



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA ED ECOLOGIA

CICLO XXX

*IDENTIFICAZIONE, CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE E
VALUTAZIONE PER FITORIMEDIO DI GENI PER LA
BIOSINTESI DI PEPTIDI TIOLICI IN ARUNDINEAE*

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Pierluigi Viaroli

Tutore:
Chiar.mo Prof. Ada Ricci

Co-Tutore:
Dott. Claudio Varotto

Dottorando: Luca Stragliati

Anni 2014/2017



*From so simple a beginning
Endless forms most beautiful and most wonderful
Have been, and are being,
Evolved.*

Charles Robert Darwin; On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life (1859).

IDENTIFICAZIONE, CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE E VALUTAZIONE PER FITORIMEDIO DI GENI PER LA BIOSINTESI DI PEPTIDI TIOLICI IN ARUNDINEAE

Alcuni metalli pesanti e metalloidi sono elementi altamente tossici anche in traccia, e sono fra gli inquinanti più frequenti in siti impattati da attività industriali. Svariate specie di piante hanno sviluppato sistemi in grado di disintossicare i metalli pesanti, in particolare tramite la biosintesi di peptidi tiolici, chiamati fitochelatine. Alcune specie di Poaceae appartenenti alla tribù delle Arundineae sono state proposte come candidate per la fitodepurazione di ambienti contaminati da metalli pesanti grazie alla loro crescita rapida ed alla tolleranza a questi inquinanti. Il progetto proposto si prefigge di elucidare le basi molecolari di tale tolleranza e di esplorare il potenziale dei geni biosintetici per la produzione di peptidi tiolici e di enzimi preposti alla loro sintesi (es. Fitochelatina Sintasi, enzima costitutivo catalizzante la biosintesi delle fitochelatine) in una specie di Arundineae, *Arundo donax*, per migliorarne il potenziale di fitodepurazione. In particolare, il progetto si articola in:

- 1) Identificazione dei geni per la biosintesi di Fitochelatina Sintasi del metabolismo tiolico nel trascrittoma di *A. donax* (He et al, 2012; Sablok et al, 2013);
- 2) Caratterizzazione degli stessi a livello genetico (evoluzione, struttura genica, espressione);
- 3) Analisi funzionale degli enzimi da essi codificati (specificità, attività, capacità di disintossicazione di metalli pesanti, regolazione dell'omeostasi di micronutrienti). Il

lavoro sarà completato anche impiegando piante terrestri basali e alghe con esse imparentate, al fine di acquisire dati solidi di ordine filogenetico ed evolutivo.

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1. LA TOSSICITÀ DEI METALLI PESANTI.....	1
1.2. I SISTEMI DI DISINTOSSICAZIONE IN PIANTA.....	3
1.3. FITOCHELATINE E FITOCHELATINA SINTASI.....	4
1.4. LA DIFFUSA PRESENZA DEI GENI PER FITOCHELATINA SINTASI.....	10
1.5. LA SFIDA DELLA RICOSTRUZIONE FILOGENETICA.....	12
1.6. IL CONCETTO DI FITORIMEDIO.....	14
1.7. ARUNDO DONAX.....	15
2. MATERIALI E METODI.....	19
2.1. OTTENIMENTO DEI DATASET TRASCRITTOMICI.....	19
2.2. RICERCA PER OMOLOGIA DI GENI PCS-LIKE.....	19
2.3. AMPLIFICAZIONE E SEQUENZIAMENTO DEI TRASCRITTI PCS-LIKE DI ARUNDO.....	20
2.4. ANALISI FILOGENETICA.....	25
2.5. REAL-TIME PCR.....	27
2.6. PRIMO SISTEMA ETEROLOGO: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
2.6.1. OTTENIMENTO DEI MUTANTI IN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
2.6.2. TEST DI COMPLEMENTAZIONE IN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
2.6.3. ANALISI DI CRESCITA IN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
2.6.4. ANALISI DI SPETTROMETRIA DI MASSA IN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
2.7. SECONDO SISTEMA ETEROLOGO: <i>Arabidopsis thaliana</i>	36

2.7.1. OTTENIMENTO DELLE LINEE RICOMBINANTI DI <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
2.7.2. CRESCITA DELLE PIANTE E STERILIZZAZIONE DEI SEMI DI <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
2.7.3. TEST DI GERMINAZIONE IN <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
2.7.4. ANALISI FENOTIPICA DEI RICOMBINANTI DI <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
3. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	40
3.1. <i>Arundo donax</i> CODIFICA ALMENO TRE DIFFERENTI TRASCRITTI PCS-LIKE.....	40
3.2. ANALISI FILOGENETICA DEI TRASCRITTI AdPCS1, AdPCS2 e AdPCS3.....	43
3.3. I GENI PER PCS DI <i>Arundo donax</i> SONO ESPRESSI DIFFERENZIALMENTE E RISPONDONO ALLA PRESENZA DI METALLO PESANTE ANCHE A LIVELLO TRASCRIZIONALE TEST DI COMPLEMENTAZIONE IN LIEVITO.....	49
3.4. L'ESPRESSIONE ETEROLOGA DELLE DIFFERENTI CDS AdPCS1-3 IN LIEVITO RECUPERA IL FENOTIPO ALTAMENTE SENSIBILE AL Cd CARATTERISTICO DEL CEPPO YK44.....	55
3.5. L'ESPRESSIONE DI AdPCS1 CAUSA RITARDO NELLA CRESCITA DEL CEPPO YK44 DI LIEVITO.....	57
3.6. LE DIVERSE AdPCS SINTETIZZANO DIVERSI SPETTRI DI FITOCHELATINE E POSSEGGONO DIVERSI LIVELLI DI PROCESSIVITÀ.....	58
3.7. IN <i>Arabidopsis thaliana</i> L'ESPRESSIONE DI AdPCS3 RIDUCE LA GERMINAZIONE AD ELEVATE CONCENTRAZIONI DI Cd.....	62

3.8. L'ESPRESSIONE DELLE TRE DIVERSE VARIANTI GENICHE DI AdPCSs PORTA A TRE DIFFERENTI FENOTIPI IN <i>Arabidopsis thaliana</i>	64
4. CONCLUSIONI.....	67
5. BIBLIOGRAFIA.....	70
6. MATERIALI SUPPLEMENTARI.....	80
7. RINGRAZIAMENTI.....	86

1. INTRODUZIONE

1.1. LA TOSSICITÀ DEI METALLI PESANTI

I metalli pesanti sono definiti, nel loro complesso, come elementi la cui densità eccede il valore limite di 5g/cm^3 (Emsley; 2001). All'interno di tale raggruppamento funzionale vi sono due classi principali, suddivisione basata sulla loro funzionalità relativa alla vita cellulare. La prima classe è composta da quegli elementi fondamentali al funzionamento cellulare in qualità di microelementi. Tra essi si collocano, ad esempio, lo Zinco (Zn) ed il Rame (Cu), metalli essenziali come cofattori in reazioni di ossidoriduzione, interazione con ligandi, stabilizzazione di cariche o ionizzazione dell'acqua (Voet & Voet; 2004). La seconda classe è composta da quei metalli pesanti che sono definiti come non-essenziali. Tra essi ottimi esempi sono il Cadmio (Cd) e il Piombo (Pb) o metalloidi come l'Arsenico (As) e l'Antimonio (Sb). Questi metalli pesanti non-essenziali non solo non sono richiesti per le funzioni cellulari, ma possono interferire con l'attività dei metalli pesanti essenziali o simularne concentrazioni eccessive.

Sebbene i metalli pesanti siano naturalmente presenti a livello ambientale come normali componenti della crosta terrestre, la maggior parte di essi è da considerarsi come elementi inquinanti a seguito di attività antropiche (World Health Organization, 2007; Nagajyoti et al, 2010) e possono costituire un notevole rischio per la salute degli organismi che vivono in tali aree, umani compresi (Thompson and Bannigan, 2008). Il meccanismo di tossicità dei metalli pesanti non è ancora stato definito in dettaglio ed è ancora poco compreso. Ciò che viene generalmente accettato come consenso è che concentrazioni eccessive di metalli pesanti essenziali e tracce di non-essenziali causino due tipi di

problemi. Il primo è il mimetismo molecolare dei metalli non-essenziali nei confronti dei corretti cofattori. Il Cadmio, ad esempio, è considerato altamente tossico in quanto dispone della capacità di sostituirsi ad altri cationi bivalenti a carattere metallico, come Zinco (Zn^{2+}), Ferro (Fe^{2+}), Rame (Cu^{2+}) e persino Calcio (Ca^{2+}), inibendo l'attività biologica di quelle proteine (che siano enzimi o meno) le quali richiedono i sopracitati elementi come cofattori. Il secondo meccanismo di tossicità è la genesi di una cascata di reazioni chimiche aberranti indotta dal metallo; in questo scenario, diversi gruppi tiolici delle proteine nell'ambiente cellulare legano l'elemento metallico, generando specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Rea et al, 2004) e provocando di conseguenza uno stress di tipo ossidativo. Metalli attivamente ossidoriduttivi danno inizio alla formazione di ROS inducendo reazioni del tipo Haber-Weiss e Fenton (Haliwell & Gutteridge, 1990) come riportato in *Figura 1*.

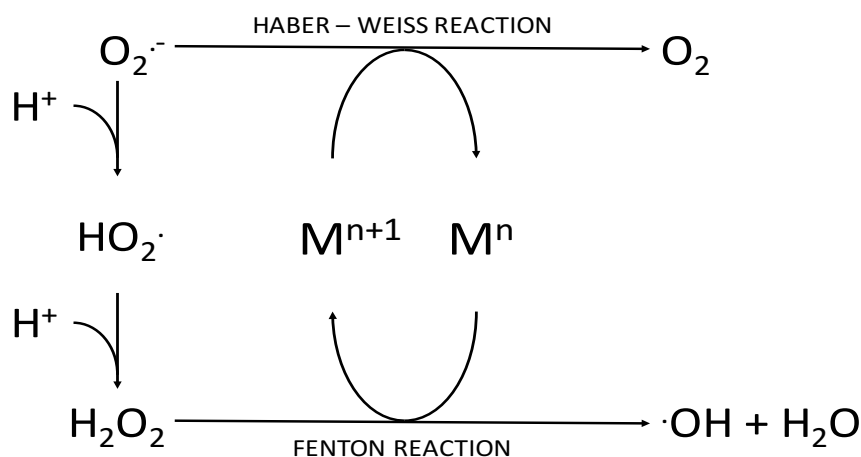


Figura 1: Schematizzazione delle reazioni Haber-Weiss e Fenton a cui si assiste in presenza di metalli. I simboli M presenti al centro dello schema rappresentano l'atomo metallico con il suo relativo stato ossidativo. Nella parte alta della figura viene riportata la reazione del tipo Haber-Weiss diretta, con la ROS "ossigeno singoletto" ossidata a ossigeno molecolare sfruttando la riduzione del metallo. Nella parte bassa dell'immagine, invece, viene mostrata la reazione di Fenton, con il perossido di idrogeno ridotto a acqua e, mediante addizione di idrogeno e ossidazione del metallo, ossidril radicali. Il metallo assume così un ruolo centrale in questo contesto, riducendosi e ossidandosi in base ai suoi iteratori. I due processi sono connessi alla base dalla presenza di idrogeni liberi disponibili a reagire con l'ossigeno singoletto.

Un'ulteriore serie di fattori da prendere in considerazione quando si parla di tossicità dei metalli pesanti sono il loro stato ossidoriduttivo, i complessi organometallici di cui fanno parte e, nel caso dell'organismo esposto, diversità organismo-specifiche, predisposizione genetica a fattori ambientali.

1.2. I SISTEMI DI DISINTOSSICAZIONE IN PIANTA

Come risulta logico pensare su scala evolutiva, gli organismi che si trovano esposti a questo tipo di stress hanno evoluto sistemi di difesa adeguati. Data l'elevata reattività dei gruppi idrossilici, amminici e tiolici nei confronti dei metalli pesanti, non sorprende che i sistemi di disintossicazione per questi elementi siano basati su molecole dotate di tali gruppi funzionali. Nello specifico, due differenti classi di molecole biologiche, Metallotioneine (MTs) e Fitochelatine (PCs), sono state identificate in pianta e proposte come possibile sistema di disintossicazione, grazie alla presenza di siti di legame ad alta affinità per metalli nelle suddette molecole. Le metallotioneine sono proteine di ridotta lunghezza ricche in residui di Cisteina, i quali, come precedentemente riportato, mostrano grande affinità per gli atomi metallici. Grazie a questa qualità intrinseca sono state verificate come molecole capaci di conferire resistenza al Cadmio nei mammiferi già nella seconda metà degli anni Ottanta (Hamer, 1986) e da allora sono state confermate come principale sistema di disintossicazione nel regno animale. Sebbene le metallotioneine siano presenti anche nelle piante, il loro ruolo rimane tuttora da delucidare negli organismi vegetali (Grennan, 2011). Le fitochelatine sono brevi oligopeptidi ricchi anch'essi in residui di Cisteina e furono inizialmente scoperte nel lievito a fissione *Schizosaccharomyces pombe* (Kondo et al, 1984) e successivamente in pianta (Grill et al, 1985). In seguito, ne è stata confermata la capacità di conferire

resistenza al Cadmio (Cobbett & Goldsburgh, 2002). Da allora, mediante una notevole serie di esperimenti, è stato provato che, benché entrambe le classi molecolari siano presenti, le fitochelatine rappresentano il principale sistema di disintossicazione dai metalli pesanti negli organismi vegetali, nonché analogo funzionale delle metallotioneine animali.

1.3. FITOCHELATINE E FITOCHELATINA SINTASI

L'enzima γ -glutamylcysteinyltransferasi, meglio noto come Fitochelatina Sintasi (Phytochelatine Synthase, PCS, Pfam IPR007719), è un membro del clan proteico delle peptidasi CA (Pfam CL0125). L'enzima è responsabile della sintesi post-traduzionale e non-ribosomiale di fitochelatine tramite una reazione transpeptidasica (Grill et al, 1989). Nelle piante, l'enzima è tipicamente organizzato con una struttura a due domini (*Figura 2*). Il primo dominio per ordine spaziale, noto come dominio Phytochelatine (Pfam PF05023), corrisponde alla porzione N-terminale della molecola, ha una lunghezza di circa 200 aminoacidi e contiene i residui destinati alla catalisi transpeptidasica. Il secondo dominio è definito come Phytochelatine_C (Pfam PF09328), corrisponde alla porzione C-terminale, possiede una lunghezza variabile e la sua funzione non è ancora stata delineata in maniera univoca.

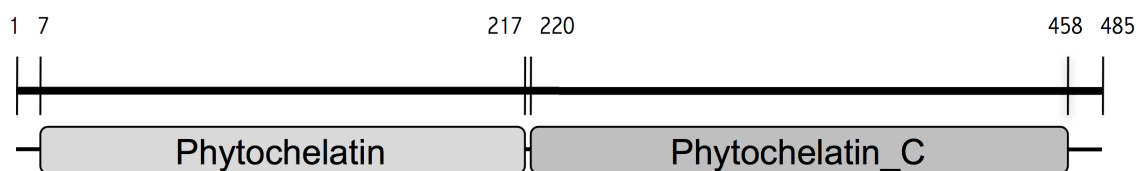


Figura 2: Tipica organizzazione a due domini degli enzimi validati funzionalmente come Fitochelatina Sintasi. Lo schema è basato sulla sequenza PCS1 di Arabidopsis thaliana; come si può osservare, il dominio "Phytochelatine" spazia dal residuo 7 al 217 e il dominio "Phytochelatine_C" dal 220 al 458. La maggior parte delle proteine PCS-like in Viridiplantae presenta una struttura simile fortemente conservata, con lievi variazioni rispetto allo schema presentato.

La regione N-terminale è altamente conservata in tutti quei taxa, anche molto distanti evolutivamente, in possesso dei geni che codificano per l'enzima (Rea et al, 2004). A partire dai lieviti fino alle piante, tre residui risultano fortemente conservanti, e, in accordo con la sequenza di *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh detta anche arabetta comune (NCBI accession number NP_199220), sono indicati come Cys-56, His-162 e Asp-180 (Figura 3). Mediante esperimenti di mutagenesi sito-specifica è stato dimostrato che questi residui formano la triade catalitica dell'enzima per la reazione di transaminazione che permette la sintesi delle fitochelatine (Romanyuk et al, 2006).

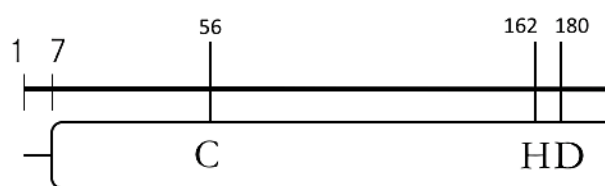


Figura 3: Localizzazione dei residui della triade catalitica a livello aminoacidico nel contesto della sequenza PCS1 di *Arabidopsis thaliana*.

D'altro canto, il dominio Phytochelatin_C può non essere presente. Vi sono organismi in cui tale dominio è assente, seppur la sequenza mantenga un allungamento nella regione C-terminale dell'enzima della stessa dimensione, e altri organismi in cui il dominio mancante risulta in un dominio Phytochenaltin tronco; in questo caso, si ottiene un enzima di dimensioni ridotte (attorno a 200 aminoacidi, come nel caso di diverse Chlorophyta caratterizzate). Tale dominio Phytochelatin_C sembra essere coinvolto nell'aumento dell'attivazione dell'enzima (Romanyuk et al, 2006), rendendolo responsivo nei confronti di un più ampio spettro di ioni metallici. È stato inoltre suggerito che il sopracitato dominio aumenti la stabilità termica dell'enzima e sia coinvolto nella catalisi non-core (Ruotolo et al, 2004). A differenza del dominio N-terminale, in cui si osserva una forte

conservazione della sequenza aminoacidica, il dominio C-terminale mostra una scarsa conservazione nei taxa che dispongono di geni per PCS finora identificati. Caso a parte è quello relativo alle Viridiplantae. Benché il dominio Phytochelatin_C risulti meno conservato del dominio Phytochelatin, si assiste ad una tendenza alla conservazione di determinate porzioni proteiche, probabilmente importanti per struttura secondaria e terziaria o per le funzioni verificate o ipotizzate per il dominio stesso.

L'enzima produce una serie di molecole strutturalmente correlate, tutte accumulate dal fatto di essere corti peptidi formati da residui di acido glutammico, cisteina e glicina e, definite fitochelatine. Un numero variabile di dipeptidi γ -Glu-Cys può essere ripetuto tra due e undici volte, ma più comunemente le ripetizioni sono comprese tra due e cinque. Il polipeptide viene seguito da una glicina, la quale termina la molecola. Le fitochelatine vengono perciò riportate con la formula generale $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, dove "n" indica il fattore di polimerizzazione (*Figura 4*). A seguire si trovano dunque le classi di fitochelatine che vengono riportate come formula semplificata in base al fattore di polimerizzazione del dipeptide γ -Glu-Cys, ovvero PC2 (fattore di polimerizzazione 2), PC3 (fattore 3), fino a PC11. Le fitochelatine sono strettamente correlate al glutatione (GSH, γ -Glu-Cys-Gly), il quale funge da precursore per la sintesi, tanto da poter essere considerato una sorta di fitochelatina con fattore di polimerizzazione pari a uno.

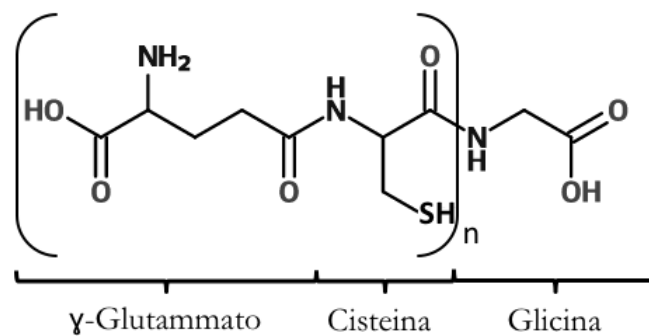


Figura 4: Formula di struttura generale della classe peptidica delle fitochelatine. Sono evidenziati i residui amminoacidici componenti l'oligopeptide. Il simbolo "n" indica il livello generale di polimerizzazione del dipeptide γ -Glu-Cys, il quale è generalmente compreso tra 2 e 11.

L'enzima catalizza la sintesi delle fitochelatine mediante una reazione a due step (Hirata et al, 2005). Nel primo passaggio si assiste alla formazione del dipeptide γ -Glu-Cys in concomitanza con il taglio della Gly terminale su una molecola di glutatione, mentre nel secondo si osserva il trasferimento del dipeptide neo-formato ad una molecola accettrice (Figura 5), la quale può essere o una molecola di GSH (e dunque formazione di PC2) o una fitochelatina preesistente in fase di allungamento (e quindi formazione di fitochelatine di tipo PC3 o superiori). Questo modello di reazione è supportato da esperimenti che hanno portato alla risoluzione di strutture cristalline di intermedi acil-enzima-PC (Vivares et al, 2005), di cui sotto sono riportati i passaggi fondamentali.

Step 1: γ -Glu-Cys-Gly $\rightarrow$ γ -Glu-Cys + Gly

Step 2: γ -Glu-Cys + (γ -Glu-Cys) $_n$ -Gly $\rightarrow$ (γ -Glu-Cys) $_{n+1}$ -Gly

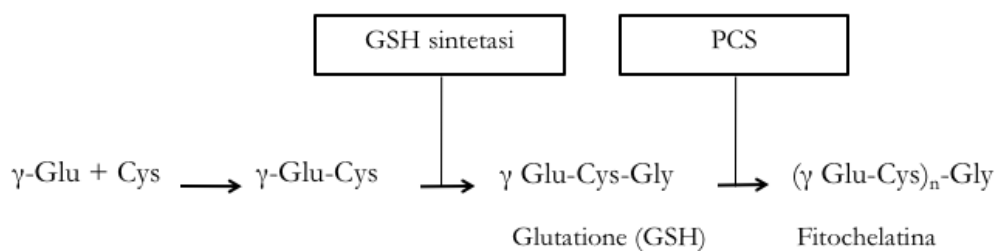


Figura 5: Pathway semplificato della biosintesi delle fitochelatine. Ne riquadri sono riportati gli enzimi critici per la sintesi delle stesse. L'enzima GSH sintetasi è l'enzima che di fatto pone un limite alla biosintesi di fitochelatine, in quanto è deputato alla produzione del pool di substrato necessario all'enzima PCS.

I metalli pesanti sono essenziali all'interno di questo pathway, in quanto sono in grado di indurre la sintesi di fitochelatine legando attivamente l'enzima PCS e fungendo da regolatori biosintetici positivi (Maier et al, 2003; Tsuji et al, 2005). Tale fenomeno di attivazione enzimatica non è limitato al solo Cadmio (Loscov, 2006; Tennstedt, 2008), ma anche ad altri metalli fisiologicamente rilevanti. Le fitochelatine inattivano la citotossicità dei metalli pesanti in quanto sono in grado di chelare gli stessi mediante il legame dei loro gruppi tiolici associati ai residui di Cys, formando i cosiddetti “complessi a basso peso molecolare” (Low Molecular Weight complexes, LMW). Questi complessi LMW rappresentano il primo passo del processo di disintossicazione e vengono quindi traslocati all'interno del vacuolo ed in esso compartimentalizzati (Mendoza-Còzatl et al, 2005, Mendoza-Còzatl et al, 2010) mediante trasportatori della membrana tonoplastica del tipo ABC. Il vacuolo assume in tal modo il ruolo di sito di stoccaggio a lungo termine dei composti metallici ad elevata tossicità cellulare (*Figura 6*). Una volta giunti nell'ambiente vacuolare, i complessi LMW, tramite addizione di gruppi zolfo S^{2-} e ulteriori molecole di metallo pesante, sono convertiti in complessi ad elevato peso molecolare (High Molecular Weight complexes, HMW).

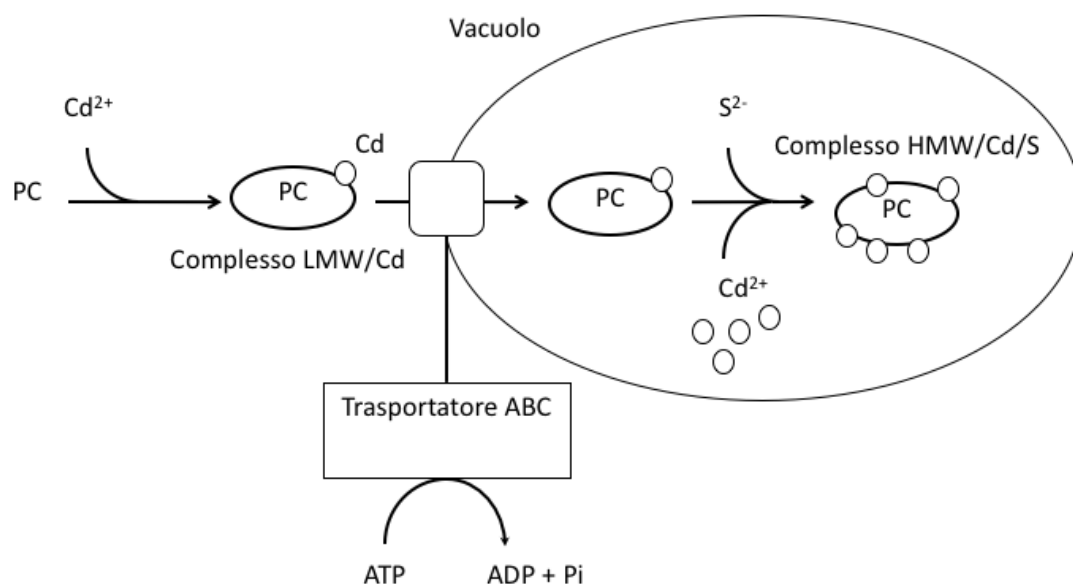


Figura 6: Visione schematica del processo di internalizzazione vacuolare. Come si può vedere i complessi a basso peso molecolare (LMW, Low Molecular Weight) citosolici vengono compartimentalizzati nell'ambiente vacuolare mediante trasporto attivo ad opera di un trasportatore ABC. All'interno del vacuolo si assiste ad un processo di aggregazione di atomi metallici e gruppi solfuro ai complessi LMW introitati, con conseguente conversione a complessi HMW (High Molecular Weight) destinati allo stoccaggio a lungo termine.

