

**L'impatto antropico e il processo riproduttivo
delle spermatofite:
effetti conclamati, evidenze sperimentali e
l'avvento di nuovi (nano)materiali
potenzialmente pericolosi**



**L'impollinazione e la fecondazione sono stadi fondamentali
nel processo riproduttivo delle spermatofite**

Ecologia

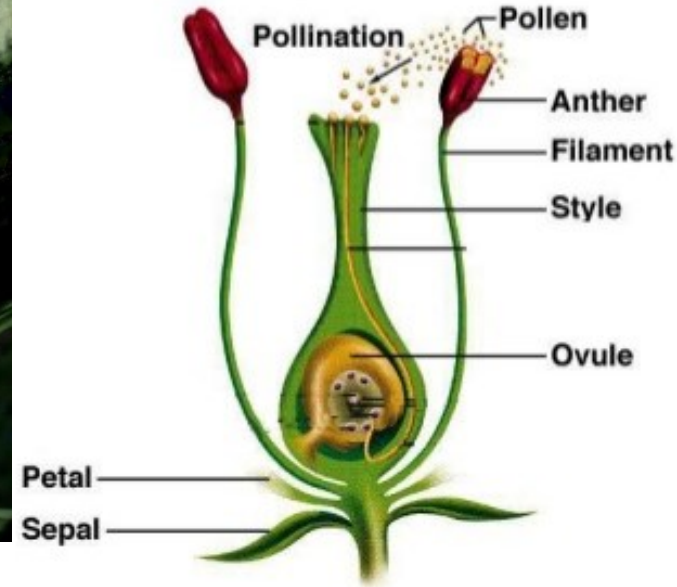


Economia



Una produzione globale di cibo valutata tra 235 e 577 miliardi di dollari dipende dal contributo degli impollinatori (FAO)





Il polline e la fecondazione sono due componenti delicate

♂ Vitalità del polline

- Rh, T, apporto di N, stagione etc.
- Esposizione, apertura del fiore, protezione delle antere, etc.
- Microsporogenesi o dal metabolismo del polline
- ...

♀ Ricettività dello stigma

- Condizioni meteo
- Interazioni morfologiche e chimiche polline-stigma
- Fattori di riconoscimento nelle papille stigmatiche
- ...



...e l'impatto antropico?



**CINA –
declino
impollinatori**



US:

- Dal 1945 al 2005, il numero delle colonie gestite dagli allevatori del versante pacifico è diminuita da 6,000,000 a meno di 3,000,000.



UK:

- Il Bombo di Cullem (*Bombus cullumanus*), è stato registrato l'ultima volta nel 1941.
- Il Bombo a pelo corto (*Bombus subterraneus*), nel 1988.



IT - FVG:

- Nel 2015, calo del 30- 40% del numero delle api nei 36.000 alveari presenti in regione
- Picchi di moria anche del 70%!



Effetti sulla vitalità del granulo pollinico



Traffico da autoveicoli può influenzare:


- Vitalità (*Pinus nigra* e *Corylus avellana*)
- Germinabilità (*P. nigra*)
- Lunghezza del tubetto pollinico (*P. nigra*)

SO_2

NO_2

NO_x

PM₁₀

 *Journal of Atmospheric Chemistry* **49**: 149–159, 2004.
© 2004 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

149

Pollen Viability for Air Pollution Bio-Monitoring

ELENA GOTTARDINI¹, FABIANA CRISTOFOLINI¹, ELENA PAOLETTI²,
PAOLO LAZZERI³ and GIANCARLO PEPPONI³

¹Istituto Agrario di San Michele all'Adige, Via Mach 2, 38010 S. Michele a/A, Trento, Italy, e-mail: elena.gottardini@ismaa.it

²Istituto Protezione Piante, CNR, Piazzale delle Cascine 28, Firenze, Italy

³Istituto Trentino di Cultura – ITC-Irst, via Sommarive 18, 38050 Povo, Trento, Italy

(Received: 23 April 2004; accepted: 5 May 2004)

PM 10 – Particulate Matter 10

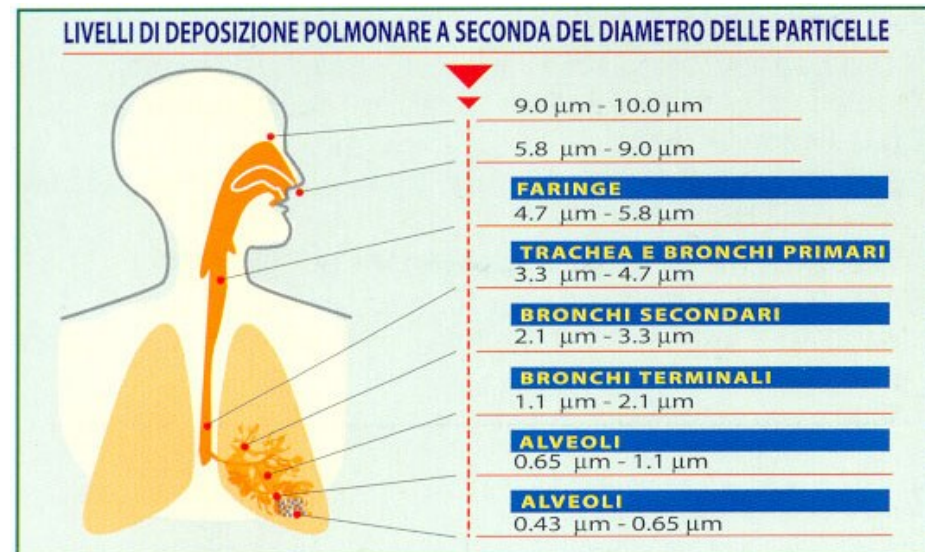
Una delle numerose frazioni in cui viene classificato il particolato sospeso in aria

Il suo *diametro aerodinamico* (ovvero corrispondente al diametro di un'ipotetica sferetta di densità uguale a 1 g/cm^3 ugualmente veicolata dall'aria) è uguale o inferiore a $10 \mu\text{m}$

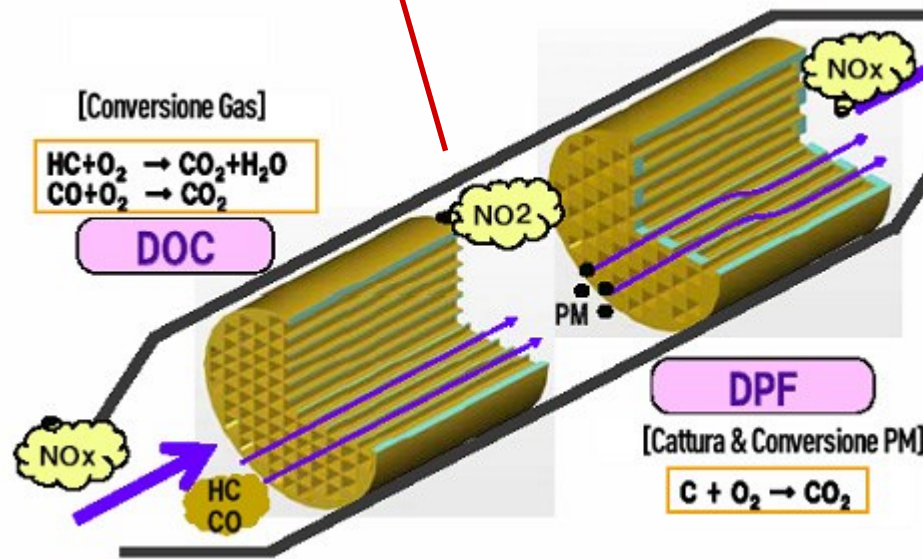
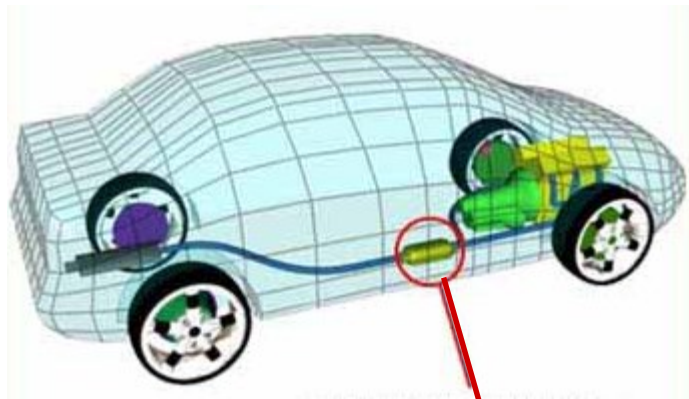
Altre tipologie di particolato veicolato dall'aria:

- PM 2.5 (diam. $< 2.5 \mu\text{m}$)

- **Nanoparticelle**
(dimensioni tra 1 micrometro e 10 nanometri)



Nanoparticelle:



Argento (Ag)

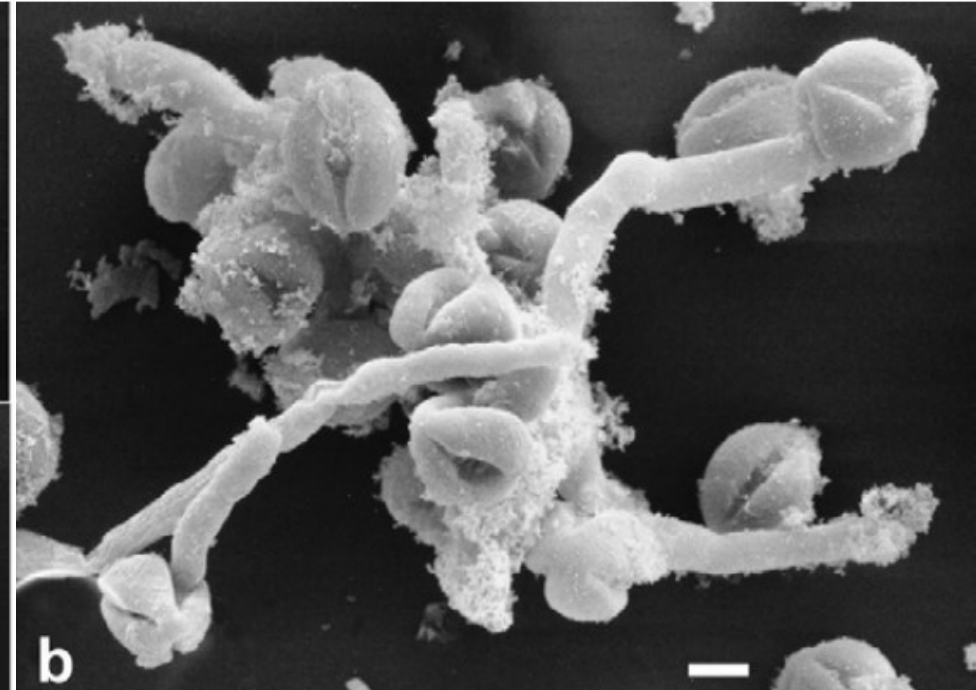
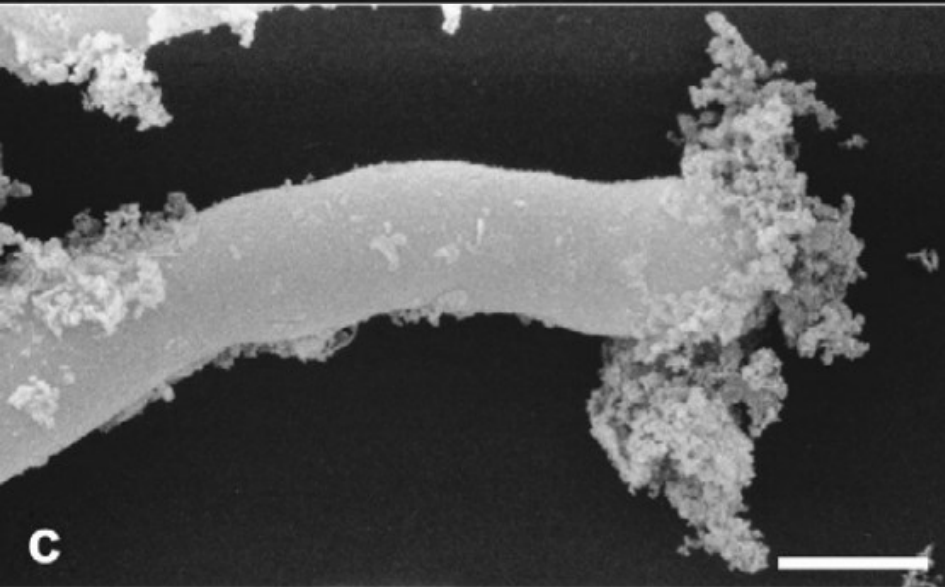
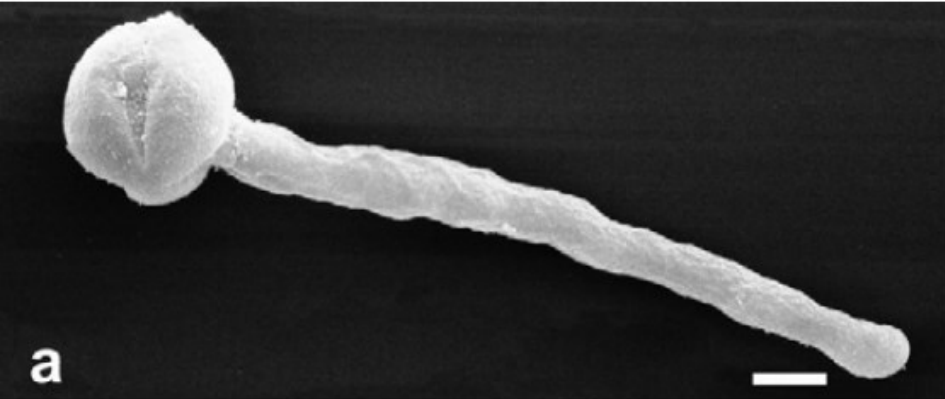
Oro (Au)

Palladio (Pd)

Platino (Pt)

Rhodio (Rh)

Costituenti primari del filtro catalizzatore delle marmitte catalitiche



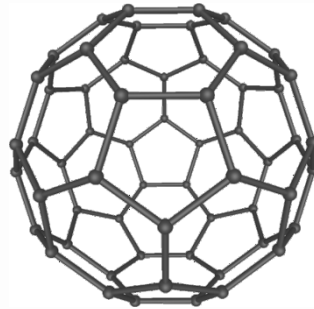
Riduzione del tasso di germinazione dei granuli pollinici (!)

