assenti nel trattato (fig. 13, tab. 16)

4 proteine *up-regulated* (fig. 14, tab. 17)

10 proteine *down-regulated* (fig. 13, tab. 17)

Sono in corso analisi di *mass finger printing* di peptidi sulle proteine differenzialmente espresse al fine di identificare eventuali molecole "target" coinvolte nella tolleranza del muschio *Leptodictyum riparium* nei confronti dei metalli pesanti.

Le proteine *up-regulated* riscontrate sono tutte nel range a basso peso molecolare, ciò potrebbe far pensare che siano metallotioneine o fitocheltine, queste ultime sono uno dei meccanismi di protezione attivati dalle piante in presenza di metalli pesanti. Le proteine *de novo* sintesi, comprese in un range tra 24 e 30 KDa, potrebbero essere delle alterazioni causate dal Cd a livello del PSII. Infine, la maggior parte delle proteine *down regulation* e assenti nel trattato sono ad alto peso

molecolare, ciò potrebbe far pensare che si tratti o di rubisco o di chaperonine.

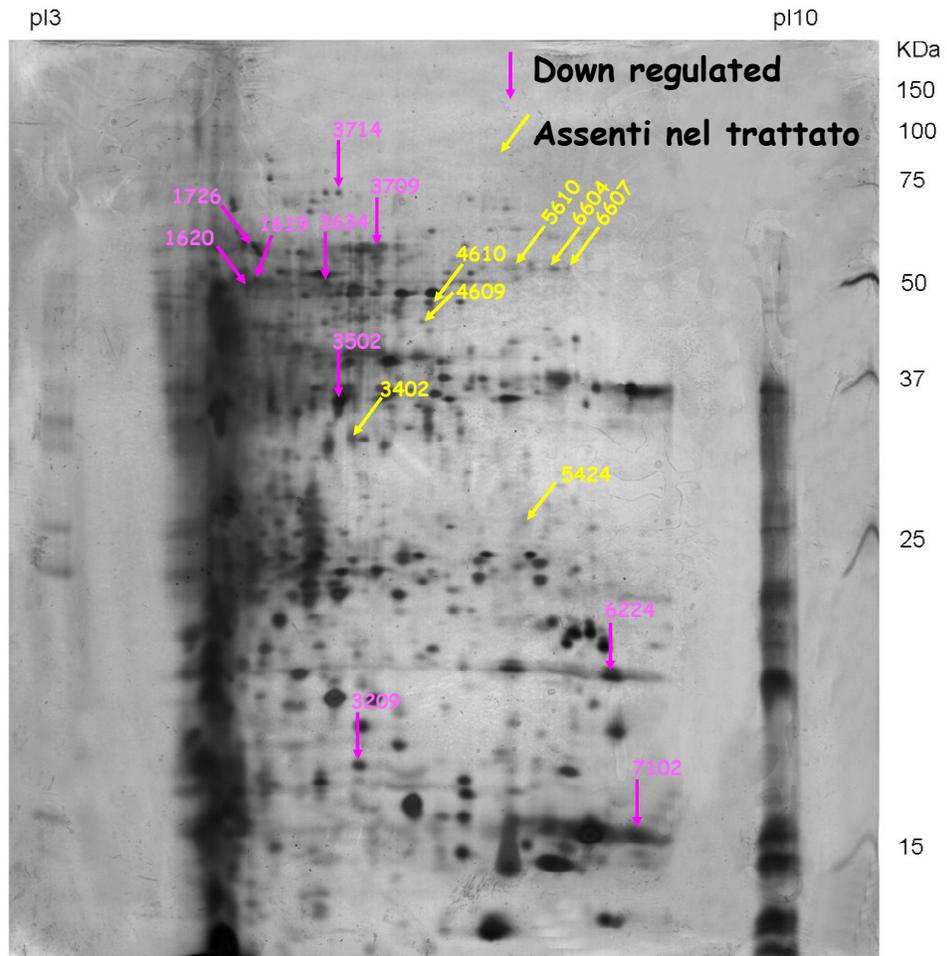


Fig. 13 - *pattern* proteico di *Leptodicyum riparium*

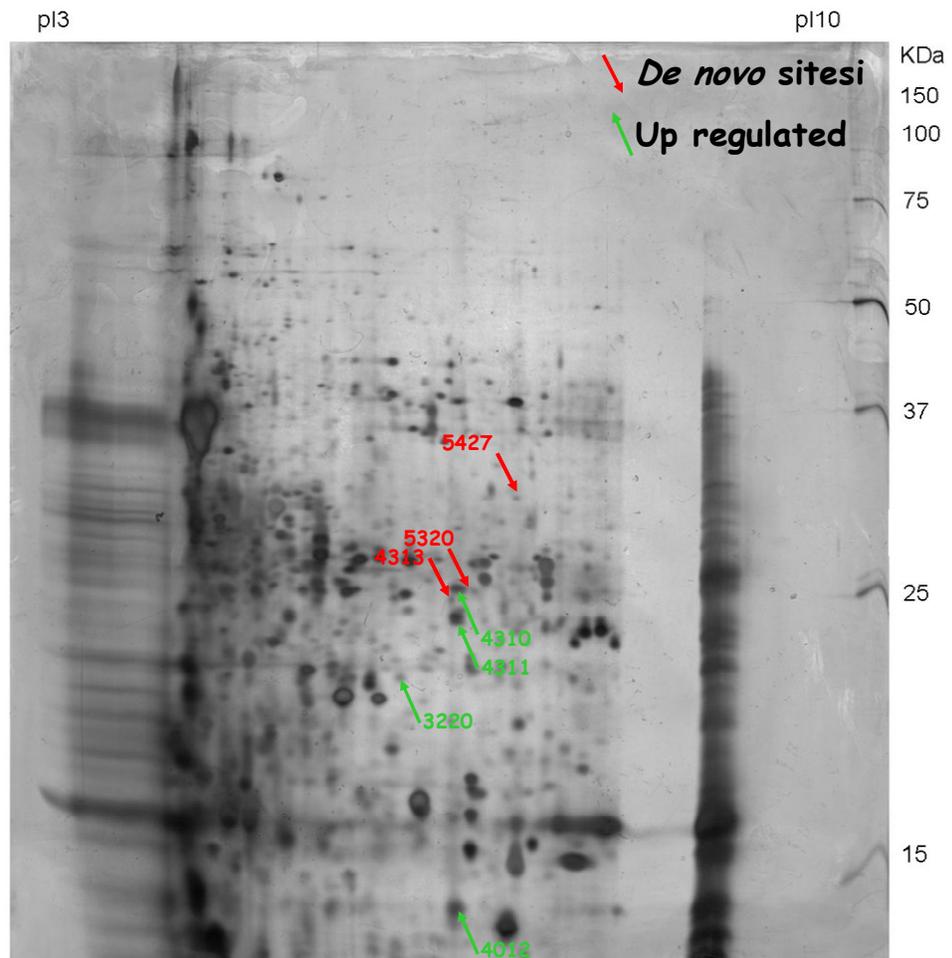


Fig. 14 - *pattern* proteico di *Leptodicyum riparium* trattato con Cd 10^{-4} M

Numero di spot contati	358
<i>De novo</i> sintesi	3
