

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE**

**FACOLTA' DI AGRARIA**

**SCUOLA DI DOTTORATO "UBALDO MONTELATICI" IN SCIENZE E  
TECNOLOGIE VEGETALI, MICROBICHE E GENETICHE**

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE GENETICHE (XXI CICLO)**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AMBIENTALI E FORESTALI  
AREA DISCIPLINARE AGR/07**

**Caratterizzazione biochimica dei sistemi enzimatici antiossidanti in  
cloni di pioppo tolleranti ai metalli pesanti**

Tutor: Prof.ssa Milvia Luisa Racchi

Dottoranda: Dott.ssa Adelaide Turchi

Coordinatore

Prof. Raffaello Giannini

Anno 2008

## ***Ringraziamenti***

*Un sentito e doveroso ringraziamento è rivolto alla Prof. Milvia Luisa Racchi, che mi ha offerto la possibilità di fare questa esperienza e che mi ha seguito durante questi tre anni.*

*Desidero ringraziare Ivano Tamantini dell'Istituto Agronomico per l'Oltremare, che mi ha seguito durante lo svolgimento di una parte dei miei esperimenti, che è stato sempre pronto a darmi ottimi consigli.*

*Un caloroso ringraziamento è rivolto ai miei colleghi entomologi, in particolare la Dott.ssa Serena Landini, Dott.ssa Alessandra Camèra e il Dott. Aurelio Granchietti, con i quali ho condiviso tutte le mie lunghe giornate di lavoro e sono stati sempre presenti nei momenti di bisogno, inoltre un pensiero affettuoso è rivolto anche al Prof. Belcari, alla Dott.ssa Patrizia Sacchetti e alla Dott.ssa Marzia Cristiana Rosi, che mi sono stati sempre vicini.*

# Indice

## Capitolo 1

1 Premessa	3
1.1 Lo stress ossidativo	7
1.2 Metallotioneine	9
1.3 Materiale di studio: il pioppo	12
Scopo della ricerca	14

## Capitolo 2

2 Introduzione	16
Scopo della ricerca	19
2.1 Piante e loro campionamento	21
2.2 Micropropagazione del materiale	21
2.3 Trattamento con metalli pesanti	22
2.4 Determinazione metalli	23
2.5 Risultati	24
2.5.1 Determinazione del contenuto di rame e zinco nelle microtalee esposte ai metalli	27
2.6 Discussione	32

## Capitolo 3 I sistemi antiossidanti nella risposta del pioppo a concentrazioni tossiche di rame e zinco

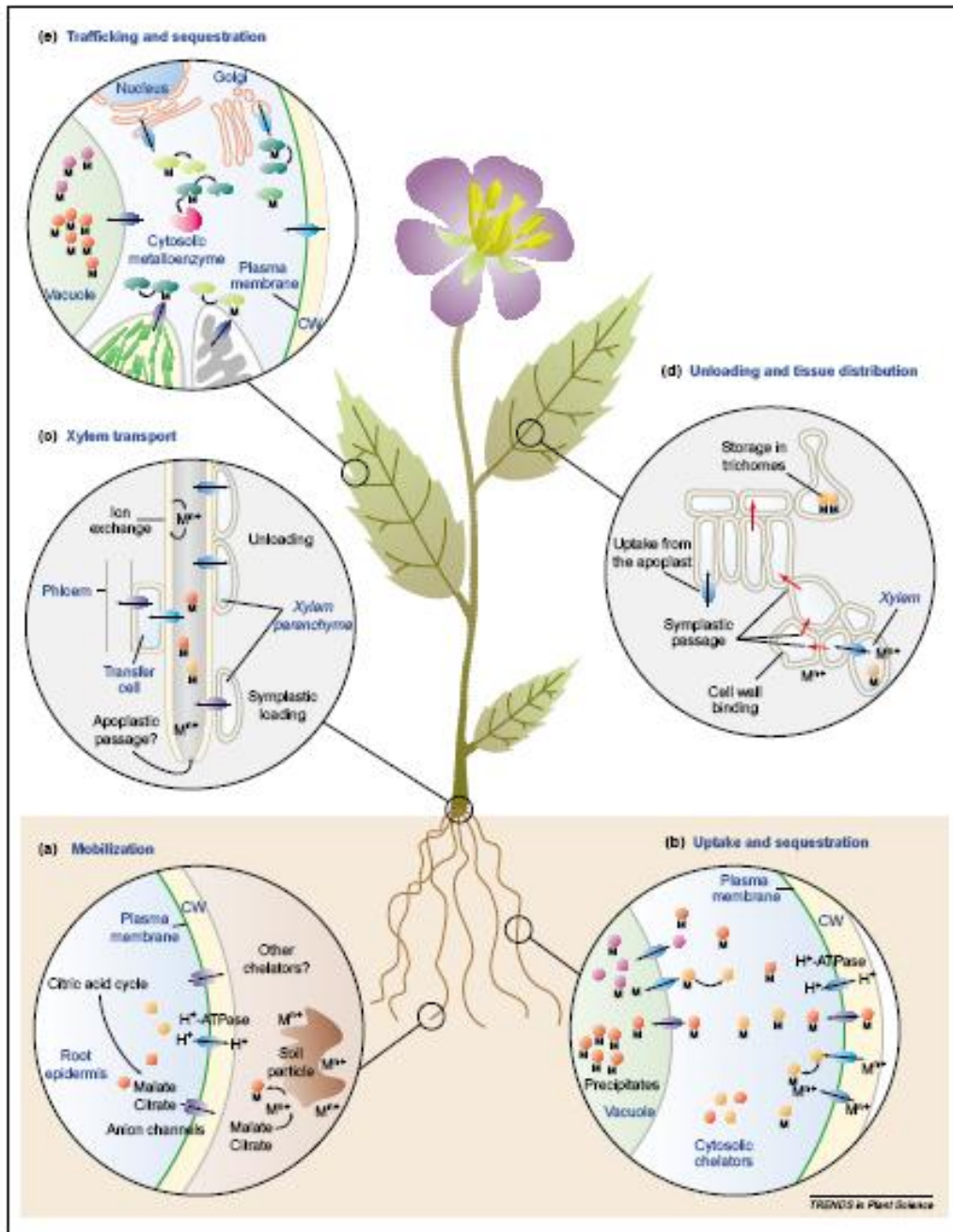
3.1 Introduzione	35
3.1.1 Superossido dismutasi	36
3.1.2 Catalasi	38
3.1.3 Specificità spazio-temporale di catalasi e superossido dismutasi	40
3.1.4 Ascorbato perossidasi	42
3.1.5 La perossidazione dei lipidi e lo stress da metalli pesanti	45
3.1.6 I sistemi enzimatici antiossidanti nello stress da metalli pesanti	46
Scopo del lavoro	48
3.2 Materiali e metodi	49
3.2.1 Estrazione proteine solubili	49
Catalasi	49
Superossido dismutasi	49
Ascorbato perossidasi	50
3.2.2 Dosaggio proteine	51
3.2.3 Trattamento in colonna di desalting	52
3.2.4 Determinazione dell'attività enzimatica	52
Catalasi	52
Superossido dismutasi	54
Ascorbato perossidasi	55
3.2.5 Gel nativi di poliacrilamide	56
Colorazione gel di catalasi	57
Colorazione gel di superossido dismutasi	58
Colorazione gel di ascorbato perossidasi	59
3.2.6 Determinazione del contenuto di malondialeide	59
3.3 Risultati	60
3.3.1 Valutazione dell'effetto tossico di concentrazioni crescenti di rame su microtalee dei cloni Villafranca e 1EB	60

3.3.2	Valutazione dell'effetto tossico di Cu e Zn su microtalee dei cloni Villafranca e 1EB	64
3.3.3	Valutazione dell'effetto tossico di Cu e Zn su microtalee radicate dei cloni Villafranca, AL22 e 46EA in condizioni di semi-idroponia	66
3.3.4	Profili di attività degli enzimi antiossidanti CAT, SOD, APX in seguito all'esposizione a 0,1 mM Cu e 1 mM Zn	69
3.4	Discussione	72
3.4.1	Valutazione dell'effetto tossico di concentrazioni crescenti di rame su microtalee dei cloni Villafranca e 1EB	72
3.4.2	Valutazione dell'effetto tossico di Cu e Zn su microtalee dei cloni Villafranca e 1EB	73
3.4.3	Valutazione dell'effetto tossico di Cu e Zn su microtalee radicate dei cloni Villafranca, AL22 e 46EA in condizioni di semi-idroponia	74
	Conclusioni	78
	<b>Appendice</b>	79
	<b>Bibliografia</b>	80

# Capitolo 1

## 1. PREMESSA

L'incremento della concentrazione di inquinanti organici e metalli pesanti negli ecosistemi agrari e naturali è ormai un problema ampiamente diffuso. I metalli pesanti sono naturali costituenti della crosta terrestre, ma per effetto dell'attività dell'uomo o per cause naturali questi possono essere presenti a concentrazioni potenzialmente tossiche. Tra gli elementi di transizione lo Zinco (Zn) ed il Rame (Cu), sono micronutrienti essenziali per le piante, essendo coinvolti in parecchie funzioni cellulari come componenti di molti enzimi e proteine (Cakmak and Engels, 1999). Lo  $Zn^{2+}$ , per esempio, serve come cofattore per molti enzimi ed un vasto numero di sequenze proteiche contengono zinco legato ai loro domini strutturali (Clarke e Berg, 1998). Il rame è un componente vitale delle reazioni di trasferimento degli elettroni mediato dalle proteine, come la superossido dismutasi, la citocromo-*c* ossidasi e la plastocianina. Ad elevate concentrazioni, tali metalli sono tra gli elementi tossici più ampiamente diffusi negli agroecosistemi, la loro decomposizione nell'ambiente è lenta, risultando quindi in un problematico "remedio" dei suoli inquinati. (Roy and Couillard, 1998; Nane *et al.*, 2002). Le piante assorbono e distribuiscono i metalli pesanti attraverso il flusso di traspirazione all'interno della pianta, con gli stessi meccanismi utilizzati nella nutrizione minerale (Marschner, 1995). Questi meccanismi includono l'assorbimento attraverso le radici, la traslocazione su lunga distanza sfruttando i vasi xilematici e floematici, l'accumulo nella parte ipogea ed epigea della pianta. A questi si sommano tutta un'altra serie complessa di meccanismi di controllo a livello cellulare che consentono di mantenere la concentrazione di metalli entro valori tollerabili dalla pianta senza indurre effetti di tossicità (Clemens 2001, 2002). Ci sono due strategie di base per diminuire la tossicità dei metalli: o l'efflusso dal citosol o attraverso il processo di chelazione, operato dalle fitochelatine e dalle metallotioneine (Fig. 1).



**Figura 1** “A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation” *TRENDS in Plant Science* Vol.7 No.7, July 2002.

Con particolare riferimento a quest'ultime, si tratta di proteine a basso peso molecolare che hanno la capacità di legare efficientemente i metalli, lasciando pensare ad un loro importante ruolo nella tolleranza ai metalli e nell'omeostasi nelle piante (Cobbett e Goldsbrough, 2002).

Alcune piante non solo li tollerano ad elevati livelli ma possono anche iperaccumularli. Circa 400 differenti specie appartenenti ad un ampio range di taxa sono state descritte come iperaccumulatrici (Baker e Brooks, 1989). Per specie iperaccumulatrici generalmente intendiamo quelle piante che sono capaci di accumulare quantità di metallo  $> 0,1\%$  del peso secco dell'elemento tale il Ni, Co o il Pb. Per lo Zn il limite è superiore all'1%, per il Cd il limite è superiore a 0,01% del peso secco. Il fenotipo che iperaccumula è il concetto che sta alla base del fitoremedio, l'uso di piante che accumulano metalli per il clean-up di suoli contaminati (Chaney *et al.*, 1997).

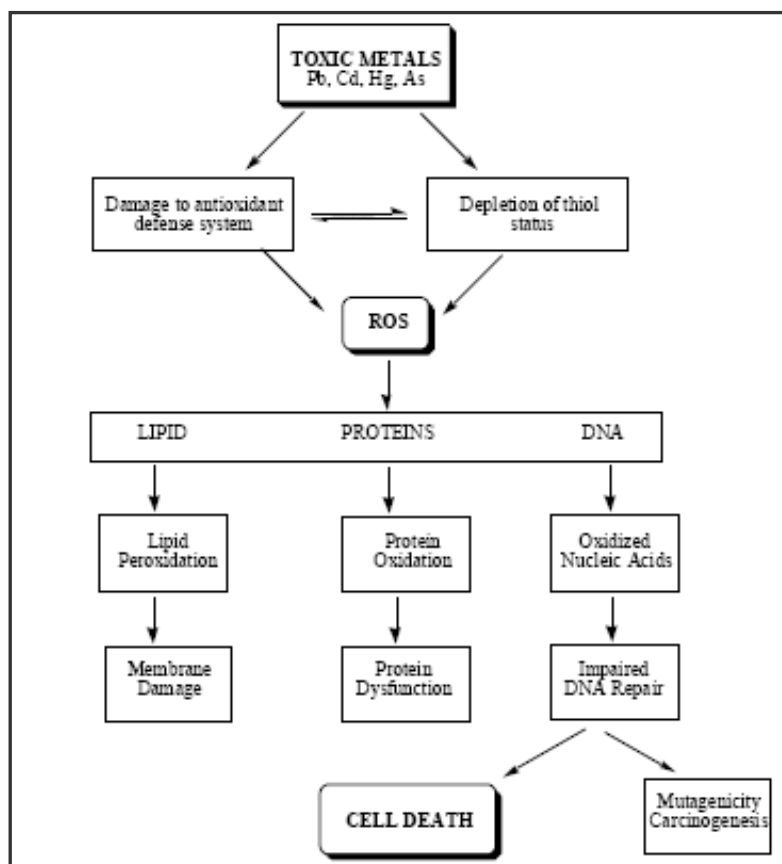
Negli ultimi anni numerosi studi su inquinanti organici e inorganici hanno indicato il pioppo come buon candidato per la remediazione dell'acqua e del suolo. Nella maggior parte dei casi le indagini condotte riguardano la capacità di accumulo e la produzione di biomassa da parte delle piante in risposta ad elevate concentrazioni di inquinanti. Dall'altra parte poche sono le informazioni riguardo gli aspetti fisiologici e molecolari della risposta della pianta ad inquinanti, come i metalli pesanti (Hall, 2002).

Concentrazioni elevate di metalli pesanti influenzano una molteplicità di processi nelle piante. Una delle maggiori conseguenze è data da una maggiore produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

L'induzione dello stress ossidativo in presenza di eccesso di metalli sia a livello ipogeo che epigeo è stato oggetto di numerosi studi. La ragione più importante è che i radicali sono particelle estremamente pericolose e possono danneggiare tutti i tipi di biomolecole, incluso il DNA, le proteine e i lipidi (Mancini *et al.*, 2006). Inoltre alcuni autori sono impegnati nella ricerca di indicatori dello stato di stress indotto da metalli pesanti e nella comprensione se si vi è o meno l'induzione degli enzimi antiossidanti. Alla fine, la capacità di tollerare efficientemente lo stress ossidativo potrebbe essere, come suggerito in precedenza, una valida caratteristica delle piante per la "phytoremediation" dei suoli (un'efficace sistema di detossificazione dei radicali liberi sembra

essere un requisito). Ci sono evidenze secondo cui l'esposizione delle piante a concentrazioni elevate di Fe e Cu inducono danni ossidativi (De Vos *et al.*, 1992; Gallego *et al.*, 1996; Weckx e Clijsters, 1996; Mazhoudi *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 1997). La capacità della pianta di incrementare la protezione antiossidante per contrastare le conseguenze negative dello stress da metalli pesanti sembra essere limitata poiché alcuni studi mostrano che l'esposizione ad elevate concentrazioni di metalli risultano in una diminuzione e non in un incremento delle attività degli enzimi antiossidanti. Inoltre ci sono studi secondo cui la sovraespressione di agenti chelanti, quali metallotioneine e ferritina, proteggono dallo stress ossidativo (Fabisiak *et al.*, 1999).

È comunque da sottolineare che la risposta a questo tipo di stress è strettamente dipendente dalla specie considerata, dal tessuto analizzato, dal metallo utilizzato, dall'intensità dello stress ed un altro aspetto da non trascurare è rappresentato dalle condizioni di crescita della pianta, se sono controllate (es. coltura *in vitro*) o di pieno campo.



**Figura 2** “ Toxic metals and oxidative stress Part I: mechanisms involved in metal induced oxidative damage” *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2001, 1: 529-539.



## 1.1 LO STRESS OSSIDATIVO

Gli organismi viventi sono esposti a diversi tipi di stress che possono originare da attività antropiche, come per esempio l'accumulo di metalli pesanti, o da cause naturali, quali l'inquinamento dell'aria, la siccità, la temperatura, l'intensità luminosa, la carenza di elementi nutritivi. Poiché le piante hanno meccanismi limitati che le rendono capaci di evitare lo stress, esse necessitano di mezzi flessibili di adattamento alla variabilità delle condizioni ambientali. Una caratteristica comune, associata alla risposta a diverse condizioni di stress, è l'incrementata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nei tessuti della pianta con il conseguente stress ossidativo.

Le specie reattive dell'ossigeno sono normalmente generate nelle cellule della pianta durante i normali processi metabolici (Fridovich, 1995; Alscher *et al.*, 1997). Il sistema fotosintetico di trasporto degli elettroni ne è un esempio.

In condizioni normali il sistema di difesa antiossidante fornisce adeguata protezione contro le specie attive dell'ossigeno e i radicali liberi (Asada e Takahashi, 1987). Al contrario in condizioni di stress induce la produzione di ROS, a cui non corrisponde un'adeguata risposta da parte dei sistemi di difesa antiossidante (Gressel e Salun, 1994). Lo stress ossidativo è essenzialmente un processo regolato, l'equilibrio tra le capacità ossidative e antiossidanti determina il destino della pianta.

La generazione di ROS induce in gran parte ad un irrigidimento della membrana, danni a carico dei lipidi di membrana, denaturazione delle proteine e mutazioni a carico del DNA (Borg e Scaich, 1988). Le più importanti forme di ROS sono rappresentate dal radicale anione superossido ( $O_2^-$ ), il radicale idrossile ( $OH^\cdot$ ) e il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ). In ordine a prevenire lo scoppio ossidativo dovuto alla produzione di ROS, le piante hanno evoluto un meccanismo complesso di detossificazione, che include sia metaboliti con funzioni antiossidanti a basso peso molecolare, come l'ascorbato, il glutatione,  $\alpha$ -tocoferolo, sia componenti enzimatiche (Howe e Schillmiller,

2002). I componenti enzimatici comprendono la superossido dismutasi, che è il maggior enzima detossificatore del O<sub>2</sub>, il quale per una reazione di dismutazione è convertito in ossigeno molecolare e perossido di idrogeno. A sua volta il perossido di idrogeno è convertito in acqua e ossigeno molecolare attraverso la catalasi e una varietà di altre perossidasi. Oltre alle superossido dismutasi, alle catalasi e alle perossidasi, un altro importante componente della difesa enzimatica è dato dal ciclo dell'ascorbato-glutatione che coinvolge quattro enzimi: ascorbato perossidasi, monodeidroascorbato reduttasi, la deidroascorbato reduttasi e la glutazione reduttasi (Asada, 1999).

Inoltre l'incremento delle specie reattive dell'ossigeno determina una perdita di stabilità delle membrane cellulari che è evidenziata dall'accumulo di malondialdeide (MDA), prodotto citotossico della perossidazione lipidica, per questo la concentrazione della malondialdeide viene presa come parametro per la valutazione dello stato di ossidazione della cellula.

## **1.2 METALLOTIONEINE**

Come già anticipato nei precedenti paragrafi le piante utilizzano diverse strategie di risposta agli stress. Nel caso specifico dello stress da metalli pesanti, le metallotioneine rivestono notevole importanza.

Le Metallotioneine (MTs) sono definite come proteine a basso peso molecolare ricche in cisteina, che possono legare i metalli pesanti e possono giocare un ruolo durante i processi intracellulari di "sequestro" dei metalli. A partire dalla prima volta in cui le metallotioneine furono purificate dal rene equino (Margoshes e Vallee, 1957; Kagi e Vallee, 1960), i geni delle metallotioneine e le proteine sono state scoperte in molti organismi procarioti ed eucarioti (Robinson *et al.*, 1993; Cobbett e Goldsbrough, 2002).

Negli animali e nei funghi, le MTs formano complessi con i metalli pesanti e la trascrizione dei geni codificanti le MT è regolata dai metalli (Thiele, 1992). Le metallotioneine giocano un

ruolo nella detossificazione dei metalli pesanti e nell'omeostasi intracellulare degli ioni metallo (Cobbett e Goldsbrough, 2002). Comunque la loro esatta funzione non è ancora ben compresa. Le metallotioneine sono state classificate basandosi sugli arrangiamenti dei residui di cisteina (Cys) a livello della loro struttura. Si distingue una classe I che è tipica dei vertebrati ed una classe II che include le metallotioneine tipiche delle piante e dei funghi così come degli invertebrati. Basandosi poi sulla conservazione dei residui Cys, le metallotioneine delle piante sono state ulteriormente suddivise in quattro tipi (Cobbett e Goldsbrough, 2002).

Le metallotioneine hanno un'espressione tessuto specifica. Infatti l'espressione di quelle appartenenti al tipo 1 tende ad essere più elevata nelle radici rispetto ai germogli, mentre l'opposto è generalmente osservato per le MTs appartenenti al tipo 2 (Cobbett e Goldsbrough, 2002). Il tipo 3 è presente ad alti livelli nelle foglie e nei frutti in maturazione, mentre l'espressione del tipo 4 rimane ristretta ai semi in sviluppo (Cobbett e Goldsbrough, 2002).

Nelle piante, sono stati isolati molti geni e cDNAs codificanti le MTs, ma ad oggi sono state purificate dai tessuti delle piante solo due proteine MTs in *Arabidopsis* (Murphy *et al.*, 1997) e una nel frumento (Lane *et al.*, 1987). La maggior parte delle informazioni riguardo alle loro funzioni putative è derivata da studi di espressione. I dati esistenti, fino ad ora disponibili, riguardo all'effetto degli ioni metallo e al ruolo delle MTs nel processo di detossificazione e di omeostasi sono inconsistenti. Comunque sappiamo da numerosi studi che geni di *MT1* e *MT2* delle piante si sono dimostrati capaci di complementare la carenza di MT nel lievito (*cup1D*), dimostrando la loro funzione nella detossificazione dal rame (Zhou e Goldsbrough, 1994) determinando anche una incrementata tolleranza al cadmio. Ugualmente l'espressione delle MTs delle piante in *Escherichia Coli* conduceva ad una maggiore tolleranza verso rame e cadmio (Kille *et al.*, 1991; Evans *et al.*, 1992). Basandosi su queste scoperte, è ritenuto che le metallotioneine giocano un ruolo importante nell'omeostasi del rame nelle cellule durante lo sviluppo della pianta. Sono stati fatti comunque pochi studi sulla loro funzione espletata nelle piante *in vivo*. Il rame, per esempio,

sembra indurre l'espressione della metallotioneina di tipo 1 in *Arabidopsis* (Zhou e Goldsbrough, 1994), riso (Hsieh *et al.*, 1995) e nel tabacco (Choi *et al.*, 1996). Molto recentemente, in uno studio di Lee *et al.*, (2004) è stato visto che MT2a e MT3 di *A. thaliana*, espresse in maniera transitoria nelle cellule di guardia di *Vicia faba*, conferivano una maggiore resistenza al Cadmio. Nello sforzo di comprendere i processi che sono legati alla tolleranza ai metalli pesanti nel pioppo, è stata caratterizzata l'espressione di geni codificanti trasportatori (*PtdMTs*; Blaudez *et al.*, 2003) e proteine, le metallotioneine, coinvolte nel processo di "binding" dei metalli pesanti. Sono stati identificati vari tipi di Mts (*PtdMTs*) dell'ibrido di pioppo *Populus trichocarpa* x *Populus deltoides* nel database PoplarDB EST e sono stati messi a punto esperimenti per valutarne le loro proprietà funzionali e l'espressione. Nelle radici del pioppo, solo il trattamento con lo zinco ha avuto effetti stimolanti sull'espressione dei geni delle metallotioneine di tipo 1 e di tipo 2. L'espressione del gene *PtdMT3a* non era influenzato dal trattamento con lo zinco, mentre l'espressione *PtdMT3b* ne era debolmente influenzata. Al contrario, i trattamenti con il Cu (50  $\mu$ M) e Cd (25  $\mu$ M) solo debolmente determinavano un incremento nei livelli di trascritto *PtdMTs* se confrontati con i livelli di trascritto in radici non trattate, determinando una completa repressione dell'espressione delle *MT* ad elevate concentrazioni di metalli. Questi risultati suggeriscono un ruolo delle *PtdMTs* del pioppo principalmente nei processi di metabolismo/detossificazione dello Zn piuttosto che in quelli del Cd o del Cu. La presenza di diversi tipi di metallotioneine nel pioppo ed in altre piante può riflettere la diversità della loro funzione nei processi di "sequestration" dei metalli pesanti ma anche in altri meccanismi essenziali per la crescita e lo sviluppo della pianta (Castiglione *et al.*, 2007). Nelle piante la situazione è ulteriormente complicata dalla presenza delle fitochelatine, enzimaticamente sintetizzate (*MTs* di classe III) (Cobbett, 2000), che si sono dimostrate giocare un ruolo molto importante nella detossificazione da metalli pesanti (Cobbett e Goldsbrough, 2002).

