

---

# **ESPRESSIONE IN PIANTA DI GENI PER IL FITORISANAMENTO DA INQUINANTI ORGANICI**

---

**Francesca Palomba**

Dottorato in Scienze Biotechologiche XXI ciclo  
Indirizzo Biotecnologie Vegetale  
Università di Napoli Federico II



Dottorato in Scienze Biotecnologiche XXI ciclo  
Indirizzo Biotecnologie Vegetali  
Università di Napoli Federico II



---

**ESPRESSIONE IN PIANTA DI  
GENI PER IL FITORISANAMENTO  
DA INQUINANTI ORGANICI**

---

**Francesca Palomba**

Dottoranda: Francesca Palomba

Relatore: Prof. Edgardo Filippone

Coordinatore: Prof. Giovanni Sannia

*A Zio Pasquale e alla mia famiglia*

# INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	<b>pag. 1</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>pag. 2</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>pag. 6</b>
1.1 Premessa	pag. 6
1.2 Natura degli inquinanti	pag. 6
1.3 Impatto dell'industria olearia	pag. 7
1.4 Inquinamento da idrocarburi policiclici aromatici	pag. 9
1.5 Tricloroetilene	pag. 11
1.6 Acido tricloroacetico	pag. 12
1.7 Risanamento dei suoli e delle acque	pag. 12
1.8 Biorisanamento	pag. 13
1.9 Fitorisanamento	pag. 14
1.10 Laccasi e risanamento	pag. 19
1.11 Scopo della tesi	pag. 22
<b>2. MATERIALI E METODI</b>	<b>pag. 24</b>
2.1 Substrati di coltura	pag. 24
2.2 Crescita e dosaggio di piante di tabacco e microrganismi usati	pag. 24
2.3 Geni e Vettori utilizzati	pag. 25
2.4 Costruzione del vettore di espressione e trasformazione di <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	pag.25
2.5 Trasformazione stabile di tabacco mediante <i>A. tumefaciens</i>	pag. 26
2.6 Caratterizzazione molecolare delle linee di tabacco transgeniche	pag. 2
2.6.1 Estrazione del DNA genomico	pag. 27
2.6.2 Reazione di amplificazione degli acidi nucleici	pag. 27
2.6.3 RT-PCR	pag. 28
2.6.4 Estrazione delle proteine solubili totali e quantificazione delle proteine totali estratte	pag. 28
2.6.5 Separazione elettroforetica delle proteine totali (SDS-PAGE) e analisi Western	pag. 29
2.6.6 Zimogramma	pag. 29
2.7 Saggi biochimici per la valutazione dell'attività fenol-ossidasi	pag. 29
2.7.1 Saggio dell'attività enzimatica con ABTS	pag. 29
2.7.2 Saggio dell'attività enzimatica con Siringaldazina	pag. 30
2.7.3 Saggio dell'attività enzimatica con 2,6-DMP (dimetossifenolo)	pag. 30
2.7.4 Saggio di chiarificazione di acque di vegetazione <i>in vivo</i>	pag. 30
2.7.5 Quantificazione dei fenoli	pag.31
2.7.6 Saggio di decolorazione dell'RBBR <i>in vivo</i>	pag. 31
2.8 Analisi fenotipica	pag. 31
2.8.1 Rilievo dei dati morfometrici	pag. 31
2.9 Analisi del TCE e del TCAA	pag. 31
2.9.1 Estrazione del TCE e analisi	pag. 31
2.9.2 Estrazione del TCAA e analisi	pag. 32
<b>3. RISULTATI</b>	<b>pag. 33</b>
3.1 Costruzione del vettore binario e trasformazione di <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	pag. 33

3.1.1 Costruzione del vettore binario	pag. 33
3.1.2 Trasformazione di <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	pag. 33
3.1.3. Trasformazione stabile di <i>Nicotiana tabacum</i> cv <i>Samsun NN</i>	pag. 33
3.2 Analisi molecolari delle piante putative transgeniche	pag. 34
3.2.1 Analisi di amplificazione del DNA genomico	pag. 34
3.2.2 Analisi western	pag. 34
3.2.3 zimogramma delle proteine fogliari	pag. 34
3.3 Saggi biochimici per determinare l'attività enzimatica	pag. 34
3.3.1 Saggi di attività enzimatica in pianta	pag. 34
3.3.2 Saggi dell'attività enzimatica in essudati radicali	pag. 36
3.3.3 Saggio di chiarificazione di acque di vegetazione	pag. 36
3.3.4 Degradazione dei fenoli in acque di vegetazione	pag. 37
3.3.5 Saggio di decolorazione con RBBR	pag. 37
3.4 Analisi fenotipica	pag. 37
3.4.1 Dati morfologici	pag. 37
3.5 Analisi del TCE e TCAA	pag. 38
3.5.1 Tossicità dovuta all'esposizione ai TCE	pag. 38
3.5.2 Assorbimento del TCE	pag. 38
3.5.3 Metabolismo del TCE	pag. 38
3.5.4. Tossicità dovuta all'esposizione all'acido tricloroacetico	pag. 39
3.5.5 Assorbimento dell' Acido Tricloroacetico	pag. 39
3.5.6 Metabolismo del TCAA	pag. 39
<b>4. DISCUSSIONE</b>	<b>pag. 40</b>
4.1 Espressione della laccasi fungina POXA1B in piante di tabacco	pag. 41
4.2 Studio della progenie T <sub>1</sub> esprimente il gene <i>poxC</i>	pag. 45
4.3 Espressione del gene <i>bar</i> in piante di tabacco per la degradazione del tricloroetilene	pag. 48
<b>5. CONCLUSIONI</b>	<b>pag. 50</b>
<b>6. TABELLE E FIGURE</b>	<b>pag. 51</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>pag. 80</b>
<b>8. ALLEGATI</b>	<b>pag. 93</b>

## Riassunto

I composti organici sono considerati una tra le maggiori fonti di contaminanti ambientali, in particolare gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono stati riconosciuti come un problema mondiale a causa della loro stabilità chimica e dei loro effetti carcinogenetici. Tali sostanze generano una forte pressione selettiva sulla capacità dell'ecosistema di autopurificarsi, danneggiando la biodiversità e mettendo in pericolo uno sviluppo sostenibile. L'applicazione delle biotecnologie con l'ottenimento di piante geneticamente modificate da impiegare nel fitorisanamento degli IPA potrebbe contribuire alla risoluzione di questo problema.

Lo scopo del progetto di ricerca è stato l'ottenimento, tramite un approccio biotecnologico, di piante in grado di esprimere geni utili per il fitorisanamento dei suoli e acque da contaminanti organici.

Da una collaborazione con il prof. Sanna (Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica, Napoli) si è reso disponibile il cDNA del gene *poxC* e del gene *poxA1b* entrambi codificanti per una laccasi isolata dal fungo *Pleurotus ostreatus*. Durante lo sviluppo del progetto è stato costruito un vettore binario contenente la sequenza in esame usato per poi trasformare piante di *Nicotiana tabacum* cv *Samsun NN* mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Sono state ottenute 9 linee transgeniche da eventi di rigenerazione indipendenti. Le analisi molecolari, condotte su tessuti fogliari delle piante ottenute, hanno dimostrato la presenza della sequenza del gene eterologa e la traduzione del gene. L'attività fenol-ossidasi è stata confermata e quantificata in stadi differenti stadi fenologici della pianta e negli essudati radicali, tramite analisi spettrofotometrica e zimogramma. L'attività è stata variabile tra le diverse linee e tra differenti stadi fenologici della pianta. Tale differenza potrebbe dipendere dalla differente posizione del transgene del genoma di tabacco e da effetti di silenziamento. Inoltre è stata analizzata la progenie T<sub>1</sub> di piante esprimenti il gene *poxC*, precedentemente ottenute nel nostro laboratorio, sia per valutare la capacità degradante di sostanze inquinanti sia per valutare differenze nel fenotipo. Le piante transgeniche, sono state allevate *in vivo* in una soluzione idroponica contaminata una volta con acque di vegetazione derivanti dallo scarto dell'industria olearia e l'altra con un colorante tessile industriale l'RBBR. Dopo una settimana d'incubazioni si è rilevata una riduzione dei fenoli e del colorante nella maggior parte delle linee analizzate e si è arrivato ad un valore massimo del 70%.

Presso il Dipartimento della Salute e dell'Ambiente dell'Università del Sud Carolina, dove è stato svolto parte del lavoro di tesi, sono state eseguite alcune ricerche del gruppo ospitante, relative alla caratterizzazione di piante di tabacco transgeniche per la degradazione del tricloroetilene. Il tricloroetilene è un composto organico utilizzato sia a livello industriale che domestico ed è uno dei maggiori inquinanti delle acque e del suolo. Tale lavoro era volto alla compressione della capacità degradativa di piante di tabacco esprimenti il gene *bar*, codificante per l'enzima fosfonitrocina acetil transferasi e usato come marcatore selettivo, nell'assorbire il tricloroetilene (TCE) e metabolizzarlo. Le analisi hanno mostrato che le piante transgeniche sono capaci di assorbire e metabolizzare più velocemente il tricloroetilene. Infatti in media le piante transgeniche sono state capaci di assorbire il 41% di TCE, mentre le piante controllo hanno assorbito solo il 25% di TCE. Inoltre le piante non trasformate dosate per il tricloroetilene hanno una più alta concentrazione di acido tricloroacetico (uno dei prodotti del metabolismo del TCE) rispetto alle piante esprimenti il gene *bar*. Le piante transgeniche quando dosate per l'acido tricloroacetico (TCAA) assorbono il 10% in più del TCAA rispetto alle piante non trasformate.

## Summary

Phytoremediation is an emerging and highly innovative technology employed to remove various contaminants from soils, groundwater and the atmosphere. Phytoremediation is a currently gaining public, regulatory and industrial acceptance because of its ability to remove various contaminants and its economic, aesthetic, and environmental benefits (Dietz e Schnoor, 2001).

Phytoremediation is the use of plants and their associated microbes for environmental cleanup (Newman e Reynolds, 2005). This technology makes use of the naturally occurring processes by which plants and their microbial rhizosphere flora degrade and sequester organic and inorganic pollutants. Organic pollutants in the environment are mostly man made and xenobiotic to organism. Many of them are toxic, some carcinogenic. Organic pollutants are released into the environment via spills (fuel, solvents), military activities (explosive, chemical weapons), agriculture (pesticides, herbicides), industry (chemical, petrochemical), wood treatment, etc. Depending on their properties, organics may be degraded in the root zone of plants or taken up, followed by degradation, sequestration or volatilization (Pilon-Smits, 2005).

In nature, soil bacteria and white-rot fungi can oxidize organopollutants by production of enzymes having degradation activity. This ability can be applied to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the contaminated soils (bioremediation); in particular, white-rot fungi are interesting since the larger PAHs are not substrates for soil bacteria. In recent years, some species of white rot-fungi, such as *Pleurotus ostreatus*, have been shown to degrade PAHs in soil (Piscitelli *et al.*, 2005). Moreover, plants are able to produce enzymes degrading organic xenobiotics in roots exudates and to provide a favourable environment for the growth of useful microbia in the rhizosphere (Macek *et al.*, 2000; Cunningham *et al.*, 1996).

Among methodologies that can be applied to remediation of contaminated soils, the phytoremediation (plant-assisted remediation) has the advantages to preserve the natural structure of the soil and to be energetically favourable, because the energy for metabolic processes is derived primarily from sunlight (Macek *et al.*, 2000). Furthermore, being *in situ* technique, it not requires the movement of the soil (Schnoor *et al.*, 1995). Nevertheless, limitations in the use of higher plants for remediation have been reported (Huang *et al.*, 2004). So far, some biotechniques can improve phytoremediation. These techniques are *i*) the use of plant species that have the ability to proliferate in the presence of high levels of contaminants (Huang *et al.*, 2004), *ii*) the use of strains of PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) that increase plant survival, stimulate root development and accelerate plant growth in heavily contaminated soils (Huang *et al.*, 2004). In addition, to enhance the potential of organic contaminants degradation *in planta*, biotechnological strategies can be applied, through either the over-expression of endogenous genes or the expression of transgenes from other kingdoms (Meagher, 2000). In recent years, among enzymes capable of degrading phenolic pollutants, laccases have become of interest; they have already been used in a variety of biotechnological and environmental applications. Laccases are oxidoreductases catalysing non-specific oxidation of aromatic substrates with a concomitant reduction of molecular oxygen to water (Solomon *et al.*, 1996); they are able to degrade condensed PAHs and phenolic compound into less toxic compounds (Giardina *et al.*, 1999). Laccases have the advantages that their activity is on a broad range of substrates and, in contrast to peroxidases, they do not require hydrogen peroxide as a co-substrate to be active

They are widely distributed in higher plants, in fungi and recently it has been reported that they are widespread in bacteria (Duran *et al.*, 2002; Alexandre *et al.*, 2000). By genetic engineering it is possible to achieve *in planta* the heterologous expression of genes encoding biodegradative enzymes, such as laccase. This approach can increase the quantity and activity of plant enzymes, enhancing the rate of phytoremediation of PAHs contaminated soils (Macek *et al.*, 2000).

Easy transformation and cultivation make plants suitable for production of many recombinant proteins. However, the extraction and purification of proteins from biochemically complex plant tissues is a laborious and expensive process and a major obstacle to large-scale protein manufacturing in plants. To overcome this problem, secretion-based systems utilizing transgenic plants can be used (Borisjuk *et al.*, 1999). Secretion is a basic function of plants. Compounds secreted by roots often move through the intercellular space (apoplast) which has direct contact with the external solution (Neumann *et al.*, 2003).

In this study we aimed to remediate organic contaminants in soil and wastewater by using tobacco transgenic plants expressing a fungal laccase gene (*poxA1b* and *poxC*) isolated from the Basidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus* and the bacterial gene (*bar*) from *Streptomyces hygrosopicus*.

Different laccase isoenzymes are secreted by *P.ostreatus*; among them POXA1b shows a high stability at alkaline pH and the coding sequence of the *poxA1b* gene is 1599 bp long, interrupted by 15 introns and the mature protein has a molecular mass of 62 kDa (Giardina *et al.*, 1999). POXC is the most abundant and the coding sequence of the *poxC* gene is 2.608 kb long, interrupted by 19 introns and the mature protein has a molecular mass of 60 kDa (Palmieri *et al.*, 2003).

The cDNA clone of *poxA1b*, isolated from the white-rot fungus *P. ostreatus*, was cloned into the EcoRV site of the pG002935SpoxA1b binary vector. The resulting construct was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 strain by electroporation.

Genetic transformation of *A. tumefaciens* mediated was carried out on leaf discs (Horsch *et al.*, 1985). PCR-analysis shows that 9 lines of 11 analyzed have integrated into their genome the *poxA1b* gene. Laccase protein was detected by reaction with polyclonal antibodies raised in rabbit against the purified laccase from *P. ostreatus*. The immunoblot analyses on total soluble proteins extracted from transgenic leaves confirmed the presence of POXA1b protein, having a molecular mass of 62 kDa. The quantitative differences in transgene expression between independent transformants should be related to different integration sites of the transgene (positional effect) or to gene silencing (Van Leeuwen *et al.*, 2001).

To determine whether laccase expressed into transgenic plants was also active, a phenol-oxidase enzymatic assay was carried out. To evaluate the laccase activity in transgenic plants, total soluble proteins were isolated from *in vivo* young leaves and separated under native conditions. After running, the gels were treated with ABTS (2,2-azobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), a chromogenic laccase substrate (Piscitelli *et al.*, 2005). In order to carry out another assay to determine the laccase activity by spectrophotometer with 3 different substrates: ABTS, syringaldazine and 2,6-dimethoxyphenol (DMP). Each genotype shows a different activity's value with each substrate; for ABTS the value range between 20 to 350 mUmg<sup>-1</sup> in the whole plant; for syringaldazine the value range between 0 to 10 mUmg<sup>-1</sup> in the whole plant; for 2,6-DMP the value range between 30 to 390 mUmg<sup>-1</sup> in the whole plant. Besides the level of phenol-oxidase activity was detected also in the root exudate with all 3 substrates above mentioned; with ABTS the activity ranging



from 0 to 168 mUmg<sup>-1</sup>, with syringaldazine ranging from 3 to 20 mUmg<sup>-1</sup> and with 2.6-DMP ranging from 2 to 168 mUmg<sup>-1</sup>. All the transgenic lines tested showed detectable signal in all the fractions. The activity was variable among transgenic plants and with three different substrate.

Ligninolytic enzymes such as laccases have been difficult to over-express heterologously in an active form in a plant system. White rot fungal laccase have been expressed in *Saccharomyces cerevisiae* (Cassland e Jonsson., 1999); *Pichia pastoris* (Jonsson *et al.*, 1997), *Aspergillus oryzae* (Yaver *et al.*, 1996) at relatively low concentration (Hood *et al.*, 2003). Recently *Trametes versicolor* laccase I gene was expressed in maize seed (Bailey *et al.*, 2004) and they obtained only few plants bearing construct having a constitutive promoter and extra cellular targeting sequences. These plants died prior to be transferred in the greenhouse, perhaps due to the lethal effects of the transgene enzyme (Bailey *et al.*, 2004).

Other Authors have obtained heterologous expression of *P. ostreatus* POXA1b laccase in two yeast, *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. Both transgene yeasts secreted recombinant active laccase, although *K. lactis* was much more effective than *S. cerevisiae*, where no reliable values for POXA1b activity was measured due to the low amount of recombinant protein produced. In *K. lactis* the Authors obtained activity levels higher than in our transgenic plants (Piscitelli *et al.*, 2005). In conclusion it seems that the homology between homologous and heterologous expression system is related with the enzyme expression level (Hood *et al.*, 2003).

In this project we study the offspring T<sub>1</sub> of tobacco plant that overexpress the fungal gene *poxC*. We found that this plant didn't show any morphology differences with control tobacco plant. Anyway their leaves shown red-brown patches. Leaf morphology in several transgenic plants was different in comparison with the untransformed ones.

To analyze the ability of transgenic plants to modify phenolic compounds, the transgenic lines were grown for one week in an idroponic solution added with olive oil wastewater and in another assay with a syntetic dye Remazol Brilliant Blue R (RBBR). All transgenic plants analyzed were able to reduce the quantity of phenolic compounds more effectively than the control plants and some lines showed a rduction of 90% of the phenols. For RBBR all transgenic plants is able to degrade the dye and the maximum of degradation was at 50%.

In conclusion, laccases represent a group of biomolecules that catalize the oxidation of aromatic compounds in less toxic products (Giardina *et al.*, 1999). This property can be used to transform polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) into less harmful compuonds from contaminated soils by transgenic plants expressing these enzymes. In search of an effective method for phytoremediation of water and soils contaminated with organic compounds, we investigated the application of an apoplastic expressional system that secretes useful fungal enzyme from transgenic plants into the soil.

In the last year of PhD project tobacco plants expressing *bar* gene for degradation of trichloroethylene (TCE) have been characterized. Those experiments are devoleped in the Dr. Lee Newman research group. TCE is the most common organic contaminane found in the environment. Trichloroethylene is not only used on the industrial scale, it can also be found in many household products such as: typewriter correction fluids, paint removers, spot removers, adhesives, and rug-cleaning fluids (Williams-Johnson *et al.* 1997).

It is important to remediate areas that are contaminated with TCE because of the toxic effects that it has on animals and plants. Trichloroethylene has been found to cause damage to the nervous system (Kilburn 2002), liver (Brown *et al.* 1990), kidneys, and it is a suspected carcinogen (Robbiano *et al.* 2004).

Many conventional technologies like pump-and-treat (Bayer and Finkel 2006) and air sparging (McCray and Falta 1996) have been used to remediate TCE. However, pump-and-treat technologies can be very time consuming and expensive (Bayer and Finkel 2006), and air sparging releases volatile organic compounds (VOC) like TCE into the atmosphere (McCray and Falta 1996). Phytoremediation, a more aesthetically pleasing and economical technology has been introduced as a viable alternative to remediate TCE from soil and groundwater (Newman *et al.* 1997).

The *bar* gene is a commonly used selectable marker that encodes for the phosphinothricin acetyltransferase (PAT) enzyme. This enzyme has the ability to detoxify the herbicide glufosinate (Mayer *et al.* 2004). In many research projects involved with transforming plants the *bar* gene is commonly used as a selectable marker. The purpose of this study was to determine the effects that the *bar* gene has on TCE degradation and toxicity. Furthermore, we looked at trichloroacetic acid (TCAA), a known metabolite of TCE degradation, and evaluated the impact the *bar* gene had on its degradation rate and toxicity to tobacco plants.

When the tobacco plants were dosed with TCE, toxic effects could be seen at a concentration of 200 ppm in wild type plants and 300 ppm for transgenic plants. Transgenic tobacco plants were found to take up a higher percentage of TCE from the flasks containing TCE. On average transgenic plants were able to take up 41% of TCE while wild type plants only took up 25% of TCE. Trichloroethylene concentrations were significantly higher in the stems of wild type plants than in transgenic plants. Wild type plants dosed with TCE had higher concentrations of TCAA in their leaves than plants containing the *bar* gene.

Besides transgenic plants took up significantly more TCAA than wild type plants. Plants containing the *bar* gene took up approximately 10% more TCAA than wild type plants.

When plants were dosed with TCAA the wild type plants had much higher concentrations of TCAA than did the plants containing the *bar* gene. On average, 19% of the TCAA was recovered in transgenic plants and 51% was recovered in wild type tobacco plants.

The *bar* gene is a common selectable marker used in both plant and bacterial studies. Selectable markers like the *bar* gene could potentially cause unexpected responses when plants are studied for expression of other traits.