Riduzione dell'allungamento del tubetto pollinico (!)

Esistono numerosi nanomateriali e quelli a base carboniosa (Carbon Based Nanomaterials - CBNs) sono tra i più promettenti

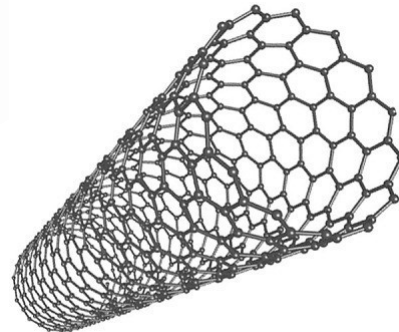


Fullereni



- Scoperti nel 1985
- Costituiti da 60 atomi di C sp^2
- Utilizzati con successo nelle terapie contro l'HIV

Nanotubi di carbonio



- Il momento della loro scoperta è dibattuto (1991)
- Struttura tuboidale formata da 1 o più strati di C sp^2
- Materiale estremamente resistente e conduttivo
- Difficilmente integrabile in altre matrici

Grafene

What is graphene?



“A two-dimensional crystal composed of monolayers of carbon atoms arranged in a honeycombed network with six-membered rings.”

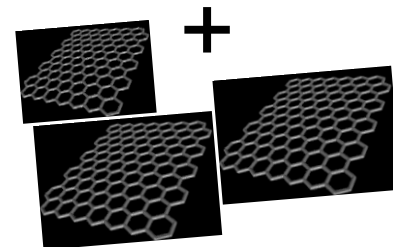
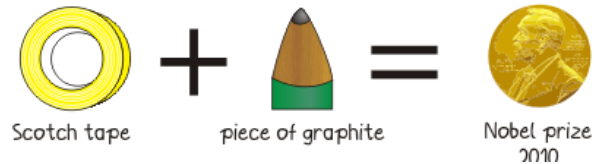
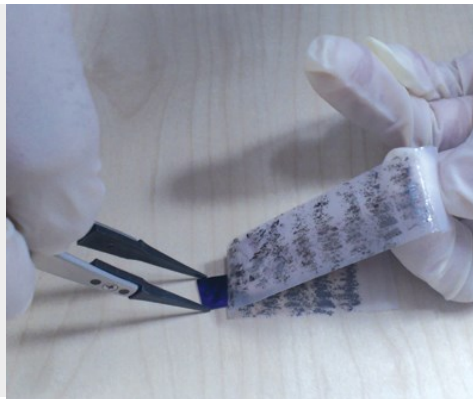
2004 – Estratto il primo foglio monoatomico

Geim, AK (2009) Science. 324: 1530-1534

GRAPHENE
was discovered thanks to **STICKY TAPE!**



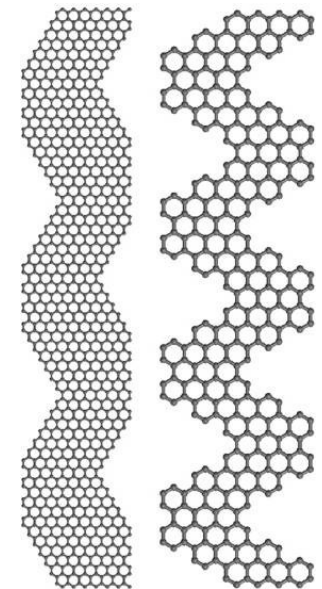
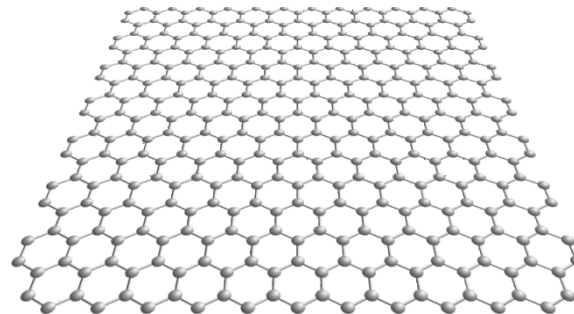
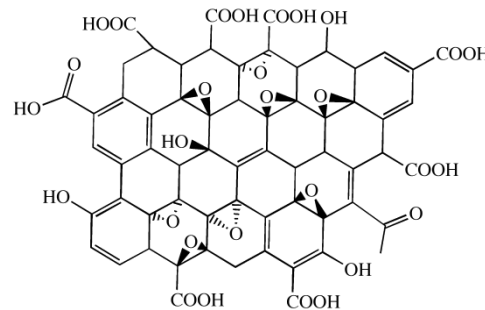
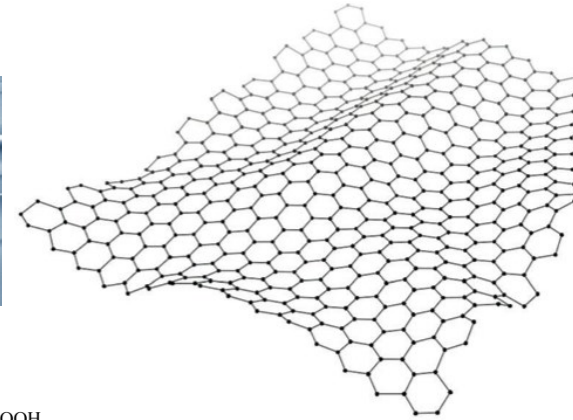
Geim and Novoselov used tape to pull a single layer of graphite free—a technique known as **mechanical exfoliation**—and ended up with graphene.









La famiglia dei materiali a base di grafene (GBMs) è numerosa

- GO: Graphene Oxide
- rGO: reduced Graphene Oxide
- Graphene nanoribbons
- Graphene nanosheets
- GQD: Graphene quantum dots
- ...

Lo stato di ossido/riduzione del grafene e i suoi gruppi funzionali determinano diversi gradi di reattività del materiale con ciò che lo circonda



Proprietà superlative del grafene

- L'oggetto più leggero mai prodotto 
- Più resistente dell'acciaio 
- Il materiale più duro 
- E' il cristallo più flessibile 
- Miglior conduttività termica
- Conduce elettricità al limite di assenza di elettroni 
- Più elevata densità di corrente a T ambiente
- Il materiale trasparente più sottile 

Applicazioni

- Aerospaziale 
- Automobilistica 
- Elettronica 
- Stoccaggio energia 
- Solare 
- Sensoristica 
- Estrattiva 
- Comunicazioni 

**11 anni fa l'EU decise di investire
1 mld di euro in 10 anni**



GRAPHENE FLAGSHIP

Secondo progetto di ricerca europeo più grande di sempre

Coinvolte 264 istituzioni tra aziende private e atenei

Work Package 4 – Health and Environment



**Viene integrato sempre più spesso
costituiscono oggetti di uso comune**



- Inchiostri per circuiterie indossabili
- Rivestimenti
- Fibre
- Strumenti per il filtraggio dell'aria

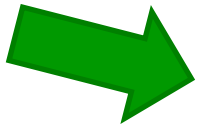


Aumento della dispersione in aria del grafene



A fast survey on the most recent results in our ecotoxicological studies concerning GRMs will be given, with special emphasis on one of three topics:

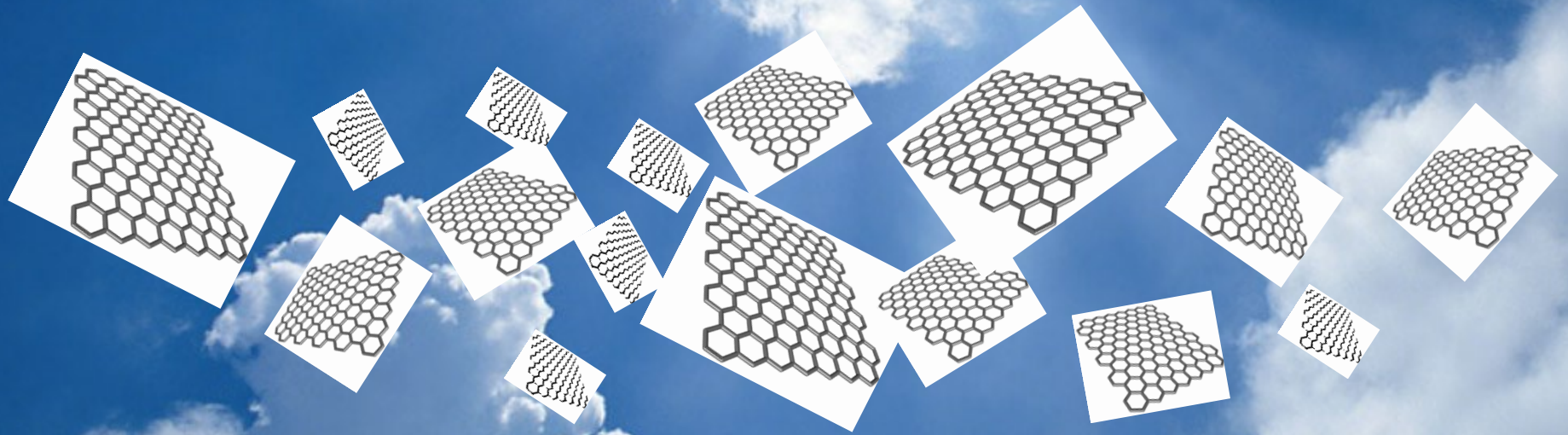
(i) applicability of standard test guidelines for the assessment of environmental safety;



(ii) GRMs & the sexual reproduction of seed plants;

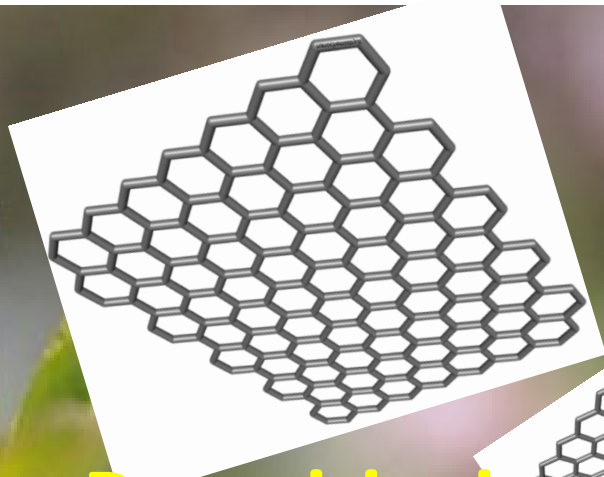
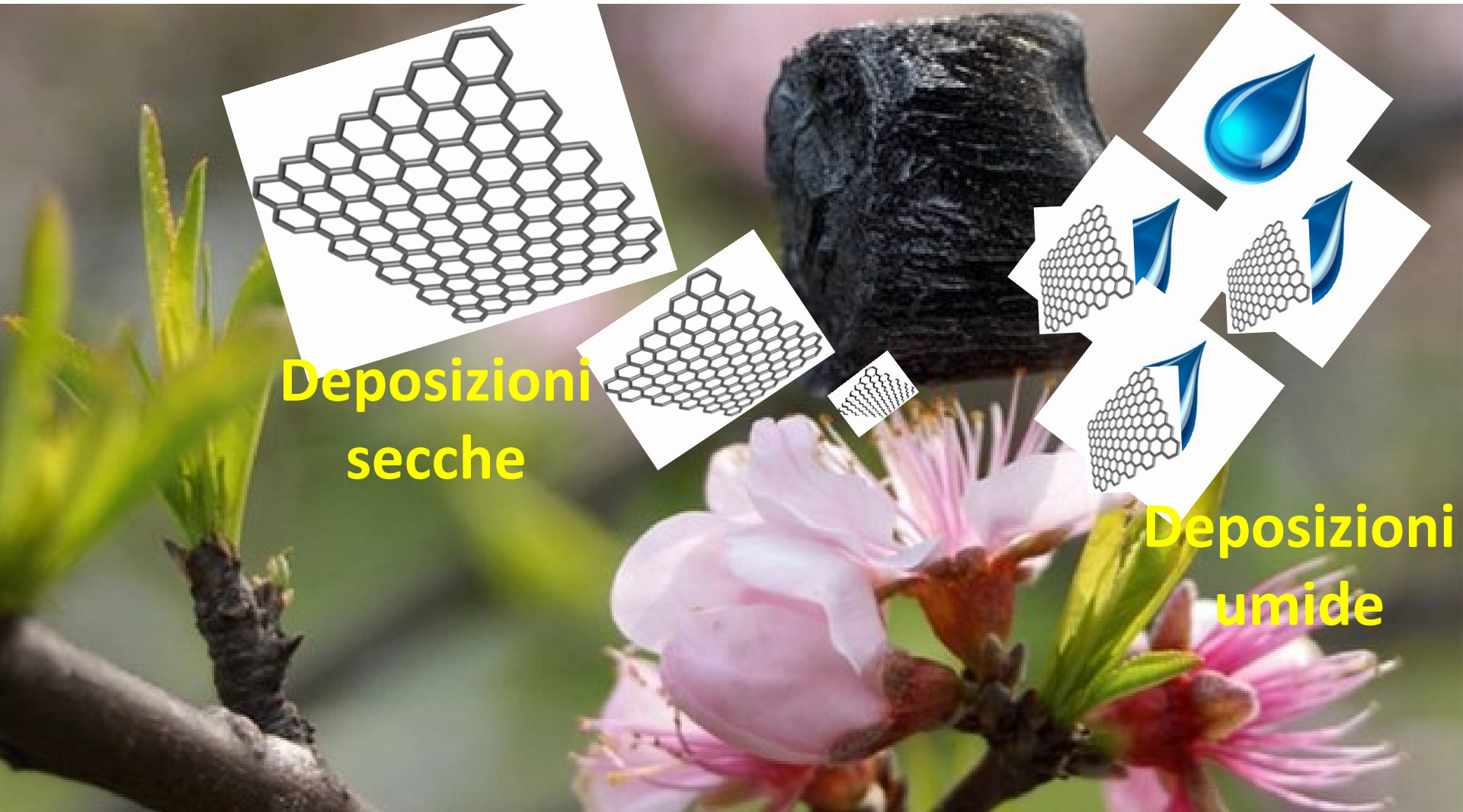
(iii) GRMs degradation by fungi.

