

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE, AMBIENTALI
E ALIMENTARI

Ciclo XXVII

Settore Concorsuale di afferenza: 07/D1

Settore Scientifico disciplinare: AGR/12

**Stress abiotici e preparati ultra-diluiti:
effetti fisiologici e molecolari sulla crescita *in vitro*
di frumento**

Presentata da: **Dott.ssa Valeria Bregola**

Coordinatore Dottorato

Prof. Giovanni Dinelli

Relatore

Dott.ssa Lucietta Betti

Correlatore

Prof. Giovanni Dinelli

Esame finale anno 2015

RIASSUNTO

Gli stress abiotici determinando modificazioni a livello fisiologico, biochimico e molecolare delle piante, costituiscono una delle principali limitazioni per la produzione agricola mondiale. Nel 2007 la FAO ha stimato come solamente il 3,5% della superficie mondiale non sia sottoposta a stress abiotici.

Il modello agro-industriale degli ultimi cinquant'anni, oltre ad avere contribuito allo sviluppo economico dell'Europa, è stato anche causa di inquinamento di acqua, aria e suolo, mediante uno sfruttamento indiscriminato delle risorse naturali. L'arsenico in particolare, naturalmente presente nell'ambiente e rilasciato dalle attività antropiche, desta particolare preoccupazione a causa dell'ampia distribuzione come contaminante ambientale e per gli effetti di fitotossicità provocati. In tale contesto, la diffusione di sistemi agricoli a basso impatto rappresenta una importante risorsa per rispondere all'emergenza del cambiamento climatico che negli anni a venire sottoporrà una superficie agricola sempre maggiore a stress di natura abiotica.

Nello studio condotto è stato utilizzato uno stabile modello di crescita *in vitro* per valutare l'efficacia di preparati ultra diluiti (PUD), che non contenendo molecole chimiche di sintesi ben si adattano a sistemi agricoli sostenibili, su semi di frumento preventivamente sottoposti a stress sub-letale da arsenico. Sono state quindi condotte valutazioni sia a livello morfometrico (germinazione, lunghezza di germogli e radici) che molecolare (espressione genica valutata mediante analisi microarray, con validazione tramite Real-Time PCR) arricchendo la letteratura esistente di interessanti risultati. In particolare è stato osservato come lo stress da arsenico, determini una minore vigoria di coleptile e radici e a livello molecolare induca l'attivazione di pathways metabolici per proteggere e difendere le cellule vegetali dai danni derivanti dallo stress; mentre il PUD in esame (As 45x), nel sistema stressato ha indotto un recupero nella vigoria di germoglio e radici e livelli di espressione genica simili a quelli riscontrati nel controllo suggerendo un effetto "riequilibrante" del metabolismo vegetale.

ABSTRACT

Abiotic stresses and ultrahigh diluted treatments: physiological and molecular effects on *in vitro* wheat growth

The unquestionable importance of abiotic stresses to world agriculture is demonstrated by the fact that altogether abiotic factors provide the major limitation to crop production worldwide. A 2007 FAO report stated that only 3.5% of the global land area is not affected by environmental stresses and that climate change will increase areas characterized by abiotic stresses.

The agro-industrial model that enriched European population in the last fifty years, however has resulted in irreversible contamination of water, air and soil. In particular arsenic is a toxic metalloid widely disseminated in the environment as a consequence of natural processes and anthropic activities, that causes global concern for health and environmental hazards. Within this context, sustainable farming systems and the use of organic treatments such as ultrahigh diluted treatments (PUD) could be important tools of mitigating the effects of climate change. The objective of the present study was to test the biological effect of PUD As_{45x} on wheat seedling poisoned with a sub-lethal dose of arsenic, using an *in vitro* plant system. The evaluation of the arsenic toxicity and the effectiveness of As_{45x} was conducted through biometric measurements and molecular analyses (microarray and Real-Time PCR). The results provided evidence for a strong gene modulating effect of arsenic, upregulating molecular pathways involved in cellular protection and defense from oxidative stress. It was also observed a reduction in the length of shoots and roots. Inversely in seedlings grown from poisoned seeds and treated with PUD, a recovery of coleoptiles and roots vigor was detected together with a massive reduction of gene expression levels to values comparable to those of the control group. A plausible hypothesis is that PUD induced a reequilibration of those genes that were upregulated during arsenic stress by bringing the expression levels closer to the basal levels normally occurring in control plants.

INDICE

1. INTRODUZIONE	7
1.1 <i>Stress abiotici nelle piante</i>	7
1.2 <i>Stress da metalli pesanti</i>	8
1.3 <i>L'arsenico</i>	10
1.3.1 Vie di trasporto dell'arsenico nella pianta	15
1.3.2 Effetti fisiologici da tossicità da arsenico nella pianta	16
1.3.2.1 Inibizione della crescita	16
1.3.2.2 Alterazione del sistema fotosintetico	17
1.3.2.3 Alterazione dell'integrità di membrana	18
1.3.2.4 Produzione di specie reattive dell'ossigeno e perossidazione lipidica	18
1.3.3 Strategie di tolleranza dello stress da arsenico	20
1.3.3.1 Sistemi antiossidanti	20
1.3.3.2 Sintesi di fitochelatine	21
1.3.3.3 Iperaccumulo	22
1.3.3.4 Funghi micorrizici arbuscolari	22
1.3.4 Vie di trasduzione del segnale in risposta alla percezione di stress da arsenico	22
1.3.4.1 Proteine chinasiche	23
1.3.4.2 Accumulo di ioni Ca ²⁺	24
1.3.4.3 Cambiamento delle condizioni redox	25
1.3.4.4 Ossido nitrico	26
1.3.4.5 Ormoni	26
1.3.5 Regolazione ed estinzione del segnale	27
1.4 <i>Agricoltura e sostenibilità</i>	27

1.4.1 I preparati ultra-diluiti (PUD)	29
1.4.2 PUD e piante	31
<i>1.5 Il modello di crescita in vitro di semi di frumento</i>	32
<i>1.6 Valutazione dell'espressione genetica</i>	34
1.6.1 La tecnologia microarray	34
1.6.1.1 Utilizzo dell'analisi microarray per lo studio degli effetti dei PUD	36
1.6.2 La PCR quantitativa: Real-Time PCR	37
2. MATERIALI E METODI	40
<i>2.1 Riproduzione del modello di crescita in vitro di semi di frumento</i>	40
2.1.1 Materiale vegetale, trattamenti	40
2.1.2 Protocollo sperimentale	41
<i>2.2 Analisi di espressione genica</i>	43
2.2.1 Estrazione dell'RNA e preparazione dei campioni per l'analisi microarray	43
2.2.2 Retrotrascrizione e marcatura	44
2.2.2 Ibridazione, lavaggio e scansione	44
2.2.3 I GeneChip® Wheat Genome Array	45
2.2.4 Analisi dei dati microarray	45
2.2.5 Verifica dell'analisi di espressione genica mediante Real-Time PCR	47
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	51
<i>3.1 Valutazione di efficacia: parametri di crescita</i>	51
<i>3.2 Valutazione di efficacia: analisi molecolari</i>	53
3.2.1 Analisi microarray	54
3.2.1.1 L'interazione S+0 vs C+0 e S+T vs C+0	60
3.2.1.2 L'interazione C+T vs C+0 e S+T vs S+0	74

3.2.2 qRT-PCR	79
4. CONCLUSIONI	81
5. BIBLIOGRAFIA	85

1. INTRODUZIONE

1.1 Stress abiotici nelle piante

Nel corso dell'evoluzione le piante si sono adattate a vivere in ambienti sottoposti a stress di diverso tipo, in grado di influire negativamente sul normale sviluppo e crescita della pianta. Da un punto di vista agronomico ciò si riflette nella riduzione potenziale della produttività di una coltura.

Tali stress possono essere distinti in stress biotici e abiotici. I primi sono generati da organismi viventi (funghi, batteri, insetti, ecc.) mentre i secondi sono causati da fattori legati ad eccessi o carenze di tipo chimico-fisico delle condizioni ambientali (**Figura 1**). Nonostante entrambe le tipologie di stress determinino modificazioni a livello fisiologico, morfologico, biochimico e molecolare delle piante, limitandone crescita, sviluppo e resa, gli stress abiotici sono oggetto di particolare attenzione da parte della comunità scientifica. Tale interesse deriva, dalla rapidità del cambiamento delle condizioni ambientali e quindi all'aumento delle aree sottoposte a stress abiotici, che rischiano di mettere in discussione le capacità adattative delle piante, soprattutto quelle con cicli riproduttivi lunghi (nel 2007 la FAO ha riportato come solamente il 3,5% della superficie mondiale non è sottoposta a stress di tipo abiotico); in aggiunta fondamentale è il ruolo che gli stress abiotici rivestono nell'agricoltura mondiale, costituendo la maggiore limitazione alla produzione agraria (nel 1982 Boyer individuò nei fattori ambientali la causa di una limitazione della produzione agraria pari al 70%).

Le piante in quanto organismi sessili, incapaci di sfuggire a condizioni ambientali sfavorevoli, hanno sviluppato un'ampia varietà di strategie per adattarsi alle diverse condizioni di stress. Rispondono quindi in modo dinamico e complesso ed il tipo di risposta dipende dal tessuto e dall'organo sottoposto allo stress. Inoltre l'intensità e la durata dello stress (stress acuto o cronico) influenzano notevolmente la complessità della risposta ed il risultato (**Figura 1**).

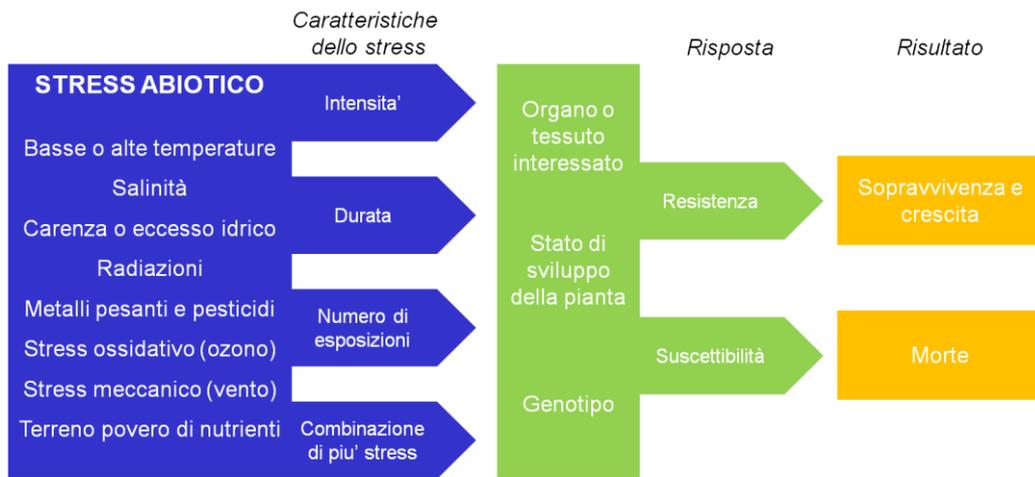


Figura 1. Rappresentazione schematica delle tipologie di stress abiotici a cui le piante possono essere sottoposte, e delle risposte attuate dalla pianta in base alle caratteristiche dello stress, al tipo di organo interessato, allo stato di sviluppo della pianta e al genotipo.

Le cellule hanno evoluto *pathways* di segnalazione per percepire ed integrare differenti segnali provenienti dall'ambiente; lo stress induce quindi una cascata di eventi molecolari e biochimici che si riflette in una modulazione dell'espressione genica. Tale modulazione permette alla cellula il ripristino delle sue normali attività e la preserva da danni irreversibili. Perciò, la capacità di una pianta di indurre in maniera più o meno efficace e rapida modificazioni biochimiche e fisiologiche conferisce alla pianta stessa la proprietà di essere suscettibile o tollerante.

1.2 Stress da metalli pesanti

Alcuni metalli pesanti come rame, zinco, ferro, cobalto, manganese e molibdeno sono essenziali micronutrienti per la pianta in quanto agiscono come cofattori per diversi enzimi e sono coinvolti in vitali reazioni biologiche permettendo il corretto svolgimento delle attività metaboliche. Oltre a questi essenziali elementi vi sono altri metalli pesanti come alluminio, mercurio, cadmio, arsenico e piombo che non sono richiesti per nessuna funzione metabolica, ma che al contrario, sono altamente tossici; anche a basse concentrazioni provocano un declino della fotosintesi, riduzione nel contenuto di clorofilla, inibizione dell'attività enzimatica, senescenza fogliare, produzione

di ROS, danni a cloroplasti e mitocondri e inibizione della crescita di radici e fusto, quindi dell'intera pianta (Miteva e Merakchiyska, 2002; Malec *et al.*, 2008; Islam *et al.*, 2011).

I metalli sottoforma ionica, dal suolo possono essere assorbiti a livello delle cellule radicali mediante le proteine trasportatrici di membrana. Una volta assorbiti a livello radicale, i metalli pesanti vanno ad accumularsi nei tessuti raggiungendo livelli di tossicità, danneggiando la struttura cellulare ed occupando le vie d'accesso ai nutrienti.

Le piante tuttavia come altri organismi hanno evoluto diversi meccanismi per assicurare concentrazioni fisiologiche per quanto riguarda i metalli essenziali e per limitare l'esposizione nei confronti dei metalli non essenziali. Alcuni meccanismi sono ubiquitari, in quanto richiesti per i normali processi di omeostasi cellulare, e vanno a minimizzare i danni provocati da elevate concentrazioni di metalli pesanti tramite detossificazione, conferendo alla pianta tolleranza allo stress da metalli pesanti. Altri meccanismi sono invece specifici per gli ioni metallici come la loro esclusione dall'ambiente intracellulare o la loro compartimentazione. Esistono infatti piante che crescono in terreni contaminati da metalli pesanti che hanno evoluto particolari meccanismi e processi fisiologici per eliminare o accumulare metalli pesanti tossici. Nella strategia di esclusione, i metalli vengono mantenuti nel suolo, attraverso il rilascio da parte delle cellule radicali di essudati in grado di chelare gli ioni metallici, modificando quindi la loro solubilità ed il loro assorbimento; alternativamente possono essere attivati trasportatori di membrana che pompano attivamente gli ioni metallici all'esterno. Nelle piante accumulatrici ed iperaccumulatrici al contrario, i metalli vengono assorbiti e attivamente traslocati nei tessuti vegetali della biomassa epigea della pianta dove vengono compartimentati e trasformati in forme fisiologicamente tollerabili. A quest'ultima categoria di piante fanno parte le piante indicatrici, nelle quali l'assorbimento e la traslocazione del metallo nelle parti aeree della pianta sono regolati in modo che la concentrazione fogliare corrisponda a quella presente nel suolo (McGrath *et al.*, 2002). A differenza delle piante

accumulatrici, le piante tolleranti tendono a ridurre la traslocazione dei metalli pesanti alle parti epigee, mantenendoli a livello di suolo e radici.

La risposta allo stress da metalli pesanti coinvolge una complicata rete a cascata di segnali di trasduzione, attivata dalla percezione dello stress da parte dei recettori di membrana, caratterizzata dalla sintesi e accumulo di secondi messaggeri e che termina con l'attivazione nel nucleo di fattori trascrizionali in grado di regolare l'espressione dei geni in risposta allo stress (*stress-related proteins*). Le principali vie di trasduzione del segnale includono il sistema delle calmoduline, ormoni, ROS, MAPK (mitogen-activated protein kinase) e fosforilazioni. Tuttavia differenti sono i *pathways* attivati in risposta a diversi tipi di metalli pesanti (DalCorso *et al.* 2010; Islam *et al.*, 2015).

1.3 L'arsenico

L'inquinamento da metalli pesanti è oggetto di grande attenzione da parte della comunità scientifica a causa dell'aumentata immissione nell'ambiente di tali composti mediante attività industriali e agricole. L'arsenico (As) in particolare, il più tossico metalloide conosciuto, identificato come cancerogeno, mutageno e teratogeno (Wang e Mulligan, 2008), desta preoccupazione a livello mondiale a causa della sua ampia diffusione come inquinante ambientale. Appartiene al V gruppo della tavola periodica degli elementi ed il numero di massa atomica dei suoi isotopi varia tra 68 e 80, ma solo l'isotopo 75 è stabile. E' quindi un elemento molto reattivo, si combina rapidamente con molti metalli e non metalli, ed in natura può presentarsi sia in forma organica che inorganica ed in quattro stati di ossidazione (-3, 0, +3 e +5).

As è largamente presente nell'ambiente terrestre ed acquatico come conseguenza di attività naturali (processi pedogenetici, vulcanici e di attività biologica) ed antropiche (attività industriali e minerarie, combustione di rifiuti e carbone, attività agricole).

Tale elemento è il ventesimo per abbondanza nella crosta terrestre (da 1,5 a 3 mg kg⁻¹ (Mandal e Suzuki, 2002) essendo il costituente principale in più di 200

minerali. La sua concentrazione varia inoltre in base alla tipologia di roccia: nelle rocce ignee il contenuto di arsenico è relativamente basso, in media $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$; nelle rocce sedimentarie la concentrazione di arsenico è maggiore e varia da un minimo di 4 mg kg^{-1} per le sabbie e le arenarie ad un massimo di 13 mg kg^{-1} per le argille; nelle rocce metamorfiche il contenuto di arsenico varia in funzione della tipologia di roccia (igneo o sedimentaria) da cui derivano.

Nonostante il fatto che la maggior parte di arsenico presente nell'ambiente derivi dalla sua costante mobilitazione ad opera di processi naturali, le attività antropiche hanno contribuito in modo sostanziale all'accumulo di arsenico in suolo, acqua, aria e tessuti biologici. L'uomo infatti utilizzando le risorse naturali di arsenico, lo rilascia nell'ambiente ed in tal modo può poi essere rilevato in tracce anche in piante ed animali.

Le attività industriali, in particolare le industrie ceramiche, le industrie produttrici di componenti elettronici, le industrie cosmetiche, tessili, i colorifici e le vetrerie, introducono arsenico nell'ambiente sotto forma di As_2O_3 (triossido di arsenico) che a temperatura ambiente si presenta come solido bianco e cristallino. La maggior parte del triossido di arsenico viene convertito in acido (H_3AsO_4) il quale forma sali di arsenico, utilizzati anche in agricoltura (American Agency for Toxic substances and Disease Registry, ATSDR 2007). I processi di estrazione e fusione minerale determinano fenomeni di contaminazione di suoli, corsi d'acqua e falde, essendo l'arsenico un componente naturale di diversi minerali, in particolari quelli contenenti piombo, zinco, rame ed oro. Attraverso poi l'attività di combustione del carbone per produrre energia, viene rilasciato arsenico direttamente nell'atmosfera e attraverso il trasporto delle ceneri leggere che si generano, possono essere contaminati anche suoli ed acque superficiali lontani dal sito di produzione; l'entità dell'inquinamento è in funzione della quantità di arsenico presente nel carbone e tale valore varia notevolmente in base all'origine geologica del carbone stesso (Mandal e Suziki, 2002).

Pesticidi a base di arsenico sono stati ampiamente utilizzati in agricoltura fino agli anni 60. Il Paris Green, originariamente impiegato nell'industria tessile, è

stato utilizzato con successo per contrastare la dorifora della patata (Peryea, 1998) dal 1867 al 1900 e nei primi anni del 900 è stato sostituito da arseniati di piombo per la difesa dei frutteti. A partire dagli anni 60, quando è stato riscontrato un legame tra l'esposizione all'arsenico e l'insorgenza di tumori, ed un rischio per la salute la presenza di residui di arsenico presenti nella frutta trattata (Mabuchi *et al.*, 1980; Nelson *et al.*, 1973), la maggior parte dei pesticidi a base di arsenico sono stati ritirati. Tuttavia a causa dell'elevata persistenza nell'ambiente dell'arsenico, si stima che milioni di ettari di terreno siano tutt'ora contaminati con residui di arseniati di piombo (Hughes *et al.*, 2011). A partire dagli anni 50 fino ai nostri giorni, l'arsenico è stato utilizzato come pesticida in agricoltura in forma organica, considerata meno tossica rispetto a quella inorganica per la possibilità di entrare nei meccanismi di detossificazione cellulare (Cohen *et al.*, 2006). L'utilizzo di alcuni di questi composti è stato sospeso dall'EPA (Environmental Protection Agency) per possibile cancerogenicità mentre per altri ne è stato limitato l'utilizzo in determinate condizioni (Hughes *et al.*, 2011).

I livelli di arsenico nel suolo variano notevolmente in base alle regioni geografiche considerate come si può osservare in **Figura 2**. Vengono considerati suoli non contaminati quelli con una concentrazione di arsenico compresa tra 1 e 40 mg kg⁻¹, con i più bassi valori riscontrati in terreni sabbiosi e granitici, ed i più elevati in terreni alluvionali ed organici (Kabata-Pendias e Pendias, 1984).

Nel suolo l'arsenico si presenta principalmente in forma inorganica, eccetto per alcune aree in cui l'arsenico organico è immesso intenzionalmente (Saxe *et al.*, 2006), ed in particolare si trova allo stato trivalente (arsenito, As III) o pentavalente (arseniato, As V). In condizioni ossidanti As V è la forma più stabile e tende ad essere adsorbito sulle superfici di ossidi e idrossidi di metalli (Fe, Al, Mn) e minerali argillosi, mentre in condizioni riducenti As III è la forma predominante. L'arsenico inorganico può essere inoltre metilato da microrganismi (batteri come *Escherichia coli*, *Flavobacterium sp.* e *Methanobacterium sp.* o funghi come *Aspergillus glaucus* e *Candida humicola*)

portando alla formazione in condizioni ossidanti di acido monometilarsinico (MMA), acido dimetilarsinico (DMA) e ossido di trimetilarsina (TMA₂O). La forma chimica dell'arsenico ne determina la disponibilità biologica e quindi il suo effetto fisiologico e tossico: i composti inorganici sono più tossici di quelli organici e As III è molto più tossico, solubile e mobile rispetto a As V.

Country	Types of soil/sediment	Number of samples	Range (mg kg ⁻¹)	Mean (mg kg ⁻¹)
West Bengal, India	Sediments	2235	10–196	
Bangladesh	Sediments	10	9.0–28	22.1
Argentina	All types	20	0.8–22	5
China	All types	4095	0.01–626	11.2
France	All types	–	0.1–5	2
Germany	Berlin region	2	2.5–4.6	3.5
Italy	All types	20	1.8–60	20
Japan	All types	358	0.4–70	11
	Paddy	97	1.2–38.2	9
Mexico	All types	18	2–40	14
South Africa		2	3.2–3.7	3
Switzerland		2	2–2.4	2.2
United States	Various states	52	1.0–20	7.5
	Tiller	1215	1.6–72	7.5

Figura 2. Contenuto di arsenico nel suolo di diversi paesi, tratto da Mandal e Suzuki, 2002.

La contaminazione del suolo è una delle fonti principali di contaminazione da arsenico nelle acque naturali (Le *et al.*, 2000). I livelli di contaminazione da arsenico sono molto ampi e variano da un minimo di 0,5 µg l⁻¹ (acque non contaminate) ad un massimo di 5000 µg l⁻¹ (Smedley e Kinniburgh, 2002). Valori più elevati possono essere riscontrati in acque di falda, in particolare nelle acque geotermiche come in zone della Nuova Zelanda (8.5 mg l⁻¹) e Giappone (1.8–6.4 mg l⁻¹) (Mandal e Suzuki, 2002). Ulteriori aree con elevato inquinamento da arsenico delle falde sono state rilevate in Argentina, Cile, Messico, Cina, Ungheria, India, Bangladesh e Vietnam (Smedley e Kinniburgh, 2002). Anche nelle acque come per il suolo, le forme inorganiche (trivalente e pentavalente) sono predominanti rispetto alle forme organiche che possono essere prodotte in particolar modo nelle acque superficiali per opera dell'attività di batteri e funghi, ma possono anche essere presenti dove l'acqua è

inquinata dall'attività industriale.

La presenza di arsenico nel suolo e nelle acque naturali determina la presenza del metalloide anche nei tessuti vegetali. L'arsenico si accumula nei tessuti vegetali, con una concentrazione variabile tra un minimo di $0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ ad un massimo di $5 \mu\text{g g}^{-1}$ di peso secco. L'arsenico non si distribuisce ugualmente nelle diverse parti della pianta: semi e frutti sono caratterizzati da concentrazioni di arsenico più basse rispetto a foglie, stelo e radici; in particolare nelle radici sono stati riscontrati i valori più elevati di arsenico ed in maggiore misura negli strati esterni rispetto a quelli interni (Peryea, 2001). In letteratura è riportato come suoli con elevate concentrazioni di arsenico portino alla formazione piante con aumentati livelli di tale elemento nei loro tessuti (Williams e Whetstone, 1940); tuttavia tali studi sono stati condotti considerando suoli con una concentrazione di arsenico anche superiore a 500 mg kg^{-1} , mentre la maggior parte dei terreni è caratterizzato da livelli di arsenico inferiore ai 10 mg kg^{-1} (Warren e Alloway, 2003; Warren *et al.*, 2003). Solamente terreni con concentrazioni di arsenico di $200\text{-}300 \text{ mg kg}^{-1}$ portano ad una concentrazione pari ad 1 mg kg^{-1} di arsenico nei tessuti vegetali (Matschullat, 2000).

Con le stesse concentrazioni di arsenico nel suolo, piante cresciute in terreni sabbiosi accumulano più arsenico rispetto a piante cresciute in terreni argillosi. Aumentando quindi la percentuale di sostanza organica nel terreno, mediante l'apporto di compost o limo, il suolo tende ad immobilizzare l'arsenico riducendo l'assorbimento dell'elemento tossico da parte della pianta (Moon *et al.*, 2004). Al contrario l'apporto di ammendanti fosfatici in terreni ricchi in arsenico determina un' aumento dell'assorbimento dell'arsenico da parte della pianta (Peryea, 2001) probabilmente a causa della similarità chimica dei due elementi.

Il ciclo dell'arsenico nell'ambiente fa sì che tutti gli organismi siano continuamente esposti a questo elemento (**Figura 3**); essendo l'arsenico presente in tutti gli organismi viventi, da *Escherichia coli* all'uomo, ogni organismo ha sviluppato vie metaboliche di detossificazione (Jones, 2007).