Un'ulteriore caratteristica associata alle fitochelatine è stata identificata mediante esperimenti di espressione eterologa della PCS di *Triticum aestivum* (TaPCS1, Clemens et al, 1999; Gong et al, 2003) nei mutanti cad1-3 di *Arabidopsis thaliana* (Ha et al, 1999), deleti nell'attività associata all'enzima PCS principale di *Arabidopsis thaliana* (AtPCS1). È stato dimostrato il coinvolgimento degli enzimi PCS nel trasporto di Cadmio dalle radici ai germogli, grazie al quale i livelli di metalli pesanti all'interno dell'apparato radicale vengono mantenuti ridotti nonostante l'organo sia a diretto contatto con lo stress abiotico. Altra caratteristica interessante legata agli enzimi PCS è stata studiata adottando un approccio di ingegneria genetica sempre in *Arabidopsis thaliana*. È stato infatti osservato che l'overespressione di geni codificanti per questa classe di enzimi non conduce in alcun modo ad una aumentata resistenza nei confronti dei metalli pesanti (Lee et al, 2003), determinando, al contrario, una ipersensibilità verso lo stress da Cadmio (Lee

et al, 2003; Wang et al, 2012). Piante transgeniche che sovraesprimono geni per PCS mostrano infatti il tipico fenotipo da stress da metallo pesante: ridotto tasso di germinazione, clorosi e ridotto allungamento radicale. La ragione di ciò viene ritrovata nel fatto che, a seguito di esposizione a Cadmio o altro metallo pesante, gli enzimi PCS subiscono attivazione; si ha perciò una aumentata sintesi di fitochelatine, con conseguente impoverimento della concentrazione di glutathione intracellulare. Il depauperamento del pool di glutathione è quindi responsabile del fenotipo osservato, poiché il GSH, in effetti, non è solo parte del pathway di sintesi delle fitochelatine, ma viene altresì utilizzato in altri sistemi metabolici fondamentali (Parisy et al, 2007; Dubreuil-Maurizi et al, 2011), tra i quali spiccano sia l'omeostasi dello stato di ossidoriduzione cellulare, che la difesa antiossidante, agendo come precursore per la sintesi di altre classi molecolari. La conseguenza diretta è un'alterazione del normale stato di ossidazione della cellula, con derivante sbilanciamento verso lo stress ossidativo. Un altro possibile effetto tossico è imputabile ai composti contenenti zolfo, come appunto fitochelatine e glutathione, i quali possono contribuire al sopracitato fenotipo (Lee et al, 2003).

1.4. LA DIFFUSA PRESENZA DEI GENI PER FITOCHELATINA SINTASI

I geni per PCS non risultano confinati ai soli regni Fungi (Shine et al, 2015) e Viridiplantae. Sono infatti stati identificati geni del tipo PCS-like anche nei raggruppamenti tassonomici Bacteria (Harada et al, 2004; Tsuji et al, 2004; Chaurasia et al, 2008), Algae (Ahner et al, 1995; Morelli & Scarano, 2001; Tsuji et al, 2003; Osaki et al, 2008) e Animalia (Clemens et al, 2001; Ray & Williams, 2011, Rigouin et al, 2013). Questi enzimi mostrano, come già riportato, un elevato livello di conservazione del dominio Phytochlatin (regione N-terminale). Non è comunque raro trovare un

allungamento di questa regione dell'enzima; ciò porta, in un contesto di allineamento multiplo, ad una differente localizzazione del dominio Phytochelatin, generalmente compreso nei primi 200 aminoacidi, ben più all'interno della sequenza (Figura 7). Buoni esempi di questo scenario sono i geni per PCS di *Shistosoma mansoni* (accession number CCD59772), dove il dominio Phytochelatin è localizzato tra gli aminoacidi 87 e 297, *Schizosaccharomyces pombe* (accession number CAA92263), tra le posizioni 43 e 252, o *Cyanidioschyzon merolae* (accession number XP_005536287; Osaki et al, 2008) tra le posizioni 116 e 338.

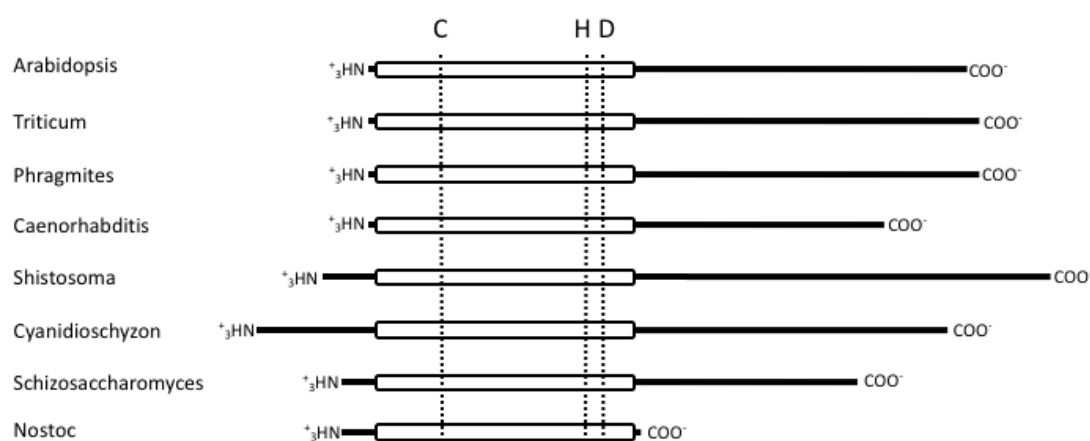


Figura 7: Rappresentazione schematica dell'allineamento del dominio "Phytochelatin" da sequenze provenienti da organismi ad elevate distanze filogenetiche. Sono riportati nell'immagine i residui relativi alla triade catalitica e le regioni discontinue di N-terminale e C-terminale. Non sono al contrario riportate le estensioni relative al dominio "Phytochelatin_C". Le specie in esame sono (dall'alto al basso): *Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum*, *Phragmites australis*, *Caenorhabditis elegans*, *Shistosoma mansoni*, *Cyanidioschyzon merolae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Nostoc spp.*

Come già detto il dominio Phytochelatin risulta fortemente conservato; ciò non è però da intendersi in senso assoluto: infatti, mentre si assiste ad una stretta conservazione dei residui associati alla catalisi transaminasica e dei parametri chimico-fisici dei residui strutturalmente fondamentali, come lecito attendere si osserva invece che maggiore è la distanza evolutiva tra gli organismi osservati, maggiori sono le differenze identificabili in porzioni del dominio sottoposti a una minore pressione selettiva. Data la presenza di

questi geni in organismi filogeneticamente molto distanti, dagli organismi unicellulari agli organismi superiori, è stato proposto che questo tipo di caratteristica rappresenti una funzione ancestrale quantomeno per il caso delle piante (Petraglia et al, 2014). Un altro fattore rilevante è la ridondanza genica relativa ai geni per PCS riscontrata in taluni organismi. È stato infatti riportata la presenza di più copie geniche il cui prodotto risulta essere un enzima del tipo Fitochelatina Sintasi, come nel caso degli enzimi di *Arabidopsis thaliana* AdPCS1 (NCBI Id NP_199220) e AdPCS2 (NCBI Id NP_171894). Questo fenomeno aumenta la sfida posta della ricostruzione filogenetica. In primo luogo, la presenza di più copie putative a livello genomico imporrebbe la validazione sperimentale di ogni singolo gene per avere conferma della sua funzionalità, dato che *in silico* non è ottenibile direttamente. In secondo luogo, il fenomeno della multicopia rischia di creare artefatti a livello di ricostruzione filogenetica, portando i software esistenti a raggruppare preferenzialmente sequenze ad elevata conservazione e a separare quelle a bassa conservazione. Nel caso delle piante, si ha una forte tendenza ad avere copie geniche divise da scarse variazioni nei residui, con conseguente fenomeno di clusterizzazione per organismi che presentano due o più copie per PCS.

1.5. LA SFIDA DELLA RISCOSTRUZIONE FILOGENETICA

La conoscenza delle relazioni filogenetiche sussistenti tra sequenze geniche e proteiche omologhe di organismi differenti è fondamentale sia dal punto di vista evolutivo che funzionale. Tale nozione permette, di fatto, di riconoscere quali regioni delle sequenze sono strettamente conservate ad elevate distanze evolutive e quali no, stabilendo così le porzioni delle sequenze importanti per la funzione e/o la struttura. Non è inoltre da sottovalutare l'utilità sperimentale derivante da queste informazioni. Questo in quanto

l'approccio permette l'individuazione delle regioni ideali per il design di primer e sonde funzionali ad uno studio più approfondito delle sequenze in esame; allo stesso modo rende possibile localizzare i siti più efficienti in approcci di mutagenesi sito-specifica, largamente utilizzati in studi di struttura e funzione. Nonostante la rilevanza della questione, non è disponibile alcuno studio dettagliato sulle relazioni filogenetiche tra PCS in angiosperme, in quanto la maggioranza dei lavori accorpa nelle analisi sequenze che vanno da cianobatteri, alghe e lieviti, fino ad animali e piante. Due requisiti sono fondamentali per l'inferenza filogenetica, ovvero un corretto allineamento di sequenze omologhe e la disponibilità di un numero sufficientemente alto di caratteri informativi per la ricostruzione. Le PCS, da questo punto di vista, rappresentano un'intrigante sfida, in quanto il dominio Phytochelatin è talmente conservato (Ruotolo et al, 2004) da fornire uno scarso segnale filogenetico a distanze tassonomicamente ridotte. D'altro canto, l'inter-dispersa presenza del dominio Phytochelatin_C su lunghe distanze tassonomiche e la sua ridotta conservazione fra taxa anche strettamente correlati, rendono l'ottenimento di allineamenti affidabili una sfida. Benché nell'ottica della ricostruzione della filogenesi di PCS su lunghe distanze tassonomiche la rimozione del dominio Phytochelatin_C sia generalmente accettato, nonché necessario, la perdita di informazioni evolutive risulta notevole. La strategia generalmente utilizzata ed accettata è un drastico taglio delle sequenze per quanto riguarda i primi 20 aminoacidi della porzione N-terminale e la completa rimozione della sequenza al termine del dominio Phytochelatin, con un risultante allineamento che copre meno del 50% della lunghezza delle sequenze in esame. Inoltre, molte specie possiedono più di un gene per PCS, di cui il caso maggiormente documentato a riguardo è quello di *Arabidopsis thaliana* (Vatamaniuk et al, 1999; Kühnlenz et al, 2014). Perciò è fondamentale chiarire il numero di geni per PCS

all'interno dei diversi organismi come informazione preliminare per futuri studi dettagliati di caratterizzazione funzionale. Nel già citato caso di studio delle due varianti di PCS presentate da *Arabidopsis thaliana* si è dimostrata una diversa funzionalità di questi enzimi, con la forma AtPCS1 che agisce come Fitochelatina Sintasi principale e con la forma AtPCS2 che agisce come enzima supplementare e che non è in grado di recuperare la perdita di funzione nel caso di delezione di PCS1 come nel caso dei mutanti cad1-3.

1.6. IL CONCETTO DI FITORIMEDIO

Il fitorimedio è una tecnologia che prevede l'utilizzo di piante e, talvolta, dei batteri associati alla rizosfera, allo scopo di rimuovere sostanze inquinanti dal suolo quali metalli pesanti o altri inquinanti organici (Peuke & Rennenberg, 2005). Questa metodica venne ideata negli anni '80, e dagli anni '90 in poi è stata sviluppata in quanto presenta diversi vantaggi rispetto alla decontaminazione chimica dei suoli. Tra i benefici si enumerano l'ecocompatibilità (dettata dal fatto che per la rimozione degli inquinanti vengono utilizzate piante e non prodotti di sintesi) e la riduzione dei costi associata alla bonifica dei terreni (poiché vengono sfruttati organismi vegetali che richiedono ridotte cure); inoltre, l'utilizzo di particolari specie permette di accoppiare la rimozione degli inquinanti alla produzione di biomassa utile per la successiva elaborazione a biocarburanti. Un ulteriore passo avanti è stato compiuto con la scoperta dei cosiddetti iperaccumulatori, ovvero specie vegetali capaci di immagazzinare al loro interno maggiori quantità di inquinanti rispetto ad altri organismi e di non mostrare, o di subire ridotti, cali della fitness in risposta allo stress e dell'utilizzo degli organismi geneticamente modificati (OGM) ad

elevato grado di resistenza allo stress. Con fitorimedio si intende in realtà un insieme di diversi approcci volti alla bonifica di terreni inquinati. Si divide perciò in:

1. fitoestrazione, in cui i contaminanti ambientali (metallici e organici) sono compartimentalizzati in piante destinate alla biomassa,
2. fitodegradazione, in cui i contaminanti organici sono internalizzati e degradati all'interno degli organismi vegetali,
3. rizofiltrazione, che prevede la rimozione di inquinanti da ambienti acquatici tramite le radici,
4. fitostabilizzazione, che riduce la biodisponibilità dei contaminanti immobilizzandoli alla matrice del suolo,
5. fitovolatilizzazione, in cui gli inquinanti vengono trasformati all'interno dell'organismo vegetale e rilasciati, dallo stesso, nell'atmosfera.

Allo stato dell'arte, il fitorimedio risulta ancora scarsamente utilizzato, sebbene i vantaggi di tale metodica siano notevoli.

1.7. ARUNDO DONAX

Arundo donax L (NCBI Taxonomy ID 35708), detta solitamente canna comune, è una pianta perenne appartenente alla famiglia delle Poaceae (Taxonomy ID 4479).



Figura 8: Aspetto tipico di una macchia di *Arundo donax*. Gli individui adulti sono riconoscibili per le infiorescenze apicali.

L'aspetto ricorda fortemente il più noto bambù (*Figura 8*), con un culmo da cui protrudono foglie alternate. Le dimensioni sono notevoli, con un'altezza massima che arriva a 10 metri, e l'apparato radicale è costituito da un robusto rizoma dotato di radici. In quanto pianta rizomatosa perenne, questo organismo risulta particolarmente adatto per il processo di produzione di biomassa. È una pianta largamente diffusa soprattutto in ambienti ripari nelle zone climatiche temperate, dimostrando al tempo stesso una forte adattabilità a climi molto diversi. Questa pianta risulta presente non solo in Europa, ma anche in Asia e Nord America. Menzione particolare merita la sua presenza in California, dove grazie alla sua intrinseca adattabilità e invasività sta causando notevoli problemi in quanto soppianta organismi vegetali autoctoni, impoverendo la biodiversità degli ambienti ripari californiani (Khudamrongsawat et al, 2004). L'origine di *Arundo donax* va ricondotta all'Asia (Mariani et al, 2010), con una successiva diversificazione in due linee, ovvero quella localizzabile in Asia/Medioriente e quella nel Mediterraneo/America. Nel caso della variante mediterranea, si sarebbe inoltre assistito ad un effetto “collo di

bottiglia” per quanto riguarda i tratti genetici dei primi organismi colonizzatori, con conseguente Effetto Fondatore lungo la popolazione in questione. Tale variante mediterranea sarebbe stata successivamente esportata in America del Nord dai coloni nel corso del 1800. Questa ipotesi è supportata dalla povertà di AFLP rari all’interno della variante mediterranea/americana, a testimonianza che pochi organismo hanno dato origine alle comunità attualmente presenti in queste aree geografiche. La variante mediterranea di *Arundo donax* risulta inoltre sterile (Hardion et al, 2012) a causa di un assetto cromosomico non euploide composto da circa 110 cromosomi, anche se ne sono stati contati anche 112 o più (Bucci et al, 2013). Sulla ploidia di *Arundo donax* la questione risulta tuttora aperta, anche se sembrano coinvolti un processo di ibridazione tra un tetraploide ed un diploide, con formazione di un triploide a 108 cromosomi e, mediante aneuploidia, acquisizione di due ulteriori cromosomi. Questa “instabilità” nel conteggio dei cromosomi pare condurre ad aberrazioni durante i normali processi meiotici, con conseguente infertilità dei gameti. Sono comunque stati osservati sia ovuli che granuli pollinici potenzialmente fertili, anche se con un’incidenza trascurabile. Non è comunque da escludere un potenziale riproduttivo di questo organismo. Per ovviare alla sterilità degli organi riproduttivi, *Arundo donax* ha evolutivamente optato per una propagazione vegetativa asessuata a carico del rizoma o delle porzioni fotosintetiche quali porzioni di culmo o ramificazioni secondarie. Questo approccio incontra favorevolmente l’ambiente preferenziale di *Arundo*, ovvero quello ripario. In effetti, durante le stagioni a maggiore piovosità, queste canne giganti subiscono facilmente un danneggiamento meccanico, che porta al distacco di porzioni epigee o ipogee della pianta dalle quali, una volta giunte in un terreno adatto, si genera un nuovo organismo, clone del donatore. L’intrinseca sterilità e la propagazione vegetativa sostengono inoltre l’ipotesi dell’effetto

fondatore cui si assiste nella variante mediterranea, la quale genera prole geneticamente identica a sé stessa, portando alla formazione di cloni nei quali le differenze sono riconducibili ad effetti ambientali, con conseguente insorgenza di ecotipi, più che reali differenze cromosomiche.

2. MATERIALI E METODI

2.1. OTTENIMENTO DEI DATASETS TRASCRITTOMICI

I dati inerenti ai trascrittomi di *Arundo donax* derivano dalla collezione ottenuta e depositata presso la Fondazione Edmund Mach di San Michele all'Adige (Sablok et al, 2014). I dati disponibili riguardano i trascritti provenienti dagli organi di culmo, foglia, gemma e radice e sono disponibili presso l'indirizzo <http://ecogenomics.fmach.it/arundo/>. Un successivo dataset relativo ai dati trascrittomici di *Arundo donax* in condizioni di stress idrico sempre ottenuto alla fondazione Edmund Mach (Fu et al, 2016) è disponibile sul database NCBI (SRA Accession Number da ERX1050553 a ERX1050570).

2.2. RICERCA PER OMOLOGIA DI GENI PCS-LIKE

La query selezionata per la ricerca corrisponde al trascritto omologo PCS1 di *Oryza sativa* (Phytozome Id: LOC_Os06g01260). L'analisi è stata effettuata sfruttando la suite di BLAST+ ad algoritmo di ricerca di omologia nucleotidica (BLASTn). LOC_Os06g01260 è stata selezionata data la relativa vicinanza evolutiva tra le specie, oltre ad avere la disponibilità tramite il web server Phytozome del genoma completo di *Oryza sativa*. 66 putativi unigenes omologhi (*Supplementari 1*) sono stati identificati nei diversi organi di *Arundo* (culmo 14, foglia 12, gemma 22, radice 18). Tali trascritti sono stati inizialmente allineati mediante algoritmo ClustalW della suite BioEdit7 e controllati manualmente per la presenza delle caratteristiche canoniche di un trascritto per PCS, ovvero la presenza dei codoni atti alla traduzione negli aminoacidi della triade catalitica (in accordo con la

sequenza PCS1 di *Arabidopsis thaliana*; Cys56: TG[C/T]; His162: CA[C/T]; Asp180: GA[C/T]). Mediante selezione di tali caratteristiche, i diversi unigenes sono stati riuniti in differenti macroclassi, basandosi sulla loro lunghezza relativa e identità di sequenza. Di queste macroclassi, la maggior parte manca della regione 5' del trascritto (fenomeno ricorrente negli esperimenti di ottenimento di trascrittomi mediante tecnologia Illumina®), la quale è stata dedotta da quei pochi trascritti integri in tale porzione nucleotidica. A seguire questa fase di raggruppamento e a seguito del design di idonei primer, si è tentata l'amplificazione dei trascritti PCS-like di *Arundo* per la successiva fase di sequenziamento degli stessi.

2.3. AMPLIFICAZIONE E SEQUENZIAMENTO DEI TRASCRITTI PCS-LIKE DI ARUNDO

Un primo approccio di amplificazione su DNA genomico si è rivelato inefficiente, probabilmente a causa della presenza di introni non rilevabili con la metodica di sequenziamento del trascrittoma utilizzata. Si è perciò deciso di bypassare questo inconveniente andando ad amplificare i trascritti PCS-like dall'RNA. Il tessuto selezionato per l'estrazione dell'RNA totale è stato quello radicale, in quanto le differenti sequenze codificanti precedentemente identificate si ritrovano contemporaneamente nel trascrittoma di radice. Una porzione di tessuto di circa 500mg è stata congelata mediante azoto liquido e polverizzata mediante mortaio e pestello. A seguire è stato utilizzato il reagente Trizol™ per l'estrazione dell'RNA, seguendo le indicazioni della casa produttrice, su un'aliquota di radice polverizzata di 150mg. L'RNA totale ottenuto è stato quantificato spettrofotometricamente (assorbanza a 260nm) e ne è stata valutata la purezza (rapporti 260/280 e 260/230). Dopo quantificazione, l'acido nucleico è stato

trattato con Amplification Grade DNaseI (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, USA) per rimuovere eventuali contaminazioni da DNA genomico seguendo le indicazioni del fornitore, allestendo la reazione in un volume finale di 25µL. L'integrità dell'RNA è stata valutata caricandone 2µL, unitamente a 4µL di dye buffer contenente blu di bromofenolo e xilene cianolo, su gel di agarosio al 2% w/v ed etidio bromuro 0.2/0.5µg/mL. Successivamente da questi RNA purificati ne è stato sintetizzato il cDNA specifico per mRNA mediante l'enzima SuperScript™III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguendo le indicazioni del produttore. In un volume finale di 13µL, sono stati inizialmente aggiunti Oligo dT 2.5µM, dNTPs 0.5mM (ogni dNTP), 1µg di RNA e H₂O a sufficienza per portare a volume. La soluzione è stata riscaldata a 65°C in termociclatore per 5' e subito raffreddata in ghiaccio. Dopo una rapida precipitazione per centrifugazione, sono stati aggiunti First Strand Buffer 1x, DTT 5µM, 40U di RNase OUT e 100U di enzima SuperScript III. Dopo veloce mescolamento della soluzione, la temperatura è stata portata a 50°C per 1h e successivamente i vari enzimi sono stati inattivati a 70°C per 15'. I trascritti sono stati infine amplificati utilizzando l'enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen), utilizzando le seguenti combinazioni di primer (*Tabella 1*):

Nome del Primer	Sequenza del Primer (5'-3')	T _m (°C)
AdPCSs_Fwd	GGCATCACTTTCGGCAAGGTC	70°
AdPCS1_Rev	GAGATAATTTTTATGTCATCACG	58.2°
AdPCS2_Rev	GAATTCTACCCAGGGGATTGCTAG	66.5°
AdPCS3_Rev	GGGTCATCACTTTAAATCAAACCTG	62.3°
AdPCS4_Rev	CACTACTTAGTATTTCAATCAAGC	55.6°
AdPCS5_Rev	GGCAGTATAAGCAAATAAGTTTGG	61.5°
AdPCS6_Rev	CACTCGCAACATGGATGTTATTAG	64.2°
AdPCS7_Rev	ACCTAAATCCCTTATATGCCACTG	62.9°
AdPCS8_Rev	CACTAGAGTATCACTTCAAAAGAGGCA	64.5°
AdPCS9_Rev	CGGATTGCGGCTGTACCATAGCTG	73.8°
AdPCS10_Rev	GATTTTCGCTTTAGCATATCCCAG	65.4°
AdPCS11_Rev	CGGCCCTGTCCCCATCTAGACCT	76.1°
AdPCS_F_gw	CACCATGGCAGCTATGCCGTCCTGTAC	78.5°

Tabella 1: Primer utilizzati per tentare l'amplificazione delle sequenze unigenes rilevate bioinformaticamente.

Unitamente alla sequenza (riportate in direzione 5'-3') sono indicate le relative temperature di melting. Il primer AdPCSs_Fwd funge da primer forward unico per gli unigenes identificati. Il primer AdPCS_F_gw presenta una breve sequenza accessoria (CACC) dedicata ai vettori del sistema del tipo gateway necessari per la biochimica di reazione del suddetto sistema.

Ogni reazione di amplificazione è stata allestita in un volume finale di 10 µL. Di seguito sono riportate le concentrazioni finali dei singoli reagenti: Buffer Phusion HF 1x, forward primer 0.5µM, reverse primer 0.5µM, dNTPs 200µM ognuno, cDNA 1µL da diluizione 1:10, enzima Phusion *Taq* DNA Polymerase 0.01U e H₂O a volume. La reazione è stata eseguita seguendo le temperature e le relative tempistiche riportate in *Figura 9*.

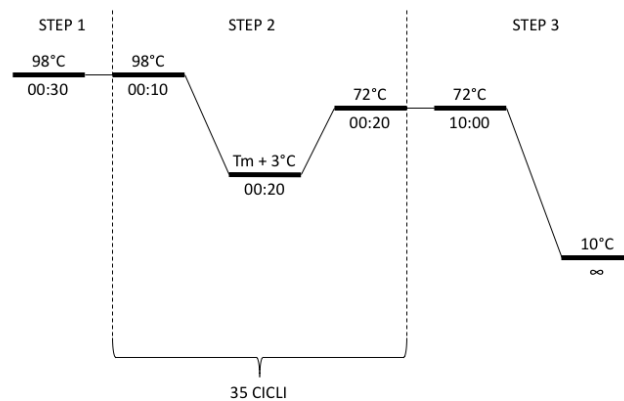


Figura 9: Schema delle temperature e delle relative tempistiche adottate nella reazione catalizzata dall'enzima Phusion Taq DNA Polymerase. Nello "STEP 2" dell'immagine, viene riportato " $T_m + 3^\circ\text{C}$ ", ad indicare che la temperatura in questione è derivata dalla temperatura di melting del primer della coppia in esame che presenta il valore più basso il quale è stato innalzato di 3°C .