This study has found that the *bar* gene may provide phytoremediation enhancement capabilities. There has been some concern about accumulating TCAA into the environment because it can be harmful to both animal and plant health (Lewis *et al.* 2004). According to this study, the *bar* gene may be capable of reducing the amount of TCAA accumulating in plant tissues from the phytoremediation of TCE. However, it is still unknown what the end product of TCAA degradation is in plants. More studies need to be carried out to identify the metabolites of TCAA degradation and to determine how the *bar* gene responds in other plants.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Premessa

L'inquinamento ambientale è stato definito come un'indesiderabile variazione delle caratteristiche dell'aria, dell'acqua, del suolo e del cibo, che può influire negativamente sulla salute, sulla sopravvivenza, sulle attività degli uomini o degli altri organismi viventi (Miller, 1991).

Nel corso dei secoli, l'uomo, l'industria, le attività militari e le pratiche agronomiche hanno contaminato grandi aree dei paesi industrializzati, con metalli pesanti ed inquinanti organici. In passato la rapidità dei mutamenti nelle caratteristiche ambientali era collegata esclusivamente a fenomeni naturali legati ai processi endogeni ed esogeni della crosta terrestre. Oggi, invece, i cambiamenti si sono intensificati in maniera esponenziale con le attività umane che, con immissioni dirette ed indirette nell'ambiente di sostanze e/o energie, hanno provocato l'accumulo nell'ambiente di sostanze in grado di provocare o favorire alterazioni più o meno persistenti o irreversibili delle caratteristiche chimico-fisiche e biologiche degli ecosistemi (Susarla *et al.*, 2002). La rapida industrializzazione e la necessità di generare nuove fonti di energia sono la causa principale del continuo rilascio nella biosfera di sostanze inquinanti. Tali sostanze generano una forte pressione selettiva sulla capacità dell'ecosistema di autopurificarsi, danneggiando le biodiversità e mettendo in pericolo uno sviluppo sostenibile. Il destino degli inquinanti, una volta giunti nell'ambiente, può essere diverso. Essi possono avere vita relativamente breve, con effetti tossici transitori o, come i metalli pesanti e molti dei composti organici di sintesi, persistere nell'ambiente ed essere accumulati nei suoli e nelle acque fluviali, lacustri e marine, secondo la loro origine e natura. È stato visto, infatti, che i residui dei fitofarmaci persistenti, come ad esempio quelli contenenti il cloro, dopo più di venti anni dalla loro messa al bando, possono essere ancora trovati nell'ambiente (Chaudhry *et al.*, 2005). Oltre al loro effetto negativo sull'ecosistema e sulle altre risorse naturali, i siti inquinati sono anche dannosi per la salute pubblica, poiché i composti tossici in essi presenti possono entrare nella catena alimentare attraverso le colture agrarie o l'acqua potabile (European Commission, 2002; European Environment Agency, 2003). In Europa è stato stimato che 52 milioni di ettari, cioè più del 16% dell'area totale, sono interessati da una qualche forma di degradazione del suolo. Le aree più inquinate sono state trovate nei pressi delle zone industrializzate dell'Europa nord ovest, ma anche presso tutte le altre grandi città Europee (European Environment Agency, 2003). Nel corso degli anni, la regolamentazione per prevenire ulteriori contaminazioni ambientali è diventata sempre più severa. Molti paesi europei hanno infatti iniziato ad adottare linee molto stringenti in campo ambientale, con tolleranza zero contro la contaminazione dei suoli (Chaudhry *et al.*, 2005).

## 1.2 Natura degli inquinanti

Gli inquinanti possono essere divisi in due grosse categorie: inorganici ed organici.

- *Inquinanti inorganici*

Sono essenzialmente rappresentati dai metalli pesanti, le cui fonti principali sono i rifiuti di miniere o altiforni ed i fanghi di depurazione.

Questo tipo d'inquinante persiste nei vari comparti dell'ecosistema per tempi molto lunghi e rende il processo di ripristino molto complesso.

- *Inquinanti organici*

La loro produzione ha subito un forte incremento negli ultimi cinquant'anni. Si può senza dubbio affermare che l'uso indiscriminato di queste sostanze e quindi il conseguente rilascio nei diversi comparti ambientali, in seguito ad attività industriali, agricole ed urbane, è diventato un problema gravissimo. Ciò rende sempre più necessaria ed urgente la ricerca di metodologie efficaci, a basso costo e di facile attuabilità, per il recupero della qualità dell'ambiente (Macek *et al.*, 2000).

In questo progetto di tesi l'attenzione è stata focalizzata sui composti organici. Uno dei problemi principali, insito nell'inquinamento da sostanze organiche di sintesi, è l'impossibilità di quest'ultime di entrare nei normali cicli biodegradativi attuati dagli organismi viventi, in quanto possono essere considerate come strutture nuove non trovate in condizioni naturali (xenobiotici). I composti xenobiotici, anche se presenti nell'ambiente in concentrazioni estremamente basse, possono creare seri problemi. Essi, infatti, non sono biodegradabili e possono essere assimilati dagli organismi viventi, concentrandosi lungo la catena alimentare e, secondo processi di bioaccumulo, diventare tossici per gli organismi superiori fino all'uomo stesso. (Rao *et al.*, 2003). Tutto ciò ha reso sempre più necessaria ed urgente la ricerca di metodologie efficaci, di facile attuabilità ed a basso costo, per il recupero della qualità di ognuna delle matrici che può essere interessata (Macek *et al.*, 2000).

Negli ultimi decenni, l'accumulo di sostanze xenobiotiche risultante dalla produzione e dall'uso in larga scala di prodotti chimici come fitofarmaci, idrocarburi policiclici aromatici (IPA), esplosivi, saponi, detersivi, coloranti e sostanze aromatiche di natura fenolica, in ambienti come il suolo, i laghi, i fiumi, i sedimenti e gli ambienti marini in generale, è diventato un problema di sempre maggiore rilievo (Chaudhry *et al.*, 2005). Gli IPA, così come altri composti aromatici, si trovano nell'ambiente essenzialmente come residui nei reflui di diverse attività industriali, quali la lavorazione del petrolio e delle pelli (concerie), la produzione di: acciaio, sostanze plastiche, resine, tessuti e carta. Si trovano nell'ambiente anche come residui della combustione dei derivati del petrolio o di materia organica, per perdite accidentali o dovute ad eventi naturali come le infiltrazioni di olii per fenomeni geologici. Anche l'industria alimentare produce reflui caratterizzati da alte concentrazioni di fenoli, come ad esempio le acque di vegetazione dei processi di molitura delle olive (Escalante-Espinosa *et al.*, 2005). Per le loro caratteristiche di tossicità i fenoli, così come gli IPA, che in più mostrano anche elevata recalcitranza nell'ambiente, sono inquinanti da tenere in massima considerazione per i loro effetti sull'ecosistema (Baldrian *et al.*, 2000).

### **1.3 Impatto dell'industria olearia**

Da sempre la produzione dell'olio d'oliva ha un'importanza economica fondamentale nei paesi del Mediterraneo, in cui se ne produce più del 95% del totale mondiale (Jaouani *et al.*, 2005). In Italia circa 2.500.000 t d'olive sono destinate ogni anno ai frantoi, per una produzione di 450-500.000 t d'olio. L'industria frantoiana è caratterizzata dalla stagionalità e dall'estrema dispersione delle aziende. La lavorazione, infatti, è eseguita in circa 13.000 frantoi sparsi in tutto il territorio, ognuno dei quali è in grado di trasformare dalle 5 alle 50 t al giorno. L'attività molitoria comincia nella seconda metà di ottobre e si protrae per 3-4 mesi. I

sottoprodotti della trasformazione delle olive sono le sanse e le acque di vegetazione, costituite dalla parte acquosa del sistema bifase olio-acqua che si ottiene a valle del processo di spremitura, una volta separate le sanse. Le acque di vegetazione rappresentano uno dei maggiori problemi di smaltimento per i frantoi oleari. Esse costituiscono infatti un sottoprodotto inutilizzabile che, sino a qualche anno fa, veniva scaricato direttamente sui terreni agricoli, immesso in fogna o nei corsi d'acqua. Il problema del trattamento degli effluenti inquinanti dei frantoi oleari assume particolare rilevanza, se si tiene conto che la loro produzione è conseguenza inevitabile dei processi d'estrazione dell'olio dalle olive e che l'industria olearia in Italia comporta la produzione di circa 4,5 Ml di m<sup>3</sup> d'acque di vegetazione, il cui carico inquinante è complessivamente valutabile in 100 Ml di abitanti equivalenti.

La quantità di tale refluo oscilla tra il 90 e il 120% del peso delle olive. Le acque di vegetazione prodotte sono formate dal 83-92% d'acqua, il 4-16% di composti organici e l'1-2% di minerali. I prodotti di scarto, sia degli impianti a pressione che di quelli a centrifugazione, hanno una forte carica inquinante dovuta all'acidità, alla ricchezza di sali minerali ed in larga misura all'elevato contenuto di sostanza organica che per il 10% è formata da polifenoli, sostanze fortemente tossiche (Attanasio *et al.*, 2005).

Il residuo secco delle acque di vegetazione, che varia dal 5% al 25%, è rappresentato da sostanze organiche per l'80-90% e inorganiche per il restante 10-20%. Le sostanze organiche sono largamente responsabili dell'elevato potere inquinante delle acque di vegetazione. Tale potere inquinante può essere espresso come COD (domanda chimica di ossigeno) e BOD (domanda biologica di ossigeno) (Balice *et al.*, 1982). Mentre un refluo di buona qualità per l'uso agricolo è caratterizzato da un BOD pari a 10-20 mg dm<sup>-3</sup> e da un COD pari a 30-60 mg dm<sup>-3</sup>, le acque reflue provenienti da impianti di lavorazione e trasformazione delle olive presentano valori di COD di alcune decine di migliaia di mg dm<sup>-3</sup> (generalmente 60.000-180.000 mg dm<sup>-3</sup>). Per l'elevato contenuto di sostanze organiche difficilmente biodegradabili ed a causa di inibitori enzimatici quali i composti fenolici, le acque di vegetazione sono considerate una notevole sorgente di inquinamento (Attanasio *et al.*, 2005; Escalante-Espinosa *et al.*, 2005; Jaouani *et al.*, 2005).

Per centinaia di anni i prodotti di scarto dell'industria olearia sono stati rilasciati nell'ambiente con la convinzione che l'ecosistema fosse in grado di assorbire e bilanciare il loro potere inquinante (Escalante-Espinosa *et al.*, 2005). Da qualche anno però anche le istituzioni hanno preso in considerazione il problema dell'inquinamento prodotto dalle acque di vegetazione, cercando una regolamentazione che potesse ridurre l'impatto ambientale. Con la legge n° 574 dell'11 novembre 1996, è stata varata la riforma sulla gestione dei reflui dei frantoi. Con essa infatti si autorizza l'utilizzazione agronomica delle acque di vegetazione e degli scarichi dei frantoi oleari. A determinate condizioni anche le sanse provenienti dalla lavorazione delle olive, costituite dalle acque, dalla parte fibrosa del frutto e dai frammenti di nocciolo, possono essere distribuite sui terreni agricoli. Per le acque di vegetazione dell'industria olearia, il limite di spargimento annuo è di 50 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> se provenienti da frantoi a ciclo tradizionale e di 80 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> per quelle provenienti da frantoi a ciclo continuo. È vietato, in ogni caso, lo spandimento su terreni situati ad una distanza inferiore a 300 m dalle aree di captazione delle acque potabili o a meno di 200 m dai centri abitati, su terreni in cui vi siano colture orticole in atto o che siano innevati o gelati ed infine su terreni che hanno falde acquifere ad una profondità inferiore a 10 m.

La tossicità del refluo è dovuta principalmente ai composti fenolici monomerici e polimerici (polimeri catecol-melaninici, contenenti anche residui glucosidici). Tale tossicità pone la questione dello smaltimento delle acque di vegetazione vista l'impossibilità di un loro trattamento nei depuratori urbani a causa della loro elevata attività anti-microbica. Il problema è reso particolarmente grave dai volumi elevati di reflui che si accumulano in periodi limitati dell'anno (Attanasio *et al.*, 2005).

L'immissione massiccia delle acque di vegetazione nel suolo comporta un effetto fitotossico ed erbicida, sia per l'elevato contenuto di sali che possono causare la morte delle piante per plasmolisi, sia per la presenza di fenoli liberi. Inoltre, l'elevato carico organico, per essere metabolizzato dalla microflora presente nel suolo, richiede una grande quantità di ossigeno. Ciò causa l'inibizione della crescita di numerosi microrganismi ed altera la composizione del suolo, come la porosità e la concentrazione dell'humus, rallentando la germinabilità dei semi (Adam e Duncan, 2002). Anche altri effetti sono stati riscontrati dopo lo spandimento su terreni destinati a coltura, si sono verificate riduzioni di produzione su colture di grano duro, orzo, girasole; meno sensibili sembrano essere le colture d'olivo. (Attanasio *et al.*, 2005).

I fenoli sono presenti nelle acque di vegetazione, in quantità variabili dai 2 ai 10 g l<sup>-1</sup> secondo il sistema di estrazione impiegato, della varietà e dello stato sanitario delle olive (Attanasio *et al.*, 2005). Studi sull'isolamento e sulla caratterizzazione spettroscopica dei principali fenoli monomerici liberi presenti nelle acque di vegetazione hanno evidenziato la presenza di tirosolo, catecolo e 4-metilcatecolo (Capasso *et al.*, 1999). I fenoli liberi che si rinvergono nei reflui oleari sono in parte già presenti nelle drupe ed in parte sono originati dall'azione di enzimi glucosidici (presenti nella polpa ed attivati in fase di pressatura) sui glucosidi fenolici della polpa (olouropaina ed oleocianina). I polifenoli di vario peso molecolare sono assenti nelle drupe e si originano anch'essi durante la produzione dell'olio a seguito dell'azione sui fenoli monomerici di fenolossidasi contenute nella polpa ed attivate in fase di pressatura (Capasso *et al.*, 2002). Le tecniche classiche per la bonifica delle acque di vegetazione prevedono la decantazione, la concentrazione seguita dall'incenerimento o l'ultrafiltrazione e l'osmosi inversa.

Dell'industria olearia è anche importante, ai fini dell'inquinamento ambientale, la lavorazione industriale di raffinazione degli oli vegetali, che comporta una sequenza di trattamenti ad elevato impatto ambientale. Con il rilascio di quantità elevate di residui inquinanti.

#### **1.4 Inquinamento da idrocarburi policiclici aromatici**

Tra i composti tossici gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono particolarmente pericolosi per la loro intrinseca stabilità chimica e l'elevata resistenza alla degradazione a cui associano un'elevata tossicità e cancerogenicità (Baldrian *et al.*, 2000). Gli IPA sono sostanze inquinanti di tipo organico costituite da due o più anelli aromatici condensati (Figura 1.1). Le loro caratteristiche chimiche come la solubilità, l'idrofobicità, il punto di fusione e d'ebollizione e la pressione di vapore variano all'aumentare del numero degli anelli aromatici e quindi del loro peso molecolare.

C'è un elevato interesse dal punto di vista ecotossicologico riguardo la presenza degli IPA nell'ambiente dato che essi hanno mostrato proprietà tossiche, mutagene e cancerogene (Goldman *et al.*, 2001; Mastrangela *et al.*, 1997). Gli effetti tossici degli IPA sembrano essere legati al numero d'anelli aromatici. Numerosi studi hanno mostrato come composti ad uno, due e tre anelli sono molto tossici (Sims Overcash,

1983); quelli con quattro o più anelli sono considerati genotossici (Phillips, 1989; Lijinsky, 1991; Mersch-Sundermann *et al.*, 1992; Nylund *et al.*, 1992). L'importanza ecotossicologica degli idrocarburi policiclici aromatici e la frequenza con cui si riscontrano nell'ambiente ha spinto l'Environmental Protection Agency (EPA) degli Stati Uniti ad inserire gli IPA tra gli inquinanti più rilevanti ed a definire la rimozione di tali inquinanti dal suolo e dall'acqua una priorità per la salute umana (Gianfreda *et al.*, 2004).

Effetti di bioaccumulo degli inquinanti sono stati riscontrati in organismi sia terrestri che marini. Anche qui una discriminante importante è il numero degli anelli aromatici degli IPA coinvolti in tali processi. Quando gli IPA contaminano il suolo, il rapporto carbonio/azoto (C/N) è alterato poiché l'aggiunta di carbonio stimola la crescita microbica. Lo squilibrio del rapporto C/N, causato dalla carica microbica, può provocare un'immobilizzazione dell'azoto nel suolo, limitando così la crescita delle piante superiori (Xu e Johnson, 1997).

Gli IPA sono composti idrofobici poco solubili in acqua e quindi, nel suolo, la loro biodisponibilità può essere ridotta o perché assorbiti su colloidi organici ed inorganici o perché presenti in fasi liquide non acquose (NAPL) (Bedard 1990; Alexander *et al.*, 1994). Per la degradazione è necessario però che questi composti vengano trasferiti in fase acquosa (Tiehm e Stiber, 2001). Quando si determinano casi d'inquinamento da IPA presenti in forma di NAPL, ci può essere un interessamento del suolo, delle falde acquifere nonché del mare. I fenoli hanno un elevato impatto ambientale sulle acque superficiali dal momento che essi catturano l'ossigeno disciolto, chinonizzandosi e rendendo in tal modo anossico l'ambiente per la flora e la fauna acquatica. A quest'azione diretta se ne aggiunge una indiretta antimicrobica dovuta alla diminuzione della tensione superficiale indotta dai fenoli, che danneggia le membrane cellulari e provoca la denaturazione delle proteine.

In aree prossime a raffinerie è stata riscontrata una concentrazione di IPA di  $1,7 \times 10^6$  ng/g contro quella di 5 ng/g di aree poco sviluppate (Johnson e Larsen, 1985). Ad esempio, nelle acque reflue di raffinerie petrolifere, la concentrazione di fenoli può variare da 10 a 216 mg ml<sup>-1</sup> (Tyagi, 1993).

Il problema dell'inquinamento da IPA è legato alla limitata biodisponibilità di questi inquinanti, dovuta alla loro bassa solubilità in acqua, (fase in cui avvengono la maggior parte delle reazioni biologiche) ed a fenomeni d'assorbimento-intrappolamento nel suolo e nel sedimento. In queste condizioni, poi, l'invecchiamento contribuisce ad aumentarne la loro recalcitranza nell'ambiente.

Le fasi iniziali di degradazione di molecole di fenantrene e di altri IPA prevedono l'idrossilazione della molecola e l'incameramento di una molecola di ossigeno. Nel processo di degradazione di molti policiclici aromatici si forma poi un intermedio o chiave che è il catecolo (Figura 1.2).

Tali composti sono simili ai prodotti di degradazione della lignina, quindi, la maggior parte degli studi per la bonifica dei siti contaminati da composti aromatici o dalle acque di vegetazione si è focalizzata sui funghi ligninolitici (Aggelis *et al.*, 2003; Fenice *et al.*, 2003; Kissi *et al.*, 2001).

## 1.5 Tricloroetilene

Il tricloroetilene (TCE) (Figura 1.3) è uno dei più comuni inquinanti dei suoli e della falda acquifera (Halsey *et al.*, 2005) dovuto al suo utilizzo negli anni nelle industrie, nel versamento accidentale e al deliberato scarico.

L'attuale livello massimo di contaminazione (MCL) per il TCE è di 5ppb, mentre l'attuale obiettivo per il livello massimo di contaminazione è di 0.

Il tricloroetilene è un idrocarburo clorinato usato come solvente nelle industrie e presente in alcuni prodotti d'utilizzo domestico come pitture, smalti, e detersivi (Selmin *et al.*, 2005). Il TCE è una neurotossina (Kilburn, 2002), un'epatossina (Brown *et al.*, 1990) e un sospetto carcinogeno (Robbiano *et al.*, 2004). È stato visto inoltre che il tricloroetilene ha anche l'abilità di incrociare facilmente la barriera placentale degli umani, infatti è stato dimostrato che in donne in gravidanza esposte al TCE attraverso acqua potabile si ha un aumento di tre *fold* di malformazioni di cardiopatia congenita nei loro bambini (Selmin *et al.*, 2005).

L'uomo può essere esposto al tricloroetilene in svariati modi. Gli uomini e gli altri mammiferi possono essere esposti al TCE attraverso l'inalazione di vapori, l'ingestione d'acqua e suoli contaminati e il contatto sulla pelle. Una volta che l'esposizione al TCE è avvenuta i mammiferi possono respirare o metabolizzare l'inquinante. Il tricloroetilene è maggiormente metabolizzato nel fegato di mammiferi grazie a due enzimi, il CYP2E1 e l'ALDH1 (Figura 1.4). Il maggior metabolita che si produce dal metabolismo del tricloroetilene nei mammiferi è l'acido tricloroacetico (TCAA) (Selmin *et al.*, 2005).

Il TCE è un liquido denso a fase non acquosa (Cho *et al.*, 2005), se si trova in condizioni dove è incapace di volatilizzare esso migrerà sul fondo dello strato acquifero. Quando il tricloroetilene penetra nello strato acquifero rimarrà lì a lungo tempo come fonte secondaria di contaminazione (Bayer e Finkel 2006). Così il tricloroetilene persiste nella falda acquifera e può migrare all'interno dello strato acquifero e nell'acqua potabile cittadina e da qui può essere assorbita e consumata dall'uomo.

Ci sono molte comuni e convenzionali pratiche usate per rimuovere il tricloroetilene e altri composti volatili dall'ambiente. Queste tecnologie includono il *pump-and-treat*, lo spargimento d'aria e sistemi d'estrazione del suolo a vapore (Bayer e Finkel 2006, Braida e Ong 2000). La tecnologia *pump-and-treat* consiste nello scavare pozzi e pompare acqua nei serbatoi dove essi sono poi trattati con una varietà di metodi (Bayer and Finkel 2006). Lo spargimento d'aria è un processo dove l'aria è pompata nel terreno e data la volatilità di alcuni inquinanti essi evaporano nell'atmosfera. Con le estrazioni del suolo con vapore, i contaminanti sono attratti e poi trattati prima di essere rilasciati (Braida e Ong 2000).