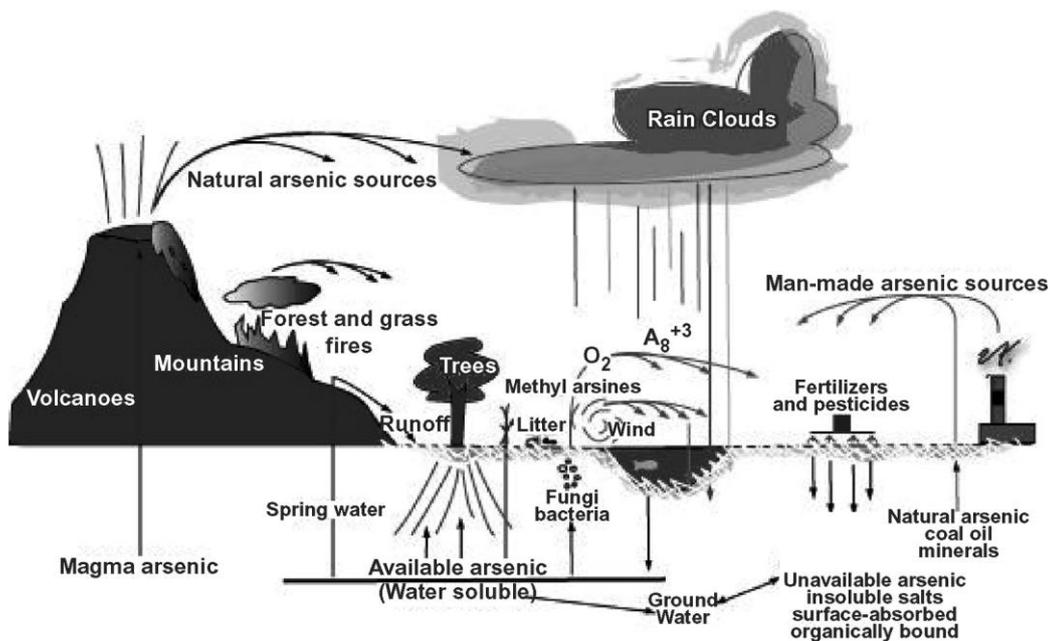


Figura 3. Ciclo dell'arsenico nell'ambiente, tratto da Jones 2007

1.3.1 Vie di trasporto dell'arsenico nella pianta

L'arseniato è la specie dominante dell'arsenico in condizioni aerobiche e che viene assorbita in maggior misura. L'assorbimento a livello radicale di As^V ed il suo trasporto attraverso la membrana plasmatica avviene utilizzando i sistemi di trasporto del fosfato, data la similarità chimica dei due elementi. Nel citoplasma As^V raramente raggiunge concentrazioni talmente elevate da provocare tossicità in quanto viene ridotto in As^{III} per opera di enzimi specifici (ACR). La maggior parte dell'arsenico viene immobilizzato nel terreno come As^{III} o rimane a livello radicale in forma chelata e compartimentato nei vacuoli. Solo una piccolissima frazione di arsenico viene traslocata nel fusto come dimetil-arsenico tramite il flusso xilematico e una volta raggiunto il fusto, l'arsenico legato in complessi stabili viene immagazzinato (Smith *et al.*, 2010).

La conoscenza dell'interazione tra arsenico e fosforo è molto importante per capire i meccanismi del loro trasporto e accumulo nelle piante. Alla famiglia dei trasportatori di membrana del fosforo (Pht 1) fanno parte più di 100 proteine trasportatrici, la maggior parte delle quali sono espresse a livello radicale e sono responsabili dell'assorbimento di P dal medium esterno. Arsenico e

fosforo sono analoghi: hanno simili configurazioni elettroniche e proprietà chimiche e sono membri dello stesso gruppo della tavola periodica, il gruppo 15 o dell'azoto contenente As, P, N, Sb e Bi. As e P competono per gli stessi recettori posti sulla membrana plasmatica radicale e nel suolo competono per i siti di assorbimento, con una conseguente maggior concentrazione in soluzione. Entrambi infatti nel suolo si trovano allo stato di ossidazione 5⁺; tuttavia il fosforo è stabile in un più ampio *range* di condizioni pH del suolo.

As V e As III vengono assorbiti nelle cellule seguendo diversi meccanismi: al contrario di As V, l'assorbimento di As III non coinvolge il sistema di trasporto del fosforo; Quaghebeur e Rengel (2004) hanno riportato come in *Saccaromices cerevisiae* As III venga assorbito mediante il canale di trasporto del glicerolo. Nelle radici di *Oryza sativa* è stato osservato come As III venga assorbito seguendo una precisa cinetica dose-dipendente (Meharg e Jardine, 2003). Dato che la stessa cinetica è stata osservata anche in *S. cerevisiae*, ci sono evidenze per cui anche in riso As III possa essere assorbito utilizzando le acquaporine, i canali di trasporto del glicerolo (Garg e Singla, 2011).

1.3.2 Effetti fisiologici da tossicità da arsenico nella pianta

L'arsenico se non detossificato dalla pianta può attivare una catena di eventi in grado di interrompere la fotosintesi e la respirazione con conseguente inibizione della crescita della pianta, disordini del metabolismo e morte. In **Figura 4** sono riportati i principali effetti di fitotossicità dell'arsenico.

1.3.2.1 Inibizione della crescita

Terreni contaminati da arsenico provocano l'alterazione della normale crescita della pianta; in particolare si verifica riduzione del numero di foglie e dell'apparato radicale, perdita di biomassa fresca e secca, alterazioni morfologiche e perdita in termini di resa e di produzione di frutti, portando la pianta alla morte in condizione di elevate concentrazione di As. Uno studio effettuato su sei varietà di frumento tenero sottoposte a concentrazioni crescenti di As III e As V ha riportato una significativa riduzione della biomassa

radicale, del tasso di germinazione e della resa in granella delle varietà considerate; lo stesso esperimento è stato effettuato apportando fosforo al terreno, evidenziando una riduzione moderata dei parametri sopra citati (Liu *et al.*, 2005). Anche Pigna *et al.* (2009) ha riscontrato una riduzione della biomassa in piante irrigate con concentrazioni elevate di arsenico e tale riduzione è risultata meno marcata in presenza di fosforo nell'acqua di irrigazione.



Figura 4. Principali effetti di fitotossicità indotti da esposizione ad elevate concentrazioni di arsenico

1.3.2.2 Alterazione del sistema fotosintetico

Necrosi e clorosi fogliare sono sintomi riscontrati in piante sottoposte a stress da arsenico. Nel citoplasma l'arseniato compete con il fosfato inibendo i processi metabolici in cui il fosfato è coinvolto come la fosforilazione ossidativa e la produzione di ATP, diventando tossico per la pianta per l'interruzione del flusso energetico nella cellula. L'arsenico danneggia le membrane dei cloroplasti (Stoeva *et al.* 2005a) e altera le funzioni del sistema fotosintetico.

Provoca una inibizione della sintesi di pigmenti fotosintetici e riduce il tasso di fissazione della CO₂ e la funzionalità del fotosistema II (Stoeva e Bineva 2003).

1.3.2.3 Alterazione dell'integrità di membrana

Le membrane cellulari sono target vulnerabili negli stress da arsenico; elevate concentrazioni di arsenico determinano nella pianta alterazioni metaboliche ed in particolare uno squilibrato assorbimento di nutrienti e acqua nelle cellule vegetali ed un limitata conduttanza stomatica.

As compete con i principali micro e macronutrienti compromettendo l'assorbimento di essenziali nutrienti per la pianta. Diversi autori hanno valutato gli effetti fisiologici e mineralogici in specie vegetali sottoposte a crescenti concentrazioni di arsenico. Shaibur *et al.* (2008) riporta come in sorgo (*Sorghum bicolor* L. cv. Fast sorghum) allevato in coltura idroponica, ad elevate concentrazioni di arsenico sono stati riscontrati effetti di tossicità derivanti da una mancata traslocazione di micronutrienti minerali, con particolare riferimento alla carenza di Fe. Vazquez *et al.* (2008) mostra come in *Lupinus albus* L., leguminosa resistente all' arsenico, sottoposto a 34 giorni di esposizione ad una dose di arsenico media (10 µM) ed elevata (100 µM), si evidenziano sintomi di tossicità dovuti a carenza di N, P e Cu solamente a dosi elevate di arsenico. Mentre alla concentrazione media, paragonabile a quella presente in terreni contaminati, non sono state riscontrate particolari alterazioni nella pianta.

Lo squilibrio nell'assorbimento e nel trasporto di acqua genera effetti negativi nel processo traspirativo: Stoeva e Bineva, (2003), riportano come l'intensità di traspirazione in piante di avena (*Avena sativa* L. cv Hanza 152) sottoposte a dosi crescenti di arsenico diminuisca fino al 20% rispetto alle piante di controllo.

1.3.2.4 Produzione di specie reattive dell'ossigeno e perossidazione lipidica

Nonostante l'arsenico non sia un metallo redox una comune conseguenza dell'esposizione di una pianta all'arsenico inorganico è l'incremento della

produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). E' stato dimostrato infatti che le forme arsenicali inorganiche sono più tossiche di quelle organiche proprio in relazione alla formazione di ROS (Hartely-Whitaker *et al.*, 2001). L'induzione di ROS è anche una caratteristica del triossido di arsenico (As_2O_3), composto per il quale è stato proposto un impiego terapeutico nell'uomo come agente antitumorale: As_2O_3 , attraverso la produzione di ROS, induce morte cellulare programmata (Murphy *et al.*, 2003). Le specie reattive dell'ossigeno quali l'anione superossido O_2^- , il radicale ossidrilico $\cdot HO$ e il perossido di idrogeno H_2O_2 sono agenti altamente ossidanti: possono danneggiare direttamente proteine, aminoacidi e acidi nucleici e causare perossidazione delle membrane lipidiche (Dat *et al.*, 2000). Le piante durante il loro normale metabolismo hanno una produzione basale di ROS derivanti dal trasporto di elettroni nel cloroplasto, mitocondrio e perossisoma. Nonostante i ROS in passato fossero considerati solamente dannosi per le cellule, ora è riconosciuto che la regolazione redox che coinvolge i prodotti dello stress ossidativo è anche un fattore importante di modulazione delle attività cellulari: trasmissione di elettroni nei percorsi di segnalazione degli stimoli e nella catena di trasporto degli elettroni durante la fotosintesi. Per assicurare il mantenimento dei livelli basali di ROS, le piante hanno evoluto un sistema antiossidante. Tuttavia questo equilibrio viene alterato da condizioni di stress: significative evidenze dimostrano come i livelli di ROS nei tessuti vegetali aumentino in condizioni di stress quali l'esposizione delle piante all'arsenico (Garg e Singla, 2011), portando ad un accumulo di perossido di idrogeno. In condizioni di stress l'accumulo di ROS è tale che supera la capacità della pianta di rimuoverli mediante il sistema antiossidante, determinando perciò l'insorgere del danno ossidativo.

In particolare la perossidazione lipidica è uno delle più importanti cause del deterioramento cellulare: essa genera variazioni della composizione degli acidi grassi, che influenzano la struttura e la fluidità delle membrane cellulari, l'inattivazione delle proteine legate alle membrane e la permeabilità delle stesse. Tale danno alla membrana può in ultimo influire negativamente

sull'attività respiratoria dei mitocondri, danneggiare i pigmenti fotosintetici e causare perdite della capacità carbonio-fissatrice nei cloroplasti.

1.3.3 Strategie di tolleranza dello stress da arsenico

La tolleranza delle piante a stress da metalli pesanti è definita come l'abilità della pianta stessa di sopravvivere a livelli di contaminazione tossici per altre piante e risulta dall'interazione tra genotipo ed ambiente (Macnair *et al.* 2000). In risposta allo stress da arsenico le piante hanno adottato complessi sistemi biochimici e strategie di difesa.

1.3.3.1 Sistemi antiossidanti

Le piante hanno evoluto sistemi antiossidanti per proteggersi dal danno ossidativo provocato dai ROS la cui produzione aumenta in condizione di stress. Tali sistemi sono composti da *scavenger* enzimatici quali superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT), ascorbato perossidasi (APox), glutatione perossidasi (GPox) e glutatione reduttasi (GT) e da antiossidanti ad azione non enzimatica come ascorbato, tocoferoli, flavonoidi, carotenoidi e glutatione, in grado di interagire con le molecole ossidanti o i prodotti dell'ossidazione e ripristinare il corretto stato redox.

La SOD fornisce protezione immediata alla cellula, è infatti il primo enzima che viene utilizzato nella cellula nella detossificazione dai ROS, catalizzando la reazione di dismutazione dello ione superossido e del perossido di idrogeno. Sono stati registrati elevati livelli di SOD nei cloroplasti durante le prime fasi di stress e la regolazione della sua attività è modulata da livelli crescenti di O_2^- .

Gli enzimi della classe delle CAT sono comunemente localizzati nei perossisomi nei quali sono coinvolti nel catalizzare la conversione del perossido di idrogeno in acqua e ossigeno molecolare.

APox e GPox, enzimi principalmente localizzati nelle membrane degli organelli, nel citoplasma e nell'apoplasto delle cellule vegetali, detossificano il perossido di idrogeno per riduzione ad acqua. APox catalizza tale reazione mediante il trasferimento di protoni da una molecola di acido ascorbico, mentre GPox

utilizza la forma ridotta del glutatione come donatore di elettroni.

L'enzima GR anche se non è direttamente coinvolto nella detossificazione dei ROS è un componente fondamentale per il funzionamento dei sistemi antiossidanti delle piante. Catalizza infatti la riduzione del glutatione dalla sua forma ossidata a quella ridotta mediante trasferimento di protoni dal NAD(P)H. L' α -tocoferolo è un antiossidante liposolubile appartenente alla classe delle vitamine E ed è coinvolto nella protezione delle membrane cellulari dagli effetti dei ROS. I flavonoidi, un'importante classe di polifenoli che svolge molteplici funzioni nella pianta, risultano essere co-fattori per l'azione enzimatica e l'attività antiossidante; la loro biosintesi viene stimolata in presenza di stress. Anche i carotenoidi sono molecole importanti nella difesa della pianta, in quanto agiscono come regolatori negativi (*quencer*) dello stress ossidativo; sono in grado inoltre di interagire sinergicamente con gli altri antiossidanti potenziando così la protezione della pianta.

1.3.3.2 Sintesi di fitochelatine

Uno dei meccanismi che conferisce alla pianta maggiore tolleranza all'arsenico consiste nel processo di detossificazione che coinvolge la produzione di fitochelatine (PC), peptidi contenenti gruppi tiolo (-SH) in grado di chelare l'arsenico formando complessi stabili, data l'elevata affinità di As III per i gruppi sulfidrilici. La tossicità di As III è infatti causata dal suo legame con gruppi -SH delle proteine, andando ad alterare la loro funzionalità.

As V nelle cellule viene generalmente prontamente ridotto in As III in reazioni catalizzate da arseniato reductasi. Nei lieviti è stato osservato come l'As III prodotto venga complessato con fitochelatine per annullare il suo effetto tossico e in questa forma (As-SH), trasportato all'interno dei vacuoli mediante specifici trasportatori di membrana. È possibile supporre che anche nelle piante superiori esista un simile meccanismo di resistenza all'arsenico (Tong *et al.*, 2004).

1.3.3.3 Iperaccumulo

L'iperaccumulo è un meccanismo evoluto da un ridotto numero di specie vegetali; in particolare sono conosciute 12 piante iperaccumulatrici, tutte provenienti dalla famiglia delle *Pteridaceae* e per la maggior parte appartengono al genere *Pteris*. Il sequestro vacuolare di As III è la strategia detossificante chiave utilizzata. Il meccanismo dell'iperaccumulo presenta le seguenti caratteristiche: un potenziato assorbimento di As V, una diminuzione nella formazione di complessi As-SH, un minimo efflusso di As III dalle radici al medium esterno, una potenziata traslocazione xilematica di As III con successiva compartimentazione vacuolare nella foglia (Zhao *et al.*, 2009).

1.3.3.4 Funghi micorrizici arbuscolari

Numerosi studi dimostrano come la simbiosi della pianta con funghi micorrizici arbuscolari (AMF) determini un effetto protettivo nella pianta ospite in condizioni di stress da arsenico (Garg e Singla, 2011). Tale effetto può essere prodotto da diversi meccanismi. La colonizzazione micorrizica può sopprimere l'elevata affinità dell'arsenico per i trasportatori di membrana del fosforo localizzati a livello radicale. Un'altra strategia consiste nella promozione della resistenza all'arsenico nella pianta ospite da parte di AMF mediante l'espulsione nel medium esterno dell'arsenico assorbito; gli AMF promuovono inoltre l'assorbimento di fosforo, in modo tale che il contenuto di fosforo citoplasmatico risulti elevato con una conseguente diluizione del contenuto di arsenico (le piante micorrizzate sono spesso caratterizzate da un elevato rapporto P/As). Infine è possibile che gli AMF determinino una limitazione della traslocazione via xilema dell'arsenico, tuttavia tale meccanismo non è stato ad oggi ancora chiarito (Zhao *et al.*, 2009)

1.3.4 Vie di trasduzione del segnale in risposta alla percezione di stress da arsenico

L'attivazione di specifiche proteine nella percezione del segnale innesca una serie di eventi che, come una vera e propria cascata, promuovono altri

messaggeri secondari fino a giungere al nucleo dove si attiva la trascrizione di geni specifici in grado di operare modificazioni a livello fisiologico e nei processi molecolari e cellulari. L'abilità di una pianta nel tollerare stress ambientali, dipende perciò dalla sua capacità di riconoscere prontamente i segnali di stress e di tradurli in adeguate risposte.

Nelle piante le conoscenze in merito ai meccanismi di percezione di uno stress e la natura dei sensori primari non sono ancora ben definite; tuttavia è noto come la maggior parte dei segnali siano inizialmente percepiti da recettori trans-membrana. Al contrario numerosi sono i geni ormai descritti come codificanti per fattori coinvolti nelle fasi successive della trasduzione del segnale di stress e molteplici secondi messaggeri di diversa natura chimica sono stati identificati.

1.3.4.1 Proteine chinasiche

La capacità della pianta di percepire uno stress è affidata per la maggior parte ad un'ampia gamma di recettori le *plant protein serine-threonine kinase*, che funzionano mediante l'attivazione di un dominio protein-chinasico intrinseco. Tali recettori possono essere localizzati sia all'esterno come parte della membrana plasmatica, che all'interno come proteine solubili. I recettori chinasicci vegetali sono i RLKs (*Receptor-Like Kinase*) e appartengono alla famiglia delle *plant protein serine-threonine kinase*. A livello strutturale attraversano una sola volta il doppio strato fosfolipidico della membrana plasmatica e sono costituiti da tre regioni: un sito di legame amminico nella parte extra-cellulare, un dominio transmembrana ed un dominio citoplasmatico carbossi-terminale altamente conservato dotato di attività chinasicca. Possono essere suddivisi in varie sotto-classi in base alla tipo di residuo N-terminale, ma sole le sottoclassi RLCK (*Receptor-Like Cytoplasmic Kinase*), CRK (*CT10 REgulator of Kinase*) e WAK (*Wall-Associated Kinase*) sono coinvolte nel meccanismo di difesa e tolleranza da arsenico (Islam *et al.*, 2015). L'attivazione di RLK avviene a seguito del legame di un ligando nel sito extra-cellulare; tale legame porta alla fosforilazione dei residui di serina-treonina del

dominio intra-cellulare generando così un complesso attivo per la trasduzione del segnale dall'esterno della cellula, al suo interno. Tale fosforilazione può avvenire sia mediante un meccanismo intramolecolare che intermolecolare; ovvero le RLKs sono in grado sia di auto-fosforilarsi che di trasferire gruppi fosfato a proteine adiacenti. È stato osservato come, a seguito di uno stress da arsenico in riso, 15 differenti RLKs vengano sovraespressi, modulando così il trasferimento del segnale (Huang *et al.*, 2012). Tuttavia nonostante l'importanza svolta dai geni RLKs negli stress abiotici sia riconosciuta, sia nelle monocotiledoni che nelle dicotiledoni, il meccanismo che regola la loro espressione non è ancora stato chiarito (Wu *et al.*, 2014).

Un ruolo prioritario nella trasduzione del segnale è svolto dall'attivazione delle proteine chinasiche ed in particolare è stato osservato che in diverse condizioni di stress abiotico, cascate di proteine *Mitogen Activated Protein Kinasi* (MAPK) vengono attivate. Esse costituiscono uno dei meccanismi di trasduzione del segnale maggiormente conservato, osservato anche negli stress da metalli pesanti (Jonak *et al.*, 2004). Il sistema di trasferimento del segnale delle MAP chinasi è costituito da tre componenti che vengono attivate in modo sequenziale per convertire uno stimolo in risposta: una MAP chinasi chinasi chinasi (MAPKKK) fosforila una MAP chinasi chinasi (MAPKK) che a sua volta fosforila una MAP chinasi (MAPK). Il sistema di attivazione delle MAP chinasi consiste in una doppia fosforilazione a livello dei residui di treonina e tirosina; mentre la loro defosforilazione riporta l'attività chinasicca ad uno stato basale, conferendo al sistema una modalità di trasduzione transiente. La cascata di segnali MAPK così prodotta è infine coinvolta nell'attivazione di fattori di trascrizione, enzimi o proteine citoplasmatici o nucleici.

L'attivazione delle MAPK in stress da metalli pesanti avviene per opera di NADPH ossidasi, ROS o altre MAPK. Dato che lo stress da arsenico porta alla formazione di ROS, tali specie sono responsabili della cascata del segnale MAPK in piante sottoposte a stress da tale metallo. Huang *et al.*, 2012 riporta come l'esposizione di piante di riso a concentrazioni crescenti di arsenico determini

un aumento proporzionale della produzione di MAPK a livello radicale, osservabile già dopo pochi minuti di esposizione.

1.3.4.2 Accumulo di ioni Ca^{2+}

Un altro evento noto nel *pathway* di segnalazione di stress abiotici, tra cui quello da metalli pesanti, è l'aumento della concentrazione di calcio intracellulare. Il calcio funge da secondo messaggero ed il suo aumento porta alla attivazione di altri effettori come le calmoduline (CaM), proteine chinasi dipendenti da calcio (CDPK) e fosfatasi regolate da calcio.

È stato osservato come Ca^{2+} operi nel meccanismo di detossificazione e accumulo di arsenico in piante sottoposto a stress da questo metallo pesante. Huang *et al.* (2012) riporta come a seguito dell'esposizione ad AsV, è stato riscontrato un incremento di ROS e Ca^{2+} in cellule radicali di riso. Inoltre tale stress ha indotto la sovraespressione di diversi geni tra i quali 7 geni CaM, e 4 geni CDPK.

1.3.4.3 Cambiamento delle condizioni redox

La produzione di ROS, incrementata dalla presenza di arsenico nel suolo e nell'acqua, determina una variazione dello stato redox delle cellule. Tuttavia, nonostante la pericolosità dei ROS per le funzioni cellulari, essi agiscono come secondi messaggeri partecipando ad una varietà di processi biologici come la trasduzione del segnale e la regolazione dell'espressione genica. Le cellule hanno quindi adottato sistemi di difesa, i sistemi antiossidanti, per contenere i livelli di tali molecole, senza eliminarle completamente. I ROS possono agire come sensori in grado di attivare la cascata del segnale oppure possono ossidare direttamente i componenti del *pathway* di segnalazione. Tra i ROS, il perossido di idrogeno riveste un ruolo centrale come molecola segnale avendo una vita relativamente lunga ed essendo in grado di attraversare le membrane cellulari. H_2O_2 è coinvolto infatti nell'attivazione di diverse chinasi MAP ed è responsabile della sovraespressione di diversi geni coinvolti in *pathway* di segnalazione (Islam *et al.*, 2015). In particolare come risposta allo stress da

arsenico è stato osservato come i ROS determinino l'attivazione di specifici fattori di trascrizione (acido jasmonico, MYB e TDT), sottolineando come lo stress ossidativo svolga un importante ruolo nello stimolare vie di trasduzione del segnale (Islam *et al.*, 2015).

1.3.4.4 Ossido nitrico

Nonostante l'ossido nitrico (NO) sia stato considerato fino agli anni Novanta, come un inquinante ambientale ed un inibitore della crescita delle piante, nell'ultimo decennio ha assunto un ruolo importante nello studio della biologia vegetale per le importanti funzioni svolte come la stimolazione della germinazione, la regolazione del metabolismo vegetale, la regolazione dei movimenti stomatici, della fotosintesi e della funzionalità mitocondriale. In aggiunta negli ultimi è stata dimostrata la capacità di NO di agire come molecola segnale nella tolleranza delle piante sottoposte a stress abiotici. (Siddiqui *et al.*, 2011). Numerosi studi riconoscono il ruolo di NO nei *pathway* di segnalazione di stress da arsenico. NO infatti svolge un'azione citoprotettiva sia regolando i livelli e la tossicità di ROS attivando gli enzimi antiossidanti coinvolti nella detossificazione da ROS, sia inducendo cambiamenti trascrizionali (Islam *et al.*, 2015). A conferma di quanto esposto, in uno studio condotto da Jin *et al.* (2010) piante sottoposte a stress da arsenico ed addizionate di NO esogeno, hanno mostrato una riduzione dei livelli di ROS, un contemporaneo potenziamento del sistema antiossidante ed una riduzione della perossidazione lipidica e del danneggiamento delle membrane cellulari.

1.3.4.5 Ormoni

Gli ormoni vegetali svolgono un' importante funzione nella regolazione della crescita e sviluppo delle piante ed evidenze scientifiche mostrano come siano anche coinvolti nella risposta allo stress da metalli pesanti e nello specifico, da arsenico. I fitormoni principalmente interessati sono l'acido jasmonico (JA), l'etilene (ET) e l'acido abscissico (ABA). È stato infatti osservato come lo stress da arsenico determini una sovraespressione di diversi geni codificanti JA (Yu *et*

al., 2012) e una evidente sovraespressione delle *zinc-finger protein*, che rivestono un ruolo prioritario nella via di segnalazione di JA (Huang *et al.*, 2012). La sovraespressione di JA promuove conseguentemente la regolazione di altri geni coinvolti nella segnalazione e risposta allo stress, come i geni MAPK.

Nello studio condotto da Huang *et al.*, 2012 in riso sottoposto a stress da arsenico, è stata rilevata una modificazione nella regolazione dei geni codificanti per ormoni vegetali; in particolare 6 geni ABA, 5 geni ET e 11 geni JA coinvolti nella biosintesi e nella segnalazione di tali ormoni sono risultati essere sovraespressi. Tale risposta suggerisce quindi un coinvolgimento di ABA, ET e JA nel *pathway* di segnalazione ormonale, influenzando l'accrescimento e lo sviluppo di piante sottoposte a stress da arsenico.

1.3.5 Regolazione ed estinzione del segnale

La regolazione del segnale, così come la sua estinzione, avviene, quando richiesta, mediante la defosforilazione delle molecole segnale attivate. Tale attività è operata da fosfatasi proteiche le quali catalizzano la rimozione dei gruppi fosfato. Lo studio condotto da Huang *et al.* (2012) ha individuato in riso la presenza di 121 geni codificanti per fosfatasi proteiche, dei quali 11 vengono regolati in seguito a stress da arsenico.

1.4 Agricoltura e sostenibilità

Il modello agroalimentare industriale degli ultimi cinquant'anni, oltre ad avere contribuito ad arricchire l'Europa, è stato allo stesso tempo causa di inquinamento delle acque, dell'aria e dei suoli, in un modo in parte irreversibile, con conseguenze che si riflettono sulla salute pubblica, sulla fertilità dei suoli e sulla prosperità delle campagne. Tale arricchimento è stato reso possibile dallo sfruttamento indiscriminato delle risorse naturali, come i suoli e le fonti idriche, alle quali non veniva attribuito valore e che al contempo erano considerate inesauribili. Lo stato in cui si trovano le risorse naturali, oggi invece considerate indispensabili alla vita e nei cui confronti è necessaria una

tutela particolare, desta molta preoccupazione e costituirà un fattore di criticità nei decenni a venire.

Una priorità è costituita dallo stato dei suoli. Le terre destinate all'agricoltura stanno infatti diminuendo sia per quantità, a favore della cementificazione, sia per qualità a causa dello sfruttamento insostenibile, dal cambiamento climatico, dall'inquinamento e dalla contaminazione. Un terreno fertile è un bene che si sviluppa in migliaia di anni; da qui si comprende come una delle principali sfide per l'agricoltura sia quella di contrastare la perdita della fertilità e il rischio di desertificazione dei suoli, in particolare quelli nella fascia climatica del Mediterraneo. Elemento chiave in tale contesto è stato il graduale processo di erosione della sostanza organica, conseguente a decenni di agricoltura intensiva che non si è dimostrata attenta nel mantenimento e ricostituzione delle riserve di humus del terreno, ma che al contrario ha contribuito nell'accumulare sostanze chimiche di sintesi derivanti da un eccessivo impiego di diserbanti, concimi e antiparassitari. Il suolo in buone condizioni inoltre non è importante solamente per la produzione agroalimentare, ma svolge un ruolo fondamentale nella riduzione dei rischi di alluvione e proteggendo le fonti idriche di profondità neutralizzando o filtrando eventuali inquinanti e immagazzinando fino a 3750 tonnellate di acqua per ettaro.