Gli ampliconi ottenuti sono stati escissi dal gel di agarosio tagliando il gel a livello delle bande, transilluminandolo brevemente a raggi UV per la corretta individuazione delle stesse. Utilizzando il kit per il recupero di acidi nucleici da gel NucleoSpin® Gel and PCR Cleanup (Macherey Nagel, Düren, Germania) e seguendo le indicazioni fornite dal produttore, gli ampliconi sono stati purificati per la successiva fase di clonaggio. I putativi ampliconi PCS-like di *Arundo* sono stati clonati in un vettore ad elevato numero di copie di *Escherichia coli*. A tal fine sono state preparate le cellule elettrocompetenti di *Escherichia coli* per la successiva trasformazione, sfruttando un protocollo modificato disponibile online sul portale della iGEM Foundation (http://2012.igem.org/wiki/images/5/57/Making_Ecoli_Electrocompetent.pdf, adattato da protocollo originale di Wu et al, 2010). Il clonaggio degli ampliconi è stato condotto nel vettore pGEM®-T (PROMEGA®, Madison, WI, USA) seguendo le indicazioni della casa produttrice ed effettuando l'A-tailing data la produzione di estremità piatte ad opera dell'enzima Phusion precedentemente utilizzato. I trasformanti sono stati

successivamente piastrati su terreno selettivo in base alla colorazione blu-bianco (terreno LB standard, X-gal 80µg/mL, IPTG 0.5mM, Ampicillina 100µg/mL), incubate a 37°C e lasciate crescere per 24h. Le colonie bianche e che per tanto risultano contenere un inserto capace di distruggere la funzionalità del gene *lacZ*, sono state trasferite su nuove piastre mediante replica plating per la successiva identificazione. Dopo la fase di crescita delle piastre a 37°C, di queste colonie ricombinanti è stata effettuata una colony PCR per verificare l'effettiva identità degli inserti con i prodotti PCS-like ricercati. I primer utilizzati per la procedura hanno il loro target sulle regioni plasmidiche T7 e SP6 e la reazione è stata allestita in un volume finale di 10 µL, utilizzando Reaction Buffer 1x, dNTPs 100µM, primer T7 200nM, primer SP6 200nM, 1U di *Taq* DNA Polymerase home-made e H₂O a volume. Il template, in questo caso, è stato un “colony picking”, nel quale un puntale da pipetta è stato utilizzato per prelevare una piccola parte della colonia e inserito nella miscela di reazione. Dopo rapida agitazione dello stesso, il puntale è stato rimosso dalla soluzione ed è stata effettuata direttamente la reazione di amplificazione (Figura10).

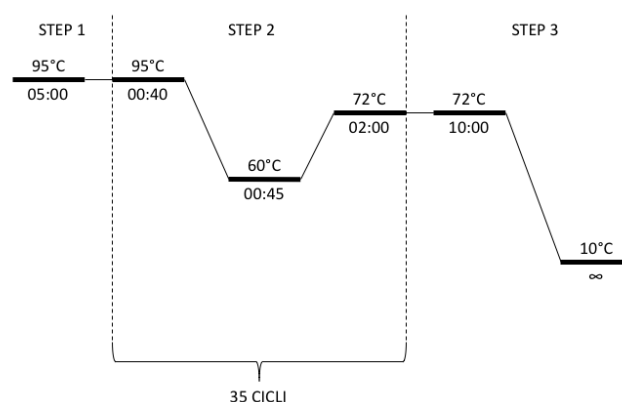


Figura 10: Schema delle temperature e delle relative tempistiche adottate nella reazione di colony PCR.

Le bande elettroforetiche sono state analizzate e quantificate. Le colonie contenenti prodotti di amplificazione delle dimensioni attese sono così state preparate per la reazione di sequenziamento. Si è deciso di optare per un sequenziamento unidirezionale con BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) sfruttando nuovamente i primer T7 ed SP6. In tal modo si sono ottenuti dati di alta qualità alle estremità 5' di lettura degli inserti. La reazione è stata allestita in 10 µL di volume finale, addizionando BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix 1x, Sequencing Buffer 1x, primer T7 o SP6 300nM, 520ng di template e H₂O a volume. Le miscele di reazione sono state mandate a servizio di sequenziamento presso la piattaforma dedicata della Fondazione Edmund Mach e i profili risultanti analizzati con la suite informativa FinchTV 1.5.0 (Geospiza, Inc.; Seattle, WA, USA; <http://www.geospiza.com>). Di tutte le combinazioni di primer testate, solo AdPCS1, AdPCS2 e AdPCS3 hanno condotto all'identificazione di trascritti AdPCS like completi da ATG iniziale a codone di stop.

2.4. ANALISI FILOGENETICA

Una volta ottenute le sequenze complete AdPCS1, AdPCS2 e AdPCS3, se ne sono determinate le relazioni filogenetiche sussistenti nei confronti di altre monocotiledoni. Per ottenere dati di alta qualità, si è deciso di sfruttare per la raccolta dei dati il database di Phytozome (Goodstein et al, 2012). Ciò in quanto Phytozome presenta il vantaggio, rispetto ad altri database quali NCBI (Geer et al, 2010), di presentare esclusivamente sequenze provenienti da organismi vegetali il cui genoma è stato completamente sequenziato. Questo approccio porta diversi benefici:

- per RNA si ottengono sequenze omologhe complete, da ATG iniziale a codone di STOP;
- per proteine si ottengono le sequenze complete da Met_i a terminatore;
- si ottiene accesso ai trascritti alternativi gene-specifici;
- non si ha ridondanza di sequenze omologhe provenienti dallo stesso organismo, in quanto i trascritti e i prodotti proteici vengono univocamente riportati al genoma in esame;
- la qualità generale dei trascritti e delle proteine è di alto livello, provenendo da esperimenti di sequenziamento genomico.

La query selezionata per la ricerca di omologia ad algoritmo BLASTx è l'omologo PCS-like di *Oryza sativa* (LOC_Os06g01260), evolutivamente molto prossimo ad *Arundo donax*, ma non appartenente allo stesso clade filogenetico. Sono state ricercate le putative sequenze omologhe sia a livello di "Grass" che nelle "Angiosperms" più basali. È stata inoltre aggiunta all'analisi la sequenza di *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud., detta anche cannuccia di palude, ottenuta tramite NCBI, in quanto l'organismo in questione è evolutivamente molto prossimo ad *Arundo donax* e ne è stata validata la funzionalità (Zhao et al, 2014). Le sequenze sono state verificate per la presenza delle caratteristiche adatte ad essere considerate trascritti PCS-like mediante il programma di analisi Bioedit (Hall, 1999). L'approccio del BLASTx permette di focalizzare l'attenzione sui residui proteici e, al tempo stesso, di mantenere intatto il frame di lettura dei codoni, cosa molto più complessa se si sfruttano sequenze nucleotidiche. In effetti le sequenze omologhe identificate sono state controllate a livello bioinformatico come CDS (Coding Sequences) e successivamente analizzate, per la filogenesi, a livello proteico. Il passo seguente è stato l'allineamento delle proteine sfruttando il programma MAFFT

(Kato et al, 2005). Tale suite dà accesso ad algoritmi di allineamento dedicati a particolari condizioni di sequenza. Quello selezionato è stato l'algoritmo di affinamento iterativo E-INS-i (Kuraku et al, 2013), in quanto le PCS-like presentano due diversi domini con differenti gradi di conservazione di sequenza. L'allineamento multiplo ottenuto è stato processato con la suite GBlocks (Talavera & Cartesana, 2007), che permette di rimuovere, a diversi livelli, le regioni di discontinuità dell'allineamento stesso (Parametri Usati in GBlocks; Minimum Number Of Sequences For A Conserved Position: 13; Minimum Number Of Sequences For A Flanking Position: 13; Maximum Number Of Contiguous Nonconserved Positions: 8; Minimum Length Of A Block: 5; Allowed Gap Positions: With Half; Use Similarity Matrices: Yes). Il file FASTA ottenuto è stato a questo punto modificato a file PHYLIP (estensione “.phy”), adatto alla successiva ricostruzione filogenetica utilizzando il web server ALTER (Glez-Peña et al, 2010). Il file è stato così sottomesso al web server PhyML (Guindon & Gascuel, 2003) nella sua versione 3.0 (Guindon et al, 2010), sfruttando la metodica SMS (Smart Model Search; Lefort et al, 2017) per stabilire il migliore modello evolutivo relativo alle CDS in esame e adottando come test statistico l'approccio aRLT (approximate likelihood-ratio test). Il Fast likelihood-based method adottato è stato l'aRLT basato sul X^2 , in quanto risulta più conservativo rispetto all'approccio basato sul metodo SH (Ansimova & Gascuel, 2006).

2.5. REAL-TIME PCR

Per valutare l'espressione dei trascritti AdPCSs in organi posti in condizioni fisiologiche, si è deciso di utilizzare la metodica della Real Time PCR. Il primo passo è stato il design di primer adatti a tale metodica, che come da letteratura, devono presentare parametri

fisico-chimici adatti alla chimica di reazione, in questo caso la Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix-UDG (ThermoFisher Scientific). Il target di amplificazione è stato selezionato nella porzione 3' dei trascritti, in modo da valutare l'espressione di mRNA completi. I primer creati (*Tabella 2*) sono stati inizialmente testati per la loro efficienza di amplificazione, procedimento definito come calibrazione. Il gene housekeeping di riferimento selezionato è l'Actina II, i cui primers sono stati derivati dai trascrittomi disponibili di *Arundo*, in quanto si è dimostrata stabile la sua espressione in risposta a stress da metallo pesante (Poli et al, 2017; in press). Il protocollo in questione prevede l'allestimento di una batteria di reazioni di amplificazione in triplicato tecnico in cui viene variata esclusivamente la diluizione di template secondo un fattore determinato arbitrariamente, in questo caso 3, ovvero 1:3, 1:9, 1:27, 1:81, 1:243. La singola reazione viene assemblata in un volume finale di 12.5µL, utilizzando SYBR Green Buffer 1x, primer forward 200nm, primer reverse 200nm, 1µL di template alle differenti diluizioni e H₂O a volume. In *Figura 11* sottostante sono riportate temperature e le durate dei singoli passaggi della reazione di amplificazione.

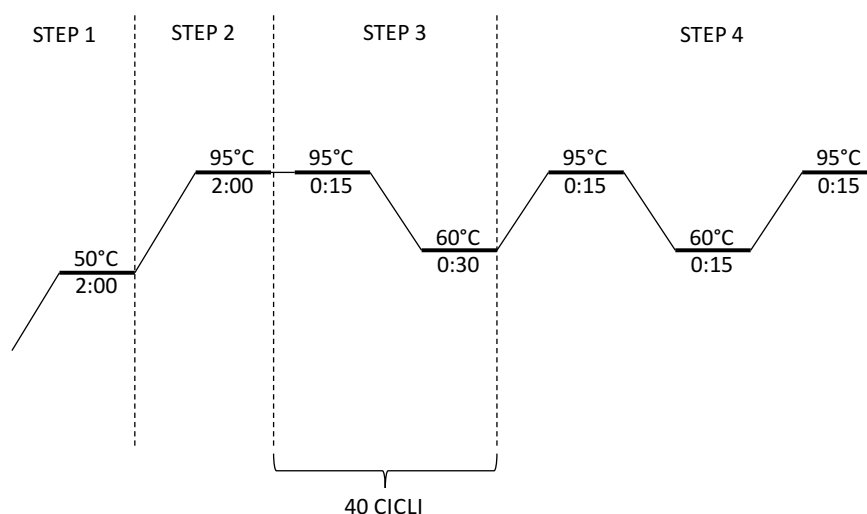


Figura 11: Schema delle temperature e dei relativi tempi utilizzati nella reazione di Real-Time. Lo "STEP 3" prevede un passaggio a 60°C dedicato al distacco del fluoroforo dai trascritti in amplificazione, unitamente all'allungamento dei trascritti bersaglio d'amplificazione.

Dalla calibrazione è emerso che i primer risultano ottimali e con rese comprese tra il 90% e il 110%, valori ideali secondo i principi della Real-Time. Mediante la calibrazione è stata inoltre dedotta la diluizione ottimale per l'amplificazione, che è risultata essere compresa tra 1:3 e 1:9, selezionando arbitrariamente 1:6 come fattore di diluizione per gli esperimenti successivi.

Bersaglio	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
AdPCS1	GGCTTTACATCCCAGCACAT	CGTCTAATAACATCAGGTAGATCG
AdPCS2	CCTTGCAGTACAAGTTTGAGCAAC	TGGGATGTAAAGCCAGCAGTAG
AdPCS3	AGTATCCATCAAGCGTAGATGTTG	CTCATCTTTGATGCCCAACC
Actina II	TCTTGGCTTGCATTCTTGGG	TGGATTGCGAAGGCTGAGTAC

Tabella 2: Primer utilizzati per la metodica di Real-Time. Sono riportate le coppie specifiche per i geni AdPCS1-3 unitamente alla coppia utilizzata per amplificare il gene di riferimento Actina II.

L'RNA totale è stato estratto utilizzando nuovamente il reagente Trizol, seguendo le indicazioni fornite dal produttore, partendo da circa 100mg di tessuto. Gli organi selezionati sono stati: foglia, lamina verde, internodo, nodo, radice e, infine, getto meristematico emergente dal rizoma. L'RNA è stato, come precedentemente descritto, quantificato spettrofotometricamente, valutatane la qualità e l'integrità e trattato con DNasiI. Un'aliquota di 1µg è stata retrotrascritta sfruttando l'enzima SuperScriptTMIII seguendo le indicazioni della casa produttrice. Il cDNA così ottenuto è stato diluito 1:6 per la successiva amplificazione. Ogni reazione è stata assemblata in 12.5µL di volume finale, con le concentrazioni finali di SYBR Green Buffer 1x, primer forward 200nm, primer reverse 200nm, 1µL di templat della diluizione 1:6 e H₂O a volume. Di ogni tessuto analizzato si è effettuato un triplicato biologico e di ognuno di essi è stato effettuato un triplicato tecnico. Ciò permette un ottimo controllo sia della variabilità biologica che della manualità dell'operatore. Successivamente all'analisi dell'espressione

in condizioni fisiologiche, è stata effettuata la valutazione dell'espressione in condizioni di stress. Per ottenere questo risultato sono stati preparati degli "stick". Differenti porzioni provenienti da un culmo di *Arundo donax* sono stati posti in coltura idroponica in modo da favorire la radicazione, sfruttando l'estrema capacità rigenerativa della pianta stessa. In questo contesto, porzioni internodali di 20cm sono state asportate dalla pianta ed immerse in acqua fino alla formazione di tessuto radicale. Lo stick presenta in questo modo sia porzione epigea che porzione ipogea. A seguire sono state definite le tempistiche di esposizione alla fonte di stress da metallo pesante, ovvero CdSO_4 alla concentrazione $150\mu\text{M}$. I tempi stabiliti sono: 0h, 30', 90', 3h, 6h, 11h e 24h. In questo modo è stata stabilita la reazione al metallo nell'arco della prima giornata di contatto allo stress. Per ogni punto temporale, tre differenti stick sono stati posti in coltura idroponica contenente Cadmio in maniera tale da valutare la variabilità biologica nella risposta trascrizionale associata ai geni AdPCS1-3. Al termine dell'esposizione prevista, una porzione di circa 100mg di tessuto epigeo ed altrettanti di tessuto ipogeo sono stati preparati per l'estrazione dell'RNA totale mediante congelamento in azoto liquido. L'RNA è stato estratto usando nuovamente il reagente Trizol; secondo le indicazioni del produttore. Nuovamente, l'RNA è stato processato e retrotrascritto come precedentemente descritto. I cDNA ottenuti sono stati diluiti in un rapporto di 1:6 per avere dati confrontabili con gli esperimenti in condizioni fisiologiche. Le reazioni sono state assemblate ancora in $12.5\mu\text{L}$ di volume, con le concentrazioni finali di SYBR Green Buffer 1x, primer forward 200nm , primer reverse 200nm , $1\mu\text{L}$ di template della diluizione 1:6 e H_2O a volume. Di ogni triplicato biologico è stato effettuato un triplicato tecnico come già descritto.

2.6. PRIMO SISTEMA ETEROLOGO – *Saccharomyces cerevisiae*

2.6.1. OTTENIMENTO DEI MUTANTI IN *Saccharomyces cerevisiae*

Le CDS complete dei trascritti AdPCS1, AdPCS2 e AdPCS3 sono amplificate nuovamente sfruttando l'enzima Phusion, come precedentemente descritto, e sono successivamente state clonate nel vettore pENTR™/D-TOPO™ Cloning Kit (ThermoFisher Scientific) di *Escherichia coli* seguendo le indicazioni fornite dal produttore. Ciò ha permesso di ottenere un plasmide donatore per il successivo vettore utilizzato, ovvero il plasmide gateway di *Saccharomyces cerevisiae* Gateway™ pYES-DEST52 Vector (ThermoFisher Scientific). La reazione di ricombinazione tra vettore donatore e ricevente è stata condotta seguendo le istruzioni del fornitore. Una volta ottenuti i plasmidi pYES-DEST52 contenenti le CDS di AdPCSs, è stata allestita la trasformazione dei lieviti. Il ceppo selezionato per la trasformazione è YK44 (ura3-52 his3-200, ΔZRCDCot1, mating type α; Zhao et al, 2014), estremamente sensibile al Cadmio e dunque ottimale per lo scopo prefissato di validazione funzionale. Oltre ai trascritti AdPCSs si è deciso di includere come controllo negativo un trasformante provvisto del vettore privo di alcun transgene. La trasformazione è stata condotta utilizzando la metodica dell'acetato di Litio, ottimizzata per ridurre le quantità di plasmide utilizzato. Si è preparata una precoltura da singola colonia in 10mL di YPD (peptone 2% w/v, yeast extract 1% w/v, glucosio 2%, pH 6.5) e lasciata overnight a 30°C in agitazione. L'OD₆₀₀ è stato determinato e diluito a 0.2 in un volume finale di 7mL. L'aliquota è stata lasciata crescere in agitazione a 30°C fino a raggiungere un valore di OD₆₀₀ di 0.6. Le cellule sono state pellettate e risospese in 40mL di tampone TE 1x (10mM Tris a pH 7.5, 1mM EDTA). Dopo ripellettazione, sono state risospese in 400μL

di una soluzione di LiAc 1x (100mM acetato di Litio a pH 7.5) e TE 1x. La sospensione è successivamente stata incubata per 10' a T_{amb} . Per ogni reazione di trasformazione sono stati mescolati in un a nuova Eppendorf 50 μ L di sospensione cellulare precedentemente descritta, 1ng di plasmide ricombinante, 25ng di ssDNA salmon sperm e 600 μ L di una soluzione di LiAc 1x / PEG 40% / TE 1x. Questo mix è stato incubato a 30°C per 30'. Successivamente sono stati addizionati 15 μ L di DMSO, mescolata la soluzione portata a 42°C per 15'. Dopo la fase di shock termico, la soluzione è stata raffreddata in ghiaccio per 2', brevemente precipitata e il surnatante è stato rimosso e sostituito con 500 μ L di TE 1x. Un'aliquota di 150 μ L è stata prelevata e concentrata in un volume finale di 75 μ L di TE 1x e infine piastrata su terreno selettivo YSD-U (Yeast Nitrogen Base 0.17%, (NH₄)₂SO₄ 2%, Dropout-U 1x, glucosio 2%, agar 2%, pH 5.8). I ricombinanti sono stati selezionati grazie all'acquisizione da parte loro della capacità di sopravvivere sulle piastre selettive di sopra descritte.

2.6.2. TEST DI COMPLEMENTAZIONE IN *Saccharomyces cerevisiae*

Le linee trasformanti contenenti i trascritti completi AdPCS1, AdPCS2 e AdPCS3 nel contesto di pYES-DEST52, unitamente alla linea trasformata con plasmide vuoto, sono state poste in 20mL di precoltura liquida YSD-U a partire da singole colonie. La precoltura è stata fatta procedere overnight a 30°C in oscillazione a 225rpm. Successivamente l'OD₆₀₀ è stato controllato, diluito al valore di 0.5 e un'aliquota di 1mL è stata trasferita in un microtubo da 1.5mL sterile. L'aliquota è stata pellettata a 14000rpm per 10", il surnatante è stato rimosso e le cellule sono state risospese in H₂O bidistillata per la fase di lavaggio. Dopo inversione, le cellule sono state nuovamente pellettate nelle stesse condizioni sopra descritte, il surnatante è stato rimosso, e un volume di 1mL di H₂O

bidistillata è stato aggiunto. Le cellule sono poi state trasferite in 20mL di YPGAL (peptone 2% w/v, yeast extract 1% w/v, galattosio 2%, pH 6.5) a 30°C e 225rpm di oscillazione. Dopo 24h di esposizione alla fonte di carbonio inducente la trascrizione del transgene, l'OD₆₀₀ è stato misurato e portato a 0.5. Un'aliquota di 1mL è stata pellettata a 14000rpm per 10", il surnatante è stato rimosso e le cellule sono state risospese in H₂O bidistillata; dopo inversione le cellule sono state nuovamente pellettate nelle stesse condizioni sopra descritte, il surnatante è stato rimosso, e un volume di 1mL di H₂O bidistillata è stato aggiunto. A partire da queste cellule, due diversi set di diluizione sono stati assemblati. Il primo è stato preparato in YSD-U (piastre per il controllo di crescita) alle condizioni di 1:10, 1:100 e 1:1000. Una goccia di 5µL da ogni diluizione è stato piastrato mediante dropping su piastre YSD-U (agar 2%). Il secondo set è stato preparato in condizioni simili, con la differenza che le cellule sono state diluite in YPGAL. Ancora una volta una goccia di 5µL da ciascuna diluizione è stata piastrata su YPGAL contenente CdSO₄ alla concentrazione 100µM (piastre di controllo per l'acquisizione di resistenza a metallo). Le piastre sono state infine poste in incubazione a 30°C e il fenotipo è stato analizzato a 24h e 48h. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in quadruplicato.

2.6.3. ANALISI DI CRESCITA IN *Saccharomyces cerevisiae*

Singole colonie provenienti dalle linee transgeniche e dalla linea contenente il plasmide vuoto, sono state preinoculate in YSD-U overnight a 30°C in oscillazione a 225rpm. A seguire l'OD₆₀₀ è stato misurato e portato al valore di 0.5. Un'aliquota di 1mL è stata trasferita in un microtubo da 1.5mL sterile. L'aliquota è stata pellettata a 14000rpm per 10", il surnatante è stato rimosso e le cellule sono state risospese in H₂O bidistillata per la fase di lavaggio. Dopo inversione, le cellule sono state nuovamente pellettate nelle

stesse condizioni sopra descritte, il surnatante è stato rimosso, e un volume di 1mL di H₂O bidistillata è stato aggiunto. Le cellule sono poi state trasferite in 20mL di YPGAL e poste a 30°C in oscillazione a 225rpm. Ad ogni time-point, un'aliquota di 1mL è stata prelevata in sterilità e ne è stato valutato l'OD₆₀₀, in modo da monitorare la crescita cellulare. I time-point selezionati sono 0h, 4h, 8h, 12h, 24h, 36h e 48h. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in quadruplicato.

2.6.4. ANALISI DI SPETTROMETRIA DI MASSA IN *Saccharomyces cerevisiae*

Per valutare in termini quali-quantitativi la biosintesi di fitochelatine e il loro grado di polimerizzazione da parte delle differenti varianti geniche AdPCSs, si è optato per un'analisi di spettrometria di massa. Data l'impossibilità di analizzare i prodotti PCn dei singoli geni direttamente in *Arundo* a causa della loro presenza contemporanea nell'organismo e di non poter scorporare tali dati, è stato deciso di sfruttare questa tecnica sui trasformanti di lievito, che conferisce il vantaggio di poter analizzare le performances delle varianti geniche singolarmente. Il controllo negativo selezionato è il trasformante provvisto di vettore privo di transgeni (Empty vector). È stata allestita una precultura overnight da colonia singola in 10mL YSD-U a 30°C in oscillatore. Successivamente, un'aliquota da 500μL ad OD₆₀₀ pari a 0.5 è stata inoculata in 10mL di terreno YPGAL (induzione dell'espressione del transgene mediante Galattosio) contenente CdSO₄ 100μM (induttore della biosintesi di PCs) e Glutathione 1mM (substrato del suddetto pathway biosintetico). I trasformanti sono stati lasciati crescere per 24h, l'OD₆₀₀ è stato valutato ed un'aliquota di 2mL ad OD₆₀₀ 2.0 è stata prelevata per la fase successiva. Come atteso il controllo negativo ha mostrato un forte ritardo nella crescita imputabile alla presenza di elevate concentrazioni di Cd nel terreno ed è stato possibile recuperare

un'aliquota all' OD_{600} richiesto ma che presumibilmente è composta da una prevalenza di cellule morte; il trasformatante AdPCS1 è cresciuto in ritardo rispetto ai trasformanti AdPCS2-3 come già osservato in condizioni prive di stress. Le cellule sono state centrifugate e lavate con H_2O sterile due volte. Ad ogni pellet sono stati aggiunti 600 μ L di SSA 5% (Acido Solfosalicilico), aggiunti 150 μ L di glass microbeads (diametro 0.2mm) e processate con TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germania) a frequenza 30Hz in tre passaggi da 20" l'uno e raffreddando i campioni in ghiaccio ogni volta. Infine i campioni sono stati centrifugati per 20' a 4°C e 13000rpm, 300 μ L del relativo surnatante recuperato, posto in un nuovo microtubo da 1.5mL, e conservati a -80°C. I campioni sono successivamente stati riportati a T_{amb} e ultracentrifugati mediante Ultimate3000 system (ThermoElectron Corporation, San José, CA, USA). Un volume di 20 μ L è stato iniettato in un sistema LTQ Orbitrap XL (ThermoElectron Corporation) controllato mediante software Xcalibur e con interfaccia ESI assistita pneumaticamente. Le condizioni dell'interfaccia ottimizzate per l'analisi di prodotti PCs sono quelle descritte da Petraglia et al (2014). La caratterizzazione di MS è stata condotta nel range m/z (rapporto massa su carica) 200//1500. L'analisi di MS/MS è stata condotta in cella di collisione a trappola ionica con energia di collisione normalizzata a 35 unità arbitrarie e un'ampiezza di isolamento di 1 m/z. Gli ioni generati sono stati analizzati mediante Orbitrap analyzer, con rapporto m/z delle PCn settato in funzione della massa molecolare del Glutathione.