Siccome il TCE ha un tasso lento di trasferimento della massa, il restauro dello strato acquifero tramite il sistema di *pump-and-treat* è per la maggior parte non raggiungibile entro un determinato intervallo di tempo (Bayer e Finkel 2006). Per di più quando sono usati i sistemi di spargimento di aria i composti volatili vengono dispersi nell'atmosfera (McCray e Falta 1996). Comunque quando lo spargimento di aria è accoppiato con il sistema di estrazione del suolo con vapore i composti volatili sono impossibilitati ad entrare nell'atmosfera (Braida e Ong 2000).

Purtroppo queste tecniche sono costose e impiegano molto tempo per pulire un'area contaminata. Quindi, recentemente il fitorisanamento è stato studiato come un possibile strumento per rimuovere economicamente e efficientemente il TCE dall'ambiente (Newman *et al.*, 1997).



## 1.6 Acido tricloroacetico

L'acido tricloroacetico (TCAA) (Figura 1.5) è il maggiore metabolita del metabolismo del tricloroetilene nei mammiferi. Come il TCE, il TCAA può essere dannoso per l'ambiente e per la salute pubblica. L'acido tricloroacetico è comunemente trovato nell'ambiente ma il suo ritrovamento nell'ambiente è in discussione se o no provenga solamente da fonte antropogenica (Lewis *et al.*, 2004).

L'acido tricloroacetico è trovato nell'acqua municipale come prodotto della clorurazione (Selmin *et al.*, 2005) ed è comunemente ritrovato nell'ambiente perché è stato precedentemente usato come un erbicida. Dato il suo diffuso uso e le sue potenziali origini naturali, il TCAA può essere trovato in quantità misurabili nel suolo, nella falda acquifera, sulla superficie dell'acqua, nell'atmosfera e nelle precipitazioni (Lewis *et al.*, 2004).

L'acido tricloroacetico è un provato carcinogenico (DeAngelo e McMillan 1998) e ha una specifica tossicità per il cuore embrionico (Selmin *et al.*, 2005). Esso è scarsamente metabolizzato e limitatamente eliminato tramite l'urina, ciò spiega la lunga emivita durante l'eliminazione (Saghir e Schultz 2004). L'acido tricloroacetico ha un ampio intervallo di tossicità nell'ambiente. La specie terrestre testata più sensibile è il cane. Comunque la tossicità al TCAA è bassa per gli animali selvatici (Foy 1975).

## 1.7 Risanamento dei suoli e delle acque

La bonifica dei suoli e delle acque contaminate da sostanze xenobiotiche è volta a ripristinare quanto più possibile una qualità del sistema compatibile con le esigenze degli organismi viventi. I costi di bonifica del suolo sono molto elevati. È stato calcolato che per risanare i siti contaminati in Europa servirebbero tra i 59 ed i 109 miliardi di Euro (European commission, 2002). Gli enormi costi per la bonifica portano, qualche volta, ad evitare la decontaminazione e ad attuare tecniche che prevedono la riduzione della carica contaminante, utilizzando lo spargimento come avviene per le acque reflue prodotte dalla lavorazione dell'olio di oliva (Chaudhry *et al.*, 2005). Prima di poter individuare la metodologia più adatta per la decontaminazione ed il ripristino del sito inquinato, è necessario conoscere la storia del sito, la sequenza di eventi inquinanti che si sono verificati, le varie attività che sono avvenute nel sito e disporre quindi di una ampia raccolta di dati analitici su campioni di acqua, suolo e sedimenti che accertino la qualità e la quantità dell'inquinamento. Si deve poi fare una scelta fra le diverse tipologie di disinquinamento in base ai dati raccolti in fase di campionamento e quindi progettare un programma di risanamento.

Indipendentemente dal tipo di processo scelto, le metodologie si dividono in: trattamenti *ex situ* ed *in situ*. I trattamenti *ex situ* consistono nella rimozione del terreno inquinato, nel suo trattamento e decontaminazione in modo da renderlo riutilizzabile. Essi, secondo una classificazione usualmente adottata a livello internazionale, si suddividono in trattamenti *on site* e *off site*. Nel primo caso il terreno rimosso viene trattato in un impianto mobile disponibile sul posto; nel secondo caso, invece, il terreno asportato viene trasferito e trattato in un impianto ubicato in un luogo distante dalla zona di intervento. Questa pratica deve però supportare le spese del trasporto del suolo inquinato ed è perciò molto più costosa di quella *in situ* che risulta più conveniente. Le tecniche *on site* e *off site* sono

caratterizzate, generalmente, da un elevato costo e da difficoltà insite con il trasferimento di grandi quantità di materiale e/o di complesse attrezzature da una località all'altra.

I metodi di bonifica *in situ* prevedono invece il trattamento del terreno inquinato direttamente sul posto senza la sua rimozione. Alla luce dei numerosi vantaggi molti studi cercano nuovi approcci di risanamento *in situ* (Chaudhry *et al.*, 2005).

Esistono molte tecniche di disinquinamento che si basano su metodi di natura diversa che possono essere di tipo fisico, chimico o biologico:

- *Metodi fisici*: adsorbimento, separazione, flottazione e separazione per densità, rimozione con aria a vapore, solidificazione e trattamento termico;
- *Metodi chimici*: Estrazione, ossidazione, uso di resine scambiatrici e di catalizzatori abiotici;
- *Metodi biologici*: Biodegradazione.

In Italia la normativa di riferimento sulla bonifica dei siti contaminati è entrata in vigore con il decreto ministeriale n° 471 dell'ottobre 1999. In esso sono stati fissati i limiti di concentrazione di elementi e molecole inquinanti e viene fatto obbligo alle Regioni di predisporre un censimento dei siti contaminati allo scopo di valutare la priorità degli interventi di bonifica. Tra gli indirizzi generali relativi alla scelta della metodologia da applicare per la bonifica dei siti contaminati viene chiaramente suggerito (art. 5) di privilegiare le tecniche a basso costo, di minimizzare la movimentazione del suolo ed il suo riutilizzo al termine dell'operazione di bonifica. I trattamenti di bonifica di suoli contaminati condotti con i tradizionali metodi di tipo fisico e chimico richiedono però elevati investimenti finanziari e tecnologici e causano sensibili alterazioni delle caratteristiche biologiche del suolo (Roh *et al.*, 2000), essendo tecnologie distruttive per l'ambiente che depauperano ed erodono il suolo. Le correnti tecniche di risanamento, fino ad oggi applicate, non sono comunque del tutto efficaci. Per esempio, è stato stimato che in Germania solo il 30% del suolo dei siti contaminati e trattati risulta effettivamente bonificato, il suolo rimanente viene solo trasportato e conservato in siti a ciò predisposti. Naturalmente questo non risolve il problema, semplicemente lo sposta e lo procrastina nel tempo, lasciandolo alle future generazioni. Si sente quindi urgentemente il bisogno di tecniche alternative, che siano economiche ed efficienti, per bonificare le aree industrializzate fortemente inquinate. Questo potrebbe essere raggiunto con le tecnologie relativamente nuove che prevedono l'utilizzo di organismi viventi per la bonifica dei siti contaminati (Peuke e Rennenberg, 2005). Le tecniche di biodegradazione rappresentano quindi una valida alternativa.

## 1.8 Biorisanamento

Il biorisanamento si basa sulla capacità dei esseri viventi di trasformare il materiale organico inquinante in biomassa, anidride carbonica ed acqua (Alexander *et al.*, 2000). Questa tecnologia consente di decontaminare un suolo inquinato, stimolando le proprietà degradative di organismi indigeni, già adattati al suolo inquinato, che di microrganismi alloctoni. I meccanismi attraverso cui le sostanze inquinanti possono essere trasformate dagli organismi viventi, sono essenzialmente di tipo diretto, come conseguenza diretta del loro metabolismo, o di tipo indiretto, dovuti ad effetti indiretti degli organismi sull'ambiente chimico-fisico che si traducono in una trasformazione secondaria.

I principali fattori che influenzano la riuscita di un processo di biodegradazione sono legati alle proprietà dell'inquinante (struttura molecolare, concentrazione, solubilità, etc.) alle proprietà dell'ambiente (presenza di ossigeno, contenuto d'acqua, valore di pH, temperatura, contenuto di nutrienti), alla biodisponibilità della molecola in questione nel sito specifico.

In passato sono stati condotti numerosi studi per la ricerca di microrganismi in grado di degradare i composti organici. Vari ceppi batterici hanno mostrato buone capacità degradative, tra questi molti attinomiceti e molte varietà di *Pseudomonas* (Samanta *et al.*, 2002; Ward *et al.*, 2003). Alcuni funghi, come il genere *Pleurotus*, si sono mostrati in grado di degradare i composti aromatici (Aggelis *et al.*, 2003; Fenice *et al.*, 2003; Kissi *et al.*, 2001). Sebbene i microrganismi che degradano i inquinanti mostrano buone capacità degradative in laboratorio, presentano numerose limitazioni:

- sono spesso poco competitivi con i microrganismi indigeni, ciò comporta la risultante riduzione della biomassa dei batteri introdotti per il risanamento (Uchida *et al.*, 2005);
- possono influire negativamente sulla capacità risanatrice di tali microrganismi le avverse condizioni meteorologiche con drastici cambiamenti del clima (Singh e Jain, 2003);
- necessitano di numerosi nutrienti che ne supportino la crescita;
- hanno un tasso di degradazione imprevedibile;
- hanno un'azione ridotta ai primi 10-15 cm di suolo (Ward *et al.*, 2003).

## 1.9 Fitorisanamento

I processi di biorisanamento includono anche l'utilizzo delle piante. Tale meccanismo è detto fitorisanamento: l'uso delle piante e dei microrganismi a loro associati per il risanamento ambientale (Raskin *et al.*, 1994; Salt *et al.*, 1995; 1998). In tale tecnica rientrano quegli interventi di bonifica di suoli inquinati in grado di rimuovere, contenere o rendere meno pericolosi elementi o sostanze inquinanti grazie alla opportuna combinazione degli effetti della vegetazione, delle pratiche ammendanti ed agronomiche (Salt *et al.*, 1995; Chaney *et al.*, 1995; Cunningham e Ow, 1996). Questa tecnologia utilizza i naturali processi con cui le piante ed i microrganismi della rizosfera degradano e sequestrano i contaminanti. Sin dai primi lavori di Brooks *et al.* (1977) e Jaffre (1976), il fitorisanamento aveva fatto intuire le sue diverse potenzialità. Grazie ai suoi innumerevoli pregi ed alla possibilità di trattare aree molto estese, il fitorisanamento ha ricevuto grande attenzione da parte della comunità scientifica (Salt *et al.*, 1998; Gleba *et al.*, 1999; Meagher *et al.*, 2000; Dietz e Schnoor, 2001; Guerinot e Salt, 2001; Kraemer e Chardonnens, 2001; Peuke e Renenberg, 2005). Tale tecnica è un'efficiente metodica per il risanamento di contaminanti sia organici che inorganici. Il fitorisanamento può essere usato per inquinanti solidi, liquidi o gassosi. Esso è stato utilizzato nel trattamento di: siti militari (TNT, metalli) campi agricoli (erbicidi, fitofarmaci, metalli, selenio) siti industriali (metalli, arsenico, organici) miniere (metalli) ed industrie del legname (PAHs) (Banuelos *et al.*, 1990; Ferro *et al.*, 1999; Olson *et al.*, 2003; Rock *et al.*, 2003; Winter *et al.*, 2002). Negri *et al.* (2000) hanno ipotizzato anche interventi di bonifica di siti contaminati da radionuclidi. Le piante, inoltre, possono essere usate per il trattamento dell'aria da: ozono, gas nervino, NO<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> o alogenati ed idrocarburi volatili (Jeffers *et al.*, 2003; Morikawa *et al.*, 2003). Il fitorisanamento ha

acquistato negli ultimi 10 anni popolarità presso i governi e le industrie. Questo è dovuto in parte al costo relativamente basso del fitorisanamento ed in parte agli scarsi fondi disponibili per il risanamento ambientale. Attualmente negli USA vengono spesi da 6 a 8 bilioni di dollari l'anno e nel mondo da 25 a 50 bilioni di dollari l'anno per la bonifica dei siti contaminati (Tsao, 2003; Glass, 1999). Siccome le piante sono autotrofe e quindi i loro processi biologici sfruttano l'energia solare, il fitorisanamento è in media 10 volte più economico delle altre tecniche di risanamento classico come l'escavamento, il lavaggio dei suoli o l'incenerimento (Tsao, 2003; Sonoki *et al.*, 2005). Nel 1999 è stato stimato che il costo del fitorisanamento poteva variare dai 5.000 ai 30.000 dollari per acro di terreno, tra 25 e 100 dollari per tonnellata di suolo e tra 1 e 3 dollari per litro di liquami trattati. I costi comprendono:

- l'installazione delle colture, come la preparazione del sito, la preparazione del terreno, le infrastrutture necessarie, le tecniche di contenimento necessarie quali la permeabilizzazione dei bacini in caso di liquami, la costruzione di barriere in caso di suoli pendenti e l'impianto della coltura;
- la progettazione, in cui rientrano le spese per la caratterizzazione del sito e dei test piloti;
- il mantenimento dell'impianto e del monitoraggio ambientale (Flathman *et al.*, 1999).

Il fatto che il fitorisanamento è una tecnica che viene utilizzata principalmente *in situ* contribuisce alla sua convenienza economica, riduce l'erosione del suolo e può ridurre l'esposizione dell'uomo al contaminante (Singh e Jain, 2003). Il fitorisanamento gode anche dei consensi della opinione pubblica che preferisce la così detta pulizia verde alle ruspe delle tecniche *ex situ*. Inoltre i governi gradiscono includere nei loro programmi di decontaminazione il fitorisanamento per distribuire i fondi e le industrie lo preferiscono per pubblicizzare il loro coinvolgimento in una tecnologia amica dell'ambiente (Smits, 2004). Il supporto del governo con fondi speciali e l'interessamento dell'opinione pubblica fanno degli USA il paese in cui la quasi totalità delle agenzie che si occupano di risanamento prevedono tra le tecnologie offerte il fitorisanamento. Tra le fitotecnologie proposte ci sono la rizofiltrazione dei liquami, l'assorbimento dei metalli pesanti o radionuclidi.

Il mercato del risanamento che impiega le piante ora è circa lo 0,5% del totale degli interventi di bonifica ed il biorisanamento circa il 2% del totale. Il fitorisanamento per l'80% riguarda i composti organici ed il restante 20% quelli inorganici. L'uso delle piante per la bonifica dei siti contaminanti è iniziato negli USA con progetti di piccola o media dimensione (Watanabe, 1997). L'interesse economico che gira intorno a questo mercato negli USA è cresciuto negli ultimi 5 anni di 2 o 3 volte, passando dai 30-40 milioni di dollari del 1999 ai 100-150 milioni di dollari nel 2003 e se ne prevede una crescita esponenziale nei prossimi anni (Tsao, 2003). Per il 2006 l'incremento dovrebbe arrivare ai 200-370 milioni di dollari (Schoeder *et al.*, 2002). In Europa il fitorisanamento non è molto sviluppato ma dovrebbe svilupparsi nel prossimo futuro poiché gli interessi ed i fondi della ricerca sul fitorisanamento sono in forte crescita. Tale tecnica potrebbe anche diventare un'opportunità per i paesi in via di sviluppo sia per la sua economicità che per la facile installazione (Smits, 2004). Sebbene negli ultimi anni l'interesse della ricerca riguardo questo argomento è in continua crescita e le conoscenze dei meccanismi coinvolti nei processi di assorbimento, trasporto e detossificazione dei inquinanti sono un po' più chiari, il fitorisanamento è ancora limitato dalla mancanza di conoscenze dei meccanismi alla base di molti processi vegetali e dell'interazione pianta-microorganismo (Smits, 2004). Riassumendo, quindi, il fitorisanamento presenta il vantaggio di: essere economico ed ecologicamente

compatibile; sfruttare l'energia solare; essere una tecnica *in situ*; essere molto versatile; avere bisogno di poca manutenzione ed avere i consensi della opinione pubblica (Chaudhry *et al.*, 2005).

Il fitorisanamento presenta però anche degli svantaggi e dei limiti: le piante devono essere coltivate sul sito inquinato che deve perciò presentare un livello di tossicità tale da non risultare dannoso per le piante che devono effettuare il risanamento; il clima e le proprietà del suolo devono essere idonei alla crescita della specie adottata; i contaminanti al di sotto della rizosfera non possono essere rimossi. A seconda del processo impiegato, il fitorisanamento può essere, inoltre, molto più lento delle tecniche tradizionali, quali l'incenerimento o l'escavamento. Per esempio i processi che prevedono l'assorbimento da parte della pianta del contaminante possono richiedere anni. Per quanto riguarda i processi di trasformazione di composti organici il tempo richiesto, può invece essere notevolmente inferiore da giorni a mesi, rendendo quindi questa tecnica di più facile attuazione. Il fitorisanamento è influenzato dalla biodisponibilità del polluento in caso di alta idrofobicità o stabilità chimica rendendo disponibile solo in parte il polluento alla fitorimediazione; gli IPA ne sono un esempio. Tale tecnica non può, quindi, essere utilizzata o deve essere supportata da tecniche tradizionali se la bonifica prevede la rimozione totale del contaminante (Flechas *et al.*, 2003). Nel 2001 Watanabe ha lanciato alcuni dubbi sull'utilizzo del fitorisanamento sia quello che usa le specie selvatiche sia di quello che prevede l'uso della biologia molecolare. Ha ipotizzato che gli organismi geneticamente modificati e la loro massiva coltivazione potrebbero influire sulla biodiversità, riducendola. Ha, inoltre, ipotizzato che i polluenti o i loro prodotti di degradazione potrebbero entrare nella catena alimentare e che la tecnica di rizofiltrazione potrebbe depauperare anche le risorse nutritive e non solo decontaminare. Clemens *et al.*, (2002) hanno proposto delle strategie da seguire per evitare tali problemi: aumentare e diversificare il numero dei siti trattati; ridurre l'utilizzo di specie che possono entrare nella catena alimentare; alterare la specificità dei meccanismi di assorbimento per ridurre la competizione con gli ioni non desiderati; aumentare il numero dei siti di legame intracellulare o il tasso di trasporto negli organelli per incrementare la capacità di sequestro da parte delle piante.

Il bio/fitorisanamento e le tecniche non biologiche non sono mutuamente esclusive. Si sta, infatti, affermando la possibilità di accoppiare differenti tecnologie come per esempio la rimozione del suolo maggiormente inquinato e l'uso delle piante per la bonifica della restante parte o la costituzione di trattamenti integrati in quei casi in cui si debba intervenire su matrici multicontaminate. In questo modo si possono combinare le tecniche tradizionali più efficienti e le innovative più economiche (Smits, 2004; Roote, 2003).

Le piante ed i microrganismi della rizosfera possono essere utilizzati per il fitorisanamento in diversi modi. Possono funzionare come filtri nella costruzione di "Paludes" (Horne, 2000) o nel risanamento di liquami (Raskin *et al.*, 1997), sfruttando la così detta rizofiltrazione ( Figura 1.6; Figura1.7). Tale tecnica può essere utilizzata maggiormente su paludi o liquami contaminati da metalli pesanti e radionuclidi. Possono essere impiegate come barriere per evitare lo scivolamento delle acque o semplicemente per evitare l'erosione dei suoli o per convertire gli inquinanti in forme meno biodisponibili, sfruttando la fitostabilizzazione. Tale tecnica può essere utilizzata maggiormente sui terreni, i sedimenti o le paludi contaminate da metalli pesanti. (Berti *et al.*, 2000). Le piante possono anche essere usate per estrarre ed accumulare nei loro tessuti i polluenti in modo da rimuoverli poi con la raccolta delle piante, sfruttando la tecnologia chiamata fitoestrazione. Questa tecnica può essere

utilizzata maggiormente sui terreni, i sedimenti o le paludi contaminate da metalli pesanti (Blaylock *et al.*, 2000). Il materiale raccolto dopo la fitoestrazione può a sua volta essere bruciato e, se il contaminante è di un qualche valore come i metalli pesanti, può essere estratto dalle ceneri e riciclato (Chaney *et al.*, 2000). Le piante possono anche agire sinergicamente con la flora delle rizosfera, facilitando la biodegradazione (fitostimolazione), tecnica che può essere utilizzata maggiormente sui terreni, i sedimenti, le paludi o i liquami contaminati da composti organici. La fitovolatilizzazione invece è quel meccanismo per il quale alcuni contaminanti dopo essere stati assorbiti dalle piante vengono rilasciati sotto forma di composti volatili. Questa tecnica può essere utilizzata maggiormente sui terreni, i sedimenti, le paludi o i liquami contaminati da solventi organici ed alcuni metalli come Hg, Se, As. Naturalmente tutti questi processi non sono mutuamente esclusivi ma possono agire sinergicamente (Hansen *et al.*, 1998). A conferma del successo di tali tecniche di bonifica ci sono i numerosi brevetti che sono stati dedicati alle metodiche di bonifica ambientale (Raskin *et al.*, 2002). Vari sono stati i progetti di bonifica ambientale che hanno previsto l'uso delle piante. Ricordiamo la bonifica degli esplosivi attuata dagli USA, degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), utilizzando la *Cannabis sativa* (Campbell *et al.*, 2002) o del tricloroetano (TCE), utilizzando una leguminosa tropicale (Doty *et al.*, 2003).