La loro espressione nelle pianta è regolata da molti altri fattori, incluso differenti stress quali infezioni da patogeni (Choi *et al.*, 1996; Butt *et al.*, 1998), interazioni simbiotiche (Laplaze *et al.*, 2002) e senescenza fogliare (Bhalerao *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2004), suggerendo quindi che le MTs possono essere considerate come parte di una risposta da parte della pianta agli stress (Cobbett e Goldsbrough, 2002). Inoltre è stato sostenuto che le MTs funzionano come antiossidanti e giocano un ruolo nel “riparare” la membrana plasmatica (Hall, 2002). La scoperta che l'espressione dei geni per le MT sia indotta da stress ossidativo e che le MT possano esercitare attività antiossidanti suggerisce che una delle funzioni di queste proteine sia di proteggere la cellula dai radicali liberi (Andrews, 2000). E' certo che la capacità di limitare i danni da radicali liberi rappresenta una priorità per la cellula e che l'elevata efficienza in questo processo fornisce un vantaggio selettivo. I dati della letteratura scientifica più recente hanno evidenziato il ruolo antiossidante delle MT2 vegetali. In particolare, è stata dimostrata la capacità delle MT2a e MT3 di *Arabidopsis thaliana* di ridurre il livello di ROS generati dall'esposizione delle cellule al cadmio (Lee *et al.*, 2004)

### **1.3 MATERIALE DI STUDIO: IL PIOPPO**

La pianta scelta per questa ricerca è il pioppo. Il genere *Populus* è un membro delle *Salicaceae*, si tratta di un genere di alberi decidui (raramente sempreverdi), hanno un'ampia distribuzione naturale nell'emisfero boreale e una piccola rappresentanza nell'Africa tropicale. Varie classificazioni sono state suggerite, la più recente conta 29 specie raccolte in cinque diverse sezioni (Eckenwalder, 1996). Molte di queste specie hanno un'estesa distribuzione, ripartendosi su interi continenti (per esempio il *P. tremuloides*, *P. tremula*), e solo poche invece sono geograficamente confinate (*P. ilicifolia*, *P. monticola*).

Il pioppo in Italia ha una parte importante nell'arboricoltura da legno: viene infatti impiegato per vari usi come la fabbricazione di fogli di compensato, cassette da imballaggio, carta,

fiammiferi, pannelli di compensato, ecc.. Apprezzato anche per motivi ornamentali, viene impiegato nei parchi, nei giardini e nei viali delle città.

Da un punto di vista scientifico il pioppo rappresenta una scelta ideale per analisi di tipo biochimico e molecolare: è considerata una pianta modello in silvicoltura poiché possiede un genoma di piccole dimensioni e ad oggi totalmente sequenziato (Tuskan *et al.*, 2006); ha una rapida crescita, è facile da clonare e da trasformare geneticamente e mostra una forte associazione tra caratteristiche fisiologiche e produttività di biomassa. Inoltre viene comunemente utilizzato nella fitoestrazione delle aree industriali inquinate (Laureysens *et al.*, 2005). Specie arboree a crescita rapida, come il pioppo, sono ritenute ottimi candidati per il trattamento di suoli inquinati da metalli pesanti (Cunningham e Ow, 1996; Schnoor, 2000) e per produrre biomassa economicamente valida da sfruttare per la produzione di energia. Se confrontato con le specie erbacee, il pioppo mostra parecchie caratteristiche vantaggiose, come un apparato radicale profondo, un'elevata produttività e attività di traspirazione. Il pioppo è già stato studiato per il clean up dei suoli e delle acque inquinate da atrazina (Burken e Schnoor, 1998), tricloroetilene (Newman *et al.*, 1997), zinco (Di Baccio *et al.*, 2003), Cadmio (Robinson *et al.*, 2000) Selenio (Pilon-Smits *et al.*, 1998).

## SCOPO DELLA RICERCA

I metalli pesanti sono tra gli elementi tossici più ampiamente diffusi negli agroecosistemi, la loro decomposizione nell'ambiente è lenta, risultando quindi in un problematico "remedio" dei suoli inquinati. Le piante assorbono e distribuiscono i metalli pesanti attraverso il flusso di traspirazione all'interno della pianta, con gli stessi meccanismi utilizzati nella nutrizione minerale (Marschner, 1995). A questi si sommano tutta un'altra serie complessa di meccanismi di controllo a livello cellulare che consentono di mantenere la concentrazione di metalli entro valori tollerabili dalla pianta senza indurre effetti di tossicità (Clemens 2001, 2002), a cui si associa la funzione di chelazione svolta dalle fitochelatine e dalle metallotioneine. Alcune piante non solo tollerano i metalli pesanti ad elevati livelli ma possono anche iperaccumularli. Circa 400 differenti specie, appartenenti ad un ampio range di *taxa*, sono state descritte come iperaccumulatrici (Baker e Brooks, 1989). Nella maggior parte dei casi le indagini condotte riguardano la capacità di accumulo e la produzione di biomassa da parte delle piante in risposta ad elevate concentrazioni di inquinanti. Dall'altra parte poche sono le informazioni riguardo gli aspetti fisiologici e molecolari della risposta della pianta a tali inquinanti. La capacità della pianta di incrementare la protezione antiossidante per contrastare le conseguenze negative dello stress da metalli pesanti sembra essere limitata poiché alcuni studi mostrano che l'esposizione ad elevate concentrazioni di metalli risultano in una diminuzione e non in un incremento delle attività degli enzimi antiossidanti (Schützendübel e Polle, 2002). Mentre ci sono studi secondo cui la sovraespressione di agenti chelanti quali metallotioneine e ferritina proteggono dallo stress ossidativo (Fabisiak *et al.*, 1999). In luce delle informazioni attualmente disponibili, la ricerca è stata indirizzata alla caratterizzazione biochimica di tre importanti sistemi antiossidanti: CAT, SOD, APX, nel pioppo, che è stato indicato come buon candidato per la remediazione dell'acqua e del suolo. Il materiale utilizzato è quindi rappresentato da tre piante transgeniche MAT-MT, che sovraesprimono la metallotioneina 2 (MT2) di *Pisum sativum*, il loro controllo non trasformato che è rappresentato

dal clone Villafranca che è naturalmente sensibile, a questi si è aggiunto il clone AL22, appartenente ad una collezione privata, selezionato in precedenza per la sua capacità di accumulare/tollerare elevate concentrazioni di metalli pesanti.

Lo scopo è quello di evidenziare eventuali differenze di risposta tra differenti cloni e di approfondire le conoscenze sulla risposta dei sistemi antiossidanti in materiale tollerante di diversa origine e nella fattispecie nei cloni che esprimono la MT2 di pisello.

La mia ricerca si è articolata nei seguenti punti:

- Valutazione della diversa capacità di accumulare i metalli sia a livello radicale che a livello fogliare
- Stima dello stato di stress ossidativo mediante la valutazione dell'accumulo della malondialdeide prodotta dalla perossidazione delle membrane nelle radici e nelle foglie
- Valutazione dell'attività degli enzimi antiossidanti, CAT, SOD e APX, nelle radici e nelle foglie
- Analisi dei profili PAGE per l'identificazione delle diverse isoforme in seguito al trattamento con i metalli.



## Capitolo 2

### 2. INTRODUZIONE

Elevati quantitativi di inquinanti nel suolo e nell'acqua, dovuti ai processi di industrializzazione rappresentano uno dei maggiori problemi ambientali su scala mondiale. In particolare, i metalli appartenenti al gruppo degli elementi di transizione, tra cui zinco e rame, possono avere effetti di tossicità sia sulle piante che sugli animali. Le piante esposte a elevate concentrazioni di metalli pesanti manifestano sintomi di tossicità, come clorosi, inibizione della crescita, riduzione dell'assorbimento di acqua ed elementi nutritivi, alterazione dell'attività degli enzimi e dei processi fotosintetici (Sanità di Toppi e Gabbrielli 1999; Pietrini *et al.*, 2003).

La maggior parte degli studi eseguiti sugli alberi riportano che il pattern di accumulo dei metalli pesanti mostra una compartimentalizzazione predominante nelle radici e una traslocazione ridotta verso la parte epigea, sebbene differenti elementi mostrano un differente pattern di distribuzione. Piombo, mercurio e cromo sono immobilizzati nelle radici, mentre cadmio, rame, zinco, cobalto, molibdeno boro e nichel tendono ad essere trovati maggiormente in altri tessuti, riflettendo quindi una maggiore mobilità di questi ultimi all'interno della pianta.

Le informazioni relative al pattern di assorbimento dei metalli pesanti sono ancora molto limitate, ma è noto che i metalli, come già anticipato, tendono a rimanere localizzati nelle radici piuttosto che essere trasportati ai tessuti aerei della pianta (Borgegård *et al.*, 1989; Arduini *et al.*, 1994). L'uptake, e quindi la tossicità, dipendono dalla solubilità e dalla mobilità del metallo, che complessivamente si riassume nell'abilità del metallo stesso di attraversare le membrane ed essere trasportato attraverso il flusso floematico nelle varie parti della pianta. Questo è probabilmente la maggior costrizione da superare per una più efficiente utilizzazione delle specie arboree nel ridurre la contaminazione dei suoli da metalli pesanti. Inoltre, è necessario valutare il materiale vegetale

forestale per stabilire quali piante siano le più adatte per traslocare i metalli assorbiti alla parte aerea, specialmente ai tessuti del fusto, che non sono rinnovati come le foglie e che possono essere raccolti ed utilizzati per la produzione di energia.

Tra le specie arboree valutate per l'impiego nel fitoremedio, le *Salicaceae* sono state oggetto di particolare attenzione. La rapidità di crescita, e quindi della formazione di biomassa, e l'ampia distribuzione geografica di queste piante le rendono particolarmente adatte come estrattori. Questa famiglia rappresenta una notevole risorsa per l'identificazione di specie/cloni con elevata resistenza e diversa capacità di assorbimento dei metalli come richiesto nel fitoremedio di suoli contaminati. Numerosi studi, pertanto, si sono indirizzati verso l'analisi della resistenza ai metalli e della capacità potenziale di accumulo delle varie specie di salice e di pioppo in esperimenti sia in vaso, in pieno campo che in coltura idroponica (Dickinson, 2000; Eltrop *et al.*, 1991; Greger e Landberg, 1999; Keller *et al.*, 2003; Klang-Westin e Eriksson, 2003; Laureysens *et al.*, 2005; Meers *et al.*, 2005; Granel *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 2000; Rosselli *et al.*, 2003; Vyslouzilova *et al.*, 2003; Dos Santos Utmazian *et al.*, 2007).

I contenuti di Cd e Zn accumulati in tessuti di diverse *Salicaceae* in diversi stadi di sviluppo, in seguito all'esposizione ai metalli in un sistema idroponico, riportati da Dos Santos Utmazian e collaboratori, sono stati presentati in figura 1.

Il numero di test in condizioni idroponiche per studiare l'accumulo potenziale di Cd e Zn nel salice e nelle diverse specie di pioppo è piuttosto piccolo (Fig. 1). Le concentrazioni del metallo in soluzione idroponica vanno da 0,1  $\mu\text{M}$  (Cd) a 1000  $\mu\text{M}$  (Zn), il periodo di esposizione al metallo varia ampiamente, da pochi giorni a parecchi mesi. Alcuni studi coinvolgono trattamenti con più metalli contemporaneamente, altri prevedono il trattamento con un singolo metallo, i risultati sono quindi eterogenei e difficilmente confrontabili tra differenti esperimenti.

La più alta concentrazione di Cd nei germogli è stata misurata in talee di *Salix x calodendron* dopo 112 giorni di trattamento, in cui le concentrazioni del metallo sono aumentate

del 50% rispetto alla quantità iniziale ( $1,34 \mu\text{M Cd}$ ) ogni 14 giorni ( $350 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) (Pushon *et al.*, 1996). La maggiore concentrazione di Zn è stata invece trovata nei germogli del *Salix viminalis* dopo 20 giorni di esposizione a  $10 \mu\text{M}$  di Zn ( $1810 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) (Greger e Landberg, 1999).

La coltura idroponica è un sistema molto utile per analizzare la risposta delle piante in condizioni di stress da metalli pesanti, perché riduce non solo il periodo di crescita e la durata del tempo di trattamento delle piante, ma anche lo spazio richiesto per eseguire l'esperimento. Inoltre la variabilità dovuta ai fattori ambientali è notevolmente ridotta. In generale, i dati ottenuti da uno screening in condizioni di coltura idroponica per essere confermati devono essere seguiti da prove di pieno campo. Infatti, se da un lato questo sistema permette di eliminare tutte le possibili variabili dovute ai diversi fattori ambientali che intervengono è pur vero che, in condizioni di coltura idroponica, viene influenzata largamente la disponibilità del metallo per la pianta in quanto vengono a mancare tutte quelle interazioni fisiche metallo-suolo che si riscontrano in natura.

## **SCOPO DELLA RICERCA**

Lo scopo di questa parte dello studio è quello di valutare la capacità fitoestrattiva potenziale di cloni di pioppo in relazione anche a loro genotipo, mediante la misurazione del metallo accumulato nei tessuti della pianta.

Per tale valutazione sono state utilizzate: tre piante transgeniche MAT-MT2 che sovra-esprimono la metallotioneina 2 (MT2) di *Pisum sativum*, il loro controllo non trasformato rappresentato dal clone Villafranca, a questi si è aggiunto il clone AL22, precedentemente selezionato in campo come tollerante. Le piante sono state allevate e sottoposte ai singoli trattamenti con Zn e Cu, in condizioni strettamente controllate, ed è stato valutato l'assorbimento del metallo sia per le radici che per i germogli.

Table 1  
Hydroponic tests performed to study the Cd and Zn accumulation and/or tolerance of willow and poplar species

Species/clone	Solution conc (µM)	Experimental details	Plant conc. (mg kg <sup>-1</sup> )	Reference
<i>Populus × euramericana</i>	Zn 1–1000 (ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	Up to 3.5 months. Sand–vermiculite substrate	Old leaves: Zn 131.3	Di Baccio et al. (2003)
<i>Salix caprea</i>	Cd 4.45, Zn 153	21 days + 7 days without metals	Stems*: Cd < 50, Zn < 800	Dickinson et al. (1994)
<i>S. viminalis</i>	Cd 1 (0–10 CdCl <sub>2</sub> ), Zn 10 (0–100 ZnCl <sub>2</sub> )	20 days, 104 different clones	Shoots: Cd 0.2–8.5, Zn 14–1813	Greger and Landberg (1999)
<i>S. viminalis</i>	Cd 1 (0–10 CdCl <sub>2</sub> ), Zn 10 (0–100 ZnCl <sub>2</sub> )	20 days, 5 different clones of <i>S. viminalis</i>	Shoots: Cd < 2, Zn < 700	Greger and Landberg (2001)
<i>S. discolor</i> , <i>S. eriocephala</i> , <i>S. exigua</i> , <i>S. nigra</i> and <i>S. lucida</i>	Cd 5 and 25 (CdSO <sub>4</sub> )	21 days	Shoots/wood (25): Cd 6.45–80/18.3–181.0	Kuzovkina et al. (2004)
<i>S. viminalis</i> , <i>S. dasyclados</i> , <i>S. daphnoides</i> , <i>S. purpurea</i> and <i>S. triandra</i>	Cd 1 (0–10 CdCl <sub>2</sub> ), Zn 10 (0–100 ZnCl <sub>2</sub> )	20 days. Clones from unpolluted and polluted areas	Shoots*: Cd < 10	Landberg and Greger (1996)
<i>S. viminalis</i>	Single/cocktail, Cd 0.3, Zn 3 Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 10	20 days, single and cocktails treatments	Shoots*: Zn < 400	Landberg and Greger (2002)
<i>S. viminalis</i> , <i>S. alba</i> , <i>S. purpurea</i> , <i>S. cinerea</i> , <i>P. × euramericana</i> <i>S. viminalis</i> , <i>S. alba</i> , <i>P. × euramericana</i> and <i>P. alba pyramidalis</i>	Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 10	35 days.	Shoots: Cd 2–62.1	Lunacková et al. (2003)
<i>P. deltoidea</i> and <i>P. euramericana</i>	Cd 0.1 and 10 Initial dose, Cd 1.34, Zn 53.5	3 months Concentrations were increased by 50% of the initial dose. 112 days	Leaves/stems: Cd 3–29/40–160	Lux et al. (2002)
<i>S. caprea</i> , <i>S. viminalis</i> , <i>S. × calodendron</i> , <i>S. aquatica gigantea</i>	Cd 1.33–13.3 (CdSO <sub>4</sub> ), Zn 38.2–380 (ZnSO <sub>4</sub> )	Up to 128 days. Single/cocktail treatments	Leaves and stems*: Cd < 10 Willow cuttings*: Cd < 350, Zn < 550	Pilipović et al. (2005) Punshon et al. (1996)
<i>S. burjatica</i> , <i>S. caprea</i> , <i>S. viminalis</i> , <i>S. calodendron</i>	Cd 0.12, Zn 42.3	1 week	Leaves: Cd < 100, Zn < 700	Punshon and Dickinson (1997)
<i>S. phylicifolia</i> and <i>S. borealis</i>	Cd 10, Zn 200	6 weeks, metal cocktail treatments	Leaf: Cd 5.7, Zn 302 Leaf/root, Cd 0.07–2.70, Zn 0.22–1.97	Stolz and Greger (2002) Watson et al. (2000)

\*Estimated from figures.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Piante e loro campionamento

Per gli esperimenti sono state utilizzate microtalee delle piante transgeniche MAT-MT2, che sovraesprimono la metallotioneina 2 (MT2) di *Pisum sativum* (denominate 46EA, 1EB, 10ECA), il loro controllo non trasformato che è rappresentato dal Clone Villafranca (*P. alba*), e il clone AL22 appartenente ad una collezione privata, selezionato in precedenza per la sua capacità di accumulare/tollerare elevate concentrazioni di metalli pesanti. Per rendere omogenei gli esperimenti, sono state utilizzate microtalee di circa 1 mese (7-8 internodi). Una volta effettuato il trattamento con i metalli pesanti Zn e Cu, alle concentrazioni rispettivamente 1 mM e 0,1 mM, le foglie e le radici sono state prelevate dalle plantule e stoccate a -80 °C fino al momento delle analisi biochimiche.

### 2.2 Micropropagazione del materiale

Le piantine sono state propagate utilizzando Woody Plant Medium (WPM, McCown and Lloyd, 1981), per quanto concerne l'apporto di macro e microelementi, già addizionato con le vitamine. Per la preparazione del mezzo di crescita sono stati utilizzati due distinti protocolli, la cui scelta si è resa indispensabile a seconda della parte della pianta che è stata utilizzata per la moltiplicazione. Se il materiale di partenza è rappresentato dall'apice vegetativo è stato utilizzato il terreno denominato WPM, il cui protocollo di preparazione è di seguito riportato:

McCown Woody Plant Medium incl. vitamins	2,462 gr/lt
Saccarosio	20,00 gr/lt
Carbone attivo	1,500 gr/lt
pH ottimale	5,7
Phytigel	2,500 gr/lt

Al contrario se la moltiplicazione avviene a partire dagli internodi è stato utilizzato un altro terreno denominato rd11, il cui protocollo è di seguito riportato:

McCown Woody Plant Medium incl. vitamins	2,462 gr/lt
Saccarosio	20,000 gr/lt
Caseina	200,000 mg/lt
Ca pantotenato	100,000 mg/lt
Acido folico	50,000 mg/lt
Acido Indolbutirrico	0,500 mg/lt
pH ottimale	5,7
Phytigel	2,500 gr/lt

La crescita delle piantine è avvenuta sotto condizioni controllate di temperatura ed intensità luminosa, rispettivamente a 24 °C con un fotoperiodo di 16-8h (luce-buio) e PPF (Photosynthetic Photon Flux Density) pari a 84  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .



### **2.3 Trattamento con metalli pesanti**

Per il trattamento con i metalli pesanti, il mezzo di crescita è stato preparato dimezzando il contenuto di macro e microelementi, utilizzando il protocollo di preparazione del terreno WPM. I trattamenti, effettuati separatamente per i due metalli, prevedevano l'impiego di Zn e Cu addizionato al terreno sottoforma rispettivamente di  $\text{ZnSO}_4$  e  $\text{CuCl}_2$  in concentrazioni pari 1mM per lo zinco e 0,1 mM per il rame. In base ai risultati ottenuti nel corso della sperimentazione la concentrazione scelta per il Cu è di 0.10 mM mentre per lo zinco si è adottata la concentrazione 1 mM sulla base dei dati di tossicità di questo metallo esistenti in letteratura.

Nel primo set di esperimenti sono state utilizzate microtalee di VF e 1EB, tagliate alla base, prive di radici, e quindi trasferite sul mezzo di crescita solido addizionato con le rispettive concentrazioni di metalli e mantenute in questa condizione per 15 giorni, al fine di poter verificare l'insorgenza di eventuali sintomi di tossicità, valutare la capacità rizogena, in termini di numero e lunghezza delle radici e, da un punto di vista biochimico, l'attività dei principali enzimi antiossidanti.

Nel secondo set di esperimenti microtalee (in questo caso dotate di radici) di VF, AL22, 1EB, 46EA, 10 ECA sono state sottoposte a 7 giorni di trattamento in condizioni di semi-idroponia, mantenendo le stesse concentrazioni di metalli, utilizzando il mezzo di crescita impiegato nel precedente set di esperimenti, ma privato dell'agente solidificante (Appendice, fig. 1). Alla fine degli esperimenti i germogli e le radici sono stati raccolti, congelati in azoto liquido e conservati a -80°C.

#### **2.4 Determinazione metalli**

Le radici e i germogli, raccolti subito dopo i trattamenti, sono stati direttamente utilizzati per la determinazione dell'accumulo di metalli pesanti, al fine di comprendere quale è la parte della pianta in cui avviene l'accumulo dei metalli rame e zinco e valutare l'entità dell'accumulo stesso.

Il materiale, il cui peso fresco era circa 1 gr, è stato posto all'interno di crogiolini, in numero pari ai trattamenti e ai cloni considerati. Il protocollo prevede una prima fase di essiccazione del materiale che è stata fatta a 70 °C per 12 h. Il materiale, così trattato, è stato pesato per verificare che rientrasse nell'intervallo di peso necessario per effettuare l'analisi, che è compreso tra 100 e 500 mg di peso secco. Successivamente i campioni sono stati inceneriti a 520°C. Le ceneri, così ottenute, sono state pesate e quindi trattate con 2.5ml di acqua distillata, quindi dissolte in HNO<sub>3</sub> 3N, diluite a 10 ml, filtrate e raccolte in provetta. Per la determinazione spettrofotometrica è stato preparato uno standard con 10mg/l sia per lo zinco che per il rame. Su due crogiolini vuoti è stato preparato il bianco con le stesse modalità seguite per i campioni. In questa fase affinché i campioni potessero essere saggiati allo spettrofotometro con ICP (Plasma 400 Perkin Elmer) sono stati diluiti 1:5 in acqua distillata. I valori di emissione totali, di cui sono state fatte due repliche per ciascun trattamento, sono stati convertiti in valori di concentrazione sulla base degli standards e del bianco.

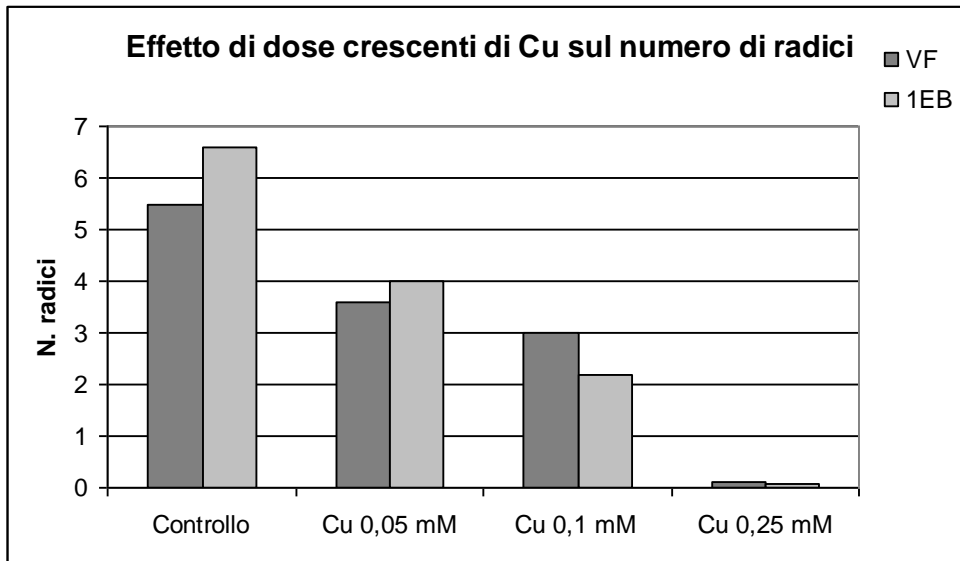
## 2.5 RISULTATI

Per valutare gli effetti dei metalli pesanti e stabilirne le concentrazioni di impiego sono stati utilizzati il clone di pioppo bianco (*P. alba*) MAT-MT2, denominato 1EB e il suo controllo non trasformato clone Villafranca (VF). Le microtalee sono state tagliate alla base, prive di radici, e trasferite sul mezzo di crescita solido addizionato con i singoli metalli e mantenute in questa condizione per 15 giorni. Al termine della coltura la tossicità del metallo è stata valutata, sulla base della capacità rizogena espressa in termini di numero di radici, e dello sviluppo della microtalea, espressa come peso e lunghezza della parte aerea. Per il Cu, vista la sua maggiore citotossicità, sono state considerate tre concentrazioni: 0,05; 0,10 e 0,25 mM.