2.7. SECONDO SISTEMA ETEROLOGO – *Arabidopsis thaliana*

2.7.1. OTTENIMENTO DELLE LINEE RICOMBINANTI DI *Arabidopsis thaliana*

Le CDS complete di AdPCS1, AdPCS2, AdPCS3 CDS sono state subclonate nel vettore pK7WG2 e trasformate in *Agrobacterium tumefaciens*, ceppo GV3101-pMP90; successivamente le piante di *Arabidopsis thaliana* sono state infettate mediante floral dipping (Clough & Bent, 1998). I ricombinanti positivi (generazione T1) sono stati identificati mediante selezione su piastre MS contenenti kanamicina alla concentrazione 50 mg/L. I trasformanti (piante verdi, la kanamicina uccide o induce forte clorosi nei non trasformanti) sono stati successivamente coltivati alla generazione T2 e ricercati per la condizione di transgene presente in singola copia, analizzando la segregazione dei rapporti fenotipici in risposta all'antibiotico (nuovamente su MS e kanamicina 50mg/L) in accordo con le leggi di Mendel. Di queste piante a singola copia è stata verificata mediante PCR il livello di espressione del transgene. Per fare ciò, circa 15 piantine sono state asportate dalla piastra, inserite in un microtubo da centrifuga, aggiunte due sfere di metallo e congelate in azoto liquido. Le pianticelle sono poi state poste in un tissue lyser ad alta frequenza e ridotte in una polvere fina. Da questo materiale di partenza, l'RNA totale è stato estratto come precedentemente descritto (15 piantine pesano circa 150mg, le quantità di reagenti sono perciò state adattate di conseguenza). L'RNA è stato successivamente trattato con DNasiI e retrotrascritto con enzima SuperScriptIII come già descritto. L'espressività del transgene è stata valutata mediante una PCR utilizzando le coppie di primer AdPCS dedicate alla Real-Time PCR e una coppia di primer per l'Actina II di *Arabidopsis thaliana* utilizzata come gene di riferimento per l'espressione relativa del transgene (Tabella 3).

Actina II Arabidopsis	Sequenza (5'-3')
Primer Forward	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG
Primer Reverse	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC

Tabella 2: Primer specifici per l'Actina II di *Arabidopsis thaliana*.

Le singole reazioni sono state allestite in un volume finale di 10 μ L, utilizzando Tampone di reazione 1x, dNTPs 100 μ M, primer forward 200nM, primer reverse 200nM, 1 μ L di cDNA da diluizione 1:10, 1U di *Taq* home-made e H₂O a volume. Le piante a singola copia sono poi state riprodotte fino alla generazione (T3) per la selezione del transgene in condizione di omozigosi. Sono perciò state ottenute piante in cui sono presenti le due normali copie di PCS1 e PCS2 con in aggiunta una delle tre forme di PCS di *Arundo donax* in condizioni di omozigosi a singola copia (linee At::AdPCS1, At::AdPCS2 e At::AdPCS3).

2.7.2. CRESCITA DELLE PIANTE TRANSGENICHE E STERILIZZAZIONE DEI SEMI DI *Arabidopsis thaliana*

Le piante sono state fatte crescere in terriccio naturale (45% terreno commerciale torbato, 45% terreno commerciale fino, 10% perlite) in serra fino a maturità e produzione di un elevato numero di silique. Successivamente la parte aerea è stata imbustata per facilitare le successive fasi di essiccazione e la raccolta dei semi. Dopo una fase di maturazione di 2-3 settimane, le piante sono state recise alla base e le buste contenenti i semi sono state poste a 37°C per 24h, in modo tale da permettere l'essiccazione delle silique. I semi sono così stati raccolti rimuovendo le parti di siliqua e della pianta utilizzando una serie di setacci a pori sempre più fini. Dopo trasferimento in microtubo da centrifuga da 1.5mL, un'aliquota (di quantità adeguata all'utilizzo, riferirsi ai paragrafi seguenti) degli stessi è

trasferita in un nuovo microtubo da 1.5mL per la sterilizzazione. Il procedimento adottato è basato sull'utilizzo di un tissue lyser a bassa oscillazione (8 oscillazioni/secondo). Ad ogni aliquota di semi è stato aggiunto un volume di 1.0mL di EtOH al 70% e posta in oscillazione per 3-4 minuti. Dopo centrifugazione a 14000rpm per 20 secondi, l'EtOH è stato aspirato mediante pompa a vuoto, sostituito con un volume di 1.0mL di candeggina al 5% e posto ancora in oscillazione per altri 3-4 minuti. Dopo centrifugazione (14000rpm per 20") la candeggina è stata rimossa e sostituita con un volume di 1.0mL di acqua bidistillata per il primo lavaggio in oscillazione per 7-8 minuti. Centrifugati i semi (14000rpm per 20") e rimossa l'acqua, è stato effettuato un ulteriore lavaggio in altra acqua bidistillata per altri 7-8 minuti. I semi sono stati nuovamente centrifugati nelle stesse condizioni, l'acqua è stata aspirata e si sono aggiunti 300µL di H₂O bidistillata.

2.7.3. TEST DI GERMINAZIONE IN *Arabidopsis thaliana*

Premessa: ad ogni passaggio tra una generazione e l'altra, così come in preparazione di germinazione e analisi dei fenotipi, i semi da *Arabidopsis thaliana* sono stati sterilizzati come riportato nel precedente paragrafo.

Per ogni linea ricombinante i semi delle generazioni T4 sono stati raccolti, catalogati a maturità e poi vernalizzati a 4°C per favorirne il sincronismo di germinazione. 265 semi, divisi in set da 55 per ogni linea, sono poi stati sterilizzati come sopra descritto e piastrati singolarmente su piastre di terreno ½ MS contenente concentrazioni crescenti di CdSO₄, ovvero 0 µM, 50 µM, 100 µM and 150 µM. Oltre alle linee ricombinanti, la stessa quantità di semi dell'ecotipo Columbia è stato trattato e aggiunto all'esperimento come controllo *wild-type*. Ogni piastra è stata posta in camera di crescita termostata per 7 giorni a 23°C in fotoperiodo estivo. Il tasso di germinazione è stato così valutato in

percentuale e i tassi di germinazione confrontati con l'ecotipo Columbia. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in quintuplicato.

2.7.4. ANALISI FENOTIPICA DEI RICOMBINANTI di *Arabidopsis thaliana*

Come precedentemente descritto, i semi utilizzati sono stati vernalizzati per sincronizzarli. Circa 100 semi per linea T4 ricombinante, unitamente allo stesso numero di semi dell'ecotipo Columbia, sono stati sterilizzati come precedentemente descritto e risospesi in circa 300µL di terreno ½ MS agarizzato. Successivamente, i semi sono stati piastrati mediante spotting su piastre ½ MS contenenti CdSO₄ alle concentrazioni 0µM, 50µM, 100µM and 150µM. Le piastre sono state fatte crescere in camera termostata per 7 giorni a 23°C in fotoperiodo estivo. Al termine dei 7 giorni i fenotipi sono stati osservati in relazione allo stress da metallo pesante.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Arundo donax CODIFICA ALMENO TRE DIFFERENTI TRASCRITTI PCS-LIKE

I dati relativi ai BLAST condotti sui trascrittomi dei differenti organi di *Arundo donax* hanno portato all'identificazione di 66 unigenes putativi, i quali sono stati raggruppati in 11 macroclassi fittizie, basandosi sulle similarità di dimensioni e sequenza. Di queste macroclassi, la maggior parte è incompleta nella regione 5' del trascritto. Per ovviare a questo fenomeno, tipico del sequenziamento di trascrittomi sfruttando la tecnologia Illumina, la porzione 5' è stata ricavata bioinformaticamente da quei trascritti completi in tale regione disponibili e sfruttata per la progettazione di primer adeguati. Solo le coppie di primer AdPCS_F/AdPCS1R, AdPCS_F/AdPCS2R e AdPCS_F/AdPCS3_R hanno portato all'amplificazione di bande singole, le quali sono state escisse da gel, purificate l'acido nucleico e inserito nel vettore di *E. coli* pGEM-T per il sequenziamento. I dati grezzi, analizzati mediante FinchTV, hanno portato all'identificazione delle tre varianti geniche di PCS in *Arundo*. Come limite teorico per la distinzione tra geni differenti e alleli, è stata adottata la soglia del 3% di differenza nucleotidica. Come si può vedere dall'immagine sottostante (*Figura 12*), sono state anche correttamente isolate le isoforme alleliche dei trascritti AdPCS2 e AdPCS3.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
AdPCS1										
AdPCS2 Short Isoform	ATGGCAGCTATGCCGTCCTGTACCGGCGGGTCTCCCGTCGCCGCCGCGTGGATTTCCTCGCCGAGGGCAAGCGCCTCTCGCGGAGGCCCTCG									
AdPCS2 Long Isoform										
AdPCS3 Short Isoform										
AdPCS3 Long Isoform										

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
AdPCS1										
AdPCS2 Short Isoform	CGGCCGGCACCATGGAAGGCTTCTCTCCCTCGTCTCTGCTTCCAGACGCGAGTCCGAGCCCGCATTCGCGGCCTCGCCTCTCTCGCCGTCGTCCTCAA									
AdPCS2 Long Isoform										
AdPCS3 Short Isoform										
AdPCS3 Long Isoform										

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
AdPCS1										
AdPCS2 Short Isoform	CGCGCTCGCTATCGACCCCGGCCCGCTGGAAGGGCCCTGGCGGTGGTTCGACGAGTCCATGCTCGATTGCTGCGAGCCCTCGACAAGGTCAAGGCC									
AdPCS2 Long Isoform	C.....G.....A.....A.....C.....									
AdPCS3 Short Isoform	T.C.....C.....A.....A.....A.....C.....G.A.....									
AdPCS3 Long Isoform	C.....A.....C.....G.A.....									
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
AdPCS1										
AdPCS2 Short Isoform	CAGGGCATCACCTTCGCAAGTTCGCTGCCTCGCGCACTGCTCCGGCGCGCAGTCCAGTCCTTCGCGCCAACCGGGCCACAATCCAGATCTCCGCC									
AdPCS2 Long Isoform	G.....T.....C.....A.....C.....C.....									
AdPCS3 Short Isoform	T.....A.G.....T.....C.....C.....T.....									
AdPCS3 Long Isoform	A.G.....T.....C.....C.....T.....									
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
AdPCS1										
AdPCS2 Short Isoform	GCCATCTCATCCGCTGCTCTCTCTCCGAGGACTGCCATCTCATCGCTTCTTACCACAGGAAGCCTTTCAAACAGACCGGAACCGGGCATTTGTTCCCGCAT									
AdPCS2 Long Isoform	C.....G.....T.....T.....G.....C.....T.....									
AdPCS3 Short Isoform	T.....C.....G.....G.....T.....									
AdPCS3 Long Isoform	G.....									
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
AdPCS1										
AdPCS2 Short Isoform	CGTGGTACTACAGCTGAACAGGACATGGCCCTCATCTTGGATGTTGCCCGATTCAAATACCTCCCTCATTGGGTTCATTGCCACTTCTTTGGGAAGCC									
AdPCS2 Long Isoform	T.....C.....C.....T.....									
AdPCS3 Short Isoform	C.G.....C.....T.....									
AdPCS3 Long Isoform	C.G.....C.....T.....									
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
AdPCS1										
AdPCS2 Short Isoform	ATGAATACGACTGATGAATCAACCGGACTTCTTAGGGGGTTTCATGCTTATATCAAGGCACACTGAGCTCCTTCATCACTGTACACTGTAGTTGCAGAG									
AdPCS2 Long Isoform	A.....TG.....C.....G.....									
AdPCS3 Short Isoform	G.....T.....									
AdPCS3 Long Isoform	G.....T.....									
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
AdPCS1										
AdPCS2 Short Isoform	ATGAAGTCTGGAAGGCATGGCAAAGTATTGCACTGAAGATTACCAAAATCTTTGAAGGCTGAGGGTCTAGATAATGTTCCAACACTTTTGTCCCGTTT									
AdPCS2 Long Isoform	A.....TG.....C.....G.....C.....T.....									
AdPCS3 Short Isoform	A.....TG.....C.....G.....C.....T.....									
AdPCS3 Long Isoform	A.....C.....T.....C.....C.....									
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
AdPCS1										
AdPCS2 Short Isoform	AATGATTCT---CTTCCAGCTAATGCTGGAGCTTGGATCAAATGGTTGTTGAAGTTAGAGAAAGAGGAAGGTGGGCCAAGCTTAAGCAAGAGGGAG									
AdPCS2 Long Isoform	CTC.....C.....									
AdPCS3 Short Isoform	C.A---									
AdPCS3 Long Isoform	C.---A.....									
	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
AdPCS1										
AdPCS2 Short Isoform	AAAGAAAGGCTTCTTTTGAAGGAAAGTGATTACAGCAAGTCCGTGATACCAAGCTATTTACGATAGTCCATGACCTGCAATGTGCTAATATCCAATGCT									
AdPCS2 Long Isoform	T.....C.....T.....G.....T.....									
AdPCS3 Short Isoform	T.....C.....T.....G.....T.....									
AdPCS3 Long Isoform	C.....C.....T.....									
	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
AdPCS1										
AdPCS2 Short Isoform	GCAATTGCTCATCGTCAAGTGATGAAGATTCCATTACTAGGATTGCTGCCGCTGTGTGCTGTCAAGGAGCTGCAATGCTATCAGGGAACCTTGATCAAG									
AdPCS2 Long Isoform	G.....A.G.....C.....G.....A.....T.....									
AdPCS3 Short Isoform	A.G.....C.....A.....T.....									
AdPCS3 Long Isoform	G.....G.....C.....A.G.....T.....									
	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
AdPCS1										
AdPCS2 Short Isoform	TGATGGTTTCTGCTGCAGAGAAACATGTTTCAAATGTGTTCAAGCAAATGGTGATGGTCATAAGACGTTATCTCAGGCTCTGTGGTATCTGAAGGCAAT									
AdPCS2 Long Isoform	T.....G.....G.....G.....G.....T.....									
AdPCS3 Short Isoform	T.....G.....G.....G.....G.....T.....									
AdPCS3 Long Isoform	A.....A.....C.....T.....C.....									
	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
AdPCS1										
AdPCS2 Short Isoform	GAACAGGGTGGTGATATACTTTTACCAATGCCCCCCACAGTACAAAGTTCATGCAATTCAAACCTTGAGCAATAAAATCATGGAATATCCAAACAGCACAG									
AdPCS2 Long Isoform	G.....G.....TTG.....TGA.....C.....G.G.....A.A.....T.....									
AdPCS3 Short Isoform	G.....G.....TTG.....TGA.....C.....G.G.....A.A.....T.....									
AdPCS3 Long Isoform	G.....G.....G.....G.....C.....A.G.....T.....GT.....									
	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
AdPCS1										
AdPCS2 Short Isoform	ATGTTATAACTGTACTACTGCTGGCTTTACAT-----CCACAGCACATGGTTGGGCATCAAGATGAGAGGCTGAAAGCCGAATTTC									
AdPCS2 Long Isoform	C.....T.....									
AdPCS3 Short Isoform	C.....T.....									
AdPCS3 Long Isoform	G.....T.....									

```

AdPCS3 Long Isoform .....G.....T.....CTACTGCTGGCTTTACAT.....
                                1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470      1480      1490      1500
                                .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AdPCS1                                GACTCTTGTTCACACAGACGATCTACCTGATGTTATTAGACGAGAGATTTGCATTTAAGGCGGCAACTCTGTTATCTCAAGTCTGTAAAGAAGGGGAA
AdPCS2 Short Isoform                .....T.C.....C...A.T.G.....C...C.G.....A...
AdPCS2 Long Isoform                .....T.C.....C...A.T.G.....C...C.G.....A...
AdPCS3 Short Isoform                .....A.....C...A.T.G.....C...C.G.....A...
AdPCS3 Long Isoform                .....A.....C...A.....C.....C.....A...
                                1510      1520      1530
                                .....|.....|.....|
AdPCS1                                TCTGAAGATCCTGTGCCACTATCACCTTAG
AdPCS2 Short Isoform                .A.....T...G.....
AdPCS2 Long Isoform                .A.....T...G.....
AdPCS3 Short Isoform                .A.....C.....A
AdPCS3 Long Isoform                .A.....C.....A

```

Figura 12: Allineamento multiplo delle varianti trascrizionali dei geni AdPCS1, AdPCS2 e AdPCS3. Le sequenze sono confrontate rispetto alla variante AdPCS1. Il simbolo di "dot" (•) riporta un'identità nucleotidica, in caso contrario è indicata la variante nucleotidica corrispondente. Il simbolo di "score" (-) indica l'apertura di un gap. Sono inoltre riportate le varianti alleliche dei trascritti AdPCS2 e AdPCS3.

Le sequenze identificate possiedono le caratteristiche adatte ad essere considerate geni per Fitochelatina Sintasi se dotate dei codoni codificanti per gli aminoacidi Cys in posizione 56, His in posizione 162 e Asp in posizione 180 (rispetto alla sequenza PCS1 di *Arabidopsis thaliana*, allineata per il riconoscimento dei residui ma non riportata in *Figura 12*). Le tre sequenze presentano, in effetti, la tripletta TGC (corrispondente all'aminoacido Cys) compresa tra le basi 169 e 171, CAC (His) tra le basi 511 e 513, GAT (Asp) tra le basi 541 e 543. Dall'allineamento risulta inoltre uno sfalsamento di un aminoacido rispetto alla sequenza di *Arabidopsis AtPCS1*, risultando perciò in una triade Cys₅₇, His₁₈₃ e Asp₁₈₁. Oltre ai sopracitati residui componenti la triade catalitica, l'allineamento alla sequenza *AtPCS1* mostra la presenza di entrambi i domini tipici Phytochelatin e Phytochelatin_C, come anche confermato dal web server NCBI (*Figura 13*). Ciò è stato ottenuto mediante traduzione *in silico* delle sequenze ed i risultati per le singole copie sono riportati nella tabella sottostante (*Tabella 4*).

Tabella 4: Dati relativi all'estensione dei domini Phytochelatin e Phytochelatin_C per i singoli trascritti AdPCSs. Per le varianti AdPCS2 e AdPCS3 l'analisi è stata condotta sull'allele ad estensione maggiore. Per ogni singolo dominio sono riportati i valori di E relativi alla probabilità statistica dell'identificazione del dominio in quanto tale.

CDS	Phytochelatin (estensione in aa)	E Value	Phytochelatin_C (estensione in aa)	E Value
AdPCS1	8 - 216	1.8 e-135	222 - 483	9.2 e-154
AdPCS2	8 - 216	9.23 e-154	222 - 484	4.22 e-133
AdPCS3	8 - 216	8.48 e-146	222 - 489	1.38 e-133

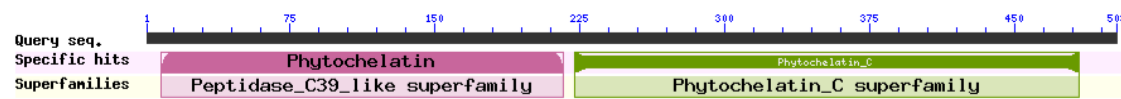


Figura 13: Riconoscimento tramite il web server NCBI dei domini caratteristici degli enzimi Fitochelatina Sintasi relativi alla sequenza codificante AdPCS1.

L'unione di queste due osservazioni porta perciò a pensare che effettivamente le sequenze identificate codifichino per enzimi del tipo Fitochelatine Sintasi. Il successivo passo è stato perciò verificare le relazioni filogenetiche sussistenti tra queste sequenze e sequenze PCS-like provenienti da altri membri della famiglia delle Poaceae.

3.2. ANALISI FILOGENETICA DEI TRASCRITTI AdPCS1, AdPCS2 e AdPCS3

Dalla ricerca emergono 40 hits positive, di sotto riportate e correlate delle relative annotazioni funzionali. Le sequenze delle angiosperme più basali sono state aggiunte alla ricerca di omologia per fornire un maggiore segnale evolutivo all'analisi, aumentando la distanza filogenetica tra gli organismi donatori presi in considerazione per il test (Tabella 5). Nel contesto delle Poaceae, le quali risultano essere le maggiormente caratterizzate tra le monocotiledoni, i trascritti alternativi disponibili sono stati rimossi, per evitare di falsare l'analisi raggruppando perciò le sequenze alternative insieme quasi a priori.

ID	Organismo	Nome Breve	Cys56	His162	Phy_C	Note
PIANTE ERBACEE						
AC210598.3_FG003	Org_Zmays	ZeaMay1	x			
Bradi1g44650	Org_Bdistachyon	BraDis				
Brast07G088100	Org_Bstacei	BraSta				
GRMZM2G038170	Org_Zmays	ZeaMay2	x			
GRMZM2G091228	Org_Zmays	ZeaMay3				
GRMZM2G438178	Org_Zmays	ZeaMay4	x			
LOC_Os05g34290	Org_Osativa	OrySat1			x	
LOC_Os06g01260	Org_Osativa	OrySat2				
LOC_Os06g01260	Org_Osativa	OrySat3	x			

Oropetium_20150105_17931	Org_Othomaeum	OroTho		x		
Pahal.E04397	Org_Phallii	PanHal1.1				
Pahal.E04397	Org_Phallii	PanHal1.2				Deleto di 1.1
Pahal.E04397	Org_Phallii	PanHal1.3				Alternativo a 1.1
Pahal.E04399	Org_Phallii	PanHal2				
Pahal.G00135	Org_Phallii	PanHal3.1	C → S	x		
Pahal.G00135	Org_Phallii	PanHal3.2	C → S	x		
Pahal.I00403	Org_Phallii	PanHal4	x			
Pavir.Ea00195	Org_Pvirgatum	PanVir1.1				
Pavir.Ea00195	Org_Pvirgatum	PanVir1.2				Alternativo a 1.1
Pavir.Ea00200	Org_Pvirgatum	PanVir2				
Pavir.Ea00201	Org_Pvirgatum	PanVir3.1				
Pavir.Ea00201	Org_Pvirgatum	PanVir3.2				Identico a 3.1
Pavir.Ea00201	Org_Pvirgatum	PanVir3.3				Alternativo a 3.1
Pavir.Ea00201	Org_Pvirgatum	PanVir3.4				Alternativo a 3.1
Pavir.Ea00201	Org_Pvirgatum	PanVir3.5				Alternativo a 3.1
Pavir.J15941	Org_Pvirgatum	PanVir4		x		
Pavir.J39486	Org_Pvirgatum	PanVir5	x			
Seita.5G146100	Org_Sitalica	SetIta1				
Seita.5G146200	Org_Sitalica	SetIta2				
Sevir.5G144600	Org_Sviridis	SetVir1				
Sevir.5G144700	Org_Sviridis	SetVir2				
Sobic.003G024200	Org_Sbicolor	SorBic1				
Sobic.003G024300	Org_Sbicolor	SorBic2				
Zm00008a002707	Org_ZmaysPH207	ZeaMay5	x			
Zm00008a030296	Org_ZmaysPH207	ZeaMay6		x		
ANGIOSPERME BASALI						
evm_27.TU.AmTr_v1.0_scaffold00067.82	Org_Atrichopoda	AmbTri				
GSMUA_Achr10G07930_001	Org_Macuminata	MusAcu1				
GSMUA_Achr11G06850_001	Org_Macuminata	MusAcu2				
SpiPo17G0049400	Org_Spolyrhiza	SpiPol				
Zosma147g00230	Org_Zmarina	ZosMar				
NCBI						
AFU06381.1	Phragmites australis	PhrAus				

Tabella 3: sequenze CDS omologhe PCS-like putative di Monocotiledoni estratte da Phytozome V12 e NCBI. Si trovano evidenziate le varianti trascrittomiche dei singoli geni, le quali sono state rimosse rispetto al trascritto principale. Le colonne di sinistra riportano eventuali delezioni o sostituzioni nei residui catalitici fondamentali per la catalisi (nel caso della Cys56 catalitica), così come l'eventuale assenza del dominio Phytochelatins_C. Lista degli organismi selezionati (dall'alto verso il basso): (ZeaMay) Zea mays; (BraDis) Brachypodium distachyon; (BraSta) Brachypodium stacei; (OrySat) Oryza Sativa; (OroTho) Oropetium thomaeum; (PanHal) Panicum hallii; (PanVir) Panicum virgatum; (SetIta) Setaria italica; (SetVir) Setaria viridis; (SorBic) Sorghum bicolor; (AmbTri) Amborella trichopoda; (MusAcu) Musa acuminata; (SpiPol) Spirodela polyrhiza; (ZosMar) Zostera marina; (PhrAus) Phragmites australis.