Il fitorisanamento però presenta alcune limitazioni. La pianta ideale per il fitorisanamento dovrebbe avere le seguenti caratteristiche:

- rapido sviluppo vegetativo, elevata produzione di biomassa;
- radici profonde e ben sviluppate;
- possibilità di gestire la pianta come una coltura agraria;
- facilità di raccolta della biomassa;
- adattabilità alle diverse condizioni ambientali;
- alta competitività.

Ad oggi non sono state individuate specie vegetali con capacità fitorisanatrici in grado di soddisfare tutti i requisiti necessari per il risanamento (Li *et al.*, 2003). Alcuni composti, inoltre, sono più recalcitranti, poiché risultano fortemente adesi ai colloidi del suolo, rendendo quasi del tutto inefficiente il biorisanamento. In Olanda si sono trovati di fronte a questo problema quando, utilizzando le piante per un intervento di bonifica, non è stata ottenuta, al contrario delle previsioni, alcuna riduzione nella contaminazione poiché i inquinanti erano fortemente adesi ai colloidi del suolo (Chaundhry *et al.*, 2005). Sembra che le piante abbiano, infatti, delle limitate capacità di degradazione dei composti organici in special modo dei composti contenenti più cicli aromatici (Dietz e Shnoor, 2001). Si può quindi affermare che, al contrario delle enormi promesse, il biorisanamento soffre di limitazioni per la bonifica dei suoli contaminati. Le biotecnologie stanno trasformando il mondo dell'agricoltura, aggiungendo nuove caratteristiche alle piante. Oltre ai programmi tradizionali di miglioramento genetico volto ad aumentare la produzione, migliorare la qualità della specie ed altro, la biologia molecolare apre le porte al cosiddetto valore aggiunto di cui fa parte anche il fitorisanamento (Gleba *et al.*, 1999). La biologia molecolare è stata già utilizzata con successo per molti anni in agricoltura. Tra i primi transgeni ricordiamo la soia "Roundup" della Monsanto in grado di tollerare l'erbicida glifosato. Le piante transgeniche offrono numerosi potenziali anche per il biorisanamento: basso costo di produzione, stabilità del prodotto (Hood, 2002), velocità ed ecocompatibilità (Rugh, 2004). La biologia molecolare è già stata utilizzata nel fitorisanamento, oltre agli innumerevoli esempi volti ad incrementare l'assorbimento di metalli pesanti (Rugh *et al.*, 1998; Bizily *et al.*, 1999; Kraemer e Chardonens,

2001), ci sono stati anche esempi per la bonifica di contaminanti organici. Sono state ottenute piante geneticamente modificate esprimenti geni eterologhi. Un esempio è l'espressione del gene umano P450, tali piante erano capaci di metabolizzare il TCE 640 volte di più del controllo (Doty *et al.*, 2000). French *et al.*, (1999) esprimendo un enzima batterico (pentaeritritolo tetranitrato reductasi), ottennero piante in grado di degradare il trinitrotoluene (TNT). Questi precedenti hanno mostrato che l'approccio biotecnologico può essere utilmente sfruttato nel fitorisanamento di composti organici (Singh e Jain, 2003) attirando l'attenzione ed i favori dell'opinione pubblica (Suresh e Ravishankar, 2004). Comunque a tutto oggi, nella quasi totalità dei casi, queste piante, a causa dello scetticismo dell'opinione pubblica verso il rilascio nell'ambiente di organismi geneticamente modificati, sono state testate solo in laboratorio, valutandone quindi l'efficacia su substrati artificiali in condizioni controllate (Chaudhry *et al.*, 2005). Sembra però che le cose stiano cambiando, in qualche caso si è potuto giungere alle prove in campo, testando l'effettiva capacità fitorisanatrice in condizioni non controllate, un esempio sono le piante transgeniche che esprimevano la glutatione S transferasi per l'accumulo dei solfati e dei seleniti (Smits, 2004).

Il processo cui siamo maggiormente interessati è la fitodegradazione, cioè la degradazione di contaminanti che può avvenire ad opera di enzimi interni alle piante o da esse secreti nella rizosfera (Newman *et al.*, 1997). La fitodegradazione può riguardare solo contaminanti organici, gli inorganici infatti possono solo essere rimossi, stabilizzati o conservati. I composti organici possono essere catabolizzati dagli enzimi delle piante fino alla mineralizzazione o degradati parzialmente ad intermedi stabili che possono essere poi trattiene nelle piante stesse (McCutcheon *et al.*, 2003). La degradazione enzimatica può avvenire sia a livello radicale sia nei tessuti e può coinvolgere anche l'attività microbica (Barac *et al.*, 2004). La fitodegradazione coinvolge alcuni degli enzimi coinvolti nella fitoestrazione come: dealogenasi, nitrilasi, fosfatasi ed altri che, aggiungendo gruppi laterali, incrementano la solubilità del polluyente e ne rendono possibile la coniugazione, che è la fase iniziale in alcuni tipi di fitodegradazione (Wolfe e Hoehamer, 2003). Tale tecnica può essere ottimizzata selezionando specie che già producono enzimi per la fitodegradazione oppure ottenendo, attraverso l'ingegneria genetica, piante in grado di produrre alti livelli di attività enzimatiche (French *et al.*, 1999; Hannink *et al.*, 2001). L'uso delle piante per la decontaminazione degli acquitrini contaminati da inquinanti organici ed inorganici è conosciuto da centinaia di anni ed è alla base dello sviluppo delle "Paludes" per il trattamento delle acque reflue municipali o degli scarichi industriali (Hartman, 1975). L'idea di utilizzare le piante per la bonifica dei suoli contaminati da composti organici è molto recente. Il concetto si è sviluppato in seguito all'osservazione che nei suoli coltivati i composti organici erano degradati più facilmente che in quelli incolti (Aprill e Sims, 1990; Burken e Schnoor, 1998; Cunningham e Ow, 1996; Hedge e Fletcher, 1996).

Oltre ai meccanismi diretti di assorbimento e degradazione dei polluenti, le piante possiedono anche un altro meccanismo, esse sono capaci di rilasciare nella rizosfera enzimi potenzialmente utilizzabili nel fitorisanamento. Questo meccanismo è noto come fitorisanamento *ex planta* (Salt *et al.*, 1998). Tra gli enzimi rilasciati dalle piante ci sono le dealogenasi, le nitroriduttasi, le perossidasi e le laccasi. Tali enzimi sono stati efficientemente testati su numerosi contaminanti organici spaziando dai solventi agli esplosivi (Schnoor *et al.*, 1995; Boyajian e Carreira, 1997; Carriera e Wofe, 1995; Duran e Esposito, 2000; Jaouani *et al.*, 2005; Attanasio *et al.*, 2005; Sonoki *et al.*, 2005; Hannink *et al.*, 2001).

## 1.10 Laccasi e risanamento

I funghi filamentosi, appartenenti agli *Omobasidiomiceti*, offrono un grande potenziale per le applicazioni industriali, mediche e nel campo del biorisanamento. Essi secernono enzimi nel mezzo di coltura in quantità e con un'attività che non ha eguali in altri funghi. Principalmente secernono metalloenzimi e più di tutti le laccasi. Questi enzimi hanno la possibilità di essere applicati in molti campi in quanto sono capaci di degradare numerosi inquinanti recalcitranti come quelli prodotti dall'industria della carta e del legno (Alves *et al.*, 2004). Nel loro ambiente naturale i funghi del marciume bianco sono capaci di produrre varie isoforme di ossidasi extracellulari e perossidasi coinvolte nella degradazione di complessi naturali come la lignina e gli acidi umici (Palmieri *et al.*, 2000). Il sistema ossidativo non specifico di tali funghi è capace di degradare oltre alla lignina anche altri composti aromatici recalcitranti. Gli enzimi extracellulari coinvolti nella degradazione includono diverse classi di perossidasi, ossidasi e laccasi (Jouani *et al.*, 2005).

Le laccasi (benzenediol: ossigeno riduttasi EC 1.10.3.2) sono il componente più semplice della famiglia delle ossidasi a rame (McGuirl e Dooley, 1999), sono enzimi extracellulari che contengono 4 atomi di rame nel sito catalitico (figura 1.8).

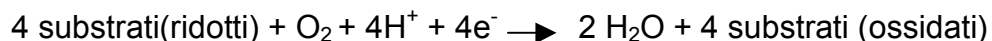
Per la prima volta le laccasi sono state descritte da Yoshida nel 1883. Questo fa delle laccasi uno dei primi enzimi ad essere stati descritti (Shleev *et al.*, 2005). La produzione di laccasi è comune a molti funghi basiodimiceti, specialmente in quelli coinvolti nella degradazione del legno e nella decomposizione. Le laccasi presenti nel regno dei funghi sono molteplici. Esse sono state trovate in molte varietà non solo nei funghi basiomiceti ma anche in specie non ligninolitiche come gli ascomiceti, *aspergillus* e *neuspora*. (Breen e Singleton, 1999). Le laccasi in fungo svolgono molte funzioni. Esse sono coinvolte nella pigmentazione dei conidi e nel processo di infezione durante le patogenesi. In questo caso sono una risposta alla reazione di difesa dell'organismo ospite, polimerizzando i fenoli prodotti dalle piante e rendendoli meno tossici. Sicuramente il ruolo primario delle laccasi fungine, in combinazione con le perossidasi, è comunque la decomposizione delle lignine (Marques De Souza *et al.*, 2004). Le laccasi sono prodotte anche in altri regni con diverse funzioni: nei batteri la laccasi è coinvolta nella resistenza agli UV delle spore; nelle piante superiori il legame dei precursori fenolici e della laccasi è parte del processo di lignificazione e delignificazione delle pareti cellulari; negli insetti è coinvolta nella produzione della melanina come primitiva difesa contro i parassiti e nella formazione della cuticola. La laccasi sembra addirittura coinvolta nei meccanismi di infezione del fungo *Cryptococcus neoformans*, patogeno umano, che ne ha utilizzato tutte queste funzioni come fattore di virulenza (Williamson *et al.*, 1998). In conclusione le laccasi sono degli enzimi eccezionalmente versatili, che catalizzano una semplice reazione alla base di grandi trasformazioni e per questo hanno un grande potenziale per le biotecnologie (Claus, 2003; 2004).

Nei funghi del marciume bianco le laccasi sono prodotte costitutivamente a bassi livelli come enzimi multipli extracellulari. La produzione può essere considerevolmente incrementata da molte sostanze principalmente aromatiche o fenoliche correlate con la lignina (Marques De Souza *et al.*, 2004). Le laccasi fungine sono isoenzimi che formano complessi multimerici. La massa dei monomeri varia tra 50 e 100 kDa. Per l'attività catalitica è richiesto un minimo di 4 atomi di rame per unità, tali atomi sono divisi in tre tipi a seconda della posizione e della funzione. Il rame di tipo 1 ha una coordinazione triangolare con 2 istidine, una cistidina ed un



altro ligando che varia a seconda della specie (figura 1.9). Questo aminoacido può fortemente influenzare il potenziale di ossidazione e la regolazione dell'enzima. Questo atomo di rame di tipo 1 è anche responsabile della colorazione blu delle proteine a rame ed è il sito in cui avviene l'ossidazione del substrato. Gli atomi di tipo 2 e 3 formano il sito catalitico trinucleare dove avviene la riduzione della molecola di ossigeno ed il rilascio della molecola di acqua (Claus, 2004). Il tipo 2 attiva la molecola di ossigeno ed il tipo 3 è responsabile per la cattura dell'ossigeno. Il meccanismo di trasferimento degli elettroni e quello di riduzione dell'ossigeno non è stato però ancora chiarito (Shleev *et al.*, 2005).

Le laccasi catalizzano una ossidazione del substrato con la rimozione di un singolo elettrone, riducendo simultaneamente una molecola O<sub>2</sub> ad H<sub>2</sub>O, lo schema riassume la reazione:



(Marques De Souza *et al.*, 2004; Mattinen *et al.*, 2005).

Substrati per una ossidazione mediata dalle laccasi sono tutte quelle sostanze che producono un radicale libero perdendo un elettrone. Generalmente l'ossidazione di un substrato dalle laccasi porta alla polimerizzazione dei prodotti con coppie di reazioni ossidative C-O e C-C (Shleev *et al.*, 2005).

Le reazioni catalizzate delle laccasi sono importanti nella sintesi di numerose sostanze umiche e ligniniche. Lo spettro di azione delle laccasi varia dai complessi organici a quelli inorganici anche a seconda dell'organismo che le produce: funghi, piante, batteri. Numerose sostanze possono essere oggetto di catalisi dell'ossidazione in posizione orto o para: fenoli, benzotoli, aniline, idrocarburi policiclici aromatici, insetticidi contenenti fosforo organico, gas nervino (Alexandre e Zhulin, 2000), tannini, melanina, alcaloidi, ferrocianidine, difenoli, aminofenoli, polyfenoli, polyamine, lignine e arildiamine e di sostanze inorganiche, cioè tutte quelle sostanze che hanno un potenziale redox non troppo alto (Shleev *et al.*, 2005). Le laccasi sono generalmente prodotte insieme agli altri enzimi ligninolitici ma, in *Pycnopus cinnabarinus* e *Coriolopsis rigida*, due basidiomiceti abili nella degradazione di composti aromatici, le laccasi sono gli unici enzimi ligninolitici secreti. Ciò lascia pensare che le laccasi sono gli unici responsabili della degradazione di tali composti (Saparrat *et al.*, 2002 ; Eggert *et al.*, 1996). Numerosi studi hanno, infatti, confermato che le laccasi fungine, *in vitro*, sono in grado di rimuovere numerose sostanze fenoliche altamente tossiche (Hammel, 1995; Palmieri *et al.* 2000; Rao *et al.*, 2003). Questi enzimi non sono specifici e di conseguenza possono mediare varie reazioni:

- il cross link di monomeri, ovvero i composti fenolici ossidati dalla laccasi reagiscono tra di loro per formare dimeri, oligomeri o polimeri;
- la degradazione di polimeri, ovvero i radicali liberi generati dalla laccasi rompono i legami covalenti e rilasciano monomeri (Claus, 2004);
- la rottura dei cicli dei composti aromatici (Claus *et al.*, 2002; Duran e Esposito, 2000).

Ampio spettro di specificità, alti livelli di attività, uso dell'ossigeno come cofattore sono le caratteristiche che fanno delle laccasi oggetto di studio per molti processi industriali. Tentativi di utilizzare le laccasi su substrati fenolici sono stati fatti nel campo dell'industria della carta, della cellulosa, tessile e nelle applicazioni dell'industria alimentare, come nel procedimento di produzione di prodotti da forno lievitati dove la laccasi può aumentare il volume del pane (Mattinen *et al.*, 2005).

Sono state riportate applicazioni nel campo dei biofuel (Barton *et al.*, 2002), biosensori (Freire *et al.*, 2001), biodegradazione di xenobiotici (Balakshin *et al.*, 2001), immuno saggi (Kuznetsov *et al.*, 2001), sintesi organica (Shleev *et al.*, 2005). Le laccasi possono essere utilizzate anche in processi di detossificazione di coloranti, rimozione di fenoli dal vino, trasformazione di steroidi e antibiotici. Le laccasi possono agire direttamente con le sostanze fenoliche o possono servirsi di mediatori, che ne facilitano l'attività su un ampio spettro di substrati (Breen e Singleton, 1999). Le laccasi, a causa dell'ingombro sterico, non possono entrare in diretto contatto con alcuni polimeri. Tali composti possono essere comunque catalizzati dalle laccasi con l'intervento dei mediatori chimici. Questi sono piccole molecole organiche o composti metallici che, ossidati e attivati dalle laccasi, mediano la catalisi radicale e la depolimerizzazione di grosse molecole organiche (Claus, 2004). Le principali aree di applicazione delle laccasi resta comunque la detossificazione dei rifiuti e la trasformazione dei coloranti (Jaouani *et al.*, 2005). Yague *et al.* (2000) hanno studiato l'abilità della laccasi da *Coriopsis gallica* nella degradazione dei tannini contenuti nelle acque di scarto prodotte dalla industria della birra che rappresenta un importante fonte di inquinamento a causa dell'elevato contenuto di polifenoli. Un altro esempio è dato dall'utilizzo della laccasi da *Trametes* nella rimediazione delle acque derivanti dalle distillerie. I prodotti di scarto prodotti durante la produzione dell'etanolo nella fermentazione della canna da zucchero, chiamati vinacce, sono ricchi di sostanze organiche solubili di un intenso colore blu (Gonzalez *et al.*, 2000). Anche le acque di vegetazione delle olive possono essere trattate con le laccasi. Numerosi studi che sono stati condotti a riguardo mostrano la capacità delle fenolo-ossidasi dei funghi basidiomiceti di abbassare la tossicità dei reflui delle industrie dell'olio (D'annibale *et al.*, 1999; 2000).

La grande stabilità della laccasi in soluzione, le blande condizioni di reazione per la catalisi e la selettività fa delle laccasi candidati ideali per la sintesi chimica (Timo *et al.*, 2004). Devono essere però condotti studi sulla produzione industriale e purificazione di laccasi a basso costo. I costi infatti delle laccasi commercializzate sono molto elevati, i prezzi cambiano a seconda della ditta e della purezza dell'enzima stesso, ma si giunge fino a più di 10 dollari per 1U. La tecnologia del DNA ricombinante offre quindi un interessante soluzione per la riduzione dei prezzi (Minussi *et al.*, 2002).

Le laccasi hanno un enorme potenziale per le biotecnologie (Alexandre e Zhulin, 2000) grazie ad un'alta stabilità termica, fino a 60°C, ad una bassa specificità di substrato ed un ampio spettro di pH su cui agiscono (Mayer e Staples, 2002). La mancanza di inibizione da substrato accoppiata con il suo elevato tasso di ossidazione, da 10 a 100 volte superiore a quello di altre perossidasi, fanno delle laccasi un candidato ideale per lo sviluppo di processi enzimatici (Crestini *et al.*, 2003). L'attività specifica della laccasi aumenta in proporzione con il potenziale redox dell'enzima stesso. In generale le laccasi da funghi hanno un potenziale redox maggiore di quello delle piante (Kurniawati e Nicell, 2005).

Tutto questo fa della laccasi un candidato ideale per lo sviluppo di processi di decontaminazione (Rao *et al.*, 2003).

In banca dati sono disponibili più di 220 sequenze aminoacidiche (NCBI) di laccasi. La molteplicità delle laccasi, in pianta, è stata ampiamente descritta. Sono stati isolati vari geni codificanti tale enzima in molte piante tra cui l'acero (LaFayette *et al.*, 1995), il pioppo (Ranocha *et al.*, 1999) ed il tabacco (Kiefer e Meyer *et al.*, 1999). Sebbene ci siano delle regioni molto conservate vicino ai centri catalitici, le laccasi hanno un basso livello di omologia anche tra le diverse specie di piante (Ranocha *et*

*al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2003). Si ritiene che i geni codificanti le laccasi siano presenti in tutte le piante superiori probabilmente in più copie (Gavnholt e Larsen, 2002).

Visto che l'omologia di sequenza del gene eterologo con un gene endogeno può impedire l'overespressione del transgene in pianta, a causa della co-soppressione (Jorgensen, 1990), si è pensato di esprimere in pianta un gene fungino. Per quanto riguarda i funghi, vari geni sono stati isolati e caratterizzati. Sono stati descritti 4 differenti geni in *Rhizoctonia solani* (Wahleithner *et al.*, 1996), 3 geni nel basidiomicete I-62, 4 geni da *P. sajor caja* (Mansur *et al.*, 1998). Comunque tutti questi numerosi isoenzimi sembrano essere varianti post-trascrizionali dello stesso prodotto genico (Mansur *et al.*, 1998). Varie specie del genere *Pleurotus* sono stati descritti come produttori di laccasi (Leonowicz *et al.*, 2001). Nel caso di *P. ostreatus*, facente parte della famiglia dei basidiomiceti, sono stati identificati cinque isoenzimi secreti. La diversità biochimica di tali forme isoenzimatiche della laccasi sembra sia dovuta ad una molteplicità di geni (Piscitelli *et al.*, 2005). L'isoenzima prodotto più abbondantemente è una fenolo-ossidasi chiamata POXC (Palmieri *et al.*, 1993; Giardina *et al.*, 1995). Gli altri quattro isoenzimi che sono stati purificati e caratterizzati da questo fungo sono: POXA1w, POXA1b (Palmieri *et al.*, 1997), POXA3a e POXA3b (Palmieri *et al.*, 2000).

Le laccasi presentano un potenziale redox differente a seconda della specie di fungo che le produce. Inoltre le laccasi presentano caratteristiche differenti per quanto riguarda la stabilità a differenti pH e temperature. Tale caratteristiche influiscono sulla reattività dell'enzima stesso (Crestini *et al.*, 2003). La laccasi codificata dal gene *poxA1b* risulta migliore di molte altre laccasi sia in base al suo alto potenziale redox sia in base ad un stabilità maggiore a pH alcalini (Giardina *et al.*, 1999). Proprio in funzione di queste peculiarità, in questo progetto è stato espresso in tabacco il gene *poxA1b* da *P. ostreatus* codificante la laccasi POXA1b (Palmieri *et al.*, 1997).

## 1.11 SCOPO

In funzione dei limiti del biorisanamento, questo progetto di ricerca ha avuto come scopo l'ottenimento di piante per la bonifica delle acque e dei suoli contaminati da composti organici. Poiché le piante non presentano enzimi altamente efficaci per poter degradare tali composti *in situ*, è stato pensato un approccio di tipo biotecnologico. Il presente studio ha avuto, quindi, come obiettivo primario l'ottenimento, di piante geneticamente modificate in grado di sintetizzare e secernere una fenolo-ossidasi per il trattamento di suoli contaminati da sostanze di natura organica. In particolare si è proceduto al trasferimento nel genoma di tabacco di una laccasi e del gene *bar* per la bonifica dei suoli e delle acque contaminate da composti organici.