Particolato e nanoparticelle possono rimanere sospesi in aria per lungo tempo ed essere così trasportati per lunghe distanze



Il tempo di permanenza del particolato in atmosfera è strettamente dipendente dalle sue dimensioni

Il grafene può interagire con il processo riproduttivo delle spermatofite?



**Deposizioni
secche**



**Deposizioni
umide**



- **Obiettivo:** verificare potenziali effetti negativi dei materiali a base di grafene sulle performance dei pollini, i.e. la germinabilità e l'allungamento del tubetto pollinico.



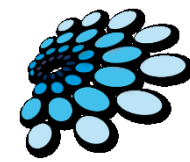
✓ Entomofila: *Nicotiana tabacum* L.



✓ Anemofil.



- ✓ Il polline è stato esposto a “few layers graphene” (**FLG**), “graphene oxide” (**GO**) o “reduced **GO**” (**rGO**) a concentrazioni da **0** (controllo) a **100** $\mu\text{g mL}^{-1}$



Esperimenti *In vitro* sul polline di *Corylus avellana* (Nocciolo)

- Prima degli esperimenti il polline è stato reidratato 3 h a 90% di umidità relativa
- La germinazione del polline è stata indotta per **2** ore in *N. tabacum* e **5.5** ore in *C. avellana* in un terreno di germinazione standard [Brewbaker and Kwack Medium (BK)] con **saccarosio** o **PEG** (controllo) o in BK arricchito con **GBMs** a concentrazioni da **1** a **100 $\mu\text{g mL}^{-1}$**
- L'esperimento è stato ripetuto **tre volte**



Esperimenti *In vitro* sul polline di *N. tabacum* e *Corylus avellana*

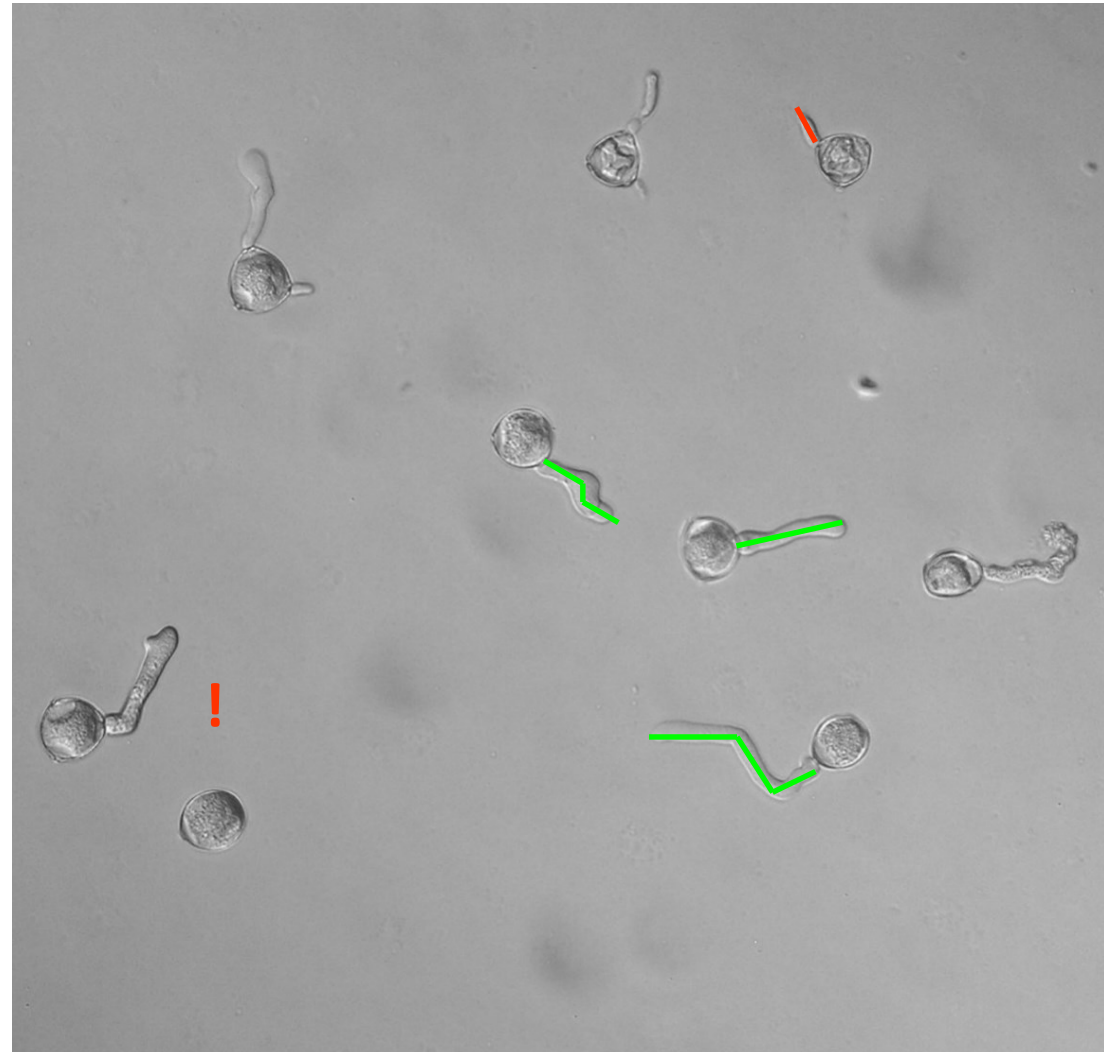
Misure:

- Percentuali di germinazione (n=150)



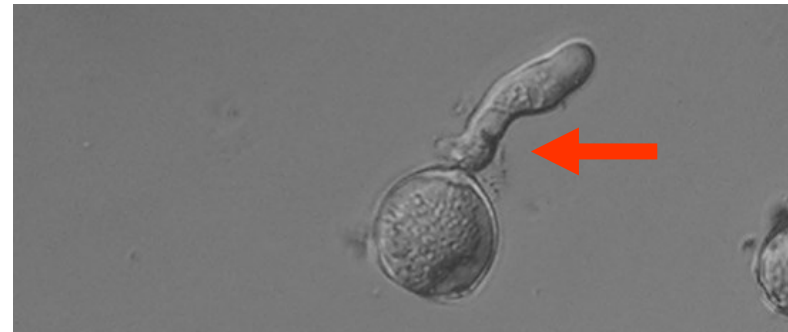
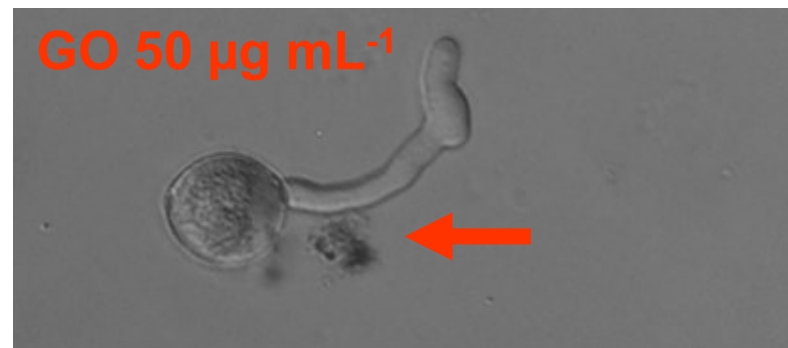
Polline germinato =
tubetto pollinico >
diametro del polline

- Lunghezza del tubetto pollinico dei primi 100 granuli pollinici germinati
- Misure di pH intracellulare lungo il tubetto pollinico





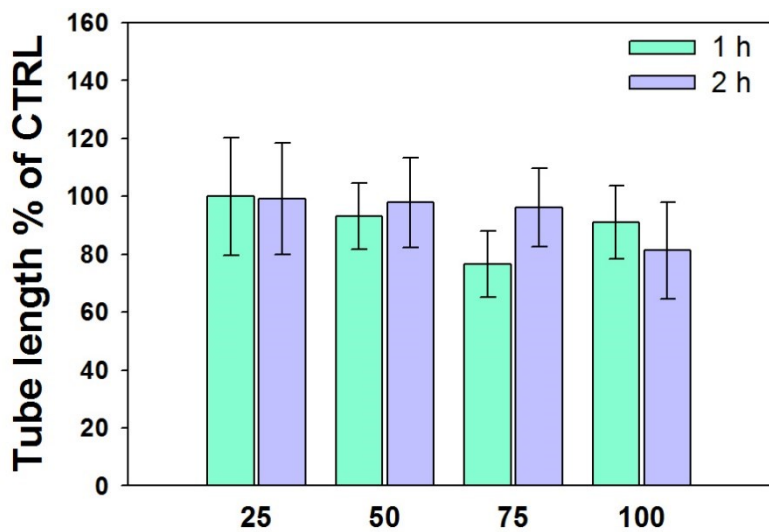
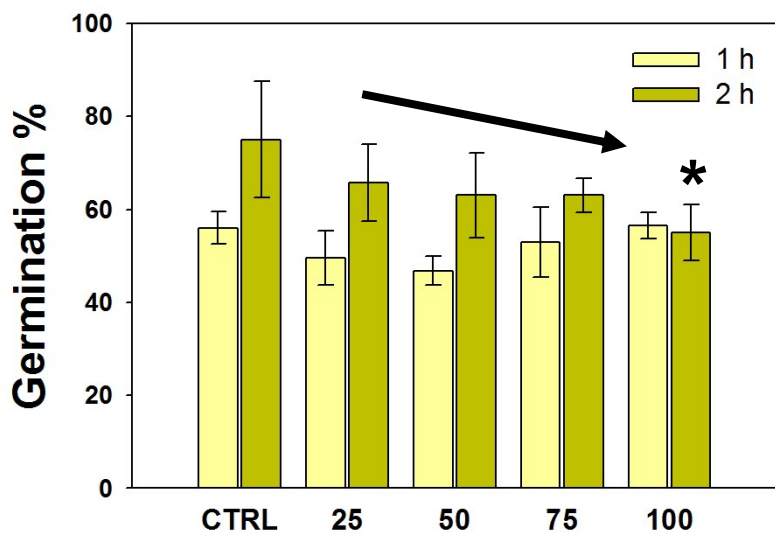
Risultati esposizione al GO