Il file è stato in prima battuta allineato con algoritmo ClustalW su BioEdit 7, in modo tale da verificare la presenza dei residui catalitici all'interno dei singoli trascritti (eventuali mancanze sono riportate nella tabella sovrastante). Successivamente si è controllata la presenza di entrambi i domini tipici delle PCS intatti. Come riferimento per questo controllo è stata selezionata la sequenza PCS di tipo 1 di *Arabidopsis thaliana* (Phytozome accession number AT5G44070.1), essendo la PCS più diffusamente studiata; la completezza dei domini, in questo contesto, è stata valutata nell'ordine dei 350 aminoacidi. Ciò è dovuto al fatto che, in accordo con la sequenza AtPCS1, il dominio Phytochelatin è compreso tra i residui 7 e 215 e il dominio Phytochelatin_C tra i residui 221 e 458. L'omologo di *Oryza sativa* OrySat1 non rispetta queste indicazioni, terminando al residuo 246 e presentando solo il dominio Phytochelatin. Le sequenze omologhe di *Sorghum bicolor* SorBic1 e SorBic2 sembrano presentare terminatori precoci all'interno delle loro sequenze. Un'analisi più approfondita mostra invece una mis-annotazione delle sequenze introniche (in effetti i terminatori in esame sono collocati in regioni di discontinuità nell'allineamento) e tali sequenze sono state mantenute all'interno del file per il successivo allineamento di precisione. Le sequenze sono successivamente state tradotte *in silico* e confrontate con le stesse sequenze fornite da Phytozome, per verificarne la correttezza. Confermata la bontà delle sequenze proteiche, il file è stato allineato mediante MAFFT ad algoritmo E-INS-i e processato con GBlocks (ottenendo un allineamento di 475 aminoacidi rispetto all'originale allineamento di 5454 aminoacidi) in maniera non stringente, conservando perciò il maggior segnale filogenetico possibile. Il file (dopo conversione ad un formato leggibile da PhyML) è stato sottomesso per l'analisi, di cui il primo passo è la ricerca del modello evolutivo migliore. L'analisi ha determinato che il modello che più si adatta al dataset in questione

risulta essere il modello JTT+G+I (Jones et al, 1992). Il modello è stato determinato anche utilizzando la suite MEGA7 (Kumar et al, 2016), che suggerisce l'adozione del modello JTT+G e mediante ProtTest Server 2.4 (Abascal et al, 2005), che conferma l'indicazione di PhyML. Come definito nei materiali e metodi il test adottato per la ricostruzione filogenetica sfrutta l'approccio aRLT, che beneficia dell'ottenimento di un risultato differente dal bootstrap (e perciò di una interpretazione che si apre ad un eventuale dibattito), ma fornisce un dato effettivamente statistico. Data questa caratteristica, è stata imposta una soglia per i valori di supporto ai vari rami a $p < 0.05$ (considerando perciò come statisticamente rilevanti valori con $p > 0.95$). In *Figura 14* sono riportate le relazioni filogenetiche che intercorrono tra le varie sequenze omologhe in monocotiledoni identificate. A tal fine è stata utilizzata la suite TreeGraph2 (Stöver & Müller, 2010) per far collassare i rami i cui supporti erano inferiori al valore soglia.

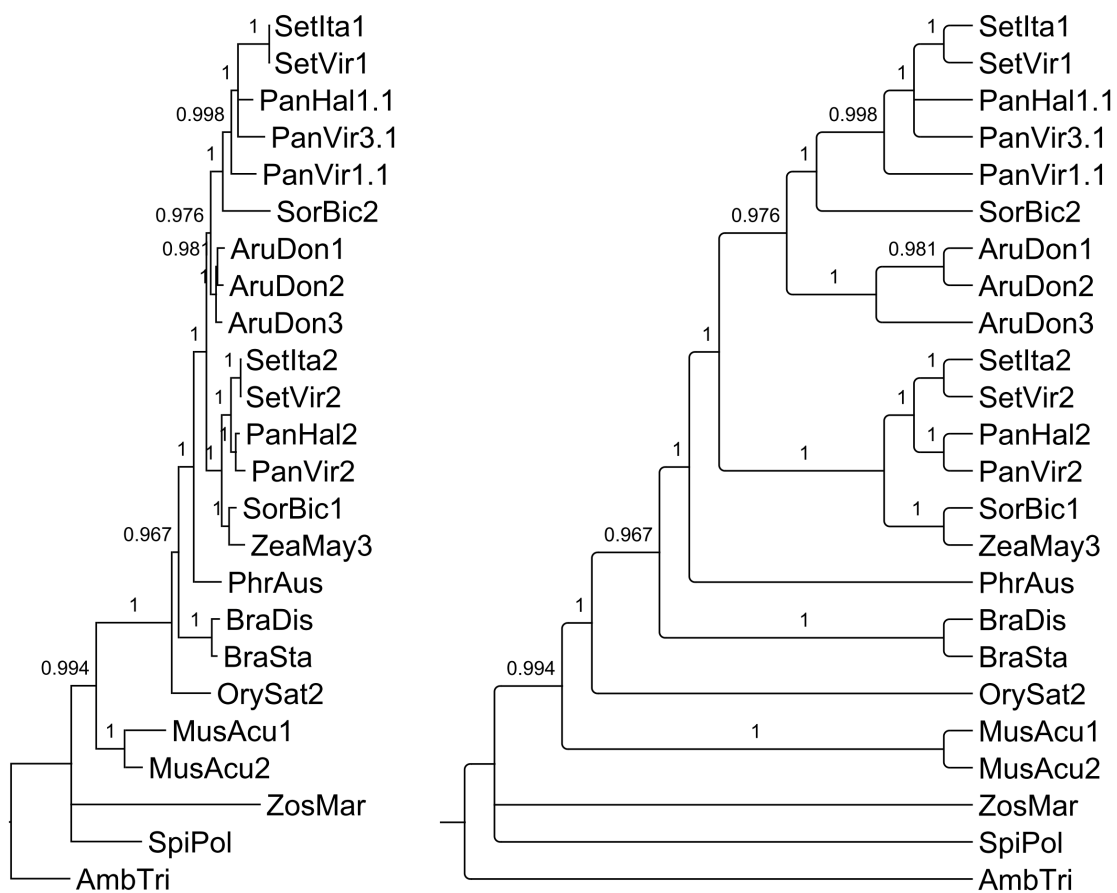


Figura 14: albero filogenetico delle relazioni sussistenti tra sequenze omologhe in monocotiledoni ottenute dai database Phytozome e NCBI. Le sequenze relative agli enzimi AdPCSs sono riportate come *AruDon1* (AdPCS1), *AruDon2* (AdPCS2) e *AruDon3* (AdPCS3). La sequenza di *Amborella trichopoda* è stata utilizzata come outgroup per il rooting dell'albero, in accordo con quanto proposto dal server Phytozome. A sinistra è riportato il filogramma, mentre a destra il cladogramma. Lista degli organismi e relative abbreviazioni (in ordine alfabetico): (*AmbTri*) *Amborella trichopoda*; (*AruDon*) *Arundo donax*, (*BraDis*) *Brachypodium distachyon*; (*BraSta*) *Brachypodium stacei*; (*MusAcu*) *Musa acuminata*; (*OroTho*) *Oropetium thomaeum*; (*OrySat*) *Oryza Sativa*; (*PanHal*) *Panicum hallii*; (*PanVir*) *Panicum virgatum*; (*PhrAus*) *Phragmites australis*; (*Setlta*) *Setaria italica*; (*SetVir*) *Setaria viridis*; (*SorBic*) *Sorghum bicolor*; (*SpiPol*) *Spirodela polyrhiza*; (*ZeaMay*) *Zea mays*; (*ZosMar*) *Zostera marina*.

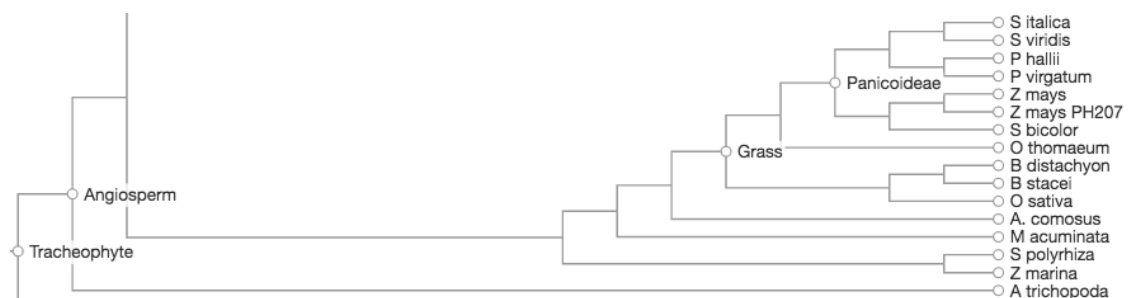


Figura 15: dettaglio a livello di monocotiledoni delle relazioni filogenetiche tra specie calcolato da Phytozome riportato come cladogramma.

Come osservabile dal confronto tra le relazioni pre-calcolate da Phytozome (*Figura 15*) e quelle inerenti agli enzimi AdPCSs e gli omologhi di monocotiledoni (*Figura 14*), le relazioni filogenetiche sono sostanzialmente conservate. L'omologo di *Amborella trichopoda* è stato impostato come radice dell'albero in accordo con quanto riportato da Phytozome. Interessante è la localizzazione di *Phragmites australis*, che si presenta come basale rispetto alle Panicoideae. Questo fenomeno si ripresenta anche adottando altri metodi di indagine ed indica che la sequenza caratterizzata da Zhao e collaboratori è probabilmente una variante antica e che probabilmente, come in *Arundo donax*, anche *Phragmites* possiede altre copie geniche per geni del tipo PCS. Le Panicoideae mostrano infine un fenomeno riconducibile ad un evento di duplicazione genica sia per il genus *Panicum* che per il genus *Setaria*. Le tre sequenze relative ad *Arundo* (AruDon1-3) sono correttamente clusterizzate assieme e localizzate a livello del ramo più recente dell'evento duplicativo delle Panicoideae (Clade A in *Figura 16*).

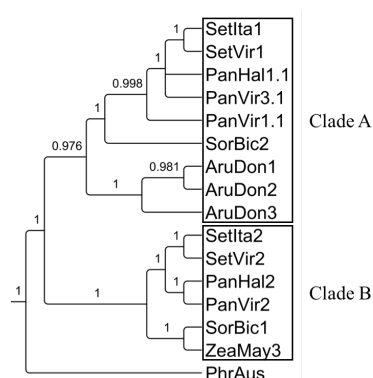


Figura 16: dettaglio del processo di duplicazione osservato nelle sequenze di Panicoideae.

Le copie AdPCS1 e AdPCS2 risultano inoltre evolutivamente più vicine rispetto alla forma AdPCS3. In conclusione si osserva una forte vicinanza delle sequenze identificate con quella che è l'evoluzione delle specie, anche se *Arundo* sembra localizzarsi in posizione leggermente più basale all'interno della Famiglia delle Poaceae rispetto a

quanto atteso basandosi sul modello proposto dal server Angiosperm Phylogeny Database (Stevens, 2001) e riportato nell'immagine sottostante (*Figura 17*).

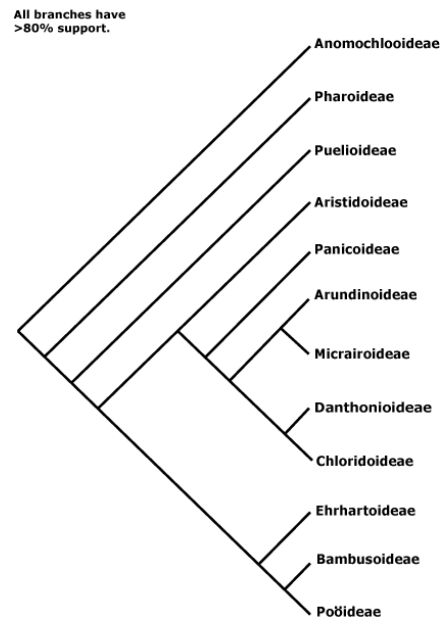


Figura 17: Relazioni filogenetiche tra specie proposte dal web server Angiosperm Phylogeny Database per le Poacee. Arundo si localizza a livello della sottofamiglia delle Arundinoideae, mentre i generi Panicum e Setaria sono localizzati a livello della sottofamiglia delle Panicoideae e in teoria basali rispetto ad Arundo.

3.3. I GENI PER PCS DI *Arundo donax* SONO ESPRESSI DIFFERENZIALMENTE E RISPONDONO ALLA PRESENZA DI METALLO PESANTE ANCHE A LIVELLO TRASCRIZIONALE

L'espressione dei geni per PCS di *Arundo* è stata valutata mediante Real-Time PCR in maniera da ottenere una quantificazione affidabile. La chimica adottata è la SYBR Green, la quale permette la fluorescenza in corrispondenza dell'attiva amplificazione dei bersagli della PCR. In primo luogo è stata valutata l'espressione dei trascritti AdPCSs in condizioni fisiologiche degli organi della pianta. Gli organi selezionati sono stati:

- Foglia,
- Lamina Verde, intesa come sottile lamina fogliare di colorazione verde che si estende al culmo,

- Nodo,
- Internodo,
- Getto Meristematico, inteso come intera parte aerea giovane della pianta che protrude dal rizoma
- Radice.

Il gene housekeeping selezionato per la quantificazione è il gene relativo all'Actina II, in quanto si è precedentemente dimostrato trascrizionalmente stabile in reazione a stress da Cadmio 150 μ M. I dati grezzi di Real-Time hanno mostrato una forte dominanza dell'espressione del trascritto AdPCS1 rispetto ai trascritti AdPCS2 e AdPCS3. Questa dominanza, nell'ordine di una differenza nell'espressione anche di 7 volte all'interno dello stesso organo e di quasi 240 volte tra organi differenti ha portato a presentare i dati relativi alla quantificazione mediante un'estrapolazione grafica che pone, nei singoli organi, il valore relativo ad AdPCS1 pari a 1 (valore arbitrario), interpretando di conseguenza i dati relativi a AdPCS2 e AdPCS3.

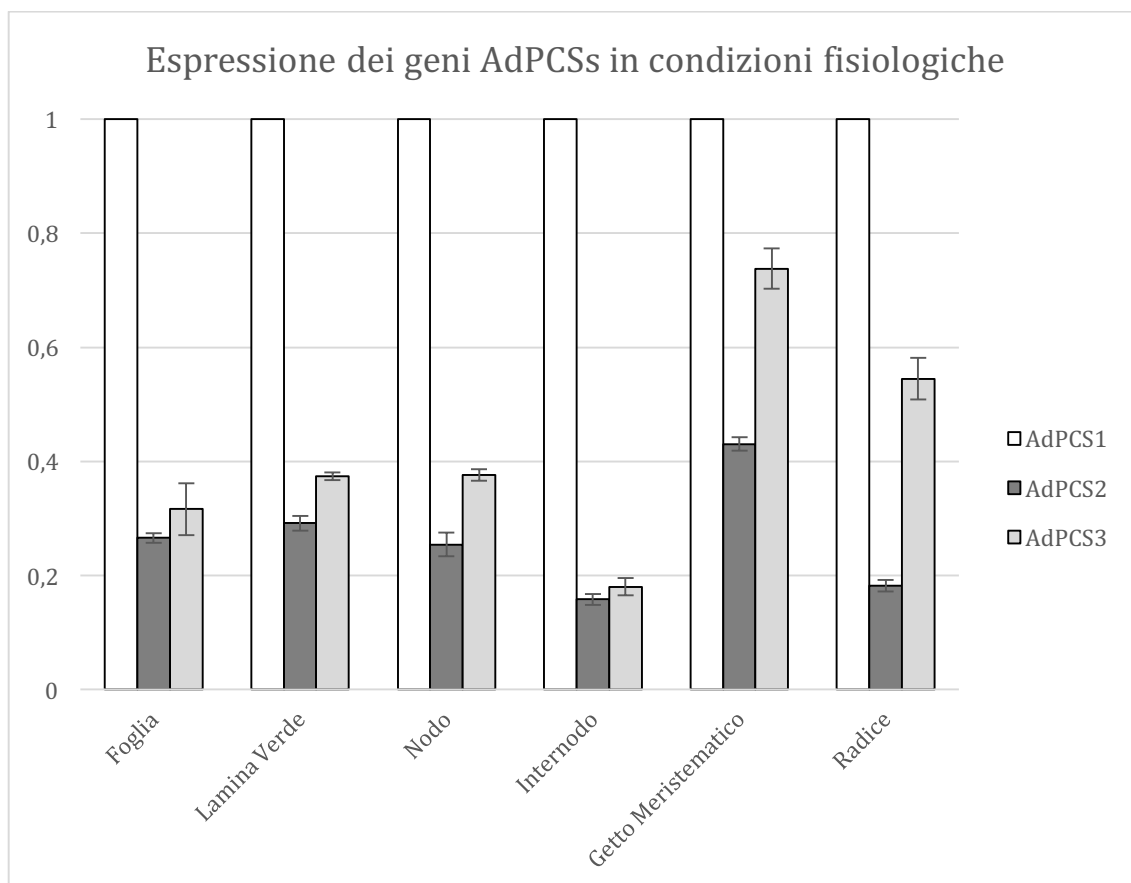


Figura 18: Espressione dei geni AdPCS1-3 nel contesto di organi in condizioni fisiologiche. La prima Colonna per organo riporta l'espressione di AdPCS1 al valore arbitrario di 1. Le espressioni relative di AdPCS2 e AdPCS3 sono riportate di conseguenza come indice relativo rispetto ad AdPCS1. Le barre d'errore riportano le deviazioni standard relative al triplicato tecnico effettuato (assenti per i dati relativi ad AdPCS1 in quanto i valori sono stati arbitrariamente impostati a 1).

Questi dati indicano, come precedentemente detto, una forte dominanza della copia di AdPCS1 rispetto alle altre due copie disponibili in *Arundo*, facendo ipotizzare che questo gene produca un trascritto “di guardia” nei confronti dei metalli pesanti, putativamente ad elevata espressione ma a bassa processività nella produzione di fitochelatine e che gli altri due geni effettuino il “fine tuning” della risposta allo stress. Determinati i rapporti sussistenti tra le copie geniche in condizioni fisiologiche, è stata testata la risposta ad uno stress da CdSO_4 alla concentrazione di $150\mu\text{M}$ nelle due porzioni principali della pianta, ovvero la porzione ipogea e quella epigea. I tessuti utilizzati derivano dalla preparazione mediante “stick”, in cui la porzione ipogea è rappresentata dall'unione di rizoma e radici

e la porzione epigea rappresenta il resto dei tessuti disponibili. Sette diverse serie di stick, ognuna presente in triplicato, sono state esposte a Cadmio solfato per intervalli di tempo differenti, ovvero:

- 0h
- 30'
- 1h 30'
- 3h
- 6h
- 11h
- 24h

Ad ogni punto temporale, lo stick è stato rimosso dalla coltura idroponica e sezionato nelle due differenti parti. Di ognuna di esse, una porzione di circa 150mg è stata asportata, congelata in azoto liquido e l'RNA totale estratto come precedentemente descritto. Il primo "distretto" analizzato è stata la porzione epigea, nella quale è emersa una tendenza delle tre differenti PCS identificate a non rispondere allo stress, mantenendo relativamente stabile la trascrizione dei geni per PCS (*Figura 19*).

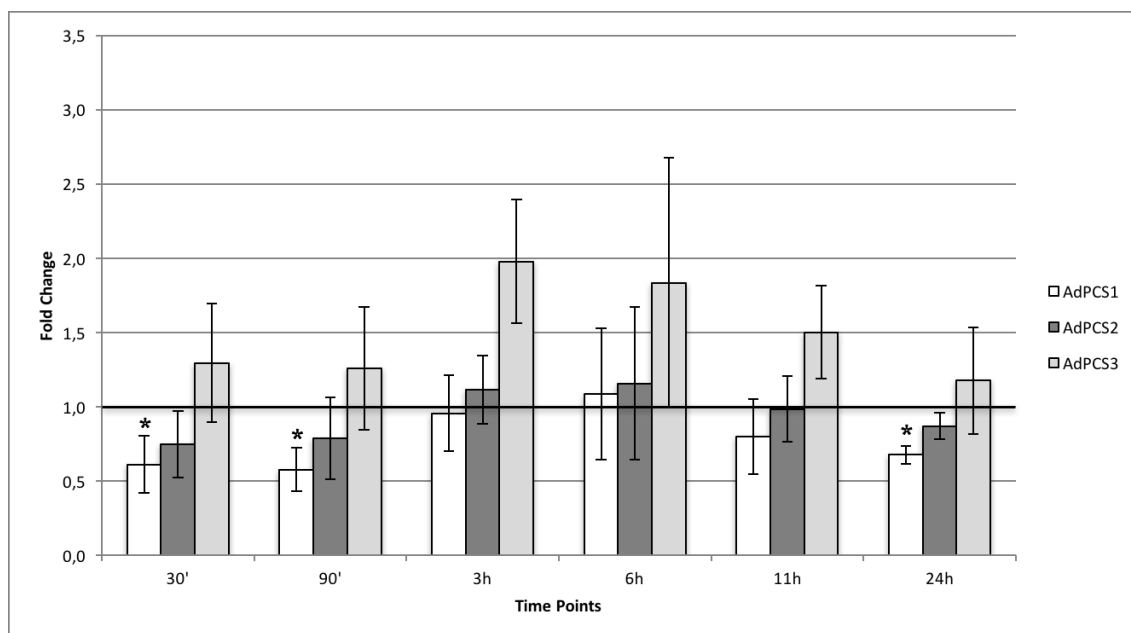


Figura 19: Variazione dell'espressione dei geni AdPCS1-3 in risposta a stress da CdSO_4 150 μM nel tessuto epigeo. Sono riportate nell'immagine i differenti Time Points sull'asse delle ascisse, mentre sull'asse delle ordinate sono riportate le variazioni dell'espressione rispetto al valore di espressione al tempo 0h (indicato dalla retta in corrispondenza del valore arbitrario 1). Unitamente alle relative deviazioni standard sono riportate le significatività statistiche come asterischi al di sopra della barra corrispondente. Il test statistico adottato è un T Test con correzione mediante False Discovery Rate considerando significativo un valore di $p < 0.05$.

Questa assenza di induzione era ampiamente prevista. Studi analoghi condotti sulle due diverse PCS di *Arabidopsis thaliana* hanno in effetti dimostrato la mancanza di reattività trascrizionale nei confronti del metallo pesante, in quanto l'induzione avviene a valle della trascrizione, più nello specifico a livello post-traduzionale, con l'atomo metallico che attiva l'enzima PCS inducendo la sintesi delle fitochelatine. Per tale ragione i geni per PCS sono generalmente considerati come housekeeping e perciò non inducibili. Il secondo "distretto" analizzato è stata la porzione ipogea, principale iteratore con lo stress da metallo pesante. Data la elevata tolleranza di *Arundo* nei confronti del Cadmio, è lecito ipotizzare un meccanismo differente rispetto a quanto osservato nelle porzioni epigee della pianta e rispetto al ben più approfonditamente sistema di *Arabidopsis*. In effetti i dati relativi alla variazione di espressione dei geni AdPCS1-3 mostrano una variazione di

un fold change da 1 a 3.25 circa per il gene AdPCS1. L'andamento della risposta trascrizionale è correlata con la prolungata esposizione al metallo nell'arco delle 24 ore. Si assiste, in effetti, ad un progressivo aumento della trascrizione a partire da 6 ore fino al culmine a 24 ore (*Figura 20*). Questa reattività della trascrizione nei confronti dello stress non è comunque correlabile con un'aumentata sintesi di fitochelatine, dimostra piuttosto un certo livello di modulabilità della risposta a Cadmio anche a livello trascrizionale e non solo a livello post-traduzionale come solitamente riscontrato in letteratura.

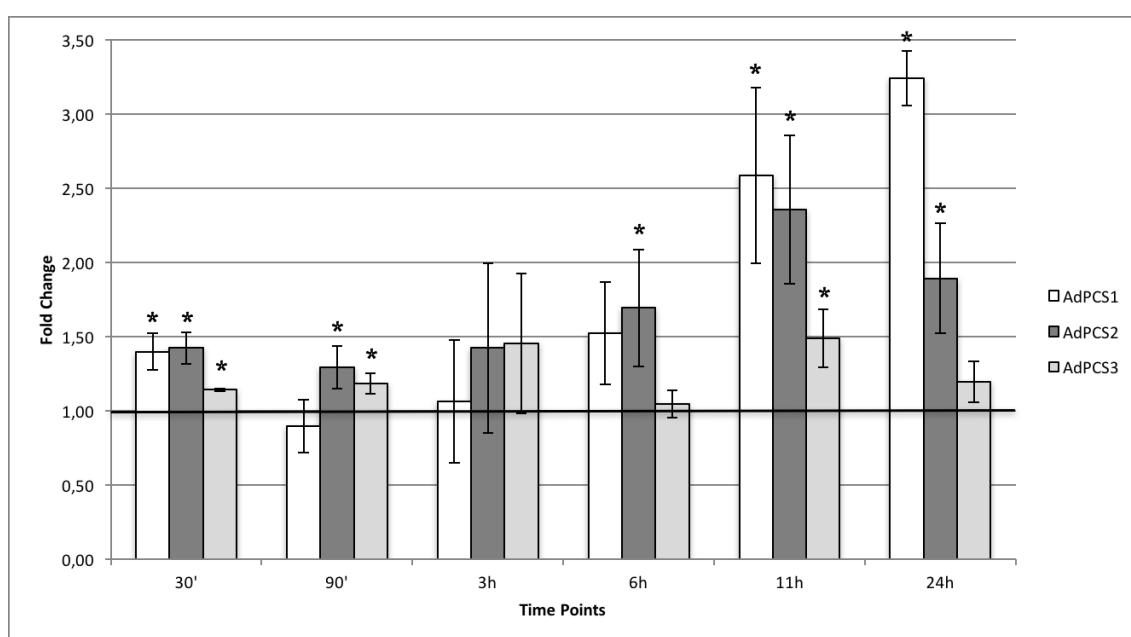


Figura 20: Variazione dell'espressione dei geni AdPCS1-3 in risposta a stress da CdSO₄ 150µM nel tessuto ipogeo. Sono riportate nell'immagine i differenti Time Points sull'asse delle ascisse, mentre sull'asse delle ordinate sono riportate le variazioni dell'espressione rispetto al valore di espressione al tempo 0h (indicato dalla retta in corrispondenza del valore arbitrario 1). Unitamente alle relative deviazioni standard sono riportate le significatività statistiche come asterischi al di sopra della barra corrispondente. Il test statistico adottato è un T Test con correzione mediante False Discovery Rate considerando significativo un valore di p<0.05.

Anche il gene per AdPCS2 segue un comportamento simile, anche se in maniera più limitata rispetto a quanto osservato per AdPCS1. In questo contesto la copia AdPCS2 presenta il suo picco di espressione a 11h, per poi subire una relativa repressione

dell'espressione in corrispondenza delle 24h. il gene codificante per AdPCS3 presenta, infine, una quasi assenza di variazione dell'espressione. Benché taluni punti temporali analizzati risultino statisticamente significativi, la loro rilevanza sembra essere dovuta più alle ridotte deviazioni standard correlate ai dati, più che effettivamente imputabili ad un differente livello di espressione. I dati, nel loro insieme, presentano perciò un comportamento trascrizionale differente per le porzioni epigea ed ipogea, con le tre differenti copie di AdPCSs che mostrano un comportamento quasi "speculare" con la copia AdPCS1 come inducibile e fortemente espressa nell'ipogeo e costitutivamente espressa nell'epigeo; così come, anche se a minore rilevanza, la copia AdPCS3 è maggiormente espressa nella porzione epigea e con un comportamento quasi da gene *housekeeping* nella porzione ipogea.

