

## Le colture *in vitro* per lo studio del fitorimedia

**Maurizio Capuana\***

*IBBR/Istituto di Bioscienze e Biorisorse, CNR, Sesto Fiorentino (Firenze)*

**Parole chiave:** metalli pesanti, micorrize, micropropagazione, trasformazione genetica.

### Introduzione

Ai fini del fitorimedia, le colture *in vitro* rappresentano un utile strumento per lo studio della tolleranza degli organismi vegetali ai contaminanti presenti in suoli e acque (metalli pesanti, idrocarburi, composti aromatici, pesticidi, erbicidi, ecc.). Oltre ad un uso diretto per test di tolleranza *in vitro* e per la valutazione dei meccanismi di assorbimento, traslocazione o esclusione, le tecniche riconducibili al '*vitro*' sono sfruttate per settori specifici; tra questi, lo studio delle complesse interazioni tra piante e comunità microbiche presenti nella rizosfera, con particolare attenzione al ruolo delle micorrize e a quello degli endofiti. Anche il settore della trasformazione genetica, per il quale le colture *in vitro* costituiscono uno strumento fondamentale, offre un'ampia gamma di possibilità di approfondimento, in particolare per quanto concerne l'individuazione dei geni coinvolti nei diversi meccanismi di tolleranza ai contaminanti e nella conseguente comprensione dei fenomeni metabolici interessati.

### Fitorimedia

E' stato calcolato che in Europa più del 20% del territorio è degradato o contaminato da inquinanti, per cui un parziale intervento di recupero appare ormai non procrastinabile. La decontaminazione di un suolo o di un corso d'acqua può essere eseguita con vari sistemi fisici, chimici o biologici, accomunati tutti da una certa complessità e, soprattutto, da un costo elevato. E' stato proposto, quindi, il fitorimedia, che consiste nell'utilizzo di piante naturali o geneticamente modificate, e di microrganismi correlati, per il risanamento e il recupero di suoli e acque. Il fitorimedia si fonda sui meccanismi distinguibili in fitoestrazione (assorbimento del contaminante attraverso il sistema radicale, traslocazione verso gli organi aerei, estrazione post-raccolta), fitostabilizzazione (totale o parziale immobilizzazione dei contaminanti per assorbimento e adsorbimento radicale e/o precipitazione nella rizosfera), fitovolatilizzazione (estrazione dal suolo e rilascio nell'atmosfera attraverso trasformazione e volatilizzazione), fitofiltrazione (assorbimento di contaminanti da acque stagnanti o flussi di rifiuti acquosi da parte dei sistemi radicali) (Salt *et al.*, 1995).

L'uso delle piante può richiedere tempi più lunghi di altri sistemi, ma sicuramente causa un impatto inferiore sull'ecosistema rispetto a tecniche meccaniche (escavazione), chimiche, fisiche o di intervento con microrganismi. Per contro, è un sistema indicato nei luoghi dove i contaminanti non sono concentrati negli strati più profondi del suolo. Il fitorimedia nasce con l'osservazione che alcune piante sono in grado di assorbire metalli in concentrazioni molto più elevate (50-100 volte) rispetto a quelle normalmente presenti nei vegetali; per questo sono state definite "iperaccumulatrici" e tra loro troviamo specie dei generi *Thlaspi*, *Alyssum*, *Silene*, *Cystus*, *Pteris*, *Brassica*, ecc. Si tratta di specie per lo più erbacee, di piccole dimensioni, con modesti apparati radicali; per questo si è successivamente pensato di sfruttare anche alcune essenze arboree che, grazie al loro consistente apparato radicale e a ritmi di crescita elevati, possono avere un ruolo in questa attività, pur non possedendo particolari capacità di iperaccumulo. In tal senso, le specie di maggiore interesse sono individuabili nei generi *Populus*, *Salix*, *Betula*, *Alnus*, *Eucalyptus*.