La scelta del tabacco come pianta si fonda su vari aspetti. In particolare esso assume importanza strategica nello sviluppo di tecnologie per usi alternativi delle colture agricole. L'uso tradizionale di questa specie come droga incontra crescenti perplessità, non solo per i noti motivi salutistici, ma anche per ragioni economiche, essendo il tabacco una coltura sempre più malvolentieri sostenuta dai contribuenti dell'EU. D'altro canto, il fatto di essere una coltura non alimentare, la sua diffusione in molte regioni italiane ed europee e la notevole produzione di massa verde la rendono attraente per usi alternativi, in particolare, per la produzione di piante geneticamente modificate (McGrath, 2002). Inoltre, poiché il tabacco mostra una maggiore efficienza di manipolazione genetica rispetto ad altre specie vegetali,

possono essere applicate a questa specie protocolli di trasferimento genico che limitino o aboliscano l'impiego di geni marcatori di resistenza ad antibiotici per la selezione *in vitro* degli eventi di trasformazione (de Vetten *et al.*, 2003). Ciò comporta la conseguente riduzione del rischio ambientale così come richiesto dall'ultima legislazione dell'UE per l'emissione deliberata di organismi geneticamente modificati nell'ambiente (Direttiva 2001/18/CE).

Il presente studio ha avuto, quindi, come scopo l'ottenimento di piante di tabacco transgeniche in grado di esprimere il gene *poxA1b* da *Pleurotus ostreatus* codificante una laccasi reso disponibile dal Prof. Sanna del Dipartimento di Biochimica dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II".

Un ulteriore scopo del presente lavoro e' stato l'ottenimento di piante di tabacco esprimenti il gene *bar* per la degradazione del tricloroetilene, presso il laboratorio della Dr Lee Newman Università del Sud Carolina.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Substrati di Coltura

Per la preparazione di tutti i substrati è stata utilizzata acqua demineralizzata con deionizzatore Millipore ad osmosi inversa fino alla conducibilità elettrica di  $18,2 \text{ Mohm} \times \text{cm}^{-1}$ . La reazione finale dei vari substrati è stata portata a pH 5,8 con l'aggiunta di HCl 0,1N o KOH 0,1N. La sterilizzazione è stata condotta in autoclave ad una temperatura di  $120^\circ\text{C}$  ed alla pressione di 0,12 Mpa per 20 minuti. Tutte le operazioni in sterilità sono state eseguite sotto cappa a flusso laminare orizzontale. Gli antibiotici, previamente sterilizzati per filtrazione, sono stati aggiunti ai mezzi di coltura autoclavati quando questi hanno raggiunto la temperatura di  $40^\circ\text{C}$  circa. I substrati sono poi stati dispensati in capsule Petri di 10 cm di diametro (20 ml per capsula) per la coltura dei batteri su substrato solido e per la trasformazione genetica e selezione degli espianti trasformati. Per la micropropagazione delle piantine sono stati utilizzati vasi di coltura in vetro Pyrex da 500 ml (50 ml per vaso) o contenitori in plastica da 150 ml (25 ml per contenitore). I substrati utilizzati sono stati, per i batteri:

- LB (*Luria Bertani Broth*, Miller, 1972) addizionato con gli antibiotici necessari, liquido o solido (agar, Oxoid  $15 \text{ g l}^{-1}$ ).

Per i tessuti vegetali e le piante:

- POC, basato sulla formulazione di Murashige e Skoog (1962), con aggiunta di saccarosio  $30 \text{ g l}^{-1}$  e Microagar (Duchefa)  $8 \text{ g l}^{-1}$  quale gelificante.

- RTE, basato sulla formulazione di Murashige e Skoog (1962) addizionato con gli ormoni benzil-amminopurina (BAP,  $2 \text{ mg l}^{-1}$ ) e l'acido indolacetico (IAA,  $0,4 \text{ mg l}^{-1}$ ).

Tutte le operazioni in sterilità sono state eseguite sotto cappa a flusso laminare orizzontale il cui interno è stato reso sterile prima dell'uso per azione di una lampada germicida a raggi UV tenuta accesa per almeno 20 minuti ed il cui piano di lavoro era stato preventivamente trattato con alcool etilico denaturato al 70%. Tutti gli strumenti di metallo non sterili sono stati sterilizzati alla fiamma di un becco Bunsen.

### 2.2 Crescita e dosaggio di piante di tabacco e microrganismi usati

Negli esperimenti sono state impiegate piante di *Nicotiana tabacum* cv Samsun NN, micropropagate ed allevate in armadi di crescita alla temperatura di  $24^\circ\text{C}$  e con fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio. I nodi sono stati micropropagati ogni 30 giorni, trasferendoli in asepsi in contenitori sterili di plastica da 150 ml, contenenti 25 ml di mezzo di coltura.

Piante di tabacco controllo (*Nicotiana xanthi*) e piante putative transgeniche sono state seminate in suolo sotto luce fluorescente. Sono state fatte talee da ogni pianta, in modo da avere disponibili 5 repliche per ogni campione. Una volta che le piante hanno raggiunto più o meno 15 cm sono state tagliate e messe in una soluzione *Hoagland* fino a che traspirassero approssimativamente 200 ml per un periodo di 5 giorni. Dopo di che le piante sono state trasferite in beute da 500 ml con un braccio laterale (Figura 2.1). Le beute sono state avvolte in foglie di carta alluminio per prevenire la crescita d'alghe e la fotodegradazione del TCE e del TCAA. Alla superficie della beuta è stata messa una piastra di vetro e sigillata con stucco e *fluorolube* per prevenire la volatilizzazione all'esterno della beuta. Le piante sono state sistemate sotto una cappa a flusso con lampade di crescita a 400 Watt.

Le piante sono state dosate attraverso il braccio laterale con intervalli di concentrazioni di TCE e TCAA tra 100ppm a 300ppm. Ad ogni dosaggio, campioni d'acqua sono stati presi da ogni beuta saggiata per determinare l'esatta concentrazione sia di TCE che TCAA.

Dopo il periodo di dosaggio (5 giorni) un altro campione d'acqua è stato prelevato da ogni beuta per determinare la concentrazione finale di TCE e TCAA. Inoltre, è stata valutata la tossicità, comparando il tasso d'assorbimento dell'acqua, l'afflosciamento della foglia e l'ingiallimento delle foglie. I tessuti delle piante di tabacco sono stati divisi in foglie, fusti al di sopra e di sotto la piastra di vetro e radici. Ogni tessuto è stato pesato per determinare la biomassa della pianta. Una volta pesati, i tessuti sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C fino alle successive analisi.

Per la manipolazione dei vettori è stato utilizzato il ceppo di *Escherichia coli* DH5a (Takara). Per la trasformazione genetica è stato utilizzato il ceppo di *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Ooms *et al.*, 1982).

### 2.3 Geni e Vettori utilizzati

Nel presente lavoro sono stati utilizzati differenti vettori (Figura 2.2);

a) di clonaggio pGEM 7Zf in cui era stato inserito il cDNA del gene *poxA1b* (Giardina *et al.*, 1999) e gentilmente fornito dal prof. Giovanni Sannia (Dipartimento di Chimica e Biochimica dell'Università di Napoli "Federico II");

b) di clonaggio pGreen 35S (pG35S) derivato dal pJIT60 (Guerineau e Mullineaux, 1993). Esso reca il promotore costitutivo del gene 35S del virus del mosaico del cavolfiore (CAMV), una regione che permette il clonaggio del gene d'interesse per la presenza di siti di restrizione unici (MCS), la sequenza di terminazione del gene 19S del CaMV;

c) di espressione in pianta pG0029 contenente, nel T-DNA, il gene *npt II* e la regione di clonaggio con siti unici, mentre fuori dal T-DNA è presente il gene *npt I* di resistenza alla kanamicina per la selezione dei batteri;

di replicazione in cellule di agro batterio pSoup. Il vettore è stato utilizzato per la co-trasformazione di *A. tumefaciens* con il vettore binario per l'espressione in pianta di *poxA1b* basato sul pG0029. La co-trasformazione è necessaria in quanto il pG0029 non possiede il gene codificante la replicasi (*repA*) responsabile dell'inizio della replicazione in *A. tumefaciens*, mentre questo è recato da pSOUP e codifica per una replicasi che, agendo in *trans*, riconosce come sito d'inizio di replicazione la sequenza pSa-ORI presente nel vettore binario.

### 2.4 Costruzione del vettore di espressione e trasformazione di *Agrobacterium tumefaciens*

La costruzione del vettore d'espressione in pianta recante il gene d'interesse è stata intrapresa con l'ottenimento del frammento *poxA1b* tramite reazione di amplificazione PCR del DNA plasmidico contenuto nel vettore pGEM 7Zf con una specifica coppia di *primer*, precedentemente disegnata, (Tabella 2.1) ottenendo così i siti di restrizione *SacI* e *XbaI* rispettivamente al 5' ed al 3' della sequenza amplificata.

Le amplificazioni sono state fatte mediante l'enzima *Taq* Polimerasi "Pfu" in accordo con quanto suggerito dalla *Stratagene*. Il frammento è stato sottoposto a digestione, rispettivamente, con le endonucleasi di restrizione sopra riportate (Promega) e purificati dal gel mediante l'uso del kit "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega) e clonati nel vettore pG35S, digerito con l'endonucleasi opportuna, mediante ligazione con la DNA ligasi T4 (Promega) usando un rapporto vettore/inserto 1/3.

Il prodotto della reazione di ligazione è stato impiegato per la trasformazione cellulare di cellule competenti di *Escherichia coli* ceppo DH5 $\alpha$  effettuata attraverso il metodo dello "shock termico". Le cellule batteriche sono state piastrate in scatola Petri contenente il terreno di coltura batterico LB con aggiunta dell'antibiotico ampicillina e di IPTG e X-GAL per evidenziare le cellule batteriche trasformate. L'incubazione delle piastre è stata effettuata ad una temperatura di 37 °C per 16 ore, successivamente, la selezione delle colonie recante il vettore in questione è stata effettuata attraverso analisi di amplificazione del DNA utilizzando come *primer* (Tabella 2.1) delle sequenze analoghe al promotore e al terminatore del gene 35S.

Il pDNA estratto dai cloni di *E. coli* contenenti i plasmidi pG35S::*poxA1b* è stato sottoposto a digestione con l'endonucleasi di restrizione *EcoRV* (Promega), per isolare la cassetta promotore-cDNA-terminatore d'interesse. I frammenti, isolati e purificati, sono clonati nel vettore pG0029 e su alcune colonie sono state effettuate analisi PCR per l'identificazione delle colonie trasformate. Per verificare la corretta sequenza della sequenza *poxA1b* è stato effettuato un sequenziamento mediante il *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem) impiegando il sequenziatore *3100 Genetic Analyzer* ABI PRISM disponibile presso il Dipartimento.

Il vettore binario pG002935SpoxA1b è stato impiegato per la trasformazione cellulare di cellule competenti di *Escherichia coli* ceppo DH5 $\alpha$  effettuata attraverso il metodo dello "shock termico" e successivamente trasferito nell'agrobatterio tramite elettroporazione (Cangelosi *et al.*, 1991). La trasformazione delle cellule di *A. tumefaciens* è stata fatta mediante elettroporazione con la seguente procedura sperimentale: 1  $\mu$ g di plasmide pSoup e del vettore binario pG002935SpoxA1b sono stati aggiunti a 40  $\mu$ l di cellule competenti. La soluzione è stata trasferita nella cuvetta e sottoposta ad impulso elettrico dell'intensità di 2,5 KV utilizzando l'elettroporatore "*E. coli PULSER*" della BioRad. In seguito sono stati aggiunti 0,8 ml di substrato LB ai batteri e, dopo essere stati incubati a 28°C in agitazione per due ore, essi sono stati piastrati su LB solido contenente kanamicina 50 mg l<sup>-1</sup>. Le piastre sono state incubate a 28°C per 48 ore. I cloni positivi alla selezione su kanamicina 50 mg l<sup>-1</sup>, rifampicina 50 mg l<sup>-1</sup> e streptomicina 50 mg l<sup>-1</sup>, sono stati analizzati tramite analisi PCR del DNA.

## 2.5 Trasformazione stabile di tabacco mediante *A. tumefaciens*

Giovani foglie di piante di tabacco allevate *in vitro* su substrato MS sono state usate per la trasformazione stabile in accordo con quanto riportato da Horsch *et al.* (1985). Le foglie tagliate in sezioni di 1 cm<sup>2</sup>, sono state trasferite in capsule Petri sterili contenenti 30 ml di sospensione batterica, incubate per 30 minuti a temperatura ambiente, asciugate su carta Whatman 3MM sterile ed infine poste su substrato RTE ed incubate a 26°C al buio. Dopo 48 ore le sezioni sono state trasferite su RTE addizionato con kanamicina (100 mg l<sup>-1</sup>) e Claforan (500 mg l<sup>-1</sup>, Duchefa) e poste nuovamente a 26°C per 3-4 settimane. I germogli trasgenici putativi differenziati,

sono stati tagliati e trasferiti su MS addizionato con kanamicina 100 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> e claforan 250 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>, fino alla radicazione.

## 2.6 Caratterizzazione molecolare delle linee di tabacco transgeniche

### 2.6.1 Estrazione del DNA genomico

Il DNA genomico è stato isolato da foglie cresciute *in vivo* modificando il protocollo di Michiels *et al* (2003). Tale metodo è stato scelto poiché è possibile ottenere DNA di ottima qualità, privo di contaminazioni da composti fenolici e in quantità sufficiente per la reazione di amplificazione, da pochi milligrammi di tessuto fresco.

Sono stati macinati 200-300g di tessuto fresco in azoto liquido in 1ml di buffer d'estrazione (Tris-HCl pH8 100mM; NaCl 1,4M; EDTA 20mM; β-mercaptoetanol 0,2%; polivinilpirrolidone 2% p/v; CTAB 2% p/v); il tutto è stato incubato a 60°C per 60 minuti e seguito dall'aggiunta di 1ml di una soluzione di cloroformio: alcool isoamilico (24:1 v/v) e centrifugato per 5 minuti a 14.000 rpm ad una temperatura di 20°C. A seguito del trasferimento del surnatante in una nuova provetta, è stato aggiunto ad essa una soluzione di 1μl di RNase A alla concentrazione di 10 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> ed il tutto è stato incubato a 37°C per 30 minuti per la degradazione dell'RNA.

In seguito, alla soluzione sono stati aggiunti 1ml di una soluzione contenente cloroformio ed alcool isoaminico nel rapporto di 24:1; il tutto è stato centrifugato per 5 minuti alle condizioni sopra descritte.

Alla fase acquosa surnatante, trasferita in un nuovo tubo sterile, sono stati aggiunti, circa 2/3 del volume d'isopropanolo freddo ed il tutto è stato incubato a 25°C per 1 ora e successivamente i campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 14.000 rpm a 8°C. Il pellet precipitato è stato sottoposto ad un lavaggio mediante 1ml di una soluzione d'etanolo al 70% per due volte e lasciato ad asciugare all'aria. Il DNA è stato risospeso in H<sub>2</sub>O sterile e conservato a - 20°C.

### 2.6.2 Reazione di amplificazione degli acidi nucleici

L'analisi di amplificazione del DNA è stata eseguita con l'impiego di un *thermocycle PCR* (BioRad). Il DNA genomico è stato estratto da foglie di piante allevate *in vivo* seguendo il protocollo riportato sopra. Il DNA plasmidico è stato isolato mediante il Kit d'estrazione QIAprep Midi (Qiagen). Per l'amplificazione del DNA sono stati impiegati i primer *forward* e *reverse* relativi al gene *poxA1b* (come riportato in Tabella 2.1). Ciascuna reazione di amplificazione è stata condotta in 25 ml di una miscela di reazione secondo le istruzioni del Kit utilizzato (Invitrogen).

Il programma di amplificazione adottato è stato il seguente:

- 1 ciclo a 94°C per 5 minuti per ottenere la denaturazione del DNA;
- 30 cicli comprendenti: una fase di denaturazione a 92°C per 0,5 minuto, una fase di "annealing" a 55°C per 1 minuto ed una fase di elongazione a 72°C per 1 minuto;
- 1 ciclo terminale di elongazione a 72°C per 7 minuti.

Per la reazione di amplificazione sono stati utilizzati dei *primer* specifici per il gene *bar* (tabella 2.1) e quindi per verificare l'espressione del gene nelle piante di tabacco



trasformate e dei *primer* specifici per il gene dell'actina, il quale è stato usato come controllo positivo.

Ciascuna reazione di amplificazione è stata condotta in 25 ml di una miscela di reazione. Il programma di amplificazione adottato è stato il seguente:

- 1 ciclo a 94°C per 2 minuti per ottenere la denaturazione del DNA;
- 30 cicli comprendenti: una fase di denaturazione a 94°C per 0,5 minuti, una fase di "annealing" a 56°C per 0,5 minuti ed una fase di elongazione a 72°C per un minuto;
- 1 ciclo terminale di elongazione a 72°C per 5 minuti.

In seguito, i prodotti di amplificazione sono stati caricati su gel di agarosio all'1% contenente bromuro di etidio 40 ppm e sottoposti a migrazione elettroforetica ad 80 V per 60 minuti in tampone TAE (Tris acetato 4 mM; EDTA 1 mM) 1x. Il gel è stato osservato mediante analizzatore d'immagine a raggi UV (BioRad) e fotografato. Le dimensioni degli amplificati ottenuti, espresse in coppie di basi (cb), sono state valutate per confronto con quelle di un marcatore avente peso molecolare noto (1 kb Ladder; Gibco-BRL).

Per l'analisi di amplificazione del DNA genomico delle piante transgeniche come controllo positivo nell'analisi PCR sono state utilizzate cellule di E. Coli recanti il plasmide PG002935SpoxA1b. Come controllo negativo è stato utilizzato il DNA genomico di una pianta di tabacco non trasformata.

### 2.6.3 RT-PCR

L' RNA è stato estratto da foglie congelate di ogni campione usando il kit per l'isolamento dell'RNA della Promega. La quantità di RNA è stata determinata usando il Nanodrop spettrometro. Per eseguire la sintesi del cDNA è stato necessario ottenere un minimo di 100ng/μl di RNA. La qualità dell'RNA è stata determinata usando un Agilent Technologies bioanalyzer.

Una volta estratto, l'RNA è stato trascritto in cDNA usando il kit della Promega "reverse transcription" utilizzando esameri random. I campioni così ottenuti sono stati conservati a -20°C fino alle analisi successive.

### 2.6.4 Estrazione delle proteine solubili totali e quantificazione delle proteine totali estratte

Giovani foglie (tabacco) prelevati da piante transgeniche e non allevate in vaso, sono state triturate in presenza di azoto liquido ed utilizzate per l'estrazione delle proteine solubili totali. Il tessuto tritato è stato pesato e addizionato con il *protein extraction buffer* in accordo con il protocollo di Nagel *et al.*, 1992. Dopo centrifugazione (10 minuti a 13000 rpm, 4°C), il surnatante recuperato è stato conservato a -20°C fino alle analisi successive.

Le proteine totali estratte sono state quantificate mediante saggio Bradford (Bradford, 1976). Gli standard per la costruzione della retta di taratura sono stati preparati con la albumina di siero bovino (BSA, da 0,5 a 5 μg). I campioni da controllare sono stati addizionati a 200 μl di una soluzione diluita 1/5 di reagente Bradford e dopo 5 minuti è stata letta l'assorbanza mediante spettrofotometro a 595nm. La concentrazione proteica è stata calcolata confrontando l'OD<sub>595nm</sub> di ciascun campione con OD

595nm della retta di taratura ottenuta con le letture dello standard (BSA).

## 2.6.5 Separazione elettroforetica delle proteine totali (SDS-PAGE) e analisi Western

Le proteine estratte sono state addizionate con il *loading buffer* e denaturate incubando i campioni ad una temperatura di 100°C per 10 minuti. I campioni proteici sono separati mediante elettroforesi in gel di poliacrilamide e sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE al 12%) seguendo il protocollo standard (Sambrook *et al.*, 1989). A fine SDS-PAGE le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa (Amersham). Al termine del trasferimento la membrana è stata bloccata mediante proteine del latte al 5% (p/v) in PBST, 1 ora a temperatura ambiente e incubata nell'anticorpo primario (1:5.000). Dopo la reazione con l'anticorpo specifico, il filtro è stato trattato con l'anticorpo secondario coniugato con l'enzima perossidasi (Opti 4CN Detection Kit, Goat-anti-Rabbit; Biorad) ad una diluizione 1:3.000 in tampone TBS con l'1% di proteine del latte per 1,5 ore. Al fine di evidenziare la proteina transgenica, la membrana è stata infine lavata e sottoposta a reazione colorimetrica attraverso l'impiego delle soluzioni fornite dal Kit stesso contenenti 4-cloro-1-naftolo come substrato per la perossidasi.

**Protein loading buffer 6x:** 8% (p/v) SDS, 40% (v/v) glicerolo, 200 mM Tris-HCl (pH 6.8), 5% (v/v) β-mercaptoetanol, 0.05% (p/v) blu di bromofenolo.

**Tampone di corsa elettroforetica:** 25 mM Tris; 192 mM glicina; 0.5% (p/v) SDS.

**Tampone di trasferimento:** 25 mM Tris; 192 mM glicina; 0.5% (p/v) SDS; 20% (v/v) metanolo.

**PBS-T, Phosphate-Buffered Saline Tween20 solution (pH 7.4):** 137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O; 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,1% (v/v) Tween20.