3.4. L'ESPRESSIONE ETEROLOGA DELLE DIFFERENTI CDS AdPCS1-3 IN LIEVITO RECUPERA IL FENOTIPO ALTAMENTE SENSIBILE AL Cd CARATTERISTICO DEL CEPPO YK44

Il ceppo YK44 (altamente sensibile al Cadmio) di *Saccharomyces cerevisiae* precedentemente mutagenizzato con le tre varianti della PCS di Arundo, unitamente ad una linea mutagenizzata con il vettore privo di inserzioni, sono state poste in precoltura liquida selettiva di YSD-U over night. Nel caso in cui i transgeni inseriti codifichino per un enzima PCS attivo, ci si attende di osservare la crescita dei mutanti che li contengono in presenza di Cadmio, con il vettore vuoto inabile in questo compito. Come si può osservare nell'immagine sottostante (*Figura 21*), i ricombinanti in cui è stata inserita una delle tre diverse forme di PCS di Arundo acquisiscono la capacità di sopravvivere in un terreno contenente un metallo pesante ad elevata tossicità quale il Cadmio. Correttamente

e come atteso il mutante provvisto di plasmide vuoto non è in grado, al contrario, di sopravvivere in queste condizioni, come invece riesce a fare in terreno selettivo per l'Uracile.

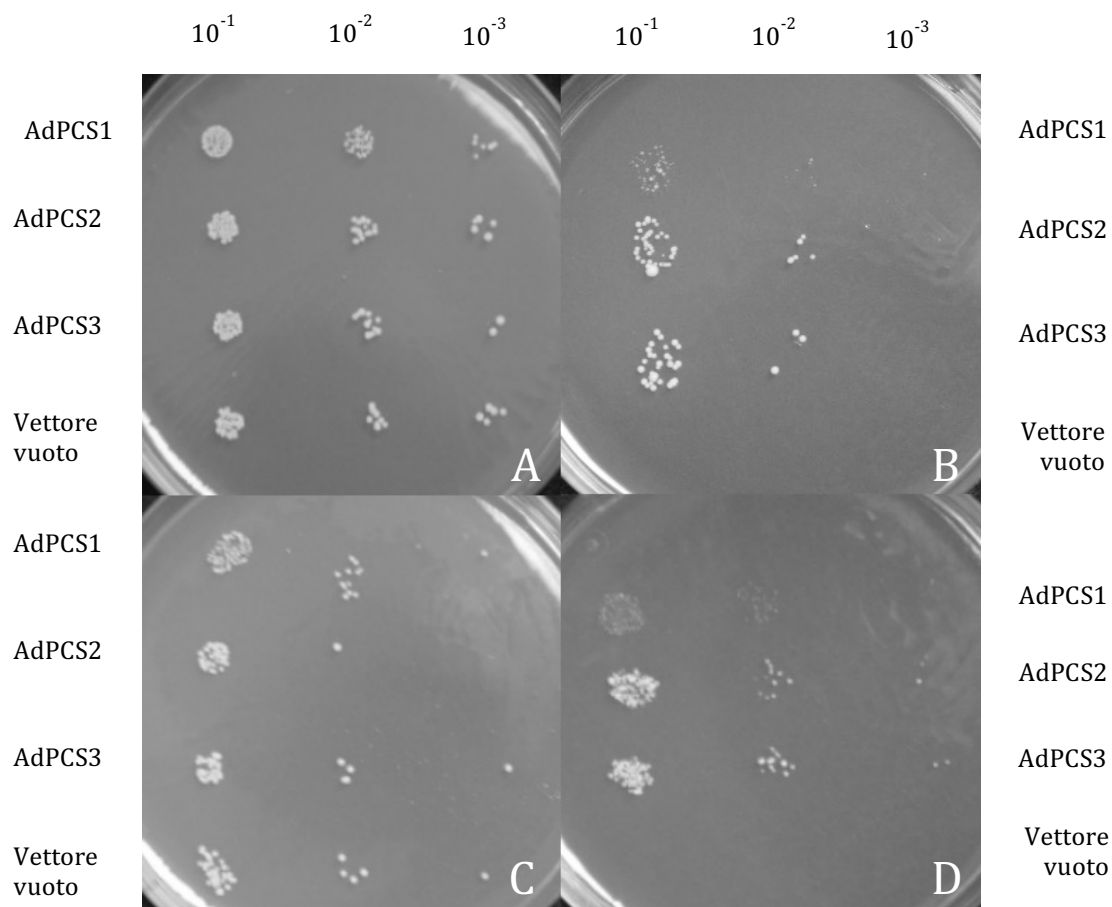


Figura 21: Test di complementazione tramite spot assay in *Saccharomyces cerevisiae* YK44 mutagenizzato con le varianti PCS1-3 di *Arundo donax* e il plasmide pYES-DEST52 (Empty vector). Nelle sezioni B e D sono riportati gli spot esposti alla fonte di carbonio inducente e CdSO₄ 100μM per 24h, alle diluizioni riportate nella parte alta dell'immagine. Le sezioni A e C riportano gli spot corrispondenti a 24h di esposizione a terreno YSD-U non inducente.

Questo insieme di osservazioni conferma l'identità delle sequenze isolate come codificanti per enzimi del tipo Fitochelatina Sintasi funzionanti, il che indica che *Arundo donax* è dotato di un numero minimo di tre geni codificanti per PCS, i quali hanno il potenziale di produrre enzimi funzionanti e che conferiscono resistenza nei confronti di un metallo pesante quale il Cadmio.

3.5. L'ESPRESSIONE DI AdPCS1 CAUSA RITARDO NELLA CRESCITA DEL CEPPO YK44 DI LIEVITO

Il ricombinante di *Saccharomyces cerevisiae* trasformato con la copia AdPCS1 ha mostrato un sensibile ritardo nella crescita su terreno YPGAL contenente CdSO_4 $100\mu\text{M}$, mentre tale fenomeno nello stesso è assente in YSD-U. Ciò potrebbe essere causato da un eccessivo carico metabolico in relazione alla presenza di Cadmio e nello specifico l'ipotesi è che il carico metabolico sia localizzato a livello traduzionale, con il Cd che attiva la sintesi di fitochelatine in risposta allo stesso e induca una sovrapproduzione di enzimi Fitochelatina Sintasi. Per verificare questo fenomeno sono stati monitorati gli OD_{600} relativi alla crescita dei lieviti trasformati nell'arco di 48h in una condizione inibente la sintesi post-traduzionale di PCS.

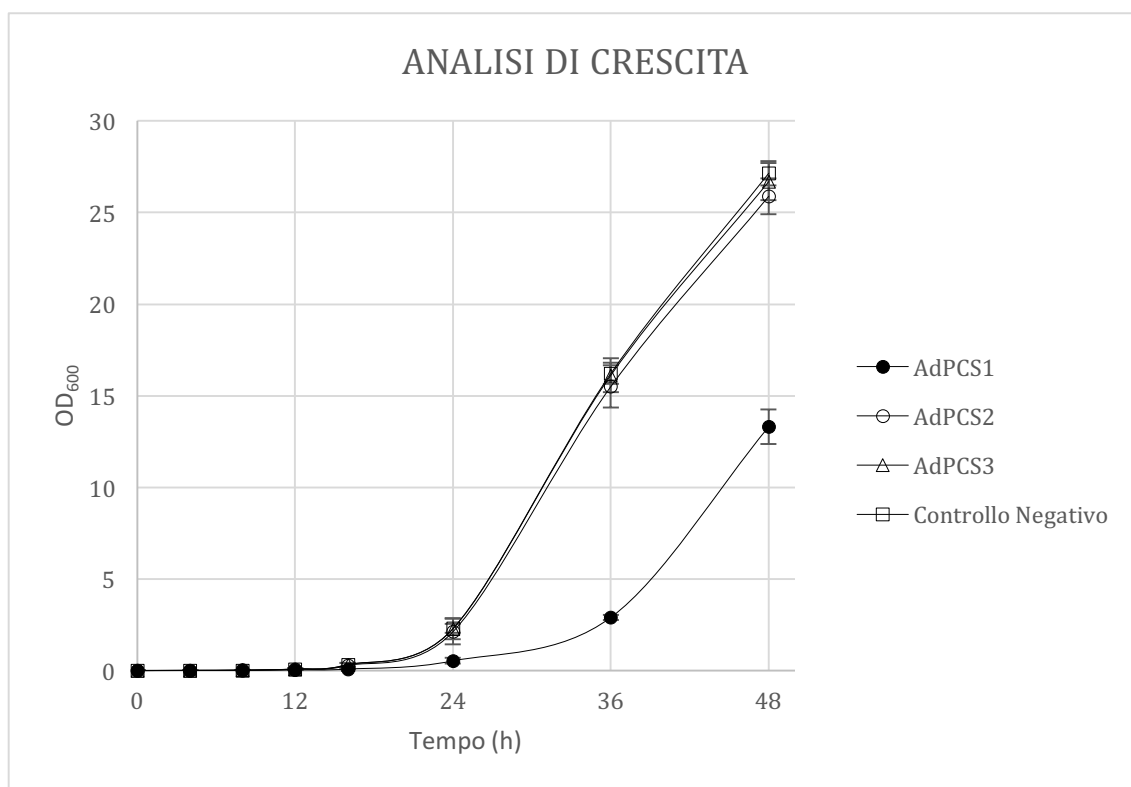


Figura 22: Curve di crescita relative ai ceppi YK44 di *Saccharomyces cerevisiae* mutagenizzati con le tre differenti copie di AdPCSs e il vettore pYESDEST52 vuoto. Il terreno adottato è un YPGAL al 2% di galattosio con misurazione dell' OD_{600} a 0h, 4h, 8h, 12h, 16h, 24, 36h e 48h. Il mutante esprimente AdPCS1 è riportato con un marker nero, mentre i mutanti AdPCS2-3 e il vettore vuoto (Controllo Negativo) sono riportati con marker bianchi. In immagine sono altresì riportate le deviazioni standard relative alle misurazioni.

I mutanti AdPCS2-3 ed il vettore vuoto presentano un andamento di crescita pressoché identico (*Figura 22*) ma, come riportato in grafico, il ceppo ricombinante esprimente la copia AdPCS1 presenta una fase di lag molto più pronunciata rispetto a quanto fanno i ceppi esprimenti AdPCS2, AdPCS3 o vettore vuoto. L'osservazione è consistente con quanto già monitorato nel sistema di crescita in piastra su YPGAL contenente Cadmio. Data l'assenza del sale di Cadmio nel sistema utilizzato, la differenza osservata non è imputabile all'effetto del metallo pesante sulla sintesi post-traduzionale di fitochelatine, quanto più alla trascrizione/traduzione del transgene stesso, con un effetto generale di rallentamento della normale crescita del lievito. Questo comportamento ha portato a ipotizzare che le differenze di sequenza tra le specie AdPCS1 e AdPCS2-3, per quanto ridotte, siano significative nel sistema eterologo adottato. L'effetto a cui si assiste non è comunque un fenomeno di citotossicità vero e proprio, quanto un effetto ritardante sulla normale crescita, la quale dopo 24h sembra essere superato dalle cellule trasformanti che entrano correttamente in fase di crescita logaritmica.

3.6. LE DIVERSE AdPCS SINTETIZZANO DIVERSI SPETTRI DI FITOCHELATINE E POSSEGGONO DIVERSI LIVELLI DI PROCESSIVITÀ

I dati di spettrometria di massa hanno mostrato profili differenziali per gli enzimi AdPCS1-3 per quanto riguarda sia le quantità di fitochelatine prodotte che il loro livello di polimerizzazione. Per l'analisi dei dati è necessaria però una breve premessa. In primo luogo la quantificazione delle PC individuate è stata ottenuta mediante l'uso del Glutatione come standard (riferirsi a *Supplementari 2* per la retta di calibrazione in questione). Questo pone il vantaggio di sfruttare una sola molecola come standard ma, al contempo, porta ad una sottostima dei dati delle PC prodotte, in quanto la corrispondenza

dell'indice m/z tra Glutathione e PC non è perfetto. Un'ulteriore problematica emerge al momento di analizzare i dati relativi alle PC con un livello di polimerizzazione pari o superiore a 6 (PC6). In questo contesto, gli oligopeptidi da PC6 a PC10 non presentano più un'unica carica ionica, ma tendono a presentarsi in forma di peptidi multi-carica. Ciò ha un effetto sui tempi di ritenzione, i quali divengono disomogenei, con conseguente ulteriore sottostima delle quantificazioni ottenute. Infine è stato osservato che il lievito trasformato con vettore vuoto ha prodotto un livello basale di PC2 e tracce al limite della quantificazione di PC3 (cromatogramma disponibile in *Supplementari 3*). La biosintesi di PC2 da parte del lievito *Saccharomyces cerevisiae* in condizioni normali è già stata osservata (Kneer et al, 1992; Wünschmann et al, 2007) come risultato ad opera di due Serina carbossipeptidasi localizzate sulla membrana vacuolare e perciò non sorprende che in condizioni di elevato stress il GSH venga processato a PC2. Inoltre proprio l'eccesso di GSH fornito ed il sistema di protezione, basato sul GSH, proprio del lievito possono aver contribuito alla sintesi occasionale di PC3, dato comunque al limite della quantificazione. In effetti in lievito sono presenti diversi enzimi della classe Glutathione trasferasi utilizzati principalmente per la coniugazione a xenobiotici, come Gtt1-2 o Grx1-2 (Morano et al, 2012), i quali possono aver contribuito ad un'erronea polimerizzazione a PC3.

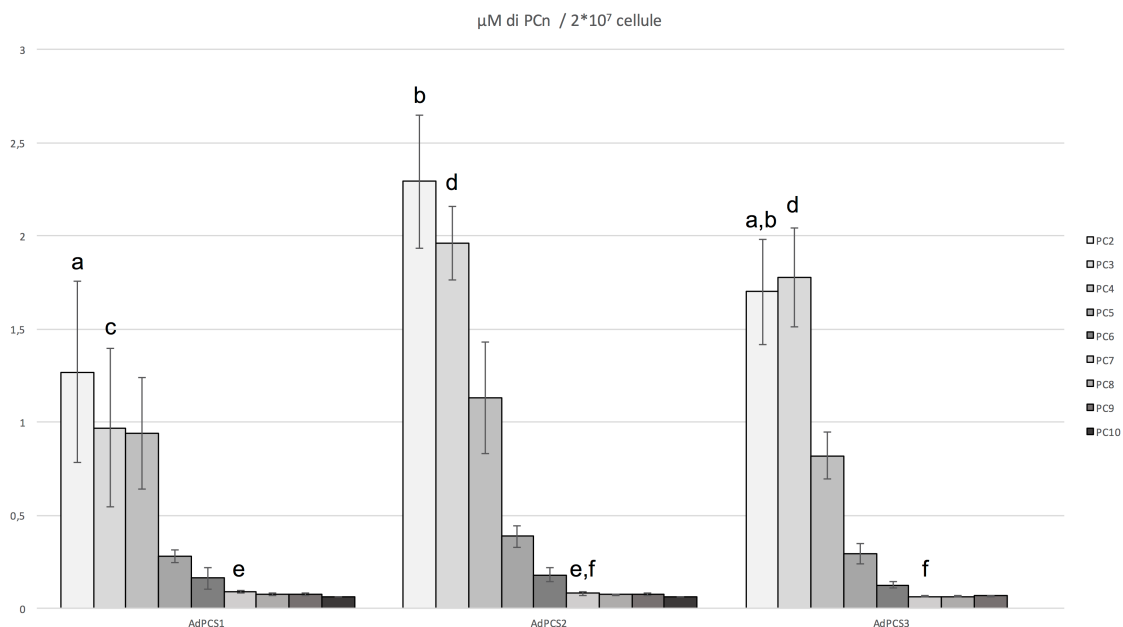


Figura 23: Spettri delle fitochelatine a differenti livelli di polimerizzazione sintetizzati dalle diverse AdPCS. I dati sono stati normalizzati sul valore di PC prodotte dal trasformatante provvisto del solo vettore. Le barre d'errore riportano la deviazione standard. Le diverse lettere ubicate sopra le colonne rappresentano la significatività statistica, calcolata mediante ANOVA con correzione post-hoc di Tukey. Ove non sono presenti indicazioni, il test statistico non ha suggerito differenze apprezzabili. Sigle utilizzate: PC2 (peptide ECECG), PC3 (ECECECG), PC4 (ECECECECG) e a seguire.

Per quanto riguarda il confronto a coppie tra le singole classi di fitochelatine prodotte, come osservabile nell'immagine (*Figura 23*), le tre differenti AdPCSs hanno diverse capacità in termini di sintesi di PC. La variante AdPCS1 pare essere la meno efficiente nella biosintesi delle PC come quantità di peptidi sintetizzati e anche la meno biosinteticamente costante, avendo una certa instabilità nelle quantità di PC prodotte. AdPCS2 e AdPCS3 si presentano invece come ravvicinate in termini di performances, con AdPCS2 che è però in grado di processare con maggiore efficienza il GSH disponibile. AdPCS3 mostra infine una minore capacità di polimerizzare le PC; si osserva infatti che AdPCS1 e AdPCS2 sono in grado di polimerizzare PC fino al valore di 10, mentre AdPCS3 non supera la soglia di PC9 (un picco di PC10 è presente nei

cromatogrammi, ma non risulta quantificabile, riferirsi a *Supplementari 6*). Un secondo approccio per valutare la capacità biosintetica è riportato in *Figura 24*.

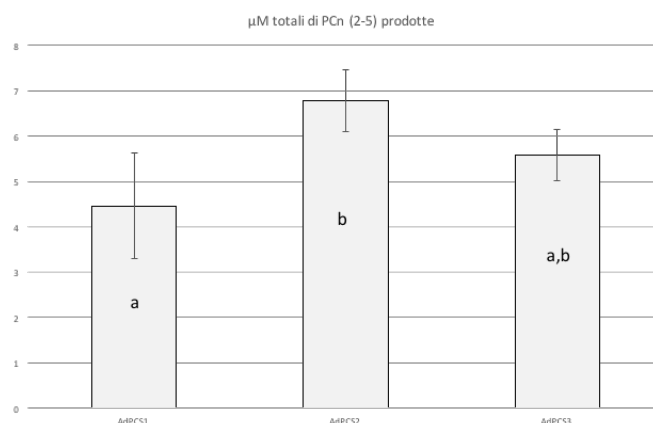


Figura 24: Rappresentazione dell'insieme delle PC prodotte con livello di polimerizzazione da 2 a 5 dalle singole varianti d AdPCSs. La barra d'errore rappresenta la deviazione standard. Le lettere all'interno delle colonne rappresentano le differenze statisticamente significative ottenute mediante test ANOVA con correzione post-hoc di Tukey.

In questo contesto i dati sono stati analizzati come sommatoria delle PC con grado di polimerizzazione da 2 a 5 (rappresentando i dati maggiormente affidabili). Da questa valutazione emerge che AdPCS3 rappresenta la variante con rese intermedie tra AdPCS1, la meno performante, e AdPCS2, la più performante. Questi dati, nel loro insieme, sembrano confermare quanto già ipotizzato dalle analisi di Real-Time PCR, ovvero che AdPCS1 sia un enzima che possiede un ruolo “di guardia” e che perciò risulti inducibile ma con ridotta capacità biosintetica e che quindi provochi ridotto stress una volta che la sua espressione viene up-regolata dall’esposizione della porzione ipogea a metallo pesante. Le migliori performances biosintetiche delle varianti AdPCS2 e AdPCS3 suggeriscono ancora un’azione di “fine tuning” verso lo stress, essendo in grado di fornire elevate rese nella sintesi di fitochelatine.

3.7. IN *Arabidopsis thaliana* L'ESPRESSIONE DI AdPCS3 RIDUCE LA GERMINAZIONE AD ELEVATE CONCENTRAZIONI DI Cd

Confermata l'effettiva identità dei trascritti identificati come codificanti per enzimi funzionanti del tipo PCS, grazie ai dati forniti dal sistema eterologo di *Saccharomyces cerevisiae*, si è passati alla valutazione degli effetti degli stessi trascritti in un sistema eterologo più vicino all'organismo donatore, ovvero *Arabidopsis thaliana*. Questa decisione deriva dalla volontà di verificare la presenza di effetti fisiologici derivanti dall'introduzione di un transgene in un organismo già di per sé tollerante lo stress da metallo pesante. Si è deciso per questo motivo di mutagenizzare non un deleto funzionale quale il mutante cad1-3, ma l'ecotipo wild-type Columbia. *Arabidopsis thaliana* è infatti provvista di due differenti geni per PCS, comunemente chiamati AtPCS1 (NCBI Gene ID: 834430) e AtPCS2 (NCBI Gene ID: 839354). Studi precedenti hanno dimostrato che la sovrespressione del gene AtPCS1 porta ad un fenotipo altamente sensibile ai metalli pesanti. Come già riportato nell'introduzione, questo fenomeno è imputato all'impoverimento del pool cellulare di GSH, con conseguente stress a carico dell'intero metabolismo cellulare. Per ogni linea transgenica AdPCSs alla generazione T4 più la linea wild-type, un totale di 255 semi sono stati singolarmente piastrati per valutarne i tassi di germinazione (*Figure 25 e 26*), in modo tale da verificare se la sovrespressione del transgene inducesse effetti simili alla sovrespressione del gene AtPCS1.

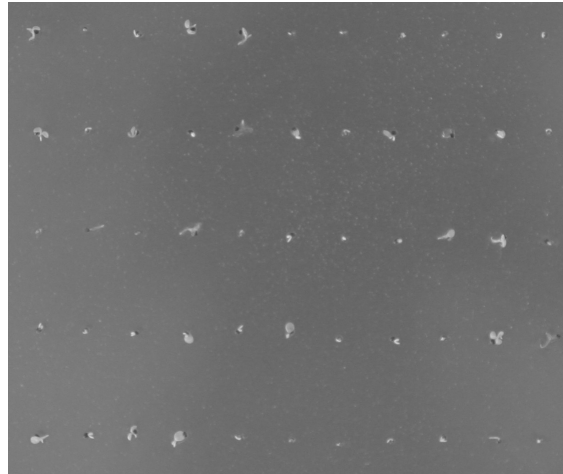


Figura 25: Esempio di piastra per il test di germinazione. In immagine si può osservare la linea trasformante AdPCS3 della generazione T4 in piastra ½ MS contenente CdSO₄ alla concentrazione 150M dopo 7 giorni. Si possono chiaramente osservare le propaggini radicali emergenti dai semi nel caso in cui la germinazione sia portata favorevolmente a termine dal seme, così come i giovani cotiledoni. In caso contrario dal seme non risultano visibili strutture protrudenti di alcun tipo.

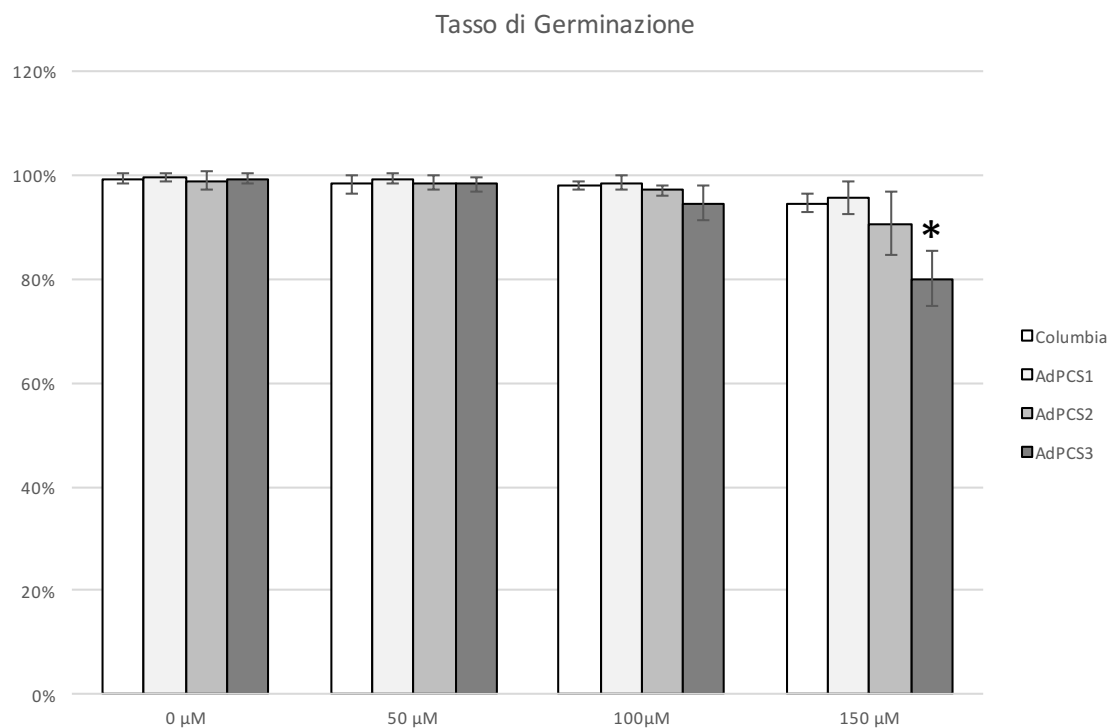


Figura 26: Grafico dei tassi di germinazione delle linee transgeniche e della linea wild-type espresse in percentili. La barra d'errore riporta la deviazione standard relativa, espressa anch'essa in percentili. Sono riportati in immagine i differenti stress applicati alle piastre di germinazione, ovvero un aumento nella concentrazione di CdSO₄ da 0 a 150μM. L'analisi statistica è stata effettuata mediante test di Kruskal-Wallis con correzione post-hoc di Dunn nei confronti del livello di germinazione dell'ecotipo Columbia in relazione alla concentrazione in esame. L'unico dato significativo ottenuto è rilevato alla condizione di CdSO₄ 150 μM, in cui la linea AdPCS3 mostra una significatività statistica di $p < 0.05$. È stata utilizzata anche la correzione post-hoc a coppie di Mann-Whitney, la quale ha confermato la significatività del dato.