L'agricoltura quindi costituisce uno dei fattori determinanti del cambiamento climatico ed è uno degli aspetti su cui il cambiamento climatico inciderà di più con fenomeni quali l'aumento delle temperature, la siccità, alluvioni e lo spostamento delle zone fertili verso i poli, sottoponendo una superficie agricola sempre maggiore a stress di natura abiotica.

In tale contesto si inserisce quindi il senso della nuova Politica Agricola Comune (PAC) ovvero, in una UE allargata a 28 Stati Membri, rispondere alle nuove sfide dell'agricoltura: salvaguardia dell'ambiente, sicurezza alimentare, innovazione e competitività sui mercati mondiali. Il 20 novembre 2013, dopo due anni di trattative, il Parlamento Europeo ha quindi approvato in via definitiva i Regolamenti della nuova PAC, in vigore per il settennio 2014-2020. Nonostante le linee guida comuni a tutti, ad ognuno degli Stati Membri viene lasciata ampia

discrezionalità per adattare la PAC alle condizioni specifiche di ogni territorio; tale flessibilità viene adottata anche a livello nazionale: ogni Regione può elaborare strategie proprie e Programmi di Sviluppo Rurale (PSR) per adattare la politica comunitaria alle caratteristiche ed esigenze specifiche di ogni regione.

Tra le novità della nuova PAC troviamo diverse azioni ed incentivi attuati sia tramite gli "aiuti diretti" (I pilastro) che mediante lo "sviluppo rurale" (II pilastro), volti ad una gestione sostenibile in agricoltura e alla tutela delle risorse naturali come risposta all'emergenza del cambiamento climatico.

In questo contesto la diffusione di sistemi agricoli a basso impatto ambientale ed in particolare dell'agricoltura biologica, sembrano rappresentare una importante risorsa. Per definire questo modello produttivo si può citare l'IFOAM, la Federazione Internazionale dei Movimenti per l'Agricoltura Biologica (International Federation of Organic Agriculture Movements), che per agricoltura biologica intende: "Tutti i sistemi agricoli che promuovono la produzione di alimenti e fibre in modo sano socialmente, economicamente e dal punto di vista ambientale. Questi sistemi hanno come base della capacità produttiva la fertilità intrinseca del suolo e, nel rispetto della natura delle piante degli animali e del paesaggio, ottimizzano tutti questi fattori interdipendenti. L'agricoltura biologica riduce drasticamente l'impiego di input esterni attraverso l'esclusione di fertilizzanti, pesticidi e medicinali chimici di sintesi. Al contrario, utilizza la forza delle leggi naturali per aumentare le rese e la resistenza alle malattie". Quindi la declinazione dell'agricoltura in "biologico" non rappresenta solo il tentativo di restituire una maggiore salubrità ai prodotti della terra, ma di fare sì che la stessa terra possa continuare a rigenerarsi per essere ospite delle coltivazioni il più a lungo possibile e non a scapito delle generazioni future.

1.4.1 I preparati ultra-diluiti (PUD)

Nell'ottica della tutela delle risorse naturali e nell'ambito dei sistemi agricoli a basso impatto ambientale, nei quali non è possibile utilizzare prodotti chimici

di sintesi per la difesa della pianta, risulta di particolare interesse il possibile impiego di preparati ultra-diluiti (PUD). Essi, per la tipologia della loro preparazione, non presentano molecole della sostanza di origine dai quali vengono ottenuti, evitando quindi problemi di tossicità e di accumulo. Per la preparazione dei PUD si parte da *Tinture Madri (TM)*, vale a dire da soluzioni caratterizzate dall'aver massima concentrazione del principio attivo. Le tinture madri sono soluzioni idroalcoliche di diversi principi attivi di svariata origine (animale, vegetale, minerale o chimica) ottenute mediante la procedura di estrazione con solvente, quale alcool etilico, e aggiunta di acqua in varie percentuali. Se il materiale di partenza è insolubile si procede a polverizzazione e triturazione con lattosio ed in seguito si porta in soluzione idroalcolica. La TM viene successivamente sottoposta a diluizioni seriali intercalate da dinamizzazione, mediante succussione, dove per succussione si intende una violenta agitazione in senso verticale a cui viene sottoposta la soluzione allo scopo di dinamizzarla e viene eseguita mediante l'impiego di un opportuno apparato meccanico. Le diluizioni maggiormente utilizzate sono quelle decimali (1:10) e quelle centesimali (1:100) rispettivamente indicate con la lettera x o con la lettera c. Come diluente, generalmente viene utilizzato acqua, etanolo o una miscela idro-alcolica. L'efficacia di questi preparati è ancora oggi controversa, soprattutto se vengono considerate diluizioni elevate, ed in particolare a partire dalla 24x o dalla 12c. Infatti le leggi della chimica provano che a tali diluizioni il prodotto finale è così diluito da non contenere più neppure una molecola della sostanza di partenza (Garlaschelli, 1999), rendendo impossibile di conseguenza la realizzazione dell'interazione molecola/recettore alla base della segnalazione cellulare. Tuttavia negli ultimi anni sono state pubblicate ricerche che provano l'attività dei PUD in sistemi *in vitro* e *in vivo* (Witt *et al.*, 2007; Endler *et al.*, 2010). Benché il meccanismo di azione non sia ancora stato del tutto chiarito, le conoscenze su questo argomento vanno rapidamente consolidandosi con notevoli implicazioni in diversi settori tra cui le scienze agrarie ed ambientali. Il meccanismo più accreditato per spiegare gli effetti osservati a seguito dell'applicazione di PUD è correlato

all'organizzazione molecolare dell'acqua che si verifica con la procedura di preparazione dei PUD. In particolare il processo di dinamizzazione porterebbe ad alterazioni fisico-chimiche nelle soluzioni ultra diluite (Yinnon e Elia, 2013); diversi sono stati i parametri studiati: conducibilità elettrica, calore di mescolamento con soluzioni acide o basiche e pH. Secondo questa teoria, diluizione e dinamizzazione portano ad una variazione della struttura sopra-molecolare del solvente acqua, attraverso la formazione di strutture dissipative. L'acqua è infatti un liquido complesso, capace di auto-organizzarsi a seguito di perturbazioni meccaniche e/o elettromagnetiche anche di lieve entità, attraverso la formazione di nano-strutture acquose. In fase liquida queste strutture sarebbero capaci di mantenersi in uno stato lontano dall'equilibrio mediante la dissipazione di energia radiante prelevata dall'ambiente, mentre in fase solida (eliminazione dell'acqua tramite evaporazione) manterrebbero indefinitamente le loro proprietà di dissipazione. Le nano-strutture sarebbero in grado di interagire per risonanza con sistemi di regolazione biofisici operanti nell'organismo (Bellavite, 2014) trasmettendo in tal modo l' "informazione" della sostanza di origine.

1.4.2 PUD e piante

La ricerca scientifica sull'applicazione dei PUD in campo vegetale ha origine nel 1923 con i lavori pionieristici di Lili Kolisko. In questo lasso di tempo le ricerche condotte in tale campo possono essere suddivise in due gruppi: lo studio degli effetti dei PUD sulla germinazione/crescita di diverse colture (sane o stressate con stress abiotici) e lo studio dell'applicabilità dei PUD nel controllo delle fitopatia (piante artificialmente infettate). Nonostante l'ampia letteratura esistente, emerge un quadro critico considerando la valenza scientifica di tali elaborati. Nella *review* di Betti *et al.* (2009) sono state prese in considerazione le pubblicazioni dal 1969 al 2009 riguardanti esperimenti di efficacia dei PUD *in vitro*, *in planta* ed in pieno campo; tali pubblicazioni sono state revisionate utilizzando la metodologia proposta da Majeovsky *et al.* (2009) che include parametri quali la statistica, il MIS (*Manuscript Information Score*) e lo SMEP

(*Study Methods Evaluation Procedure*). Su un totale di 44 pubblicazioni su studi fitopatologici e modelli *in vitro*, 25 sono state escluse per mancanza di analisi statistica e tra le rimanenti, solamente 6 possedevano un MIS accettabile (MIS>5); mentre di 9 pubblicazioni su prove di efficacia in campo, 3 non possedevano analisi statistica, ma le restanti 6 avevano un MIS >5.

In aggiunta Jäger *et al.* (2011) hanno revisionato le pubblicazioni scientifiche dal 1920 al 2010 sull'utilizzo dei PUD in modelli vegetali sottoposti a stress abiotici, utilizzando l'approccio descritto da Majevsky *et al.* (2009). Il primo esperimento condotto su piante stressate risale al 1965 (Boiron, 1965) e da allora un totale di 34 articoli sono stati identificati. Di essi 22 pubblicazioni includevano analisi statistica e tra questi 13 possedevano sufficienti informazioni per una dettagliata interpretazione dei risultati (MIS>5). Infine solamente 4 includevano nell'esperimento controlli positivi e negativi: "Il modello di crescita *in vitro* di semi di frumento con triossido di arsenico" di Betti *et al.* (1997), "Il modello di crescita *in vitro* di semi di frumento con lisina" (Auquièrè *et al.*, 1988), "Il modello di crescita *in vitro* di semi di crescita con cloruro di sodio" (Tighe *et al.*, 2005) e "Il modello di *Lemna gibba* L. e As V" (Jäger *et al.*, 2010). Significativi e riproducibili effetti di PUD in scala decimale e centesimale sono stati osservati evidenziando come tali modelli possano essere efficacemente utilizzati nello studio degli effetti dei PUD.

1.5 Il modello di crescita *in vitro* di semi di frumento

Il modello di crescita *in vitro* di semi di frumento è uno dei primi modelli adottati per la valutazione degli effetti di PUD e come esposto nel sottocapitolo 3.1 è uno dei pochi modelli utilizzati in sistemi stressati ritenuti validi scientificamente. Tale modello sperimentale è stato messo a punto nel 1997 da Betti *et al.* per valutare l'effetto della diluizione 45x del triossido di arsenico (As₂O₃ 45x) sulla crescita *in vitro* di piantine di grano. In un precedente esperimento basato sulla germinazione *in vitro* di semi di frumento, condotto dallo stesso gruppo di ricerca (Betti *et al.*, 1994), era stato selezionato il triossido d'arsenico come prodotto da saggiare dato il suo ben noto effetto

tossico sulla crescita e vitalità delle piante, ed erano state valutate diverse ultra-diluizioni di As_2O_3 (23x, 25x, 30x, 35x, 40x, 45x) per verificarne l'effetto stimolante sulla germinazione (principio di Arndt-Schultz dell'inversione degli effetti). La diluizione 30x mostrava un effetto inibente mentre la diluizione decimale 45 aveva mostrato gli effetti più significativi e ripetibili sulla germinazione.

Nel modello proposto da Betti *et al.* (1997) parte dei semi di frumento sono stati "stressati" con una dose ponderale di arsenico (0,1% di As_2O_3 per 30 minuti, seguito da risciacquo in acqua corrente per 60 min) al fine di ottenere una limitata diminuzione della germinazione e permettere quindi un'amplificazione dell'effetto specifico del PUD As_2O_3 45x. Tale modello può essere quindi considerato "isopatico" in quanto si usa la stessa sostanza (As_2O_3) in dose ponderale per lo "stress" e in forma omeopatica per la "cura". Per quanto riguarda il protocollo sperimentale, esso prevedeva, in tutte le sperimentazioni effettuate, l'uso di semi di grano (*Triticum aestivum* L.): ciascun seme è stato posto a germinare in una bustina di plastica a sua volta inserita in una busta di cartoncino opaco, per permettere al germoglio e alle radici di svilupparsi alla luce e al buio rispettivamente, ad una temperatura e intensità luminosa controllata (**Figura 5**).

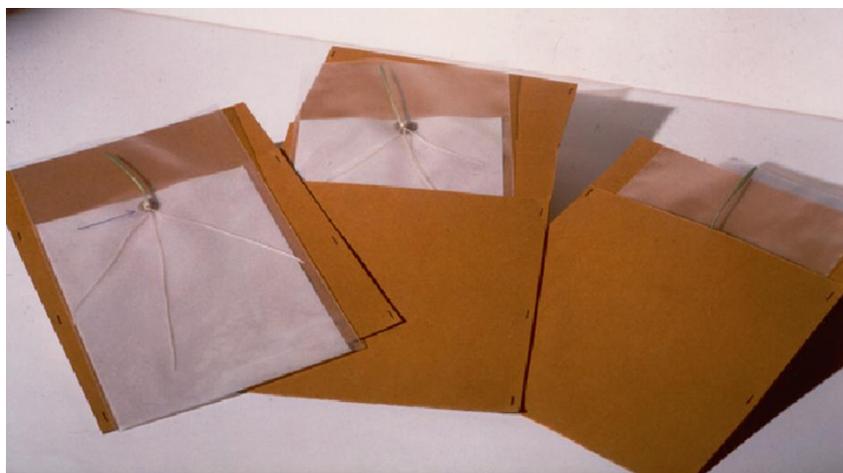


Figura 5. Modello di crescita *in vitro* di semi di grano; il seme, attaccato alla carta da filtro con argilla, è posto a germinare in una bustina di plastica a sua volta inserita in una busta di cartoncino opaco.

Le variabili considerate sono state la lunghezza del germoglio della radice primaria e delle radici secondarie. Nello specifico sono state poste a confronto tre tesi: seme non "stressato" trattato con H₂O (controllo non "stressato"), seme "stressato" e trattato con H₂O (controllo "stressato") e seme "stressato" e trattato con As₂O₃ 45x (gruppo "stressato" e trattato).

L'esperimento ha messo in evidenza un effetto stimolante, sulla lunghezza dei germogli di grano, del trattamento omeopatico As₂O₃ 45x rispetto al controllo "stressato" confermando i risultati ottenuti da Betti *et al.* nel 1994 utilizzando il modello di germinazione.

Il modello di crescita *in vitro* di semi di grano è stato successivamente ripreso e adottato da un team di ricerca in Svizzera, allo scopo di verificare la riproducibilità degli effetti del PUD a base di arsenico sulla lunghezza del germoglio (Binder *et al.*, 2005). Tuttavia l'esperimento ha portato a risultati significativi ma di segno opposto: la crescita del germoglio è stata significativamente inibita dall'applicazione di As₂O₃ 45x. Ulteriori prove di verifica sono state condotte ed i risultati, pur confermando i dati precedentemente ottenuti dal team di ricerca italiano e da quello svizzero, hanno evidenziato la stabilità del sistema sperimentale (Lahnstein *et al.*, 2009).

1.6 Valutazione dell'espressione genetica

1.6.1 La tecnologia microarray

Lo sviluppo di nuove tecnologie ha facilitato in modo rilevante lo sviluppo della genomica funzionale e strutturale permettendo di ragionare in termini di sistemi biologici interi, confrontando simultaneamente migliaia di componenti senza conoscerne preventivamente l'identità. Essendo l'espressione genica spesso regolata a livello trascrizionale, con l'avvento della tecnica del *microarray* (micromatrice) è stato possibile analizzare la trascrizione di un intero genoma. Un gene infatti, per essere espresso deve essere trascritto, per cui conoscendo le condizioni in risposta alle quali un gene viene trascritto, tale tecnica consente di ipotizzare la funzione del gene stesso. La tecnologia

microarray fornisce quindi l'importante possibilità di misurare l'espressione di migliaia di geni contemporaneamente ed in modo rapido. Per le sue peculiari caratteristiche, l'uso dei *microarray* ha trovato immediata e larga applicazione nello studio del genoma sia in campo vegetale, animale e medico, ma anche per lo studio di lieviti, batteri e virus, apportando importanti implicazioni non solo in medicina ma in tutta la biologia, agricoltura compresa.

Tecnicamente i *microarray* o *biochips* o *gene-chips* consistono in un piccolo supporto solido, di vetro o silicio, su cui sono spazialmente distribuiti ed in modo ordinato, frammenti di DNA o oligonucleotidi ad elevata densità definiti *spots* o *probes*. Ogni *spot* corrisponde ad uno specifico gene ed è capace di riconoscere e legarsi con molecole marcate complementari (mRNA o DNA), definite *target* o *sonde*, isolate da campioni di cui si vuole conoscere il profilo trascrizionale. Il segnale di ibridazione ottenuto per ogni *spot*, riflette dunque il livello di ogni singolo trascritto all'interno della popolazione di mRNA o DNA presa in esame e viene quindi trasformato in un segnale quantificabile mediante l'utilizzo di specifici programmi informatici.

Sono stati sviluppati diversi metodi per realizzare i *microarray*, tra questi troviamo lo sfruttamento dello stesso processo utilizzato per produrre i chip per computer, la fotolitografia. Mediante tale processo migliaia di oligonucleotidi, nel complesso corrispondenti a tutti i geni di un organismo, vengono sintetizzati *in situ* su un supporto di silicio di 1-2 cm. I geni sono solitamente rappresentati da 10-20 diversi oligonucleotidi, ognuno costituito da 25-60 paia di basi.

In ciascun spot, per ogni oligonucleotide che presenta un *match* perfetto (PM) con il trascritto, ne è presente uno identico con *mismatch* per una sola base in posizione centrale (MM). La presenza di un MM consente di stimare legami aspecifici e background locale e di sottrarli al segnale di PM

Tali chip possono essere ibridizzati con una sonda a DNA o RNA preventivamente biotinilata; in un secondo momento viene aggiunto un coniugato streptavidina-ficoeritrina in grado di legare la biotina ed emettere luce fluorescente una volta irraggiato con raggio laser. Dato che il DNA o RNA si

lega solamente con le sequenze complementari, è possibile, mediante lettura e analisi del chip rispettivamente con laser e PC, osservare profili di ibridizzazione distinti a seconda di quali sequenze di DNA o RNA complementari sono presenti nel campione (**Figura 6**).

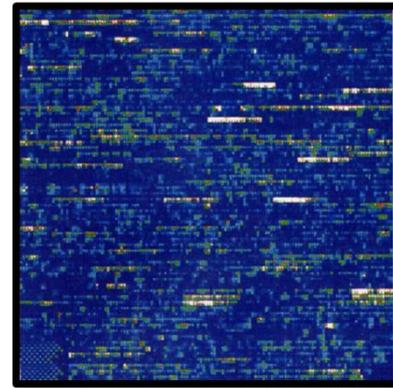
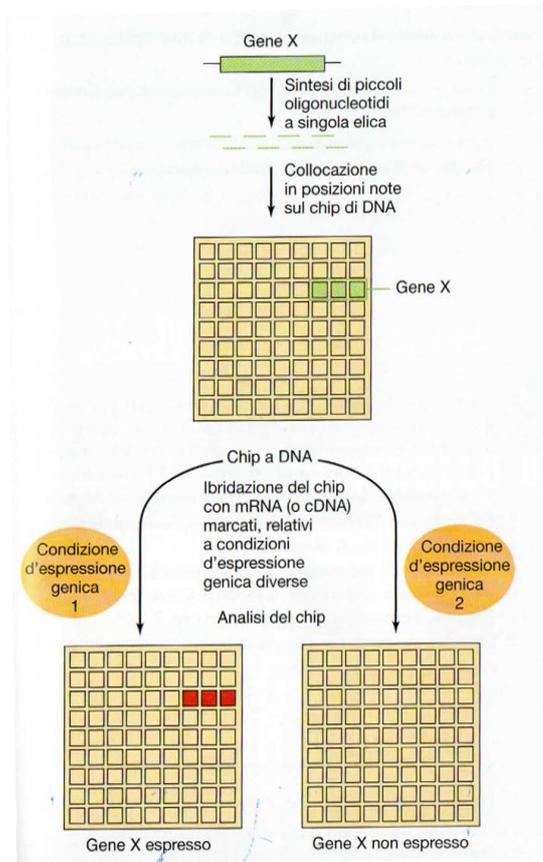


Figura 6. Rappresentazione della realizzazione e utilizzo dei chip a DNA (a sinistra). In alto esempio di chip ibridato e sottoposto a scansione laser. La localizzazione dei punti in cui l'mRNA si è legato con la sequenza complementare posizionata sul chip, è indicata dalla gradazione della colorazione sino alla massima ibridazione, indicata dal bianco. Dato che, la localizzazione dei geni è nota, quando il chip viene letto, rivela quali geni specifici sono stati espressi.

1.6.1.1 Utilizzo dell'analisi microarray per lo studio degli effetti dei PUD

Il profilo di espressione genica di una cellula determina il suo fenotipo, la sua funzione e la risposta a stimoli ambientali. Risulta di particolare interesse perciò l'indagine dei *pattern* di espressione genica, in relazione all'applicazione di PUD. In particolare la tecnologia del *microarray*, permettendo di analizzare in modo simultaneo un ampio numero di geni, costituisce una valida possibilità per analizzare la risposta ai PUD di un organismo nel suo complesso.

Una revisione dell'utilizzo di questa tecnica in campo vegetale ed in particolare per la valutazione delle proprietà e della qualità di estratti fitoterapici, è stata

condotta da Chavan *et al.* (2006), il quale ha sottolineato come l'analisi microarray costituisca un'importante applicazione per saggiare le diverse fasi di sviluppo della pianta da cui viene ottenuto il rimedio fitoterapico, in modo da standardizzarne la preparazione e ottimizzarne l'impiego terapeutico.

L'analisi microarray è stata utilizzata con successo anche nello studio della variazione di espressione genica in linee cellulari umane ed in modelli animali a seguito del trattamento con PUD (Bigagli *et al.*, 2010; Marzotto *et al.*, 2014; De Oliveira *et al.*, 2008). Recentemente, Saha *et al.* (2013) ha mostrato, a seguito di analisi microarray, come il profilo di espressione genica di cellule tumorali umane sottoposte a trattamento *in vitro* con PUD sia significativamente differente rispetto al profilo di espressione delle stesse cellule trattate con un placebo.

Nonostante vi sia un crescente utilizzo dell'analisi microarray nel campo dei PUD, ad oggi nessuna indagine è stata ancora condotta sulla valutazione dell'effetto di tali preparati in ambito vegetale.

1.6.2 La PCR quantitativa: Real-Time PCR

La real-time PCR o PCR quantitativa (qRT-PCR) è una implementazione della PCR che permette di avere informazioni più precise sulle concentrazioni relative dei DNA amplificati e dei loro mRNA corrispondenti. A differenza della PCR classica che necessita di un post-trattamento per visualizzare i risultati alla fine dei cicli di reazione, con la qRT-PCR è possibile monitorare ciclo per ciclo la sintesi di DNA durante la reazione di PCR. Ciò è reso possibile dal fatto che la quantità di prodotto formato viene misurata durante il processo di amplificazione grazie all'emissione di fluorescenza, emessa da un fluoroforo, che è proporzionale alla quantità di DNA a doppia elica che viene sintetizzato. In pratica si tratta di una tecnologia che associa in un'unica reazione amplificazione e quantificazione.

Essenzialmente vi sono due tipologie di marcatori fluorescenti che possono essere utilizzati: i "sequenza non specifici" ed i "sequenza specifici". Della prima categoria fanno parte piccole molecole che cambiano di emissione quando si

intercalano al DNA a doppia catena come il *SYBR green*. All'inizio del processo di amplificazione la miscela di reazione contiene DNA denaturato, *primers* e la molecola fluorescente, dopo l'*annealing* dei *primers*, si legano alcune molecole fluorescenti alla doppia elica e durante l'elongazione si verifica un aumento di fluorescenza che corrisponde all'aumento di numero di copie dell'amplicone. Dato che la molecola fluorescente si lega in modo casuale alle doppie eliche, risulta necessario ottimizzare la metodica per evitare la formazione di prodotti aspecifici. Della seconda categoria di marcatori fanno parte oligonucleotidi, definiti sonde, disegnati per essere complementari al DNA da amplificare (es. sonde *TaqMan*) e che si legano in una regione diversa rispetto a quella dei *primers* di amplificazione, non competendo con essi. All'estremità 5' della sonda è legato un fluorocromo ad alta energia che emette fluorescenza (*reporter*), mentre all'estremità 3' è legato un fluorocromo a bassa energia che spegne la fluorescenza del *reporter* (*quencher*). Finchè entrambi i marcatori sono legati al DNA bersaglio non viene emessa fluorescenza; se avviene l'*annealing* dei *primers* e inizia l'elongazione, il *reporter* viene liberato in soluzione emettendo fluorescenza. Quest'ultima metodica pur essendo più precisa della precedente è anche più costosa e richiede la conoscenza della sequenza da amplificare.

All'inizio di una reazione di qRT-PCR lo strumento rileva solamente un rumore di fondo; man mano che molecole di DNA sono sintetizzate, aumenta la fluorescenza, fino ad un livello soglia (CT), dopo il quale il segnale raggiunge la saturazione. Conoscere il numero di cicli necessari per arrivare al CT permette una misurazione comparativa del numero di copie iniziali di sequenza presenti nel campione, tenendo conto che i valori di CT sono inversamente proporzionali alla concentrazione iniziale del DNA target.

La quantificazione può essere assoluta, se si fa ricorso alla costruzione di una curva di calibrazione standard di RNA a concentrazione nota, da cui poi si può risalire alla concentrazione e al numero di copie iniziali del campione in studio, oppure può essere relativa se la concentrazione del campione viene normalizzata ad un gene di riferimento (*reference*). Geni *housekeeping* (es.

GADPH, sub-unità ribosomali, ecc...) sono comunemente utilizzati come *reference* in quanto sono ubiquitari, sono espressi in modo costitutivo, non risentono dei trattamenti sperimentali e mantengono la loro espressione costante nei diversi tipi cellulari.

La qRT-PCR è in molti campi la metodologia principalmente utilizzata per l'analisi quantitativa del DNA e dell'RNA dopo retrotrascrizione; ma la sua applicazione è stata estesa alla conferma del profilo di espressione genica ottenuto tramite analisi *microarray*.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Riproduzione del modello di crescita *in vitro* di semi di frumento

2.1.1 Materiale vegetale, trattamenti

Semi di frumento tenero (*Triticum aestivum* L.) provenienti da agricoltura biologica, appartenenti alla cultivar "Pandas" (CGS sementi, Italia) e selezionati per integrità, uniformità di forma, dimensione e colore, sono stati utilizzati per la prova di crescita *in vitro*.

Una parte dei semi è stata sottoposta a stress abiotico da metalli pesanti; in particolare tali semi sono stati immersi in una soluzione acquosa di triossido di arsenico (As_2O_3) 5mM (As_2O_3 , 99,995%, Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA; H_2O p.a. Merck, Darmstadt, Germania) per 30 minuti e successivamente risciacquati in acqua corrente per 60 minuti. Una uguale quantità di granella è stata sottoposta allo stesso trattamento, utilizzando acqua distillata al posto di As_2O_3 5mM. Sia i semi stressati (semi S) che quelli di controllo (semi C), sono stati seccati portandoli ad una percentuale di umidità pari al 12% e infine conservati al buio a temperatura ambiente fino al momento del loro utilizzo.