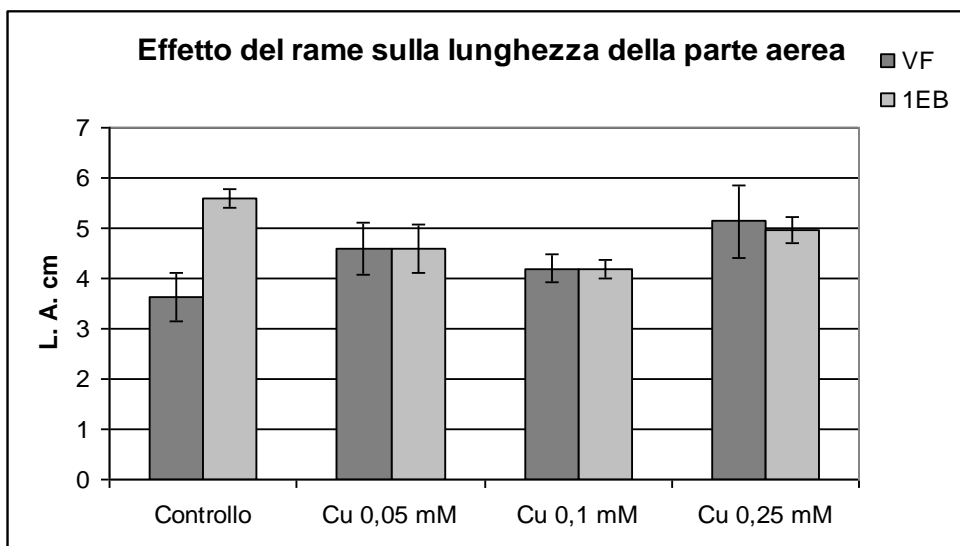
I risultati indicano, confermando risultati ottenuti in precedenza, che la crescita su un terreno contenente concentrazioni mM di rame determina una riduzione della emissione del numero e della crescita delle radici rispetto al controllo proporzionale all'aumento della concentrazione, fino alla loro quasi totale assenza in corrispondenza della dose più elevata 0,25 mM di Cu (Fig. 1A). È interessante notare anche una sensibilità minore al metallo da parte della linea trasformata 1EB rispetto al clone di controllo Villafranca. Le dosi considerate non sembrano invece avere effetti significativi sullo sviluppo della parte aerea (Fig. 1B), mentre è evidente il diverso effetto di concentrazioni inibenti del metallo sul peso di radici e foglie (Fig. 1C). Sulla base di questi risultati è stata scelta la concentrazione 0,1 mM di Cu.

In accordo con i dati ottenuti per il Cu, il trattamento con lo Zn 1 mM determina una diminuzione del numero di radici rispetto al controllo dimostrando tuttavia una minore attività inibente la radicazione a confronto del rame (fig. 1D).

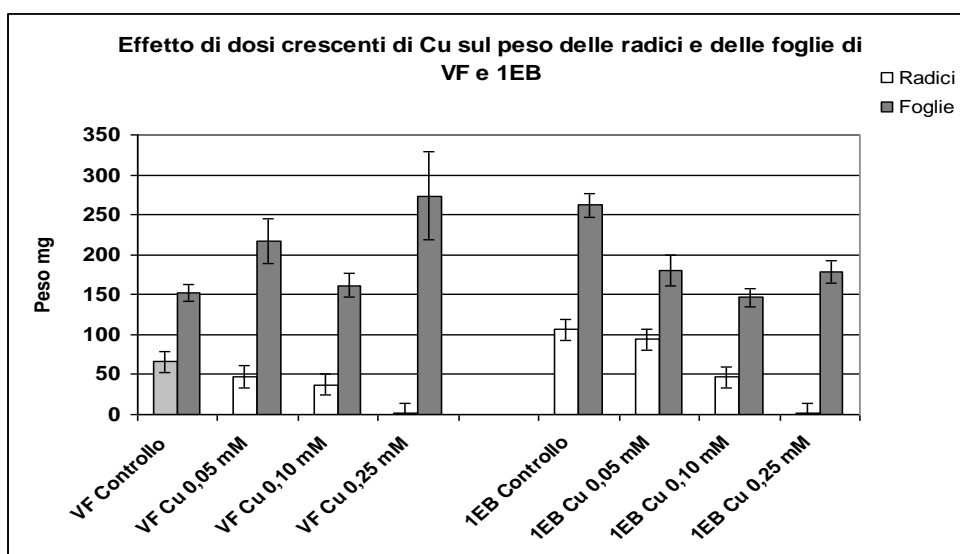




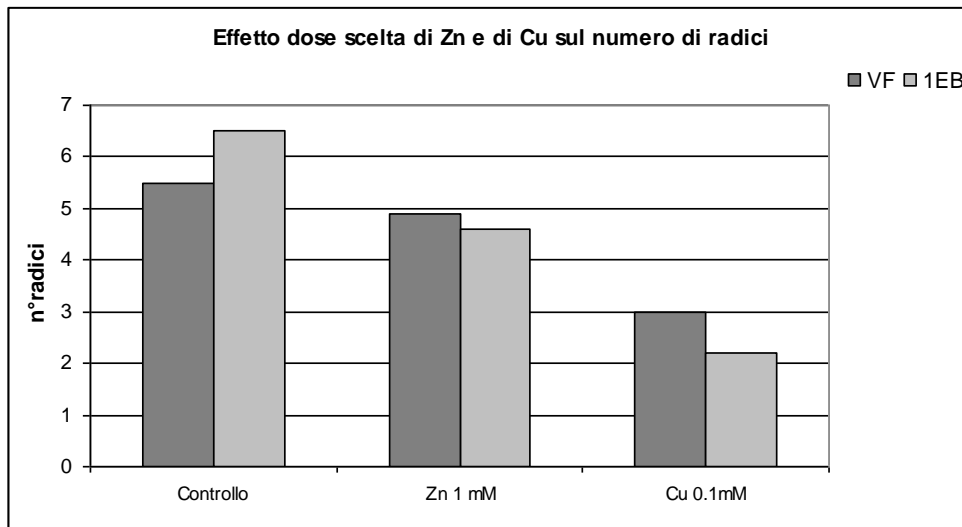
**Fig. 1A:** effetto di concentrazioni crescenti di Cu sul numero di radici nei cloni VF e 1EB



**Fig. 1B:** effetto di concentrazioni crescenti di Cu sulla lunghezza della parte aerea nei cloni VF e 1EB



**Fig. 1C:** effetto di concentrazioni crescenti di Cu sul peso delle radici e delle foglie nei cloni VF e 1EB



**Fig. 1D:** effetto di Cu (0,1 mM) e Zn (1 mM) sul numero di radici nei cloni VF e 1EB

### **2.5.1 Determinazione del contenuto di rame e zinco nelle microtalee esposte ai metalli**

Allo scopo di valutare l'entità dell'accumulo del metallo nelle parti della pianta ed eventuali differenze tra i cloni in esame, la quantità di rame e zinco è stata valutata su piantine *in vitro*, transgeniche 46EA, 1EB, 10ECA, sul loro controllo non trasformato rappresentato dal clone Villafranca ed sul clone AL22 selezionato in campo appartenente ad una collezione privata.

La capacità estrattiva della pianta, valutata come assorbimento di Cu e di Zn, espresso come mg/Kg sulla sostanza secca nei campioni di foglie e di radici, è riportata nella tabella 1. Dai dati presentati emerge chiaramente che in tutti i cloni coltivati in presenza dei metalli, l'accumulo è maggiore nelle radici rispetto alle foglie anche se nel caso dello zinco si osserva una maggiore mobilità verso le foglie. A questo proposito è interessante notare che lo zinco viene traslocato maggiormente verso le foglie quando il mezzo di coltura non contiene il metallo.

Per quel che concerne il rame i cloni, manifestando diverse capacità estrattive, presentano maggiori capacità di accumulo, da 10 a 20 volte superiori, nelle radici rispetto alle foglie. 46EA è il clone che sembra manifestare una più alta capacità di accumulare il metallo nelle radici, con valori superiori a 1,5 g/Kg di sostanza secca mentre il clone 10ECA manifesta il contenuto più elevato di rame nelle radici, presentando anche una buona capacità di accumulo nelle foglie. In questo clone infatti si osserva il rapporto più elevato (pari a 3:1) di contenuto di rame in radici/foglie.

Il contenuto di Cu in foglie e radici (fig. 2A) espresso come rapporto presenza/assenza del metallo nel mezzo di coltura mostra diversità tra cloni. E' interessante notare che nelle foglie i cloni AL22 e 10ECA presentano il rapporto più elevato, mentre i valori trovati negli altri cloni sono tra loro paragonabili, un quadro simile si nota anche nelle radici dove però è il clone Villafranca a presentare il rapporto maggiore di contenuto di metallo. I risultati relativi all'assorbimento dello Zn, (Tabella 1, fig. 2B) mettono in evidenza un accumulo del metallo nell'apparato radicale maggiore di tre, quattro volte quello osservato nella parte fogliare. I cloni che più accumulano Zn

sono 46EA, 1EB e 10ECA rispettivamente con valori prossimi ai 4 g/kg di sostanza secca nelle radici. Lo zinco inoltre viene accumulato nelle foglie in misura maggiore di quanto osservato per il rame. Tuttavia quando i valori sono espressi come rapporto tra il contenuto di metallo in presenza del metallo sul controllo senza metallo non sono evidenti differenze tra le cinque linee analizzate né a livello fogliare né a livello delle radici (Fig. 2C).

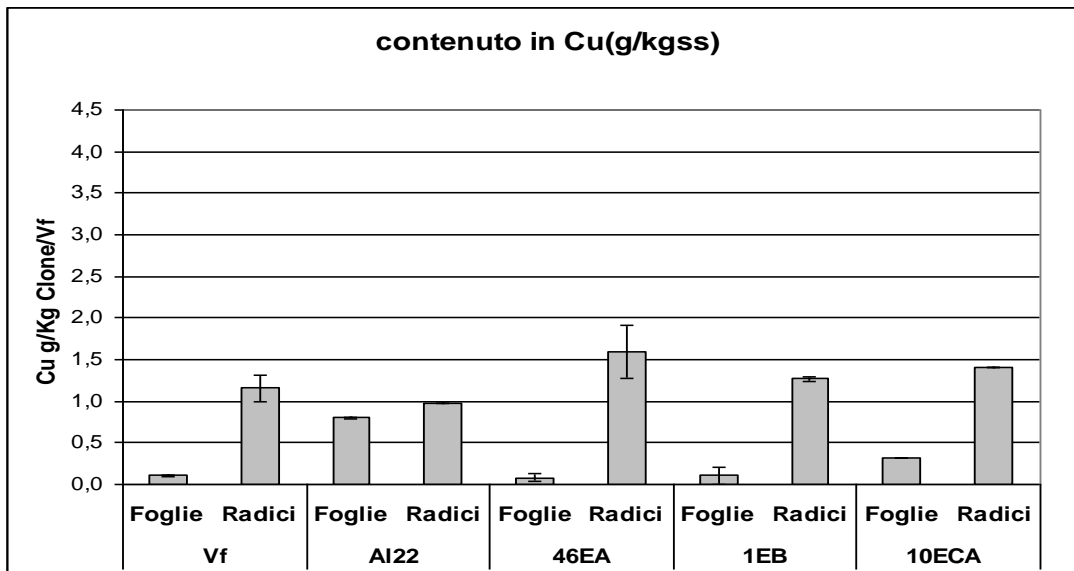


Fig. 2A

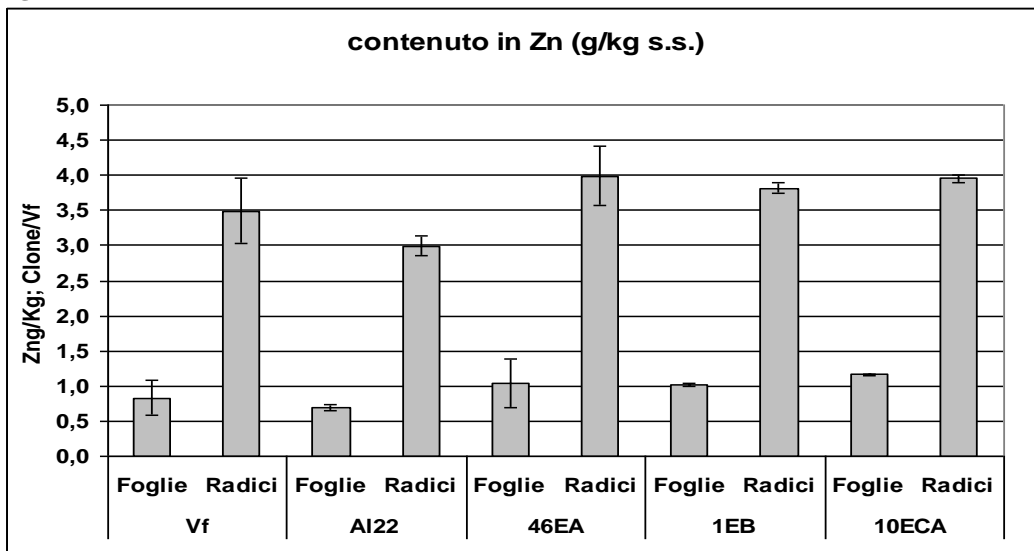


Fig.2B

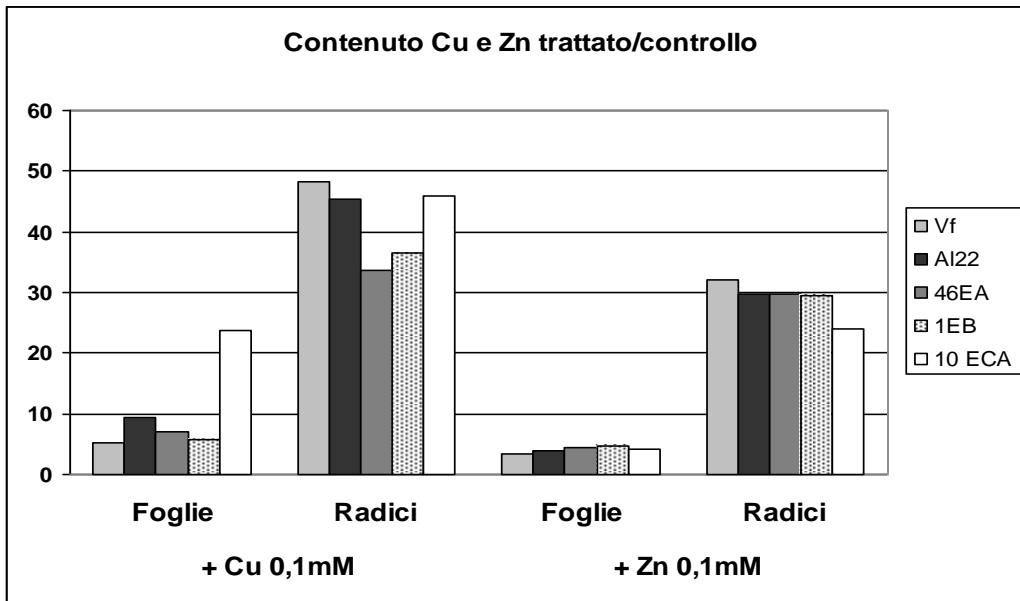


Fig. 2C: contenuto di rame espresso rapporto trattato controllo.

La capacità di accumulare dei cloni transgenici e del clone selezionato in campo AL22 è stata valutata esprimendo i valori medi di rame e zinco nelle foglie e nelle radici di ciascun clone in rapporto ai valori trovati nel clone di riferimento Vf. I risultati sono riassunti nelle figure 3A e 3B. L'analisi dei risultati rivela che i cloni transgenici hanno una "performance" migliore del clone AL22, per quel che concerne la capacità di accumulare rame nelle radici. Anche lo zinco è accumulato in modo maggiore nei tessuti dei cloni MAT-MT2 rispetto al clone AL22, non solo nelle radici ma anche nelle foglie.

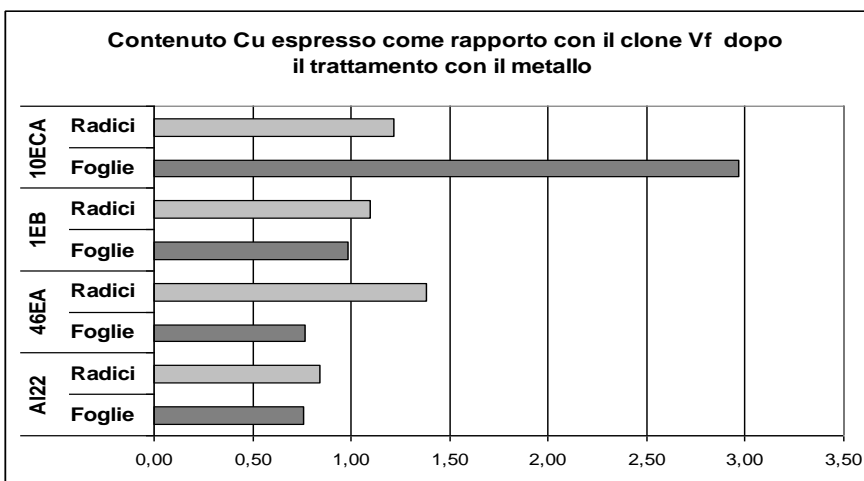
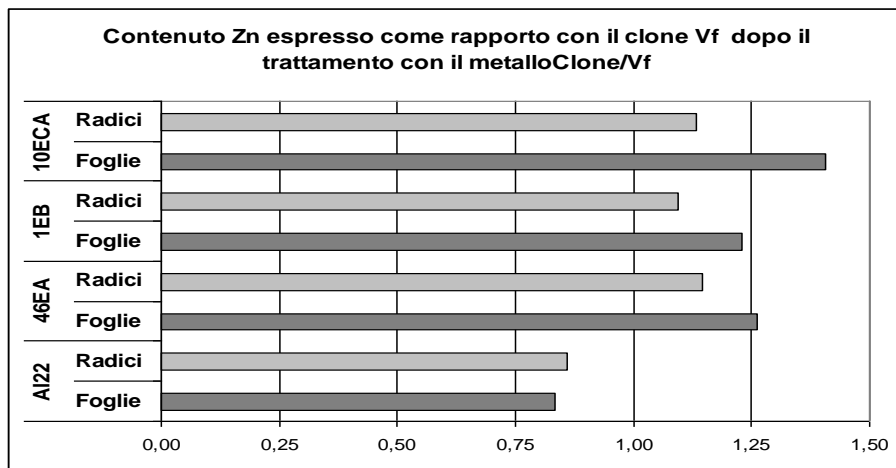


Fig. 3A



**Fig. 3B**

**Tabella 1.** Quantità di Cu e Zn in radici e foglie di cloni di *P.alba* valutato mediante ICP (Plasma400 Perkin Elmer).

Cloni	organo	Cu (mg/kg s.s.)	Er. St.	Cu trattato/ controllo	Zn (mg/kg s.s.)	Er. St.	Zn trattato/ controllo
Vf Controllo	Foglie	20,28	8,93		241,15	37,73	
	Radici	23,96	4,97	-	108,31	0,99	-
Vf Cu 0,1mM	Foglie	105,57	11,23	5,21	241,33	52,54	1,39
	Radici	1154,92	156,38	48,20	134,08	28,49	1,24
Vf Zn 1 mM	Foglie	12,73	1,12	0,63	829,13	248,11	3,44
	Radici	34,23	12,58	1,43	3487,43	465,93	32,20
Al22 Controllo	Foglie	8,58	7,94		176,18	37,15	1,00
	Radici	21,48	5,10	-	101,14	13,85	-
Al22 Cu 0,1 mM	Foglie	80,37	9,48	9,37	158,60	12,41	0,90
	Radici	974,97	4,60	45,39	106,74	79,06	1,06
Al22 Zn 1 mM	Foglie	10,96	0,92	1,28	691,89	40,32	3,93
	Radici	21,48	7,97	1,00	2995,64	136,94	29,62
46EA Controllo	Foglie	11,60	2,17		236,70	34,95	
	Radici	47,59	14,51		134,57	3,26	-
46EA Cu 0,1 mM	Foglie	80,62	45,37	6,95	181,97	43,49	0,77
	Radici	1598,92	315,87	33,60	187,29	30,91	1,39
46EA Zn 1 mM	Foglie	9,59	1,49	0,83	1045,56	346,42	4,42
	Radici	102,79	69,47	2,16	3993,01	416,55	29,67
1EB Controllo	Foglie	17,86	1,14		219,00	4,00	
	Radici	34,62	1,38	-	129,18	1,17	-
1EB Cu 0,1 mM	Foglie	103,70	1,17	5,81	202,41	4,40	0,92
	Radici	1266,80	23,20	36,59	177,14	12,46	1,37
1EB Zn 1 mM	Foglie	15,69	3,21	0,88	1019,26	19,37	4,65
	Radici	36,58	1,35	1,06	3813,77	76,23	29,52
10ECA Controllo	Foglie	13,23	0,77		287,79	2,34	
	Radici	30,45	1,56	-	164,37	5,63	-
10ECA Cu 0,1 mM	Foglie	312,97	2,03	23,66	235,05	11,15	0,82
	Radici	1401,66	3,12	46,03	172,36	6,54	1,05
10ECA Zn 1 mM	Foglie	13,87	1,37	1,05	1166,94	10,54	4,05
	Radici	33,52	1,04	1,10	3951,81	48,19	24,04

## 2.6 DISCUSSIONE

Il pioppo, grazie alla crescita, alle sue caratteristiche genetiche e culturali, è un potenziale candidato per la “phytoremediation” di suoli contaminati da metalli pesanti.

La tolleranza al metallo e conseguentemente la protezione dell'integrità e della funzionalità dei processi metabolici e fisiologici primari, è un prerequisito necessario affinché una pianta possa essere impiegata nella “phytoremediation” (Pietrini *et al.*, 2003).

In questa ricerca è stato confrontato il comportamento di cinque cloni in relazione alla loro capacità di tollerare, accumulare e traslocare nei tessuti i metalli zinco e rame. I cloni, che sono stati utilizzati negli esperimenti, sono rappresentati da tre cloni trasformati MAT-MT2 (denominati 46EA, 1EB, 10ECA), che sovraesprimono la metallothioneina 2 (*MT2*) di *Pisum sativum*, il loro controllo non trasformato, rappresentato dal clone Villafranca (*P. alba*) ed infine il clone AL22, appartenente ad una collezione privata, selezionato in precedenza per la sua capacità di accumulare/tollerare elevate concentrazioni di metalli pesanti.

L'obiettivo di questa prima parte del lavoro è valutare la capacità di cloni di pioppo bianco di tollerare l'esposizione a dosi inibenti di zinco e rame e di accumulare i metalli, traslocandoli dall'apparato radicale alla parte aerea.

La maggior parte degli studi eseguiti sulle specie arboree riportano che il pattern di accumulo dei metalli pesanti avviene principalmente nelle radici, mentre una traslocazione ridotta è osservata verso la parte epigea (Borgegård *et al.*, 1989; Arduini *et al.*, 1994). I risultati, ottenuti circa all'accumulo/traslocazione dei metalli a livello radicale e fogliare, sono in accordo con quanto in precedenza trovato. Infatti, sia per Zn che per Cu, in presenza del metallo nel terreno colturale si verifica un maggior accumulo a livello radicale in tutti i cloni considerati. Questi risultati evidenziano come vi sia un effettivo maggiore accumulo dei metalli pesanti a livello



radicale, come confermato da numerosi altri studi (Kabata-Pendias e Pendias, 1984; Glavac *et al.*, 1990; Alloway, 1995; Landberg and Greger, 1996).

I cloni manifestano capacità di assorbimento diverse a seconda del metallo. Nel caso dello zinco le tre piante trasformate (46EA, 1EB, 10ECA) ed il clone tollerante AL22 presentano un contenuto di metallo a livello radicale maggiore del clone non trasformato Villafranca, tuttavia le differenze tra cloni non risultano significative.

Per il rame, il 46EA è il clone che presenta il maggiore accumulo nelle radici, tuttavia tutti i cloni transgenici e il clone selezionato in campo AL22 hanno un trend di accumulo nelle radici superiore al controllo Villafranca.