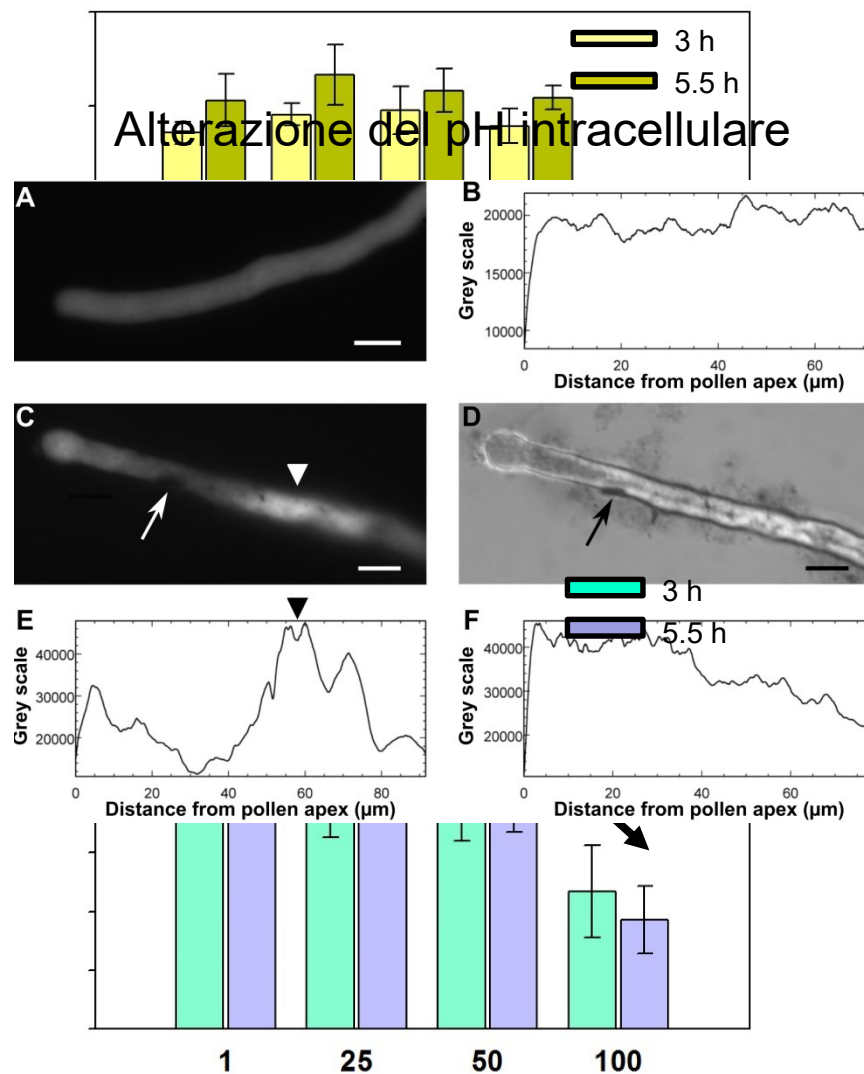


GO

N. tabacum



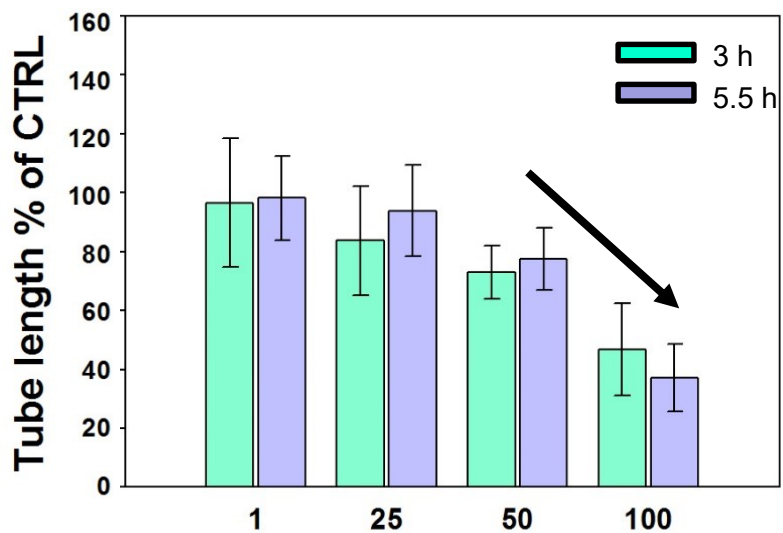
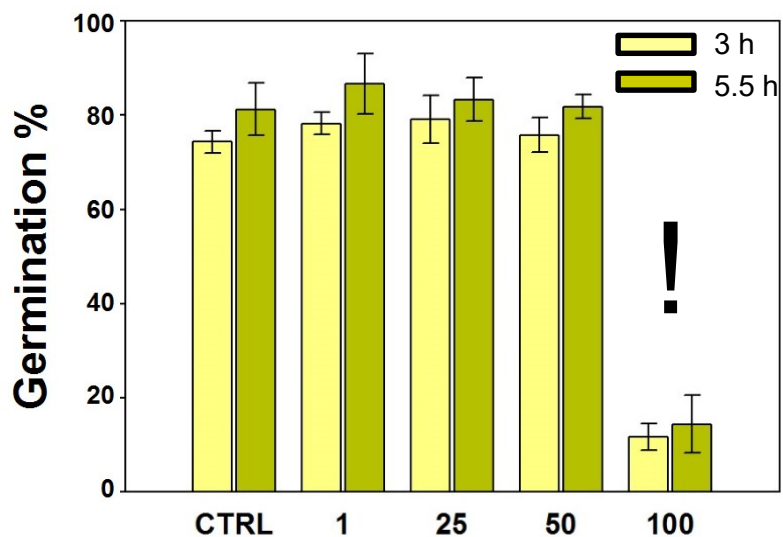
C. avellana





GO

C. avellana



	pH
BK _{suc}	6.36 ± 0.10
BK _{PEG}	6.91 ± 0.02
BK _{GO}	6.85 ± 0.02

Environmental
Science
Nano



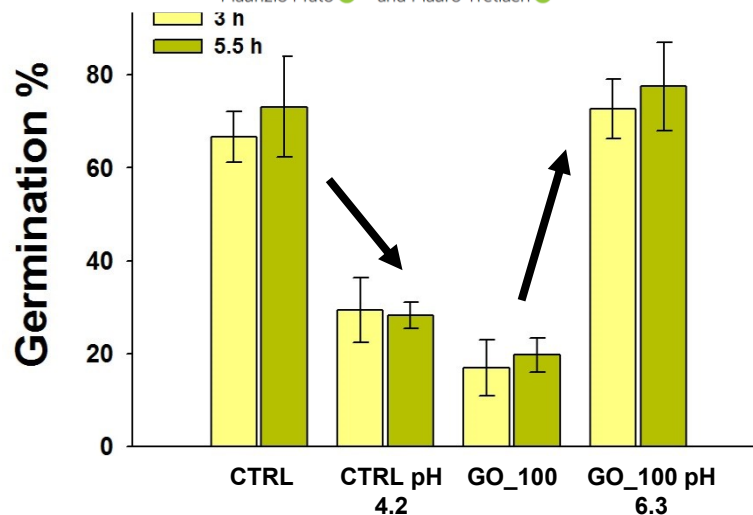
PAPER



Cite this: *Environ. Sci.: Nano*, 2018, 5, 1608

Graphene oxide impairs the pollen performance of *Nicotiana tabacum* and *Corylus avellana* suggesting potential negative effects on the sexual reproduction of seed plants†

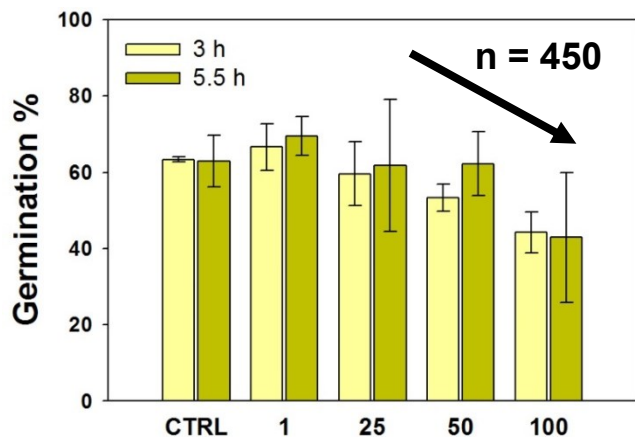
Fabio Candotto Carniel,^a Davide Gorelli,^b Emmanuel Flahaut,^c Lorenzo Fortuna,^a Cecilia Del Casino,^b Giampiero Cai,^b Massimo Nepi,^b Maurizio Prato,^{d,e} and Mauro Tretiach^a



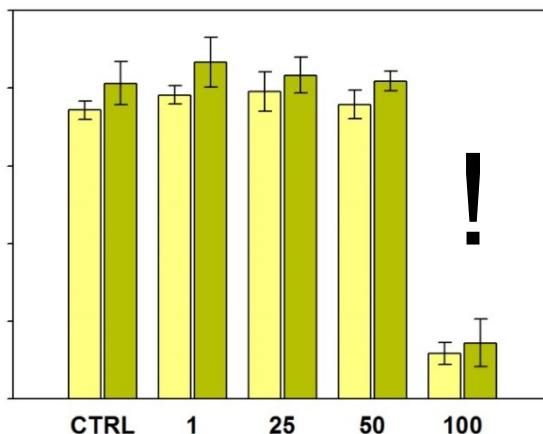


C. avellana

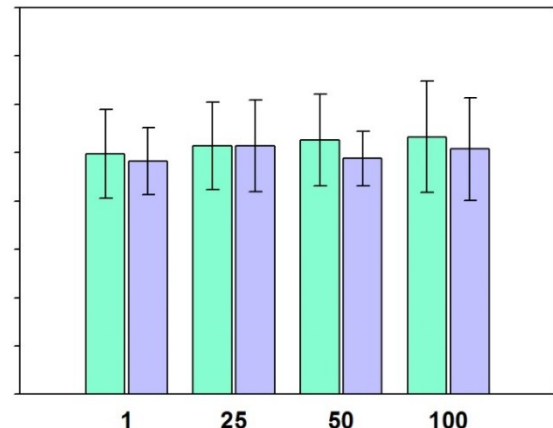
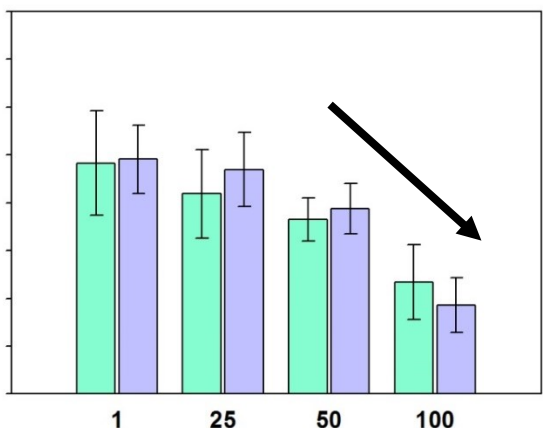
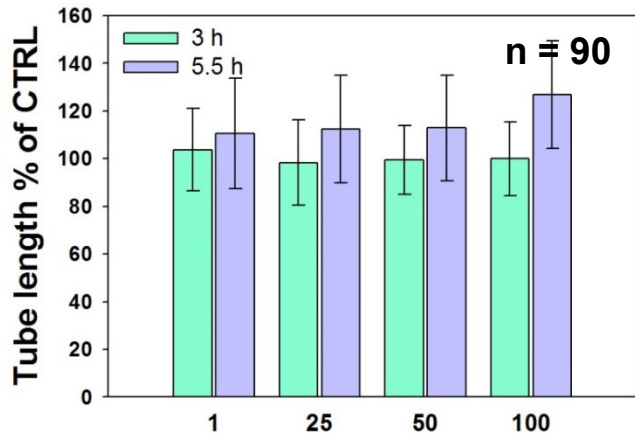
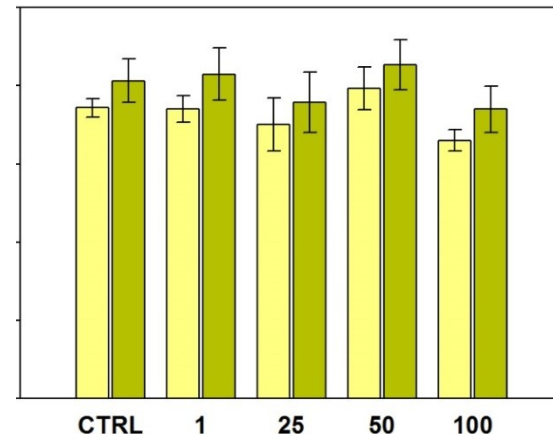
FLG



GO



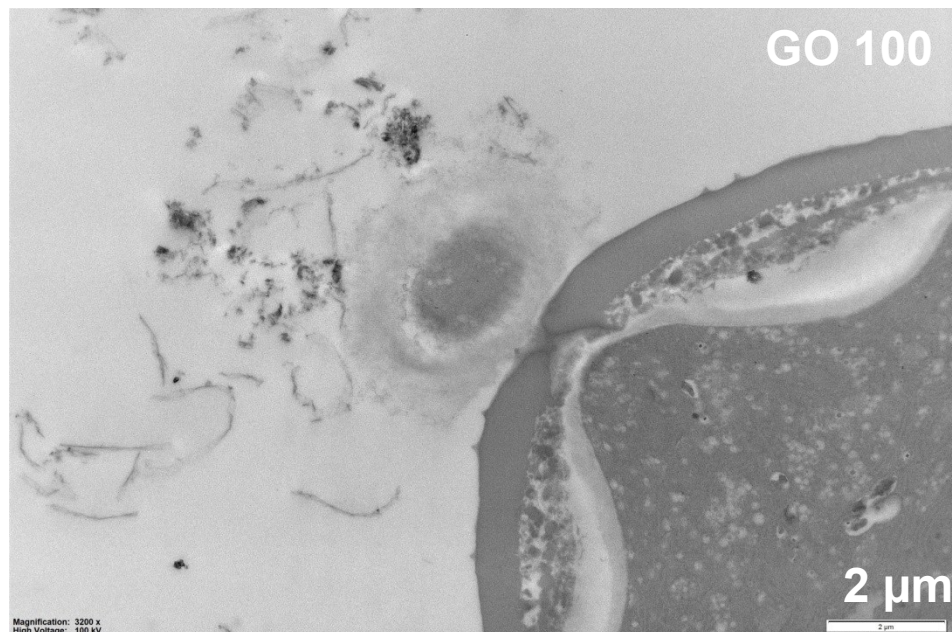
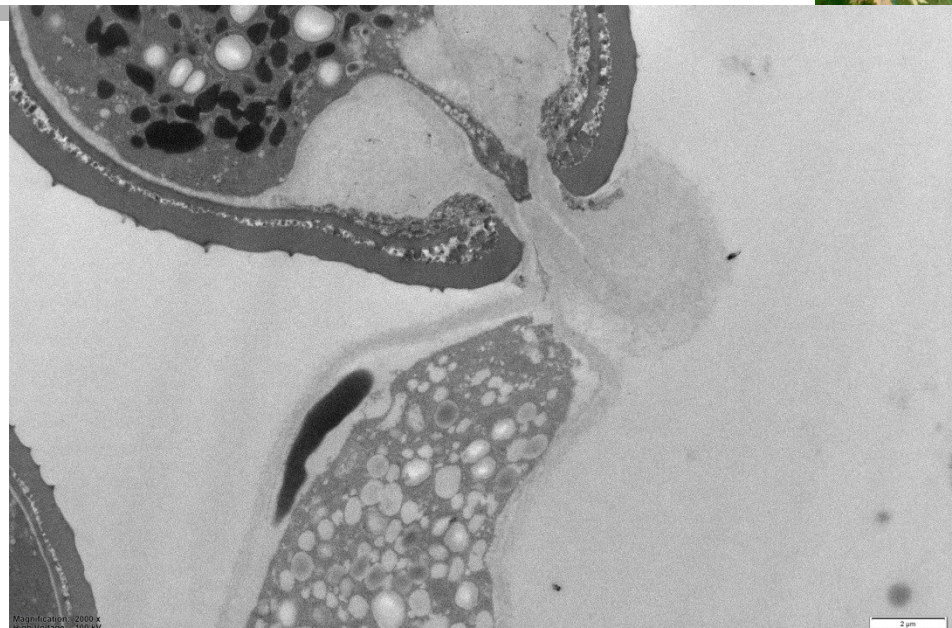
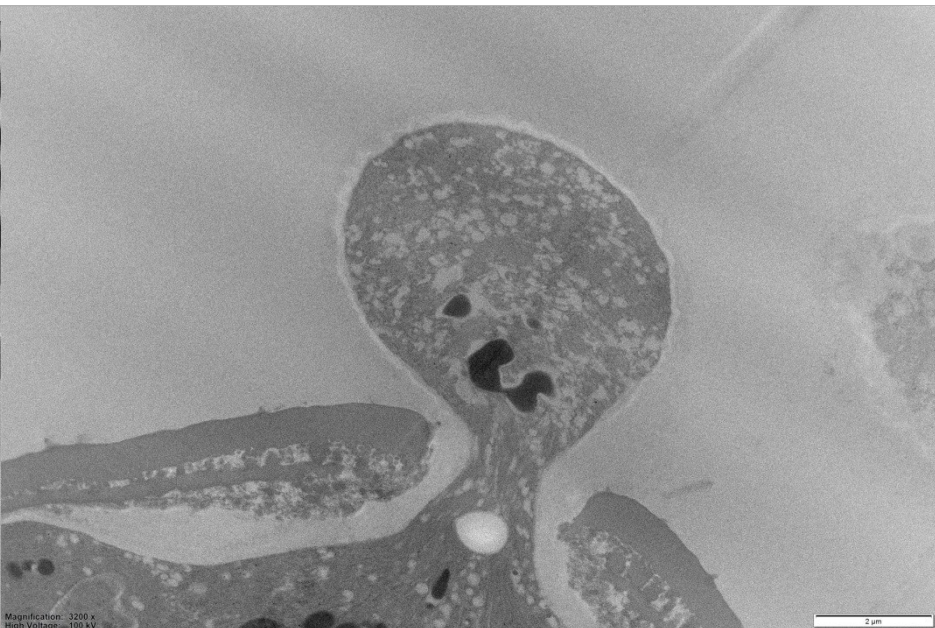
rGO