La scelta del tipo di stress, la dose utilizzata e il tempo di esposizione allo stress sono stati selezionati in base a quanto riportato da Betti *et al.* (1997). Nello specifico è stato scelto di saggiare il triossido d'arsenico dato il ben noto effetto tossico sulla crescita e vitalità delle piante fino a diluizioni pari a 10^{-6} ; mentre la dose di As_2O_3 (definita sub-letale) e il tempo di esposizione che sono stati applicati, permettono l'ottenimento di una limitata diminuzione della germinazione (10/15%). L'induzione di un effetto di recupero nei semi di frumento a seguito dello stress sub-letale da As_2O_3 , è stato valutato utilizzando:

- H_2O distillata come controllo (indicata con 0);
- As_2O_3 alla diluizione decimale 45 (As 45x, Laboratori Boiron, Lione, Francia; indicato con 7) come trattamento.

Il prodotto ultra diluito (PUD) As 45x, scelto in accordo con Betti *et al.* (1994), è stato preparato a partire da una tintura madre di As_2O_3 0.01M e

successivamente sottoposta a diluizioni seriali in base decimale, intervallate dal processo di dinamizzazione, fino ad ottenere la diluizione 45x.

2.1.2 Protocollo sperimentale

Ciascun seme, stressato o non stressato, è stato fissato sulla parte superiore di un foglio di carta da filtro (Perfecte 2-extrarapid, Cordenons, Pordenone, Italia) di dimensioni 12x20 cm, mediante l'utilizzo di un pezzetto di argilla ($0,20 \pm 0.05$ g). La carta da filtro è stata poi inserita in un involucro di polietilene trasparente, a sua volta inserito in una busta di cartoncino nero in modo da permettere la crescita dei germogli alla luce e delle radici al buio come riportato da Betti *et al.* (1997) (**Figura 7**). 3.2 mL di H₂O distillata o di As 45x (Laboratori Boiron, Lione, Francia) sono stati utilizzati per umidificare ciascun foglio di carta da filtro per permettere la germinazione e crescita dei semi di frumento (Betti *et al.*, 1997).

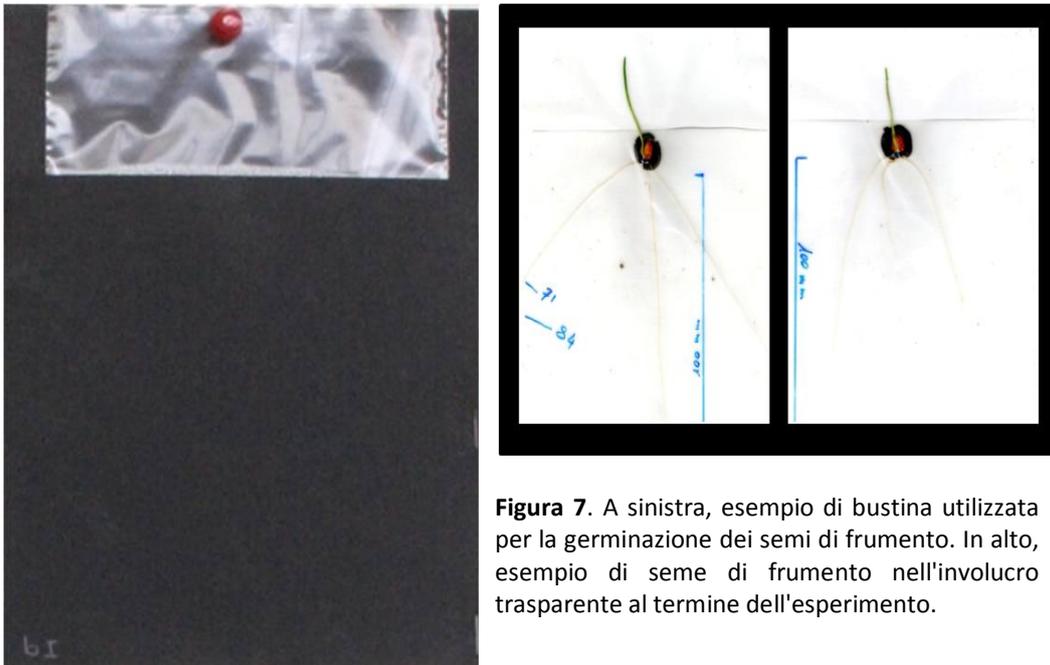


Figura 7. A sinistra, esempio di bustina utilizzata per la germinazione dei semi di frumento. In alto, esempio di seme di frumento nell'involucro trasparente al termine dell'esperimento.

Come mostrato in **Figura 8** sono quindi stati posti a confronto i seguenti 4 gruppi sperimentali:

1) controllo (C+0): semi non stressati e trattati con acqua distillata;

- 2) controllo trattato (C+T): semi non stressati e trattati con il PUD;
- 3) stressato (S+0): semi sottoposti a stress con arsenico ponderale e trattati con acqua distillata;
- 4) stressato trattato (S+T): semi sottoposti a stress con arsenico ponderale e trattati con il PUD.

In totale sono state preparate 80 bustine (20 per ciascun gruppo sperimentale) che sono state fissate su un supporto di legno (85 x 100 cm); i semi così preparati e disposti nelle relative bustine, sono stati posti a germinare in serra ad una temperatura di $20 \pm 1^\circ\text{C}$ in condizione di luce naturale per 7 giorni. Al termine dei 7 giorni è stata valutata la percentuale di germinazione; inoltre le piante sono state scansionate (Epson Perfection 2480 Photo) e parametri quali lunghezza del coleoptile e delle radichette seminali, sono stati misurati utilizzando il software Assess 2.0 (Lamari, 2002) (**Figura 7**).

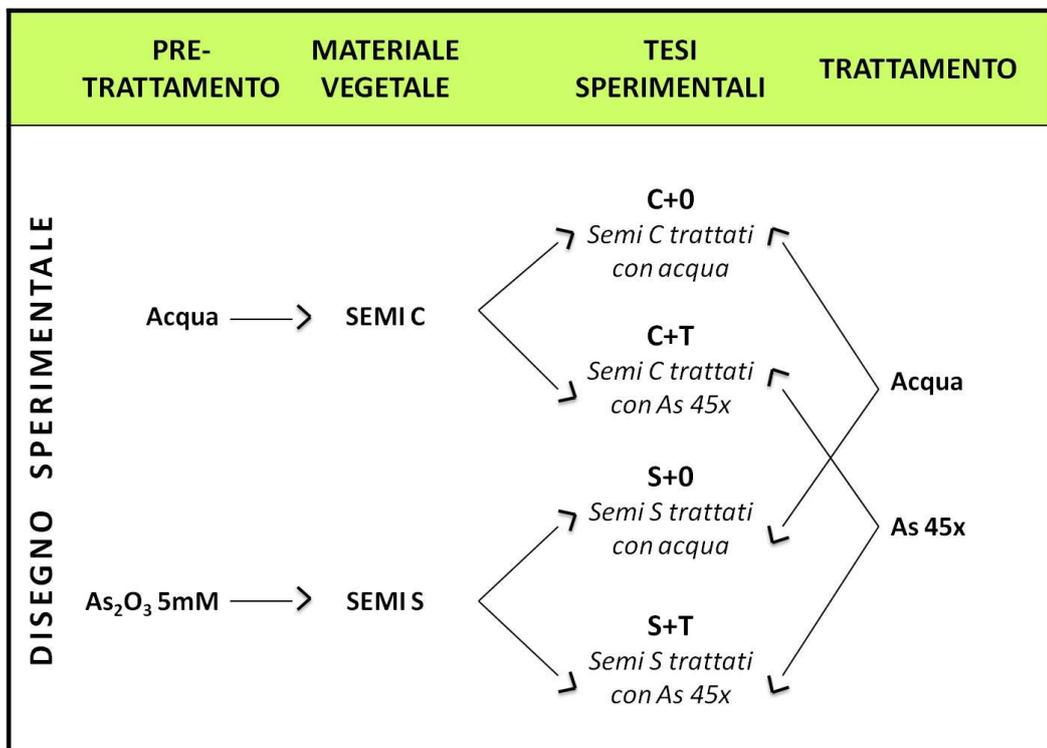


Figura 8. Rappresentazione del disegno sperimentale utilizzato.

L'esperimento è stato condotto in cieco per evitare qualsiasi condizionamento da parte dell'operatore e le bustine sono state disposte in base ad un disegno sperimentale totalmente randomizzato.

L'esperimento è stato replicato sette volte, per un totale di 560 semi, 140 per ciascun gruppo sperimentale.

L'Analisi della Varianza (ANOVA) ad una via è stata condotta utilizzando il software CoStat (Cohort Software versione 6.002, Monterey, CA, USA) al fine di identificare differenze nella lunghezza del coleoptile e delle radichette seminali e nella percentuale di germinazione tra le quattro tesi poste a confronto

2.2 Analisi di espressione genica

2.2.1 Estrazione dell'RNA e preparazione dei campioni per l'analisi microarray

Al termine della prova di crescita *in vitro* dei semi di frumento, da tre delle sette repliche sperimentali, è stato prelevato il materiale fogliare necessario per effettuare l'analisi di espressione genica mediante microarray, ottenendo tre repliche biologiche per ciascuna tesi sperimentale, per un totale di 12 campioni. In particolare per ognuna delle tesi in studio sono stati costituiti *bulks* composti da 10 germogli ciascuno. I campioni sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e sottoposti ad estrazione dell'RNA totale tramite l'utilizzo del Nucleospin RNA plant kit (Macherey Nagel) in accordo con le istruzioni della casa madre. In ultimo l'RNA è stato quantificato spettrofotometricamente, misurando l'assorbanza (A) del campione diluito a due diverse lunghezze d'onda (260 e 280 nm); la lettura a 260 nm consente di calcolare la concentrazione dell' RNA nel campione, mentre il rapporto tra A (260) e A (280) fornisce un indice di purezza.

L'RNA isolato dai tessuti vegetali è stato successivamente sottoposto a tutte le operazioni preparative per l'analisi di espressione genica mediante il *GeneChip® Wheat Genome Array* di Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) condotte dal consorzio Genopolis del Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze dell'Università di Milano-Bicocca (Milano, Italia) in conformità con il protocollo Affymetrix. La purezza e l'integrità dell'RNA estratto è stata verificata

utilizzando lo strumento Agilent Bioanalyser (Agilent 2100 RNA 6000 Nano LabChip, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) e solamente l'RNA di elevata qualità, con un RIN (RNA Integrity Number) superiore a 7, è stato selezionato per l'analisi microarray. Il controllo della qualità dell'RNA è un passaggio molto importante in quanto contaminazioni di varia natura (proteine, lipidi, carboidrati) porterebbero ad aumentare il rumore di fondo, mediando legami non specifici, mentre la degradazione dell'RNA porterebbe ad una non rappresentatività del campione.

2.2.2 Retrotrascrizione e marcatura

Cinque microgrammi di ogni campione di RNA totale sono stati utilizzati per la conversione in DNA complementare (cDNA) mediante una reazione di trascrizione inversa (One-Cycle Target Labeling Assay, Affymetrix). Dopo la sintesi del secondo filamento, il cDNA ottenuto è stato sottoposto ad una reazione *in vitro* di trascrizione a RNA complementare (cRNA), mediante l'enzima RNA polimerasi, per consentire una migliore amplificazione del campione e una maggiore efficienza di ibridazione (gli ibridi DNA-RNA sono più stabili degli ibridi DNA-DNA). Durante l'operazione della polimerasi viene effettuata anche la marcatura del cRNA mediante il complesso biotina/streptavidina-ficoeritrina.

2.2.2 Ibridazione, lavaggio e scansione

Il cRNA frammentato e biotinilato è stato successivamente utilizzato per l'ibridazione. Nello specifico i campioni sono stati disciolti in un'apposita soluzione a 45 °C per permettere la denaturazione della doppia elica e posti a contatto con il microarray in una camera di ibridazione di piccolo volume per 16 h. In totale sono stati utilizzati 12 GeneChips, uno per ciascuno dei 12 campioni di cRNA. Al termine del tempo previsto per la realizzazione dell'ibridazione, gli array sono stati lavati per rimuovere l'eccesso di sequenze marcate che non si sono ibridate, e sottoposti a scansione per ottenere un'immagine della superficie ibridata (GeneChip Scanner 3000 e Affymetrix

GCO software). Nel particolare, un fascio laser scansiona la superficie del chip, eccitando i fluorocromi legati alle sequenze bersaglio ibridate e determinando l'emissione di fluorescenza, la cui intensità è proporzionale al grado di ibridazione. La luce emessa, di lunghezza d'onda caratteristica, viene raccolta e misurata da un microscopio confocale e viene convertita in una immagine digitale; appositi software, definiti di estrazione degli spots, estrapolano dall'immagine, dati in formato numerico.

2.2.3 I GeneChip® Wheat Genome Array

I GeneChip® Wheat Genome Array della Affymetrix utilizzati contengono 61127 *probe sets* corrispondenti ai 55052 trascritti dei 42 cromosomi nel genoma del frumento. Per ogni *probe set* sono posizionati oligonucleotidi di 25 unità: 11 *perfect match* o sonde complementari (PM) e 11 *mismatch* o sonde imperfette (MM), con la tredicesima base diversa allo scopo di misurare ibridazioni aspecifiche.

La progettazione dell'array è basata sui contenuti disponibili nelle banche dati GenBank® e dbEST. In particolare dai contenuti pubblici presenti nel database UniGene Build #38 (24 aprile 2004) derivano le informazioni di sequenza per 59356 *probe sets* relativi ai genomi A, B e D del frumento tenero (*T. aestivum*); 1215 *probe sets* derivano da ESTs (Expressed Sequence Tag) del diploide *T. monococcum* (genoma A); 539 *probe sets* rappresentano ESTs dei genomi A e B del frumento duro (*T. turgidum*) e 5 *probe sets* derivano da ESTs del diploide *Aegilops tauschii* portatore del genoma D.

2.2.4 Analisi dei dati microarray

L'analisi dei dati microarray è stata condotta utilizzando un pacchetto di programmi forniti da Affymetrix.

I dati in formato numerico relativi alle intensità dei *probe* sono stati importati come files CEL Affimetrix. Il livello di espressione genica è stato determinato mediante l'utilizzo del software Microarray Affymetrix Suite 5.0 (MAS5) che con un apposito algoritmo, combina l'informazione tra PM e MM in ogni *probe set*.

MAS5 fornisce quindi un dato in formato logaritmico (\log_2) corretto per il background, derivante da ibridazioni non specifiche e dalla naturale fluorescenza del chip, mediante l'utilizzo di un filtro basato sullo scarto interquantile (IQR=0.2) e normalizzato in modo che i dati ottenuti da tutti i chip coinvolti nell'esperimento possano essere reciprocamente confrontati. La normalizzazione del profilo di espressione genica viene effettuata dividendo il valore ottenuto per ciascun gene per quello del controllo (gene *housekeeping*) utilizzato nell'esperimento.

L'identificazione dei geni differenzialmente espressi (DEG) è stata condotta utilizzando il test Empirical Bayesian (Smyth e Gordon, 2004), congiuntamente al controllo dei falsi positivi mediante il test Benjamini-Hochberg (Reiner *et al.*, 2003) ($p \leq 0,05$).

I DEG successivamente sono stati filtrati, selezionando i geni con un \log_2 fold-change (\log_2 FC) >1 o <-1 , dove per fold-change è inteso il rapporto tra intensità del segnale del trattato e intensità del segnale del controllo.

Infine è stata indagata la categoria funzionale di appartenenza dei geni attraverso l'utilizzo del database WheatPLEX (<http://www.plexdb.org/>) e HarvEST:WheatChip (<http://harvest.ucr.edu/>). Tale funzione è stata assegnata solamente con un *E-value* $< 1e^{-10}$ mentre i geni per i quali non è stato osservato un ragionevole grado di allineamento sono stati classificati come *unknown*.

L'elaborazione dei pathway metabolici è stata condotta utilizzando il programma MapMan 3.5.1 (<http://mapman.gabipd.org/web/guest/mapman-version-3.5.1>) accoppiato con un *mapping file* specifico per il frumento (Taes_Affy_0709) (Thimm *et al.*, 2004). I valori di abbondanza dei trascritti per ciascun gene sono stati mediati all'interno di ogni categoria funzionale ed è stato elaborato un indice compreso tra -3 e +3. Tutti i geni unitamente alla categoria funzionale di appartenenza, sono stati rappresentati graficamente, utilizzando una scala cromatica dal rosso al blu per indicare i rispettivi livelli di espressione genica.

2.2.5 Verifica dell'analisi di espressione genica mediante Real-Time PCR

Nonostante la tecnica microarray per la valutazione dell'espressione genica sia ad alta resa e altamente processuale, è una procedura semi-quantitativa e non fornisce dati di espressione assoluti. È stato necessario di conseguenza validare i risultati di espressione ottenuti, utilizzando la tecnica a "singolo gene" Real Time PCR (qRT-PCR).

In particolare sono stati sottoposti a controllo 55 geni, scelti casualmente sulla base del loro coinvolgimento nei principali *pathways* metabolici attivati in risposta ad uno stress. In **Tabella 1** è riportata la lista dei geni indagati e la categoria funzionale di appartenenza.

Gli esperimenti di validazione in qRT-PCR, utilizzando i campioni di RNA adoperati per l'analisi microarray, sono stati condotti mediante lo strumento StepOnePlus™ (Applied Biosystems, UK).

Tabella 1. Lista dei 55 geni selezionati per la validazione microarray tramite qRT-PCR, raggruppati in base alla categoria funzionale di appartenenza

CATEGORIE FUNZIONALI	ID GENE
Metabolismo lipidico	BG909536; BJ270709; CK198840; CK207205; CK208220;
Istoni e proteine strutturali	BQ838979; CA635455; CA660860; BE416616; BJ251672; BQ607338; CA628396; CD868502; CD869995; CA719316; BK225202; BJ262694; BJ274465; BJ306445; BJ308450; BJ320258; BQ294672; BQ168973
Proteine dello stress	BJ322693; CA613417; CA699507; CA708152; CA708660; CK205521
Segnalazione, trasduzione e trasporto	BF484849; BJ226504; BJ246114; BJ303391; BJ312841; BQ578355; CA629836; CA640553; CA681335; CA744534; CA747224; CD453390; CK203324
Metabolismo secondario	CK210556
Metabolismo proteico	BJ228692; BJ243882; BJ256146; CA599873; CA700404; CA731980
Sistema di detossificazione cellulare	CA642191; CA676257; CA676553; CA685752; CA719198; CK198851

Il kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, UK) è stato utilizzato per la retrotrascrizione dell' RNA in cDNA in accordo con il protocollo operativo fornito dalla casa madre.

Data la sequenza target (Affymetrix) per ciascuno dei geni selezionati, è stata disegnata una coppia di *primers* (**Tabella 2**) mediante l'utilizzo di un apposito programma (Primer Express Software v2.0, Applied Biosystems) e seguendo i criteri suggeriti dai protocolli di qRT-PCR. Come controllo endogeno (*reference genes*) è stato utilizzato il gene GAPDH (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi) scelto in accordo con Paolacci *et al.* (2009). Lo studio *in silico* di Paolacci *et al.* (2009), mediante uno *screening* di 32 geni e cDNA corrispondente a 24 differenti campioni vegetali di frumento (diverse tipologie di tessuto, diversi stadi di sviluppo e diverse temperature di stress) ha permesso di valutare la stabilità di espressione di tali geni e di individuare idonei *reference genes* in grado di effettuare una più accurata normalizzazione e una migliore quantificazione di espressione genica in qRT-PCR.

Ciascuna reazione di amplificazione è stata condotta in un volume di 20 μ L contenente:

- Power SYBR(R) Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 2X
- F-Primer (Sigma Aldrich) 900 nM
- R-primer (Sigma Aldrich) 900 nM
- cDNA (10 ng/ μ L) 10X

Sono stati previsti per ciascuna coppia di *primers* e per il *reference genes* controlli negativi (privi di cDNA) per escludere la presenza di contaminazioni.

Le condizioni di reazione prevedevano tre *steps*:

- 1) 10 minuti a 95°C;
- 2) 40 cicli ognuno costituito da 15 secondi a 95°C e 1 minuto a 60°C;
- 3) curva di dissociazione (*melting curve*) costituita da 15 secondi di incubazione a 95°C, 1 minuto di incubazione a 60°C e un incremento di temperatura fino 95°C per 15 secondi, condotta al termine di ogni ciclo di amplificazione al fine di confermare la specificità dell'amplificazione.

Sono state utilizzate le tre repliche biologiche derivanti dalle tre diverse estrazioni di RNA utilizzate per l'analisi di espressione microarray e ciascun campione è stato analizzato in triplo.

La quantificazione dei livelli di espressione genica è stata eseguita in accordo con il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ proposto da Livak e Schmittgen (2001), basato sulla determinazione del numero di cicli di amplificazione necessari per giungere il ciclo soglia (CT) nella fase esponenziale della reazione di PCR; nello specifico l'ammontare di DNA iniziale è inversamente proporzionale al valore di CT.

Per misurare il grado di relazione tra i dati ottenuti mediante l'analisi GeneChip array e tramite qRT-PCR è stata effettuata la correlazione di Pearson (Pearson, 1896), ampiamente utilizzata per confrontare profili di espressione genica. La correlazione di Pearson individua relazioni di tipo lineare tra le variabili messe a confronto e assume valori compresi tra -1 e 1.

In particolare date due variabili aleatorie x e y la loro correlazione di Pearson r_{xy} è data da:

$$r_{xy} = \sigma_{xy} / \sigma_x \sigma_y$$

Dove σ_{xy} indica la covarianza tra le due variabili, mentre σ_x e σ_y indicano la deviazione standard rispettivamente di x e di y .

Considerando perciò ciascun gene g_i come una variabile aleatoria di cui si dispone di un numero limitato di campioni, g_{in} , con $n=1\dots N$, la correlazione di Pearson tra i profili di espressione dei geni g_i e g_j può essere calcolata mediante la seguente formula:

$$r_{ij} = \frac{\frac{1}{N-1} \sum_{n=1}^N (g_{in} - \bar{g}_i)(g_{jn} - \bar{g}_j)}{\sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{n=1}^N (g_{in} - \bar{g}_i)^2} \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{n=1}^N (g_{jn} - \bar{g}_j)^2}}$$

dove N è il numero di campioni disponibili.

Tabella 2. Lista dei geni analizzati: ID del gene e sequenze nucleotidiche (5'-3') dei primers forward (F) e reverse (R) utilizzati per l'amplificazione in qRT-PCR.

ID GENE		SEQUENZA DEI PRIMERS 5'-3'	ID GENE		SEQUENZA DEI PRIMERS 5'-3'
GAPDH	F	TTGCTCTGAACGACCATTTC	CA708660	F	AAGCACCAAAAAGAAGGCACAA
	R	GACACCATCCACATTATTCTTC		R	TCTTGGTGTGTCATGGGAAATTT
BG909536	F	TGCTGGCGCTTGCA	CK205521	F	GCCATCCCCGGTCTTG
	R	CCAGTACGAGGACCAATCGA		R	GCTGCCGATCGCTTATGTC
BJ270709	F	TGCGGCTGGTTTCAAGTCA	BF484849	F	ACAGGTAAGTGGGAGGGCAAT
	R	CCCGGACGAGAGAAAACAAC		R	AGATCTGAATTATGTGATGGGCATT
CK198840	F	GGCCGGCTTACGCATGT	BJ226504	F	CTTCCCTGGCCCAAGGA
	R	GGCCGTGGAGCTTACCATAA		R	CCGCTGTGTGTCATCAGAAA
CK207205	F	CATGGTCGGTTGCCATCAG	BJ246114	F	GGCAGGCACACGAAACGA
	R	TTCCCCAGTCAAGCTTTGGT		R	GCGAGGGCTCTAGGTTACAACA
CK208220	F	GTAGCTGTGGAAGAACACATGCTT	BJ303391	F	GCTGAAGAACCCGGAATCG
	R	GCTCTGCGACGAGGTACA		R	TCCTCTGGAATGCTGCAA
BQ838979	F	GCCCGTACGTGCAGTACAAA	BJ312841	F	CGCATGACAGGAGAGCGTTT
	R	CGTAGGCCCGCATCTGTAG		R	TGTCCACTGACAGCAACAGTT
CA635455	F	CCCGGCTGGGAAGAA	BQ578355	F	CCATCGCTTCTACATCAAGGT
	R	TGGCTATGGCTTGGTTAGCA		R	GCGACGAGCTTCTCGATCTC
CA660860	F	CCTGCTCGTCTCCAGGAT	CA629836	F	TTGCACACCCTTCGACAAAG
	R	GCGCAGGCATCGTTTCTT		R	TTTGTGCTGTCTTGA AAAA
BE416616	F	TGCTCAAGATCTTCTCGAGAAC	CA640553	F	AACCCATGCGTCACTGATC
	R	GGCGTCTCGGTGATAGGT		R	CCTACCTCCATGAGCTCAACTG
BJ251672	F	GCAAGACGCTTCTCTTCGT	CA681335	F	CTGGGAGTGTGGTTGTCAT
	R	GTTGAAGCTTGTCTTTGCTTTG		R	TGGCATGATAGGCTTCTTGA
BQ607338	F	CTCCTCACCTCGATCCAAA	CA744534	F	CACGGATCTGGACCTGAA
	R	CATGGCTGACGGCTTCTT		R	CCAGCGTGCCTTCTAGCT
CA628396	F	AAGGGCTTGTTCGGCTAATTC	CA747224	F	CAGAGCAAACCACTCGAATA
	R	CAAACCAATCTTGGCAATCC		R	CTTCTAGCCGCAATTTGGAA
CD868502	F	TCCTTAGCCTGATGTGTTTCATC	CD453390	F	TCCGCGCTTGTCAAGTACTC
	R	CGACCACGACAGAAACAAC		R	TTGGGTGCTGCTTCCA
CD869995	F	TCGCGACACCGCTTAGGT	CK203324	F	TCTGAGCCCGGCACCAT
	R	CAGAATCCAACCAACCAAGCT		R	TGACGTTCTGCGCATGTC
CA719316	F	CATCTTAGCCATCTCACAGAAA	CK210556	F	AGAAAGATCGTGGCTTCTC
	R	TCTGTGATTCGTGAGCAA		R	GTTCCGCTCACCATTGG
BJ225202	F	GGCCGTACCAAGTTCACA	BJ228692	F	GGCTTCTGGCCATCCTTA
	R	CCGCCATCAATCCATGAAA		R	CTTGCCCGGAGATAAATCA
BJ262694	F	TTGAAGTCTGCGGATCT	BJ243882	F	CAGGAAGCAGATCGCTGTTG
	R	AAGAGCACGGAGCTGCTGAT		R	AGGATGGCTAGCTTCTGGTTTC
BJ274465	F	TACCCATGCTCGACGAA	BJ256146	F	GGATAGGGCAGCTGCTTCA
	R	TGATGCTGTATGTAATGCCTGCTA		R	GGCTGACAGCCACTTAGG
BJ306445	F	GGATCCATCTTAGTCCATGAGA	CA599873	F	CATGAGGACACCATGAGCAAA
	R	GAGTAGCCGTCGCCCCATA		R	ACCAGCATCCAGAATACCAGAAG
BJ308450	F	GCGCAGGACACAGAGTGAAA	CA700404	F	ACTACCCCTCCCCAACAC
	R	CGGTGACTGATGTTCCAGTTT		R	CCGCGACTCGAAGAAGAAGT
BJ320258	F	CAAGCTTGAGCACTCTCTGGAA	CA731980	F	AGCGGACGACTAGTGAACCTT
	R	TGCTGTGCTAGTGTCTGTGTTAA		R	TGGGCTCTCCACCATGA
BQ294672	F	CATAGCCAGCGCACTAGATTCA	CA642191	F	GGTAGAGAGGATCGCTGAAATCA
	R	GGCTGACCCTGCTGTTCC		R	GCCGCCAGCTTAGGAACTT
BQ168973	F	CCAGGGCAACAGAGCTT	CA676257	F	TGGCAAACGCGAGTACA
	R	TGCCAAACCAATCCTAAGG		R	GCGCCAGTTGAAGCAGTA
BJ322693	F	GCCACCAGGAGAGCAAAACAG	CA676553	F	TTACCCCGCAAAAATGTATT
	R	CGCTGCGGGTGTGAACT		R	ACGGTGCCTGCACATCT
CA613417	F	TGCCCTTCTGACGCAA	CA685752	F	GCTGGAGAGACCGTTTGTCTT
	R	CGTCCCGTGTCCACTGTCT		R	CGGTTTGGCTGTGATTTA
CA699507	F	CGGCACCACCTACTCATGTG	CA719198	F	CACCGCCAGAGGGTCTTTC
	R	CCATGGTCATGGCGATAATC		R	CGCACTGCTCGATGATATGC
CA708152	F	CCAGAAGCAGCGCAACGT	CK198851	F	GCCGGCCCTTACGAAT
	R	GCGGTGCTTTAGCCTTAGG		R	CCTCAAGTGGCAACAGGTT

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Valutazione di efficacia: parametri di crescita

L'esperimento di valutazione della crescita *in vitro* dei semi di frumento preventivamente sottoposti a stress sub-letale da As₂O₃ e successivamente trattati con acqua o con il PUD in esame (As 45x), ha portato a risultati (**Tabella 3**) in linea con quanto osservato in precedenti sperimentazioni (Betti *et al.*, 1997; Brizzi *et al.*, 2005). Nello specifico l'applicazione dello stress abiotico ha indotto una marcata e statisticamente significativa riduzione della crescita del coleoptile di frumento; nel caso dei trattamenti S+0 e S+T è stata infatti osservata una lunghezza media del coleoptile inferiore del 22 e 11% rispettivamente, in relazione al controllo (C+0). Inoltre, se si considera l'effetto del PUD nel sistema stressato e non stressato è possibile osservare un incremento nella vigoria del coleoptile del 14% nel gruppo S+T e del 25% nel gruppo C+T rispetto ai relativi controlli (S+0 e C+0). L'effetto osservato è risultato particolarmente interessante nel contesto del sistema stressato, dove il PUD As 45x ha mostrato di determinare un miglioramento nel parametro di crescita del germoglio, inducendo un recupero degli effetti fito-tossici negativi dell'arsenico a dosi ponderali.