## 2.6.6 Zimogramma

Per l'analisi dell'attività nelle proteine solubili totali estratte dalle foglie delle linee trasformate ed i controlli è stato utilizzato lo zimogramma. In questo caso 100 mg di proteine estratte sono state sottoposte a elettroforesi su gel di poliacrilammide, costituito da un gel di separazione al 12,5% di acrilammide a pH alcalino (tampone Tris-HCL 500 mM, pH 9,5) e dal gel di impaccamento al 4% di acrilammide a pH 7,5. Per la corsa elettroforetica è stato utilizzato il tampone Tris-Glicina pH 8,4 a una resistenza di 15 mA. L'enzima è stato rilevato mediante colorazione per attività, incubando il gel a 25°C in tampone Na-citrato 0,1 M pH 3.0 contenente come substrato ABTS 2 mM (Piscitelli *et al.*, 2005).

## 2.7 Saggi biochimici per la valutazione dell'attività fenol ossidasica

### 2.7.1 Saggio dell'attività enzimatica con ABTS

L'attività enzimatica della laccasi eterologa nelle proteine solubili totali estratte dai foglie è stata calcolata mediante l'uso dello spettrofotometro. L'attività laccasica è stata saggiata a 25°C utilizzando, quale substrato, una miscela di reazione contenente l'ABTS 20mM in tampone citrato 0,2M pH 3,0 (Piscitelli *et al.*, 2005). La

velocità di trasformazione del prodotto è stata valutata seguendo l'assorbimento allo spettrofotometro a 420nm (Champagne e Akit Ramsay, 2005). L'attività degli essudati radicali è stata misurata sul liquido di coltura, prelevato in asepsi dopo 7 giorni di coltura *in vitro*.

L'unità enzimatica è stata definita come quantità di proteine che catalizza la formazione di una mole di prodotto nell'unità di tempo, essendo noto il coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon_{420} = 36.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) ABTS 2mM (Piscitelli *et al.*, 2005).

### **2.7.2 Saggio dell'attività enzimatica con Siringaldazina**

L'attività enzimatica della laccasi eterologa nelle proteine solubili totali estratte da foglie è stata calcolata mediante l'uso dello spettrofotometro. L'attività è stata saggiata a 25°C utilizzando, quale substrato, una miscela di reazione contenente siringaldazina 500 $\mu$ M in tampone fosfato 250 mM pH 6,5 (Laufer *et al.*, 2006). La velocità di trasformazione del prodotto è stata valutata seguendo l'assorbimento allo spettrofotometro a 525nm. L'attività degli essudati radicali è stata misurata sul liquido di coltura, prelevato in asepsi dopo 7 giorni di coltura *in vitro*.

L'unità enzimatica è stata definita come quantità di proteine che catalizza la formazione di una mole di prodotto nell'unità di tempo, essendo noto il coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon_{525} = 65.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) (Laufer *et al.*, 2006).

### **2.7.3 Saggio dell'attività enzimatica con 2,6-DMP(dimetossifenolo)**

L'attività enzimatica della laccasi eterologa nelle proteine solubili totali estratte da foglie è stata calcolata mediante l'uso dello spettrofotometro. L'attività è stata saggiata a 25°C utilizzando, quale substrato, una miscela di reazione contenente 2,6-DMP 100mM in tampone tartrato 200 mM pH 5,0 (Zouari-Mechichi *et al.*, 2006). La velocità di trasformazione del prodotto è stata valutata seguendo l'assorbimento allo spettrofotometro a 469nm. L'attività degli essudati radicali è stata misurata sul liquido di coltura, prelevato in asepsi dopo 7 giorni di coltura *in vitro*.

L'unità enzimatica è stata definita come quantità di proteine che catalizza la formazione di una mole di prodotto nell'unità di tempo, essendo noto il coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon_{469} = 27.500 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) (Zouari-Mechichi *et al.*, 2006).

### **2.7.4 Saggio di chiarificazione di acque di vegetazione *in vivo***

Le acque di vegetazione sono state prelevate presso un frantoio oleario in Campania. I campioni sono stati centrifugati a 10.000 rpm per 45 minuti e poi è stato sottoposto a decantazione e filtrazione per allontanare le particelle solide ed i residui di olio. Le aliquote sono state conservate a -20°C. Le linee di tabacco transgeniche ed i controlli sono stati incubati per 7 giorni *in vivo* in una soluzione idroponica contenente le acque di vegetazione ad una diluizione 1:30.

La chiarificazione delle acque di vegetazione è stata valutata tramite lettura allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 395nm. I campioni sono stati valutati in

un arco temporale di una settimana, prelevando ogni 2 giorni un 1ml di soluzione e analizzando la variazione colorimetrica allo spettrofotometro.

### **2.7.5 Quantificazione dei fenoli**

Le acque di vegetazione utilizzate nell'esperimento di chiarificazione ( vedi paragrafo precedente) al settimo giorno di coltura sono state prelevate ed è stato quantificato il contenuto di fenoli. Il contenuto di fenoli è stato determinato secondo il metodo di Folin-Ciocalteu (1927) per confronto con concentrazioni di catecolo note.

### **2.7.6 Saggio di decolorazione dell'RBBR *in vivo***

L'RBBR (remazol brilliant blue) è un colorante antrachinonico usato nell'industria tessile.

Le linee di tabacco transgeniche ed i controlli sono stati fatti crescere per 7 giorni *in vivo* in una soluzione idroponica contenente la soluzione di *Hoagland* e RBBR ad una concentrazione 0,05 mM.

La decolorazione dell'RBBR è stata analizzata tramite spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 592nm (Palmieri *et al.*, 2005 ), in un arco temporale di una settimana leggendo la variazione di colore ogni 2 giorni.

## **2.8 Analisi fenotipica**

### **2.8.1 Rilievo dei dati morfometrici**

Tre cloni per ciascuna linea trasformata sono stati trasferiti *in vivo*. Settimanalmente sono stati raccolti dati morfometrici sulle piante fino al 60° giorno dal trasferimento *in vivo*. È stato rilevata l'altezza dal colletto all'apice fogliare, il diametro del colletto del fusto, la lunghezza del sesto internodo e il numero d'internodi. È stata, inoltre, eseguita una valutazione complessiva delle piante al raggiungimento dello stato di senescenza e quindi alla fine del suo ciclo biologico. Tale valutazione ha riguardato la forma delle foglie, il loro colore e la presenza di infiorescenze.

## **2.9 Analisi del TCE e del TCAA**

### **2.9.1 Estrazione del TCE e analisi**

I tessuti di ogni campione sono stati congelati e macinati in azoto liquido. Per digerire i tessuti per l'analisi del TCE, essi sono stati messi in 2ml di una soluzione di 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/10% NaCl. Sono stati aggiunti 10 ml del solvente organico metile *tert*-butile etere (MTBE) e i campioni poi agitati per 10 minuti a 300 rpm. Dopo aver agitato, lo strato di MTBE formatosi è stato trasferito in un nuovo tubo contenente 2g di Na<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> e fatti asciugare per 45 minuti. In seguito l'MTBE è stato trasferito in un

capillare di 2 ml per gas cromatografia con uno standard interno di 2 $\mu$ l di dibromide di etilene (50 $\mu$ l/100 ml MTBE).

Gli estratti di TCE di ogni campione sono stati analizzati in un gas cromatografo (Perkin Elmer Auto System). Come gas di corsa è stato usato l'elio, questo è stato fatto correre attraverso una colonna *Supelco VOLCOL* ( con un film di spessore di 60m X .25m X 1.25 $\mu$ m). Un rilevatore di elettroni a cattura (ECD) è stato usato alla temperatura di 340° C. Ogni campione ha corso per 58 minuti a 140° C con un volume di iniezione di 1.0  $\mu$ l e un ad una velocità di flusso of 20 ml/min. La sensibilità del GC è stata aggiustata secondo le concentrazioni di TCE all'interno del campione.

## 2.9.2 Estrazione del TCAA e analisi

I tessuti di ogni campione sono stati estratti e analizzati per l'acido tricloroacetico usando una modifica del *metodo 552 US EPA*. Ogni campione è stato macinato in azoto liquido e immediatamente sono stati aggiunti 20 ml di acqua deionizzata e poi agitati per 10 minuti a 300 rpm. Dopo aver agitato sono stati aggiunti immediatamente 3ml di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e in seguito sono stati aggiunti 9g di Na<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>/1g di Cu SO<sub>4</sub>. Dopo di che sono stati aggiunti 10 ml di MTBE alla miscela e fatti agitare per 10 minuti a 300 rpm. Lo strato di MTBE formatosi è stato trasferito in un nuovo tubo e sono stati aggiunti 6 ml di una soluzione al 10% di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in metanolo. I campioni sono stati incubati a 50°C per 1 ora e poi raffreddati a 4°C per 10 minuti. Alla soluzione raffreddata sono stati aggiunti 15 ml di una soluzione di Cu SO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> (50mg<sup>-1</sup> e 100 mg<sup>-1</sup> rispettivamente) e la miscela è stata nuovamente agitata per 10 minuti a 300 rpm. In seguito l'MTBE è stato trasferito in un capillare di 2 ml per gas cromatografia con uno standard interno di 2 $\mu$ l di dibromide di etilene (50 $\mu$ l/100 ml MTBE).

Gli estratti sono stati analizzati tramite gas cromatografo come quello descritto in precedenza. Il tempo di analisi per ogni campione è stato di 2 ore a 100°C con un una velocità di flusso di 10ml/minuto. La sensibilità del gas cromatografo è stata aggiustata secondo la concentrazione di TCAA nei campioni.

### **3. RISULTATI**

#### **3.1 Costruzione del vettore binario e trasformazione di *Agrobacterium tumefaciens***

##### **3.1.1 Costruzione del vettore binario**

Il clonaggio di *poxA1b* nel vettore pG0029 è stato eseguito utilizzando l'enzima di restrizione EcoRV. In Figura 3.1 è riportata la mappa del vettore binario ottenuto.

L'analisi di amplificazione del DNA eseguita con *primer* "poxA1bF" e "poxA1bR" (Tabella 2.1) sulle colonie di *E.coli* ottenute in seguito alla trasformazione con il prodotto di legazione p35SpoxA1b, ha verificato la presenza di cloni positivi. Il peso molecolare della banda ottenuta rispetta quello atteso, pari a circa 400 cb (Figura 3.2). Il vettore così ottenuto è stato utilizzato per la trasformazione del ceppo LBA4404 di agrobatterio.

##### **3.1.2 Trasformazione di *Agrobacterium tumefaciens***

Il DNA plasmidico di colonie contenenti il costrutto pG002935SpoxA1b è stato isolato e utilizzato per trasformare ceppi LBA4404 di *A. tumefaciens* contenenti il plasmide Ti helper pAL4404. L'analisi di amplificazione (Figura 3.3) mediante *primer* specifici, (*primer* poA1bF e *poxA1bR*, Tabella 2.1) su colonie ottenute dalla trasformazione, e cresciute su substrato selettivo, ha evidenziato la presenza del vettore di espressione nel ceppo di agro batterio trasformato e, quindi della cassetta di espressione di interesse.

##### **3.1.3 Trasformazione stabile di *Nicotiana tabacum* cv *Samsun NN***

Dall'esperimento di co-cultura condotto su un totale di 190 espianti fogliari di *N. tabacum* con il ceppo di *A. tumefaciens* recante il vettore binario pG002935SpoxA1b sono stati ottenuti, nel corso di 6 settimane dalla co-cultura, 22 germogli, con una frequenza di trasformazione del 12%. Questi sono stati prelevati e trasferiti su substrato di radicazione contenente kanamicina (Figura 3.5 e 3.6); di essi 11 hanno radicato su mezzo selettivo, quindi con una frequenza di rigenerazione del 6%. Per questo possiamo dedurre che i rimanenti 11 germogli che non hanno radicato sul mezzo selettivo possono essere considerati degli escape.

Per valutare l'efficacia del mezzo di rigenerazione sono stati posti su suddetto mezzo da dieci espianti non co-coltivati. Tra questi, non è stato evidenziato alcun evento di differenziamento ed i tessuti primari sono imbruniti completamente nell'arco di 4 settimane.

Dieci espianti non co-coltivati, posti su mezzo di rigenerazione privo di antibiotico, hanno rappresentato il controllo positivo; il 100% di tali espianti ha prodotto callo e germogli.

## **3.2 Analisi molecolari delle piante putative transgeniche**

### **3.2.1 Analisi di amplificazione del DNA genomico**

Per verificare l'effettiva trasformazione delle piante con il costrutto di interesse è stata eseguita un'analisi di amplificazione sul DNA genomico estratto dalle piante radicate (come riportato nel paragrafo 2.6.1 del capitolo precedente) su mezzo selettivo con i *primer* specifici (Tabella 2.1) per il gene di interesse. L'analisi di amplificazione ha mostrato che in 9 delle 11 piante putative transgeniche ottenute, era presente un amplificato con corretto peso molecolare trasformato (Figura 3.7). Tutte le piantine risultate non positive all'analisi di amplificazione sono state considerate non trasformate e quindi non sottoposte alle analisi successive.

Sono state eseguite analisi di amplificazione del DNA di piante trasformate per il gene *bar* per verificare l'avvenuta inserzione del transgene. In figura 3.8 è riportato l'analisi di amplificazione di alcune piante transgeniche esprimenti il gene di interesse, le piante risultate positive all'analisi di amplificazione sono state sottoposte alle analisi successive.

### **3.2.2 Analisi western**

Le proteine solubili totali estratte dalle putative piante transgeniche sono state sottoposte ad analisi western. Come mostrato in figura 3.9, la banda del peso molecolare atteso di circa 62 KDa è presente con intensità variabile nei cloni transgenici; anche se questa analisi non è di tipo quantitativo, caricando la stessa quantità di proteine è possibile osservare delle bande di intensità differente. La specificità degli anticorpi è stata valutata caricando un controllo negativo costituito da una pianta di tabacco non trasformato. Come si evince dalla figura nella linea corrispondente al controllo negativo non è apparsa nessuna banda.

### **3.2.3 Zimogramma delle proteine fogliari**

È stata condotta un'analisi elettroforetica in condizioni native sulle proteine solubili totali delle foglie dei cloni transgenici per il gene *poxA1b*. In figura 3.10 è riportato solo uno dei 3 gel corsi per ogni linea trasformata. La banda proteica relativa alla POXA1b è stata evidenziata mediante colorazione per attività, usando ABTS. (Figura 3.10). Tali analisi ha verificato la presenza di una laccasi attiva in tutti i cloni. L'intensità di colorazione delle bande mostranti l'attività fenol-ossidasi è differente nei vari cloni.

## **3.3 Saggi biochimici per determinare l'attività enzimatica**

### **3.3.1 Saggi d'attività enzimatica in pianta**

L'attività enzimatica delle putative piante transgeniche è stata determinata mediante saggi spettrofotometrici con tre substrati diversi specifici, l'ABTS, la siringaldazina e il

2,6-dimetossifenolo, sulle proteine totali solubili estratte da foglie in tre diversi stadi fenologici della pianta, parte apicale, mediana e basale. Per ciascuna linea le analisi sono state ripetute 3 volte. In tabelle 3.1 sono riportati i valori di attività espressi in mU per milligrammo di proteine totali estratte, ottenuti con il substrato ABTS un mediatore redox specifico per la laccasi. Nelle foglie estratte dalla parte apicale delle piante putative transgeniche l'attività più alta e statisticamente differente dal controllo è stata riscontrata nella linea 1 con un valore di  $584 \text{ mUmg}^{-1}$  e invece i valori più bassi sono stati ottenuti nelle piante 4, 5 e 6 con valori rispettivamente di 30, 44 e  $21 \text{ mUmg}^{-1}$ , i quali non presentano valori statisticamente differenti dalla pianta non trasformata. Le altre linee hanno mostrato un livello di attività intermedio tra questi due con una differenza significativa rispetto al controllo.

Nella parte mediana della pianta, invece i valori sono stati più bassi rispetto alla parte apicale con il valore più alto nella linea 7 di  $207 \text{ mUmg}^{-1}$ , differente statisticamente dal controllo. Anche in questo caso le linee 4 e 5 non sono statisticamente differenti dal controllo. Per quanto riguarda le foglie analizzate nella parte basale l'attività fenol-ossidasi risulta più alta nella linea 1. Nelle linee 3, 7 e 8 l'attività enzimatica saggiata presente un livello intermedio e le linee 4 e 6 mostrano un livello più basso di attività, non statisticamente differente dalla pianta non trasformata. In fine si può concludere che l'attività enzimatica è espressa nei vari stadi fenologici della pianta in modo differente e che l'attività maggiore è riscontrata nella parte apicale della pianta per la maggior parte delle linee analizzate, invece l'attività minore è rilevata nella parte mediana della pianta. Per quanto riguarda l'attività saggiata all'interno dell'intera pianta, ancora una volta il valore più alto si è riscontrato nella linea 1 con un valore di  $366 \text{ mUmg}^{-1}$ , statisticamente differente con il controllo e le altre linee saggiate. Come verificato per l'attività enzimatica saggiata nei vari stadi fenologici della pianta, anche in questo caso i valori più bassi sono ritrovati nei genotipi 4, 5 e 6, i quali non differiscono statisticamente dal controllo.

In tabella 3.2 sono riportati i valori dell'attività fenol-ossidasi saggiata con la siringaldazina, un composto fenolico cromogeno. Per ciascuna linea i saggi sono stati ripetuti 3 volte. Tutti i valori di attività sono espressi in mU per milligrammo di proteine totali estratte. La linea 7 ha mostrato una più alta attività negli estratti proteici da foglie estratte nella parte apicale ( $27 \text{ mUmg}^{-1}$ ) con un valore differente statisticamente sia dal controllo che dalle altre linee saggiate, invece nella parte basale ha mostrato un'attività enzimatica di  $2 \text{ mUmg}^{-1}$  come i genotipi 1 e 5. Per quanto riguarda le altre linee analizzate solo le piante 1, 3 e 5 hanno reagito positivamente, mostrando un'attività media di  $4 \text{ mUmg}^{-1}$  per la parte apicale e un'attività media nella parte basale di  $3 \text{ mUmg}^{-1}$ , i quali non sono differenti statisticamente dal controllo. I genotipi 4, 6 e 8 non hanno mostrato nessun'attività enzimatica in tutta la pianta.

L'ultimo saggio per valutare l'attività enzimatica delle putative piante transgeniche è stato eseguito utilizzando come substrato specifico il 2,6 dimetossifenolo. I campioni che reagiscono positivamente al composto assumono una colorazione arancio. Il saggio è stato effettuato su proteine totali solubili isolate da foglie.

Come riportato in tabella 3.3 i valori di attività enzimatica di ogni genotipo saggiato sono stati più alti per quanto riguarda le foglie prelevate nella parte apicale della pianta. In particolare si evidenzia che la linea 7 ha mostrato la più alta attività sia nelle proteine estratte da tessuto fogliare della parte apicale con un valore di  $493 \text{ mUmg}^{-1}$ , sia negli altri due stadi fenologici analizzati, con una differenza statistica sia rispetto al controllo che le altre piante transgeniche. Le piante 1, 3, 5 e 8 hanno mostrato un livello di attività nella parte apicale della pianta che va da 263 a 337



mUmg<sup>-1</sup>. Le stesse piante hanno presentato un'attività enzimatica nell'intervallo tra 221 e 310 mUmg<sup>-1</sup> per le foglie della parte basale e dei valori tra 138 e 255 mUmg<sup>-1</sup> per le foglie della parte mediana della pianta. Invece le linee 4 e 6 hanno mostrato una più bassa attività enzimatica in tutti e tre gli stadi fenologici rispetto alle altre piante trasformate.

In conclusione, possiamo dire che tutte le piante putative transgeniche hanno mostrato un'attività enzimatica per ogni substrato utilizzato, con differenti valori sia per quanto riguarda lo stato fenologico della pianta sia rispetto al composto impiegato. Inoltre osservando i valori presentati come sommatoria dell'attività in pianta le linee migliori per tutti i substrati saggiati sono rappresentati dai genotipi 1, 7 e 8.

Tutti i valori riportati sono confrontati con un controllo negativo, rappresentato da una pianta di tabacco non trasformato.

### 3.3.2 Saggi dell'attività enzimatica in essudati radicali

L'attività enzimatica delle putative piante transgeniche è stata valutata nel liquido di coltura di piante allevate *in vitro* in coltura idroponica. L'attività è stata analizzata con tre substrati differenti, l'ABTS, la siringaldazina e il 2,6-dimetossifenolo. Come mostrato in tabella 3.4 la linea 1 mostra una più alta attività con un valore di 168 mUmg<sup>-1</sup>, con differenze statisticamente significative sia rispetto al controllo che rispetto alle altre linee saggate. Questa mostra un valore d'attività rispetto alla siringaldazina di 11 mUmg<sup>-1</sup>.

Per quanto riguarda i valori dell'attività enzimatica con l'ABTS le linee 3, 7 e 8 mostrano un livello intermedio d'attività, mentre le linee 4,5 e 6 presentano i valori più bassi che vanno da 0 a 12 mUmg<sup>-1</sup> e statisticamente uguali alla pianta non trasformata.

Per i saggi effettuati con la siringaldazina, il miglior risultato si è ottenuto con il genotipo 3 con un valore di 20 mUmg<sup>-1</sup>. Le linee 1, 4, 5 e 8 hanno mostrato valori intermedi tra 6 e 10 mUmg<sup>-1</sup>, con valori statisticamente differenti rispetto al controllo. Il valore più basso è stato riscontrato nelle linee 6 e 7, con un valore di 3 e 4 mUmg<sup>-1</sup> rispettivamente le quali non differiscono con il controllo.

I saggi effettuati con il 2,6-dimetossifenolo hanno reso evidente che la il genotipo 1 presenta un valore d'attività enzimatica significativamente più alto (168 mUmg<sup>-1</sup>) rispetto al controllo e alle altre linee saggate. Per le linee 3, 7 e 8 è stato osservato un livello intermedio di attività enzimatica. Invece le linee 4,5 e 6 e hanno mostrato i valori più bassi tra le 3 e le 22 mUmg<sup>-1</sup>, senza presentare differenze statistiche con la pianta saggiata come controllo.