Si confermano le differenze tra i metalli in relazione ai due organi considerati. Lo zinco traslocato nelle foglie raggiunge quantità pari a un terzo di quello trovato nelle radici in tutti i cloni. È interessante notare che ciò avviene solo in presenza del metallo, infatti in condizioni normali di coltura le foglie presentano valori di zinco sempre maggiori di quelli osservati nelle radici. I dati sono in accordo con quanto trovato da Utmazian e collaboratori (2007), che hanno osservato notevoli differenze nella risposta all'esposizione ai metalli tra specie di pioppo e tra diversi cloni di salice, confermando l'elevata variabilità genetica della famiglia delle *Salicaceae*. Le specie e i cloni da loro analizzati mostravano un differente pattern di distribuzione del Cd e dello Zn tra radici e foglie. In particolare alcuni cloni di salice (*Salix babilonica*, *S. rubens*-1, *S. purpurea*, *S. fragilis*, *S. humboldtiana*) mostravano un rapporto foglia:radice  $< 1$ , indicando quindi un elevato uptake del metallo e di conseguenza un inefficiente traslocazione verso la parte fogliare. È da notare, però, che la scarsa capacità di trasferimento del Cd e dello Zn dalle radici alle foglie osservato in molti trattamenti può essere parzialmente considerato un artefatto determinato dalla breve durata di esposizione ai metalli in esperimenti condotti in condizioni idroponiche. La durata limitata nel tempo dell'esposizione ai metalli in condizioni idroponiche può

non essere sufficiente a permettere un maggiore accumulo dei metalli (Cd, Zn) nella parte aerea della pianta.

I risultati nel complesso mettono anche in evidenza una buona “performance estrattiva” dei cloni MAT-MT2 rispetto al loro controllo non trasformato ed anche al clone AL22, selezionato in campo come tollerante. Questo risultato è di particolare interesse, in considerazione del ruolo delle metallotioneine nei processi di metabolismo/detossificazione dei metalli di transizione. (Kohler *et al.*, 2004).

## Capitolo 3

# I sistemi antiossidanti nella risposta del pioppo a concentrazioni tossiche di rame e zinco

### 3.1 INTRODUZIONE

Rame e zinco sono micronutrienti essenziali per la pianta, tuttavia possono causare effetti nocivi se presenti in eccesso. I metalli pesanti possono perturbare il ciclo cellulare nei meristemi (Sobkowiak e Deckert, 2003), causare alterazioni al citoscheletro (Dovgalyuk *et al.*, 2003) e indurre danni genotossici (Pan *et al.*, 2001).

Come nel caso di processi di infezione da patogeni (Baker e Orlandi, 1995) e in condizioni di stress di natura abiotica quali il freddo, la siccità, la salinità, lo stress da ozono (Foyer e Mullineux, 1994) l'esposizione a metalli pesanti determina un aumento nella produzione di ROS (Scandalios, 1997). I ROS possono determinare l'ossidazione aspecifica di proteine e lipidi di membrana e danneggiano il DNA.

I ROS non svolgono solo un ruolo negativo, ma agiscono anche come molecole di segnale per la regolazione dell'espressione genica nel sistema di difesa della pianta contro i patogeni (Bolwell *et al.*, 2002). La cellula deve, quindi, controllare strettamente il livello dei ROS, date le molteplici funzioni svolte da queste sostanze. Tale controllo è affidato ai sistemi antiossidanti che sono costituiti da metaboliti quali ascorbato, glutatione, tocoferolo ed enzimi, quali superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT), ascorbato perossidasi (APX) (Scandalios, 1997). Questi enzimi svolgono un'azione fondamentale e sinergica nel controllo dei ROS con un'azione specifica in relazione ai tessuti ed ai comparti cellulari bersaglio che sono oggetto dello stress.

### **3.1.1 Superossido Dismutasi**

La superossido dismutasi (SOD) è la prima linea di difesa contro il radicale superossido ( $O_2^-$ ). La SOD è stata isolata per la prima volta da vari tessuti animali come “green copper protein” la cui funzione biologica era ritenuta essere quella di sequestro del rame (Mann e Keilin, 1938). L'enzima è stato anche variabilmente riferito a eritrocupreina, indofenol ossidasi, tetrazolium ossidasi. La vera funzione catalitica della SOD, la dismutazione del  $O_2^-$  ad  $H_2O_2$  e  $O_2$ , è stata scoperta da McCord e Fridovich (McCord e Fridovich, 1969). La SOD è ubiquitaria ed è stata trovata virtualmente in tutti gli organismi che consumano ossigeno, in quelli ossigeno tolleranti ed in alcuni anaerobi obbligati (Fridovich, 1986). Mutanti carenti della SOD, in procarioti ed eucarioti, sono ipersensibili all'ossigeno molecolare (Carlioz, 1986), tale condizione porta alla morte di tali organismi (Van Loon *et al.*, 1986). Delezioni e mutazioni a carico dei geni codificanti la SOD possono condurre a gravi disordini biologici (Rosen *et al.*, 1993).

Nell'ambiente biologico, l'ossigeno molecolare è molto reattivo ed essendo una molecola carica ed idrofila, non può prontamente attraversare le membrane biologiche. Di conseguenza l' $O_2$  molecolare prodotto in un determinato comparto deve essere eliminato attraverso le SOD (Fridovich *et al.*, 1995). La SOD è stata isolata e caratterizzata da un'ampia varietà di organismi (Scandalios *et al.*, 1997) e sono stati identificati quattro tipi di SOD relativamente al metallo che presentano al loro sito attivo. Una classe di SOD è rappresentata dalle Cu/ZnSOD, le quali presentano a livello del loro sito attivo il Cu(II) più lo Zn(II), un'altra classe è data dalle MnSOD, una terza è data dalle FeSOD e una quarta classe dalle NiSOD con la coppia Ni(II/III) al sito attivo. Le Cu/ZnSOD sono generalmente riscontrate nel citosol delle cellule eucarioti, nei cloroplasti e in alcuni procarioti; le MnSOD sono state trovate nei procarioti, nelle alghe e nei cloroplasti di alcune piante superiori; le NiSOD sono invece caratteristiche del genere *Streptomyces* (Choudhury *et al.*, 1999).

La FeSOD rappresenta è l'isoforma più antica e si ritrova sia nei procarioti che negli eucarioti. Esistono due distinti gruppi di FeSOD: il primo è un omodimero, formato da due subunità proteiche identiche di 20 kDa, il secondo, presente nella maggior parte delle piante superiori, è un tetramero formato da quattro subunità di 80-90 kDa.

La MnSOD è un enzima formato da subunità identiche disposte a dimeri o a tetrameri e localizzato soprattutto nella matrice mitocondriale (Rabinowitch e Fridovich, 1983; Scandalios *et al.*, 1987; Bowler *et al.*, 1989,1994).

Le Cu/ZnSOD sono enzimi sia omodimerici che omotetramerici, codificati, come gli altri due tipi di SOD, da geni nucleari e, nelle piante, presenti prevalentemente nel citoplasma (Baum e Scandalios, 1982; Rabinowitch e Fridovich, 1983; Scandalios *et al.*,1987) e nello stroma dei cloroplasti (Palma *et al.*, 1986; Salin, 1988; Asada, 1992), oltre che nello spazio tra le membrane dei mitocondri (Rabinowitch e Fridovich, 1983; Scandalios, 1987) e nei gliossisomi (Del Rio *et al.*, 1992).

A differenza della maggior parte degli altri organismi che solitamente hanno solo una di ciascuna classe di SOD nei vari compartimenti cellulari, le piante possiedono forme multiple per ciascuna classe codificate da più di un gene (Scandalios *et al.*, 1997).

La presenza della famiglia multigenica delle SOD nelle piante riflette i molteplici e differenti ruoli giocati da questi enzimi nelle piante, che non sono fisiologicamente capaci di evitare condizioni di avversità ambientale. Forme multiple di SOD sono state trovate in tutte le piante ad oggi esaminate, e quelle del mais (*Zea mays* L.) sono state studiate in maggior dettaglio.

Il sistema gene-enzima della superossido dismutasi nel mais comprende almeno nove distinti isoenzimi (Scandalios *et al.*, 1997), i cui geni codificanti sono stati isolati e caratterizzati strutturalmente e funzionalmente (Zhu *et al.*, 1993, White e Scandalios 1988, Kernodle e Scandalios, 2001). In anni recenti, si è verificato un notevole incremento negli studi sulle SOD in una varietà di altre specie di piante, in particolare, *Arabidopsis* (Kliebenstein *et al.*, 1998, Abarca

*et al.*, 2001), tabacco (Bowler *et al.*, 1987), pomodoro (Kardish *et al.*, 1994) e riso (Sakamoto *et al.*, 1992).

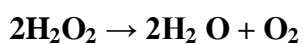
### **3.1.2 Catalasi**

Le catalasi sono enzimi ubiquitari, presenti in quasi tutti gli eucarioti, localizzate nei perossisomi e nei gliossisomi. E' stata suggerita anche in mais una localizzazione delle catalasi a livello mitocondriale che non ha trovato conferma in altre specie (Acevedo *et al.*, 1991).

Le catalasi (CAT), insieme a superossido dismutasi (SOD), ascorbato perossidasi (APX) e Glutazione perossidasi (GPX), è parte del sistema enzimatico di difesa contro lo stress ossidativo che interviene non solo a livello del compartimento intracellulare, ma anche nell'apoplasto (Arora *et al.*, 2002) e che contrasta la formazione dei radicali liberi e altri derivati attivi dell'ossigeno (ROS, reactive oxygen species).

Gli effetti dell'azione dei radicali liberi sulle membrane includono l'induzione della perossidazione lipidica e la de-esterificazione degli acidi grassi.

Le catalasi sono enzimi tetramericici le cui subunità, contengono un gruppo eme; esse, catalizzano la seguente reazione di dismutazione che permette la rimozione del perossido di idrogeno in eccesso:



Le principali fonti di perossido di idrogeno nei perossisomi sono rappresentate dall'Acetil-CoA ossidasi, che interviene nella  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi nei gliossisomi e la glicolato ossidasi che converte il glicolato, prodotto durante la fotorespirazione, in gliossilato. L'intervento delle catalasi nella fotorespirazione evidenzia l'importanza di questi enzimi come sistema di protezione della funzione fotosintetica delle cellule contro gli stress ossidativi. A sostegno di ciò, l'osservazione che un mutante di orzo con ridotta attività delle catalasi risulta essere danneggiato nella crescita durante la fotorespirazione (Kendall *et al.*, 1993).

Per quanto riguarda la risposta agli stress di natura abiotica, è stato dimostrato che le catalasi giocano un ruolo cruciale nell'induzione, mediata dall'acido salicilico, di "SAR" (sistemi acquired resistance) (Chen *et al.*, 1993). E' stato infatti dimostrato che l'acido salicilico si lega e inattiva le catalasi con il conseguente aumento di perossido di idrogeno che a sua volta induce la trascrizione delle (pathogenesis related-proteins) "PR-proteins". (Breusegem *et al.*, 2001).

Le caratteristiche molecolari e biochimiche delle catalasi sono state ampiamente studiate sia nelle specie erbacee e monocotiledoni (Scandalios, 1987; Suzuki, 1994) che nelle dicotiledoni (Willekens, 1994a,b; Frugoli *et al.*, 1996).

Nelle piante arboree le caratteristiche biochimiche di questi enzimi sono state studiate nelle gimnosperme (Mullen e Gifford, 1993; Racchi *et al.*, 1996), ippocastano (Bagnoli *et al.*, 1998) ed in quercia (Racchi *et al.*, 2000). Inoltre sono state isolate e caratterizzate molecularmente due catalasi di pesco (Bagnoli *et al.*, 2004), una di albicocco (Turchi, 2002) e tre sono le catalasi isolate caratterizzate in pioppo (Caparrini, 2006).

Nella maggior parte degli eucarioti, le catalasi sono codificate da singoli geni; nelle piante sono rappresentate da una piccola famiglia multigenica, solitamente costituita da tre o quattro geni, che può riflettere i molteplici e diversi ruoli giocati da questi enzimi. Ciascuna catalasi mostra un distinto pattern di espressione spaziale e temporale durante il ciclo vitale di una pianta. Gli enzimi antiossidanti, infatti, risultano essere regolati non soltanto dalla presenza di fonti di stress ossidativo, ma anche dal tipo di tessuto e dallo stadio di sviluppo della pianta. Evidenza di ciò è data, per esempio, dai dati molecolari ottenuti in un'analisi su *Nicotiana plumbaginifolia*, in cui i livelli di espressione dei tre trascritti di *catalasi* erano strettamente dipendenti dal tessuto di appartenenza e dall'età della foglia (Willekens *et al.*, 1994b). Sulla base del profilo di espressione è stata adottata una particolare classificazione che le vede suddivise in tre classi (Willekens *et al.*, 1995). Classe I, comprende le *Cat* che risultano essere altamente espresse nel tessuto fogliare e che sono coinvolte nella rimozione del perossido di idrogeno prodotto durante la fotorespirazione;

Classe II, quelle espresse nei tessuti vascolari e coinvolte nei processi di lignificazione e nella protezione delle cellule da fattori di stress ambientale; Classe III, quelle che sono più espresse nei semi e nei giovani semenzali, ma quasi assenti negli stadi tardivi dello sviluppo; la loro funzione sembra essere quella di rimuovere il perossido di idrogeno prodotto durante la degradazione degli acidi grassi nei gliossisomi.

### **3.1.3 Specificità spazio-temporale di catalasi e superossido dismutasi**

Gli enzimi antiossidanti sono una componente cruciale per il mantenimento dell'equilibrio redox nella cellula. Quindi anche in condizioni di crescita ottimali, questi enzimi sono regolati in relazione al tipo di tessuto e allo stadio di sviluppo. Numerose evidenze in letteratura, su specie erbacee, mostrano come sia le catalasi che le superossido dismutasi possiedono specificità spazio-temporale nella loro espressione. Una tra le piante più studiate è il mais, in cui gli enzimi sopraccitati sono stati esaminati sia da un punto di vista molecolare che biochimico. L'accumulo di ciascuno dei quattro trascritti, codificanti per le quattro diverse proteine di MnSOD, ha dimostrato delle variazioni notevoli sia da un punto di vista spaziale che temporale (Zhu e Scandalios, 1993). Mentre la *SOD3* è stata trovata in tutti i tessuti osservati, tranne che nelle foglie, gli altri tre geni sembrano attivarsi ciascuno in momenti specifici, con priorità soprattutto nello scutello durante lo sviluppo del seme. Anche i tre geni codificanti le *catalasi* nel mais sono stati studiati nei vari tessuti del seme in vari momenti del suo sviluppo. Così mentre l'espressione della *CAT3* è evidente solo nel pericarpo nelle prime fasi del sviluppo, quella di *CAT2* incrementa con la crescita, mentre l'espressione di *CAT1* è sempre costante nei vari tessuti del seme (Wadsworth e Scandalios, 1989).

Oltre al mais anche il tabacco si è dimostrata una specie modello per studiare la specificità spazio-temporale di CAT e SOD. Analisi condotte su *Nicotiana tabacum* hanno evidenziato che le attività enzimatiche di MnSOD e FeSOD sono maggiori nelle foglie senescenti, mentre le Cu/ZnSOD sono attive nelle foglie giovani (Kurepa *et al.*, 1997). Mentre da analisi molecolari



condotte su *N. plumbaginifolia* è stata dimostrato che i livelli di espressione dei tre trascritti di *CAT* sono dipendenti dal tessuto di appartenenza e dall'età della foglia (Willekens *et al.*, 1994a).

Anche le piante arboree sono state oggetto di simili ricerche, sia biochimiche che molecolari. In *Hevea brasiliensis* il messaggero di *MnSOD* è trascritto in tutti i tessuti della pianta, con un maggior livello di espressione nel tessuto coltivato *in vitro* (Miao e Gaynor, 1993). In *Picea abies* L. la più elevata attività di *SOD* è stata trovata nei tessuti giovani durante il differenziamento (Kroniger *et al.*, 1993), mentre nel *Pinus silvestris* sono state riscontrate evidenze di differenti livelli di espressione di *Cu/ZnSOD* cloroplastica e citoplasmatica nei tessuti considerati (Karpinski *et al.*, 1992). Da un'indagine effettuata invece in piante micropropagate di *Quercus robur* L., le due isoforme di *CAT* risultavano essere attive in maniera differenziale nei diversi tessuti ed in relazione al potenziale rizogenetico (Racchi *et al.*, 2001).

L'insieme di tutte queste informazioni sia da un punto di vista biochimico che molecolare, conseguite analizzando specie erbacee e arboree, dimostrano come catalasi e superossido dismutasi manifestino una distribuzione variabile nei tessuti e durante i vari momenti dello sviluppo vegetativo della pianta. Il tutto è da relazionare al metabolismo cellulare presente nei vari tessuti, che può richiedere un'azione più o meno intensa nel processo di detossificazione dai ROS ed il mantenimento dell'equilibrio redox della cellula.

### **3.1.4 Ascorbato perossidasi**

Le ascorbato perossidasi (APX) sono state identificate in molte piante superiori e comprendono una famiglia di isoenzimi con differenti caratteristiche. Molti isoenzimi della guaiacolo perossidasi (GP) nei tessuti della pianta sono localizzati nei vacuoli, nella parete cellulare e nel cytosol, ma non negli organelli (Asada, 1992). Al contrario gli isoenzimi delle APX sono distribuiti in almeno in quattro distinti compartimenti cellulari. Si distinguono quindi APX stromali (sAPX), quelle legate alla membrana tilacoidale (tAPX) nei cloroplasti, quelle legate alle membrane di organelli, quali gliossisomi e perossisomi (mAPX), e citosoliche (cAPX) (Chen e

Asada, 1989; Miyake *et al.*, 1993; Yamaguchi *et al.*, 1995a, b; Buckelmann e Trelease, 1996; Ishikawa *et al.*, 1996a, c, 1998). Una quinta APX è stata trovata legata alla membrana mitocondriale.

Le proprietà molecolari ed enzimatiche degli isoenzimi dell'APX sono differenti da quelle di altre perossidasi come la GP. L'APX possiede un'elevata specificità per l'acido ascorbico, come donatore di elettroni, è questo il caso specifico dell'APX cloroplastica (chlAPX) e di quella mitocondriale (Yoshimura *et al.*, 1998; Asada, 1999; Leonardis *et al.*, 2000). Oltre all'ossidazione dell'acido ascorbico, le cAPX e le mAPX delle piante superiori e le APX proprie delle alghe possono anche ossidare donatori artificiali di elettroni come il pirogallolo o il guaiacolo (Chen e Asada, 1989, Ishikawa *et al.*, 1995, 1996b; Yoshimura *et al.*, 1998; Asada, 1999). Gli isoenzimi delle APX nelle piante non possono ridurre gli idroperossidi lipidici. L'APX è un enzima contenente un gruppo eme il cui gruppo prostetico è una protoporfirina (Shigeoka *et al.*, 1980b; Chen e Asada, 1989). Una delle maggiori caratteristiche delle ascorbato perossidasi è la loro instabilità in assenza di acido ascorbico. Sotto condizioni in cui la concentrazione di acido ascorbico è più bassa di 20  $\mu\text{M}$ , l'attività delle APX è rapidamente persa. "L'half-inactivation times" delle chlAPX e delle mitAPX è meno di 30 secondi, mentre quello delle cAPX e mAPX è circa 1 ora o più (Chen e Asada, 1989; Miyake *et al.*, 1993; Ishikawa *et al.*, 1998; Yoshimura *et al.*, 1998; Leonardis *et al.*, 2000). L'instabilità delle APX sembra essere una delle ragioni per cui l'enzima non viene trovato per lungo tempo negli organismi fotosintetici, che si aggiunge alla difficoltà di ottenere grandi quantità altamente purificate. La chlAPX esiste in una forma monomerica, mentre la cAPX è un dimero che consiste di subunità identiche con una massa molecolare di 28 kDa (Mittler e Zilinskas, 1991a; Miyake *et al.*, 1993). La massa molecolare della tAPX è maggiore di quella di sAPX (33,2 kDa); la differenza in massa molecolare tra la tAPX e la sAPX è relativa al fatto che il primo dei due isoenzimi è legato alle membrane (Chen e Asada,

1989; Miyake *et al.*, 1993; Ishikawa *et al.*, 1996a). La massa molecolare (31kDa) della mAPX e della mitAPX sono simili (Yamaguchi *et al.*, 1995a; Ishikawa *et al.*, 1998; Leonardis *et al.*, 2000).

Nel sistema di detossificazione da ROS dipendente dall'ascorbato (ascorbato-glutatione pathway), l'utilizzazione dell'ascorbato conduce alla formazione di un prodotto intermedio dell'ascorbato, il radicale monodeidroascorbato. Questo composto può essere o ridotto attraverso la monodeidroascorbato reduttasi, un enzima presente in parecchi compartimenti cellulari, o attraverso la ferredossina nel flusso fotosintetico degli elettroni. Il monodeidroascorbato che non è ridotto ad ascorbato spontaneamente dismuta, producendo ascorbato e acido deidroascorbico. L'ultimo composto è poi ridotto ad ascorbato attraverso la deidroascorbato reduttasi utilizzando il glutatione come donatore di elettroni. Il glutatione è poi rigenerato attraverso la glutatione reduttasi NAPDH-dipendente (Noctor e Foyer, 1998; De Gara e Tommasi, 1999).

Sebbene il ruolo degli enzimi riducenti l'ascorbato nei meccanismi di difesa della pianta necessita di ulteriori chiarificazioni, è generalmente accettato che le attività degli enzimi del sistema ascorbato-glutatione (e in maniera specifica l'ascorbato perossidasi) conferiscono una generale resistenza ad una vasta gamma di stress ambientali (Foyer *et al.*, 1994; Allen *et al.*, 1997; De Gara e Saracino, 1997).

Studi recenti si sono focalizzati sull'analisi delle variazioni nelle attività delle APX nelle piante superiori soggette a parecchi stress ambientali come ozono, elevata intensità luminosa, temperatura estrema, salinità e paraquat (Tanaka *et al.*, 1985; Mittler e Zilinskas, 1994; Prasad *et al.*, 1994; Coklin e Last, 1995; Rao *et al.*, 1996; Dat *et al.*, 1998; Lòpez *et al.*, 1996; Donahue *et al.*, 1997; Yoshimura *et al.*, 2000). Generalmente le attività si incrementano di pari passo con le attività di altri enzimi antiossidanti come la catalasi, la SOD e la GSH reduttasi in risposta a vari stress ambientali, suggerendo che le componenti del sistema di detossificazione delle AOS sono co-regolate. Piante di mais, resistenti alla siccità, mostrano una più grande induzione dell'attività di APX rispetto alle piante sensibili, in contemporanea ad un significativo incremento dell'attività

della GSH riduttasi (Pastori e Trippi, 1992). Un mutante di *Arabidopsis* (*pst1*) isolato in base alla sua capacità di crescere fotoautotroficamente su un mezzo contenente NaCl mostrava un significativo incremento delle attività di APX e SOD (Tsugane *et al.*, 1999).

### **3.1.5 La perossidazione dei lipidi e lo stress da metalli pesanti**

La struttura della membrana nella pianta può essere vista come il primo bersaglio della tossicità dei metalli pesanti (Hall, 2002).

I metalli pesanti esercitano la loro azione producendo danni che possono essere messi in relazione con una generale azione sulla biogenesi e sulla integrità della membrane, a seguito dell'alterazione del metabolismo lipidico .

La comprensione dei meccanismi attraverso i quali si realizza la tolleranza ai metalli pesanti richiede di approfondire il ruolo delle membrane e lipidi (i lipidi sono i maggiori componenti delle membrane) nella risposta all'esposizione della pianta ai metalli pesanti. Diverse sono le ragioni per le quali tali conoscenze sono necessarie : i) le alterazioni nella composizione della membrana plasmatica possono variare la permeabilità della membrana e di conseguenza l'assorbimento netto degli ioni metallo (Quartacci *et al.*, 2000); ii) il livello di perossidazione lipidica che può alterare i processi metabolici all'interno della cellula è determinato dal grado di insaturazione dei lipidi di membrana (Harwood, 1998). L'insaturazione della membrana si è dimostrata essere strettamente correlata alla tolleranza in un certo numero di piante superiori (Maksymiec, 1997); e iii) il rapido turnover dei componenti di membrana può rappresentare una strategia per la modificazione adattativa allo stress da metalli.

La malondialdeide è un prodotto tossico della perossidazione dei lipidi delle membrane che viene ampiamente utilizzato come un indicatore dello stato di stress ossidativo conseguente ad un aumento di ROS (Ohkava *et al.*, 1979). I risultati ottenuti da studi sulle membrane in seguito all'esposizione ai metalli pesanti evidenziano un incremento dei livelli di MDA a livello fogliare in seguito al trattamento con Cu (Cuyper *et al.*, 2000); analogamente l'accumulo dei prodotti

della perossidazione lipidica sono stati evidenziati in seguito ad una prolungata esposizione al Cadmio (Metwally *et al.*, 2003). Recentemente, Lin e collaboratori (2005) hanno dimostrato che lo stress ossidativo indotto dal rame modifica la parete cellulare irrigidendola a seguito della formazione di cross – link tra i polimeri della parete.

### **3.1.6 I sistemi enzimatici antiossidanti nello stress da metalli pesanti**

Molti sono gli studi riguardanti la risposta dei sistemi antiossidanti indotta da metalli pesanti nelle piante. In generale l'esposizione ai metalli determina un aumento delle difese antiossidanti, tuttavia le risposte variano secondo la specie, il tessuto analizzato, il metallo utilizzato per il trattamento e dall'intensità dello stress.