Le linee trasformanti AdPCS1-2 non mostrano variazioni sensibili nei test di germinazione rispetto alla linea considerabile wild-type. Al contrario la linea AdPCS3 presenta, a seguito dell'esposizione a CdSO_4 150 μM , un calo statisticamente significativo nei livelli di germinazione se confrontato con l'ecotipo Columbia nelle medesime condizioni di crescita. Si osserva infatti una riduzione dal 90% circa, caratteristico delle linee Columbia e AdPCS1-2, al valore di 80% nella linea ricombinante AdPCS3. Questa osservazione risulta apparentemente contraddittoria con quanto osservato nel sistema di espressione di *Saccharomyces cerevisiae*, va però ricordato che i sistemi eterologhi in esame sono estremamente differenti e non è da escludere che lo stesso prodotto proveniente da un transgene agisca in maniera differente sui metabolismi cellulari dei diversi organismi esperimenti.

3.8. L'ESPRESSIONE DELLE TRE DIVERSE VARIANTI GENICHE DI AdPCSs PORTA A TRE DIFFERENTI FENOTIPI IN *Arabidopsis thaliana*

Data la precedente osservazione di un ridotto livello di germinazione nella linea AdPCS3, è stato ipotizzato un possibile effetto a livello fenotipico una volta sviluppatesi le prime foglie vere. Ciò in relazione al fatto che una ridotta germinazione, in questo contesto, è tendenzialmente indice di un'aumentata sensibilità al metallo pesante. Al fine di verificare questa ipotesi, un'aliquota di circa 200 semi da ogni linea ricombinante e lo stesso quantitativo proveniente dalla variante Columbia è stato preparato per la semina. I semi sono stati sterilizzati come già descritto e risospesi in 250 μL di terreno $\frac{1}{2}$ MS. Si è poi proceduto con lo spotting di questa soluzione di semi su piastre $\frac{1}{2}$ MS con CdSO_4 alle concentrazioni di 0 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 150 μM e 250 μM . Le piastre sono state poste in camera termostata a 23°C e ciclo fotoperiodo estivo per 14 giorni, al fine di

ottenere organismi in cui si ha sviluppo delle prime foglie vere e un fenotipo da stress visibile nel caso sia presente. È stata ricercata la concentrazione ideale alla quale un fenotipo osservabile fosse presente nelle linee trasformanti ma non nell'ecotipo Columbia e la suddetta concentrazione è stata riscontrata a $75\mu\text{M}$ (Figura 27). Concentrazioni superiori iniziano in effetti anche ad agire sull'ecotipo considerato wild-type e sono perciò state considerate di ridotto interesse per l'analisi del fenotipo.

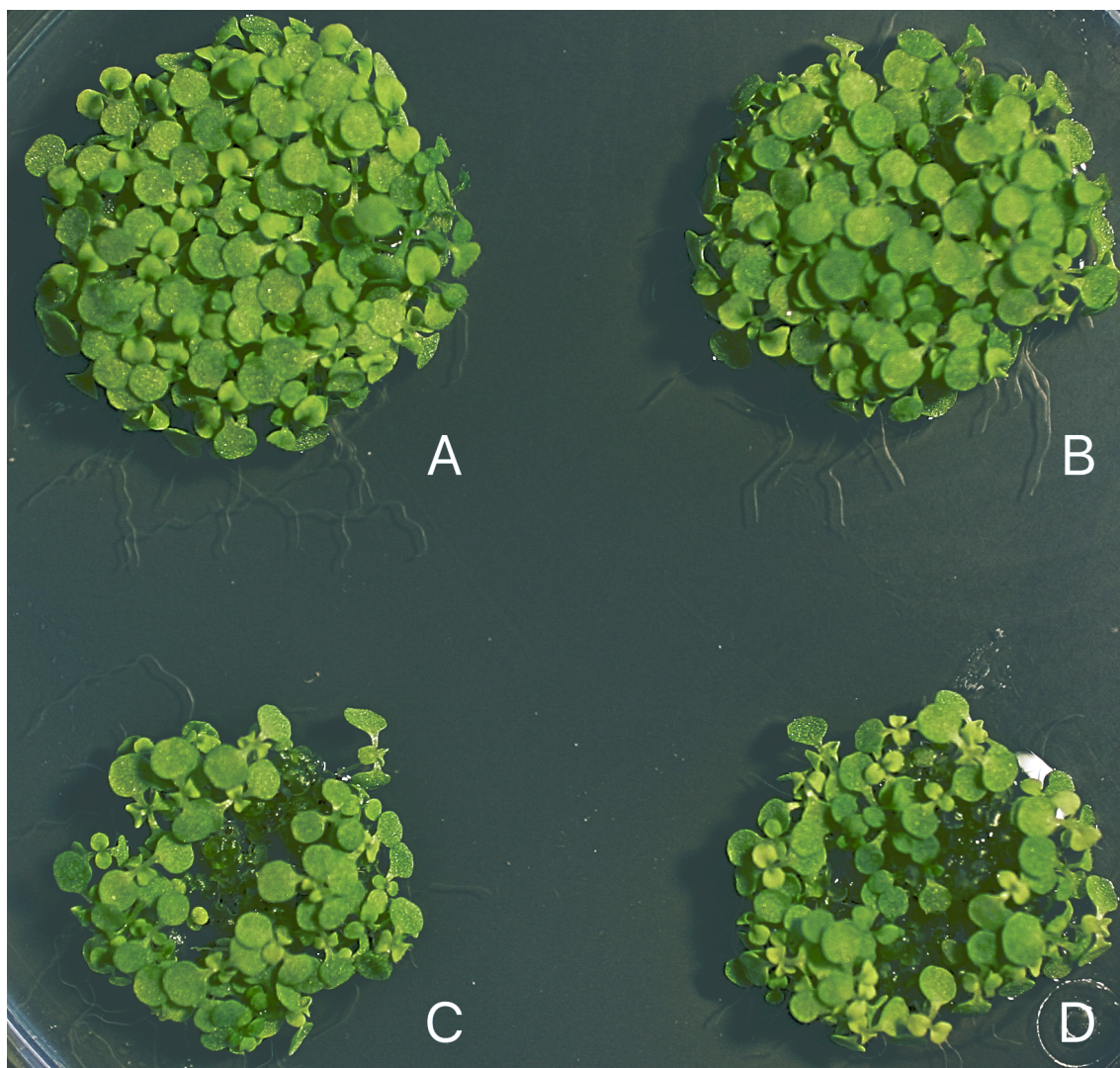


Figura 27: Analisi dei fenotipi delle linee trasformanti di *Arabidopsis thaliana* in relazione a stress da CdSO_4 .
A: ecotipo Columbia.

B: trasformante At::AdPCS1.

C: trasformante At::AdPCS2.

D: trasformante At::AdPCS3.

Lo stress da Cadmio applicato ai semi ha portato, come si può osservare in figura, all'insorgenza di un fenotipo da stress (ipoclorosi) nelle linee trasformanti AdPCS2 e AdPCS3. L'effetto risulta più marcato nella linea AdPCS3 piuttosto che nella linea AdPCS2 ed è maggiormente localizzato a livello delle prime vere foglie emergenti.

Come si può notare, sembra che delle linee AdPCS2 e AdPCS3 sia stata piastrata una minore quantità di semi. Ciò è un effetto ottico dovuto ad un minore sviluppo dei semi i quali, benché riescano a germinare, non riescono a svilupparsi con successo, fenomeno scarsamente rilevabile con i test di germinazione. I trasformanti provvisti di AdPCS1 presentano un fenotipo fortemente rassomigliante quello mostrato dall'ecotipo Columbia. Questo fenomeno, associato ai dati di Real-Time degli organi in condizioni fisiologiche e delle porzioni epigea ed ipogea in condizioni di stress, sembrano confermare l'ipotesi che AdPCS1 sia in realtà un trascritto di guardia nei confronti dei metalli pesanti, dotato di elevata trascrittibilità ma con ridotta processività. I risultati derivanti dall'analisi del fenotipo relativi ai transgeni AdPCS2 e AdPCS3 paiono confermare la seconda ipotesi avanzata in base ai dati di Real-Time e avvalorata dai dati di spettrometria di massa. In effetti, l'osservazione di un fenotipo differente rispetto all'ecotipo wild-type, unitamente alla differenza mostrata rispetto ai trasformanti AdPCS1, pare suggerire che queste due varianti enzimatiche godano di elevata processività e che di conseguenza imitino gli effetti derivanti dall'overespressione del gene AtPCS1 descritti in letteratura.

4. CONCLUSIONI

Nel contesto dell'organismo *Arundo donax*, ottimo candidato per la tecnologia del fitorimedia, sono state trovate le prime basi genetiche che permettono all'organismo di tollerare la presenza di anche elevate concentrazioni di metalli pesanti presenti nella matrice ambientale in cui l'organismo compie il suo ciclo vitale. Le difficoltà correlate con l'ottenimento del sequenziamento genomico di *Arundo donax*, imposti dall'assetto cromosomico pseudotriploide, hanno portato a bypassare il genoma per ricercare la base molecolare della metallo-resistenza mediante il trascrittoma disponibile. A partire dai dati trascrittomici esistenti sono state identificate diverse copie geniche codificanti per enzimi PCS-like e, tra essi, si è stati in grado di sequenziare tre differenti CDS complete da ATG iniziale a codone di STOP. Il sequenziamento ha portato non solo all'identificazione di tre differenti varianti geniche codificanti per PCS putative, ma anche le varianti alleliche nel caso di due di esse. L'analisi filogenetica effettuata su queste varianti identificate ha permesso di collocarle, coerentemente all'evoluzione delle specie, in relazione alle altre sequenze di PCS di Monocotiledoni disponibili sui database esistenti. Ciò ha inoltre fatto emergere che l'unica sequenza disponibile di *P. australis* probabilmente è solo una delle possibili varianti geniche esistenti nell'organismo e che rappresenta la forma più distante da quelle normalmente presenti nelle Poaceae. L'espressione dei trascritti PCS putativi è stata verificata mediante Real-Time PCR e ha dimostrato diverse caratteristiche interessanti:

1. La variante AdPCS1 mostra un livello di espressione fortemente maggiore rispetto alle altre due varianti in tutti gli organi analizzati, presentandosi perciò come PCS fin ora caratterizzata più espressa in *Arundo donax*
2. È stata dimostrata per la prima volta una responsività trascrizionale e induzione dei geni per PCS nei confronti dei metalli pesanti, mostrando perciò l'esistenza di un controllo non solo post-traduzionale nella biogenesi delle fitochelatine, ma anche un controllo trascrizionale della stessa
3. Le porzioni ipogea ed epigea modulano differientemente la loro espressione genica dei geni per PCS identificati se sottoposte allo stress da metallo pesante, indicando perciò un'indipendenza della risposta dei distretti presi in esame

Queste PCS putative sono successivamente state verificate per la loro funzionalità inizialmente nel sistema eterologo di *Saccharomyces cerevisiae*, grazie al quale sono stati ottenuti dati molto netti riguardo all'identità di questi trascritti come codificanti effettivamente per enzimi PCS funzionanti. Il ceppo di lievito utilizzato YK44 è infatti altamente sensibile al Cadmio e, grazie all'inserzione dei diversi transgeni codificanti per le CDS individuate, acquisisce la capacità di resistere ad uno stress da CdSO_4 100 μM . Ciò dimostra la presenza in *Arundo* di almeno tre differenti geni per PCS funzionanti, il che non sorprende data l'origine della specie stessa, caratterizzata da continui riarrangiamenti cromosomici i quali hanno portato alla sua sterilità. Fra le tre PCS, una (AdPCS1) ha mostrato un effetto ritardante sulla crescita dell'organismo ospitante il transgene in questione, effetto comunque non citotossico e non correlato con l'attività enzimatica stessa. Gli esperimenti condotti sul monitoraggio della crescita del lievito in condizioni inducenti l'espressione dei transgeni all'interno dei vettori ma non recanti stress da metallo (terreno YPGAL senza Cadmio), hanno infatti mostrato un

allungamento della fase di lag iniziale, blocco superato dopo 24h di induzione. Le analisi di spettrometria di massa hanno inoltre evidenziato un pattern variante-specifico nella biosintesi di fitochelatine da parte delle differenti varianti di AdPCSs. Successivamente alla verifica dell'identità delle CDS identificate come PCS, le stesse sono state inserite nel contesto di *Arabidopsis thaliana* in maniera tale da verificare eventuali effetti delle stesse a livello fisiologico in un sistema eterologo più vicino all'organismo donatore. Le linee trasformanti create sono state portate avanti per autoimpollinazione al fine di raggiungere la condizione di omozigosi dei transgeni inseriti. Ciò è stato utile per verificare gli effetti dei transgeni come se agissero da gene supplementare. Ci si attendeva un effetto di ipersensibilità nei confronti dei metalli pesanti, effetto che si è mostrato marcato alla concentrazione di 150 μ M per la germinazione. A livello fenotipico l'effetto è già notevole alla concentrazione di CdSO₄ 75 μ M, con corrispettivo ridotto sviluppo dei semi nelle linee At::AdPCS2 e At::AdPCS3 e, sempre in queste due linee, insorgenza di clorosi a livello delle prime foglie vere. Queste osservazioni sono in accordo con la risposta all'overespressione del gene di *Arabidopsis thaliana* AtPCS1.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Abascal F, Zardoya R, Posada D. 2005. ProtTest: Selection Of Best-Fit Models Of Protein Evolution. *Bioinformatics* 21: 2104-2105.
2. Ahner BA, Kong S, Morel FMM. 1995. Phytochelatin Production in Marine Algae: An Interspecies Comparison. *Limnology and Oceanography* 40: 649–657.
3. Anisimova M, Gascuel O. 2006. Approximate Likelihood-Ratio Test For Branches: A Fast, Accurate, And Powerful Alternative. *Systematic Biology* 55: 539–552.
4. Bucci A, Cassani E, Landoni M, Cantaluppi E, Pilu R. 2013. Analysis Of Chromosome Number And Speculations On The Origin Of *Arundo donax* L. (Giant Reed). *Cytology and Genetics* 47: 237–241.
5. Chaurasia N, Mishra Y, Rai LC. 2008. Cloning Expression And Analysis Of Phytochelatin Synthase (PCS) Gene From *Anabaena* sp. PCC 7120 Offering Multiple Stress Tolerance In *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 376: 225–230.
6. Clemens S, Kim EJ, Neumann D, Schroeder JI. 1999. Tolerance To Toxic Metals By A Gene Family Of Phytochelatin Synthases From Plants And Yeast. *EMBO Journal* 18: 3325–3333.
7. Clemens S, Schroeder JI, Degenkolb T. 2001. *Caenorhabditis elegans* Expresses A Functional Phytochelatin Synthase. *European Journal of Biochemistry* 268: 3640–3643.
8. Clough SJ, Bent AF. 1998. Floral dip: A Simplified Method For Agrobacterium-Mediated Transformation Of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16: 735–743.

9. Cobbett C, Goldsbrough P. 2002. Phytochelatins and Metallothioneins: Roles In Heavy Metal Detoxification And Homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53: 159–182.
10. Dubreuil-Maurizi C, Vitecek J, Marty L, Branciard L, Frettinger P, Wendehenne D, Meyer AJ, Mauch F, Poinssot B. 2011. Glutathione Deficiency Of The Arabidopsis Mutant PAD2-1 Affects Oxidative Stress-Related Events, Defense Gene Expression, And The Hypersensitive Response. *Plant physiology* 157: 2000–12.
11. Emsley J. 2001. Nature's building blocks: An A-Z guide to the elements.
12. Fu Y, Poli M, Sablok G, Wang B, Liang Y, La Porta N, Velikova V, Loreto F, Li M, Varotto C. 2016. Dissection Of Early Transcriptional Responses To Water Stress In *Arundo donax* L. By Unigene-Based RNA-seq. *Biotechnology for Biofuels* 9: 54.
13. Geer LY, Marchler-Bauer A, Geer RC, Han L, He J, He S, Liu C, Shi W, Bryant SH. 2010. The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Research* 38: D492–D496.
14. Glez-Peña D, Gómez-Blanco D, Reboiro-Jato M, Fdez-Riverola F, Posada D. 2010. ALTER: Program-oriented Conversion Of DNA And Protein Alignments. *Nucleic Acids Research* 38: 14–18.
15. Gong J-M, Lee DA, Schroeder JJ. 2003. Long-distance Root-to-shoot Transport Of Phytochelatins And Cadmium In Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 10118–10123.

16. Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N, Rokhsar DS. 2012. Phytozome: A Comparative Platform For Green Plant Genomics. *Nucleic Acids Research* 40: D1178–D1186.
17. Grennan AK. 2011. Metallothioneins, A Diverse Protein Family. *Plant physiology* 155: 1750–1751.
18. Grill E; Winnacker EL; Zenk, MH. 1985. Phytochelatins: The Principal Heavy-Metal Complexing Peptides Of Higher Plants. *Science* 230: 674–676.
19. Grill E, Löffler S, Winnacker EL, Zenk MH. 1989. Phytochelatins, The Heavy-Metal-Binding Peptides Of Plants, Are Synthesized From Glutathione By A Specific Gamma-Glutamylcysteine Dipeptidyl Transpeptidase (Phytochelatinsynthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 6838–6842.
20. Guindon S, Gascuel O. 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm To Estimate Large Phylogenies By Maximum Likelihood. *Systematic Biology* 52: 696–704.
21. Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New Algorithms And Methods To Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing The Performance Of PhyML 2.0. *Systematic Biology* 59: 307–321.
22. Ha S-B, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O’Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS. 1999. Phytochelatinsynthase Genes From Arabidopsis And The Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* 11: 1153–1163.

23. Hall T. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor And Analysis Program For Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
24. Halliwell B, Gutteridge JM. 1984. Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metals And Disease. *The Biochemical journal* 219: 1–14.
25. Hamer DH. 1986. Metallothionein. *Annual Review of Biochemistry* 55: 913-951.
26. Harada E, Von Roepenack-Lahaye E, Clemens S. 2004. A Cyanobacterial Protein With Similarity To Phytochelatin Synthases Catalyzes The Conversion Of Glutathione To γ -Glutamylcysteine And Lacks Phytochelatin Synthase Activity. *Phytochemistry* 65: 3179–3185.
27. Hardion L, Verlaque R, Rbaumel A, Juin M, Vila B. 2012. Revised Systematics Of Mediterranean Arundo (Poaceae) Based On AFLP Fingerprints And Morphology. *Taxon* 61: 1217–1226.
28. He R, Kim MJ, Nelson W, Balbuena TS, Kim R, Kramer R, Crow JA, May GD, Thelen JJ, Soderlund CA, Gang DR. 2012. Next-Generation Sequencing-Based Transcriptomic And Proteomic Analysis Of The Common Reed, *Phragmites australis* (Poaceae), Reveals Genes Involved In Invasiveness And Rhizome Specificity. *American Journal of Botany* 99: 232–247.
29. Hirata K, Tsuji N, Miyamoto K. 2005. Biosynthetic Regulation Of Phytochelatins, Heavy Metal-Binding Peptides. *Journal of bioscience and bioengineering* 100: 593–599.
30. Jones D, Taylor W, Thornton J. 1992. The Rapid Generation Of Mutation Data Matrices From Protein Sequences. *Computer Applications in the Biosciences* (CABIOS) 8: 275–282.

31. Katoh K, Kuma KI, Toh H, Miyata T. 2005. MAFFT version 5: Improvement In Accuracy Of Multiple Sequence Alignment. *Nucleic Acids Research* 33: 511–518.
32. Kneer R, Kutchan TM, Hochberger A, Zenk MH. 1992. *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatin. *Archives of Microbiology* 157: 305–310.
33. Kondo N, Imai K, Isobe M, Goto T, Murasugi A, Wada-Nakagawa C, Hayashi Y. 1984. Cadystin A and B, Major Unit Peptides Comprising Cadmium-Binding Peptides Induced In A Fission Yeast-Separation, Revision Of Structures And Synthesis. *Tetrahedron Lett.* 25: 3869–3872.
34. Kühnlenz T, Schmidt H, Uraguchi S, Clemens S. 2014. *Arabidopsis thaliana* Phytochelatin Synthase 2 Is Constitutively Active In Vivo And Can Rescue The Growth Defect Of The PCS1-Deficient cad1-3 Mutant On Cd-Contaminated Soil. *Journal of Experimental Botany* 65: 4241–4253.
35. Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7 . 0 For Bigger Datasets. *Brief communication* 33: 1870–1874.
36. Kuraku S, Zmasek CM, Nishimura O, Katoh K. 2013. aLeaves Facilitates On-Demand Exploration Of Metazoan Gene Family Trees On MAFFT Sequence Alignment Server With Enhanced Interactivity. *Nucleic acids research* 41: 22–28.
37. Lee S. 2003. Overexpression Of Arabidopsis Phytochelatin Synthase Paradoxically Leads To Hypersensitivity To Cadmium Stress. *Plant Physiology* 131: 656–663.
38. Lee S, Petros D, Moon JS, Ko TS, Goldsbrough PB, Korban SS. 2003. Higher Levels Of Ectopic Expression Of Arabidopsis Phytochelatin Synthase Do Not

- Lead To Increased Cadmium Tolerance And Accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 903–910.
39. Lefort V, Longueville J-E, Gascuel O. 2017. SMS: Smart Model Selection In PhyML. *Molecular Biology and Evolution*: 4–6.
 40. Loscos J. 2006. A Reassessment Of Substrate Specificity And Activation Of Phytochelatins From Model Plants By Physiologically Relevant Metals. *Plant Physiology* 140: 1213–1221.
 41. Maier T, Yu C, Küllertz G, Clemens S. 2003. Localization And Functional Characterization Of Metal-Binding Sites In Phytochelatins Synthases. *Planta* 218: 300–308.
 42. Mariani C, Cabrini R, Danin A, Piffanelli P, Fricano A, Gomarasca S, Dicandilo M, Grassi F, Soave C. 2010. Origin, Diffusion And Reproduction Of The Giant Reed (*Arundo donax* L.): A Promising Weedy Energy Crop. *Annals of Applied Biology* 157: 191–202.
 43. Mendoza-Cózatl DG, Zhai Z, Jobe TO, Akmakjian GZ, Song WY, Limbo O, Russell MR, Kozlovskyy VI, Martinoia E, Vatamaniuk OK, Russell P, Schroeder JI. 2010. Tonoplast-Localized ABC2 Transporter Mediates Phytochelatins Accumulation In Vacuoles And Confers Cadmium Tolerance. *Journal of Biological Chemistry* 285: 40416–40426.
 44. Mendoza-Cózatl D, Loza-Tavera H, Hernández-Navarro A, Moreno-Sánchez R. 2005. Sulfur Assimilation And Glutathione Metabolism Under Cadmium Stress In Yeast, Protists And Plants. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 653–671.
 45. Morano KA, Grant CM, Moye-Rowley WS. 2012. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190: 1157–1195.

46. Morelli E, Scarano G. 2001. Synthesis And Stability Of Phytochelatins Induced By Cadmium And Lead In The Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine environmental research* 52: 383–95.
47. Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM. 2010. Heavy Metals, Occurrence And Toxicity For Plants: A Review. *Environmental Chemistry Letters* 8: 199–216.
48. Osaki Y, Shirabe T, Tamura S, Yoshimura E. 2008. A Functional Putative Phytochelatin Synthase From The Primitive Red Alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 72: 3306–3309.
49. Parisy V, Poinssot B, Owsianowski L, Buchala A, Glazebrook J, Mauch F. 2007. Identification Of PAD2 As a γ -Glutamylcysteine Synthetase Highlights The Importance Of Glutathione In Disease Resistance Of Arabidopsis. *Plant Journal* 49: 159–172.
50. Petraglia A, De Benedictis M, Degola F, Pastore G, Calcagno M, Ruotolo R, Mengoni A, Di Toppi LS. 2014. The Capability To Synthesize Phytochelatins And The Presence Of Constitutive And Functional Phytochelatin Synthases Are Ancestral (Plesiomorphic) Characters For Basal Land Plants. *Journal of Experimental Botany* 65: 1153–1163.
51. Peuke AD, Rennenberg H. 2005. Phytoremediation. Ray D, Williams DL. 2011. Characterization Of The Phytochelatin Synthase Of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5.
52. Poli M, Salvi S, Li M, Varotto C. 2017. Selection Of Reference Genes Suitable For Normalization Of qPCR Data Under Abiotic Stresses In Bioenergy Crop *Arundo donax* L. *Scientific Reports* (in Press).

53. Rea PA, Vatamaniuk OK, Rigden DJ. 2004. Weeds, Worms, And More: Papain's Long-Lost Cousin. *Plant Physiology* 136: 2463–2474.
54. Rigouin C, Nylin E, Cogswell AA, Schaumlöffel D, Dobritsch D, Williams DL. 2013. Towards An Understanding Of The Function Of The Phytochelatin Synthase Of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7.
55. Romanyuk ND, Rigden DJ, Vatamaniuk OK, Lang A, Cahoon RE, Jez JM, Rea PA. 2006. Mutagenic Definition Of A Papain-Like Catalytic Triad, Sufficiency Of The N-Terminal Domain For Single-Site Core Catalytic Enzyme Acylation, And C-Terminal Domain For Augmentative Metal Activation Of A Eukaryotic Phytochelatin Synthase. *Plant physiology* 141: 858–869.
56. Ruotolo R, Peracchi A, Bolchi A, Infusini G, Amoresano A, Ottonello S. 2004. Domain Organization Of Phytochelatin Synthase. Functional Properties Of Truncated Enzyme Species Identified By Limited Proteolysis. *Journal of Biological Chemistry* 279: 14686–14693.
57. Sablok G, Fu Y, Bobbio V, Laura M, Rotino GL, Bagnaresi P, Allavena A, Velikova V, Viola R, Loreto F, Li M, Varotto C. 2014. Fuelling Genetic And Metabolic Exploration Of C3 Bioenergy Crops Through The First Reference Transcriptome Of *Arundo donax* L. *Plant Biotechnology Journal* 12: 554–567.
58. Shine AM, Shakya VP, Idnurm A. 2015. Phytochelatin Synthase Is Required For Tolerating Metal Toxicity In A Basidiomycete Yeast And Is A Conserved Factor Involved In Metal Homeostasis In Fungi. *Fungal biology and biotechnology* 2.
59. Stevens PF. 2001. Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012
60. Stöver BC, Müller KF. 2010. TreeGraph 2: Combining And Visualizing Evidence From Different Phylogenetic Analyses. *BMC Bioinformatics* 11:7.