Assenti nel trattato	7
<i>Up-regulated</i> (+4 rispetto al controllo)	4
<i>Down-regulated</i> (-4 rispetto al controllo)	10

Tab. 15 - Spot contati

N° spot	pI Teorico	P.M. (KDa)	
4313	7,2	24,27	<i>De novo</i>
5320	7,3	24,63	<i>De novo</i>
5427	7,5	30,05	<i>De novo</i>
3402	6,8	32,33	assenti nel trattato
4609	7	44,33	assenti nel trattato
4610	7	46,65	assenti nel trattato
5424	7,6	26,15	assenti nel trattato
5610	7,5	52,18	assenti nel trattato
6604	7,8	52,55	assenti nel trattato
6607	7,9	52,18	assenti nel trattato

Tab. 16 - Proteine *de novo* sintesi e assenti nel trattato

N° spot	pI Teorico	P.M. (KDa)	Intensità rispetto al controllo
3220	7	20,93	↑ 7,21
4012	7,5	13,87	↑ 6,81
4310	7,5	24,63	↑ 7,02
4311	7,5	23,49	↑ 5,13
1619	6	49,77	↓ 4,13
1620	6	48,85	↓ 3,56
1726	6,1	57,64	↓ 4,33
3209	6,9	16,9	↓ 3,44
3502	6,8	35,37	↓ 6,02
3634	6,6	49,31	↓ 10,22
3709	7	57,23	↓ 6,27
3714	6,8	72,89	↓ 5,88
6224	8	19,83	↓ 12,86
7102	8,5	14,96	↓ 6,32

Tab. 17 - Proteine up and down regulated

Discussione

La legge definisce "inquinamento" ogni modificazione che si verifica in presenza di sostanze in quantità e caratteristiche tali da alterare le normali condizioni ambientali e costituire pericolo per la salute dell'uomo, le risorse biologiche e gli ecosistemi.