In *Panax ginseng* le radici, esposte a varie concentrazioni di Cu (5, 10, 25 e 50  $\mu\text{M}$ ), sono in grado di accumulare elevate quantità di Cu. In corrispondenza dei trattamenti con 50  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ , si sono osservati elevati livelli di perossidi dei lipidi nelle radici in confronto al controllo. Dopo 20 giorni, il trattamento con Cu 50  $\mu\text{M}$  conduceva ad un incremento del 32% dei livelli di MDA mentre dopo 40 giorni i livelli di MDA si incrementavano fino al 40% rispetto al controllo. L'aumento della concentrazione di Cu oltre ad indurre una condizione di stress ossidativo come dimostrato dai livelli di MDA, influenza l'attività degli enzimi antiossidanti. Ad un incremento dell'attività di SOD corrisponde una diversa risposta delle CAT. L'attività delle CAT rimaneva invariata fino a 25  $\mu\text{M}$ , sia a 20 che a 40 giorni, mentre con la concentrazione 50  $\mu\text{M}$  l'attività di CAT diminuiva. Nelle radici esposte a Cu 5  $\mu\text{M}$ , dopo 20 giorni di trattamento, si nota un incremento delle attività di APX, mentre le concentrazioni 25 e 50  $\mu\text{M}$  determinano una diminuzione di attività (Ali *et al.*, 2006). I risultati evidenziano che il rame provoca accumulo di perossido di idrogeno, l'aumento dell'attività degli enzimi coinvolti nel ciclo dell'ascorbato e degli enzimi antiossidanti CAT e SOD e suggerisce che il ciclo dell'ascorbato giochi un ruolo importante nella detossificazione del rame.

Gli effetti di concentrazioni tossiche di piombo, mercurio e cadmio sulle attività dei sistemi antiossidanti e sulla perossidazione lipidica sono stati studiati sulle foglie e sulle radici di due mangrovie (*Kandelia candel* e *Bruguiera gymnorrhiza*). Nelle foglie l'attività delle SOD presenta un andamento fluttuante in risposta alle differenti concentrazioni di metalli, mentre l'attività delle catalasi aumenta proporzionalmente ai diversi livelli di stress indotto in *K. candel*, mentre rimaneva invariata nelle foglie della *B. gymnorrhiza*. I livelli di perossidazione lipidica al contrario, aumentano solo nelle foglie di *B. gymnorrhiza* (Zhang *et al.*, 2007).

Tewari *et al.* (2006) hanno effettuato uno studio sulla generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e sull'alterazione dell'ambiente redox a livello cellulare in presenza di eccesso o assenza di rame nel moro di gelso (*Morus alba* L. cv. Kanva). In particolare, in presenza di rame 0.1µM sono stati evidenziati danni alle radici, un accelerato livello di senescenza nelle foglie adulte, una induzione della risposta antiossidante e un'alterazione dell'ambiente redox nelle foglie giovani. Per quanto riguarda la risposta antiossidante in presenza di eccesso di rame (100 µM), è stata osservata un aumento nell'attività delle SOD, principalmente dovuta ad un aumento delle isoforme Cu/ZnSOD.

Variazioni nella perossidazione lipidica e nell'attività degli enzimi antiossidanti è stata valutata in piantine di riso trattate con Cu. Il rame si dimostrato essere un inibente della crescita delle radici senza influenzare negativamente i germogli. Il trattamento con il metallo determina un incremento della perossidazione lipidica e modula l'attività degli enzimi antiossidanti a livello radicale. In particolare, è stato evidenziato un incremento dell'attività delle superossido dismutasi, ascorbato perossidasi, glutatione reduttasi e perossidasi, ma non nelle catalasi (Chen *et al.*, 2000).

## SCOPO DEL LAVORO

Questa parte del lavoro si propone di analizzare in alcuni cloni di pioppo bianco (MAT-MT2; VF; AL22) gli effetti prodotti dall'esposizione a concentrazioni tossiche di zinco e rame sulle attività degli enzimi antiossidanti CAT, SOD e APX, valutando contemporaneamente il danno ossidativo mediante l'analisi della concentrazione di malondialdeide (MDA) derivata dalla perossidazione dei lipidi delle membrane.

L'ipotesi è che i cloni che sovraesprimono la metallothioneina 2 di pisello (46 EA, 1EB, 10ECA) differiscano dal clone di controllo non trasformato Villafranca (VF) e dal clone AL22, selezionato come tollerante, nella loro capacità di prevenire il danno ossidativo.

Il confronto tra i cloni MAT-MT2 dà la possibilità di acquisire ulteriori conoscenze in merito al ruolo di protezione dai ROS ipotizzato per le metallothioneine (Andrews, 2000).

## 3.2 MATERIALI E METODI

Il campionamento del materiale, la micropropagazione e il trattamento con metalli pesanti, sono presentati nel paragrafo relativo al capitolo 2.

### 3.2.1 Estrazione proteine solubili

Le proteine solubili sono state estratte dai tessuti utilizzando per ciascuna uno specifico tampone.

#### **Catalasi**

Il tessuto è stato polverizzato in azoto liquido, ad esso è stato aggiunto rapidamente il tampone di estrazione in rapporto 1:15 (w/v).

Tampone di estrazione:

Buffer KPO <sub>4</sub> pH 7	100 mM
EDTA	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	8 mM

DTT	4 mM
Triton x – 100	2%
H <sub>2</sub> O distillata	A volume

Al tessuto omogenato, così ottenuto è stato aggiunto il 2% di PVPP insolubile, è stato fatto riposare per 30' a 4°C, centrifugato per 15' a 11000 rpm a temperatura costante di 4°C ed infine è stato recuperato il surnatante. Normalmente si dimostra necessaria una seconda centrifugata al medesimo numero di giri a 4°C ma per tempi minori, in modo da permettere il completo allontanamento di eventuali residui di PVPP.

### **Superossido Dismutasi**

Il tessuto è stato polverizzato in azoto liquido ad esso è stato aggiunto rapidamente il tampone di estrazione pari a 10 volte (w/v) il peso del campione.

Tampone di estrazione:

Buffer KPO <sub>4</sub> pH 7,8	100 mM
EDTA	1 mM
Triton x – 100	0,5 %
H <sub>2</sub> O distillata	A volume

Al tessuto omogenato così ottenuto è stato aggiunto il 2% di PVPP insolubile, è stato fatto riposare per 30' a 4°C, centrifugato per 15' a 11000 rpm a temperatura costante di 4°C ed infine è stato recuperato il surnatante. Normalmente si dimostra necessaria una seconda centrifugata al medesimo numero di giri a 4°C ma per tempi minori, in modo da permettere il completo allontanamento di eventuali residui di PVPP.



## Ascorbato Perossidasi

Il tessuto è stato polverizzato in azoto liquido ad esso è stato aggiunto rapidamente il tampone di estrazione pari a 5 volte (w/v) il peso del campione.

Tampone di estrazione:

Buffer Tris-HCl pH 7,4	0,22 M
Saccarosio	250 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
KCl	50 mM
β-mercaptoetanololo	10 mM
Triton x-100	0,1%
H <sub>2</sub> O distillata	A volume

Al tessuto omogenato così ottenuto è stato aggiunto il 2% di PVPP insolubile, ed è stato centrifugato a 4°C per 30' a 11400 rpm ed è stato recuperato il surnatante. Poiché non è aggiunto Acido ascorbico al tessuto polverizzato viene valutata solo la componente citosolica delle APX.

### 3.2.2 Dosaggio proteine

La quantità di proteine solubili è stata determinata secondo il protocollo Lowry *et al.* (1951) modificata Peterson (1977). A quantità scelte di estratto (5 e 10 µl per campione) è stato aggiunto 1 ml di acido tricloroacetico (TCA) al 10% per precipitare le proteine. Il preparato così ottenuto è stato mantenuto a freddo almeno 30' a 4°C e poi centrifugato per 10' a 13000 rpm a temperatura ambiente. Il precipitato proteico è ora depositato sul fondo della provetta. Le provette sono state svuotate in maniera tale da eliminare qualsiasi residuo di TCA. A ciascuna provetta è stato aggiunto 1 ml di reattivo A, per risospendere il pellet agitando su vortex, e 250 µl di reattivo B. I reattivi sono stati fatti reagire per 30' dopo di che è stata fatta la lettura allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 750 nm. La conversione dei valori così ottenuti per ciascun campione è stata effettuata costruendo una curva di taratura utilizzando come standard la BSA.

Reagenti necessari:

BSA	5 mg/ml
TCA	10%
CTC*	
NaOH	0,8 N
SDS	10%
Folin	

La soluzione stock di CTC ottenuta con 0,1% Rame Solfato, 0,2% Potassio Tartrato e 10% di Sodio Carbonato, è stata preparata sciogliendo i sali di rame e di potassio in metà volume, alzando eventualmente il pH per una corretta solubilizzazione. La soluzione di sodio carbonato è stata preparata nel restante 50%. Le due soluzioni sono state unite lentamente e portate a pH 9.

Per quanto riguarda la preparazione dei reattivi A e B, di seguito sono riportati i componenti e le relative quantità:

REATTIVO A: CTC: SDS: NaOH: H<sub>2</sub>O (1:1:1:5)

REATTIVO B: 1 Folin: 5 H<sub>2</sub>O (1:5)

### **3.2.3 Trattamento in colonna di desalting**

Per la misura dell'attività enzimatica è stato necessario sottoporre gli estratti di SOD e APX alla colonna di desalting (HiTrap<sup>TM</sup> Desalting da 5 ml – GE Healthcare).

L'estratto, appena ottenuto, viene applicato ad una colonna previo utilizzo di una siringa; la colonna viene, prima di questo passaggio, equilibrata con buffer KPO<sub>4</sub> a pH 7.8 (nel caso delle APX il buffer deve essere addizionato con ascorbato 2 mM). L'eluato così raccolto è pronto per la lettura spettrofotometrica.

### **3.2.4 Determinazione dell'attività enzimatica**

**Catalasi**

La catalasi catalizza la reazione di dismutazione del perossido di idrogeno. Dal momento che la reazione segue una cinetica di primo ordine, la quantità di substrato decomposto nell'unità di tempo risulta direttamente proporzionale sia alla concentrazione dell'enzima che a quella del substrato. Seguendo nel tempo la reazione attraverso la diminuzione dell'assorbanza a 240 nm, dove il perossido assorbe fortemente, si ottiene dunque una curva che tende asintoticamente a 0. Per poter confrontare tra loro due preparazioni e determinare con precisione l'attività in un estratto, risulta pertanto necessario procedere in condizioni rigorosamente identiche.

## METODO

1. Preparazione della miscela di reazione:  $\text{KPO}_4$  50 mM pH 7 +  $\text{H}_2\text{O}_2$  1,5 volumi. La miscela deve essere letta allo spettrofotometro per verificare che la sua assorbanza a 240 nm sia compresa tra 2,4 e 2,6 O.D. (Il bianco è effettuato con il solo  $\text{KPO}_4$  50 mM pH 7) se il valore della miscela di reazione è inferiore a quello desiderato si aggiunge  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se è superiore deve essere aggiunto  $\text{KPO}_4$  50 mM pH 7.
2. l'estratto è stato opportunamente diluito con  $\text{KPO}_4$  50 mM pH 7, tenendo presente che l'attività delle catalasi è solitamente molto alta. Generalmente nella cuvette vengono messi 790  $\mu\text{l}$   $\text{KPO}_4$  50 mM pH 7 e 10  $\mu\text{l}$  di estratto (il totale deve essere sempre 800  $\mu\text{l}$ ), è fatto il bianco e successivamente si aggiungono 200  $\mu\text{l}$  di miscela di reazione. (Il volume finale che si va a saggiare è 1 ml). L'assorbanza risultante è circa 0,500 O.D. e dovrebbe iniziare quasi istantaneamente a decrescere. Il momento in cui l'assorbanza tocca 0,450 è considerato l'inizio della reazione e quando la stessa si abbassa fino a 0,400 la fine. Il tempo in cui avviene (in secondi) stima l'attività dell'enzima. Questo equivale alla decomposizione di 1,15  $\mu\text{mol}$  di perossido. Per maggiore precisione, le misure sono state ripetute utilizzando quantità diverse del campione (5 e 10  $\mu\text{l}$ ). L'attività delle CAT è stata infine calcolata in base alla formula:  $(1150 \text{ nanomol/sec impiegati})/(\text{vol estratto}) = \text{nkcat ml}^{-1}$ .

L'attività specifica ( $\text{nkat mg}^{-1}$ ) è stata calcolata in funzione dei mg di proteina estratti per ml di campione.

### **Superossido Dismutasi**

La quantità di citocromo-*c* ridotto attraverso il radicale superossido è monitorata a 550 nm, utilizzando la xantina-xantina ossidasi come fonte di radicali superossido. La superossido dismutasi compete con il citocromo-*c* per il flusso di radicali superossido, ed un'unità di SOD è definita come quella quantità necessaria ad inibire del 50% il tasso di riduzione del citocromo-*c*.

Miscela di reazione:

Buffer $\text{KPO}_4$ pH 7,8	50 mM
EDTA	0,1 mM
Xantina	50 $\mu\text{M}$
Citocromo-C	20 $\mu\text{M}$
$\text{H}_2\text{O}$ distillata	A volume

Il volume finale di reazione nella cuvette è 3 ml (Attar *et al.*, 2006).

Per prima cosa deve essere stabilita la quantità di xantina ossidasi tale da produrre una velocità di reazione standard di 0,025/min. La xantina ossidasi è preparata, diluita 1:10 in Ammonio solfato 2,3 M. Fatto questo è stata effettuata la lettura: è stato fatto il bianco (rappresentato dalla sola miscela), alla miscela di reazione è stato aggiunto il volume di estratto da saggiare e quindi è stata aggiunta la quantità di xantina ossidasi stabilita in precedenza e si è seguito l'andamento della reazione per 5 minuti. Il valore dell'attività della SOD, contenute nell'estratto, è stato calcolato tenendo conto che 1 unità (U) di SOD equivale alla quantità necessaria ad inibire del 50% il tasso di riduzione del citocromo-*c* (Beauchamp C. e Fridovich I., 1971). Dal valore medio della velocità di reazione standard si sottrae il valore medio di velocità del nostro campione. Ciò che risulta viene diviso per la metà del valore medio della velocità standard, cioè quel valore corrispondente ad un'unità di SOD. Infine, sapendo che 1 U equivale a

16,67 nkat e conoscendo i mg di proteina estratti per ml di campione, è stata calcolata l'attività specifica in nkat.

### **Ascorbato Perossidasi**

Il tasso di ossidazione dell'Acido Ascorbico dipendente dal perossido di idrogeno è stato determinato utilizzando la seguente miscela di reazione:

Miscela di reazione:

KPO <sub>4</sub> pH 7	50 mM
EDTA	0,1 mM
Acido Ascorbico	0,5 mM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,1 mM
H <sub>2</sub> O distillata	A volume

a cui è stato aggiunto l'enzima in un volume totale di 1 ml. La reazione è avviata mediante l'aggiunta del perossido di idrogeno. L'ossidazione dell'acido ascorbico è stata stimata monitorando la diminuzione di assorbanza a 290 nm a temperatura ambiente.

### METODO:

1. è stata effettuata la lettura della miscela senza il campione per verificare se l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e l'acido ascorbico interagiscono (il bianco è l'aria). Si è seguito la variazione per 1 minuto: se è osservata una diminuzione dei valori durante la lettura, ciò significa che l'acido ascorbico si sta ossidando, in questa prima fase è stata calcolata la variazione di assorbanza che dovrà essere sottratta al valore ottenuto dalla lettura dei campioni.
2. è stata effettuata la lettura della miscela senza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con il campione, per verificare la presenza dell'ascorbato ossidasi. Anche in questo caso, se ciò è verificato, si ha una diminuzione dell'assorbanza. Tale valore deve essere tolto alla variazione di assorbanza dal calcolo finale (questo controllo va ripetuto per quantità diverse dello stesso campione e per campioni diversi).

3. Per la lettura del campione, in una cuvetta è stata messa la miscela di reazione, senza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, è stato aggiunto il campione ed infine l' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Il volume finale di reazione è pari a 1ml. Si è seguita la diminuzione di assorbanza nell'arco di 1 minuto, l'andamento della curva dovrebbe essere lineare. È stata calcolata, allora, la differenza di assorbanza tra il tempo iniziale e il tempo finale. Dal valore così ottenuto sono stati tolti i valori eventualmente ottenuti nei punti 1. e 2. il coefficiente di estinzione molare è 2,8 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

### **3.2.5 Gel nativi di poliacrilamide**

L'analisi isoenzimatica è stata eseguita tramite separazione elettroforetica degli estratti in funzione della carica netta, del peso molecolare e della forma delle proteine. Le proteine native sono state fatte migrare in verticale su gel di poliacrilamide immersi in una soluzione tampone alle cui estremità è stata applicata una differenza di potenziale, che, creando un campo elettrico, spinge le proteine attraverso il gel. Per preparare il gel è stata utilizzata una soluzione stock di acrilamide preparata al 30%, contenente acrilamide e N',N'-metilenbisacrilamide in rapporto 29:1, preparata sciogliendo i componenti a 37°C in acqua distillata e portando poi a volume.

Sono stati utilizzati running gel al 8% di acrilamide per evidenziare la corsa delle CAT, running gel al 15% per evidenziare la corsa delle SOD ed infine running gel al 7% per la corsa delle APX, costituiti da Tris/HCl 0,5 M pH 8,8, Temed 0,6‰ ed APS 0,06%.

Lo stacking è un gel che è stato preparato con una concentrazione più bassa di acrilamide (4%) con la stessa composizione per l'analisi elettroforetica delle CAT, SOD, APX e risulta essere costituito da Tris/HCl 0,15M pH 6,8 Temed 0,6‰ ed APS 0,06%. Il tampone di corsa risulta essere costituito da Tris 37 mM e Glicina 293 mM, pH 8,8 (nel caso dell'APX questo è addizionato con ascorbato 2 mM).

I campioni sono stati caricati sul gel a parità di µg di proteina totali, aggiungendo in ognuno il Blu di Bromofenolo in quantità pari a 1 µl per 10 µl di campione in modo da renderli pesanti e visibili durante la corsa.

Per quanto riguarda le condizioni di corsa effettuata overnight, è stato utilizzato il sistema Biorad, su cui è stato settato un amperaggio diverso per ciascun enzima con voltaggio fuori scala. Per le CAT sono stati applicati 30 mA per 17h, per le SOD sono stati applicati 13 mA per 17h, mentre le APX (per un singolo gel) sono stati applicati 10 mA per 16h. Per evitare la degradazione degli enzimi, i gel sono stati fatti correre a 4 °C.

La presenza degli isoenzimi è stata rilevata in base alla loro attività su gel, tramite l'utilizzo di opportune soluzioni di colorazione che provocano una colorazione in negativo.

### **Colorazione gel di Catalasi**

La colorazione per evidenziare l'attività di catalasi è stata effettuata in accordo con la procedura di Woodbury et al (1971). I gel sono stati incubati allo scuro in soluzione costituita da acqua distillata con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6,27 mM per 10 minuti, dopo di che è stato ben sciacquato in acqua distillata e trasferito in una soluzione di FeCl<sub>2</sub> 1% e K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 1% in acqua distillata e fissati con una soluzione di acido acetico al 7%. Infine i gel sono stati ben sciacquati in acqua distillata. L'attività è visualizzata come bande chiare su uno sfondo blu.

### **Colorazione gel di Superossido Dismutasi**

La procedura di colorazione è stata eseguita in accordo a Beauchamp & Fridovich (1971). I gel sono stati incubati al buio in una soluzione contenente:

- Soluzione A. NBT 0,245 mM  
EDTA 1 mM  
TEMED 22,15 mM  
KPO<sub>4</sub> 50 mM pH 7,8

e successivamente per 5 minuti in una soluzione contenente:

- Soluzione B. Riboflavina 0,97 mM in acqua.

I gel sono stati poi esposti alla luce immersi in una soluzione di  $\text{KPO}_4$  50 mM pH 7,8, la colorazione è terminata quando sono evidenti bande bianche su sfondo viola quindi i gel devono essere sciacquati in acqua distillata.

L'identificazione delle tre isoforme di SOD (MnSOD, FeSOD, Cu/ZnSOD) è stata ottenuta grazie alla loro diversa sensibilità al KCN e all'  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Infatti le FeSOD sono sensibili all'  $\text{H}_2\text{O}_2$ , le Cu/ZnSOD sono sensibili sia al KCN che all'  $\text{H}_2\text{O}_2$ , MnSOD sono insensibili ad entrambi i reagenti. L'inibizione è stata eseguita incubando i gel per 30 minuti nelle rispettive soluzioni inibenti, di cui di seguito è riportata la composizione:

- Sol. Inibente Cu/Zn-SOD. KCN 2 mM  
EDTA 1 mM  
KPO<sub>4</sub> 50 mM pH 7,8
- Sol. Inibente Fe-SOD.  $\text{H}_2\text{O}_2$  5 mM  
EDTA 1 mM  
KPO<sub>4</sub> 50 mM pH 7,8

Di seguito si procede alla colorazione nelle modalità sopra riportate.

### **Colorazione gel di Ascorbato Perossidasi**

Una volta effettuata la corsa elettroforetica il gel deve essere equilibrato in  $\text{KPO}_4$  50 mM pH 7 addizionato con 2 mM di acido ascorbico. Successivamente il gel è stato incubato in agitazione per 20 minuti in una soluzione costituita da:

- Buffer  $\text{KPO}_4$  50 mM pH 7
- Acido ascorbico 4 mM
- $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM

Il gel è stato poi lavato per 1 minuto in buffer K-fosfato 50 mM pH 7. Dopo questa fase il gel è stato posto in agitazione blanda per 10-15 minuti al buio in una soluzione la cui composizione è di seguito riportata:

- Buffer  $\text{KPO}_4$  50 mM pH 7,8



- TEMED 28 mM
- NBT 2,45 mM .

Dopo questo ultimo passaggio il gel è stato immerso in  $\text{KPO}_4$  50 mM pH 7,8 ed esposto alla luce fin tanto che non sono ben evidenti le bande chiare su uno sfondo viola scuro. Il gel è stato poi sciacquato in acqua distillata per bloccare la reazione Mittler and Zilinskas (1993).

### **3.2.6 Determinazione del contenuto di malondialdeide**

Il contenuto di Malondialdeide è stato determinato seguendo il metodo di Kosugi and Kikugawa, 1985.

La MDA è il prodotto finale di decomposizione della perossidazione lipidica ed è stato utilizzato come indice dello stato di stress ossidativo.

Un'aliquota di 0,2 gr di foglie è stata omogeneizzata in 5 ml di una soluzione contenente acido tricloroacetico 20% (w/v) e acido 2-tiobarbiturico 0,5% (w/v). La miscela così ottenuta è stata mantenuta a 95°C per 30 minuti e poi velocemente raffreddata in un bagno a ghiaccio.

Dopo la centrifugazione a 5000 rpm per 10 minuti a 25 °C, sono state registrate  $A_{532}$ ,  $A_{600}$  del surnatante. In seguito è stato sottratto il valore non specifico dell'assorbanza a 600 nm. Il contenuto in MDA è stato calcolato utilizzando il suo coefficiente di estinzione molare di 155  $\text{mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$  ed espresso come  $\mu\text{mol MDA mg (FW)}$ .

## **3.3 RISULTATI**

### **3.3.1 Valutazione dell'effetto tossico di concentrazioni crescenti di Cu su microtalee dei cloni Villafranca e 1EB**

Il clone MAT-MT2 denominato 1EB e il suo controllo non trasformato clone Villafranca (VF) (*P. alba*) sono stati utilizzati per analizzare i cambiamenti dell'attività di enzimi antiossidanti SOD e CAT in seguito all'esposizione a dosi crescenti di rame (0,05; 0,1 e 0,25 mM) di cui è noto l'alto livello di tossicità. Le microtalee sono state tagliate alla base, prive di radici, e trasferite sul

mezzo di crescita solido addizionato con le singole concentrazioni di metalli e mantenute in questa condizione per 15 giorni (Appendice, fig. 2).

Le proteine solubili sono state estratte da radici e dai tessuti fogliari alla fine del trattamento ed utilizzate per l'analisi dell'attività enzimatiche degli enzimi antiossidanti e la valutazione dello stato di perossidazione dei lipidi di membrana come parametro per valutare lo stato di stress ossidativo esistente nella risposta al metallo.

I dati ottenuti sono presentati nella tabella 1 e nelle figure 1A e 1B.

Il contenuto di MDA nelle radici, aumenta in entrambi i cloni considerati in funzione della concentrazione del rame, tuttavia mentre il clone Villafranca in seguito all'esposizione a 0.05 mM Cu e 0,1 mM Cu (non sono presenti valori per la dose 0,25 mM in quanto le radici non erano presenti) presenta un incremento significativo del contenuto di MDA rispetto al controllo, nel clone 1EB i valori non sono significativi ma si osserva una maggiore variabilità tra i campioni (Tab. 1 e Fig. 1A).

L'attività di SOD nelle radici sembra essere diversa tra i due cloni, infatti il clone Villafranca presenta attività più elevate del clone transgenico 1EB. Concentrazioni crescenti di Cu determinano in entrambi i cloni aumenti non significativi dell'attività di SOD, con la sola eccezione del clone Villafranca alla dose Cu 0,1 mM presenta un aumento significativo di attività.

L'insieme dei dati delinea nelle radici un quadro di moderato stress ossidativo in seguito all'esposizioni al rame alle dosi 0.05 e 0.1 mM che sembra essere maggiore nel clone Villafranca, clone che è anche caratterizzato da una maggiore attività di SOD che aumenta in risposta alla dose 0.1 mM di rame. di circa due volte rispetto al clone trasformato (Fig. 1A).