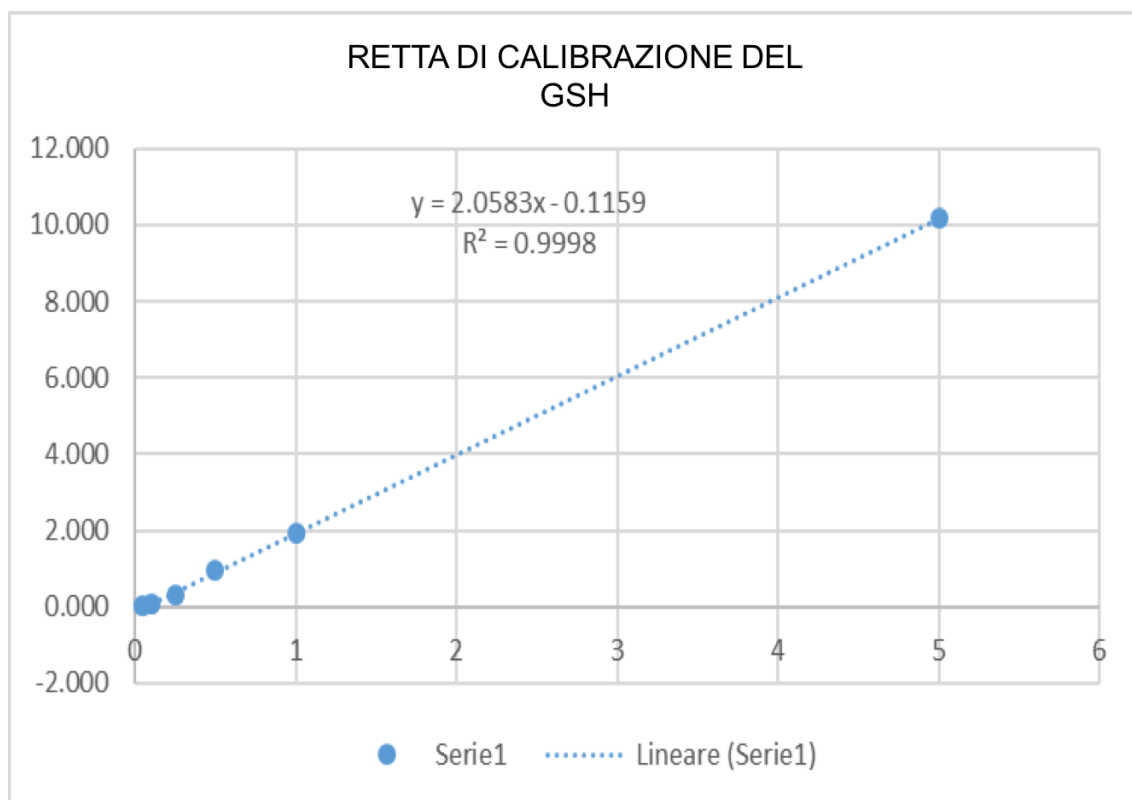
61. Talavera G, Castresana J. 2007. Improvement Of Phylogenies After Removing Divergent And Ambiguously Aligned Blocks From Protein Sequence Alignments. *Systematic Biology* 56: 564–577.
62. Tayyar R, Khudamrongsawat J, Holt JS. 2004. Genetic Diversity Of Giant Reed (*Arundo donax*) In The Santa Ana River, California. *Weed Science* 52: 395–405.
63. Tennstedt P, Peisker D, Bottcher C, Tramczynska A, Clemens S. 2008. Phytochelatin Synthesis Is Essential For The Detoxification Of Excess Zinc And Contributes Significantly To The Accumulation Of Zinc. *Plant Physiology* 149: 938–948.
64. Thompson J, Bannigan J. 2008. Cadmium: Toxic Effects On The Reproductive System And The Embryo. *Reproductive Toxicology* 25: 304–315.
65. Tsuji N, Hirayanagi N, Iwabe O, Namba T, Tagawa M, Miyamoto S, Miyasaka H, Takagi M, Hirata K, Miyamoto K. 2003. Regulation Of Phytochelatin Synthesis By Zinc And Cadmium In Marine Green Alga, *Dunaliella tertiolecta*. *Phytochemistry* 62: 453–459.
66. Tsuji N, Nishikori S, Iwabe O, Shiraki K, Miyasaka H, Takagi M, Hirata K, Miyamoto K. 2004. Characterization Of Phytochelatin Synthase-Like Protein Encoded By Alr0975 From A Prokaryote, *Nostoc* sp. PCC 7120. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 315: 751–755.
67. Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, Rea PA. 1999. AtPCS1, A Phytochelatin Synthase From Arabidopsis: Isolation And In Vitro Reconstitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 7110–7115.

68. Vivares D, Arnoux P, Pignol D. 2005. A Papain-Like Enzyme At Work: Native And Acyl-Enzyme Intermediate Structures In Phytochelatin Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 18848–18853.
69. Voet D, & Voet JG. 2011. Biochemistry. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
70. Wang F, Wang Z, Zhu C. 2012. Heteroexpression Of The Wheat Phytochelatin Synthase Gene (TaPCS1) In Rice Enhances Cadmium Sensitivity. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 44: 886–893.
71. Wu N, Matand K, Kebede B, Acquaaah G, Williams S. 2010. Enhancing DNA Electrotransformation Efficiency In *Escherichia coli* DH10B Electrocompetent Cells. *Electronic Journal of Biotechnology* 13: 1–9.
72. Wünschmann J, Beck A, Meyer L, Letzel T, Grill E, Lendzian KJ. 2007. Phytochelatins are synthesized by two vacuolar serine carboxypeptidases in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 581: 1681–1687.
73. Zhao C, Xu J, Li Q, Li S, Wang P, Xiang F. 2014. Cloning And Characterization Of A *Phragmites australis* Phytochelatin Synthase (PaPCS) And Achieving Cd Tolerance In Tall Fescue. (M Reigosa, Ed.). *PloS one* 9: e103771.

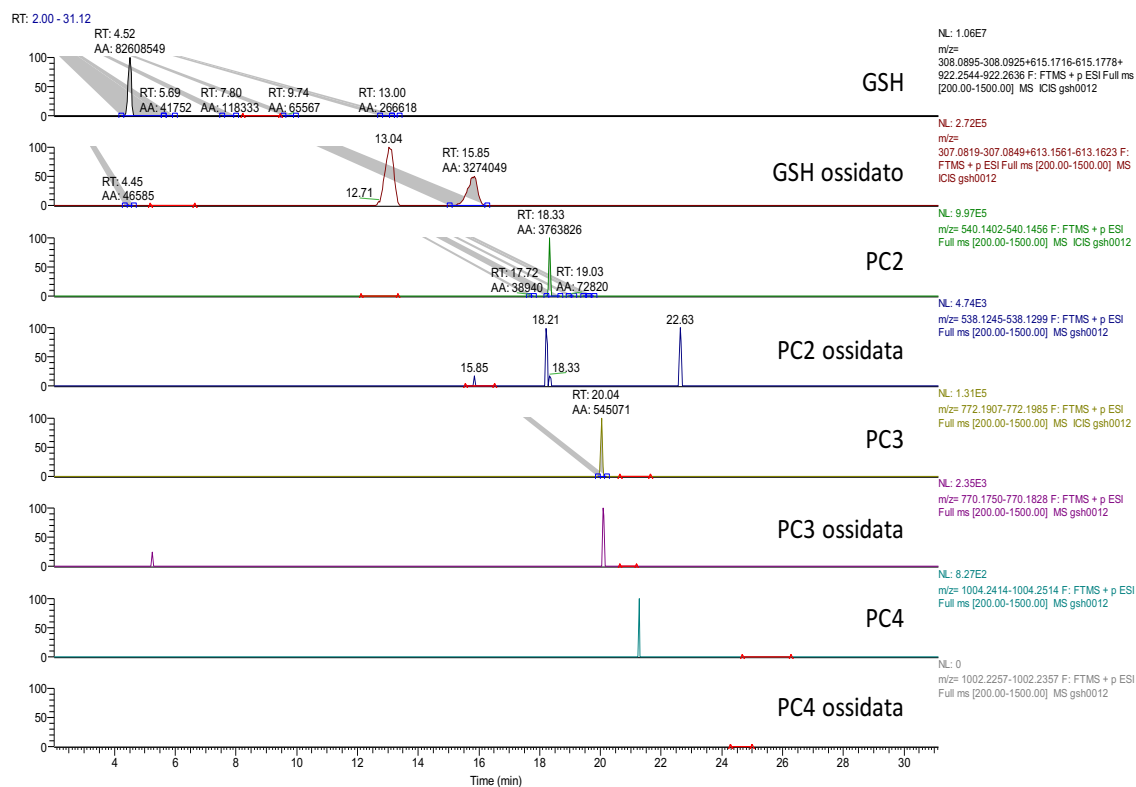
6. MATERIALI SUPPLEMENTARI

BUD	CULM	LEAF	ROOT
Locus 11208 Transcript 26/68	Locus 4500 Transcript 24/91	Locus 17051 Transcript 29/63	Locus 18532 Transcript 03/82
Locus 11208 Transcript 35/68	Locus 4500 Transcript 33/91	Locus 17051 Transcript 36/63	Locus 18532 Transcript 06/82
Locus 11208 Transcript 38/68	Locus 4500 Transcript 35/91	Locus 17051 Transcript 38/63	Locus 18532 Transcript 24/82
Locus 11208 Transcript 45/68	Locus 4500 Transcript 37/91	Locus 17051 Transcript 43/63	Locus 18532 Transcript 39/82
Locus 11208 Transcript 54/68	Locus 4500 Transcript 47/91	Locus 17051 Transcript 56/63	Locus 18532 Transcript 44/82
Locus 11208 Transcript 59/68	Locus 4500 Transcript 51/91	comp68293 c0 seq2 len=1775	Locus 18532 Transcript 49/82
Locus 11208 Transcript 61/68	Locus 4500 Transcript 53/91	comp68293 c0 seq3 len=1165	Locus 18532 Transcript 68/82
Locus 11208 Transcript 62/68	Locus 4500 Transcript 59/91	comp68293 c0 seq5 len=1620	Locus 18532 Transcript 73/82
Locus 11208 Transcript 64/68	Locus 4500 Transcript 66/91	comp68293 c0 seq6 len=1717	Locus 18532 Transcript 76/82
comp80871 c0 seq2 len=979	Locus 4500 Transcript 67/91	comp68293 c0 seq7 len=734	comp85045 c0 seq3 len=1134
comp80871 c0 seq3 len=1606	Locus 4500 Transcript 80/91	comp68293 c0 seq11 len=1656	comp85045 c0 seq5 len=1926
comp80871 c0 seq5 len=1350	comp86543 c0 seq1 len=2976	comp527297 c0 seq1 len=293	comp85045 c0 seq6 len=2008
comp80871 c0 seq8 len=1308	comp86543 c0 seq6 len=2335		comp85045 c0 seq15 len=1713
comp80871 c0 seq11 len=833	comp86543 c0 seq7 len=2798		comp85045 c0 seq19 len=1736
comp80871 c0 seq16 len=791			comp85045 c0 seq23 len=715
comp80871 c0 seq18 len=1450			comp85045 c0 seq25 len=1615
comp80871 c0 seq20 len=2217			comp85045 c0 seq29 len=690
comp80871 c0 seq21 len=912			comp85045 c0 seq30 len=4813
comp80871 c0 seq24 len=1085			
comp80871 c0 seq28 len=1923			
comp80871 c0 seq29 len=1744			
comp80871 c0 seq30 len=1492			

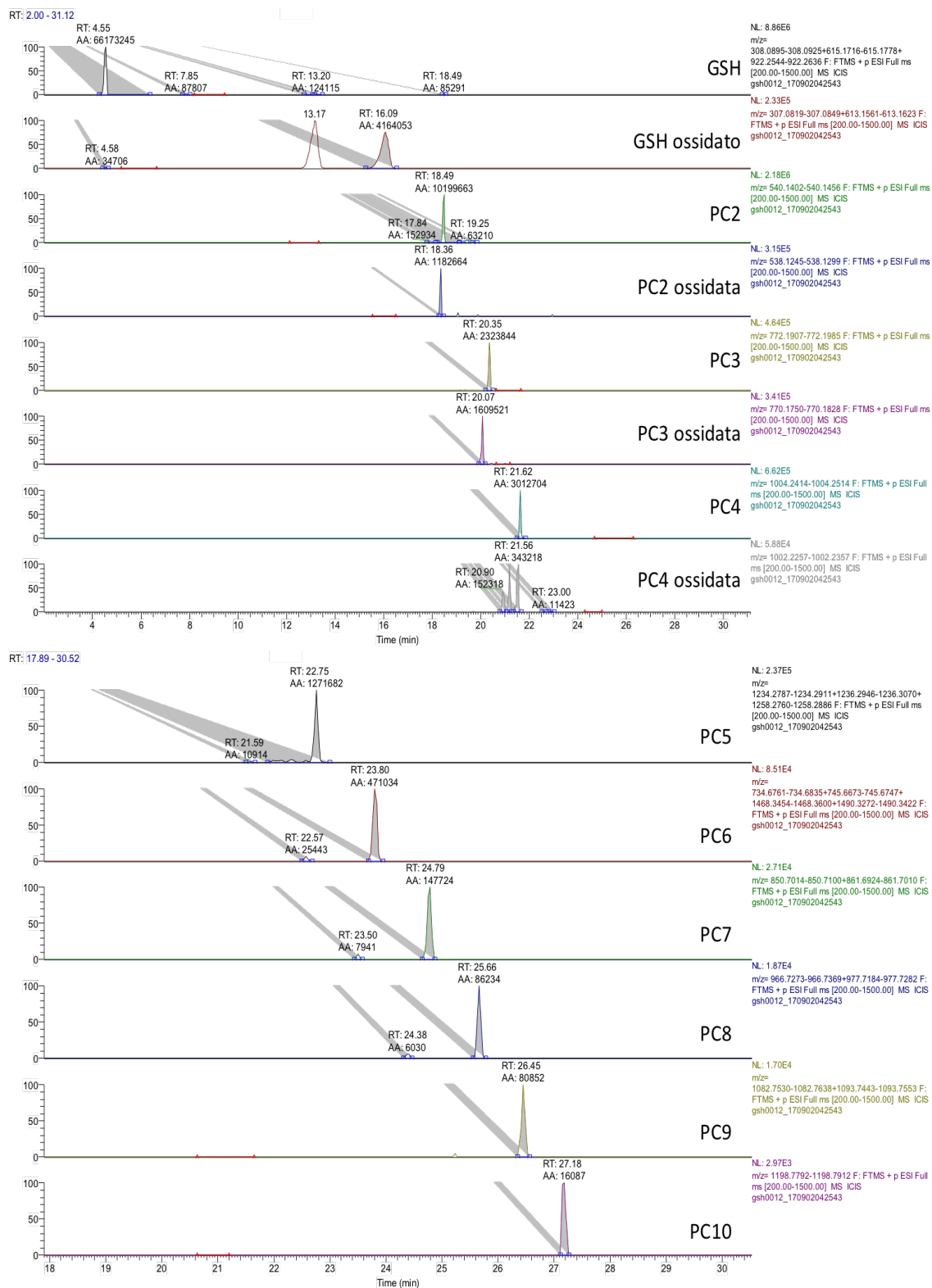
Supplementari 1: Accession number dei singoli putativi unigenes presenti nei diversi trascrittomi di A. donax e identificati come omologhi del tipo PCS-like.



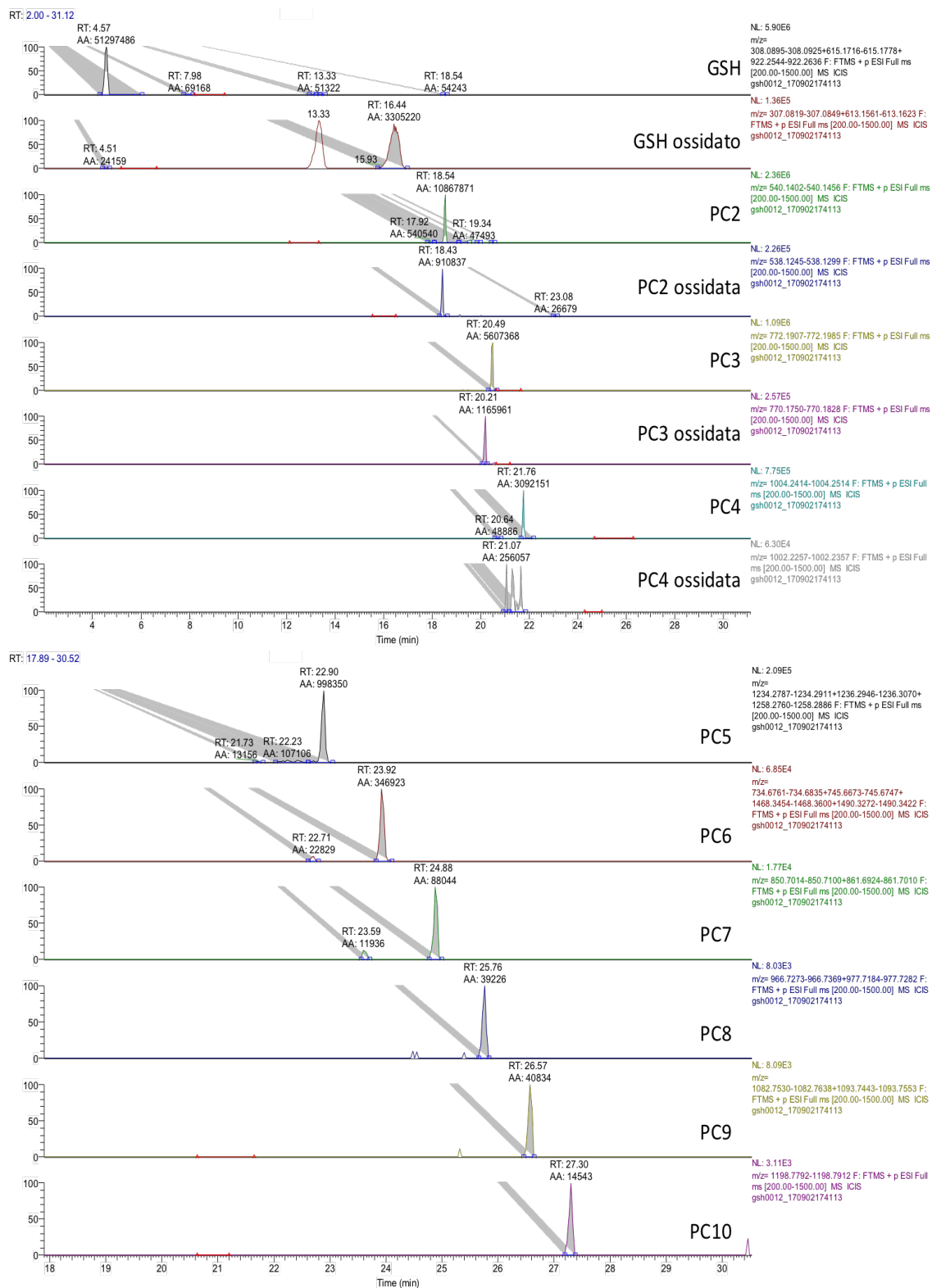
Supplementari 2: Retta di calibrazione del Glutatione. In ascisse sono riportati i dati relativi alle aree cromatografiche del GSH alle concentrazioni di 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 e 5 μM.



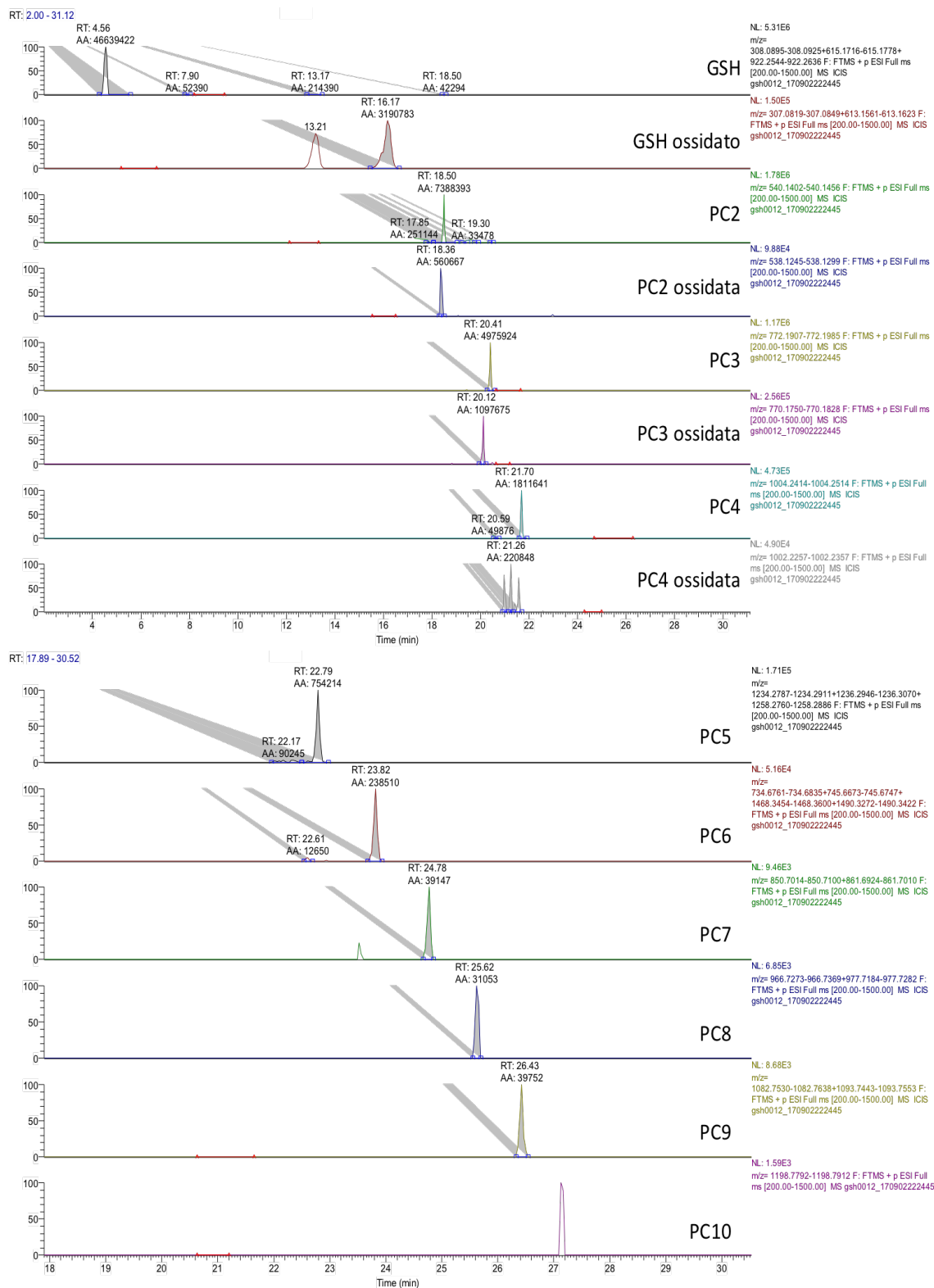
Supplementari 3: Cromatogramma della spettrometria di massa di un controllo negativo (*S. cerevisiae* YK44 trasformato con vettore pYES-DEST52 vuoto).



Supplementari 4: Cromatogramma della spettrometria di massa di una replica AdPCS1 (AdPCS1 inserito in pYES-DEST52).



Supplementari 5: Cromatogramma della spettrometria di massa di una replica AdPCS2 (AdPCS2 inserito in pYES-DEST52).



Supplementari 6: Cromatogramma della spettrometria di massa di una replica AdPCS2 (AdPCS2 inserito in pYES-DEST52).

7. RINGRAZIAMENTI

Voglio ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutato e supportato (per non dire sopportato) durante il percorso di dottorato.

In primis Paola Bellotti, mia amorevole compagna di vita che sa spronarmi e motivarmi anche quando gli ostacoli da superare mi paiono insormontabili. Sei brillante come una fiamma imperitura nell'ora più oscura.

Ovviamente un ringraziamento speciale va alla mia famiglia, che ha sempre cercato di sostenermi in questo difficile percorso e di motivarmi a dare tutto quello che si può dare. Porgo a mia più profonda riconoscenza alla Professoressa Ricci, mia “tutor per caso”, che si è sobbarcata il ruolo quando molti se ne sarebbero lavati le mani.

Un caloroso ringraziamento va ai membri del gruppo di Ecogenomica della Fondazione Mach di San Michele, Claudio Varotto, Mingai Li ed Enrico Barbaro, i quali mi hanno accolto tra le loro fila e aiutato a maturare come giovane scienziato e dato accesso a tutte le risorse di cui avevo bisogno (materiali ed intellettuali).

Un abbraccio speciale va ai ragazzi del laboratorio di Genetica Vegetale dell'Università di Parma, Giorgio, Roberto, Mattia e chi più ne ha più ne metta; siete diventati come un'adorabile e disfunzionale famiglia surrogato e di questo vi sono profondamente grato. Grazie al Professor Restivo per avermi accolto nel suo laboratorio nel momento in cui non avevo una “dimora” in cui andare.

Un ringraziamento a Francesca Degola, la quale mi ha “incastrato” in questo dottorato e poi mi ha aiutato ad uscirne fuori nella maniera migliore possibile, a sconfiggere l'Oscuro Signore e a gettare l'Anello nel Monte Fato (chi ha orecchie per intendere intenda).

Infine un saluto ai miei colleghi della Scuola di Dottorato, a chi ha già finito e a chi ancora deve finire; fatevi forza che se ce l'ho fatta io ce la farete anche voi senza dubbio alcuno.

Siete tutti “infinite e bellissime forme”

Grazie anche a TE, che hai saltato per intero questa tesi di Dottorato per andare a leggere i Ringraziamenti. Fammi il favore di leggere almeno l'Abstract, daaaaaai!