Le fonti di inquinamento possono essere divise in atmosferiche e terrestri; le prime derivano dall'attività di centrali termiche e centrali nucleari che causano l'emissione di sostanze radioattive che ricadono sulla terra attraverso le precipitazioni, le seconde possono essere suddivise in inquinamento diretto (acque di rifiuto urbane, domestiche, industriali, acque piovane che hanno raccolto sul terreno materiali inquinanti) oppure indiretto che è rappresentato dai materiali inquinanti trasportati dai fiumi, che hanno subito una certa diluizione (Provini et al., 2004).

Gli inquinanti stessi possono essere suddivisi in :

a) facilmente degradabili e a pericolosità ridotta ed attenuabili nell'ambiente come conseguenza dei

naturali processi di autodepurazione e diluizione (pH, solfuri, solfati);

b) ad azione tossica, ma in genere non accumulabili negli organismi (Alluminio, Bario, Ferro, Manganese ecc...);

c) molto tossici ed accumulabili (Cadmio, Mercurio, Selenio ecc...).

La rapida industrializzazione, l'aumento dell'attività umana, le moderne pratiche agricole e lo spreco hanno aumentato la concentrazione di elementi inquinanti nell'ambiente, che causano tossicità per gli organismi viventi. Il riconoscimento dei rischi ecologici per la salute ha condotto allo sviluppo di molte tecnologie di rimedio. Visto il costo notevole di queste tecnologie, l'attenzione è stata spostata verso lo sviluppo di tecnologie alternative come la *bioremediation*, che usa materiale di origine microbica o piante (Schneegurt et al., 2001). La bioremediation è la più recente e maggiore attività dei più autorevoli laboratori (Bhainsa and D'Souza, 1999, 2001; Sar and D'Souza, 2001, 2002; Melo and D'Souza, 2004; Eapen et al., 2003). Comparato ai metodi tradizionali di trattamento, questo sistema basato sulla biomassa è molto vantaggioso per i bassi costi e l'alta efficienza di detossificazione (Eapen and

D'Souza, 2005). La depurazione biologica delle acque di scarico consiste nell'azione combinata di popolazioni microbiche diverse con piante ed alghe che, per scopi metabolici propri, degradano le sostanze inquinanti con conseguente loro trasformazione, parte in composti semplici quale anidride carbonica, acqua e metano (che rientrano nel ciclo naturale) e parte in composti inerti che, insieme ai detriti cellulari e ai materiali dello scarico, costituiscono i fanghi dell'impianto di trattamento. La proprietà delle piante e dei batteri di accelerare i processi di depurazione è applicata negli impianti di depurazione di tipo biologico: vengono coltivate le specie in appositi bacini e si combina la loro azione con l'ossigenazione forzata dei fanghi attivi (Ramadori and Tandoni, 2004). Questi fenomeni di demolizione, attraverso trasformazioni chimiche e biologiche sono molto vantaggiosi in quanto non richiedono grosse quantità di energia ed hanno un basso costo di gestione.

Nel biomonitoraggio gli organismi vengono usati come "sentinelle ambientali"; essi possono essere utilizzati come *bioindicatori* se le variazioni del loro stato naturale in presenza di sostanze inquinanti sono apprezzabili e rilevabili, oppure come *bioaccumulatori*

quando sono in grado di sopravvivere alla presenza di una determinata sostanza, accumulandola e permettendone una qualificazione e una quantificazione. Le caratteristiche principali di un organismo bioindicatore e di un bioaccumulatore risiedono rispettivamente nella *sensibilità* e, all'opposto, nella *tolleranza* a sostanze nocive.

Alcuni degli organismi utilizzati come bioaccumulatori per il biomonitoraggio possono essere impiegati, con discreto successo, anche nel risanamento ambientale, proprio grazie alla capacità di concentrare nel loro corpo grandi quantità di elementi tossici e, talvolta, di renderli innocui.

Fenomeni di questo tipo sono comuni in natura, ma sorprende che talvolta l'uomo possa "brevettare" un organismo per utilizzarlo nel risanamento ambientale. Questo è il caso della *Lemna*, una piccola pianta acquatica capace di purificare le acque grazie a delle reazioni biochimiche che è in grado di opporre all'inquinamento. In Italia è stato sviluppato un sistema tecnologico-industriale di fitodepurazione, denominato "*Lemna System*", in grado di depurare e risanare reflui urbani e agro-industriali nonché le acque di fiumi e laghi eutrofizzati (Barale, 1994).

Le dimensioni limitate delle Briofite, la loro semplicità della struttura anatomica, il rapido ciclo vitale e la relativa facilità di crescita in laboratorio, fa di queste piante un interessante modello di studio delle risposte agli stress ambientali attuate a livello cellulare e di organismo.