### 3.3.3 Saggio di chiarificazione di acque di vegetazione

Al fine di valutare l'effettiva capacità di azione sulle sostanze fenoliche delle piante transgeniche, che esprimono la laccasi eterologa POXC, sono stati effettuati saggi di chiarificazione delle acque di vegetazione ricavate degli scarti delle industrie olearie. Alcune piante transgeniche T<sub>1</sub>, ottenute tramite autofecondazione di piante T<sub>0</sub>, e il controllo sono stati cresciuti *in vivo* in una soluzione idroponica contenente le acque di vegetazione. Per ciascuna linea sono stati effettuati 3 saggi. Nella tabella 3.5a-b sono riportate tutte le piante analizzate con la percentuale di chiarificazione dopo

sette giorni di incubazione. Alcune di queste hanno raggiunto una percentuale tra il 70 e il 99% di chiarificazione delle acque di vegetazione, con valori statisticamente differenti rispetto al controllo.

### **3.3.4 Degradazione dei fenoli in acque di vegetazione**

Al fine di valutare l'effettiva capacità di degradazione delle sostanze fenoliche delle piante transgeniche esprimenti la laccasi eterologa POXC, sono stati effettuati saggi di degradazione dei composti fenolici contenuti nelle acque di vegetazione. Alcune delle piante T<sub>1</sub>, e il controllo sono stati cresciuti *in vivo* in una soluzione idroponica contenente le acque di vegetazione. Per ciascuna linea sono stati effettuati 3 saggi. In tabella 3.6a-b sono riportati i valori di assorbanza letti per ciascun campione con le rispettive significatività statistiche. In Figura 3.11, invece, sono riportate le percentuali dei composti fenolici residui dopo 7 giorni di incubazione. La percentuale di degradazione varia tra i vari genotipi tra il 50 e il 90%, con differenze statisticamente significative rispetto al controllo.

### **3.3.5 Saggio di decolorazione con RBBR**

Per valutare se le piante esprimenti la laccasi fungina sono capaci di degradare composti fenolici sono stati eseguiti saggi di decolorazione dell'RBBR, un colorante usato nell'industria tessile. Alcune linee di piante transgeniche T<sub>1</sub> sono state fatte crescere *in vivo* in una soluzione idroponica contenente RBBR. Per ciascuna linea sono stati eseguiti 3 saggi. Nella tabella 3.7 sono riportate le percentuali di degradazione per tutte le linee analizzate a differenti giorni di coltura. Il primo tempo analizzato è dopo 2 giorni di incubazione e l'ultimo tempo è dopo una settimana. Nella figura 3.12, invece sono mostrate le percentuali di degradazione per i genotipi che hanno avuto dei valori più significativi, sia perché hanno mostrato un valore più alto di degradazione sia perché non hanno avuto un incremento nel tempo di percentuale di degradazione. Comunque il valore più alto di degradazione è stato per il genotipo poxc17-111 con l'80% e il genotipo poxc23-109 con 81% di decolorazione dell'RBBR. In ogni caso la media di degradazione del colorante è stata tra il 50 e l'80% tra i genotipi saggiati. Per di più si è notato che già dal secondo giorno d'incubazione la maggior parte dei genotipi sono stati capaci di degradare il colorante ad una percentuale in media del 50%.

## **3.4 Analisi fenotipica**

### **3.4.1 Dati morfologici**

Alcune piante T<sub>1</sub> sono state selezionate per essere sottoposte ad analisi della morfologia. Dopo 15 e 30 giorni dal trasferimento *in vivo*, è stata eseguita un'analisi statistica di alcuni dati morfologici, altezza della pianta, diametro del colletto, lunghezze del sesto internodo e numero di nodi, su piante esprimenti la proteina ricombinante e dei controlli non trasformati della stessa età, utilizzati come controllo negativo. I dati riportati nelle tabelle 3.8, 3.9, 3.10 e 3.11 non hanno evidenziato

differenze sostanziali tra le piante transgeniche ed i controlli per tutti i parametri analizzati. Inoltre sono stati raccolti i semi e seminati (Tabella 3.12) su substrato contenente l'agente selettivo, kanamicina. Anche se non sono state riscontrate differenze significative per i parametri morfologici considerati, sono state riscontrate alcune differenze nella forma e nel colore delle foglie (Figura 3.12), negli apici (figura 3.13) e nelle infiorescenze.

## **3.5 Analisi del TCE e TCAA**

### **3.5.1 Tossicità dovuta all'esposizione al TCE**

Quando le piante di tabacco sono state dosate per il tricloroetilene, gli effetti tossici sono stati osservati ad una concentrazione di TCE di 200 ppm nelle piante *wild type*. Lo stesso effetto tossico non è stato osservato nelle piante esprimenti il gene *bar* fino a quando la concentrazione di TCE non ha raggiunto 300 ppm (Figura 3.14). I sintomi della tossicità si evidenziano con l'afflosciamento e l'ingiallimento delle foglie e un più basso assorbimento dell'acqua (Tabella 3.13). I maggiori segnali della tossicità sono stati notati nelle foglie basali delle piante.

### **3.5.2 Assorbimento del TCE**

Per valutare l'assorbimento delle piante di tabacco transgeniche e le piante controllo sono stati effettuati saggi *in vivo* con piante allevate in coltura idroponica in beute. È stato osservata una più alta percentuale di assorbimento del TCE nelle piante transgeniche; in media le suddette piante sono state capaci di assorbire il 41% di TCE, mentre le piante non trasformate hanno assorbito solo il 25% del tricloroetilene (Figura 3.15).

### **3.5.3 Metabolismo del TCE**

Per valutare se il tricloroetilene è stato metabolizzato nelle piante putative transgeniche e nelle piante controllo dosate con tricloroetilene, sono state effettuate estrazioni dei metaboliti da foglie, fusti e radici e successivamente quest'ultimi quantificati tramite gas cromatografo.

È stato osservato che le concentrazioni di tricloroetilene è stata significativamente più alta nelle piante controllo che nelle piante transgeniche (Figura 3.16). Inoltre si è evidenziato che le piante controllo dosate con TCE hanno una più alta concentrazione di acido tricloroacetico nelle loro foglie rispetto alle piante contenenti il gene *bar*. In media, le piante transgeniche hanno mostrato livelli di TCAA nelle foglie di 77.6 µg/kg, mentre le piante non trasformate hanno presentato nelle foglie livelli di TCAA di 103.7 µg/kg (Figura 3.17). Non sono state trovate differenze significative per gli altri tessuti della pianta analizzati.

### **3.5.4 Tossicità dovuta all'esposizione all'Acido Tricloroacetico**

Per valutare la tossicità dell'acido tricloroacetico nelle piante trasformate e nelle piante controllo sono state fatte crescere *in vivo* in coltura idroponica con differenti concentrazioni di TCAA. Sia per le piante non trasformate che per le piante putative transgeniche la tossicità non è stata osservata fino in modo che esse sono state dosate con una concentrazione di acido tricloroacetico di 300 ppm (tabella 3.14 e figura 3.18). A questa concentrazione l'assorbimento dell'acqua è stato drasticamente diminuito in media da 150 ml a 61 ml e le foglie sono ingiallite e appassite.

### **3.5.5 Assorbimento dell'Acido Tricloroacetico**

Per stimare l'assorbimento del TCAA delle piante transgeniche e delle piante non trasformate queste sono state allevate in coltura idroponica in una soluzione contenente una concentrazione dell'acido tricloroacetico a 300 ppm. È stato stimato che le piante transgeniche hanno assorbito significativamente più TCAA rispetto alle piante non trasformate (Figura 3.19). Le piante contenenti il gene *bar* hanno assorbito più del 30% di TCAA, mentre le piante controllo hanno assorbito solo il 20% di acido tricloroacetico.

### **3.5.6 Metabolismo dell'Acido Tricloroacetico**

Per valutare se le piante transgeniche fossero capaci di metabolizzare l'acido tricloroacetico, sono state effettuate estrazioni specifiche per i metaboliti nei vari tessuti della pianta e poi questi ultimi quantificati tramite gas cromatografo.

Nelle piante dosate con TCAA, le piante non trasformate hanno mostrato una più alta concentrazione di acido ticloroacetico rispetto alle piante contenenti il gene *bar*. In media il 19% del TCAA è stato recuperato nelle piante transgeniche e il 52% è stato rinvenuto nelle piante non trasformate (Figura 3.20).

## 4. Discussioni

Il presente lavoro ha riguardato l'espressione in piante di tabacco dei geni fungini, *poxC* e *poxA1b*, codificante per una laccasi capace di degradare sostanze fenoliche inquinanti. Inoltre è stato eseguito uno studio d'espressione in piante di tabacco del gene *bar* e il confronto con piante *wild type* per la degradazione del tricloroetilene. Tali lavori sono stati eseguiti sia presso il Dipartimento della Scienza, della Pianta, del Suolo, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali di Portici, sia presso il Dipartimento della Salute e dell'Ambiente dell'Università del Sud Carolina dove è stato svolto parte del lavoro di tesi.

I geni *poxC* e *poxA1b* sono stati isolati dal fungo *Pleurotus ostreatus* facente parte della famiglia dei basidiomiceti. Questi funghi sono capaci di produrre varie isoforme d'ossidasi extracellulari e perossidasi, le quali sono coinvolte nella degradazione della lignina nel loro ambiente naturale (Palmieri *et al.*, 2000). Inoltre le laccasi fungine sembrano essere coinvolte anche nella morfogenesi, nella crescita di rizomorfi, nella sporulazione e nella patogenesi e virulenza dei funghi nei confronti delle piante (Gianfreda *et al.*, 1999). In bibliografia è riportato l'abilità di tali enzimi di usare differenti substrati appartenenti a diverse classi chimiche tra cui possiamo citare composti fenolici molto tossici (Zouari-Mechichi *et al.*, 2006).

Le laccasi rappresentano un interessante gruppo d'enzimi ossidoriduttivi ubiquitari che offrono un gran potenziale per le applicazioni biotecnologiche e ambientali (Sharma e Kuhad, 2008). Esse appartengono ad un gruppo d'ossidasi, contenente domini multipli per il rame, le quali usano ossigeno come accettore d'elettroni per rimuovere i radicali idrogeno da gruppi idrossili di fenoli (Hoegger *et al.*, 2006).

Siccome l'assorbimento dei composti organici idrofobici, come gli IPA, è molto difficile e tali composti, non possono essere facilmente traslocati all'interno della pianta (Burken *et al.*, 2000; Meagher *et al.*, 2000), in questo progetto si è cercato di ottenere la secrezione radicale dell'enzima eterologo. Come riportato da Tao *et al.*, (2005) piante di riso allevate in suoli contaminati da IPA hanno maggiormente accumulato i contaminanti a livello delle radici rispetto agli altri tessuti analizzati, evidenziando che gli IPA sono difficilmente traslocabili. L'uso della secrezione nel fitorisanamento ha l'enorme vantaggio che l'enzima secreto ha diretto accesso ai contaminanti (Uchida *et al.*, 2005). I composti secreti dalle radici si muovono attraverso lo spazio intracellulare (apoplasto) che è in diretto contatto con la soluzione esterna (Borisjuk *et al.*, 1999). La rizosecrezione è in ogni modo un processo secretorio regolato che non prevede un passaggio passivo delle proteine attraverso la membrana cellulare né la rottura della cellula ed il conseguente rilascio della proteina (Borisjuk *et al.*, 1999). Il processo di secrezione cellulare in pianta è guidato da segnali peptidici che indirizzano le proteine nel reticolo endoplasmatico ed infine nell'apoplasto (Neumann *et al.*, 2003).

La sequenza genica del gene in esame utilizzato per la costruzione del vettore d'espressione in pianta con cui è stata condotta la trasformazione di *N. tabacum*, è stata posta sotto il controllo del promotore del gene del 35S del CaMV (Topfer *et al.*, 1987). L'utilizzo di questo promotore, che induce in pianta un'espressione genica costitutiva superiore rispetto ad altri promotori, permette una produzione di proteine ricombinanti compresa tra lo 0.02% e lo 0.1% delle proteine totali solubili (Giddings *et al.*, 2000). Una strategia che permetterebbe di superare il problema della bassa resa, potrebbe essere quello dell'iperaccumulo tessuto specifico come, ad esempio,

nei semi. Un metodo simile è stato ampiamente studiato e provato per esprimere laccasi fungine in semi di mais ad alti livelli, utili per la commercializzazione ( Hood *et al.*, 2003).

#### 4.1 Espressione della laccasi fungina *poxA1b* in piante di tabacco

Una volta verificata l'inserzione del transgene nel vettore binario, mediante l'analisi d'amplificazione del DNA, tale vettore è stato introdotto in *Agrobacterium tumefaciens* tramite elettroporazione (Cangelosi *et al.*, 1991). Si è quindi proceduto alla trasformazione stabile mediata da agrobatterio. Il tabacco nel 1983 fu la prima pianta esprime un DNA esogeno ottenuta mediante trasformazione genica con *A. tumefaciens* (Gasse e Fraley, 1989). Da quel momento, con questo metodo sono stati trasferiti in diverse specie una serie di caratteri (Mourgues *et al.*, 1998) e sono state ottenute centinaia di piante esprimenti proteine eterologhe. La trasformazione genetica mediata da *A. tumefaciens* è il metodo di trasformazione più efficiente ed è dipendente dall'interazione tra il ceppo d'agrobatterio ed il genotipo impiegato. Con un'interazione compatibile si possono ottenere numerosi eventi di trasformazione stabili (Bevan, 1984; Gelvin *et al.*, 2000). L' *A. tumefaciens* è un batterio gram negativo anaerobio appartenente alla famiglia delle *Rhizobiaceae*. Esso è presente nel suolo ed è un agente patogeno di molte specie vegetali. L' agrobatterio possiede un plasmide detto Ti che regola, unitamente ai geni cromosomici, la capacità di infettare i tessuti vegetali. Nel plasmide sono state identificate due regioni fondamentali per il processo d'infezione: il T-DNA, che è trasferito nel genoma della cellula infettata, e la regione *vir*, che rende possibile il trasferimento (Gelvin *et al.*, 2000; Tzfira *et al.*, 2000; Zupan *et al.*, 2000).

Alla base del processo di trasformazione genetica mediato da agrobatterio c'è la possibilità di sostituire la regione del T-DNA con altre sequenze costituite dai geni da trasferire in pianta (Gasser e Fraley, 1989; Zupan *et al.*, 2000). Gli esperimenti di trasformazione sono stati condotti utilizzando il ceppo curato d'*A. tumefaciens* LBA4404, derivato dal ceppo selvatico Ach5.

In seguito al lavoro svolto sono stati ottenuti cloni di *N. tabacum* cv Samsun NN, trasformati per il gene *poxA1b*. L'analisi molecolare condotta mediante amplificazione del DNA sui cloni di tabacco transgenici ha dimostrato l'inserimento del gene d'interesse nel genoma di tabacco ma non in tutti i cloni radicati su substrato selettivo. La mancata amplificazione in tali cloni suggerisce che essi siano da considerare *escape* (Horsch *et al.*, 1985; Klee *et al.*, 1987): alcune gemme potrebbero provenire da tessuti chimerici e quindi i germogli da essi derivati potrebbero presentare una parziale resistenza all'antibiotico oppure essersi originati da cellule non transgeniche che sono riuscite a sopravvivere in presenza dell'antibiotico in quanto questo ultimo verrebbe degradato dalle cellule transgeniche che attorniano le prime per il fenomeno noto come *cross-feeding* (Lurquin e Filippone, 1989).

Le proteine totali estratte dalle piante transgeniche sono state sottoposte ad analisi western, al fine di verificare in esse la presenza della proteina transgenica. La presenza delle bande del peso molecolare atteso ha confermato la corretta espressione del transgene. I risultati indicano la presenza di un livello di espressione del transgene variabile nei diversi genotipi. L'espressione variabile osservata può essere derivata dal differente sito d'integrazione del transgene, infatti fino ad ora questo meccanismo è ancora poco compreso. A riguardo sono stati condotti studi su

piante di tabacco, *Arabidopsis*, petunia, riso e mais (Kholi *et al.*, 2003). La posizione dell'integrazione e la struttura del locus possono variare considerevolmente tra i trasformanti indipendenti (Kholi *et al.*, 2003). I primi studi condotti sulle dicotiledoni suggerivano che i siti d'integrazione del T-DNA erano casuali, cioè che il meccanismo d'inserzione era di tipo eterologo (Wallroth *et al.*, 1986; Chyi *et al.*, 1986). Con le analisi FISH (florescence *in situ* hybridization), metodo che discrimina tra le zone mutilate e quelle non mutilate del DNA, le tecniche per identificare le zone condensate e non dalla cromatina (Hoopen *et al.*, 1999) ed i marcatori molecolari RAPD (Baranger *et al.*, 1997) è stato invece dimostrato che l'integrazione avviene preferenzialmente nelle zone trascritte ed in alcune specie nella vicinanza di geni (Lindsey *et al.*, 1993; Iglesias *et al.*, 1997). Ciò forse è dovuto alla minore condensazione della cromatina in quelle particolari regioni cromosomiche (Hoopen *et al.*, 1999). Anche se sono insufficienti gli studi effettuati su piante trasformate con l'uso di *A. tumefaciens*, per chiarire definitivamente i criteri in base ai quali il T-DNA si distribuisce tra i cromosomi della pianta (Tinland, 1996; Kholi *et al.*, 2003), diversi studi hanno dimostrato che l'inserzione avviene su cromosomi e in siti differenti (Tinland 1996).

Inoltre l'espressione variabile può anche essere derivata dalla diversa attività del promotore che ne consegue (effetto di posizione). Di fondamentale importanza quindi, per un'elevata espressione eterologa, potrebbe essere anche la posizione che le copie del transgene occupano nel genoma (Leeuwen-W-van *et al.*, 2001; Kholi *et al.*, 2003).

Oltre ad un silenziamento dovuto alla posizione, l'espressione potrebbe essere stata influenzata anche, da un silenziamento trascrizionale dovuto al così detto fattore ambientale. È stato, infatti, ampiamente dimostrato che ci può essere un'inattivazione di geni endogeni in un periodo di stress o di cambiamenti ambientali. Tale fenomeno è stato riportato in un'espressione eterologa i cui transgeni erano sotto controllo del promotore del gene 35S del CaMV, lo stesso da noi utilizzato (Broer-I *et al.*, 1996).

Una volta verificata la presenza della proteina eterologa è stata controllata l'attività dell'enzima eterologo prodotto nelle proteine solubili totali dalle foglie dei cloni transgenici. È stata condotta un'analisi elettroforetica in condizioni native. Lo zimogramma delle proteine solubili totali da foglie ha verificato la presenza della proteina attiva in tutti i cloni analizzati ed ha mostrato che le proteine ricombinanti hanno la stessa mobilità della POXA1B purificata dal fungo (Piscitelli *et al.*, 2005). Dal gel si può osservare che il livello d'attività è risultato differente tra i vari cloni. Questo fenomeno potrebbe essere giustificato con un'ipotesi di silenziamento genico. Tale evento si manifesta con alta frequenza quando sono presenti nella pianta copie multiple di una particolare sequenza genica e/o di una sequenza omologa (Jorgensen, 1990). Il numero delle inserzioni del transgene potrebbe essere importante, poiché un numero elevato d'inserzioni si può associare a una loro mutilazione a livello del promotore e causare silenziamento trascrizionale (Derek *et al.*, 2003). Nelle dicotiledoni sono stati individuati entrambi i meccanismi di silenziamento, quello trascrizionale (TGS) e quello post-trascrizionale (PTGS). Il PTGS è un meccanismo di silenziamento che impedisce l'accumulo del mRNA, con una degradazione accelerata di specifiche sequenze di RNA dovute alla produzione di dsRNA nel citoplasma, ma non ne impedisce la sintesi. Il TGS, invece, impedisce la sintesi del mRNA del gene "bersaglio" perché coinvolge interazioni tra geni che hanno omologia nelle sequenze dei promotori. Su tali sequenze aumenta il grado di metilazione e la trascrizione è impedita a causa dell'associazione di un complesso

proteico al DNA metilato (Sijen *et al.*, 2001). In realtà non è stata ancora chiarita la correlazione esistente tra il numero di inserzioni del transgene e l'espressione dei geni nelle piante trasformate (Hobbs *et al.*, 1993). In letteratura sono riportati casi d'evidenti correlazioni negative (Hobbs *et al.*, 1993), casi in cui la correlazione è stata indeterminata (Dean *et al.*, 1998; Jones *et al.* 1987; Shirsat *et al.*, 1989) e casi di correlazione positiva (Gendloff *et al.*, 1990). Nel corso di questo progetto non sono in ogni caso stati eseguiti esperimenti per la comprensione dei meccanismi di silenziamento.

Inoltre è stata valutata l'attività enzimatica, tramite saggi spettrofotometrici, dei cloni transgenici, sia delle proteine totali estratte da foglie in differenti stadi fenologici della pianta, sia negli essudati radicali di piante allevate in coltura idroponica *in vitro*.

Per stimare la suddetta attività sono stati utilizzati tre diversi substrati, l'ABTS, la Siringaldazina e il 2.6-dimetossifenolo.

L'ABTS è una sostanza cromogena ed è un substrato specifico per valutare l'attività enzimatica della laccasi; l'ABTS è stato il primo composto trovato capace di mediare efficientemente l'ossidazione della laccasi di composti non fenolici (Xu *et al.* 2000). Siccome la laccasi, è una molecola grande e non può entrare nella parete secondaria direttamente in contatto con il substrato lignina, sembra possibile che l'ABTS possa funzionare come trasportatore di elettroni diffusibili (Burbonnais *et al.*, 1995).