Per capire gli effetti “minori” dei GBMs...

1. Analisi al microscopio elettronico a trasmissione dell'**effetto dei GBMs** sulla **morfologia del poro di germinazione** del tubetto pollinico

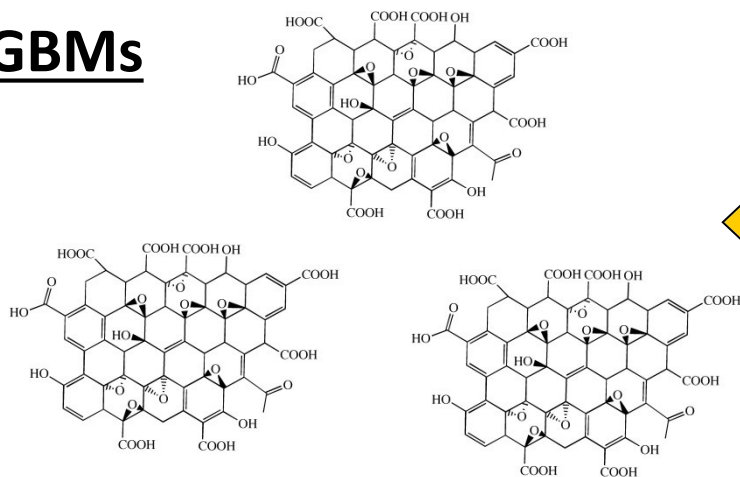




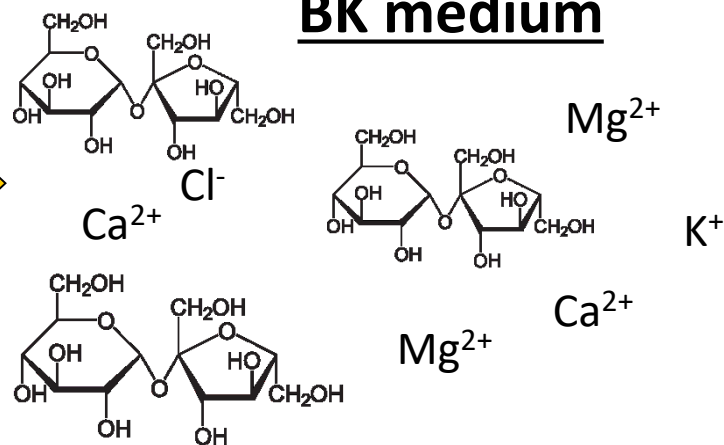
Per capire gli effetti “minori” dei GBMs...

2. Analisi della capacità di adsorbimento cationico (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) dei GBMs dal terreno di germinazione:

GBMs



BK medium



BK (CTRL)

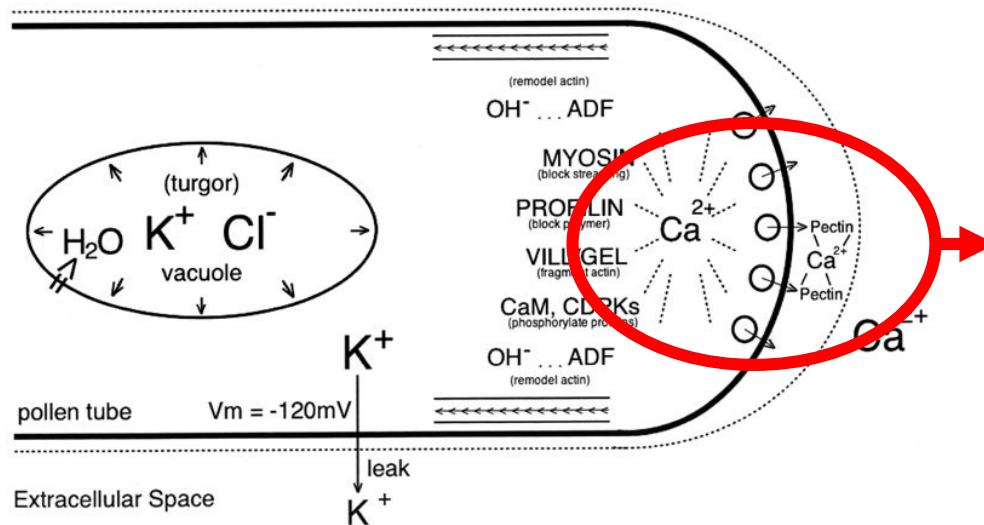
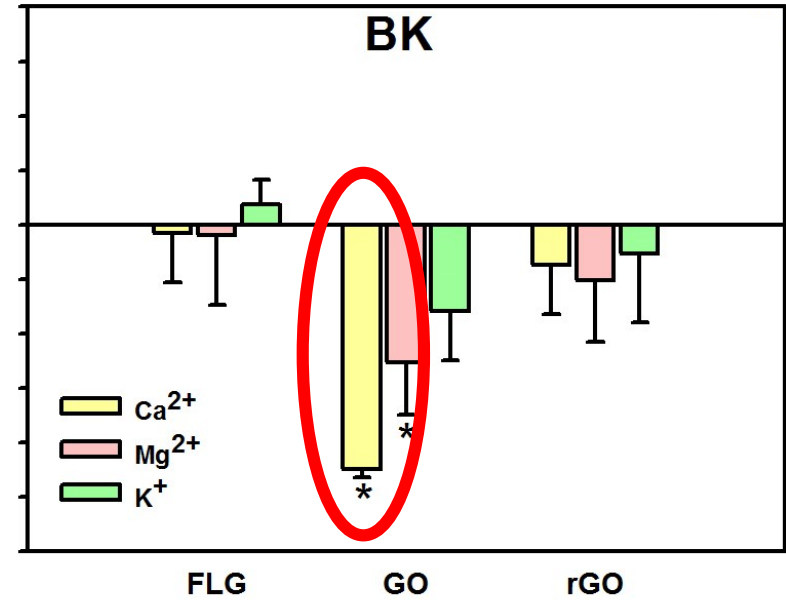
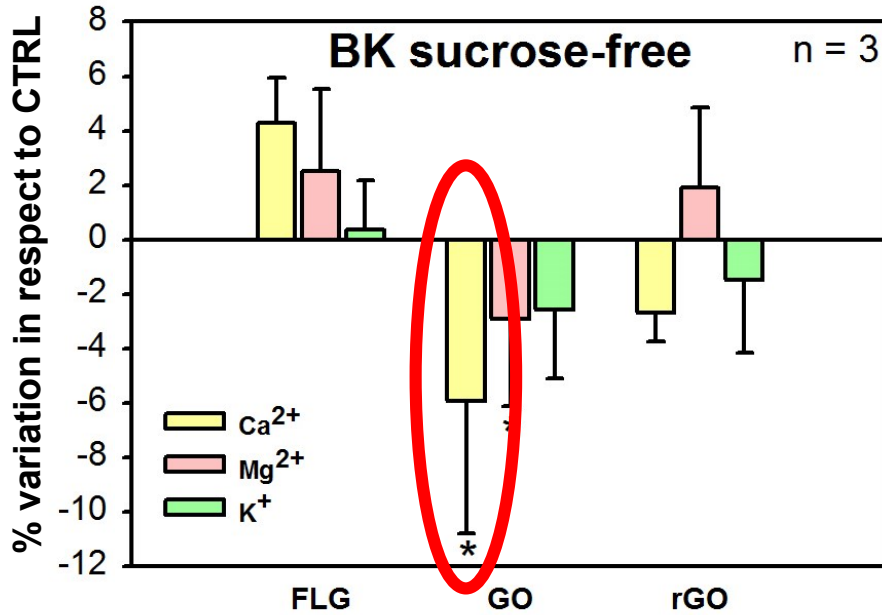
BK + GBMs ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$)



**Con o senza
saccarosio**



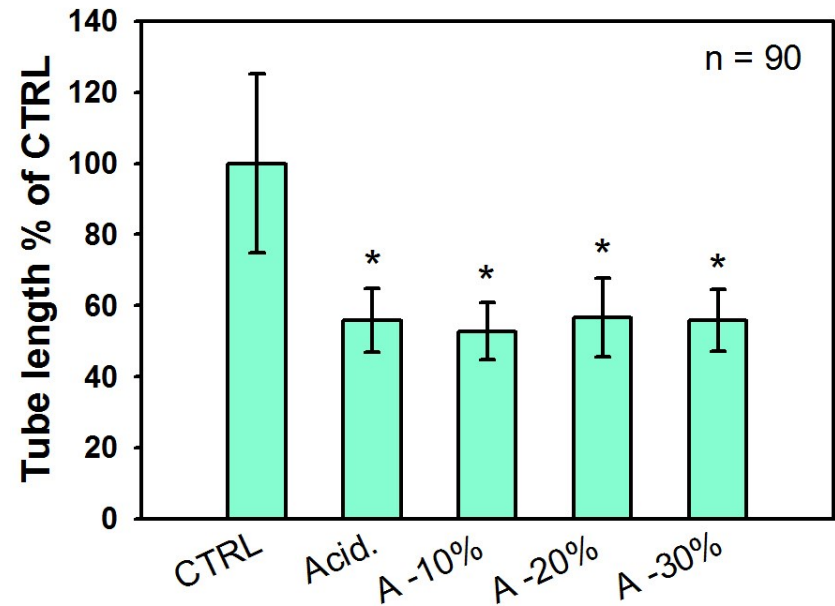
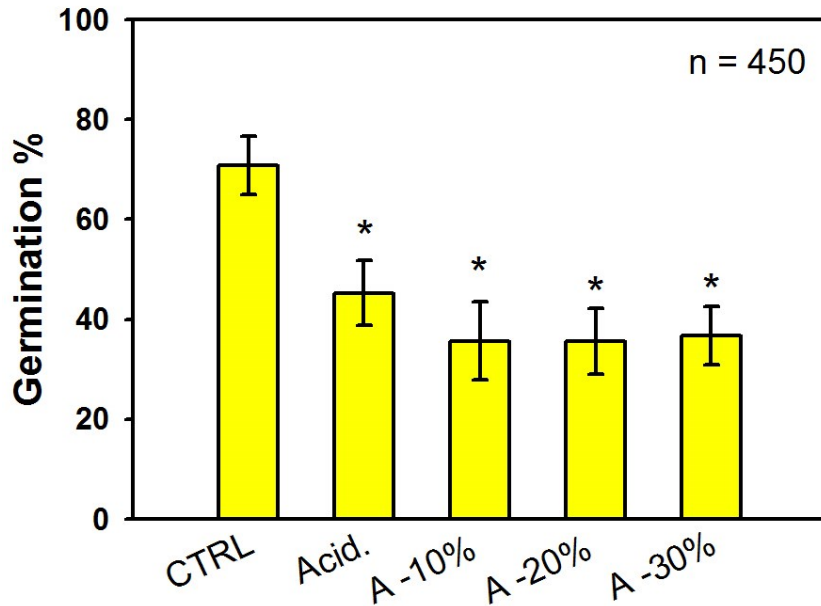
**Analisi elementare,
spettrometria di
massa**



Ca²⁺ is important for pollen germination, particularly for pollen tube elongation



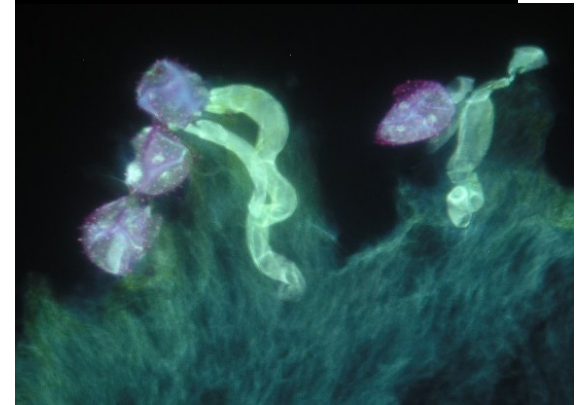
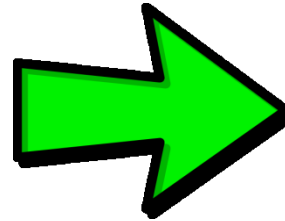
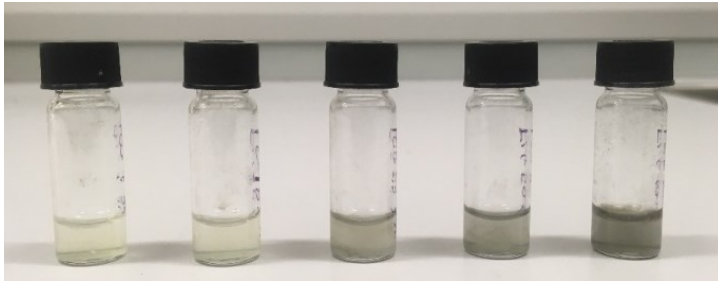
Effetto sinergico dovuto al decremento di pH e Ca^{2+} ?