L'uso delle piante può richiedere tempi più lunghi di altri sistemi, ma sicuramente causa un impatto inferiore sull'ecosistema rispetto a tecniche meccaniche (escavazione), chimiche, fisiche o di intervento con microrganismi. Per contro, è un sistema indicato nei luoghi dove i contaminanti non sono concentrati negli strati più profondi del suolo. Il fitorimedia nasce con l'osservazione che alcune piante sono in grado di assorbire metalli in concentrazioni molto più elevate (50-100 volte) rispetto a quelle normalmente presenti nei vegetali; per questo sono state definite "iperaccumulatrici" e tra loro troviamo specie dei generi *Thlaspi*, *Alyssum*, *Silene*, *Cystus*, *Pteris*, *Brassica*, ecc. Si tratta di specie per lo più erbacee, di piccole dimensioni, con modesti apparati radicali; per questo si è successivamente pensato di sfruttare anche alcune essenze arboree che, grazie al loro consistente apparato radicale e a ritmi di crescita elevati, possono avere un ruolo in questa attività, pur non possedendo particolari capacità di iperaccumulo. In tal senso, le specie di maggiore interesse sono individuabili nei generi *Populus*, *Salix*, *Betula*, *Alnus*, *Eucalyptus*.

### Culture *in vitro*

Sono stati sviluppati screening *in vitro* per diversi iperaccumulatori di metalli, quali *Alyssum narkgrafii* (Vinterhalter e Vinterhalter, 2005), *Arabidopsis halleri* (Dal Corso *et al.*, 2005), *Brassica* spp. (Rout *et al.*, 1999), *Pteris vittata* (Trotta *et al.*, 2007) e, più recentemente, per numerose specie arboree (Capuana, 2011). Parallelamente alla micropropagazione, anche la coltura di *hairy roots* è risultata uno strumento di notevole utilità. L'induzione di *hairy roots* con *Agrobacterium rhizogenes* è, infatti, un metodo che consente il rapido sviluppo di notevoli quantità di biomassa, di grande efficacia, quindi, per valutare le potenzialità delle diverse specie nel tollerare, accumulare e/o rimuovere gli inquinanti. A titolo di esempio, l'indagine degli effetti del cadmio in *Daucus carota* (Janoušková e Vosátka, 2005).

Le colture *in vitro* risultano anche uno strumento efficace per lo studio e lo sfruttamento delle comples-

\* maurizio.capuana@ibbr.cnr.it

se interazioni tra piante e comunità microbiche della rizosfera. Il ruolo delle micorrize nel fitorimedio è incentrato soprattutto sull'incremento della tolleranza delle piante agli inquinanti; esiste infatti un'ampia letteratura sugli effetti delle micorrize nelle piante sottoposte a stress da metalli, ma anche su numerose applicazioni nella degradazione di inquinanti organici (Göhre e Paszkowski, 2006).

Le tecniche di coltura *in vitro* sono poi direttamente coinvolte nella realizzazione della trasformazione genetica. L'introduzione di geni estranei nel genoma della piante è una pratica che si sta sempre più diffondendo e che offre interessanti prospettive anche nel campo del fitorimedio, grazie alla sovraespressione, negli organismi modificati, di geni coinvolti nell'assorbimento, nel trasporto e nel metabolismo di specifici inquinanti. Sono ormai innumerevoli i lavori che documentano la trasformazione di piante per l'aumento della tolleranza e della capacità di estrazione, accumulo e traslocazione. In particolare, tra le specie arboree grande attenzione si è concentrata sui pioppi: *Populus alba* (Balestrazzi *et al.*, 2009), *P. nigra* (Bittsanszki *et al.*, 2005), *P. deltoides* (Che *et al.*, 2003), *P. tremula* x *P. alba* (Samuilov *et al.*, 2016). In questo settore, a parte gli aspetti legali coinvolti, è comunque necessaria un'attenta considerazione dei rischi correlati; ne consegue l'opportunità di testare in campo gli organismi transgenici per una loro approfondita valutazione, tenendo anche in dovuto conto la problematica dell'accettazione sociale degli OGM.