Tabella 3. Lunghezza (mm) dei coleptili e delle radici (primarie e secondarie) al termine dei 7 giorni di durata dell'esperimento. I dati sono rappresentati come valore medio \pm SD. C+0=controllo; C+T= controllo trattato; S+0= stressato; S+T= stressato trattato. N= numero di campioni.

N	PARAMETRI DI CRESCITA	C+0	C+T	S+0	S+T
140	Coleoptile	25.1 \pm 1.2 (b)	31.4 \pm 1.8 (a)	19.7 \pm 1.0 (d)	22.4 \pm 1.1 (c)
140	Radice primaria	59.3 \pm 3.3 (a)	64.4 \pm 5.3 (a)	47.7 \pm 3.4 (b)	51.9 \pm 2.1 (b)
140	Radice secondaria di sinistra	45.5 \pm 2.4 (c)	66.2 \pm 5.0 (a)	39.1 \pm 2.0 (d)	57.5 \pm 2.3 (b)
140	Radice secondaria di destra	46.5 \pm 3.3 (b)	65.8 \pm 6.0 (a)	39.6 \pm 2.1 (c)	51.2 \pm 2.3 (b)

Lettere diverse sulla stessa riga, indicano valori statisticamente differenti per $p < 0.05$.

Per quanto riguarda l'apparato radicale, ad eccezione della radice primaria in cui è stato osservato unicamente un effetto significativo dato dallo stress che determina una riduzione della lunghezza della radice, nella radice secondaria di destra e di sinistra sono stati osservati risultati simili a quelli riscontrati per il coleoptile. Infatti nel sistema stressato è possibile osservare come le lunghezze delle radici di sinistra e di destra presentino una maggiore lunghezza, statisticamente significativa (rispettivamente del 47% e 29% rispetto al controllo) quando il seme era stato fatto germinare in presenza del PUD.

In merito allo studio di germinazione, non sono state osservate differenze statisticamente significative; tuttavia sia nel sistema stressato che in quello non stressato è stato riscontrato lo stesso *trend*, ovvero un effetto stimolante da parte di As 45x, a conferma di quanto riportato da Betti *et al.* (2010). In particolare, nel sistema non stressato, la tesi sperimentale C+T ha mostrato una percentuale di germinazione pari al 92,9%, mentre per il controllo C+0 è stato registrato un valore di germinazione dell' 85%. Analogamente nel sistema stressato la percentuale di germinazione nel gruppo sperimentale stressato-trattato è risultata superiore (77,9%) rispetto a quella osservata nel gruppo stressato ma non trattato (72,9%).

Il modello di crescita utilizzato, riproducendo *in vitro* lo stress abiotico da accumulo di arsenico, si è dimostrato quindi un utile strumento per la valutazione gli effetti tossici dell'arsenico sulla crescita e sviluppo dei germogli di frumento e per indagare l'efficacia del trattamento isopatico As 45x nell'indurre un recupero sui parametri di crescita. Come illustrato nella presente sezione, l'arsenico in dosi ponderali provoca una marcata e significativa riduzione della lunghezza dei germogli e dell'apparato radicale (radice principale e secondarie), mentre il tasso di germinazione non ha evidenziato differenze statisticamente significative. I risultati ottenuti sono in linea con quanto riportato in letteratura da diversi autori. Liu *et al.* (2005) in un esperimento *in vitro*, prendendo in considerazione sei varietà di frumento tenero, hanno dimostrato come l'arsenico (As III e As V) in concentrazioni elevate influenzi negativamente i primi stadi di sviluppo della pianta,

osservando effetti più marcati sulla lunghezza dell'apparato radicale rispetto alla lunghezza del germoglio e appurando come la germinazione sia uno dei parametri sui cui la tossicità dell'arsenico influisce in minor misura. Lo stesso effetto era stato precedentemente osservato da Kapustka *et al.* (1995) in frumento, erba medica e lattuga fatti crescere in terreni contaminati da arsenico.

L'esperimento condotto ha inoltre messo in evidenza l'efficacia del PUD a base di arsenico nello stimolare la crescita di germoglio e radici sia nel sistema stressato che in quello non stressato, confermando i risultati ottenuti in una precedente sperimentazione (Betti *et al.*, 1997). Lo studio dell'effetto di PUD in modelli vegetali è documentato da un'ampia letteratura; Betti *et al.* (2009) ha revisionato le pubblicazioni dal 1969 al 2009 riguardanti esperimenti di efficacia dei PUD *in vitro*, *in planta* ed in pieno campo, mentre Jäger *et al.* (2011) ha revisionato le pubblicazioni scientifiche dal 1920 al 2010 sull'utilizzo dei PUD in modelli vegetali sottoposti a stress abiotici. Entrambe le *reviews* hanno messo in evidenza una criticità in merito alla validità scientifica delle pubblicazioni esaminate a causa dell'assenza di adeguate informazioni per l'interpretazione dei risultati. In tale contesto risulta di particolare interesse l'utilizzo di un valido modello vegetale per lo studio degli effetti di PUD in piante sottoposte a stress abiotici che sia stabile e accurato nella sua messa a punto (scelta dell'organismo test, scelta della sua fase di sviluppo, scelta dello stress abiotico, del momento di applicazione dello stress e dei tempi di valutazione) ed il modello utilizzato nella presente trattazione risponde a tali requisiti grazie alle sperimentazioni effettuate nel corso degli anni (Betti *et al.*, 1994 e 1997; Brizzi *et al.*, 2000, 2002, 2005 e 2011).

3.2 Valutazione di efficacia: analisi molecolari

Considerando gli interessanti risultati ottenuti nello studio di crescita *in vitro* dei semi di frumento, che hanno evidenziato un effetto da parte del PUD in esame nello stimolare la crescita del germoglio e delle radici, è stata condotta un'analisi molecolare approfondita per indagare se anche a livello di

trascrittoma fosse possibile osservare differenze tra i gruppi sperimentali in studio.

3.2.1 Analisi microarray

La purezza e l'integrità dell'RNA estratto è stata verificata utilizzando lo strumento Agilent Bioanalyser (Agilent 2100 RNA 6000 Nano LAbChip, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

Tabella 4. Risultati del controllo della purezza e dell'integrità dell'RNA utilizzato nell'analisi microarray. RIN= RNA Integrity Number.

ID del campione	Nome del campione	Volume (µL)	Quantità totale (µg)	µg/µL	RIN Bioanalyser	Idoneità del campione di RNA
1	A1	56	12	0.215	6.3	SI
2	A2	56	27.2	0.486	8.8	SI
3	A3	56	22.2	0.396	8.8	SI
4	B1	56	8.7	0.155	8	SI
5	B2	56	13.8	0.246	8	SI
6	B3	56	13.8	0.246	8.4	SI
7	C1	56	11.3	0.201	8.4	SI
8	C2	56	30.1	0.537	9.1	SI
9	C3	56	26.4	0.471	8.1	SI
10	D1	56	13.6	0.242	8.3	SI
11	D2	56	20.9	0.374	7.8	SI
12	D3	56	27.7	0.494	9.1	SI

Come illustrato in **Tabella 4** e negli elettroferogrammi riportati in **Figura 9**, tutti i campioni di RNA sono risultati accettabili per integrità e purezza e quindi idonei per l'analisi microarray.

Su un totale di 61127 *probe sets* presenti nel GeneChip® Wheat Genome Array della Affymetrix, 40398, corrispondenti al 66% del totale, hanno prodotto un segnale di ibridazione rilevabile, come illustrato in **Figura 10**.

Al fine di identificare i geni differenzialmente espressi in risposta all'applicazione del PUD sia nel sistema stressato che in quello non stressato, sono state condotte tre tipologie di confronto (**Tabella 5**): C+T vs C+0; S+T vs C+0; S+T vs S+0. Il confronto S+0 vs C+0 è stato inoltre effettuato per identificare i geni coinvolti in risposta allo stress sub-letale da arsenico. I dati

sono stati infine filtrati attraverso una soglia di fold change in scala logaritmica corrispondente a $\log_2 \text{fold change} > 1$ o < -1 in accordo con Eisen *et al.* (1998).

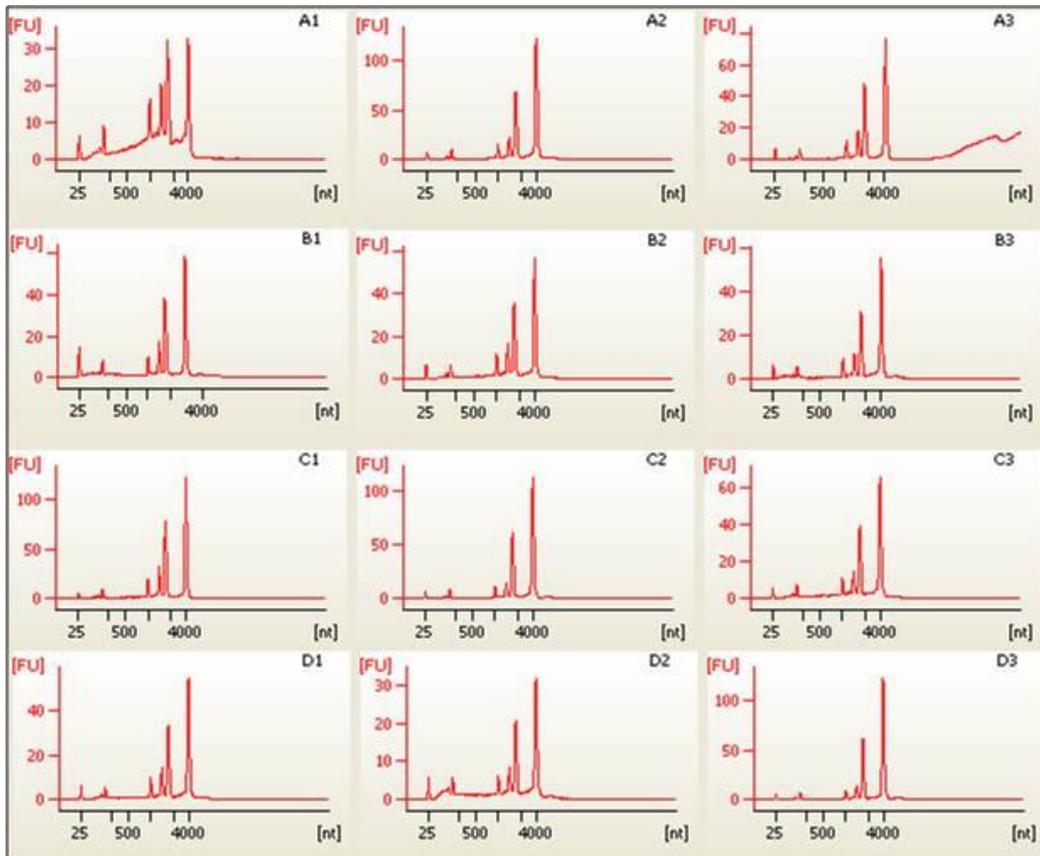


Figura 9. Elettroferogrammi dell'RNA dei 12 campioni in studio, ottenuti con lo strumento Agilent Bioanalyser. Tutti i campioni di RNA sono risultati integri, mostrando chiaramente i picchi dell' rRNA 18S e 28S.

In **Tabella 5**, sono riportati i *probe sets* risultanti da questa analisi. Si può osservare come nel confronto S+0 vs C+0, in cui il fattore discriminante è lo stress, 635 geni su 747 corrispondenti all' 85%, vengono sovraespressi. Degno di nota è il fatto che se si considera il confronto S+T vs C+0, che si differenzia con la precedente comparazione per la presenza del trattamento con il PUD nel sistema stressato, si riscontra una netta diminuzione dei geni coinvolti nella risposta, ed in particolare 378 rispetto ai 747 osservati in S+0 vs C+0. Anche in questo caso la maggior parte di *probe sets* (89%) risultano essere sovraespressi. Questi dati lasciano ipotizzare una normalizzazione dell'espressione genica

operata da As 45x nel sistema stressato, portandola ai livelli osservati nel gruppo sperimentale di controllo (C+0).

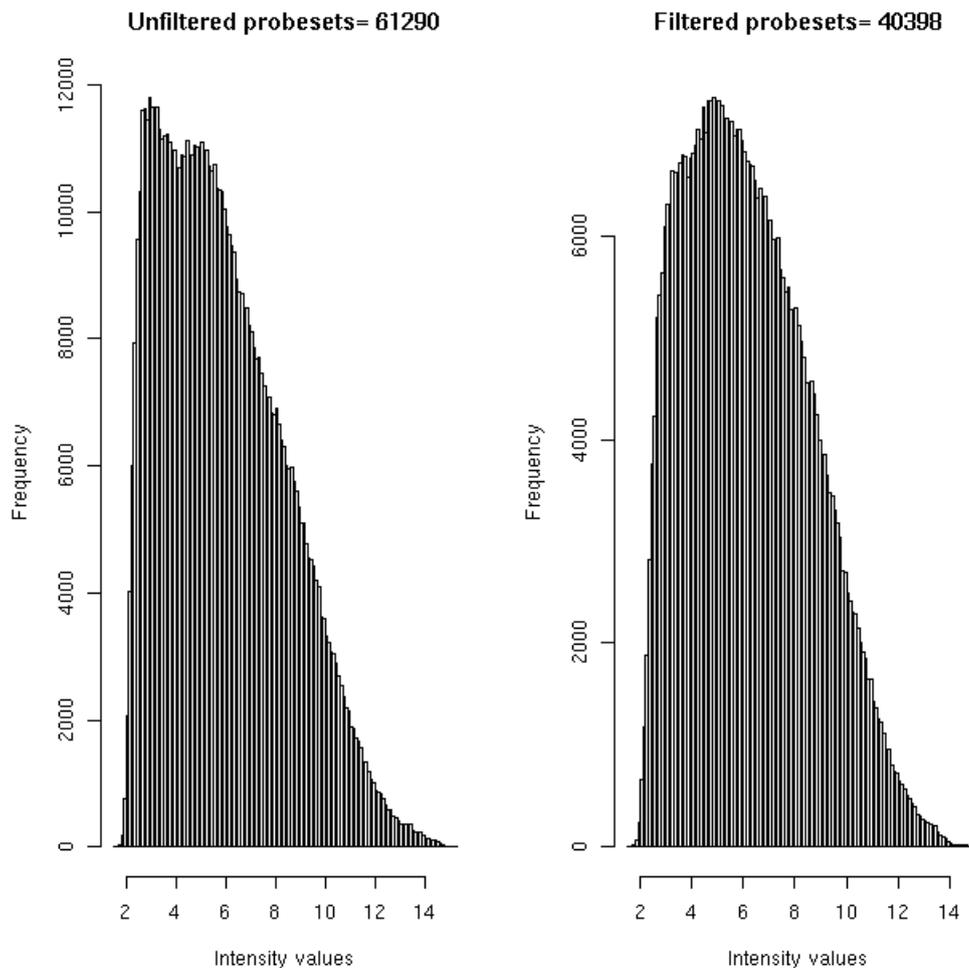


Figura 10. Grafici rappresentanti il valore di intensità registrato dei *probe sets* presenti nel GeneChip® Wheat Genome Array e la frequenza con cui tali *probe* sono stati rilevati, prima (a sinistra) e dopo (a destra) l'operazione di eliminazione del background, derivante da ibridazioni non specifiche e dalla naturale fluorescenza del chip.

Nel sistema non stressato C+T vs C+0, invece, dove il fattore differenziale è solamente il PUD, su un totale di 592 *probe sets*, 421 (71%) sono risultati sottoespressi, evidenziando come l'accrescimento del germoglio in presenza di As 45x determini una sottoespressione della maggior parte dei geni differenzialmente espressi. Lo stesso effetto di As 45x è stato riscontrato anche nel confronto S+T vs S+0 in cui il 65% dei trascritti (419 su un totale di 643) sono risultati essere sottoespressi.

Tabella 5. Numero di *probe sets* sovraespressi, sottoespressi e totali nelle quattro categorie di confronto considerate.

C+0=controllo; C+T= controllo trattato; S+0= stressato; S+T= stressato trattato.

CONFRONTI	<i>Probe sets</i> sovraespressi	<i>Probe sets</i> sottoespressi	<i>Probe sets</i> totali
C+T vs C+0	171	421	592
S+0 vs C+0	635	114	747
S+T vs C+0	332	46	378
S+T vs S+0	224	419	643

I *probe sets* differenzialmente espressi sono stati sottoposti ad una analisi comparativa, tramite diagrammi di Veen, al fine di distinguere i geni sovraespressi o sottoespressi propri di un gruppo di confronto e quelli invece comunemente presenti in due diverse interazioni (**Figura 11**). Come si può osservare in **Figura 11A**, nel sistema stressato, il confronto tra i gruppi S+0 vs C+0 e S+T vs C+0 evidenzia la presenza di 601 e 232 *probe sets* specificamente regolati nei germogli cresciuti in presenza di acqua o di As 45x rispettivamente; mentre 146 trascritti sono comuni ad entrambe le interazioni. Ne deriva che l'applicazione del PUD oltre a determinare il coinvolgimento di un numero inferiore di geni, rispetto a quelli attivati in presenza di acqua, determina l'attivazione di tipologie diverse di geni; la maggior parte dei geni differenzialmente espressi infatti nell'interazione S+T vs C+0 sono diversi rispetto a quelli attivati nell'interazione S+0 vs C+0. Allo stesso modo, se viene preso in considerazione contemporaneamente il sistema stressato e quello non stressato, in presenza o meno del PUD (C+T vs C+0 e S+T vs S+0), 169 *probe sets* sono comuni ad entrambe le interazioni, mentre 423 e 474 trascritti sono specificatamente regolati nel gruppo di confronto C+T vs C+0 e S+T vs S+0 rispettivamente (**Figura 11B**).

L'ipotesi della regolazione dell'espressione genica in risposta all'applicazione di PUD è stata esposta in molteplici pubblicazioni scientifiche ed in diversi ambiti di studio, dai mammiferi sino a lieviti e batteri (Khuda-Bukhsh e collaboratori, 1997, 2003, 2006, 2008). Secondo questa teoria, i PUD sarebbero in grado di

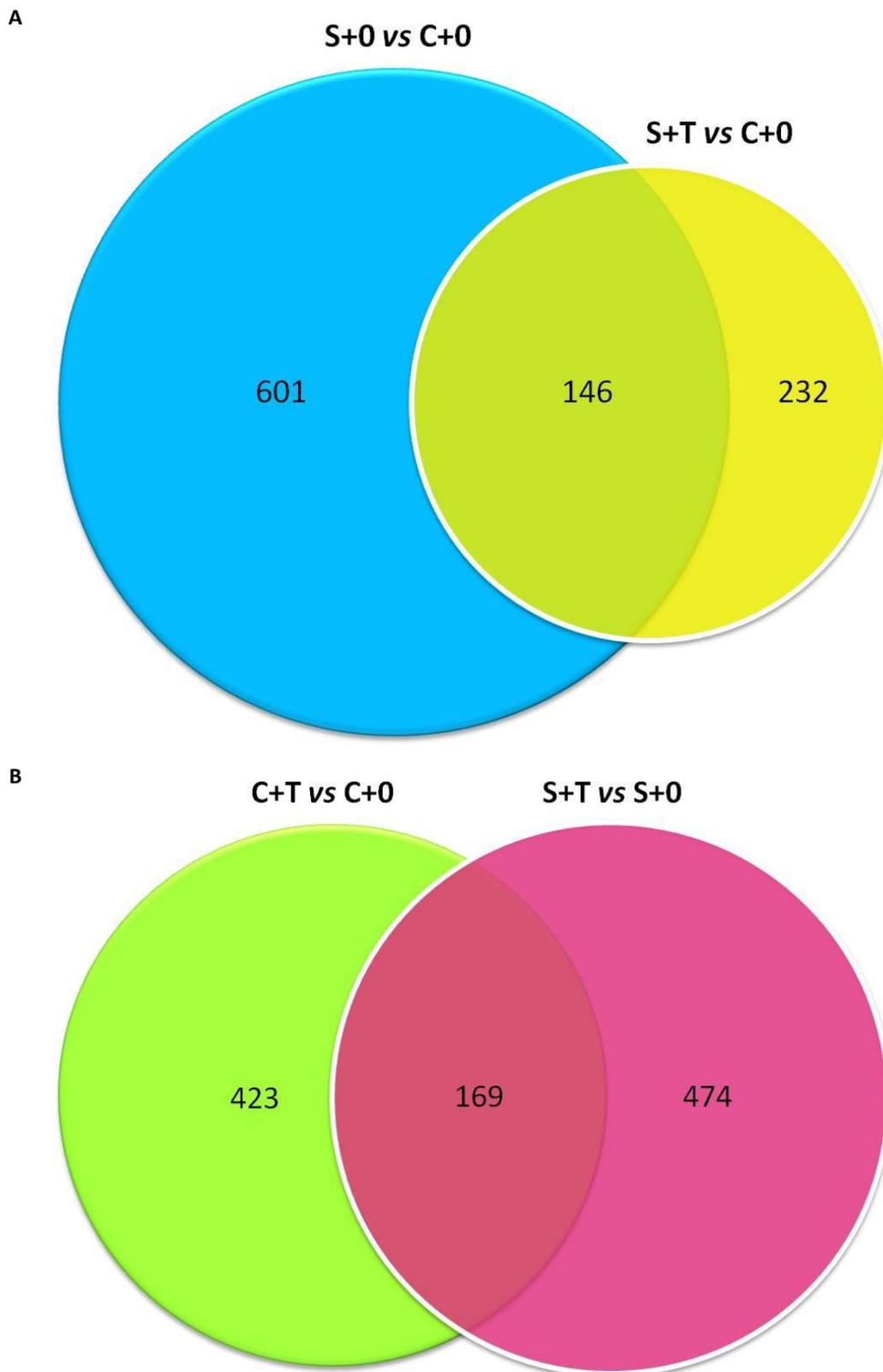


Figura 11. Rappresentazione grafica tramite diagramma di Venn dei geni differenzialmente espressi nelle diverse interazioni considerate. A) numero di geni trascritti nei gruppi sperimentali S+T e S+0 paragonati al controllo C+0; B) numero di geni trascritti nei gruppi sperimentali C+T e S+T rispetto ai relativi controlli (C+0 e S+0).

interagire con il meccanismo di segnalazione cellulare agendo come trigger di attivazione o repressione di specifici geni, determinando così la cascata del segnale, che si conclude con una modificazione dell'espressione genica. In aggiunta, Borghini *et al.* (2012) ha formulato la teoria secondo la quale l'effetto di regolazione dei PUD sull'espressione genica sia di natura epigenetica. Un recente studio (Khuda-Bukhsh *et al.*, 2014) ha evidenziato la capacità dei PUD di modificare in cellule tumorali l'attività istonica mediante fenomeni di acetilazione/deacetilazione.

Allo scopo di indagare nel dettaglio l'impatto del PUD a base di arsenico nella crescita dei germogli di frumento *in vitro* sia nel sistema stressato che in quello non stressato e per meglio comprendere i meccanismi coinvolti nella risposta allo stress da arsenico ponderale, sono state elaborate delle rappresentazioni grafiche (MapMan 3.5.1) che illustrano congiuntamente, i geni *up/down* regolati, i *pathways* metabolici di appartenenza e l'intensità dell'espressione dei geni differenzialmente espressi nei quattro gruppi di confronto presi in esame. Come si può osservare in **Figura 12, 13, 15, e 16** ogni singolo quadratino rappresenta un gene risultante dall'analisi microarray e dalle successive elaborazioni e la differenza nella loro colorazione dipende dal tasso medio di espressione di ciascun gene. La variazione nella regolazione genica è quindi rappresentata da una scala cromatica, dove al minimo di sottoespressione (-3) corrisponde il colore blu scuro, e al massimo di sovraespressione (+3) corrisponde il colore rosso. I geni sono stati inoltre suddivisi in gruppi in base al processo cellulare in cui essi sono coinvolti. Ne sono derivati geni implicati nel metabolismo primario (aminoacidi, lipidi, nucleotidi, fermentazione, vitamine e cofattori, carboidrati e ciclo dell'acido tricarbossilico), nel metabolismo secondario e in quello ormonale; geni coinvolti nei processi fotosintetici, nel trasporto mitocondriale di elettroni, nel trasporto dei metalli, nella costituzione della parete cellulare e nella degradazione dei composti xenobiotici; geni che codificano per proteine dello stress abiotico e biotico, geni coinvolti in attività cellulari quali organizzazione, trasporto, sviluppo e regolazione; geni codificanti per enzimi; geni coinvolti nel metabolismo proteico (sintesi,

modificazione, degradazione e *targeting*) e geni associati alla sintesi e riparazione del DNA e alla sintesi, regolazione e trasformazione dell'RNA.

Merita sottolineare che nel presente studio la maggior parte dei geni differenzialmente espressi e dei corrispondenti processi cellulari, sono noti per essere indotti dalla pianta in risposta a fattori di stress, inducendo la conseguente codifica di composti con funzione protettiva per l'organismo vegetale. Le proteine corrispondenti possono avere ruoli diversi nel complesso meccanismo di difesa:

- a) protezione diretta delle cellule vegetali: proteine HSPs (heat stress proteins), enzimi di detossificazione, osmoprotettori e agenti antiossidanti come i metaboliti secondari.
- b) attivazione della cascata del segnale e controllo trascrizionale: proteine chinasi, istoni e fattori trascrizionali.
- c) coinvolgimento in funzioni metaboliche come il metabolismo lipidico e proteico.