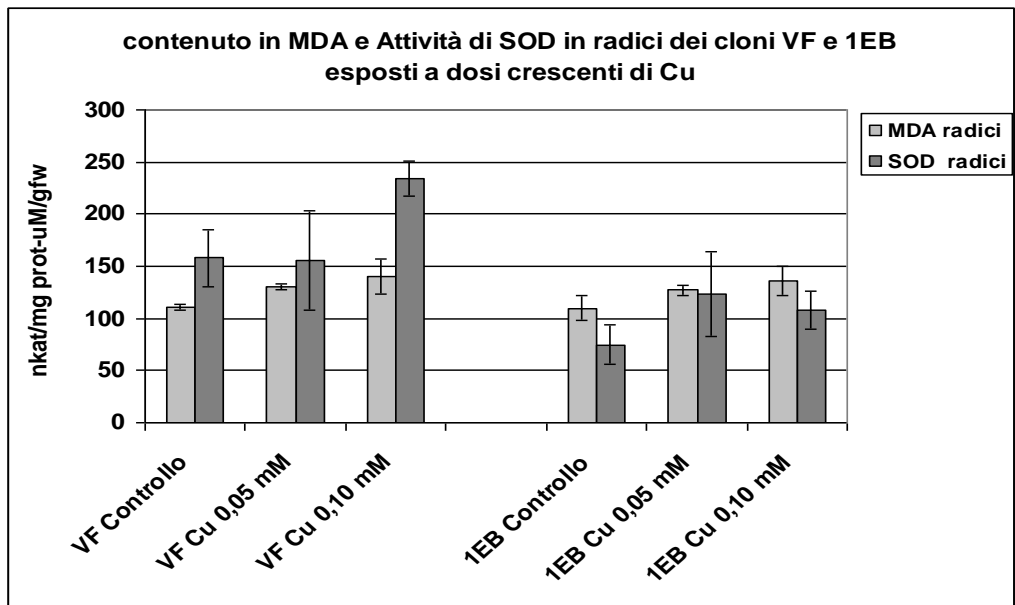


Fig. 1A

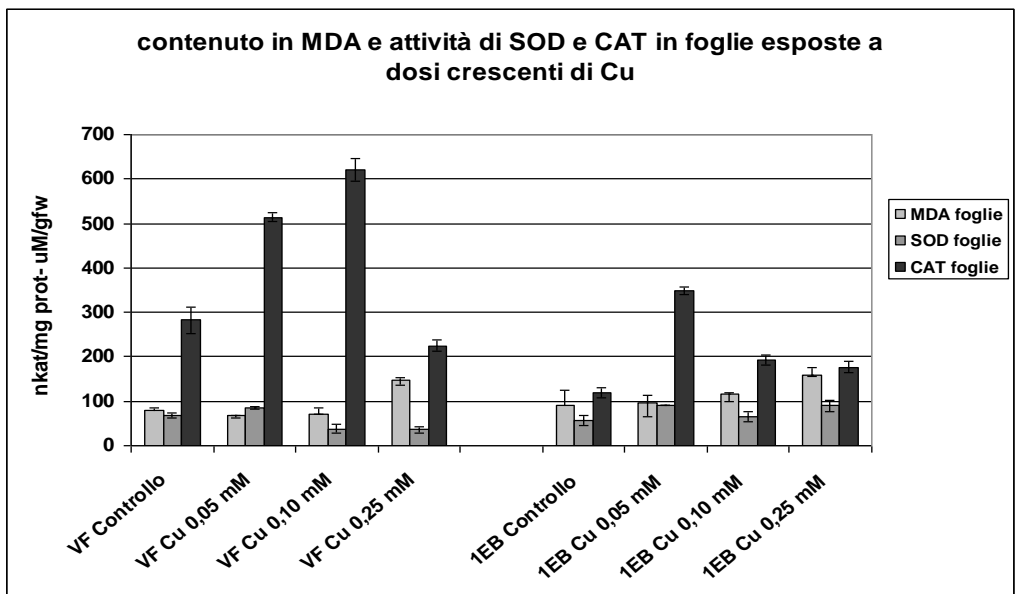


Fig. 1B

**Tabella 1.** Contenuto di MDA e Attività specifica di SOD e CAT nei cloni VF e IEB esposti a concentrazioni crescenti di rame. I valori sono medie di almeno 10 dati  $\pm$  errore standard.

Cloni	Parte della pianta	MDA ( $\mu\text{M/g}$ Peso fresco)	SOD (nKat/mg prot)	CAT (nKat/mg prot)
VF	Foglie	80,19 (4,45)	67,87	282,28
Controllo			(5,83)	(29,61)
	Radici	111,01 (2,58)	157,81	-
			(27,43)	
VF Cu	Foglie	67,07 (0,83)	85,49	514,29
0,05 mM	Radici		(2,31)	(9,76)
		130,55 (2,58)	155,66	-
			(47,72)	
VF Cu 0,1	Foglie	72,08 (12,15)	37,95	619,70
mM	Radici		(10,53)	(25,73)
		140,16 (17,01)	234,21	-
			(16,25)	
VF Cu	Foglie	147,15 (4,51)	36,26	224,93
0,25 mM	Radici		(7,17)	(13,17)
		-	-	-

1EB	Foglie	91,07	(32,71)	56,49	119,04
Controllo	Radici			(11,38)	(11,23)
		109,90	(11,83)		-
				74,52	
				(19,12)	
1EB Cu	Foglie	96,51	(16,01)	89,70	348,29
0,05 mM	Radici			(0,00)	(8,48)
		127,00	(4,64)		
				123,83	-
				(40,48)	
1EB Cu	Foglie	116,46	(3,18)	64,58	193,18
0,1 mM	Radici			(11,55)	(10,68)
		135,96	(14,04)		-
				108,36	
				(18,06)	
1EB Cu	Foglie	159,31	(15,51)	89,40	177,04
0,25 mM	Radici			(12,90)	(11,67)
		-			-
				-	-

Nelle foglie si osserva, in entrambi i cloni, un aumento significativo della concentrazione di MDA in relazione all'incrementare delle concentrazione del rame. In seguito al trattamento con Cu 0,25 mM si osserva una concentrazione di MDA quasi doppia rispetto al controllo (Fig. 1B).

Nelle foglie l'attività delle SOD tende ad essere più bassa rispetto a quella delle radici. Nel clone Villafranca si verifica un abbassamento dell'attività in seguito al trattamento con la dose 0,25 mM rispetto al controllo, altrettanto non si verifica nel clone 1EB, che non presenta sensibili variazioni tra i trattamenti rispetto al controllo non trattato (Fig. 1B).

L'attività di CAT è più alta rispetto a quella delle SOD in entrambi i cloni considerati. Nel clone Villafranca è evidente un significativo incremento dell'attività di CAT in seguito al trattamento con Cu 0,1 mM ed una consistente diminuzione dell'attività in conseguenza alla dose di Cu 0,25 mM.

Differenze significative non sono evidenti tra i trattamenti ed il controllo nel clone 1EB, ad eccezione dell'aumento di attività in presenza del trattamento con Cu 0,05 mM.

Nel loro insieme i dati ottenuti evidenziano in entrambi i cloni, in seguito all'esposizione al metallo, l'insorgenza di stress ossidativo evidenziato da un aumento significativo del contenuto di MDA, anche se i valori osservati nelle foglie sono minori rispetto alle radici. In queste condizioni di stress l'attività di SOD nelle foglie non sembra subire variazioni, mentre l'attività di CAT aumenta in modo significativo alle dosi Cu 0,05mM e 0,1 mM nel clone Villafranca, cosa che non si osserva nel clone trasformato 1EB.

### **3.3.2 Valutazione dell'effetto tossico di Cu e Zn su microtalee dei cloni Villafranca e 1EB**

Lo stesso protocollo sperimentale è stato applicato a microtalee VF e 1EB esponendole a rame e zinco alle dosi scelte pari a 1 mM Zn e 0,1 mM Cu.

Al termine della coltura è stato analizzato sulle foglie il contenuto di MDA per valutare la perossidazione lipidica e l'attività di CAT e SOD. Nel caso delle radici la scarsità del materiale non ha consentito l'analisi dell'attività di CAT. I risultati sono presentati in Fig. 2A.

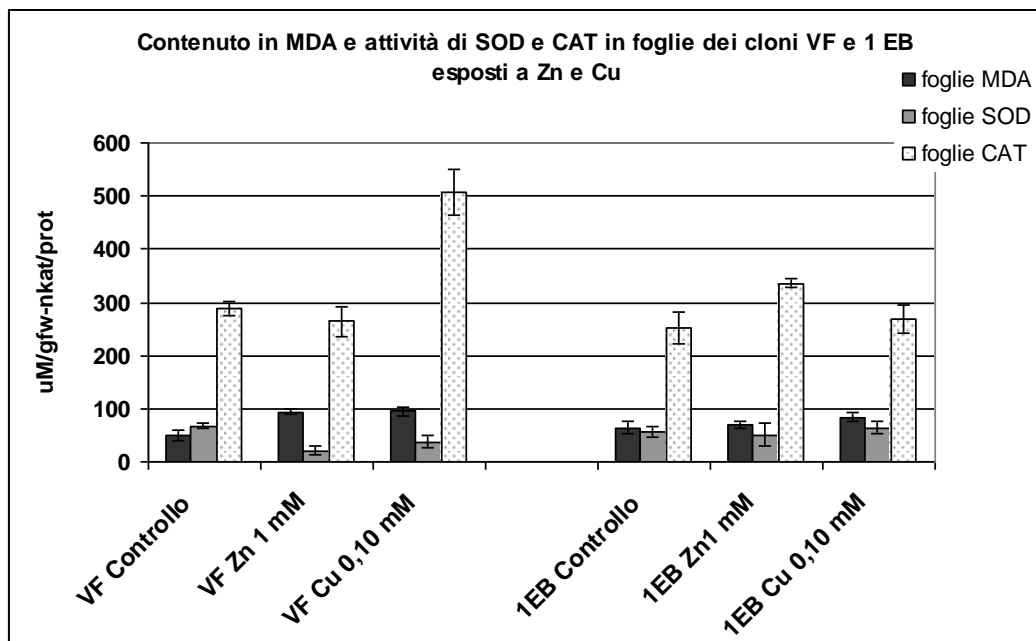


Fig. 2A

Nelle foglie i valori di MDA, in seguito al trattamento con Zn e Cu, aumentano di circa due volte rispetto al controllo nel clone Villafranca, questo non si osserva nella linea transgenica 1EB dove i valori riscontrati non sono significativamente diversi nel controllo rispetto ai trattati. Aumenti significativi delle SOD si osservano in presenza di entrambi i metalli nel clone Villafranca mentre il clone transgenico 1EB non mostra variazioni significative. L'attività di catalasi aumenta in modo significativo in risposta solo al rame nel clone VF e in risposta allo zinco nel clone 1EB.

A livello di radici, l'accumulo di MDA ha il medesimo andamento in entrambi i cloni considerati: si nota un incremento del contenuto di MDA rispetto al controllo che risulta essere più elevato in seguito a trattamento con il rame (Fig. 2B).

L'attività di SOD, più elevata nelle radici rispetto alle foglie, in seguito al trattamento con lo zinco, diminuisce fortemente in entrambi i cloni. Il trattamento con il rame invece induce in entrambi i cloni un aumento dell'attività, anche se al limite della significatività.

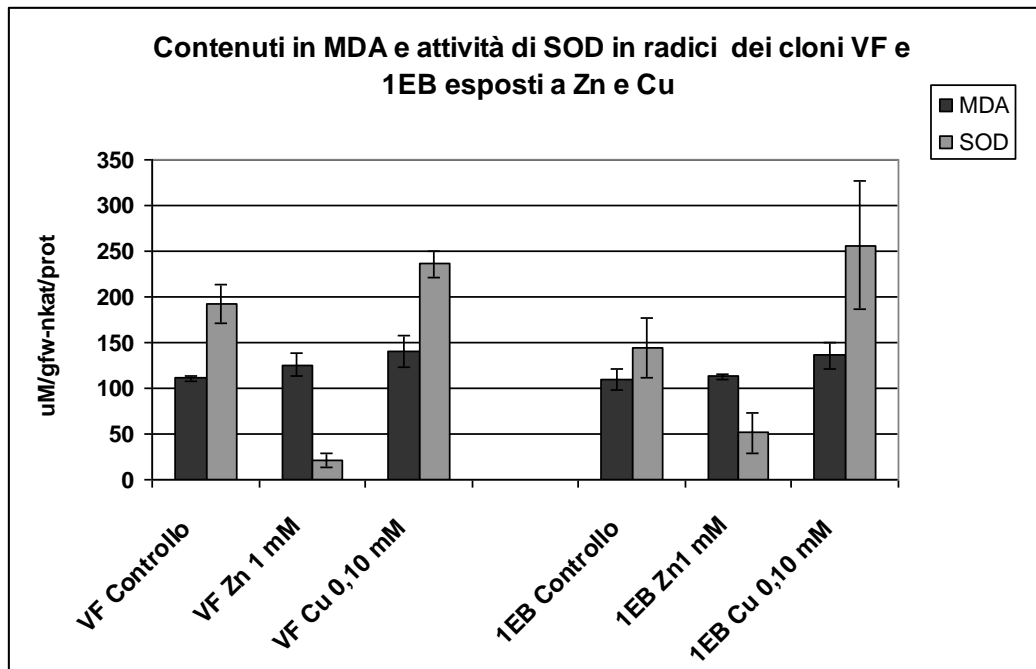


Fig. 2B

### 3.3.3 Valutazione dell'effetto tossico di Cu e Zn su microtalee radicate dei cloni Villafranca, AL22 e 46EA in condizioni di semi-idroponia

In un successivo set di esperimenti microtalee radicate di VF, del clone selezionato in campo AL22 e della linea transgenica 46EA, sono state sottoposte a 7 giorni di trattamento in condizioni di semi-idroponia, mantenendo le stesse concentrazioni di metalli. Lo scopo era quello di mettere a confronto i contenuti di MDA e l'attività degli enzimi SOD, CAT e APX a livello fogliare in cloni di *P. alba* ottenuti da selezioni diverse. I risultati sono presentati nella tabella 2 e in figura 3.

Il livello di perossidazione lipidica nei cloni Villafranca e AL22 è più elevato nel trattamento con il Cu di quanto non sia con lo Zn, i cui valori non presentano variazioni significative rispetto al controllo. Questo non si osserva nella linea transgenica 46EA dove i valori riscontrati in seguito al trattamento con i metalli non sono significativamente diversi dal controllo.

Per quanto concerne le attività della SOD i valori si confermano sempre inferiori rispetto a quelli delle CAT. Il clone Villafranca non ha variazioni significative rispetto al controllo, AL22



presenta una diminuzione significativa a seguito del trattamento con il rame, mentre il clone transgenico presenta un incremento nell'attività di SOD a limite della significatività per Cu e significativo per lo Zn.

Cloni	MDA ( $\mu\text{M/g}$ Peso fresco)	SOD (nKat/mg prot)	CAT (nKat/mg prot)	APX (nKat/mg prot)
VF	20,12	115,38	308,20 (22,62)	1,23 (0,15)
Controllo	(1,16)	(18,45)		
VF Cu	30,70	122,60	475,43 (27,89)	1,32 (0,20)
0,1mM	(4,41)	(46,87)		
VF Zn 1	20,27	88,53 (23,44)	327,11 (44,44)	1,68 (0,29)
mM	(1,29)			
Al22	23,09	115,03 (8,01)	310,89 (17,34)	1,46 (0,26)
Controllo	(1,88)			
Al22 Cu	31,92	91,44 (12,85)	334,13 (9,08)	0,93 (0,19)
0,1 mM	(1,86)			
Al22 Zn 1	19,12	89,89 (11,05)	300,62 (12,71)	1,31 (0,54)
mM	(2,19)			
46EA	18,78	47,75 (9,40)	213,69 (20,16)	1,16 (0,12)
Controllo	(2,84)			
46EA Cu	19,55	60,58 (7,66)	455,49	1,04 (0,15)
0,1mM	(0,82)		(92,49)	
46EA Zn 1	17,30	91,05 (6,15)	276,44 (51,35)	0,61 (0,10)

Tabella. 2

Per quanto concerne l'attività delle CAT si nota un aumento significativo dell'attività in risposta al rame nel clone Villafranca e nel clone transgenico 46EA, mentre nel clone AL22 non si hanno variazioni significative tra i trattamenti rispetto al controllo.

Le attività delle APX sono nettamente inferiori a quelle di SOD e CAT e sono presentate separatamente in figura 4. I valori delle APX riportati in Fig. 4, non evidenziano sostanziali differenze tra cloni con l'eccezione di 46EA che presenta una diminuzione significativa di attività in seguito al trattamento con lo zinco. Dai risultati non emerge una particolare variazione nell'attività di APX in risposta all'esposizione ai metalli pesanti nei diversi cloni. Dall'analisi dei risultati ottenuti da questo esperimento emerge la differenza tra il clone AL22 e gli altri due cloni che presentano, pur con delle differenze, un profilo di attività degli enzimi antiossidanti più simile. AL22 infatti non mostra significative differenze tra l'attività degli enzimi antiossidanti SOD e CAT in presenza o assenza dei metalli, pur presentando un aumento di MDA in risposta al rame.

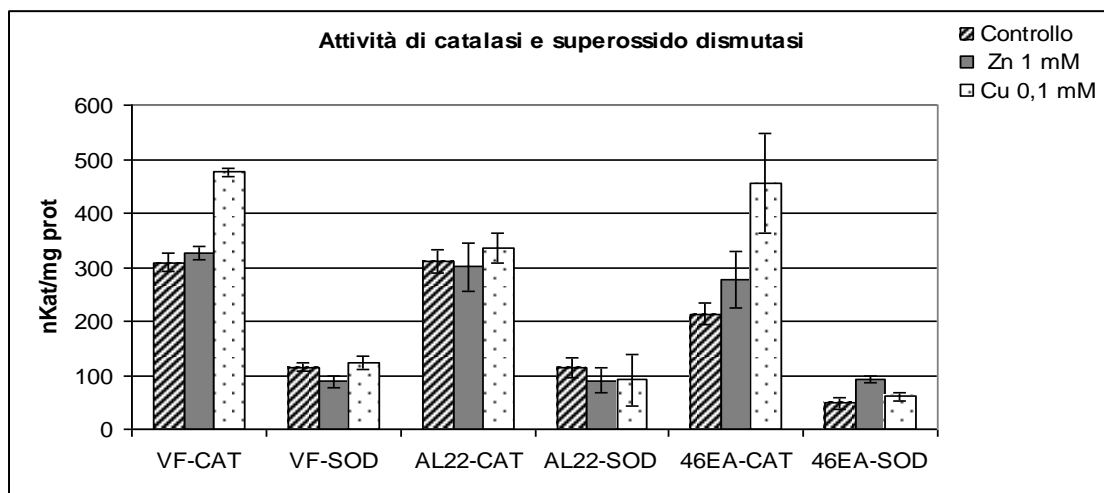


Fig. 3

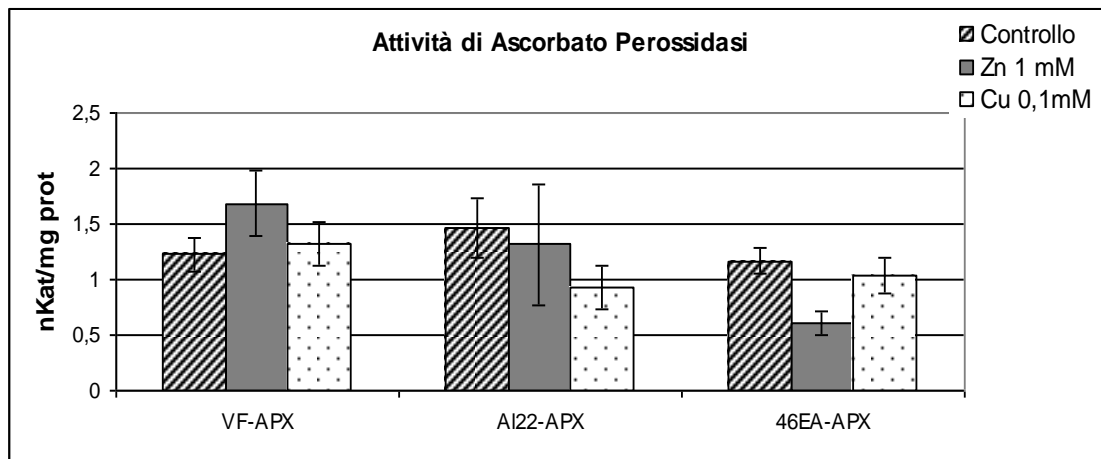
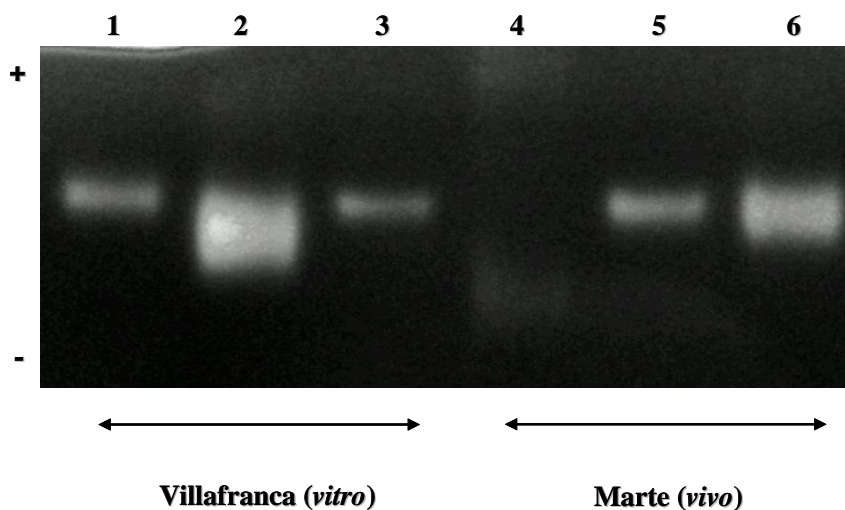


Fig. 4

### 3.3.4 Profili di attività degli enzimi antiossidanti CAT, SOD e APX in seguito all'esposizione a 0.1 mM Cu e 1 mM Zn

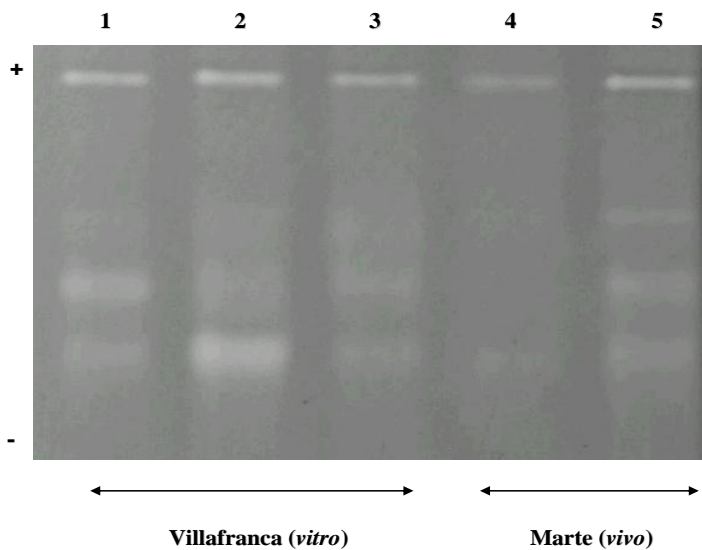
L'analisi dei profili di attività di catalasi è stata condotta su cloni di *P. alba* Villafranca coltivato in vitro e Marte coltivato in vaso mediante elettroforesi nativa sul gel di poliacrilamide. Due forme di catalasi sono distinguibili sulla base della migrazione su gel (Fig. 5). Una forma a migrazione lenta presente nella radice, nella foglia e nella gemma ed una forma più veloce nello stelo. Non sono presenti altre isoforme di catalasi né un profilo che evidenzi la presenza di eterotetrameri come osservato in altre specie arboree quali il pesco la quercia.



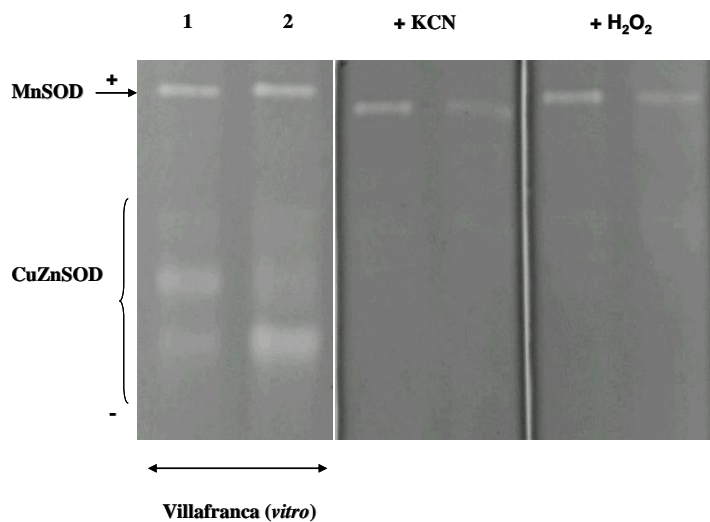
**Figura 6.** Gel nativo che mostra differenti isoforme di CAT: 1) Radice; 2) Stelo; 3) Foglia; 4) Stelo; 5) Foglia; 6) Gemma.