Nessun effetto sinergico, il fattore più importante che altera le performance dei pollini è l'abbassamento di pH determinato dal grafene ossido.



II stage: from an in vitro to an in vivo approach





II stage: in vivo approach with entomophilous species



***Cucurbita pepo* L.**
(courgette, zucchini, marrow)

✓ Monoecious

Male flower ♂



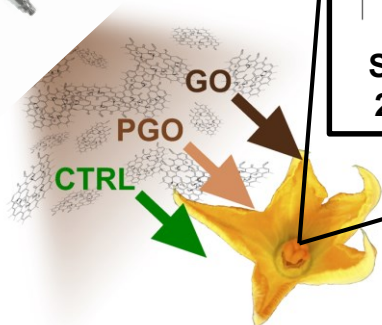
Female flower ♀



✓ Big flowers easy to handle

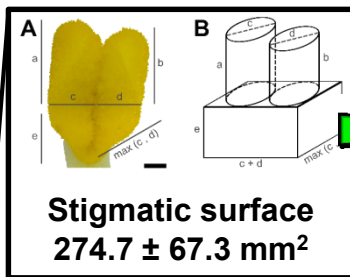
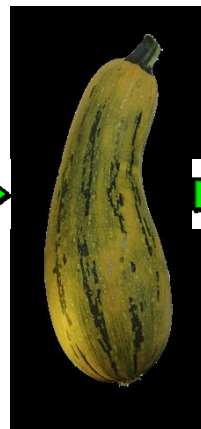
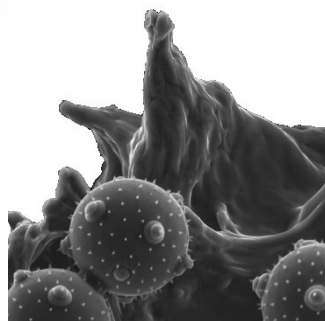
✓ High-yielding

✓ Very well known species in pollination biology



Cucurbita pepo L. flower

Pollen-stigma interactions



Values of PM depositions from literature

Environ Monit Assess (2009) 154:451–458
DOI 10.1007/s10661-008-0411-6

An assessment of heavy metals contributed by industry in urban atmosphere from Nanjing, China

Hui Zhang

~7 ng m⁻²

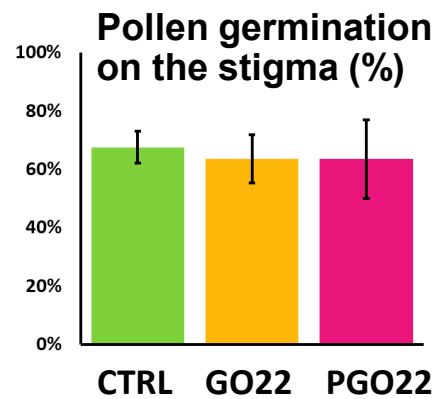
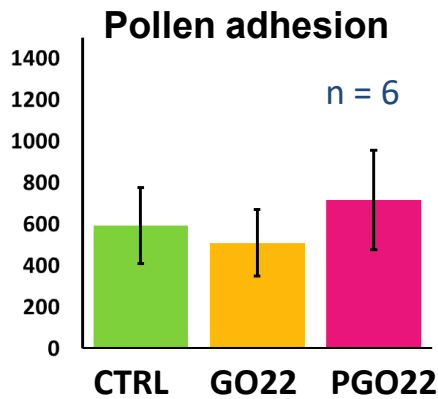
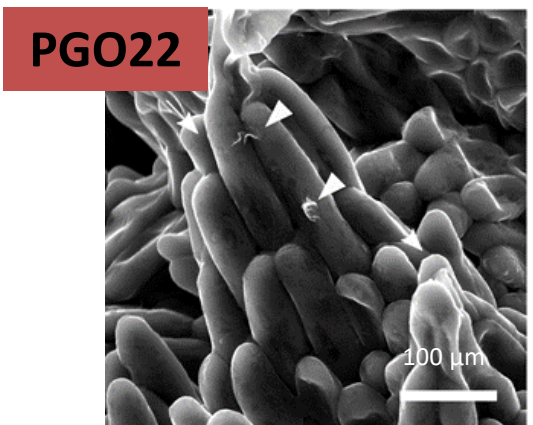
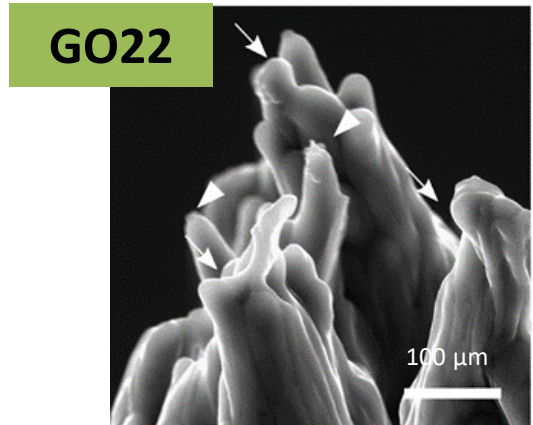
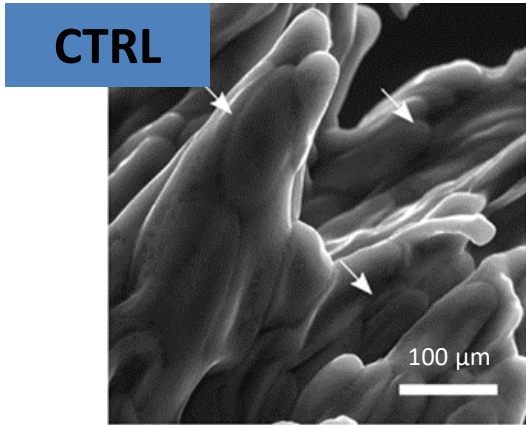
GO purified from production residues (pGO)

GO and pGO

- 0 ng m⁻² (CTRL)
- 5.5 ng m⁻² (GO5.5)
- 11 ng m⁻² (GO11)
- 22 ng m⁻² (GO22)
- 22 ng m⁻² (PGO22)

Morphometric analysis of fruit and seeds





No effect on pollen-stigma interaction

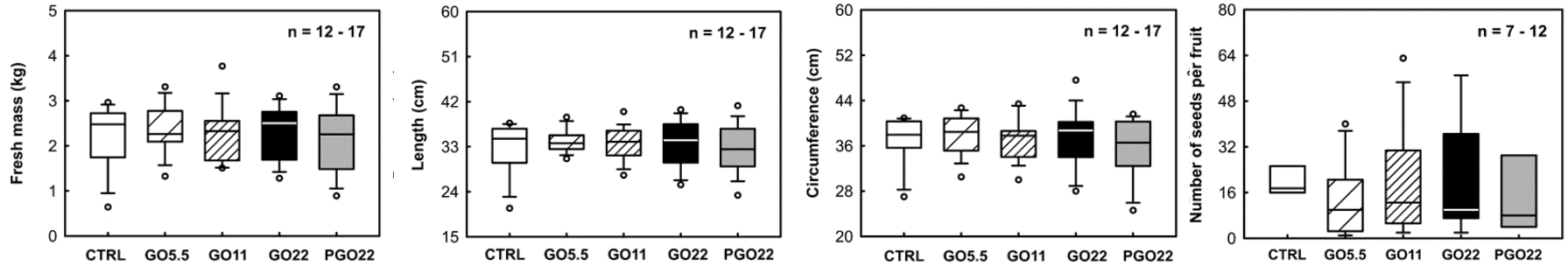


Effect at a later reproduction step

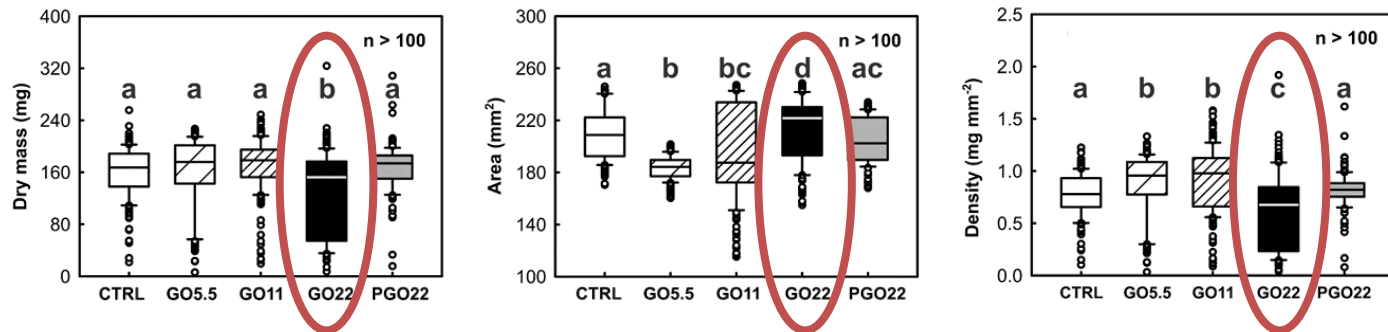


II stage: *in vivo* approach with entomophilous species

Fruits characterisation



Seeds characterisation



Only seed dimensions affected by GO22 (not by PGO22)



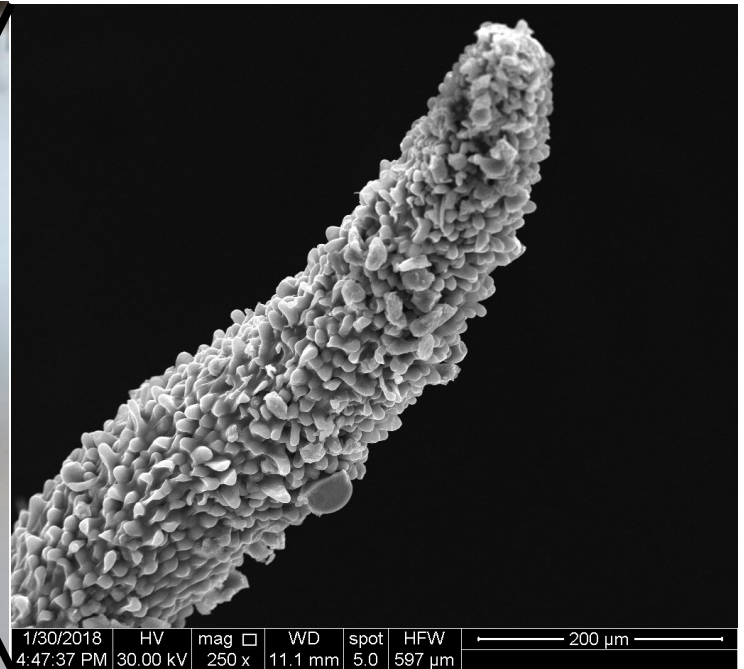
- In *C. pepo* the pollen-stigma system is not affected
- Only seed dimensions were reduced at 22 ng mm⁻² of GO
- pGO did not affect the reproduction of *C. pepo*
- Difference in the chemical composition of GO and pGO
- 11 ng mm⁻² of GO is safe for *C. pepo*