In seguito all'azione svolta dagli inquinanti le piante reagiscono attivando diversi sistemi di difesa (Sanità di Toppi and Gabrielli, 1999) come ad esempio l'attivazione delle fitochelatine, che catturano il cadmio all'interno del vacuolo oppure cercano di adattarsi allo stress indotto modificando l'attività enzimatica, ad esempio quella dei fenilpropanoidi.

I fenilpropanoidi della pianta comprendono un gruppo di derivati chimici della fenilalanina che includono un gruppo strutturalmente diverso di metaboliti secondari, i quali giocano un ruolo vitale nell'interazione delle piante con il loro ambiente circostante. La diversità strutturale dei fenilpropanoidi è dovuta all'azione di enzimi e complessi enzimatici che inducono reazioni quali aromatizzazione, glicosilazione e metilazione.

Nel lavoro di dottorato svolto, per la prima volta, è stato estratto l'enzima fenilalanina ammoniacica liasi (PAL), enzima chiave del metabolismo secondario, dal

muschio acquatico *Leptodictyum riparium* e dalle monocotiledoni *Elodea canadensis* e *Lemna minor* per valutare come varia l'attività PAL in presenza di quattro differenti metalli pesanti (Cd, Cu, Pb, Zn), a due diverse concentrazioni: una più tossica (10^{-4} M) ed una comunemente presente in ambiente (10^{-5} M). I dati ottenuti dimostrano che in queste specie, come già visto in piante superiori (Pina and Errea, 2007; Rossard et al., 2006) e in *Azolla* (Dai et al., 2006), in seguito a fenomeni di stress la pianta modifica l'attività di tale enzima; inoltre le specie analizzate mostrano una buona risposta dose-dipendente. Tale risposta, per il muschio *L. riparium* è stata anche oggetto, per la prima volta di studi proteomici condotti sia su esemplari controllo che su trattati con Cd, al fine di capire meglio quali fossero le modificazioni del pattern proteico. In precedenza la proteomica era stata utilizzata per fare una mappa del pattern proteico del muschio *Physcomitrella* (Sarnighausen et al., 2004). Negli ultimi anni l'utilizzo della proteomica in campo vegetale è stato applicato all'analisi delle variazioni morfologiche e proteomiche in diversi taxa, ad esempio sono state studiate le radici di *Cannabis sativa* cresciute in presenza di Cu (Bona et al., 2007).

E' da sottolineare che per le Briofite esistono pochissimi dati bibliografici che riportano l'utilizzo della proteomica per la caratterizzazione delle proteine in questo taxon. Nelle banche dati sono presenti principalmente le sequenze di proteine di *Arabidopsis* (Charmont et al., 2005) e *Oryza sativa*. Pertanto il lavoro svolto durante il dottorato potrebbe costituire un utile punto di partenza per l'arricchimento delle conoscenze del proteoma dei muschi. Sono, tuttora, in corso analisi di *mass finger printing* sui peptidi delle proteine differenzialmente espresse al fine di identificare eventuali molecole "target" coinvolte nella tolleranza del muschio *L. riparium* nei confronti del Cd. L'identificazione delle proteine verrà effettuata utilizzando le banche dati esistenti.

Sia il muschio che *L. minor* rispondono, già dopo 6 ore di trattamento, allo stress indotto da metalli, aumentando l'attività della PAL; per tale motivo lo studio effettuato nel triennio di dottorato mi permette di dire che potrebbero essere delle specie idonee da impiegare in sistemi di fitodepurazione. *E. canadensis*, invece, sembra essere meno applicabile per tale uso. Pertanto dal punto di vista evolutivo le briofite pur rappresentando un taxon meno evoluto hanno sviluppato meccanismi di

risposta allo stress così efficaci da essere conservati
poi nelle piante superiori.

Bibliografia

Aebersold R. and Mann M., 2003 - Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422: 198-207.

Alpi A., Pupillo P., Rigano C. 2000 - Fisiologia delle piante. Ed. EdiSES 35-37.

Arduini I., Douglas L., Onnis G. and A. 1996 - Cadmium and copper uptake and distribution in Mediterranean tree seedlings. *Physiologia Plantarum*, 97: 111-117.

Aromolo R., Benedetti A., Fiorelli F., Francaviglia R., Gataleta R., Marchionni M., Morselli L. 1999 - Approccio metodologico allo studio integrato dei metalli pesanti nell'ambiente. Conferenza Organizzativa: inquinamento del suolo da metalli pesanti. Sassari 6-7 Maggio.

Augier J. 1966 - Encyclopédie biologique-LXIV. Ed. P. Lechevalier, Paris.

Baginsky S. and Gruissem W. 2004 - Chloroplast proteomics: potentials and challenges. *Journal Experimental Botany* 55: 1213-1220.