## Bibliografia

- BALESTRAZZI A., BOTTI S., ZELASCO S., BIONDI S., 2009. *Expression of the PsMT<sub>Al</sub> gene in white poplar engineered with the MAT system is associated with heavy metal tolerance and protection against 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated-DNA damage*. Plant Cell Rep., 28: 1179–1192.
- BITTSANSZKY A., KOMIVES T., GULLNER G., GYULAI G., 2005. *Ability of transgenic poplars with elevated glutathione content to tolerate zinc(2+) stress*. Environ. Int., 31: 251–254.
- CAPUANA M., 2011. *Heavy metals and woody plants – biotechnologies for phytoremediation*. Forest Biogeosci. Forest., 4: 7-15.
- CHE D., MEAGHER R.B., HEATON A.C.P., LIMA A., RUGH C.L., MERKLE S.A., 2003. *Expression of mercuric ion reductase in Eastern cottonwood (Populus deltoides) confers mercuric ion reduction and resistance*. Plant Biotechnol. J., 1: 311.
- DAL CORSO G., BORGATO L., FURINI A., 2005. *In vitro plant regeneration of the heavy metal tolerant and hyperaccumulator Arabidopsis halleri (Brassicaceae)*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 82: 267–270.
- GÖHRE V., PASZKOWSKI U., 2006. *Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation*. Planta, 223: 1115-1122.
- ROUT G.R., SAMANTARAY S., DAS P., *in vitro selection and biochemical characterisation of zinc and manganese adapted callus lines in Brassica spp.* Plant Sci., 146: 89–100.
- SALT, D.E., BLAYLOCK M., NANDA KUMAR P.B.A., DUSHENKOV V., *et al.*, 1995. *Phytoremediation; a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants*. Nat. Biotechnol., 13: 468–474.
- SAMUILOV S., LANG F., DJUKIC M., DJUNISIJEVIC-BOJOVIC D., RENNENBERG H., 2016. *Lead uptake increases drought tolerance of wild type and transgenic poplar (Populus tremula x P. alba) overexpressing gsh I*. Environ. Pollut., 216: 773–785.
- TROTTA A., MANTOVANI M., FUSCONI A., GALLO C., *In vitro culture of Pteris vittata, an arsenic hyperaccumulating fern, for screening and propagating strains useful for phytoremediation*. Caryologia, 60: 160–164.
- VINTERHALTER B., VINTERHALTER D., 2005. *Nickel hyperaccumulation in shoot cultures of Alyssum narkgrafii*. Biol. Plant., 49: 121-124.

## B-Type cyclin modulation in response to carbon balance in callus of *Populus alba*

Giovanni Emiliani<sup>1\*</sup>, Silvia Traversari<sup>2\*</sup>, Anna De Carlo<sup>1</sup>, Maria Laura Traversi<sup>1</sup>, Claudio Cantini<sup>1</sup>, Alessio Giovannelli<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree (IVALSA-CNR), Sesto Fiorentino (Fi)

<sup>2</sup> BioLabs, Istituto di Scienze della Vita, Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

In plants, sucrose is the principal transported carbon compound. Sucrose and/or glucose and fructose are relevant in the regulation of meristematic cell proliferation. The aim was to define the sugar balance and the relationship between the osmoregulation processes and the cell division patterns in callus of *Populus alba* in response to different sucrose medium concentra-

tions. Callus proliferation and metabolism were assessed through biometric measures, non-structural soluble carbohydrates quantification, osmotic potential determination, as well as by quantification of mRNA accumulation of B-type cyclin genes. Calli were cultured on proliferation medium without sucrose or supplemented with 10, 20 or 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose. A large amount of non-structural soluble carbohydrates was used to restore the osmotic balance between callus and

\* s.traversari@santannapisa.it