3.2.1.1 L'interazione S+0 vs C+0 e S+T vs C+0

La valutazione dell'effetto del triossido di arsenico ponderale nel sistema vegetale in studio è stata indagata, considerando l'interazione S+0 vs C+0; in **Figura 12** è possibile osservare la mappa MapMan relativa a tale gruppo di confronto. La maggior parte dei 747 geni differenzialmente espressi, sono regolati positivamente, mettendo in evidenza l'attivazione di una moltitudine di risposte biochimiche allo scopo di limitare e contrastare gli effetti fitotossici determinati dall'esposizione della pianta all'arsenico. L'interazione S+T vs C+0, che evidenzia invece l'effetto del PUD As 45x nei semi stressati rispetto al controllo, è riportata nella **Figura 13**.

Il metabolismo primario

L'analisi microarray ha permesso di evidenziare in particolare l'attivazione delle vie metaboliche cellulari riferibili al metabolismo primario. Nello specifico per quanto riguarda la via metabolica della sintesi degli aminoacidi 13 *probe sets*

risultano sovraespressi e di due probe *probe sets*, correlati alla degradazione del triptofano, uno è regolato positivamente e l'altro negativamente. Lo stesso *trend* è osservabile anche per i geni coinvolti nel metabolismo lipidico, con particolare riferimento alla sintesi degli acidi grassi e dei fosfolipidi di membrana, e alla degradazione enzimatica tramite lipasi; 19 geni sono stati identificati e tutti hanno mostrato una sovraespressione. È possibile osservare una regolazione positiva anche per i geni interessati nella sintesi dei nucleotidi, nel metabolismo dei carboidrati (CHO), nel ciclo dell'acido tricarbossilico, nel metabolismo di cofattori enzimatici e nelle vie fermentative. Tale regolazione genica può essere giustificata dall'aumento nella produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che si verifica a seguito dell'esposizione di una pianta all'arsenico. Quando l'accumulo di ROS supera la capacità di rimozione della pianta mediante il sistema antiossidante, essi determinano l'insorgere del danno ossidativo a scapito di proteine, aminoacidi e acidi nucleici causando perossidazione lipidica e una conseguente variazione della struttura e fluidità delle membrane cellulari (Garg e Singla, 2011). Suberina, cutina e cere a loro associate sono costituenti fondamentali delle pareti cellulari: formano una barriera tra la pianta e l'ambiente esterno e riducono la perdita di acqua. La cutina, componente principale della cuticola (struttura multi stratificata che riveste le pareti cellulari esterne dell'epidermide nelle parti aeree delle piante erbacee) è un polimero costituito da molti acidi grassi a lunga catena legati tra loro da legami estere a formare un rigido intreccio tridimensionale. La suberina è anch'essa un polimero formato da idrossi- ed epossidi- acidi grassi legati da ponti estere, che si trova nella parti ipogee della pianta, nel fusto e nelle cicatrici. Le cere sono miscele idrofobiche complesse di lipidi liberi a lunga catena associate sia alla cutina che alla suberina; nello specifico rivestono superiormente la cuticola e si trovano anche nei suoi strati mediani e inferiori. Gli acidi grassi e i fosfolipidi sono quindi componenti fondamentali delle membrane cellulari e delle pareti cellulari costituendo delle barriere protettive e contribuendo ad indurre la resistenza della pianta ad uno stress mediante: la modificazione della fluidità delle membrane, il rilascio di acido α -linolenico

mediante l'attività lipasica e la modulazione dell'espressione genica. In particolare è stato osservato come l'acido linolenico libero, oltre ad essere una molecola segnale coinvolta nella risposta agli stress ambientali, può indurre modificazioni della fluidità della membrana tramite il cambiamento nei livelli di saturazione degli acidi grassi che la compongono. La modificazione dei livelli di saturazione degli acidi grassi, la loro mobilizzazione e regolazione costituiscono importanti meccanismi attivati dalla pianta esposta ad uno stress sia di tipo biotico che abiotico (Upchurch, 2008).

Se si considera invece l'interazione S+T vs C+0 (**Figura 13**) il numero di geni differenzialmente espressi diminuisce in modo sostanziale (378 *probe sets*) e questo effetto è particolarmente evidente per il metabolismo primario. Nella via metabolica degli aminoacidi solamente 4 geni sono sovraespressi e 1 è sottoespresso; in quella degli acidi grassi emergono 7 geni tutti regolati positivamente e nella via degli acidi nucleici 2 *probe sets* in totale sono sovraespressi. Le sottoclassi CHO, TCA e vie fermentative non comprendono invece alcun gene, evidenziando un livello di espressione di tali geni nel gruppo S+T comparabile a quello del gruppo di controllo C+0.

Le proteine dello stress

Allo stesso modo è stata osservata una differente regolazione dei geni codificanti per le proteine legate allo stress sia di origine abiotica che biotica, nell'interazione S+0 vs C+0 e nell'interazione S+T vs C+0. Molti geni codificanti per proteine dello shock termico (*heat-shock proteins*, Hsp) e per proteine legate allo stress salino, stress da basse temperature e siccità sono sovraespressi nel sistema stressato in riferimento al controllo; la **Figura 12** evidenzia infatti la presenza di 15 *probe sets* differenzialmente espressi di cui 12 mostrano una regolazione positiva. Nel sistema stressato e trattato con il PUD (**Figura 13**) invece il livello di espressione di questi geni è paragonabile a quello riscontrato nel controllo (C+0). Gli *chaperones* molecolari sono una

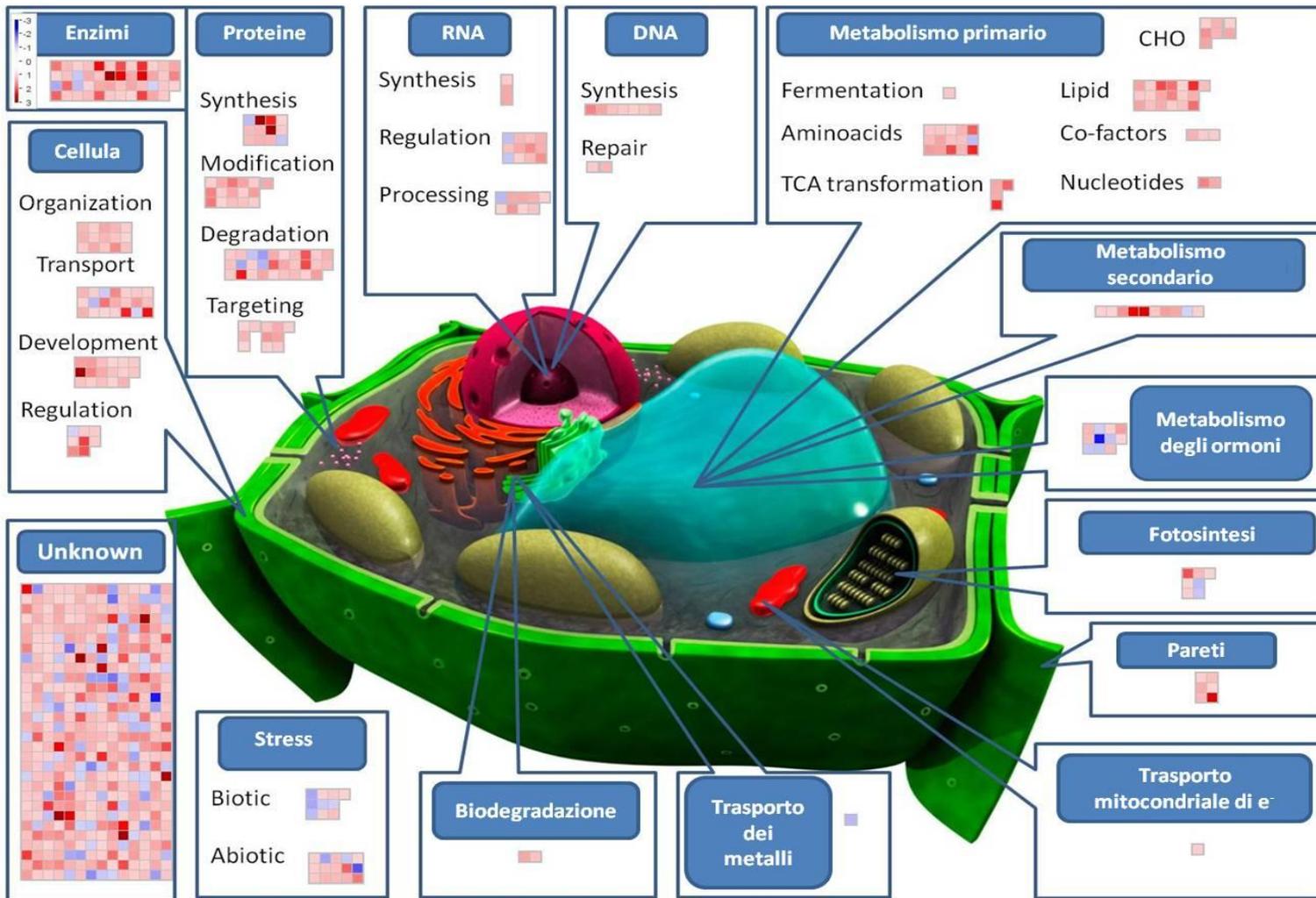


Figura 12. Rappresentazione grafica ottenuta mediante l'utilizzo di MapMan 3.5.1 dell'effetto sull'espressione genica dello stress abiotico da arsenico (As_2O_3 5mM) in germogli di frumento (S+0 vs C+0).

classe funzionale chiave di famiglie proteiche che contribuiscono all'omeostasi cellulare sia in condizioni fisiologiche che di stress. Il loro ruolo principale consiste nella prevenzione di associazioni non corrette e aggregazione di catene polipeptidiche non ripiegate per impedire la stabilizzazione di una proteina in una conformazione inattiva. Agiscono legandosi a superfici reattive nella proteina bersaglio che risultano esposte durante il processo di assemblaggio, utilizzando l'energia derivante dall'idrolisi di ATP. In questo modo gli *chaperones* impediscono che tali superfici interagiscano con altre regioni della proteina dando origine a forme scorrette. Molteplici proteine sono state riconosciute con attività chaperonica; molte di esse sono proteine dello stress ed in particolare Hsp, una classe proteica suddivisa in cinque principali famiglie altamente conservate (Hsp 70, chaperonine o Hsp 60, Hsp 90, Hsp 100 e sHsp). Le Hsp, nonostante siano state originariamente identificate in risposta a stress da elevate temperature, sono espresse nelle piante anche in seguito ad altre tipologie di stress abiotico tra cui lo stress ossidativo (Wang *et al.*, 2004); le diverse Hsp interagiscono tra di loro e possono essere attivate da specifici stress abiotici o per il mantenimento dell'omeostasi cellulare come è possibile osservare in **Figura 14**.

Altre proteine dello stress attivate sia nel sistema stressato (S+0) che in quello stressato e trattato (S+T), sono quelle legate a stress biotici, come è possibile osservare in **Figura 12** e in **Figura 13** rispettivamente. I geni codificanti per tali proteine sono risultati essere sia sovraespressi che sottoespressi in entrambi i sistemi. Nonostante le proteine legate a stress biotici vengano generalmente attivate a seguito del riconoscimento da parte della pianta di agenti come funghi, virus o batteri, un numero sempre maggiore di evidenze scientifiche supportano la teoria secondo la quale i *pathways* di segnalazione vegetale non consistano in vie indipendenti e separate, ma che al contrario costituiscano un elaborato *network* con frequenti interazioni e punti di convergenza rendendo possibile alle piante di regolare sia la risposta a stress di natura biotica che abiotica tramite le stesse vie di segnalazione (Fujita *et al.*, 2006).

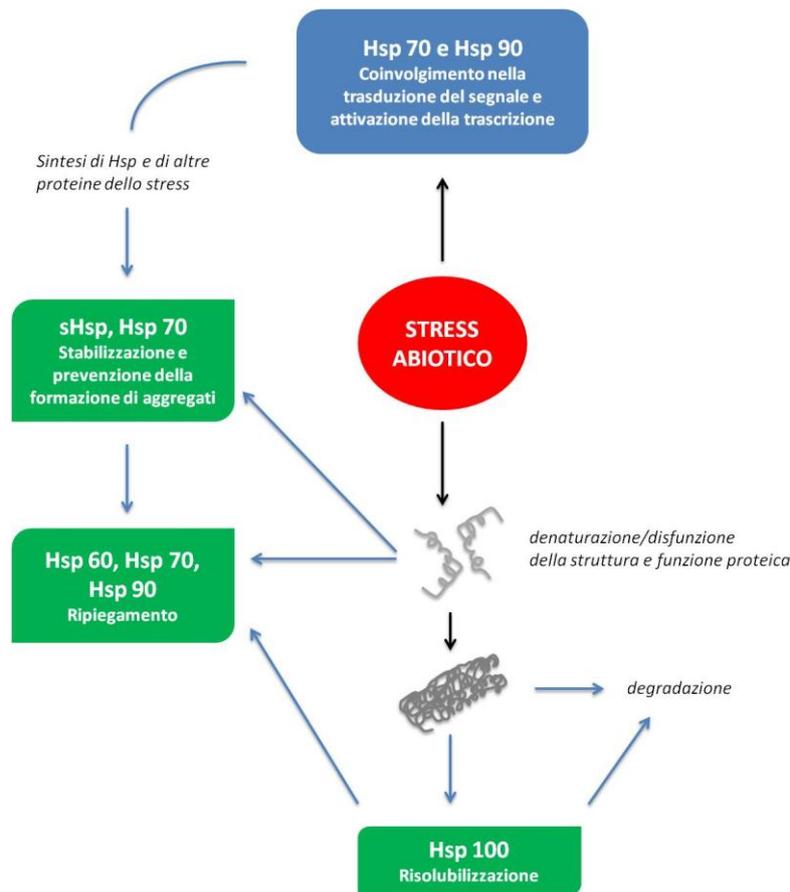


Figura 14. Hsp network in risposta ad uno stress abiotico

La fotosintesi

L'applicazione dello stress sub-letale a base di triossido di arsenico in frumento ha inoltre indotto la sovraespressione di alcuni dei geni coinvolti nei processi fotosintetici (proteine di trasporto, ATP sintasi ed enzimi del ciclo di Calvin); in **Figura 12** infatti si può osservare come 5 geni risultino regolati positivamente e 2 negativamente. L'arsenico è infatti in grado di danneggiare e alterare la struttura delle membrane dei cloroplasti, causando modificazioni funzionali del processo fotosintetico. Uno studio condotto da Miteva e Merakchiyska (2002) aveva già evidenziato come l'aumento dei livelli di arsenico portava ad una riduzione del tasso di fotosintesi in foglie di riso; il decremento del contenuto in clorofilla riscontrato era determinato dal cambiamento della forma dei cloroplasti e alla parziale distruzione delle loro membrane, causati dall'arsenico, con conseguente alterazioni nell'accumulo e flusso degli assimilati. Se si considera invece l'interazione S+T vs C+0,

solamente un *probe set*, corrispondente per i polipeptidi dei fotosistemi, viene differenzialmente espresso (**Figura 13**). Tale dato evidenzia come il trattamento As 45x applicato ai semi stressati riporti i geni coinvolti nei processi fotosintetici ad un livello di espressione pari a quelli del gruppo di controllo.

Gli acidi nucleici e gli istoni

Considerando l'interazione S+0 vs C+0, è inoltre evidente un chiaro effetto dell'arsenico nella sintesi, regolazione e maturazione degli acidi nucleici. In particolare 7 *probe sets* corrispondenti a differenti istoni e 2 geni coinvolti nella riparazione del DNA sono risultati sovraespressi. Una simile risposta è stata osservata per quanto riguarda i processi di trascrizione, regolazione della trascrizione e maturazione dell'RNA dove, su un totale di 24 *probe sets* differenzialmente espressi, l'88% è stato regolato positivamente. Inversamente nell'interazione S+T vs C+0, è stato osservato una netta riduzione dei geni coinvolti nei processi di sintesi e riparazione del DNA, registrando 4 e 1 *probe sets* differenzialmente espressi rispettivamente. Similmente per quanto riguarda l'RNA, dei 24 geni identificati nel sistema stressato, solamente il 46% si è riscontrata nel gruppo S+T rispetto al controllo; la maggior parte di questi geni, generalmente sovraespressi, è risultata coinvolta nei processi di regolazione della trascrizione. È interessante osservare come i risultati ottenuti suggeriscano un coinvolgimento degli istoni nella risposta allo stress da arsenico e nel successivo trattamento con il PUD As 45x.

Gli istoni sono un gruppo omogeneo ed evolutivamente conservato di proteine strutturali presenti in grande quantità nelle cellule. Costituiscono la componente strutturale della cromatina ed essendo proteine basiche cariche positivamente (ricchi di lisina e arginina), interagiscono con il DNA per formare strutture chiamate nucleosomi. In particolare ogni nucleosoma è costituito da circa 147 pb di DNA che si avvolgono due volte attorno ad un ottamero di istoni (*core*), costituito da due molecole di ciascuno degli istoni H2A, H2B, H3 e H4. I nucleosomi sono regolarmente spazati lungo il filamento di DNA, separati da

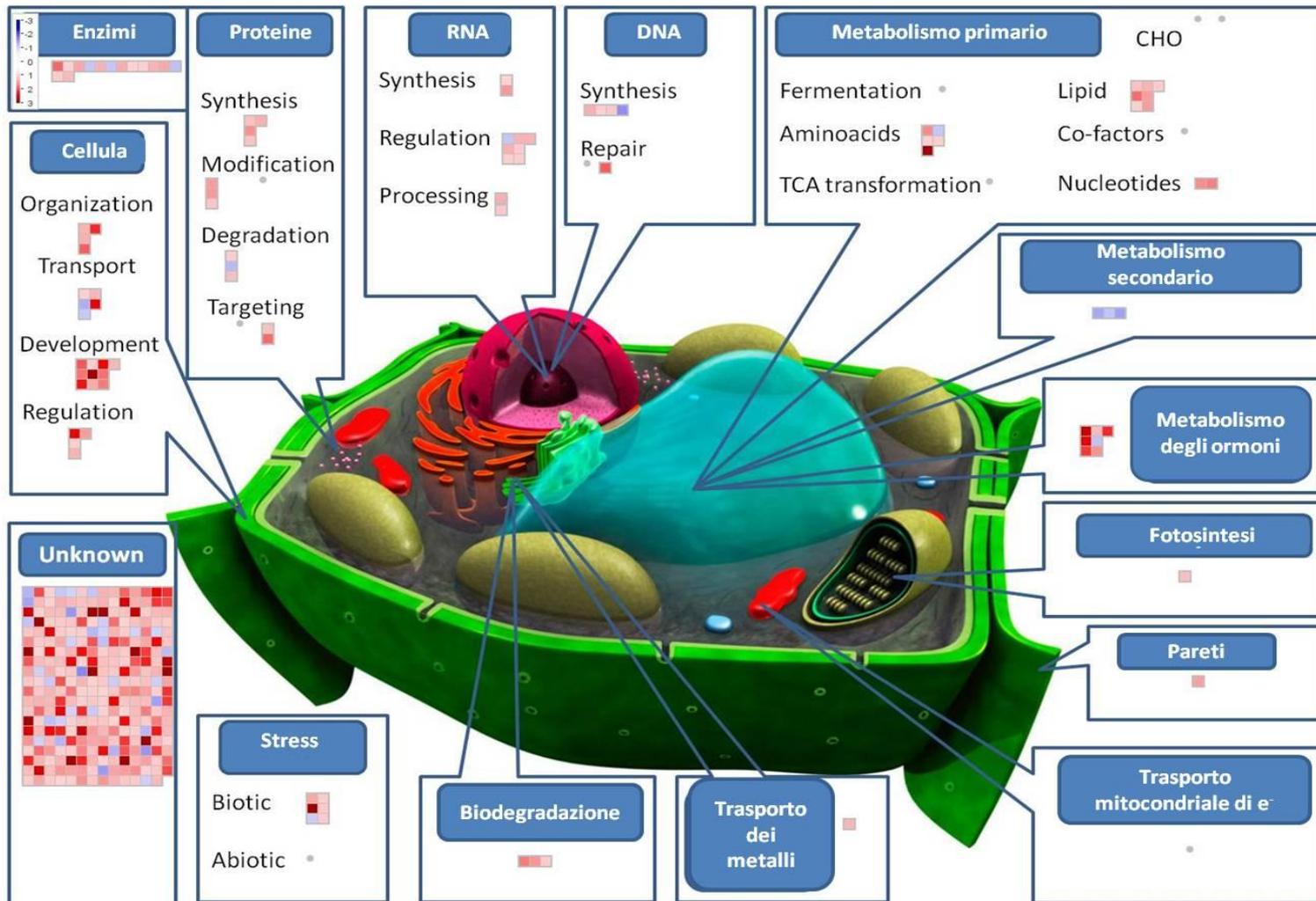


Figura 13. Rappresentazione grafica ottenuta mediante l'utilizzo di MapMan 3.5.1 dell'effetto sull'espressione genica dell'applicazione del PUD As 45x in germogli di frumento precedentemente sottoposti a stress abiotico da arsenico (As₂O₃ 5mM) (S+T vs C+0).

un numero di paia di basi compreso tra 10 e 100, formando il primo livello di organizzazione della cromatina. L' istone H1 che lega il DNA tra due nucleosomi, è invece responsabile del secondo livello di compattazione della cromatina. Per necessità di lettura genetica il nucleosoma è una struttura altamente dinamica che si avvale di specifici processi di rimodellamento ATP-dipendenti per permettere le operazioni trascrizionali.

Dato che la risposta agli stress passa attraverso la regolazione della trascrizione di migliaia di geni e di un ampio range di funzioni biochimiche e fisiologiche e che a livello genomico l'accessibilità alle sequenze del DNA è determinato dalla struttura della cromatina, è ipotizzabile che il meccanismo globale di regolazione genomica e che in particolare le modificazioni della cromatina siano meccanismi fondamentali nella risposta della pianta agli stress. Le modificazioni della cromatina sono inoltre alla base della regolazione epigenetica dell'espressione genica che coinvolge diversi processi: assemblaggio e disassemblaggio dei nucleosomi, sostituzione degli istoni canonici con varianti istoniche, modificazioni chimiche covalenti (fosforilazioni, acetilazioni, metilazioni, ecc.) degli istoni, riorganizzazione ATP-dipendente della struttura DNA-istoni e metilazione del DNA. Recenti ricerche hanno dimostrato come in particolare l'assemblaggio e disassemblaggio della cromatina durante la trascrizione e l'inserimento di varianti istoniche nel processo di rimodellamento della cromatina siano meccanismi coinvolti nella risposta delle piante a stress di tipo abiotico (Zhu *et al.*,2012). La natura propria delle modificazioni epigenetiche quindi, che non determinano cambiamenti nella sequenza del DNA, suggeriscono una potenziale plasticità di tale meccanismo di azione ed una influenza da parte delle modificazioni dell'ambiente esterno. È stato inoltre osservato che la cromatina può essere modificata non solo biochimicamente ma anche per interazione di forze elettromagnetiche. Considerando che recenti ricerche hanno dimostrato la capacità delle soluzioni ultra diluite di emettere segnali elettromagnetici (Montagnier *et al.*, 2009), si pone la suggestiva ipotesi di una possibile azione epigenetica dei PUD nei sistemi biologici (Borghini *et al.*, 2012). Questa teoria è

supportata da Bishayee *et al.* (2013), i quali hanno constatato la capacità di PUD di attivare meccanismi di regolazione di natura epigenetica in cellule tumorali umane.

Trasporto dei metalli e degradazione degli xenobiotici

Per quanto riguarda i geni coinvolti nell'espressione di proteine di trasporto dei metalli e di fattori per la degradazione degli xenobiotici, nel sistema stressato e in quello stressato e trattato sono state osservate risposte simili. Tuttavia mentre nell'interazione S+0 vs C+0 l'unico *probe set* differenzialmente espresso relativo al trasporto dei metalli risulta regolato negativamente, nell'interazione S+T vs C+0 mostra invece una sovraespressione, lasciando supporre un ruolo del PUD As 45x nell'attivazione di meccanismi di difesa.

L'attività cellulare

Considerando il gruppo funzionale delle attività cellulari che comprendono i processi di organizzazione, trasporto, sviluppo e regolazione mediante molecole segnale, è possibile osservare nei gruppi S+0 e S+T, paragonati al controllo C+0, una marcata differenza nel numero di geni differenzialmente espressi e nel tipo di regolazione. In particolare 62 *probe sets* sono risultati dall'interazione S+0 vs C+0, di cui 58 regolati positivamente e 4 negativamente, mentre nell'interazione S+T vs C+0, è stata rilevata una netta riduzione dei *probe sets* differenzialmente espressi (23, di cui 2 sottoespressi), indicando un effetto del PUD As 45x di riportare l'espressione genica ai livelli registrati per il controllo.

Per quanto riguarda il sistema di trasporto cellulare, geni codificanti proteine di trasporto appartenenti alla famiglia ABC (*ATP-binding cassette*) sono stati specificamente rilevati nel sistema stressato e non in quello stressato e trattato. La famiglia di proteine ABC comprende numerose proteine transmembrana che utilizzano l'energia liberata dall'idrolisi dell'ATP per trasportare molecole contro gradiente. Tra queste sono state individuate proteine MRP (Multidrug resistance protein) il cui ruolo consiste nell'estrudere

dal citoplasma sostanze tossiche penetrate nella cellula. Si tratta di pompe di efflusso per composti xenobiotici, in grado di trasportare un ampio spettro di substrati. (Moustafa *et al.*, 2004; Rai *et al.*, 2014).

Un aspetto molto importante nella risposta ad uno stress è il coinvolgimento delle molecole segnale nelle relative vie di trasduzione. In questo contesto le proteine chinasi rivestono un ruolo di primaria importanza, tanto che nell'indagine condotta geni differenzialmente espressi codificanti per proteine chinasi sono stati rilevati sia nel sistema stressato che in quello stressato e trattato, anche se in maggior misura nell'interazione S+0 vs C+0. Numerosi studi hanno infatti evidenziato come tali proteine segnale intervengano nel regolare la risposta agli stimoli derivanti dall'ambiente esterno ed in particolare è ampiamente documentata la loro attivazione in risposta a stress da arsenico (Islam *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2012; Jonak *et al.*, 2004). Un altro evento che si verifica a seguito del danneggiamento delle membrane cellulari causato da stress da metalli pesanti è l'aumento della concentrazione di Ca^{2+} nelle cellule vegetali (Stohs *et al.*, 1995). In condizioni normali infatti il calcio è presente nelle cellule in basse concentrazioni, ma la pianta è in grado di aumentare la concentrazione del calcio intracellulare che va ad agire come regolatore della crescita e dello sviluppo e della risposta a stress ossidativi, controllando una miriade di processi cellulari (Hepler, 2005; Huang *et al.*, 2012). In piante stressate da arsenico è stato osservato un incremento nella produzione di ROS e una successiva maggiore concentrazione di Ca^{2+} (Huang *et al.*, 2012). Un effetto sull'attivazione di geni codificanti per proteine di trasporto del calcio è stata osservata anche nell'interazione S+0 vs C+0 con la sovraespressione di 3 *probe sets*, mentre nel gruppo S+T nessun gene è risultato dall'analisi di confronto con il controllo, evidenziando un paragonabile livello di espressione dei geni coinvolti nel sistema di segnalazione del calcio.