Bak-Jensen K. S., Laugensen S., Roepstorff P., Svensson B. 2004 - Two-dimensional gel electrophoresis pattern (pH 6-11) and identification of water soluble barley seed and malt proteins by mass spectrometry. *Proteomics* 4: 728-742.

Barale R. 1994 - Mutagenesi ambientale per l'individuazione di agenti genotossici in ambiente urbano.

In Atti della giornata di studio "Organismi come bioindicatori ambientali", Trieste 4 novembre.

Bargagli R. 1998a - Chemical elements and plants life. In: Trace elements in terrestrial plants: an ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery 1-21.

Bargagli R. 1998b - Mosses as passive and active biomonitors of trace elements. In: Trace elements in terrestrial plants: an ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery 207-236.

Bhainsa K. C. and D'Souza S. F. 1999 - Biosorption of uranium (VI) by *Aspergillus fumigatus*. Biotechnology Technology 13: 695-699.

Bhainsa K. C. and D'Souza S. F. 2001 - Uranium (VI) biosorption by dried roots of *Eichornia crassipes* (water hyacinth). Journal Environmental Scientific Health, part A 3: 1621-1631.

Bona E., Marsano F., Cavaletto M., Berta G. 2007 - Copper stress in *Cannabis sativa* roots: morphological and proteomic analysis. Caryologia 60: 96-101.

Bradford M. M., 1976 - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye-binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Briat J. F. and Lebrun M. 1999 - Plant responses to metal toxicity. C. R. Academy Science III 322: 43-54.

Brown D. H. 1984 - Uptake of mineral elements and their use in pollution monitoring. In: Dyer A.F., Duckett

J.G., eds. The experimental Biology of Briophytes. New York: Academic Press, 229-255.

Bruins M. R., Kapil S., Oehme F. W. 2000 - Microbial resistance to metals in environment. *Ecotoxicology Environmental Safety* 45: 198-207.

Brune A., Urbach W., Dietz k. J. 1995 - Differential toxicity of heavy metals is partly related to a loss of preferential extraplasmic compartmentation: a comparison of Cd-, Mo-, Ni-, and Zn-stress. *New Phytology* 129: 403-409.

Brygo H. B. and Joyard J. 2004 - Focus on plant proteomics. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 913-917.

Carballeira A., Lyopez J., Vyazquez M. D. 1999 - Uptake of heavy metals to the extracellular and intracellular compartments in three species of aquatic bryophyte. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44: 12-24.

Cenci R. M. 1998 - L'utilizzo di muschi indigeni e trapiantati per valutare in micro e macro aree le ricadute al suolo di elementi in trace: proposte metodologiche. Atti del Workshop "Biomonitoraggio della qualità dell'aria in territorio nazionale". Roma, 26-27 Novembre 240-263.

Charmont S., Jamet E., Pont-Lezica R., Canut H. 2005 - Proteomic analysis of secreted proteins from *Arabidopsis thaliana* seedlings: improved recovery following removal of phenolic compounds. *Phytochemistry* 66: 453-461.

Chung L. K., Gupta V. K., Sawhney S. K. 1992 - Effect of cadmium on enzymes of nitrogen metabolism in pea seedlings. *Phytochemistry* 31: 395-400.

Conte B., Basile A., Castaldo Cobiauchi R., Forni C. 2005 - Determinazione dell'attività enzimatica della fenilalanina ammoniaca liasi (PAL) in *Lemna minor* (L.) trattata con metalli pesanti. *Informatore Botanico Italiano*, 37, 634-635, 2005.

Conte B., Braglia R., Basile A., Castaldo Cobiauchi R., and Forni C. 2007 - Proteomic and Bryophyte: comparison of different methods of protein extraction to study protein synthesis in the aquatic moss *Leptodictyum riparium* (Hedw.). *Caryologia* 60 (1,2): 102-105.

Dai I. P., Xiong Z. T., Huang Y., Li M. J. 2006 - Cadmium-induced changes in pigments, total phenolics, and phenylalanine ammonia-lyase activity in fronds of *Azolla imbricate*. *Environmental Toxicology* 21: 505-512.

Damerval C., de Vienne D., Zivy M., Thiellement H. 1986 - Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 7: 52-54.

Dixon R. A., Choudhary A. D., Dalkin D., Edwards R., Fahrendorf T., Gowri G., Harrison M. J., Lamb C. J., Loake G. J., Maxwell C. A., Orr J., Paiva N. L. 1992 - Molecular biology of stress-induced phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in alfalfa. In *Phenolic Metabolism in Plants*, H. A. Stafford and R. K. Ibrahim, eds (New York: Plenum Press), 91-138.

Dixon R. A. and Paiva N. L. 1995 - Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell* 7: 1085-1097.