I profili di attività delle SOD ottenuti mediante elettroforesi nativa sul gel di poliacrilamide sono presentati nelle figure 7 e 8.

Almeno 4 diverse isoforme sono separate su gel di cui solo quella a mobilità minore è stata sicuramente identificata sulla base dell'insensibilità al KCN e al perossido di idrogeno come MnSOD. Le altre bande sono Cu/ZnSOD mentre non è stato possibile evidenziare forme FeSOD. Come già osservato, solo lo stelo presenta un profilo di attività di catalasi diverso dagli altri tessuti.



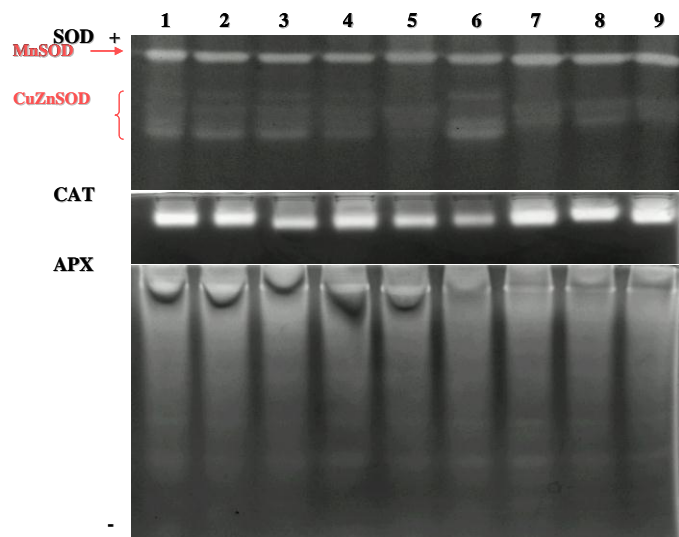
**Fig. 6.** Gel nativo che mostra differenti isoforme di SOD: 1) Radice; 2) Stelo; 3) Foglia; 4) Stelo; 5) Foglia.



**Fig. 7** Identificazione di differenti isoforme di SOD: 1) Radice; 2) Stelo.

I profili di attività per CAT, SOD e APX in foglie dei cloni VF, AL22 e 46EA in risposta all'esposizione ai metalli pesanti sono presentati nella figura 9. Solo nel caso delle SOD si apprezzano delle differenze interessanti tra le linee analizzate. Nelle corsie 1, 2, 3 i profili del clone VF non mostrano cambiamenti significativi tra controllo e trattati con i metalli. Più interessante è il profilo del clone 46EA (corsie 4, 5, e 6) dove si apprezza la perdita di alcune bande in risposta allo zinco ed una forte intensificazione di altre in risposta al rame. Il clone AL22 presenta un profilo di attività distinguibile dagli altri cloni, ma non si apprezzano differenze tra i trattamenti.

Concludendo solo nel caso delle superossido dismutasi l'analisi dei profili di attività rivela differenze interessanti tra cloni e trattamenti ed in particolare la comparsa nel clone 46EA di un profilo tipico di risposta al rame.



**Figura 9.** Effetto del trattamento con Zn 1 mM e Cu 0,1 mM sull'induzione delle SOD, CAT e APX su gel nativi: corsia 1) Villafranca (VF) controllo; 2) VF 1mM Zn; 3) VF 0,1 mM Cu; 4) 46EA controllo; 5) 46EA 1 mM Zn; 6) 46EA 0,1 mM Cu; 7) AL22 controllo; 8) AL22 1mM Zn; 9) AL22 0,1 mM Cu.

### 3.4 DISCUSSIONE

#### **3.4.1 Valutazione dell'effetto tossico di concentrazioni crescenti di Cu su microtalee dei cloni Villafranca e 1EB**

Le piante hanno il potenziale di assorbire i metalli dai suoli contaminati e tollerare i livelli di metalli pesanti che potrebbero essere tossici in altri organismi.

Nella fase preliminare di determinazione delle concentrazioni tossiche dei metalli Cu e Zn, è stato valutato il livello di perossidazione lipidica e l'attività di SOD e CAT sia nelle foglie che nelle radici dei due cloni Villafranca e 1EB.

A livello radicale in entrambi i cloni, i livelli di accumulo dei prodotti della perossidazione lipidica aumentano in funzione della concentrazione di rame. Infatti in seguito al trattamento con le dosi 0,05 e 0,1 mM di Cu, si osserva un incremento del contenuto di MDA significativo nel clone VF e non significativo nel clone 1EB. A livello fogliare è stato evidenziato un incremento dei valori di MDA che è proporzionale all'incrementare della concentrazione di rame, e che quasi raddoppia in seguito al trattamento con la dose 0,25 mM. Il rame induce lo stress ossidativo nelle radici e, in misura maggiore, nelle foglie come evidenziato dai livelli di perossidazione lipidica. Nel loro insieme i dati ottenuti evidenziano un contenuto maggiore di MDA nelle radici, rispetto alle foglie, indicando che questo organo è il primo e principale bersaglio dello stress ossidativo. Per quanto concerne l'attività degli enzimi antiossidanti SOD e CAT i risultati evidenziano differenze tra radici e foglie nella risposta al rame dei due cloni.

Nelle radici i risultati mostrano che il clone Villafranca presenta attività di SOD più alte del clone transgenico 1EB, in particolare in corrispondenza del trattamento con la concentrazione 0,1 mM di rame. Nelle foglie l'attività di SOD tende ad essere in generale più bassa di quella delle radici e non sembra essere influenzata in modo sensibile dai trattamenti nel clone 1EB, lo stesso non si osserva nel clone Villafranca. Le CAT aumentano in modo significativo alle dosi Cu

0.05mM e 0.1mM in entrambi i cloni, con valori significativamente più elevati nel clone Villafranca rispetto al clone 1EB. Questi dati suggeriscono l'attivazione di una risposta antiossidante ed in particolare delle catalasi, che è maggiore nel clone Villafranca rispetto al clone MAT-MT2 1EB, che sovra-esprime la metallotioneina di pisello. Inoltre da questi risultati preliminari è evidente un diverso comportamento tra il clone VF e il clone transgenico; quest'ultimo infatti sembra tollerare meglio l'esposizione a concentrazioni tossiche di rame. Questi risultati confermano i dati di letteratura avvalorando il ruolo delle metallotioneine nella protezione della cellula dai radicali liberi. Non è tuttavia chiaro se la prevenzione del danno ossidativo sia diretta o indiretta attraverso la riduzione della concentrazione di metalli nella cellula.

#### **3.4.2 Valutazione dell'effetto tossico di Cu e Zn su microtalee dei cloni Villafranca e 1EB**

In questa seconda fase piantine del clone Villafranca e di 1EB sono state utilizzate per valutare, sia sulle foglie che sulle radici, l'effetto delle concentrazioni scelte dei due metalli, ossia 1 mM di Zn e 0,1 mM di Cu, nelle medesime condizioni sperimentali utilizzate in precedenza, con lo scopo di poter meglio caratterizzare la risposta antiossidante del clone transgenico e del suo controllo non trasformato.

Sebbene il rame può interferire con numerosi processi fisiologici, il suo primo bersaglio è la membrana cellulare (De Vos *et al.*, 1989). Questo è evidente anche dal mio studio, in cui il trattamento con il rame determina un incremento della perossidazione lipidica nelle foglie del clone Villafranca di circa due volte rispetto al controllo; ciò non è stato osservato nel clone 1EB, i cui valori non sono significativamente diversi dal controllo. A livello radicale si verifica il medesimo andamento di accumulo di malondialdeide in entrambi i cloni, con valori più elevati in presenza della concentrazione tossica di rame. La medesima risposta si verifica per lo zinco. Quando andiamo ad analizzare la risposta a livello degli enzimi antiossidanti, è stata osservata, in generale, un'attività più elevata delle SOD nelle radici rispetto alle foglie. Nel clone Villafranca



tale risposta diminuisce significativamente in presenza della dose di zinco, ed aumenta al limite della significatività in presenza di rame, lo stesso avviene, ma in misura minore, nel clone 1EB. Infine a livello fogliare è stata valutata anche l'attività delle catalasi. Nel Villafranca l'attività nelle piantine esposte ai metalli aumenta in modo significativo in presenza di rame, mentre non varia in presenza di zinco. Nel clone 1EB si verifica l'opposto, ossia un incremento significativo dell'attività in presenza di zinco (e non in presenza di rame) rispetto al controllo.

Molti lavori documentano un incremento dell'attività di SOD in presenza di rame (Chongpraditnum *et al.*, 1992; Mazhoudi *et al.*, 1997; Rama Devi e Prasad, 1998), mentre l'attività di CAT non è influenzata dal metallo (Mazhoudi *et al.*, 1997). I nostri risultati evidenziano invece un aumento dell'attività delle catalasi indotta dal rame. Tali variazioni nella risposta di CAT e SOD in risposta allo stress da Cu o Zn, sono da mettere in relazione alla variabilità esistente tra le diverse specie in risposta agli stress e nella produzione di radicali liberi (Mazhoudi *et al.*, 1997).

### **3.4.3 Valutazione dell'effetto tossico di Cu e Zn su microtalee radicate dei cloni Villafranca, AL22 e 46EA in condizioni di semi-idroponia**

L'effetto tossico dei metalli Cu e Zn è stato infine valutato a livello fogliare nei cloni Villafranca, AL22 e nel clone transgenico 46EA con lo scopo di meglio caratterizzare la risposta antiossidante (SOD, CAT e APX), tra cloni ottenuti da selezioni diverse. I risultati ottenuti evidenziano la maggiore tossicità del rame sulla parte aerea delle microtalee. Infatti, come indicato dalle concentrazioni di MDA lo stato di stress ossidativo è maggiore in seguito all'esposizione al rame piuttosto che allo zinco. Tuttavia è da notare un minore stato di stress nel clone transgenico 46EA.

Le attività degli enzimi analizzati, viste nel loro insieme, confermano i risultati ottenuti in precedenza, ossia una più alta attività delle CAT rispetto alle SOD; questo incremento inoltre risulta essere significativo in presenza di rame sia nel clone Villafranca che nel 46EA, l'eccezione

è rappresentata in questo caso dal clone AL22, in cui le variazioni rilevate non sono significative tra i trattamenti verso il controllo. Il clone 46EA è inoltre caratterizzato da un aumento dell'attività di SOD significativo in presenza di zinco. Le APX, invece, se confrontate con le attività degli altri due enzimi, presentano valori nettamente inferiori, non sembrano quindi avere una parte importante nel processo di detossificazione dai ROS. Quando si confronta la risposta dei singoli cloni non vi sono significative differenze, ad eccezione del 46EA che, in presenza di zinco, mostra una significativa diminuzione nell'attività delle APX.

Per quanto concerne l'analisi dei profili isoenzimatici, soltanto quello ottenuto per le SOD presenta interessanti differenze tra i cloni analizzati e tra i trattamenti. In particolare, il clone 46EA in risposta allo zinco perde due bande Cu/ZnSOD, mentre si verifica una forte intensificazione di tre bande Cu/ZnSOD in risposta al rame.

È ampiamente dimostrato che l'esposizione delle piante a concentrazioni elevate di metalli pesanti come Fe e Cu determina un danno ossidativo (De Vos *et al.*, 1992; Gallego *et al.*, 1996; Weckx e Clijsters, 1996; Mazhoudi *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 1997). La capacità della pianta di incrementare la protezione antiossidante per contrastare le conseguenze negative dello stress da metalli pesanti sembrano essere limitate poiché molti studi mostrano che l'esposizione ad elevate concentrazioni di metalli risulta in una diminuzione e non in un incremento delle attività degli enzimi antiossidanti. Schützendübel e Polle non hanno trovato dati in letteratura che forniscano una evidenza che elevati livelli di enzimi antiossidanti proteggono da dosi tossiche di rame e ferro, mentre vi sono studi che dimostrano che composti capaci di chelare ferro e rame, quali ad esempio metallotioneine e ferretina, proteggono dal danno ossidativo indotto dai metalli (Fabisiak *et al.*, 1999). La presenza dell'ossigeno attivo e dei sintomi dello stress ossidativo sono stati osservati in piante esposte a metalli pesanti (Luna *et al.*, 1994; Weckx and Clijsters, 1996; Gonzales *et al.*, 1998; Chen and Kao, 1999; Shainberg *et al.*, 2001; Gallego *et al.*, 1996; Lozano-Rodriguez *et al.*, 1997; Chaoui *et al.*, 1997; Cho e Park, 2000; Piqueras *et al.*, 1999; Romero-Puertas *et al.*, 1999;

Schützendübel *et al.*, 2001; Weckx e Clijsters, 1997; Prasad *et al.*, 1999; Rao e Sresty, 2000; Ni Baccouch *et al.*, 1998). L'esposizione ai metalli pesanti determina una risposta pronunciata dei sistemi antiossidanti, ma la direzione della risposta dipende dalla specie e dal tessuto analizzati, dal metallo utilizzato per il trattamento e dall'intensità dello stress.

In conclusione, lo studio ha evidenziato l'insorgenza di uno stato di stress ossidativo in seguito al trattamento con di rame 0,1 mM, come indicato dall'aumento di malondialdeide. Il danno ossidativo è maggiore a livello radicale di quanto non lo sia a livello fogliare. Tra i cloni analizzati, AL22 e Villafranca accumulano maggiormente i prodotti della perossidazione lipidica delle membrane. Per quanto concerne l'attività degli enzimi antiossidanti, in generale le CAT sono caratterizzate nelle foglie da una attività più alta rispetto alle APX e alle SOD. Le catalasi pertanto sembrano giocare un ruolo importante nella detossificazione dal rame che, dai dati ottenuti, sembra essere specifico del background genetico dei cloni VF e 46EA e non dipendere quindi dalla presenza del transgene MT2. Quindi, dai risultati fino ad ora ottenuti, non è possibile attribuire alla sovra-espressione del gene MT2 un effetto di potenziamento dei sistemi enzimatici di protezione dai ROS. Il ruolo di protezione dallo stress ossidativo esercitato dalle metallotioneine si realizza maggiormente attraverso il mantenimento dell'omeostasi dei metalli che attraverso un azione diretta sui sistemi antiossidanti. Questo dimostra quanto sia complessa e per altro strettamente dipendente dal genotipo la network di risposta allo stress da metalli pesanti.

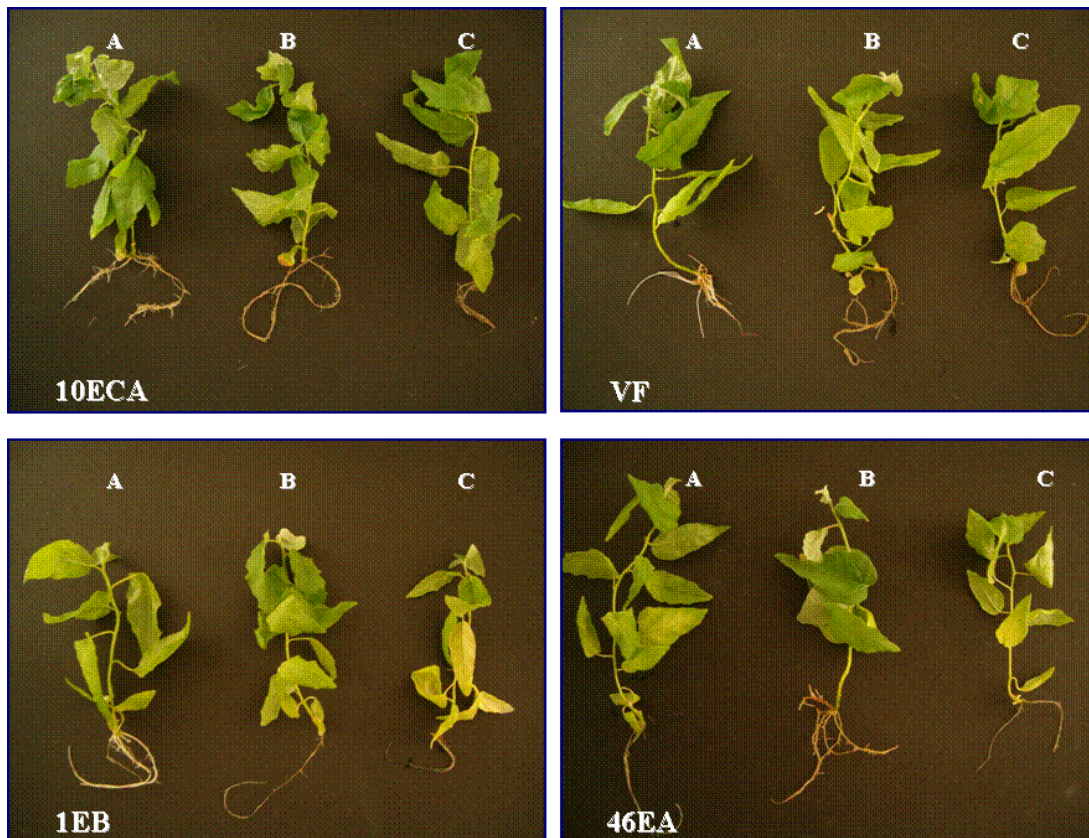
## CONCLUSIONI

Lo scopo di questa ricerca è quello di evidenziare differenze di risposta tra cloni di pioppo bianco in seguito all'esposizione ai metalli pesanti rame e zinco e di approfondire le conoscenze sul ruolo dei sistemi antiossidanti in materiale tollerante di diversa origine, nella fattispecie in cloni che esprimono la MT2 di pisello.

I risultati ottenuti, per quanto concerne l'accumulo dei metalli, mettono in evidenza una buona "performance estrattiva" dei cloni MAT-MT2 rispetto al loro controllo non trasformato VF e al clone AL22, selezionato come tollerante. Tuttavia, poiché lo screening *in vitro* genera ovvie limitazioni rispetto alle condizioni reali di crescita della pianta, questi risultati dovrebbero essere seguiti da prove sperimentali in pieno campo per confermare la loro utilità per il fitoremedio.

Nei cloni transgenici, però, non è stata evidenziata una attivazione dei sistemi enzimatici antiossidanti in accordo con la maggiore capacità di tollerare e di accumulare i metalli. È ipotizzabile quindi, che nei processi di metabolismo/detossificazione dei metalli pesanti le metallotioneine abbiano principalmente un ruolo come agenti chelanti e non un ruolo diretto nella protezione dai ROS. La loro azione si esplicherebbe quindi contenendo la concentrazione dei metalli entro limiti accettabili per la cellula contenendo così lo stress ossidativo.

## Appendice



**Figura 1** Effetto dei trattamenti con Zn 1 mM e Cu 0,1 mM, in condizioni di semi-idroponia (7 giorni): per ciascuno dei cloni sopra indicati sono identificati con le lettere A, B e C rispettivamente controllo, Zn 1 mM e Cu 0,1 mM.



**Figura 2** Effetto dell'esposizione a dosi crescenti di Cu (15 giorni) sul clone Villafranca: 1) controllo; 2) Cu 0,05 mM; 3) Cu 0,1 mM; 4) Cu 0,25 mM.

## Bibliografia

- Abarca D., Roldan M., Martin M., Sabater B.** 2001. *J. Exp. Bot.* **52**: 1417–1425.
- Acevedo A., Scandalios J. G.** 1991. Catalase and superoxide dismutase gene expression and distribution during stem development in maize. *Devel Genet.*, **12**: 423-430.
- Ali M. B., Hahn E.-J., Paek K.-Y.** 2006. Copper-induced changes in the growth, oxidative metabolism, and saponin production in suspension culture roots of *Panax ginseng* in bioreactors. *Plant Cell Rep* **25**: 1122-1132.
- Allen R. D.** 1997. Use of transgenic plants to study antioxidant defences. *Free Radical Biology and Medicine* **23**: 473-479.
- Alscher R. G., Donahue J. L., Cramer C. L.** 1997. *Physiol Plant* **100**: 224-233.
- Andersson A., Keskitalo J., Sjodin A., Bhalerao R., Sterky F., Wissel K., Tandre K., Aspeborg H., Moyle R., Ohmiya Y., Bhalerao R., Brunner A., Gustafsson P., Karlsson J., Lundeberg J., Nilsson O., Sandberg G., Strauss S., Sundberg B., Uhlen M., Jansson S., Nilsson P.** 2004. A transcriptional timetable of autumn senescence. *Genome Biology* **5**: R24.
- Arduini I., Godbold D. L., Onnis A.** 1994. Cadmium and copper change root growth and morphology of *Pinus pinea* and *Pinus pinaster* seedlings. *Physiol. Plantarum* **92**: 675.
- Arora A., Sairam R. K., Sristava G. C.** 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, **82 (10)**: 1227-38.
- Asada K.** 1992. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* **85**: 235-241.
- Asada K.** 1992. Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In Scandalios J. G. (ed) Current communications in cell and molecular biology 5. Molecular biology of free radical research scavenging systems. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, 173-192.

- Asada K.** 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 601-639.
- Asada K. and Takahashi M.** 1987. in *Photoinhibition: Topics in Photosynthesis* (Eds Kyle D. J, Osmond C. B. and Arnten, C. J.) Elsevier, Amsterdam, **9**: 227-287.
- Attar F., Keyhani E., Keyhani J.** 2006. A comparative study of Superoxide Dismutase activity assays in *Crocus sativus* L. corms. *Applied Biochemistry and Microbiology* **42** (1): 101-106.
- Baccouch S., Chaoui A., Ferjani El E.** 1998. Nickel-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Zea mays* shoots. *Plant physiology and biochemistry* **36**: 689-694.
- Bagnoli F., Capuana M., Racchi M. L.** 1998. Developmental changes of catalase and superoxide dismutase isozymes in zygotic and somatic embryos of horse chestnut. *Aust J Plant Physiol* **25**: 909-913.
- Bagnoli F., Danti S., Magherini V., Cozza R., Innocenti A. M., Racchi M. L.** 2004. Molecular cloning, characterization and expression of two *catalase* genes from peach (*Prunus persica*). *Functional Plant Biology* **31**: 349-357.
- Baker C. J., Orlandi E. W.** 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **33**: 299-321.
- Baum J. A., Scandalios J. G.** 1982. Multiple genes controlling superoxide dismutase expression in maize. *J Hered* **73**: 95-100.
- Beauchamp C., Fridovich I.** 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44** (1): 267-287.
- Bhalerao R., Keskitalo J., Sterky F., Erlandsson R., Bjorkbacka H., Birve S. J., Karlsson J., Gardestrom P., Gustafsson P., Lundeberg J., Jansson S.** 2003. Gene expression in autumn leaves. *Plant Physiology* **131**: 430-442.

- Blaudez D., Kohler A., Martin F., Sanders D., Chalot M.** 2003. Poplar metal tolerance protein 1 confers zinc tolerance and is an oligomeric vacuolar zinc transporter with an essential luciferase zipper motif. *Plant Cell* **15**: 2911-2928.
- Borgegård S.O. e Rydin H.** 1989. Biomass, root penetration and heavy metal uptake in birch, in a soil cover over copper tailings. *J. Appl. Ecol.* **26**: 585-595.
- Borg D. C., Schaich K. M.** 1988. Iron and hydroxyl radicals in lipid peroxidation: Fenton reactions in lipid and nucleic acids co-oxidized with lipids, in: P. A. Cerutti, I. Fridovich, J. M. McCord (Eds), *Oxyradicals in Molecular Biology and Pathology*, Alan R. Liss, New York 427-441.
- Bowler C., Alliotte T., De Loose M., Van Montagu M., and Inze D.** 1987. *EMBO J.* **8**: 31-38.
- Bowler C., Alliotte T., Van den Bulcke M., Bauw G., Vandekerckhove J., Van Montagu M., Inzé D.** 1989. A plant manganese superoxide dismutase is efficiently imported and correctly processed by yeast mitochondria *PNAS* **86**: 3237-3241.
- Bowler C., Van camp W., Van Montagu M.** 1994. Superoxide dismutase in plants. *Cri Rev Pl ant Sci* **13 (3)**: 199-218.
- Boyer, J. S.** 1982. Plant productivity and environment. *Science* **218**: 443-448.
- Bukelmann J. R., Trelease R. N.** 1996. Ascorbate peroxidase: a prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. *Plant Physiology* **110**: 589-598.
- Burken J. G., Schnoor J. L.** Predictive relationships for uptake of organic contaminants by hybrid poplar trees. *Environ. Sci. Technol.* **32**: 3379-3385.
- Butt A., Mousley C., Morris K., Beynon J., Can C., Holub E., Greenberg J. T., Buchanan-Wollaston V.** 1998. Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringiae*. *Plant Journal* **16**: 209-221.



- Carloz A. and Touati D.** 1986. *EMBO J.* **5**: 623-630.
- Castiglione S., Franchin C., Fossati T., Lingua G., Torrigiani P., Biondi S.** 2007. High zinc concentration reduce rooting capacity and alter metallothionein gene expression in white poplar (*P. alba* L. cv. Villafranca). *Chemosphere* **67**: 1117-1126.
- Chaoui A., Mazhoudi S., Ghorbal M. N., Ferjani E. E.** 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzymes activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci* **127**: 139-147.
- Chen L. M., Kao C. H.** 1999. Effects of excess copper on rice leaves: evidence for involvement of lipid peroxidation. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **40**: 283-287.
- Chen G-X, Asada K** 1989. Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isoenzymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant and Cell Physiology* **30**: 987-998.
- Chen L-M., Lin C. C., Kao C. H.** 2000. Copper toxicity in rice seedlings: changes in antioxidative enzyme activities, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level, and cell wall peroxidase activity in roots. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **41**: 99-103.
- Chen Z., Silva H., Klessig D. F.** 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, **262**: 1883-1886.
- Cho U. H., Park J. O.** 2000. Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Science* **156**: 1-9.
- Choi D., Kim H. M., Yun H. K., Park J. A., Kim W. T., Bok S. H.** 1996. Molecular cloning of a metallothionein-like gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology* **112**: 353-359.
- Choudhury S. B., Lee J. W., Davidson G., Yim Y. I., Bose K., Sharma M. L., Kang S., Cabelli D. E., Maroney M. J.** 1999. *Biochemistry* **38**: 3744-3752.
- Clemens S.** 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**: 475-486.