Tra le molecole segnale individuate nel sistema in oggetto si trovano anche i fitormoni, molecole a basso peso molecolare riconosciute come importanti fattori di regolazione per la protezione della pianta sia da stress biotici che abiotici, mediante interazione sinergiche ed antagoniste (Fujita *et al.*, 2006). I

risultati ottenuti hanno dimostrato il coinvolgimento di geni codificanti per auxine, gibberelline, etilene, jasmonato e acido abscissico che sono risultati moderatamente sovraespressi (\log_2 FC compreso tra 1,0 e 1,3) nell'interazione S+0 vs C+0. Lo stesso trend è stato osservato anche nell'interazione S+T vs C+0 dove però la sovraespressione è risultata più marcata (\log_2 FC compreso tra 1,3 e 2,8) indicando quindi un legame tra l'attivazione della regolazione della risposta mediata da ormoni e il trattamento dei semi stressati con il PUD As 45x. Altri *probe sets* differenzialmente espressi ed in particolare regolati negativamente (\log_2 FC compreso tra -1,2 e -2,3) in entrambe le interazioni sono quelli relativi agli ormoni brassinosteroidi. I brassinosteroidi sono una classe di fitormoni coinvolti nei processi di accrescimento dei tessuti vegetali, incluso l'allungamento del coleptile; la sottoespressione dei geni codificanti per tali ormoni sia nel gruppo S+0 che nel gruppo S+T rispetto a C+0 è in accordo con l'effettiva minore lunghezza riscontrata nei coleptili dei semi stressati e stressati-trattati rispetto ai germogli dei semi di controllo (**Tabella 2**).

Il metabolismo secondario

Anche il metabolismo secondario è frequentemente coinvolto nella risposta delle piante sottoposte ad uno stress biotico o abiotico. I metaboliti secondari infatti hanno un'azione protettiva nei confronti degli stress, agendo a livello cellulare come regolatori di crescita delle piante, modulatori dell'espressione genica e come composti implicati nella trasduzione del segnale. In base alla specifica via biosintetica che li origina tali composti sono classificati in tre grandi famiglie: fenoli, terpeni e alcaloidi. Finnegan e Chen (2012) hanno dimostrato che l'esposizione di piante all'arsenico induce una produzione di specie reattive dell'ossigeno che a loro volta stimolano la produzione di metaboliti antiossidanti ed enzimi coinvolti nella difesa antiossidante. Questo effetto è stato riscontrato anche nel presente studio in cui sono stati individuati geni codificanti per diversi metaboliti secondari (isoprenoidi, fenilpropanoidi e composti fenolici). Nell'interazione S+0 vs C+0, 10 *probe sets* sono stati rilevati ed eccetto per un *probe* regolato negativamente, è stata

riscontrata una netta sovraespressione riportando un \log_2FC compreso tra 1,0 e 2,6. Al contrario nel sistema stressato e trattato con il PUD in relazione con il controllo, sono stati rilevati solamente 3 *probe sets* caratterizzati da regolazione negativa. Anche in questo caso l'effetto osservato può essere spiegato con la ipotetica capacità di As 45x di riportare nelle piante stressate, condizioni metaboliche simili a quelle delle piante di controllo.

Proteine ed enzimi

In condizioni di stress di elevata entità, in cui si verificano alterazioni delle macromolecole di DNA, RNA, proteine e lipidi che possono compromettere l'integrità cellulare e genomica, le risposte attivate dalla pianta spesso comprendono *pathways* di degradazione proteica per evitare l'accumulo di aggregati potenzialmente pericolosi e per eliminare proteine dall'attività compromessa. La proteolisi quindi svolge un'importante ruolo nelle vie di risposte agli stress riconoscendo spesso peculiari caratteristiche di danno proteico quali l'ossidazione o errori di ripiegamento (Flick e Kaiser, 2012). La proteolisi può avvenire per opera di idrolasi localizzate nei lisosomi, oppure mediante la formazione del sistema ubiquitina-proteosoma che è responsabile di circa il 90% della degradazione proteica extra lisosomiale.

In accordo con la letteratura, nei semi stressati con arsenico ponderale è stata riscontrata la sovraespressione di molteplici geni (25 geni sovraespressi e 4 geni sottoespressi) codificanti per fattori di degradazione proteica, quali proteasi, peptidasi e sistema ubiquitina-proteosoma. Inversamente, nei semi stressati e trattati con il PUD l'espressione di questi geni è risultata paragonabile a quella delle piante di controllo (2 *probe sets* sovraespressi e 1 sottoespresso).

Lo stesso trend è stato osservato anche per i geni coinvolti negli altri processi del metabolismo proteico: mentre nell'interazione S+0 vs C+0 numerosi sono i geni diversamente espressi (39) e caratterizzati da una diffusa sovraespressione, nel gruppo S+T solo 9 *probe sets* si differenziano dal gruppo di controllo C+0.

Analisi di espressione genica hanno messo in evidenza come molti enzimi e proteine di trasporto facenti parte del sistema di detossificazione cellulare vengono attivati nelle piante superiori come conseguenza dell'esposizione a stress abiotici di diversa tipologia, tra cui lo stress da metalli pesanti (Narusaka *et al.*, 2004); si tratta principalmente di isoforme del citocromo P450, di -glucosil, -monil e glutatione trasferasi, che possono essere presenti in modo costitutivo oppure indotti specificamente in presenza di ioni metallici o agenti stressanti. La famiglia del citocromo P450 nello specifico, oltre ad essere coinvolta nella biosintesi di diversi composti endogeni lipofilici, svolge un ruolo chiave nella detossificazione dei tessuti cellulari. Tuttavia, nonostante la sua fondamentale funzione non sono ancora noti i *patterns* che determinano l'induzione dei citocromi P450 in risposta a stress biotici ed abiotici. Così come riportato in letteratura, anche nello studio condotto numerosi geni codificanti per P450 sono risultati sovraespressi in modo sostanziale nel gruppo S+0 riportando un log₂FC compreso tra 1,1 e 3,4. Al contrario nel sistema stressato e trattato con il PUD, i geni emersi nell' interazione S+0 vs C+0, non si sono riconfermati, indicando come As 45x possa influire sul sistema stressato portando i livelli di espressione pari a quelli riscontrati nelle piante di controllo. Le glutatione-s-transferasi (GST) sono proteine ubiquitarie nelle piante in grado di detossificare composti xenobiotici ed endobiotici mediante il legame covalente del glutatione (GSH), il regolatore non enzimatico più importante per il mantenimento dell'omeostasi redox intracellulare, al substrato idrofobico. Oltre ad essere principalmente coinvolte nella detossificazione da xenobiotici, tali proteine fanno parte del *pattern* di protezione delle cellule da stress biotici ed abiotici di diversa natura. In particolare è nota la loro induzione negli stress da metalli pesanti (Chakrabarty *et al.*, 2009). Nonostante tali peculiari caratteristiche che porterebbero a supporre un'ampia induzione dei geni codificanti le GST nel sistema stressato in esame, solamente un numero estremamente ridotto di *probe sets* sono risultati differenzialmente espressi sia nel gruppo S+0 che nel gruppo S+T (in relazione al controllo). Una spiegazione all'effetto osservato potrebbe essere legata al tempo in cui è stata condotta

l'analisi di espressione genica rispetto all'applicazione dello stress. Zhu *et al.* (2008) hanno infatti osservato una elevata espressione di GST in semi di cotone da 6 a 24 ore dopo l'applicazione dello stress. Considerando che l'analisi microarray è stata condotta su RNA estratto dai germogli di frumento al termine dei 7 giorni di durata dell'esperimento, è quindi plausibile che non sia stato osservato un elevato coinvolgimento di geni codificanti per GST in particolare nelle piante stressate.

Le perossidasi sono un gruppo di enzimi localizzati nel vacuolo, nelle pareti cellulari, nelle membrane tilacoidali e negli spazi extracellulari, coinvolte nei meccanismi di difesa della pianta nei confronti dei ROS; svolgono sia un ruolo di detossificazione cellulare sia di protezione, facendo parte degli enzimi *scavenger* dei radicali dell'ossigeno. L'analisi di espressione genica effettuata ha messo in evidenza una significativa sottoespressione dei geni codificanti per le perossidasi sia nel sistema stressato che in quello stressato e trattato in relazione al controllo (C+0). Lo stesso effetto è stato riportato da Chakrabarty *et al.* (2009) in uno studio condotto su germogli di riso stressati con arsenico. La sottoespressione delle perossidasi riscontrata è stata giustificata come una conseguenza del danneggiamento delle membrane tilacoidali provocata dall'attività lipossigenasica indotte dall'arsenico. Considerando che nei semi di frumento stressati con arsenico, parallelamente alla sottoespressione dei geni codificanti le perossidasi è stata osservata anche l'attivazione del sistema di degradazione delle pareti cellulari, l'ipotesi elaborata da Chakrabarty *et al.* (2009) può essere assunta per spiegare l'effetto riscontrato nelle interazioni S+0 vs C+0 e S+T vs C+0.

3.2.1.2 L'interazione C+T vs C+0 e S+T vs S+0

Prendendo in considerazione le interazioni C+T vs C+0 (**Figura 15**) e S+T vs S+0 (**Figura 16**) è possibile indagare lo specifico effetto del PUD As 45x nel sistema stressato e in quello non stressato. Le **Figure 15 e 16** mostrano chiaramente una diffusa sottoespressione (colore blu-azzurro) dei *probe sets* differenzialmente espressi rilevati nei gruppi C+T e S+T in relazione ai

corrispondenti controlli (C+0 e S+0). Un simile effetto è stato documentato da Suzuki *et al.* (2006) in colture cellulari di tabacco trattate con elicitatori di origine fungina. Mentre l'aumento dell'espressione di un ampio spettro di geni codificanti per fattori coinvolti in *pathways* di difesa della pianta a stress di tipo biotico e abiotico, è ampiamente conosciuta, le informazioni relative alla regolazione negativa della trascrizione durante la risposta di difesa agli stress sono ad oggi limitate. Tuttavia la diffusa sottoespressione genica riscontrata in concomitanza con l'applicazione di uno stress e con l'attivazione di *pathways* di difesa, indica una chiara associazione tra questi fattori (Suzuki *et al.*, 2006).

Nonostante la predominante regolazione negativa dei livelli di trascrizione genica, alcune classi funzionali sono emerse per una sovraespressione dei relativi *probe sets*; nello specifico i geni coinvolti nel metabolismo degli ormoni e nel metabolismo secondario sono risultati sottoposti ad una regolazione comparabile nelle interazioni C+T vs C+0 e S+T vs S+0. L'associazione tra attivazione del metabolismo degli ormoni e accumulo di metaboliti secondari nelle cellule vegetali in presenza di uno stress è stato osservato in diverse specie vegetali; in particolare Mamelik *et al* (2001) hanno riportato come fitormoni quali jasmonato ed etilene in condizione di stress vengano sovraespressi ed agiscono come molecole segnale per l'induzione della biosintesi di proteine di difesa e di metaboliti secondari con attività antiossidante. Nella tesi C+T la sovraespressione osservata ha coinvolto in particolar modo i geni codificanti per i fitormoni auxina, brassinosteroidi e jasmonato, mentre nella tesi S+T la sovraespressione ha interessato soprattutto i geni codificanti l'acido abscissico e l'etilene. Anche se gli ormoni attivati sono differenti nelle due interazioni, è tuttavia degno di nota l'effetto di stimolazione sul metabolismo degli ormoni che il preparato As 45x ha dimostrato di determinare sia nel sistema stressato che in quello non stressato. Come anticipato lo stesso effetto esercitato dal PUD è stato osservato anche nei geni coinvolti nel metabolismo secondario; in particolar modo i *probe sets* codificanti per la PAL (fenilalanina ammonia liasi), enzima chiave di

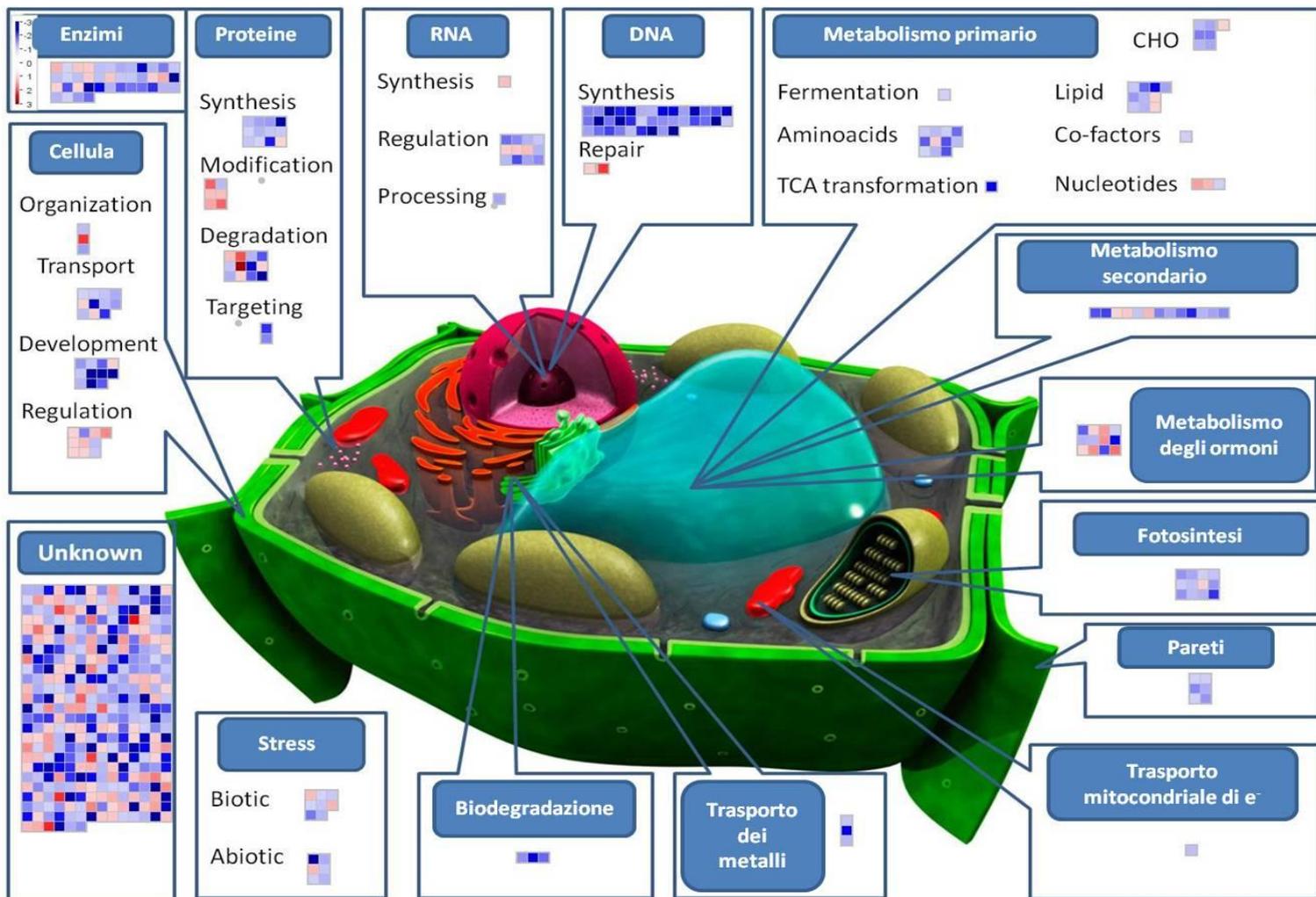


Figura 15. Rappresentazione grafica ottenuta mediante l'utilizzo di MapMan 3.5.1 dell'effetto sull'espressione genica dell'applicazione del PUD As 45x in germogli di frumento (C+T vs C+0).

connessione tra il metabolismo primario e il metabolismo secondario, sono stati particolarmente attivati in entrambe le interazioni. La PAL infatti a partire da un prodotto della via biosintetica dell'acido scichimico, l'aminoacido L-fenilalanina, mediante deaminazione permette la conversione in acido trans-cinnamico, precursore di molti composti fenilpropanoici. I dati riportati relativamente alla sovraespressione riscontrata a livello ormonale e del metabolismo secondario suggeriscono come, nonostante la diffusa sottoregolazione osservata nelle due interazioni in oggetto, il PUD As 45x possa agire come stimolatore dell'attivazione di specifici *pathways*.

Considerando l'interazione C+T vs C+0 è stata riscontrata una specifica attivazione dei geni codificanti per proteine chinasi e proteine coinvolte nel metabolismo proteico (modificazione e degradazione) non osservata invece nel sistema stressato (S+T vs S+0). Dato che tali proteine rivestono un ruolo fondamentale nella segnalazione, interazione e modificazione cellulare, è altamente probabile che As 45x rappresenti, in un sistema non stressato, una sorta di stimolazione per tali processi.

Inversamente nell'interazione S+T vs S+0 è stata rilevata una particolare attivazione dei geni del trasporto dei metalli, del trasporto mitocondriale degli elettroni e degli stress biotici, non riscontrata invece nel sistema non stressato (C+T vs C+0). L'induzione di questi geni è facilmente correlabile con l'applicazione dello stress sub-letale a base di triossido di arsenico che caratterizza l'interazione oggetto di studio.

Le due interazioni considerate nella presente sezione, C+T vs C+0 e S+T vs S+0, hanno mostrato *pattern* di espressione genica comparabili, nonostante tali sistemi differiscano per un fattore fondamentale che è lo stress abiotico da accumulo di As₂O₃ 5mM. L'effetto osservato suggerisce come il modello di crescita *in vitro* utilizzato, essendo un sistema di germinazione e crescita artificiale, possa costituire un elemento di stress per i semi di frumento, provocando l'attivazione di risposte di difesa e protezione anche nel sistema non stressato (C+T vs C+0).

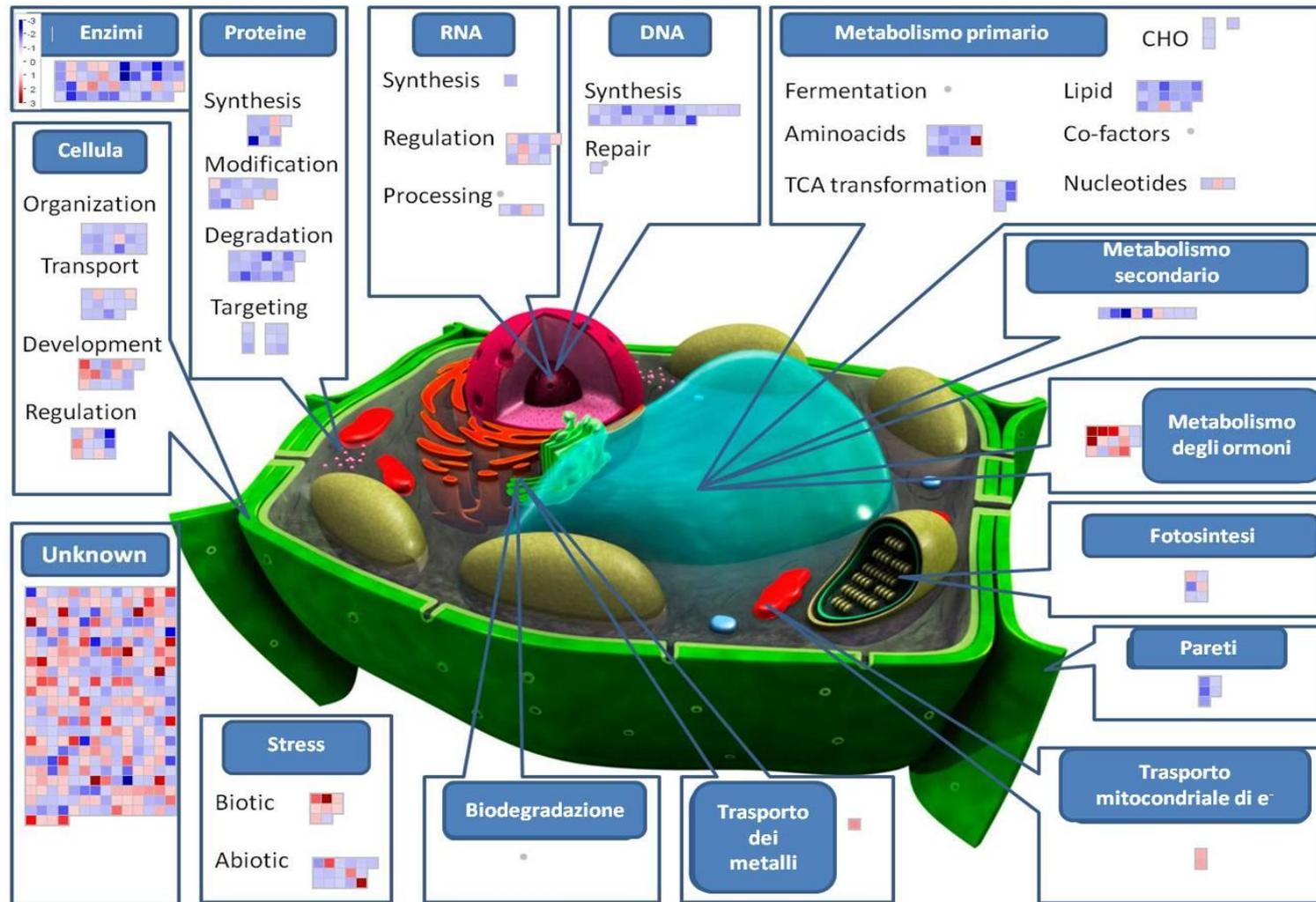


Figura 16. Rappresentazione grafica ottenuta mediante l'utilizzo di MapMan 3.5.1 dell'effetto sull'espressione genica dell'applicazione del PUD As 45x in germogli di frumento precedentemente sottoposti a stress abiotico da arsenico (As₂O₃ 5mM) (S+T vs S+O).

3.2.2 qRT-PCR

La PCR Real-time è considerata la metodica *gold standard* per la misurazione dell'espressione genica ed è spesso utilizzata per confermare i livelli di espressione ottenuti tramite l'analisi microarray. Quest'ultima tecnica infatti pur permettendo di analizzare la trascrizione di un intero genoma contemporaneamente ed in modo rapido, non fornisce dati di espressione assoluti.

Un totale di 55 *probe sets* differenzialmente espressi rilevati mediante analisi microarray e codificanti per proteine legate alla risposta allo stress sono stati sottoposti a validazione mediante analisi di qRT-PCR. In particolari sono stati selezionati in modo casuale geni sovraespressi o sottoespressi appartenenti alle diverse classe funzionale in cui i geni sono stati raggruppati come riportato in **Tabella 1**.

Per valutare il grado di correlazione tra i dati di espressione genica ottenuti mediante microarray e qRT-PCR è stato utilizzato il coefficiente di correlazione R di Pearson, che individua relazioni di tipo lineare tra le variabili messe a confronto e assume valori compresi tra -1 e 1. L'analisi statistica applicata ha permesso di evidenziare un buon grado di correlazione, corrispondente a $R^2 = 0,77$ per $P < 0,05$, validando così i dati di espressione genica derivanti dall'analisi microarray (**Figura 17**).

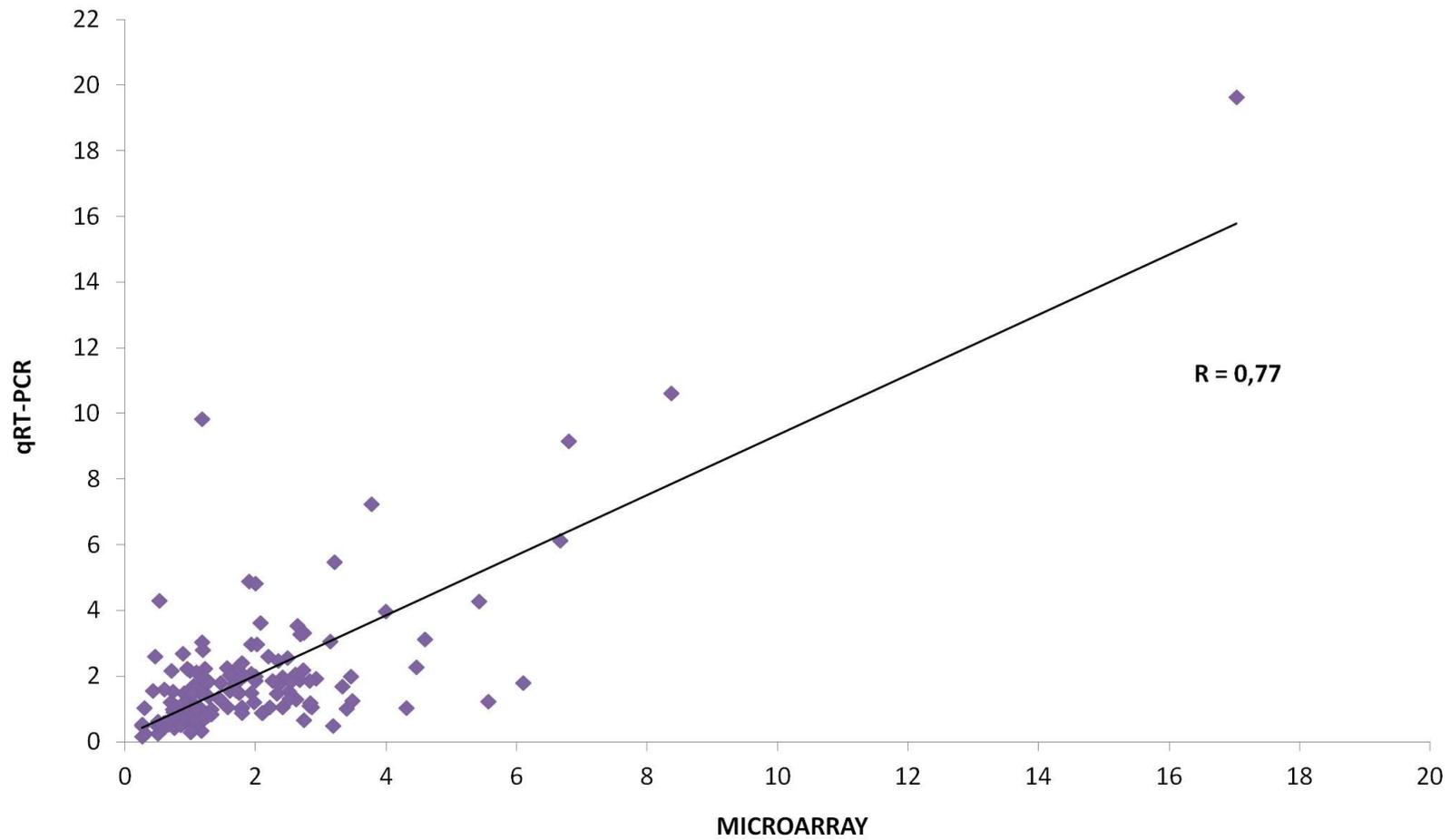


Figura 17. Rappresentazione grafica, tramite diagramma a dispersione, della correlazione tra i dati di espressione genica ottenuti con analisi microarray e qRT-PCR. Il coefficiente di correlazione di Pearson $R = 0,77$ indica l'esistenza di una relazione lineare positiva fra le due variabili considerate ($p < 0,05$).

4. CONCLUSIONI

La rapidità del cambiamento delle condizioni climatiche e il conseguente aumento delle aree sottoposte a stress abiotici, mettono a rischio le capacità adattative delle piante e determinano una forte limitazione della produzione agraria. Per tali motivi lo studio degli stress abiotici e delle strategie adottate dalle piante per adattarsi alle diverse condizioni di stress, sono oggetto di particolare interesse da parte della comunità scientifica.