Dube A., Bharti S., Laloraya M. M., 1993 - Inhibition of anthocyanin synthesis and phenylalanine ammonia-lyase activity by CO_2 in leaf disks of *Terminalia catappa*. *Physiologia Plantarum* 88: 237-242.

Eapen S., Susselan K., Cotwal S., Mitra R. 2003 - Potential rhizo filtration of uranium using hairy root cultures of *Brassica juncea* and *Chenopodium amaranticolor*. *Environmental Research* 91: 127-133.

Eapen S. and D'Souza S. F. 2005 - Prospect of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnology Advances* 23: 97-114.

Enciclopedia di scienze naturali "Nel Mondo della Natura" Federico Motta editore Milano pp. 657-648.

Fernandez J. A., Aboal J. R., Carballera A. 2000 - Use of native and trasplanted mosses as complementary technique for biomonitoring mercury around an industrial factory. *Science of the Total Environment* 256: 151-161.

Fry J. C. 1998 - Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochemistry Journal* 332: 507-515.

Gallardo K., Job C., Groot S. P., Puype M., Demol H., Vandekerckhove J., Job D. 2001 - Proteomics analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. *Plant Physiology* 126: 835-848.

Gallardo K., Le Signor C., Vandekerckhove J., Thompson R. D., Burstin J. 2003 - Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation. *Plant Physiology* 133: 664-682.

Godbold D. L. and Kettern C. 1991 - Use of root elongation studies to determine aluminium and lead toxicity in *Picea abies* seedlings. *Journal Plant Physiology* 138: 231-235.

Gorg A. 1991 - Two-dimensional electrophoresis. *Nature* 349: 545-546.

Haezlewood J. L., Howell K. A., Whelan J., Millar A. H. 2003 - Towards an analysis of the rice mitochondrial proteome. *Plant Physiology* 132: 230-242.

Hahlbrock K. and Scheel D. 1989 - Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiology Plant Molecular Biology* 40: 347-369.

Harborne J. B. 1988 - *The Flavonoids: Advances in Research since 1980*. New York: Chapman and Hall.

Herrmann K. M. 1995 - The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919.

Heumann H. G. 1987 - Effects of heavy metals on growth and ultrastructure of *Chara vulgaris*. *Protoplasma* 136: 37-48.

Hirai M. Y. and Saito K. 2004 - Post-genomics approaches for the elucidation of plant adaptive

mechanism to sulphur deficiency. *Experimental Botany* 55: 1871-1879.

Hiramoto K., Ojima N., Sako K., Kikugava K. 1996 - Effects of plant phenolics on the formation of the spin-adduct of hydroxyl radical and the DNA strand breaking by hydroxyl radical. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 19: 558-563.

Holleman A. F. and Wiberg E. 1985 - *Lehrbuch der anorganischen chemie*. Walter De Gruyter, Berlin p.868.

Jarvis P. 2004 - Organellar proteomics: chloroplasts in the spotlight. *Current Biology* 14: 317-319.

Kakegawa K., Suda J., Sugiyama M., Komamine A. 1995 - regulation of anthocyanin biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis* in relation to cell division. *Physiologia Plantarum* 94: 661-666.

Kasparzak K. S. 1995 - Possible role of oxidative damage in metal-induced carcinogenesis. *Cancer Investigation* 13: 411-430.

Knight H. and Knight M. R. 2001 - Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Science* 6: 262-267.

Komatsu S., Konishi H., Shen S., Yang G. 2003 - Rice proteomics: a step toward functional analysis of the rice genome. *Molecular Cells Proteomics* 2: 2-10.

Krupa J. 1964 - Studies on the physiology of germination of spores of *Funaria hygrometrica* (Sibth.). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 33: 173-192.

La Rocca F. 2005 - Biomarcatori e bioindicatori nella valutazione della qualità delle acque interne. Tesi di Laurea.

Leita L., Contin M., Maggioni A. 1991 - Distribution of cadmium and induced cd-binding proteins in root, stem, leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Science* 77: 139-147.

Lewis N. G. and Yamamoto E. 1990 - Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 41: 455-496.

Manning W. J. and Feder W.A. 1980 - Biomonitoring air pollutants with plants. *Applied Science Publishers*, London pp.285.

Marchionni M. 1999 - Inquinamento del suolo da metalli pesanti: effetti sulle piante. Conferenza Organizzativa: inquinamento del suolo da metalli pesanti. Sassari 6-7 Maggio.

Margna U. 1977 - Control at the level of substrate supply-an alternate in the regulation of accumulation in phenylpropanoid in plant cell. *Phytochemistry* 16: 419-426.

Matsuki M. 1996 - Regulation of plant phenolic syntesis: from biochemistry to ecology and evolution. *Australian Journal of Botany* 44: 631-634.