- Clemens S., Palmgren M. G., Krämer U.** 2002. A long way ahead understanding and engineering plant metal accumulation. *TRENDS In Plant Science* **7 (7)**: 309-315.
- Cobbett C. S.** 2000. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy metal detoxification. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 211-216.
- Cobbett C., Goldsbrough P.** 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 159-182.
- Conklin P. L., Last R. L.** 1995. Differential accumulation of antioxidant mRNAs in *Arabidopsis thaliana* exposed to ozone. *Plant Physiology* **109**: 203-212.
- Cunningham S. D., Ow D. W.** 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol.* **110**: 715-719.
- Cuypers A., Vangronsfeld J., Clijsters H.** 2000. Biphasic effect of copper on the ascorbate-glutathione pathway in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* seedlings during the early stages of metal assimilation. *Physiol Plant* **110**: 512-517.
- Dat J. F., Lopez-Delgado H., Foyer C. H., Scott I. M.** 1998. Parallel changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiology* **116**: 1351-1357.
- De Gara L., Saracino O. D.** 1997. Metabolic responses of both hydrogen peroxide scavenging enzymes and ascorbate re cycling enzymes to environmental pollution in *Acanthophora najadiformis* (*Rodophyta*). In: Hawkins L E, Hutchison S, Jensen A C, William J A, Sheadre M (eds) Responses to marine organisms to their environments. Prodeedings of the 30<sup>th</sup> European Marine Biology Symposium, Southampton, UK, September 1995. Southampton Oceanography Centre, Southampton, UK: 9-14.
- De Gara L., Tommasi F.** 1999. Ascorbate redox enzymes: a network of reactions involved in plant growth. *Recent Res Dev Phytochem* **3**: 1-15.

- De Vos C. H. R., Schat H., Vooijs R., Ernst W. A. O.** 1989. Copper induced damage to the permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*. *J. Plant Physiol.* **135**: 164-169.
- De Vos C. H. R., Vonk M. J., Schat H.** 1992. Glutathione depletion due to copper induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiol.* **98**: 853-858.
- Del Rio L. A., Sandalio L. M., Palma J. M., Bueno P., Corpas F. J.** 1992. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Rad. Biol Med* **13**: 557-580.
- Di Baccio D., Tognetti R., Sebastiani L., Vitagliano C.** 2003. Responses of *Populus deltoides* x *Populus nigra* (*P. x euramericana*) clone I-214 to high zinc concentrations. *New Phytol.* **159**: 443-452.
- Di Toppi L.S. e Gabbrielli R.** 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* **41**: 105-130.
- Donahue J. L., Okpodu C. M., Cramer C. L., Grabau E. A., Alscher R. G.** 1997. Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves. *Plant Physiology* **113**: 249-257.
- Dra, \_zkiewicz M., Sko' rzyn' ska-Polit E., Krupa Z.** 2004. Copper induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *BioMetals* **17**:379-387.
- Eckenwalder J. E.** 1996. Systematics and evolution of *Populus*. In: **Stettler R. F., Bradshaw H. D., Jr., Heilman P. E., Hinckley T. M.**, editors. *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. Ottawa: *NRC Research Press*: 7-32.
- Evans K. M., Gatehouse J. A., Lindsay W. P., Shi J., Tommey A. M., Robinsons N. J.** 1992. Expression of the pea metallothionein-like gene *PsMT<sub>A</sub>* in *Escherichia Coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of trace metal ion accumulation: implications for *PsMT<sub>A</sub>* function. *Plant Molecular Biology* **20**: 1019-1028.
- Fang W-Ch., Kao Ch. H.** 2000. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. *Plant Sci* **158**: 71-76.

- Foyer C. H., Mullineaux P. M.** 1994. Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. *CRC Press Boca Raton, FL*.
- Fridovich I.** 1995. *Annu. Rev. Biochem* **65**: 97-112.
- Fridovich I.** 1998. *Protein Sci* **7**: 2688-2690.
- Frugoli J. A., Zhong H. H., Nuccio M. L., McCourt P., McPeck M. A., Thomas T. L., McClung C. R.** 1996. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh *Plant Physiol* **112**: 327-336.
- Gallego S. M., Benavides M. P., Tomaro M. L.** 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science* **121**: 151-159.
- Gonzales A., Steffen K. L., Lynch J.** 1998. Light and excess manganese. Implications for oxidative stress in common bean. *Plant Physiol.* **118**: 493-504.
- Gratão P. L., Polle A., Lea P. J., Azevedo R. A.** 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Funct Plant Biol* **32**: 481-494.
- Gressel J., Salun E.** 1994. in Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants (Eds Foyer, C. H. and Mullineaux P. M). *CRC Press, Boca Raton, FL* 237-274.
- Hall J. L.** 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1-11.
- Harwood J. L.** 1998. Environmental effects on plant lipid biochemistry. In: J.L. Harwood, Editor, *Plant Lipid Biosynthesis—Fundamentals and Agricultural Applications*, Cambridge University Press, Cambridge, 305-363.
- Howden R., Goldsbrough P. B., Andersen C. R., Cobbett C. S.** 1995. Cadmium-sensitive, cad1 mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiology* **107**: 1059-1066.

- Howe G. A., Schillmiller A. L.** 2002. Oxylin metabolism in response to stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 230-236.
- Hsieh H. M., Liu W. K., Huang P. C.** 1995. A novel stress-inducible metallothionein-like gene from rice. *Plant Molecular Biology* **28**: 381-389.
- Ishikawa T., Sakai K., Takeda T., Shigeoka S.** 1995. Cloning and expression of cDNA encoding a new type of ascorbate peroxidase from spinach. *FEBS Letters* **367**: 28-32.
- Ishikawa T., Sakai K., Yoshimura K., Takeda T., Shigeoka S.** 1996a. cDNAs encoding spinach stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidase, differing in the presence or absence of their 3'-coding regions. *FEBS Letters* **384**: 289-293.
- Ishikawa T., Takeda T., Kohno H., Shigeoka S.** 1996b. Molecular characterization of Euglena ascorbate peroxidase using monoclonal antibody. *Biochimica et Biophysica Acta* **1290**: 69-75.
- Ishikawa T., Takeda T., Shigeoka S.** 1996c. Purification and characterization of cytosolic ascorbate peroxidase from Komatsuma (*Brassica rapa*) *Plant Science* **120**: 11-18.
- Ishikawa T., Yoshimura K., Sakai K., Tamoi M., Takeda T., Shigeoka S.** 1998. Molecular characterization and physiological role of a glyoxysome-bound ascorbate peroxidase from spinach. *Plant and Cell Physiology* **39**: 23-34.
- Janssens I. A., Sampson D. A., Curiel-Yuste J., Carrara A., Ceulemans R.** 2002. The carbon cost of fine root turnover in Scots pine forest. *For Ecol Manag* **168**: 231-240.
- Kägi J. H. R., Vallee B. L.** 1960. Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *Journal of Biology Chemistry* **235**: 3460-3465.
- Kardish N., Magal N., Aviv D., Galun E.** 1994. *Plant Mol. Biol.* **25**: 887-897.
- Karpinski S., Wingsle G., Olsson O., Hallgren J. E.** 1992. Characterization of cDNAs encoding Cu/Zn-superoxide dismutases in scots pine. *Plant Mol Biol* **18**: 545-555.

- Kendall A. C., Keys A. J., Turner J. C., Lea P. J., Mifflin B. J.** 1983. The isolation and characterization of a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare*). *Planta* **159**: 505-511.
- Kernodle S. P., Scandalios J. G.** 2001. *Arch Biochem Biophys* **391**: 137-147.
- Kille P., Winge D. R., Harwood J. L., Kay J.** 1991. A plant metallothionein produced in *E. Coli*. *FEBS Letters* **295**: 171-175.
- Kliebenstein D. J., Monde R. A., and Last R. L.** 1998. *Plant Physiol.* **118**: 637-650.
- Kolher A., Blaudez D., Chalot M., Martin F.** 2004. Cloning and expression of multiple metallothioneins from poplar. *New Phytologist* **164**: 83-93.
- Kosugi H., Kikugawa K.** 1985. Thiobarbituric acid reaction of aldehydes and oxidized lipids in glacial acetic acid. *Lipids* **20**: 915-920.
- Kroniger W., Rennenberg H., Polle A.** 1993. Development changes of CuZn and Mn-superoxide dismutase isozymes in seedlings and needles of Norway Spruce (*Picea abies* L.) *Plant Cell Physiol* **34** (7): 1145-1149.
- Kurepa J., Hérouart D., Van Montagu M., Inzé D.** 1997. Differential expression of *Cu/Zn* and *Fe-superoxide dismutase* genes of tobacco during development, oxidative stress, and hormonal treatment. *Plant Cell Physiol* **38** (4): 463-470.
- Lane B. G., Kajioka R., Kennedy T. D.** 1987. The wheat germ Ec protein is a zinc-containing metallothionein. *Biochemistry and Cellular Biology* **65**: 1001-1005.
- Laplaze L., Gherbi H., Duhoux E., Pawlowski K., Auguy F., Guermache F., Franche C., Bogusz D.** 2002. Symbiotic and non-symbiotic expression of *CgMT1*, a metallothionein-like gene from the actinorhizal tree *Casuarina glauca*. *Plant Molecular Biology* **49**: 81-92.

- Laureysens I., De Temmerman L., Hastir T., Van Gysel M., Ceulemans R.** 2005. Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture. II. Vertical distribution and phytoextraction potential. *Environ Pollut* **133**: 541-551.
- Lee J., Shim D., Song W Y, Hwang I., Lee Y.** 2004. *Arabidopsis* metallothioneins 2a and 3 enhance resistance to cadmium when expressed in *Vicia faba* cells. *Plant Molecular Biology* **54**: 805-815.
- Leonardis S. D., Dipierro N., Dipierro S.** 2000. Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 773-779.
- Lopez F., Vansuyt G., Casse-Delbart F., Fourcroy P.** 1996. Ascorbate peroxidase activity, not the mRNA level, is enhanced in salt-stressed *Raphanus sativus* plants. *Physiologia Plantarum* **97**: 13-20.
- Lowry O. H., Rosebrough N. H., Farr A. L., Randall R. J.** 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Lozano-Rodriguez E., Hernandez L. E., Bonay P., Carpena-Ruiz R. O.** 1997. Distribution of cadmium in shoot and root tissues of maize and pea plants: physiological disturbances. *Journal of experimental botany* **48**: 123-128.
- Luna C. M., Gonzales C. A., Trippi V. S.** 1994. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. *Plant Cell Physiol.* **35 (1)**: 11-15.
- Maksymiec W.** 1997. Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica* **34**: 321-342.
- Mancini A., Buschini A., Restivo F. M., Rossi C., Poli P.** 2006. Oxidative stress as DNA damage in different transgenic tobacco plants. *Plant Sci* **170**: 845-852.
- Mann T., Keilin D.** 1938. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **126**: 303-315.
- Margoshes M., Vallee B. L.** 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of American Chemical Society* **79**: 4813-4818.

- Mazhoudi S., Chaoui A., Ghorbal M. H., Ferjani E. El.** 1997. Response of antioxidative enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). *Plant Science* **127**: 129-137.
- McCord J. M., and Fridovich I.** 1969. *J. Biol. Chem.* **244**: 6049-6055.
- Metwally A., Finkemeier I., Georgi M., Dietz K. J.** 2003. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol* **132**: 272-281.
- Miao Z., Gaynor J. J.** 1993. Molecular cloning, characterization and expression of Mn-superoxide dismutase from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Mol Biol* **23**: 267-277.
- Mittler, Zilinskas B. A.** 1991a. Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiology* **97**: 962-968.
- Mittler, Zilinskas B. A.** 1993. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Anal Biochem* **212**: 540-546.
- Mittler M., Zilinskas B. A.** 1994. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *The Plant Journal* **5**: 397-405.
- Miyake C., Cao W-H., Asada K.** 1993. Purification and molecular properties of thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplast. *Plant and Cell Physiology* **34**: 881-889.
- Murphy A., Zhou J., Goldbrough P., Taiz L.** 1997. Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **113**: 1293-1301.
- Newman L. A., Strand S. E., Choe N., Duffy J., Ekuan G., Ruszaj M., Shurtleff B. B., Wilmorth J., Heilman P., Gordon M. P.** 1997. Uptake and biotransformation of trichloroethylene by hybrid poplars. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 1062-1067.
- Noctor G., Foyer C. H.** 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* **49**: 249-279.



- Palma J. M., Sandalio L. M., Del Rio L. A.** 1986. Manganese superoxide dismutase and higher plant chloroplasts: a reappraisal of a controverted cellular localization. *J Plant Physiol* **125**: 427-439.
- Pastori G. M., Trippi V. S.** 1992. Oxidative stress induces high rate of glutathione reductase synthesis in a drought-resistant maize strain. *Plant and Cell Physiology* **33**: 957-961.
- Peterson G. L.** 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal biochem* **53**: 570-577.
- Peixoto P. H. P., Cambraia J., Sant Anna R., Mosquim P. R., Moreira M. A.** 2001. Aluminium effects on fatty acid composition and lipid peroxidation of a purified plasma membrane fraction of root apices of two sorghum cultivars. *J. Plant Nutr.* **24**: 1061-1070.
- Pietrini F., Iannelli M. A., Pasqualini S., Massacci, A.** 2003. Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex strudel. *Plant Physiology* **133**: 829-837.
- Piqueras A., Olmos E., Martinez-Solano J. R., Hellin E.** 1999. Cd-induced oxidative burst in tobacco BY2 cells: time-course, subcellular location and antioxidant response. *Free radical research* **31**: 33-38.
- Pilon-Smits E. A. H., De Souza M. P., Lytle C. M., Shang C., Lugo T., Terry N.** 1998. Selenium volatilization and assimilation by hybrid poplar (*Populus tremula* x *alba*). *J. Exp. Bot.* **49**: 1889-1892.
- Prasad T. K., Anderson M. D., Martin B. A., Stewart C. R.** 1994. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *The Plant Cell* **6**: 65-74.
- Prasad K. V. S. K., Paradha Saradhi P., Sharmila P.** 1999. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. *Environmental and experimental botany* **42**: 1-10.

- Punshon T., Dickinson N.M., Lepp N.W.** 1996. The potential of *Salix* clones for bioremediating metal polluted soil, in *Heavy Metals and Trees*. Proceedings of a Discussion Meeting, Glasgow, Glimmerveen, I. Institute of Chartered Foresters, Edinburgh, 93.
- Quartacci M.F., Pinzino C., Sgherri C. L. M., Dalla Vecchia F. e Navari-Izzo F.** 2000. Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII-enriched membranes in wheat. *Physiol. Plant.* **108**: 87-93.
- Rabinowitch H. D., Fridovich I.** 1983. Superoxide radicals, superoxide dismutase and oxygen toxicity in plants. *Photochem Photobiol* **37**: 679-690.
- Rabinowitch H. D., Sklan D., Budowski P.** 1982. *Physiol. Plant* **54**: 369-374.
- Racchi M. L., Bagnoli F., Balla I., Danti S.** 2001. Differential activity of catalase and sueroxide dismutase in seedlings and in vitro micropropagated oak (*Quercus robur* L.) *Plant Cell Rep* **20**: 169-174.
- Racchi M. L., Chiusi A. P., Giannini R.** 1996. Catalase isozymes as biochemical markers of different development stages in cypress (*Cupressus sempervirens*) *Can J For Res* **26**: 1629-1633.
- Rama Devi S., e Prasad M.N.V.** 1998. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidant. *Plant Science* **138**: 157-165.
- Rama Devi S., e Prasad M.N.V.** 1999. Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. In: M.N.V. Prasad and J. Hagemeyer, Editors, *Heavy Metal Stress in Plants—From Molecules to Ecosystems*, Springer, Berlin: 99-117.
- Rao M. V., Pallyath G., Ormrod D. P.** 1996. Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **110**: 125-136.
- Rao M. V., Sestry T. V. S.** 2000. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Science* **157**: 113-128.

- Robinson B. H., Mills T. M., Petit D., Fung L. E., Green S. R., Clothier B. E.** 2000. Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: implications for phytoremediation. *Plant Soil* **227**: 301-306.
- Robinson N. J., Tommey A. M., Kuske C., Jackson P. J.** 1993. Plant metallothioneins. *Biochemical Journal* **295**: 1-10.
- Romero-Puertas M. C., McCarty I., Sandalio L. M., Palma J. M., Corpas F. J., Gomez M., Del Rio L. A.** 1999. Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaf peroxisomes. Free radical research **31**: S25-S31.
- Rosen D. R., Siddique T., Patterson D., Figlewicz D. A., Sapp P., Hentati A., Donaldson D., Goto J., O'Regan J. P., and Deng H. X.** 1993. *Nature* **362**: 59-62.
- Rucińska R., Wapłak S., Gwóźdź E. A.** 1999. Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupin roots exposed to lead. *Plant Physiol Biochem* **37**: 187-194.
- Sakamoto A., Ohsuga H., Tanaka K.** 1992. *Plant Mol. Biol.* **19**: 323-327.
- Salin M. L.** 1988. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol Plant* **72**: 681-689.
- Sanità di Toppi L., Gabrielli, R.** 1999. Responses to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* **41**: 105-130.
- Scandalios J. G.** 1987. The antioxidant enzyme genes *Cat* and *Sod* of maize: regulation, functional significance, and molecular biology. In "Isozymes: current topics in biological and medical research, molecular and cellular biology". (Eds M. C. Rattazzi, J. G. Scandalios and G. S. Whitt) **14**: 19-44 (Alan R. Liss: New York).
- Scandalios J. G.** 1997. Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.

- Schnoor J. L.** 2000. Phytostabilization of metals using hybrid poplar trees. In: Raskin I., Ensley B. D., (Eds.) Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment. Wiley, New York, 133-150.
- Schützendübel A., Schwanz P., Teichmann T., Gross K., Langenfeld-Heyser R., Godbold D. L., Polle A.** 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content and differentiation in pine (*Pinus sylvestris*) roots. *Plant Physiology* **127**: 887-892.
- Schützendübel A., Polle A.** 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal Exp Bot.* **53 (372)**: 1351-1365.
- Sergiev I., Alexieva V., Karanov E.** 1997. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Compt Rend Acad Bulg Sci* **51**: 121-124.
- Shainberg O., Rubin B., Rabinowitch H. D., Tel-Or E.** 2001. Loading beans with sublethal levels of copper enhances conditioning to oxidative stress. *J. Plant Physiol.* **158**: 1415-1421.
- Shigeoka S., Nakano Y., Kitaoka S.** 1980b. Purification and some properties of L-ascorbic acid-specific peroxidase in *Euglena gracilis* Z. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **201**: 121-127.
- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K.** 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot* **53**: 1305-1319.
- Siedlecka A., Tukendorf A., S̋korzŷnska-Polit E., Maksymiec, W., W'ojcik M., Baszy'nski T., Krupa Z.** 2001. Angiosperms (Asteraceae, Convolvulaceae, Fabaceae and Poaceae; other than Brassicaceae). In: Prasad M. N. V. (Ed.), Metals in the Environment. Marcel Dekker Inc., New York, 171-215.
- Somashekaraiyah B. V., Padmaja K., Prasad A. R. K.** (1992) Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiol Plant* **85**: 85-89.

- Srivastava S., Tripathi R. D., Dwivedi U. N.** 2004. Synthesis of phytochelatins and modulation of antioxidants in response to cadmium stress in *Cuscuta reflexa* – an angiospermic parasite. *J. Plant. Physiol.* **161**: 665-674.
- Suzuki M., Ario T., Hattori T., Nakamura K., Asahi T.** 1994. Isolation and characterization of two tightly linked *catalase* genes from castor bean that are differentially regulated. *Plant Mol Biol* **25**: 507-516.
- Tanaka K., Suda Y., Kondo N., Sugihara K.** 1985. O<sub>3</sub> tolerance and the ascorbate-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposing system in chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* **26**: 1425-1431.
- Tewari R. K., Kumar P., Sharma P. N., Bisht S. S.** 2002. Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt. *Plant Sci* **162**: 381-388.
- Tewari R. K., Kumar P., Sharma P. N.** 2006. Antioxidant responses to enhanced generation of superoxide anion radical and hydrogen peroxide in the copper-stressed mulberry plants. *Planta* **223**: 1145-1153.
- Thiele D. J.** 1992. Metal-regulated transcription in eukaryotes. *Nucleic Acids Research* **20**: 1183-1191.
- Trewavas, A. J. e Malhó R..** 1997. Signal perception and transduction: the origin of the phenotype. *Plant Cell* **9**: 1181-1195.
- Tsugane K., Kobayashi K., Niwa Y., Obba Y., Wada K., Kobayashi H.** 1999. A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *The Plant Cell* **11**: 1195-1206.
- Tukendorf A., Rauser W. E.** 1990. Changes in glutathione and phytochelatins in roots of maize seedlings exposed to cadmium. *Plant Sci.* **70**: 155-166.
- Tuskan G. A., Di Fazio S. P., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev I., Hellsten U. et al.** 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**: 1596-1604.

- Utmazian M. N. D. S., Wieshammer G., Vega R., Wezel W. W.** 2007. Hydroponic screening for metal resistance and accumulation of cadmium and zinc in twenty clones of willows and poplars. *Environmental pollution* **148**: 155-165.
- Van Breusegem F., Vranová E., Dat J. F., Inzé D.** 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* **161**: 405-414.
- Vangronsveld J., Clijsters H.** 1994. Toxic effect of metals. In: Farago, M. E. (Ed.), *Plants and the chemical elements-biochemistry, uptake, tolerance and toxicity*. VCH, Weinheim: 149-177.
- Van Loon, A. P., Pesold-Hurt, B., and Schatz, G.** 1986. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 3820-3824.
- Wadsworth G. S., Scandalios J G.** 1989. Differential expression of maize *catalase* genes during kernel development: the role of steady-state RNA levels. *Dev Gen* **10**: 304-310.
- Weckx J. E. J., Clijsters H. M. M.** 1996. Oxidative damage and defence mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper. *Physiol. Plant.* **96**: 506-512.
- Weckx J. E. J., Clijsters H. M. M.** 1997. Zn phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol Biochem* **35**: 405-410.
- White J. A. and Scandalios J. G.** 1988. *Biochim. Biophys. Acta.* **951**: 61-70.
- Willekens H., Inzé D., Van Montagu M., Van Camp W.** 1995. Catalases in plants. *Mol Breed* **1**: 207-228.
- Willekens H., Langerbartels C., Tiré C., Van Montagu M., Inzé D.** 1994. Differential expression of *catalase* genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.) *PNAS* **91**: 10450-10454.
- Willekens H., Van Camp W., Van Montagu M., Inzé D., Sandermann H. Jr., Langerbartels C.,** 1994a. Ozone, sulfur dioxide, and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Plant Physiol* **106**: 1007-1014.

- Willekens H., Villarroel R., Van Montagu V., Inzé D., Van Camp W.** 1994b. Molecular identification of *catalases* from *Nicotiana plumbaginifolia* (L.) *FEBS Letters* **352**: 79-83.
- Woodbury D. M., Williams J. A.** 1971. Determination of extracellular space and intracellular electrolytes in rat liver *in vivo*. *J. Physiol.* **212**: 85-89.
- Xiang C., Oliver D. J.** 1998. Glutathione metabolic genes co-ordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in Arabidopsis. *Plant Cell.* **10**: 1539-1550.
- Yamaguchi K., Mori H., Nishimura M.** 1995a. A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant and Cell Physiology* **36**: 1157-1162.
- Yamaguchi K., Takeuchi Y., Mori H., Nishimura M.** 1995b. Development of microbody membrane proteins during the transformation of glyoxysomes to leaf peroxysome in pumpkin cotyledons. *Plant and Cell Physiology* **36**: 455-464.
- Yamamoto Y., Hachia A., Matsumoto H.** 1997. Oxidative damage to membranes by a combination of aluminium and iron in suspension cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiology* **38**: 1333-1339.
- Yoshimura K., Ishikawa T., Nakamura Y., Tamoi M., Takeda T., Tada T., Nishimura K., Shigeoka S.** 1998. Comparative study on recombinant chloroplastic and cytosolic ascorbate peroxidase isoenzymes of spinach. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **353**: 55-63.
- Yoshimura K., Yabuta Y., Ishikawa T., Shigeoka S.** 2000. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology* **123**: 223-234.
- Zhang F-Q., Wang Y-S., Lou Z-P., Dong J-D.** 2007. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). *Chemosphere* **67**: 44-50.

**Zhou J., Goldsbrough P . B.** 1994. Functional homologs of animal and fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell* **6**: 875-884.

**Zhu D., and Scandalios J. G.** 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 9310-9314.