Tra gli stress abiotici, l'inquinamento da metalli pesanti riveste oggi un fattore di non poca rilevanza se si considera l'entità delle immissioni nell'ambiente di tali microelementi tossici per la pianta, anche in basse concentrazioni, per opera delle attività industriali e agricole. L'arsenico in particolare è il più tossico metalloide conosciuto e desta preoccupazione a livello mondiale a causa della sua ampia diffusione come inquinante ambientale. Si stima che annualmente le emissioni naturali di arsenico ammontino a circa 8000 tonnellate, mentre le emissioni antropiche siano pari a circa 23.000 tonnellate (ovvero tre volte le emissioni naturali) (WHO Regional Office for Europe, 2000). Inoltre se dagli anni 40' agli anni 90' del passato secolo si è osservato un netto decremento nei consumi e quindi nella produzione di tale metalloide (da circa 70.000 tonnellate l'anno nei primi anni quaranta a circa 33.000 tonnellate l'anno nel 1989), dagli anni 90' ad oggi si è verificato un nuovo incremento nella produzione di arsenico (nel 2014 la produzione mondiale è risultata pari a circa 46.000 tonnellate) (Statistica, 2015). Gli elevati consumi di arsenico fino alla seconda guerra mondiale sono da ascrivere all'ampio uso di questo elemento per la preparazione di pesticidi (in particolare insetticidi) e di diverse specialità cosmetiche: a seguito della riscontrata tossicità tale elemento è stato rimpiazzato con altri composti, determinando quindi una forte riduzione della sua produzione. Tuttavia il recente sviluppo tecnologico (in particolare nel settore dei semi-conduttori) ha causato un nuovo incremento dei consumi e della relativa produzione.

L'arsenico a causa della sua elevata mobilità viene rilevato ad elevate concentrazioni nei suoli, nelle acque naturali e nell'atmosfera; di conseguenza tutti gli organismi sono continuamente esposti a questo elemento ed hanno perciò sviluppato specifiche vie metaboliche di detossificazione. Nella pianta se l'arsenico non viene detossificato può attivare una catena di eventi in grado di interrompere la fotosintesi e la respirazione con conseguente inibizione della crescita, disordini metabolici e morte della pianta.

Il modello di crescita utilizzato nel presente studio si è dimostrato un utile strumento per riprodurre *in vitro* lo stress abiotico da arsenico (As_2O_3 5 mM) e per valutare gli effetti fitotossici da esso indotti su germogli di frumento. A tale scopo sono stati considerati parametri morfometrici quali percentuale di germinazione, lunghezza del coleoptile e delle radichette seminali; in aggiunta mediante l'analisi del trascrittoma è stato possibile indagare gli effetti dell'arsenico a livello fisiologico e le vie metaboliche coinvolte nella risposta di difesa della pianta. E' stato osservato come l'arsenico in dosi ponderali provochi una marcata e significativa riduzione della lunghezza dei germogli e dell'apparato radicale (radice principale e secondarie), confermando i numerosi dati presenti in letteratura sulla fitotossicità dell'arsenico in diverse specie vegetali. A livello molecolare lo studio dell'interazione tra le tesi "seme stressato e trattato con acqua" e "seme non stressato e trattato con acqua" (S+0 vs C+0) ha permesso di evidenziare i *pathways* metabolici specificamente attivati nel frumento come conseguenza dell'applicazione dello stress con triossido di arsenico.

In particolare sono stati attivati tipici meccanismi di protezione delle cellule vegetali dagli stress, come la sovraespressione di geni codificanti per *chaperones* molecolari come le Hsp o per proteine di trasporto dei metalli e di fattori per la degradazione degli xenobiotici. È stata riscontrata una chiara attivazione dei processi del metabolismo primario (lipidi, aminoacidi, nucleotidi), della fotosintesi e delle attività cellulari tra le quali la regolazione mediante molecole segnale ed una netta sovraespressione ha riguardato anche fattori coinvolti nel metabolismo secondario e nella degradazione proteica. I

risultati di espressione genica ottenuti vanno quindi ad arricchire le conoscenze sui processi fisiologici attivati dagli organismi vegetali a seguito dell'esposizione di questo contaminante tossico.

Data l'emergenza ambientale e la diffusione di sistemi agricoli a basso impatto, considerati come una risorsa per una gestione sostenibile in agricoltura e per la tutela delle risorse naturali, un ulteriore aspetto del presente studio è stato quello di valutare l'efficacia del PUD As 45x nel limitare gli effetti fitotossici indotti dall'arsenico. Tale prodotto essendo diluito alla quarantacinquesima decimale, non contiene molecole chimiche della sostanza di partenza (As_2O_3) e per questo motivo ben si adatta all'applicazione in sistemi agricoli a basso impatto come l'agricoltura biologica. Così come per lo stress da As_2O_3 , l'efficacia di As 45x è stata indagata sia a livello morfometrico che molecolare. Per quanto riguarda la valutazione dei parametri di crescita è stato interessante osservare in particolare l'incremento nella vigoria del coleoptile e delle radichette nei semi stressati e successivamente trattati con il PUD rispetto ai semi solamente stressati, indicando una sorta di recupero degli effetti negativi apportati dallo stress. Questo effetto di recupero è stato osservato anche nei livelli di espressione genica mettendo a confronto le interazioni "seme stressato e trattato con As 45x" - "seme non stressato e trattato con acqua" (S+T vs C+0) e "seme stressato e trattato con acqua" - "seme non stressato e trattato con acqua" (S+0 vs C+0). È stato infatti osservato come il trattamento a base di As 45x riporti nel sistema stressato e in diversi *pathways* metabolici, livelli di espressione genica simili a quelli riscontrati nel controllo suggerendo un effetto "riequilibrante" nel metabolismo vegetale. Di particolare rilevanza sono i *probe sets* corrispondenti alla famiglia del citocromo P450, agli istoni, alle proteine legate allo stress e ad altri geni coinvolti nella risposta della cellula vegetale a stimoli provenienti dall'ambiente esterno.

Sia le misurazioni dei parametri biologici di germogli e apparato radicale, che le analisi di espressione genica condotte tramite microarray e validate con qRT-PCR, hanno confermato un effetto di recupero indotto dal PUD As 45x applicato a semi preventivamente stressati con una dose sub letale di arsenico.

Ad oggi non è ancora stato chiarito il meccanismo con cui i PUD vanno ad interagire con i sistemi biologici inducendo una risposta di difesa nelle cellule vegetali, tuttavia i risultati ottenuti nella presente ricerca sembrano fornire importanti elementi a supporto dell' ipotesi proposta da Khuda-Bukhsh e collaboratori secondo la quale i PUD avrebbero la capacità di modulare l'espressione genica mediante modificazioni epigenetiche come l'acetilazione e la deacetilazione degli istoni.

Lo studio condotto ha in definitiva permesso di valutare in modo approfondito gli effetti da accumulo di arsenico che costituisce un importante e preoccupante fattore di stress a cui le piante di interesse agronomico sono sottoposte, e di indagare il possibile utilizzo dei PUD per la difesa e la protezione delle piante da questo tossico contaminante nel contesto di una agricoltura sostenibile. La novità apportata da questa ricerca consiste soprattutto nell'aver arricchito la letteratura esistente, basata essenzialmente su dati morfometrici e biochimici per la valutazione dell'efficacia dei PUD, con dati di espressione genica. Tuttavia al fine di validare gli effetti osservati e per meglio comprendere i meccanismi con cui i PUD vanno ad interagire con i sistemi biologici, sarebbe interessante utilizzare un più approfondito approccio di indagine che integri genomica, proteomica e metabolomica, ripetendo la sperimentazione condotta e riproducendo la prova in condizioni di pieno campo.

5. BIBLIOGRAFIA

Auquière JP, Moens P, Linster T, Speileux M (1988). Recherche de l'action de dilution homéopathiques sur les végétaux. Unpublished report, Louvain-la-Neuve.

Bellavite P, Marzotto M, Oliosio D, Moratti E, Conforti A (2014). High-dilution effect revisited. 1. Physicochemical aspects. *Homeopathy*, 103: 4-21.

Betti L, Brizzi M, Nani D, Peruzzi M (1994). A pilot statistical study with homoeopathic potencies of *Arsenicum album* in wheat germination as a simple model. *British Homeopathic Journal*, 83: 195-201.

Betti L, Brizzi M, Nani D, Peruzzi M (1997). Effect of high dilutions of *Arsenicum album* on wheat seedlings from seed poisoned with the same substance. *British Homeopathy Journal*, 86: 86-89.

Betti L, Trebbi G, Majewsky V, Scherr C, Shah-Rossi D, Jäger T, Baumgartner S (2009). Use of homeopathic preparations in phytopathological models and in field trials: a critical review. *Homeopathy*, 98: 244-266.

Betti L, Trebbi G, Zurla M, Nani D, Peruzzi M, Brizzi M (2010). A Review of Three Simple Plant Models and Corresponding Statistical Tools for Basic Research in Homeopathy. *TheScientificWorldJOURNAL*, 10: 2330-2347.

Bigagli E, Luceri C, Bernardini S, Dei A, Dolara P (2010). Extremely low copper concentration affect gene expression profiles of human prostate epithelial cell lines. *Chemico-Biological Interaction*, 188: 214-219.

Binder M, Baumgartner S, Thurneysen A (2005). The effects of a 45x potency of *Arsenicum album* on wheat seedling growth – a reproduction trial. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd*, 12: 284-291.

Bishatee K, Sikdar S, Khuda-Bukhsh AR (2013). Evidence of an epigenetic modification in cell-cycle arrest caused by the use of ultra-highly-diluted *Gonolobus condurango* extract. *Journal of Pharmacopuncture*, 16: 7-13.

Boiron J (1965). Action d'une dilution hahnemannienne arsenicale sur la croissance du blé intoxiqué à l'arsenic. *Les Annales Homéopathiques Françaises*, 7:253-258.

Borghini F, Dinelli G, Marotti I, Trebbi G, Borghini G, Betti L (2012). Electromagnetic Information Transfer (EMIT) by Ultra high Diluted (UHD)

solutions: the suggestive hypothesis of an epigenetic action. *International Journal of High Dilution Research*, 11: 113-114.

Brizzi M, Nani D, Peruzzi M, Betti L (2000). Statistical analysis of the effect of high dilutions of arsenic in a large data set from a wheat germination model. *British Homeopathic Journal*, 89: 63-67.

Boyer JS (1982). Plant productivity and environment. *Science*, 218: 443-448.

Brizzi M, Biondi C, Lazzarato L, Betti L (2002). Analisi esplorativa dell'effetto di soluzioni ultramolecolari di triossido di arsenico sullo sviluppo vegetativo in vitro di plantule di grano. *Statistica, LXII*, 3: 515-522.

Brizzi M, Lazzarato L, Nani D, Borghini F, Peruzzi M, Betti L (2005). A biostatistical insight into the As₂O₃ high dilution effects on the rate and variability of wheat seedling growth. *Forsch Komplementärmed Klass Naturheilkd*, 12: 277-283.

Brizzi M, Elia V, Trebbi G, Nani D, Peruzzi M, Betti L (2011). The efficacy of ultramolecular aqueous dilutions on a wheat germination model as a function of heat and ageing-time. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, doi:10.1093/ecam/nep217.

Chakrabarty D, Trivedi PK, Misra P, Tiwari M, Shri M, Shukla D, Kumar S, Rai A, Pandey A, Nigam D, Tripathi RD, Tuli R (2009). Comparative transcriptome analysis of arsenate and arsenite stresses in rice seedlings. *Chemosphere*, 74: 688-702.

Chavan P, Joshi K, Patwardhan B (2006). DNA microarrays in herbal drug research. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 3: 447-457.

Cohen SM, Arnold LL, Eldan M, Lewis AS, Beck BD (2006). Methylated arsenicals: the implication of metabolism and cancerogenity studies in rodents to human risk assessment. *Critical Review in Toxicology*, 36: 99-133.

DalCorso G, Farinati S, Furini A (2010). Regulatory networks of cadmium stress in plants. *Plant Signal and Behavior*, 5: 663-667.

Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Science*, 87: 779-795.

De Oliveira CC, De Oliveira SM, VM Goes, CM Probst, MA Krieger, D. de Freitas Buchi (2008). Gene expression profiling of macrophages following mice

treatment with an immunomodulator medication. *Journal of Cellular Biochemistry*, 104: 1364-1377.

Eisen M, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 95: 14863-14868.

Endler PC, Thieves K, Reich C, Matthiessen P, Bonamin L, Scherr C, Baumgartner S (2010). Repetitions of fundamental research models for homeopathically prepared dilutions beyond 10^{-23} : a bibliometric study. *Homeopathy*, 99: 25-36.

Finnegan PM, Chen W (2012). Arsenic toxicity: the effects on plant metabolism. *Frontiers in PHYSIOLOGY*, 3:182

Flick K, Kaiser P (2012). Protein degradation and the stress response. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23: 515-522.

Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current opinion in Plant Biology*, 9:436-442.

Garg N, Singla P (2011). Arsenic toxicity in crop plants: physiological effects and tolerance mechanisms. *Environmental Chemical Letter*, 9: 303-321.

Garlaschelli L (1999). Omeopatia: farmaci senza molecole. *La Chimica e l'Industria*, 8: 1023.

Hartely-Whitaker J, Ainsworth G, Meharg AA (2001). Copper- and arsenate-induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with different sensitivity. *Plant, Cell & Environment*, 24: 713-722.

Hepler PK (2005). Calcium: a central regulator of plant growth and development. *The Plant Cell*, 17: 2142-2155.

Huang TL, Nguyen QTT, Fu SF, Lin CY, Chen YC, Huang HJ (2012). Transcriptomic changes and signalling pathways induced by arsenic stress in rice roots. *Plant Molecular Biology*, 80: 587-608.

Hughes MF, Beck BD, Chen Y, Lewis AS, Thomas DJ (2011). Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicological science*, 123(2): 305-332.

Islam E, Liu D, Li T, Yang X, Jin X, Khan MA, Mahmood Q, Hayat Y, Imtiaz M (2011). Effect of Pb toxicity on the growth and physiology of two ecotypes of

Elsholtzia argyi and its alleviation by Zn. *Environmental toxicology*, 26(4): 403-416.

Islam E, Khan MT, Irem S (2015). Biochemical mechanisms of signaling: perspectives in plant under arsenic stress. *Ecotoxicology and environmental safety*, 114: 126-133.

Jäger T, Scherr C, Simon M, Heusser P, Baumgartner S (2010). Effects of homeopathic *Arsenicum album*, nosode, and gibberellic acid preparations on the growth rate of arsenic-impaired duckweed (*Lemna gibba* L.). *TheScientificWorldJOURNAL*, 10: 2112–2129.

Jäger T, Scherr C, Shah D, Majewsky V, Betti L, Trebbi G, Bonamin L, Simões-Wüst AP, Wolf U, Simon M, Heusser P, Baumgartner S (2011). Use of homeopathic preparations in experimental studies with abiotically stressed plants. *Homeopathy*, 100: 275-287.

Jin JW, Xu YF, Huang YF (2010). Protective effect of nitric oxide against arsenic-induced oxidative damage in tall fescue leaves. *African Journal of Biotechnology*, 9: 1619-1627.

Jonak C, Nakagami H, Hirt H (2004). Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-act and cadmium. *Plant Physiology*, 136: 3276-3283.

Jones FT (2007). A broad view of arsenic. *Poultry Science*, 86: 2-14.

Kabata-Pendias A, Pendias H (1984). *Trace elements in soil and plants*, 315. CRC Press, Boca Raton, FL.

Kapustka LA, Lipton J, Galbraith H, Cacela D, Lejeune K (1995). Metallic and arsenic impacts to soils, vegetation communities and wildlife habitat in southwest Montana uplands contained by smelter emission: II. Laboratory Phytotoxicity studies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14: 95-100.

Khuda-Bukhsh AR (1997). Potentized homeopathic drugs act through regulation of gene expression: a hypothesis to explain their mechanism and pathways of action in vivo. *Complementary Therapies in Medicine*, 5: 43-46.

Khuda-Bukhsh AR (2003). Towards understanding molecular mechanisms of action of homeopathic drugs: an overview. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 253: 339-345.

Khuda-Bukhsh AR (2006). Laboratory research in homeopathy. *Integrative Cancer Therapies*, 5: 1-14.

Khuda-Bukhsh AR, Pathak S (2008). Homeopathic drug discovery: theory update and methodological aspect. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 3: 979-990.

Khuda-Bukhsh AR (2014). Current trend in high dilution research with particular reference to gene regulatory hypothesis. *The Nucleus*, 52: 3-17.

Lahnstein L, Binder M, Thurneysen A, Frei M, Betti L, Peruzzi M, Heusser P, Baumgartner S (2009). Isopathic treatment effects of *Arsenicum album* 45x on wheat seedling growth-Further reproduction trials. *Homeopathy*, 98: 198-207.

Lamari L (2002). Assess: image analysis software for plant disease quantification. St. Paul, Minnesota, USA: APS Press.

Le XC, Yalcin S, Ma M (2000) Speciation of submicrogram per liter levels of arsenic in water: on-sites separation integrated with sample collection. *Environmental Science and Technology*, 34: 22-26.

Liu X, Zhang S, Shan X, Zhu YG (2005). Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seedling growth and amylolytic activity of wheat. *Chemosphere*, 61: 293-301.

Livak KJ, Schmittgen TG (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods*, 25: 402-408.

Mabuchi K, Lilienfeld AM, Snell LM (1980). Cancer and occupational exposure to arsenic: a study of pesticide workers. *Preventive Medicine*, 9: 51-77.

Macnair MR, Tilstone GH, Smith SE (2000). The genetics of metal tolerance and accumulation in higher plants. In *Phytoremediation of contaminated soil and water*, 235-250. CRC Press LLC.

Majewsky V, Heuwieser, Shah D, Scherr C, Jäger T, Betti L, Trebbi G, Bonamin L, Klocke P, Baumgartner S (2009). Use of homeopathic preparations in experimental studies with healthy plants. *Homeopathy*, 100: 275-287.

Malec P, Waloszek KA, Prasad MNV, Strzalka k (2008). Zinc reversal of Cd-induced energy transfer changes in photosystem II of *Ceratophyllum demersum* L. as observed by whole-leaf 77K fluorescence. *Plant Stress*, 2: 121-126.

- Mamelink J, Verpoorte R, Kijne JW (2001). ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *TREND in Plant Science*, 6: 212-219.
- Mandal BK e Suzuki KT (2002). Arsenic round the world: a review. *Talanta*, 58: 201-235.
- Marzotto M, Olioso D, Brizzi M, Tononi P, Cristofolletti M, Bellavite P (2014). Extreme sensitivity of gene expression in human SH-SY5Y neurocytes to ultra-low doses of *Gelsemium sempervirens*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14: 104.
- Matschullat J (2000). Arsenic in the geosphere-a review. *Science of the Total Environment*, 249: 297-312.
- McGrath SP, Zhao FJ, Lombi E (2002). Phytoremediation of metals, metalloids and radionuclides. *Advance in Agronomy*, 75: 1-56.
- Meharg AA, Jardine L (2003). Arsenite transport into paddy rice (*Oryza sativa*) roots. *New Phytologist*, 157: 39-44.
- Miteva E, Merakchiyska M (2002). Response of chloroplast and photosynthetic mechanism of bean plants to excess arsenic in soil. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 8: 151-156.
- Montagnier L, Aïssa J, Ferris S, Montagnier JL, Lavallée C (2009). Electromagnetic signals are produced by aqueous nanostructures derived from bacterial DNA sequences. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 1: 81-90.
- Moon DH, Dermatas D, Menounou N (2004). Arsenic immobilization by calcium-arsenic precipitates in lime treated soils. *Science of the Total Environment*, 330: 171-185.
- Moustafa MA, Ogino D, Nishimura M, Ueda N, Naito S, Furukawa M, Uchida T, Sawada H, Fukumoto M (2004). Comparative analysis of ATP-binding cassette (ABC) transporter gene expression levels in peripheral blood leukocytes and liver with hepatocellular carcinoma. *Cancer Science*, 95: 530-536.
- Murphy FJ, Seery LT , Hayes I (2003). Therapeutic approaches to the modulation of apoptosis. *Programmed cell Death*, 39: 131-153.
- Narusaka Y, Narusaka M, Seki M, Umezawa T, Ishida J, Nakajima M, Enju A, Shinizaki K (2004). Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in

Arabidopsis: Analysis of gene expression in cytochrome P450 gene superfamily by cDNA microarray. *Plant Molecular Biology*, 55: 327-342.

Nelson WC, Lykins MH, Mackey J, Newill VA, Finklea JF, Hammer DI (1973). Mortality among orchard workers exposed to lead arsenate spray: a cohort study. *Journal of Chronic Diseases*, 26:105-118.

Paolacci AR, Tanzarella OA, Porceddu E, Ciaffi M (2009). Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Molecular Biology*, 10: 11.

Pearson K (1896). Mathematical contributions to the theory of evolution. III. Regression, Heredity and Panmixia. *Philosophical Transactions of Royal Society*, 187: 253-318.

Peryea FJ (1998). Historical use of lead arsenate insecticide, resulting soil contamination and implication for soil remediation. In *Proceeding, 16th World Congress of Soil Science*, 20-26 August 1998, Montpellier, France, pp. 7.

Peryea FJ (2001). Gardening on lead and arsenic containing soil. *Washington State Coop. Extension Bull.* no. EB1884.

Pigna M, Cozzolino V, Violante A, Meharg AA (2009). Influence of phosphate on the arsenic uptake by wheat (*Triticum durum* L.) irrigated with arsenic solution at three different concentration. *Water Air and Soil Pollution*, 197: 371-380.

Quaghebeur M, Rengel Z (2004). Arsenic uptake, translocation and speciation in *pho1* and *pho2* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 120: 280-286.

Rai R, Pandey S, Shrivastava AK, Pandey Rai S (2014). Enhanced photosynthesis and carbon metabolism favor arsenic tolerance in *Artemisia annua*, a medicinal plant as revealed by homology-based proteomics. *International Journal of Proteomics*, DOI 10.1155/2014/163962.

Reiner A, Yekutieli D, Benjamini Y (2003). Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics*, 19: 368-375.

Saha SK, Roy S, Khuda-Bukhsh AR (2013). Evidence in support of gene regulatory hypothesis: Gene expression profiling manifests homeopathy effect as more than placebo. *International Journal of High Dilution Research*, 12: 162-167.

- Saxe JK, Bowers TS, Reid KR (2006). Arsenic. In *Environmental Forensics: Contaminant Specific Guide*, 279-292. Academic Press, Burlington, MA.
- Shaibur MR, Kitajima N, Sugewara R, Kondo T, Alam S, Imamul Huq SM, Kawai S (2008). Critical toxicity of arsenic and element composition of arsenic-induced chlorosis in hydroponic Sorghum. *Water Air and Soil Pollution*, 191: 279-292.
- Siddiqui MH, Al-Wahaibi MH, Basalh MO (2011). Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma*, 248: 447-455.
- Smedley PL, Kinniburgh DG (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, 17: 517-568.
- Smith SE, Christophersen HM, Pope S, Smith FA (2010). Arsenic uptake and toxicity in plants: integrating mycorrhizal influences. *Plant Soil*, 327: 1-21.
- Stoeva N, Berova M, Vassilev, Zlatev Z (2005). Effect of arsenic on some physiological parameters in bean plants. *Biologia Plantarum*, 49(2): 293-296.
- Stoeva N e Bineva Z (2003). Oxidative changes and photosynthesis in Oat plants grown in As-contaminated soil. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 29(1-2): 87-95.
- Stohs SJ, Bagchi D (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Radical. *Biology & Medicine*, 18: 321–326, 1995.
- Smyth GK, Gordon K (2004). Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 3(1) (Article 3).
- Statistica (2015). *Major countries in worldwide arsenic mine production from 2010 to 2014 (in metric tons)*. <http://www.statistica.com/statistics/264961/production-of-arsenic/>. Consultato il 13.03.2015.
- Suzuki K, Nishiuchi T, Nakayama Y, Ito M, Shinshi H (2006). Elicitor-induced down regulation of cell cycle-related genes in tobacco cells. *Plant, Cell & Environmental*, 29: 183-191.
- Thimm O, Blasing O, Gibon Y, Nagel A, Kruger P, Selbiq J, Muller LA, Rhee SY, Stitt M (2004). MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant Journal*, 37: 914-939.

- Tighe M (2005). Homeopathy on cress - a pre-clinical method development using a simple plant growth model. Thesis, University of Westminster, London, UK.
- Tong YP, Kneer R, Zhu YG (2004). Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for phytoremediation. *Trends in Plant Science*, 9: 7-9.
- Upchurch R.G. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnological Letters* (2008) 30:967–977.
- Vazquez S, Esteban E, Carpena RO (2008). Evolution of arsenate toxicity in nodulated White Lupine in a long-term culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18): 8580-8587.
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *TRENDS in Plant Science*, 9: 244-252.
- Wang S, Mulligan CN (2008). Speciation and surface structure of inorganic arsenic in solid phases: a review. *Environment International*, 34:867-879.
- Warren GP, Alloway BJ (2003). Reduction of arsenic uptake by lettuce with ferrous sulfate applied to contaminated soil. *Journal of Environmental Quality*, 32(3): 767-772.
- Warren GP, Alloway BJ, Lepp NW, Singh B, Bochereau FJM, Penny C (2003). Field trials to assess the uptake of arsenic by vegetables from contaminated soils and soil remediation with iron oxides. *Science of the Total Environment*, 311: 19-33.
- WHO Regional Office for Europe (2000). Air Quality Guidelines Second Edition, Copenhagen, Denmark.
- Williams KT, Whetstone RR (1940). Arsenic distribution in soils and its presence in certain plants. *USDA Technical Bulletins*, 732: 20.
- Witt CM, Bluth M, Albrecht H, Weisshuhn Te, Baumgartner S, Willich SN (2007). The in vitro evidence for an effect of high homeopathic potencies--a systematic review of the literature. *Complementary Therapies in Medicine*, 15: 128-38.
- Wu F, Sheng P, Tan J, Chen X, Lu G, Ma W, Heng Y, Lin Q, Zhu S, Wang J, Wang J, Guo X, Lei C, Wan J (2014). Plasma membrane receptor-like kinase leaf panicle 2 acts downstream of the DROUGHT AND SALT TOLERANCE transcription factor

to regulate drought sensitivity in rice. *Journal of Experimental Botany*, 66: 271-281.

Yinnon TA, Elia V (2013). Dynamics in perturbed very dilute aqueous solutions: theory and experimental evidence. *International Journal of Modern Physics B*, 27: 1350005 Available in: <http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S0217979213500057>. Accessed in March 26, 2014

Yu LJ, Luo YF, Liao B, Chen L, Xiao S, Li JT, Hu SN, Shu WS (2012). Comparative transcriptome analysis of transporters, phytohormone and lipid metabolism pathways in response to arsenic stress in rice (*Oryza sativa*). *New phytologist*, 195: 97-112.

Zhao FJ, Ma JF, Meharg AA, McGrath SP (2009). Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist*, 181: 777-794.

Zhu H, Tu L, Jin S, Xu I, Tan J, Deng F, Zhang X (2008). Analysis of genes differentially expressed during initial cellular dedifferentiation in cotton. *Chinese Science Bulletin*, 53: 3666-3676.

Zhu Y, Dong A, Shen WH (2012). Histone variants and chromatin assembly in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta* 1819, 343-348.