Melo J. S. and D'Souza S. F. 2004 - Removal of cromium by mucilaginous seeds of *Ocimum basilicum*. *Bioresource Technology* 92: 151-155.

Migliore L., Forni C., Cozzolino S., 2001 - Modelli sperimentali di Bioremediation: piante acquatiche e

antibiotici di uso veterinario. Bollettino della Società Italiana della Scienza del Suolo 50 (3): 777-780.

Mooney B. P., Thelen J. J. 2004 - High-throughput peptide mass fingerprinting of soybean seed proteins: automated workflow and utility of UniGene expressed sequence tag database for protein identification. *Phytochemistry* 65: 1733-1744.

Moral R., Gomez I., Navarro Pedreno J., Maitax J. 1994 - Effects of cadmium on nutrient distribution, yeild, and growth of tomato grown in soilness culture. *Journal Plant Nutrition* 17: 953-962.

Nichols H. W., 1973 - Growth media in fresh water. In: Stein JR, ed. *Handbook of phycological methods*. Cambridge: Cambridge University Press 7-24.

Nimis P. L. 1998 - Il biomonitoraggio della "qualità dell'aria" in Italia. Atti del Workshop "Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale". Roma, 26-27 Novembre 173-185.

Noel J. P., Austin M. B., Bomati E. K. 2005 - Structure-function relationships in plant phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Biology* 8: 249-253.

Obata H. and Umebayashi M. 1993 - Production of SH compounds in higher plants of different tollerance to Cd. *Plant soil* 155/156: 533-536.

Okland R. H., Steinnes E., Okland T. 1997 - Element concentration in the boreal forest moss *Hylocomium splendens*: variation due to segment size, branching pattern and pigmentation. *Journal of Bryology* 19: 671-684.

Oller I., Gernjak W., Maldonato M. I., Pèrez-Estrada L. A., Sánchez-Pèrez J. A., Malato S. 2006 - Solar photocatalytic degradation of some hazardous water-soluble pesticides at pilot-plant scale. *Journal of Hazardous Materials B* 138: 507-517.

Ouzoinidou G. 1994 - Copper-induced changes on growth, metal content and photosynthetic function of *Alyssum montanum* L. plants. *Environmental and Experimental Botany* 34: 154-160.

Ouzoinidou G., Moustakas M., Eleftherio E. P. 1997 - Physiological and ultrastructural effects of cadmium on Wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Archives Environmental Contamination Toxicology* 32: 154-160.

Park O. K. 2004 - Proteomic studies in plants. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 37: 133-138.

Pina A. and Errea P. 2007 - Differential induction of phenylalanine ammonia-lyase gene expression in response to *in vitro* callus unions of *Prunus* spp. . *Journal of Plant Physiology* (in press).

Provini A., Galassi S., Marchetti R. 2004 - *Ecologia applicata. Inquinamento delle acque superficiali.* 3: 237-240.

Ramadori R. and Tandoni V. 2004 - *Ecologia applicata. Depurazione biologica delle acque di scarico.* 9: 384-392.

Raskin I. 1996 - IBC Symposium on Phytoremediation, Washington DC, May 8.

Riffardi R. and Levi-Minzi R. 1989 - Il controllo degli inquinanti in agricoltura. Gli inquinanti organici. Chimica del suolo, Patron Editore.

Rolland N., Ferro M., Seigneurin-Berny D., Garin J., Douce R., Joyard 2003 - Proteomics of chloroplast envelope membranes. Photosynthesis Research 78: 205-230.

Rossard S., Luini E., Pérault J. M., Bonmort J., Roblin G. 2006 - Early changes in membrane permeability, production of oxidative burst and modification of PAL activity induced by ergosterol in cotyledons of *Mimosa pudica*. Journal of Experimental Botany 57: 1245-1252.

Rout G. R., Samantary S., Das P. 2000 - Effects of chromium and nickel on germination and growth in tolerant and no tolerant population of *Echinochloa* (L.) Linch. Chemosphere 40: 855-859.

Ruhling A. and Tyler G. 1970 - Sorption and retention of heavy metals in the woodland moss *Hylocomium splendens* (Hedw.). Br. Et: Sch. Oikos 21: 92-97.

Salt D. E., Blaylock M., Kumar N. P. B. A., Dushenkov V., Ensley B. D., Chet I., Raskin I. 1995a - Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. Biotechnology 13: 468-473.

Salt D. E., Prince R. C., Pickering I. J., Raskin I. 1995b - Mechanism of cadmium mobility and accumulation in indian mustard. Plant Physiology 10: 1427-1433.