III stage: in vivo approach with wind-pollinated species

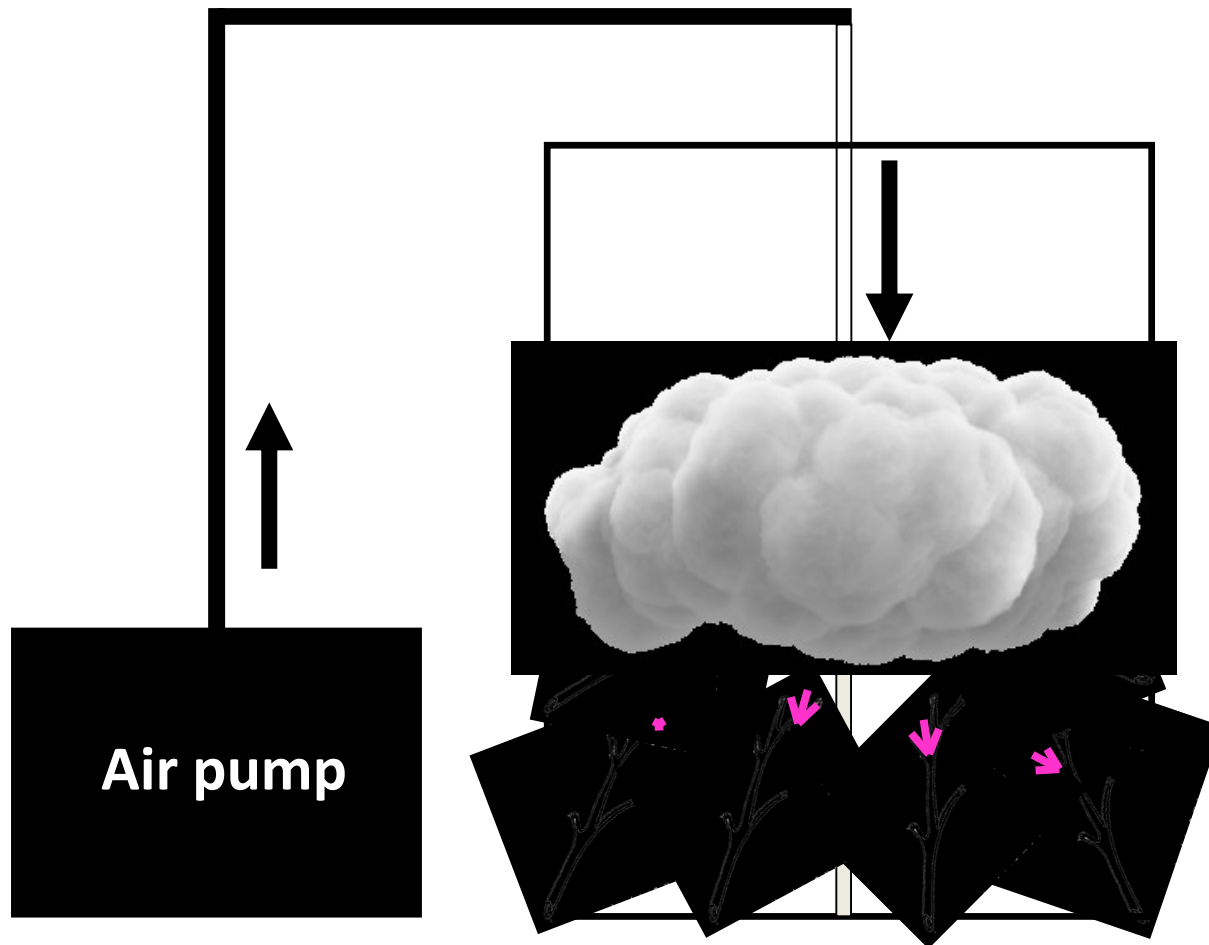
Le superfici stigmatiche sono in grado di intercettare e trattenere foglietti o aggregati di grafene ?

C. avellana L.





Sviluppo di una camera per aero-disperdere GBMs



Primi test condotti
su fiori femminili di
C. avellana

+

Grafene ossido
disidratato

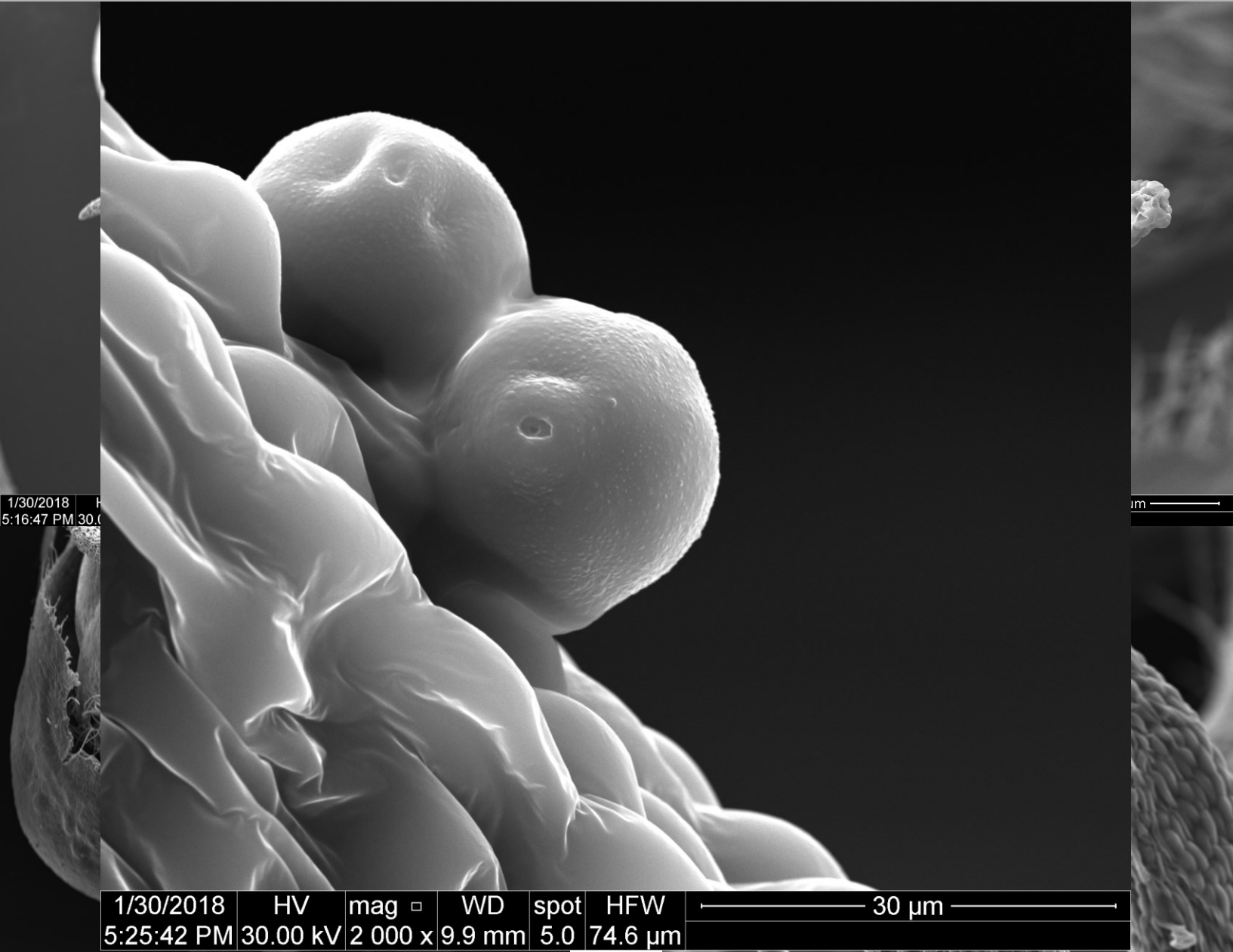
↓

Analisi al SEM



Controllo

+ polline

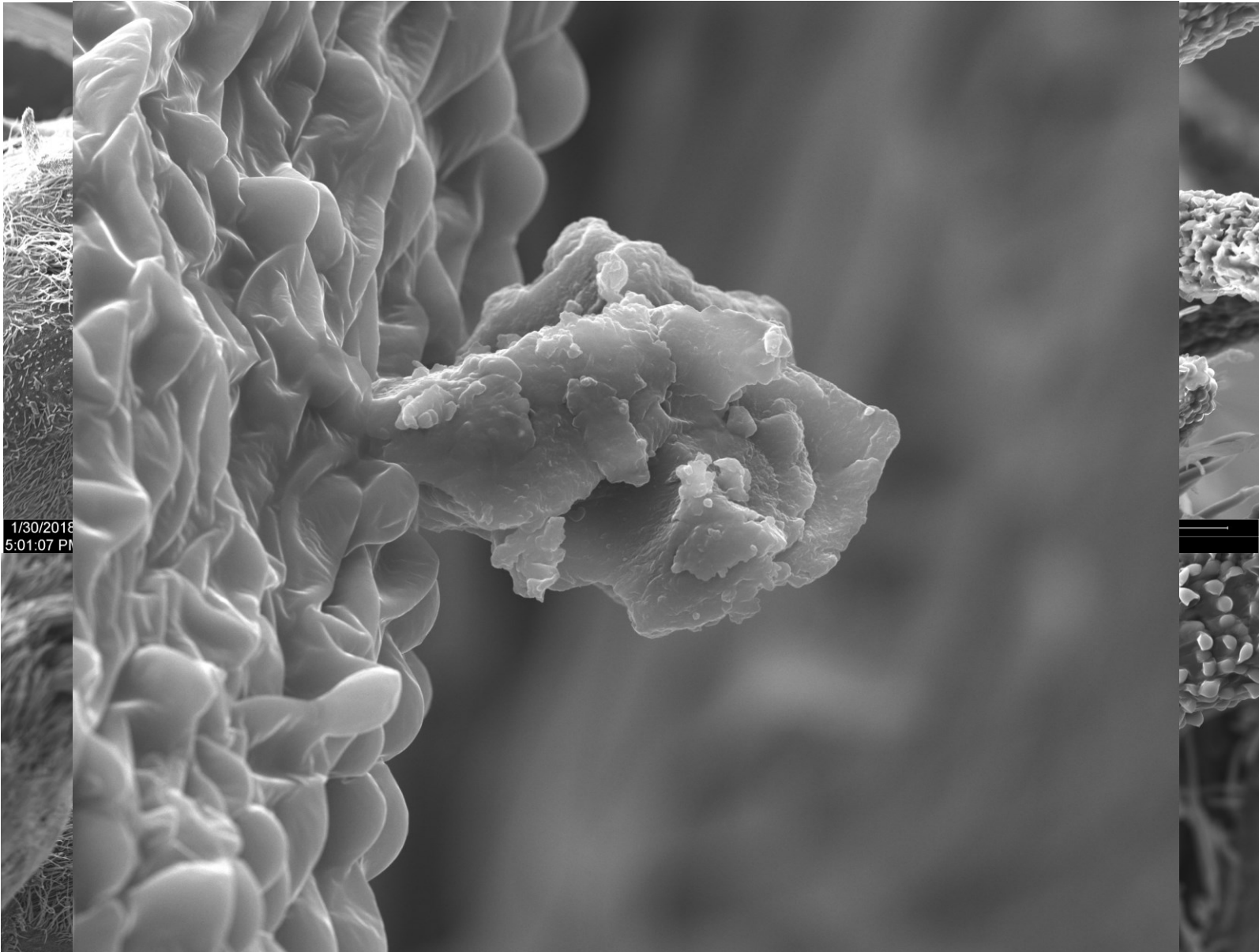


1/30/2018 5:16:47 PM 30.0

1/30/2018	HV	mag □	WD	spot	HFW	30 μm
5:25:42 PM	30.00 kV	2 000 x	9.9 mm	5.0	74.6 μm	



+ grafene ossido



1/30/2018	HV	mag □	WD	spot	HFV	50 μm
5:09:44 PM	30.00 kV	1 000 x	10.2 mm	5.0	149 μm	



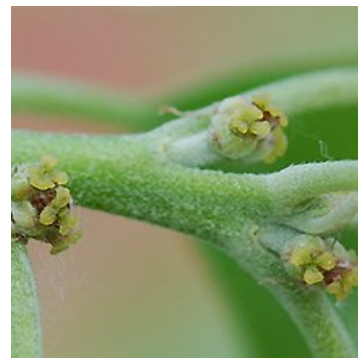
Dicots



Corylus avellana L.
(common hazel)



Juglans regia L.
(walnut)



Quercus ilex L.
(holm oak)

Monocot



Zea mays L.
(corn)

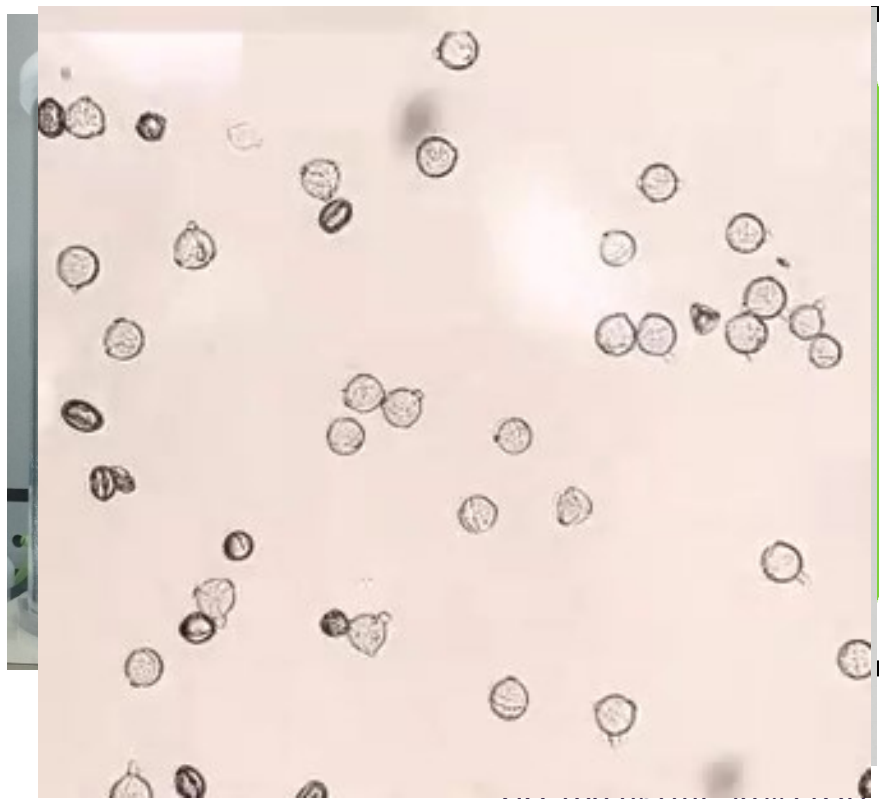
Materials tested

- **GO** Graphenea batch C823/GOB067/D2
- **pGO**, GO purified from production residues (Ali-Boucetta et al., 2013)



Treatments:

- Control (**CTRL**)
- Only EtOH 90% (**Blank**)
- GO** in EtOH 90%
- pGO** in EtOH 90%



RT 98% RH Overnight

Concentration:

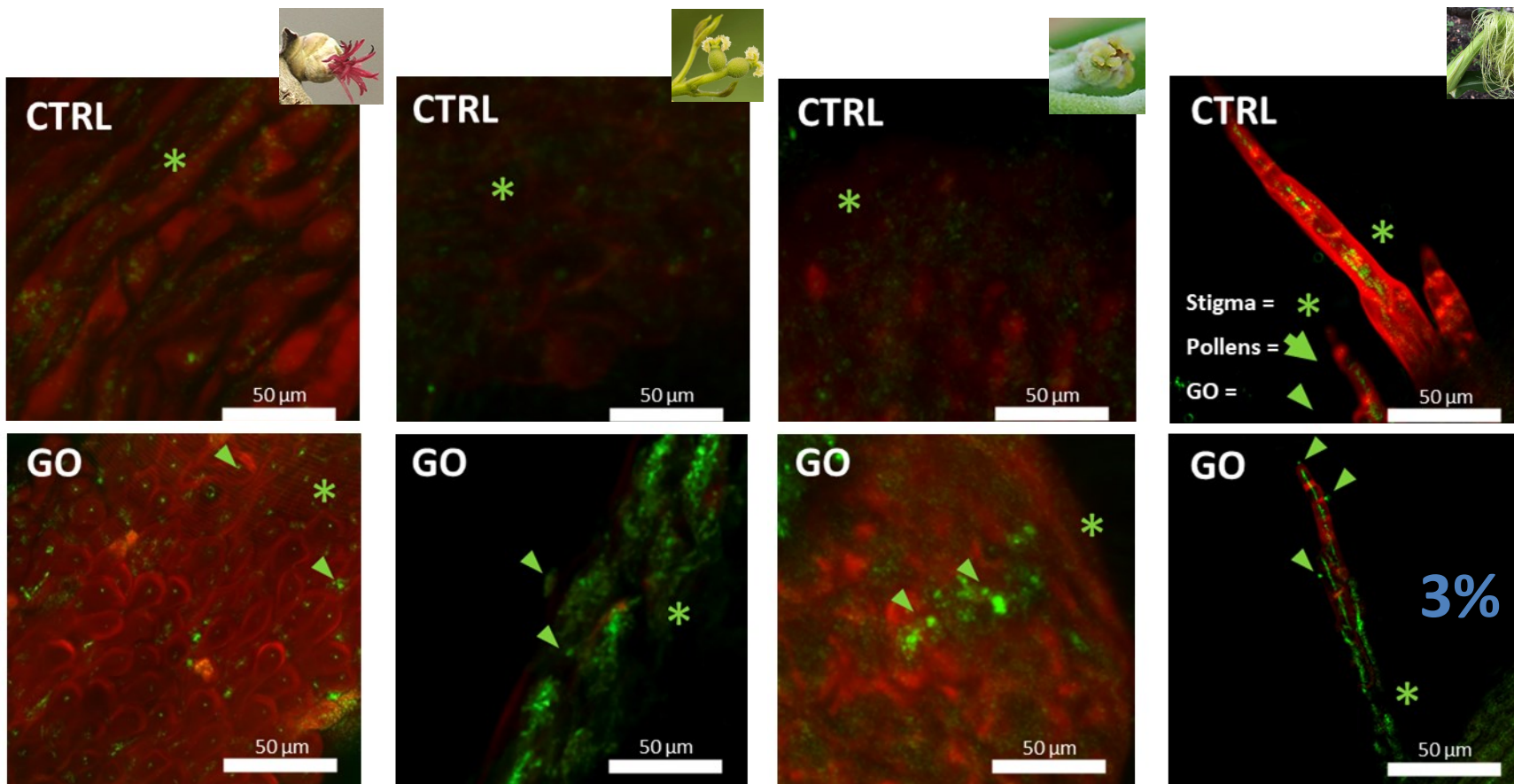
GOs = **3 ng m⁻³**

[- CNT (predicted):

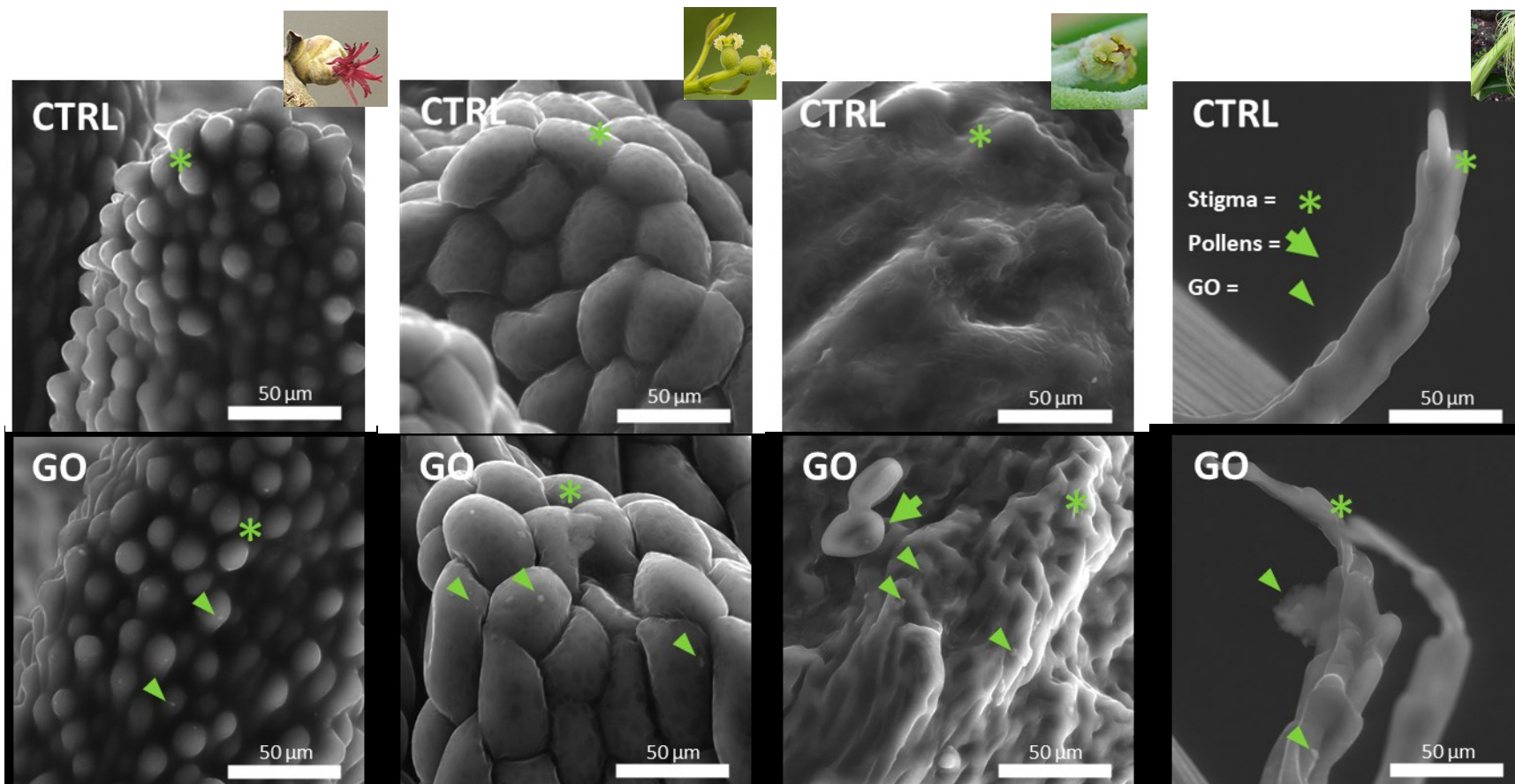
0.03 ng m⁻³ (Sun et al. 2014)

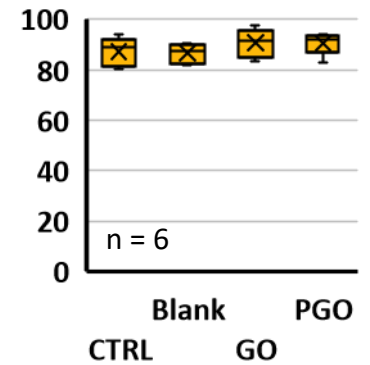
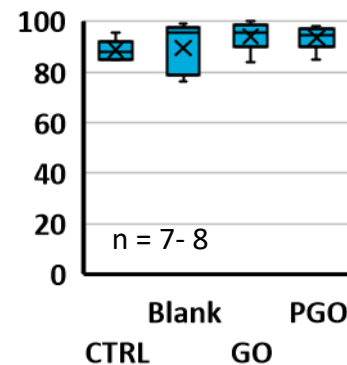
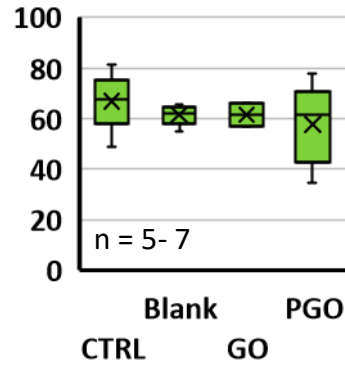
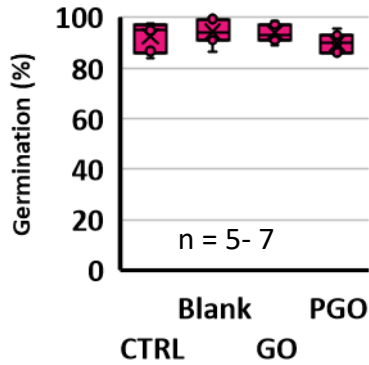
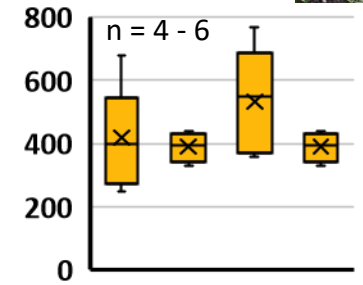
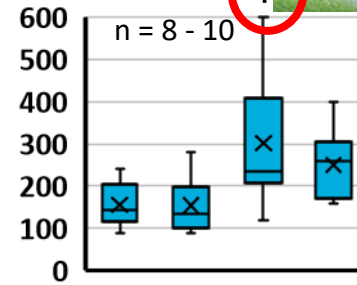
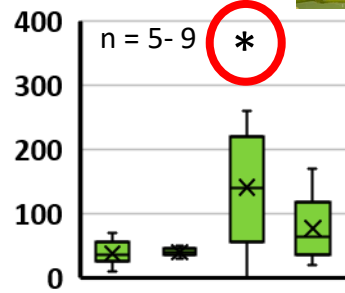
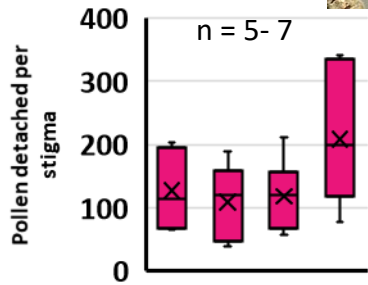
- PM2.5 (EU mean 2018):

17-27 ng m⁻³ (EEA report 2020)]



CLSM







- Stigmas of anemophilous plants intercept airborne GO nanoparticles even at very low concentrations.
- GO does not affect pollen performances in common hazel and corn.
- GO lowers pollen adhesion in walnut and holm oak, but does not inhibit pollen germination.
- The presence of a film of liquid water neither completely remove GO, nor enhance its possible negative effect.
- pGO never affects pollen performances in the tested species.

Science of the Total Environment xxx (xxxx) 154625



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com



Is airborne graphene oxide a possible hazard for the sexual reproduction of wind-pollinated plants?

Davide Zanelli ^a, Fabio Candotto Carniel ^{a,b,*}, Lorenzo Fortuna ^b, Elena Pavoni ^c,
Viviana Jehová González ^d, Ester Vázquez ^{d,e}, Maurizio Prato ^{b,f,g}, Mauro Tretsch ^a



GRMs & the sexual reproduction of seed plants: take-home messages

- At environmentally compatible concentrations, FLG is as safe as a naturally occurring nanomaterial (mica);
- rGO is also inert;
- GO is effective at the highest quantities tested: its negative effects are related to the intrinsic acidity (eventually buffered by the stigmatic surfaces), but more often by contaminants related to the production methods.



1. Studiare la degradazione dei **GBMs** da parte dei funghi

- In futuro, il rilascio nell'ambiente terrestre di questi GBMs sarà inevitabile ->> **le conoscenze sul loro destino sono molto poche;**
- Negli ambienti terrestri, i **funghi saprotrofi** sono decompositori primari di materia organica morta;
- Di questi, le **carie bianche** (basidiomiceti) e alcuni ascomiceti sono tra i pochi organismi in grado di demolire molecole naturali complesse come la lignina. Sono anche in grado di demolire inquinanti organici persistenti come di **origine antropica;**
- La demolizione avviene grazie ad enzimi (perossidasi o laccasi) rilasciati dalle ife nell'ambiente circostante. Il più conosciuto è la **lignina perossidasi.**

Due approcci utilizzati:

1. testare le capacità di demolizione di culture fungine axeniche di carie bianche e funghi del suolo verso i **GBMs**

Basidiomiceti

Ascomyceti



Bjerkandera adusta



Phanerochaete chrysosporium



Pleurotus ostreatus



Morchella esculenta

2. Testare l'effetto del ciclo catalitico della **LiP** sui **GBMs**

Lavoro ce n'è tanto!

- Sono disponibili attività legate a questo progetto valide per l'accumulo di crediti di tirocinio



Ringraziamenti

Univerisity of Trieste

Prof. Maurizio Prato

Dr. Fabio Candotto Carniel

Dr. Lorenzo Fortuna

Dr. Davide Zanelli

Dr. Alice Montagner

Dr. Susanna Bosi

Dr. Matteo Crosera

University of Siena

Prof. Massimo Nepi

Prof. Giampiero Cai

M.Sc. David Gorelli

University of Castilla-la Mancha

Prof. Ester Vázquez

CNRS - CIRIMAT

Dr. Emmanuel Flahaut

Grazie per l'attenzione!