Samecka-Cymermann A., Marczonek A., Kempers A. J. 1997 - Bioindication of heavy metal in soil by liverworts: *Archives Environmental Toxicology* 33: 162-171.

Sandermann H. Jr. 1994 - Higher plant metabolism of xenobiotics: the "green liver" concept. *Pharmacogenetics* 4 (5): 225-41.

Sanità di Toppi L., Gabrielli R. 1999 - Response to cadmium in higher plants. *Environmental Experimental Botany* 41: 105-130.

Sar P. and D'Souza S. F. 2001 - Biosorptive uranium uptake by a *Pseudomonas* strain characterization and equilibrium studies. *Journal Chemical Technology Biotechnology* 76: 1286-1294.

Sar P. and D'Souza S. F. 2002 - Biosorption of thorium (IV) by *Pseudomonas* strain. *Biotechnology Letters* 76: 1286-1294

Sarnighausen E., Wurtz V., Heintz D., Van Dorsselaer A., 2004 - Mapping of the *Physcomitrella patens* proteome. *Phytochemistry* 65: 1589-1607.

Schneegurt M. A., Jain J. C., Menicucci Fr. J. A., Brown S. A., Kemner K. M., Garofalo D. F. et al. 2001 - Biomass by products for the remediation of waste waters contaminated with toxic metal. *Environmental Science Technology* 35: 3786.

Schröder W. P., Kieselbach T. 2003 - Update on chloroplast proteomics. *Photosynthesis Research* 78: 181-193.

Shaw A. J. 1990 - Metal tolerance and cotolerance in the moss *Funaria hygrometrica*. Can. Journal of Botany 68: 2275-2282.

Shen S., Jing Y., Kuang T. 2003 - Proteomics approach to identify wound-response related proteins from rice leaf sheath. Proteomics 3: 527-535.

Siedlecka A. 1995 - Some aspects of interaction between heavy metals and plant mineral nutrients. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 64:265-272.

Sorrentino C., Basile A., Del Piano L., Cafiero G., Abet M., Giordano S., Castaldo Cobianchi R. 1997 - Morphogenetic effects and tissue localization of lead in *Nicotiana tabacum* L. e *Nicotiana rustica* L. Atti Accademia Fisiocritici Siena Serie XV.

Stallwitz E. and Header D .P. 1994 - Effects of heavy metals on mobility and gravitactic orientation of the flagellate, *Euglena gracilis*. European Journal of Protistology 30: 18-24.

Subhadra A. V. and Panda B. B. 1994 - Metal-induced genotoxic adaptation in barley (*Hordeum vulgare* L.) to maleic hydrazide and methyl mercuric chloride. Mutation Research 321: 93-102.

Trisiriroj A., Jeyachok N., Chen S. T. 2004 - Proteomics characterization of different bran proteins aromatic and nonaromatic rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica). Proteomics 4: 2047-2057.

Tyers M. and Mann M., 2003 - From genomics to proteomics. Nature 422: 193-197.

Tyler G. 1990 - Bryophytes and Heavy metals: a literature review. *Botanic Journal of the Linnean Society* 104: 231-253.

Vàsquez M. D., Poschenrieder C. H., Barcelo J. 1987 - Chromium VI induced structural and ultrastructural changes in bush bean plants. *British Ecological Society Symposium* 15: 231-258.

Van Wijk K. J. 2001 - Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiology* 126: 501-508.

Vasconcelos M. T. and Tavares H. M. 1998 - Atmospheric metal pollution (Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn) in Oporto city derived from results for low-volume aerosol samplers and for the moss *Sphagnum auriculatum* bioindicator. *Science Total Environmental* 212: 11-20.

Vermaat J. E., Khalid Hanif M. 1998 - Performance of common duckweed species (Lemnaceae) and the water fern *Azolla filiculoides* on different types of waste water. *Water Research* 32 (9): 2569-2576.

Von Mering C., Krause R., Snel B., Cornell M., Oliver S. G., Fields S., Bork P. 2002 - Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions. *Nature* 417: 399-403.

Wainwright S. J. and Woolhouse H. W. 1975 - Physiological mechanism of heavy metals tolerance in plants. *British Ecological Society Symposium* 15: 231-258.

Wierzbicka M. 1988 - Mitotic disturbance induced by low doses of inorganic lead. *Caryologia* 41: 143-160.

Wilkin M. R., Sanchez J. C., Gooley A. A., Appel R. D., Humphery-Smith I., Hochstrasser D. F., et al. 1995 - Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it, *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 13:19-50.

Zenk M. H. 1996 - Heavy metal detoxification in higher plants. *Gene* 179: 21-30.

Zivy M. and de Vienne D. 2000 - Proteomics : a link between genomics, genetics and physiology. *Plant Molecular Biology* 44: 575-580.