La Siringaldazina è un composto fenolico che fa parte della subunità S della lignina ed è usata come substrato cromogeno per saggiare la laccasi.

Il 2.6-dimetossifenolo (DMP) è ugualmente un composto fenolico, e usato come substrato cromogeno nell'analisi spettrofotometriche per le laccasi.

L'attività è stata variabile sia tra le diverse linee che tra i diversi stadi fenologici della pianta che negli essudati radicali. Dall'analisi dell'attività negli essudati radicali sono emersi differenti livelli nelle diverse linee proporzionali all'attività fenol-ossidasi rilevata a livello cellulare. Ci sono varie possibilità per spiegare tali variazioni: differenze nel livello di attività del promotore, diversa regolazione spaziale o temporale o entrambe queste differenze. Ciò è stato riscontrato anche per promotori ben caratterizzati (van Leeuwen *et al.*, 2001). Tali differenze nella regolazione possono dipendere dall'influenza delle sequenze del DNA genomico fiancheggianti il transgene. Ciò significa che il promotore potrebbe guidare l'espressione preferenzialmente in determinati tipi di cellule ed in un determinato tempo, ovvero le differenze del sito d'integrazione potrebbero modulare in modo differente l'espressione nel tempo e nel tipo cellulare. Questo potrebbe anche influire sulle differenze d'espressione tra i diversi tessuti, tra le diverse parti di uno stesso tessuto e in uno stesso tessuto dopo un prolungato periodo di tempo (van Leeuwen *et al.*, 2001). Oltre ai meccanismi già citati, le differenze del livello di attività potrebbero non dipendere da un differente livello di espressione ma dalla presenza di un enzima inattivo. L'attività fenol-ossidasi potrebbe essere stata ridotta anche da variazioni del pH. Esso, infatti, cambia le proprietà elettrostatiche dell'enzima influenzandone la stabilità e le differenti concentrazioni protoniche che possono cambiare le proprietà fisiche chimiche del substrato (Bonomo *et al.*, 2001; Prasad *et al.*, 2005). Un altro motivo potrebbe essere la parziale inibizione dovuta a sostanze organiche che potrebbero inattivare l'enzima in vari modi: la sostituzione delle molecole d'acqua presso il sito catalitico, alterazione del pH o deformazione della struttura tridimensionale dell'enzima. Questo tipo di inibizione è stato descritto nelle laccasi di *Trametes versicolor* e *P. ostreatus* (Rodakiewicz *et al.*, 2000; Okazaki *et al.*, 2002). Un'altra possibilità per spiegare le differenze dei valori dell'attività anche a



livello degli essudati radicali, potrebbe essere una carenza di rame. In letteratura sono riportati, infatti, casi in cui l'aggiunta del rame aumenta l'attività specifica della soluzione (Hood *et al.*, 2003; Prasad *et al.*, 2005; Palmieri *et al.*, 2000). Sono state formulate varie ipotesi per spiegare tale dipendenza dell'attività dell'enzima con la presenza del rame. La prima ipotizza che le laccasi siano prodotte come apoproteine inattive o parzialmente attive a causa di un ridotto numero d'atomi di rame e che la presenza dello ione in soluzione possa attivarle completamente. La seconda ipotizza che il rame in soluzione possa far transitare gli atomi di rame in uno stato più ridotto aumentandone la capacità ossidativa. La terza ipotizza che gli atomi di rame in soluzione possano bloccare o chelare gli inibitori della laccasi (Hood *et al.*, 2003).

Gli enzimi ligninolitici così come le laccasi sono difficili da esprimere in un sistema eterologo. Laccasi fungine sono state già espresse eterologamente: *Saccharomyces cerevisiae* (Cassaland e Jonsson ., 1999); *Pichia pastoris* (Jonsson *et al.*, 1997), *Aspergillus oryzae* ( Yaver *et al.*, 1996) ma a bassi livelli (Hood *et al.*, 2003).

I dati dell'attività rilasciata nel mezzo di coltura da noi ottenuti possono essere bene confrontati con alcune espressioni di laccasi eterologhe. Wang *et al.*,(2004) riportano l'espressione di una laccasi da cotone in *P. pastoris*. Gli autori riportano un'attività nel mezzo di coltura di circa 60 mUmg<sup>-1</sup> di proteine. Tale valore risulta essere confrontabile con l'attività dai noi riportata, in un intervallo tra 30 a 160 mUmg<sup>-1</sup> di proteine. Gli stessi Autori riportano l'espressione della medesima laccasi recante un peptide di secrezione al 5' anche in *A. thaliana*. Tale peptide ha consentito di ottenere il rilascio della laccasi dall'apparato radicale. Gli Autori riportano un valore massimo di 6 mUmg<sup>-1</sup> di proteine in un mezzo di coltura concentrato di circa 50 volte (Wang *et al.*, 2004). Tali valori sono nettamente inferiori a quelli che hanno mostrato le nostre linee. Hood *et al.*,(2003) riportano l'espressione di una laccasi fungina i mais, utilizzando diversi promotori e diversi segnali peptidici per la localizzazione cellulare. A differenza dei nostri risultati, gli Autori riferiscono l'impossibilità di esprimere la laccasi come prodotto extracellulare. A dispetto delle centinaia di trasformazioni sono, infatti, riusciti a differenziare solo pochi trasformanti che prima del trasferimento in suolo imbrunivano e morivano. Gli Autori terminano che il citoplasma o la parete cellulare sono i migliori siti d'accumulo della laccasi.

Piscitelli *et al.*, (2005) riportano uno studio eseguito su un sistema eterologo differente. Gli Autori hanno espresso sia il gene *poxC* che *poxA1b* in due specie di lieviti: *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces cerevisiae*. Essi riportano l'impossibilità di ottenere un'elevata espressione eterologa dei geni *poxC* e *poxA1b* in *S. cerevisiae* senza l'aggiunta di induttori quali etanolo, nutrienti supplementari o rame. Per quanto riguarda l'espressione in *K. lactis* gli autori riportano valori di attività per *poxC* e *poxA1b* pari a 500 e circa 1000 mUmg<sup>-1</sup> di proteine rispettivamente, maggiore della quantità massima negli essudati radicali da noi quantificata pari a 168 mUmg<sup>-1</sup> di proteine per la linea 1. Altri autori, che hanno ottenuto l'espressione eterologa di laccasi in lievito ed in fungo, riportano i valori per U/ml di mezzo di coltura (Guo *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2004). Tali dati non possono essere, quindi, confrontati con i nostri valori che sono espressi in U/mg di proteine totali. Confrontando i risultati ottenuti da noi e dagli altri Autori, si può concludere che maggiore è il livello di espressione di omologia del sistema di espressione eterologa maggiore è il livello di espressione ottenuto (Hood *et al.*, 2003). Il rilascio della laccasi eterologa nel mezzo di coltura è in accordo con quanto pubblicato da Sonoki *et al.*,(2005). In questo lavoro è stata analizzata l'espressione in piante di tabacco di una laccasi da *Coriolus versicolor*, appartenente alla famiglia dei funghi del marciume bianco. Gli Autori hanno espresso un cDNA di fungo la cui proteina

codificata reca un peptide segnale di secrezione al 5' che ha consentito di ottenere il rilascio della laccasi dall'apparato radicale. Gli Autori però non specificano chiaramente la quantità di laccasi ottenuta; da quanto si evince dagli zimogrammi, riportati nella pubblicazione, è possibile ipotizzare che essa si esprime in quantità minore rispetto a quella evidenziata dai nostri gel.

## 4.2 Studio della progenie T<sub>1</sub> esprimente il gene *poxC*

Nel presente lavoro di tesi, inoltre, si è analizzata la progenie T<sub>1</sub> di piante di tabacco transgeniche esprimenti il gene della *poxC* in precedenza espresso in piante di tabacco presso il nostro laboratorio.

I cloni ottenuti da semine in mezzo selettivo, contenente kanamicina, sono stati allevati *in vivo* insieme a piante controllo non trasformate per identificare eventuali variazioni fenotipiche dovute all'introduzione del gene esogeno nel genoma di tabacco. Questa valutazione dei caratteri fenotipici nella progenie T<sub>1</sub> è stata fatta proprio per osservare se anche nella successiva generazione fossero evidenti variazioni fenotipiche, come precedentemente osservato nelle piante T<sub>0</sub> esprimenti il gene fungino *poxC*. Inoltre tale confronto è stato reso necessario dal fatto che la trasformazione genetica agrobatterio-mediata dei tessuti vegetali è condizionata dalla formazione di callo. Il callo è un tessuto in grado di proliferare indefinitamente dando origine ad una massa istologica di forma irregolare le cui cellule sono considerate le meno differenziate di tutte le cellule di una pianta. Durante la formazione dei calli possono avvenire numerosi cambiamenti a carico del numero e della struttura dei cromosomi, i quali sono alla base della variabilità somaclonale (Ammirato, 1983; Olhoft & Phillips, 1999; Kaepler *et al.*, 2000).

La variabilità somaclonale si manifesta con frequenti mutazioni fenotipiche sia di tipo qualitativo che quantitativo dovuto a mutazioni della sequenza nucleotidica, attivazione di geni normalmente non trascritti e silenziamento (Kaepler *et al.*, 2000). Le osservazioni morfologiche non hanno evidenziato alterazioni fenotipiche, per i caratteri analizzati, a carico delle linee transgeniche ottenute. Solo in alcune linee sono state evidenziate delle piante con una certa difficoltà di sviluppo, con formazione degli organi epigei ridotti nelle dimensioni rispetto al controllo. È ipotizzabile, ma poco probabile anche che l'inserzione del gene *poxC*, evento del tutto casuale all'interno del genoma di tabacco, abbia in qualche maniera danneggiato qualche gene responsabile della crescita, con una sorta di *knock-out* o addirittura potrebbe essersi verificato un evento di riarrangiamento del corredo cromosomico correlato in qualche modo ad una variazione somaclonale associata allo sdifferenziamento dei tessuti nello stadio di formazione del callo (Tremblay *et al.*, 1999). Nella media però tutti i genotipi analizzati appaiono proporzionati al controllo. È probabile, quindi, che queste linee abbiano manifestato tale fenotipo a causa di un lento e stentato acclimatamento delle piante nel passaggio *vitro-vivo* per fattori ambientali non dipendenti dalla presenza del gene esogeno.

Anche se non sono state riscontrate differenze statisticamente significative con il controllo per i parametri analizzati, alcune piante di linee differenti hanno presentato una colorazione bruna delle foglie apicali, un ridotto tasso di crescita e delle malformazioni delle infiorescenze. L'insieme di questi fenomeni è stato descritto in piante transgeniche che hanno mostrato una ridotta espressione dei geni coinvolti nella biosintesi della lignina. La lignina è un composto unico nel regno vegetale. Si trova nella parete cellulare di molti tipi di cellule tra cui quelle dello xilema e del

floema. Tale polimero riduce la perdita d'acqua, rende più efficiente il trasporto dell'acqua e dei nutrienti, aumenta la resistenza alla compressione dei fasci vascolari e impedisce l'attacco dei patogeni. Per assolvere tutte queste funzioni l'idrofobicità e l'intrinseca stabilità chimica sono dei requisiti fondamentali (Gavnholt e Larsen, 2002). La lignina è formata dalla condensazione di tre monomeri; l'alcol cumarico, l'alcol coniferilico e l'alcol sinapilico. Le proprietà della lignina sono influenzate dalle proporzioni dei tre monomeri, il tipo di legame e la percentuale d'altri fenoli legati (Campbell *et al.*, 2002). Tali monomeri sono prodotti alla fine della catena metabolica dei fenilpropanoidi che inizia con una deaminazione della fenilalanina (Davin *et al.*, 1997). Numerosi altri metaboliti secondari sono prodotti in questa catena biosintetica. I monomeri sono composti fenolici che sono polimerizzati in lignina attraverso la formazione di radicali liberi, la cui formazione è catalizzata da enzimi ossidanti. I radicali poi reagiscono tra loro polimerizzando e formando la lignina (Davin *et al.*, 1997). La fase cruciale dell'attivazione, che rende possibile la polimerizzazione è l'ossidazione. Tale reazione è catalizzata dalle fenolo-ossidasi (Huttermann *et al.*, 2001). Nella biosintesi della lignina sono coinvolti molti geni tra cui la fenilalanina ammonio liasi (PAL), la cinnamato 4-idrossilasi (C4H), la 4 cumaril-CoA ligasi (4CL), la cinnamil alcol deidrogenasi (CAD). Gli Autori riportano dei fenotipi del tutto simili a quelli osservati da noi. Tali piante, con un'espressione ridotta del CCR, CAD e C4H, hanno mostrato un'altezza ed un tasso di crescita ridotti (Chabannes *et al.*, 2001). Ciò era dovuto ad un ridotto allungamento degli internodi. Altri effetti sono stati particolarmente appariscenti sulle foglie. Queste ultime sono risultate di dimensioni ridotte rispetto al controllo, malformate e di colore scuro. Tutti questi fenotipi erano associati ad una riduzione del contenuto di lignina e dei composti fenolici. Tamagnone *et al.*, (1998) hanno ipotizzato che i fenotipi siano dovuti inizialmente ad una riduzione del contenuto dei composti fenolici che a sua volta influenza il contenuto di lignina. Tali modificazioni fenotipiche della pianta e delle foglie sono state riportate anche in piante con una ridotta espressione della PAL, che hanno mostrato una riduzione del contenuto di fenoli della lignina (Elkind *et al.*, 1990). Riguardo alla colorazione bruno-marrone di foglie di alcuni cloni transgenici, è stato riscontrato un fenotipo simile in piante di tabacco trasformate con i geni antisenso codificanti per CCR e CAD. Gli studi condotti su piante esprimenti tali geni hanno mostrato un fenotipo della foglia anormale, una ridotta crescita della pianta, una tessitura della foglia più soffice ed una pronunciata arricciatura del margine verso il basso. In aggiunta tali piante hanno presentato un'alterata colorazione dello xilema con una forte colorazione rosso-marrone (O'Connell *et al.*, 2002), similmente a quanto osservato nelle piante da noi ottenute. Oltre alla riduzione del contenuto di lignina e dei composti fenolici, le differenze osservate nella forma delle foglie da noi osservata potrebbero essere state influenzate anche da altri fattori come la carenza di rame. Le laccasi sono, infatti, delle molecole che presentano più atomi di rame e potrebbero sequestrare tali molecole, rendendole meno disponibili per la pianta. I sintomi di carenza di rame sono in gran parte noti. Le foglie giovani diventano spesso di colore verde scuro, sono contorte o hanno altre malformazioni e presentando spesso punti necrotici. Il rame, essenziale per la fotosintesi, è presente nella proteina plastocianina, un trasportatore di elettroni nelle reazioni della fase luminosa, essenziale per la respirazione. È presente anche nell'acido ascorbico ossidasi ed in diverse amino ossidasi, come quella che converte la triptamina in acido indolacetico, l'ormone della crescita. Senza dubbio fa parte anche d'altri sistemi enzimatici vegetali (Marschner *et al.*, 1995).

Per verificare se le piante da noi ottenute con una laccasi fungina esogena avessero un'effettiva capacità degradativa degli inquinanti organici, sono stati effettuati saggi *in vivo* di degradazione di un colorante tessile Remazol Brilliant Blue R (RBBR).

L'industria tessile è notevolmente il maggior utilizzatore di coloranti sintetici, e quindi di soluzioni efficienti ecologicamente per i suoi effluenti colorati. Gli effluenti dalle industrie tessili sono una complessa miscela di alcune sostanze inquinanti simili a pesticidi basati su organoclorina, metalli pesanti, pigmenti e tinture. Il rilascio degli effluenti colorati nell'ambiente non è esteticamente piacevole e alcuni coloranti sono potenzialmente dannosi per la salute, in quanto essi potrebbero essere convertiti in prodotti tossici e/o carcinogenici in condizioni anaerobiche (Champagne e Ramsay, 2005). Vari paesi hanno adottato norme stringenti per il rilascio di effluenti derivanti dall'industria tessile. A causa della varietà chimica e delle differenti proprietà, non tutti i coloranti possono essere rimossi da una singola tecnologia, come la coagulazione, l'ozonazione o il carbonio attivato (Dubrow *et al.*, 1996). Per superare queste difficoltà, e prendendo in considerazione l'ampia specificità di substrati dei *white rot fungi* a degradare composti aromatici, questi funghi sono stati studiati per la loro potenziale applicazione nel trattamento degli effluenti tessili (Zouari-Mechichi *et al.*, 2005).

In letteratura sono riportate limitate informazioni sulla biotrasformazione dei coloranti antrachinonici rispetto alla notevole ricerca condotta sui coloranti azo (Lee and Pavlostathis 2004). La ragione principale è che i coloranti antrachinonici sono più resistenti alla degradazione dovuta alla loro struttura aromatica complessa (Fu and Viraraghavan 2001). L'RBBR, il colorante utilizzato nei nostri esperimenti, è un colorante antrachinonico frequentemente utilizzato nell'industria tessile e perciò rappresenta un'importante classe d'inquinanti organici (Soares *et al.* 2001).

Sono riportati svariati lavori dove è riportato l'utilizzo di funghi per degradare l'RBBR, ma non sono riportati in letteratura articoli dove sono utilizzate le stesse piante per risanare acque inquinate da effluenti colorati.

Palmieri *et al.*, (2005) riportano l'utilizzo di colture di *P. ostreatus*, con l'aggiunta di ferro e acido ferulico, per la degradazione del colorante RBBR. Il massimo di decolorazione che il sistema ha raggiunto in condizioni ottimali è stato del 70%. Questo dato è in sintonia con i dati da noi riportati dove è mostrato che alcuni genotipi riescono a degradare l'RBBR fino ad un 70% di decolorazione e senza aggiunta di composti che fungono da donatori di elettroni.

Additivi usati durante il processo tessile possono significativamente influenzare l'attività enzimatica (Li *et al.*, 1998). Abadulla *et al.*, (2000) riportano che agenti tensioattivi anionici, i quali hanno inibito la laccasi da *T. hirsuta* del 20%, sembrano interagire positivamente con la catena laterale carica degli amminoacidi dopo la penetrazione della struttura proteica dalla coda idrofobica. Al contrario, agenti tensioattivi cationici, non hanno mostrato effetti denaturanti. La laccasi da *T. hirsuta* è stata inibita del 17% quando incubata con agenti capaci di sequestrare o inattivare il rame e ferro. Alcune laccasi sono inibite da chelanti di metalli, come l'EDTA. Questo potrebbe spiegare il motivo per il quale alcune piante non hanno degradato efficientemente il colorante in soluzione; dato che le piante sono state allevate in una soluzione di Hoagland's contenente chelanti del ferro, questo ha potuto influenzare l'attività enzimatica della laccasi eterologa.

Inoltre sono stati effettuati esperimenti volti a saggiare la capacità delle piante esperimenti la laccasi eterologa di risanare acque inquinate da contaminanti organici. Al fine di valutare la capacità delle linee transgeniche di metabolizzare i composti fenolici nel liquido di coltura, le piante sono state allevate *in vivo* in una coltura

idroponica contenente le acque di vegetazione. Dopo una settimana di coltura è stata osservata una diminuzione della concentrazione di tali composti variabile tra le diverse linee con un massimo di degradazione del 70%. I dati da noi ottenuti non possono essere confrontati con i saggi di degradazione effettuati da Wang *et al.*, (2004) poiché gli autori hanno riportato solo i dati di degradazione di singoli composti fenolici. Inoltre non hanno effettuato un esperimento di degradazione utilizzando le piante ma utilizzando il mezzo di coltura concentrato dove erano state fatte crescere le piante. I dati della riduzione della concentrazione dei composti fenolici possono essere confrontati con i valori riportati da un'espressione eterologa di un'altra laccasi di fungo in tabacco riportata da Sonoki *et al.*, (2005). In questo caso gli Autori hanno ottenuto una rimozione del bisfenolo A e del pentaclorofenolo in una coltura idroponica 2 volte maggiore nelle piante overesprimenti la laccasi eterologa. Nel nostro caso la riduzione è stata circa di una volta e mezzo quella mostrata dal controllo. Tale differenza potrebbe essere giustificata dal fatto che le acque di vegetazione, in quanto contenenti una miscela di composti fenolici, sono molto più difficili da degradare dei singoli composti da loro utilizzati per il saggio di degradazione.

### **4.3 Espressione del gene *bar* in piante di tabacco per la degradazione del tricloroetilene**

I ricercatori hanno ingegnerizzato le piante con vari geni per aumentare l'abilità fitorisanatrice delle piante in un processo chiamato ingegneria genetica. Alcuni studi hanno già riportato che piante di tabacco transgeniche assorbono e degradano il tricloroetilene più velocemente di piante di tabacco non transgeniche. Piante di tabacco trasformate con il gene P450 2E1 umano hanno trasformato il tricloroetilene in una concentrazione 149 volte più grande delle piante contenente il vettore nullo nelle loro radici, 44 volte nei fusti e 72 volte in più nelle foglie (Doty *et al.*, 2000). I geni della P450 citocromo ossidasi sono stati scelti per aumentare l'abilità fitorisanatrice delle piante siccome essi hanno la maggior via metabolica per il TCE negli umani (Guengerich *et al.*, 1991).

Anche se le piante ingegnerizzate con geni umani o con altri geni animali hanno mostrato un grande interesse e un gran potenziale per il fitorisanamento, questi non hanno ottenuto però un riscontro positivo da parte dell'opinione pubblica. Perciò i ricercatori hanno iniziato ad ingegnerizzare piante con geni da altre piante come *Arabidopsis*. Questa pianta è stata scelta perché il suo genoma è stato sequenziato. Nel nostro laboratorio è stato fatto uno studio preliminare, dove geni selezionati da *Arabidopsis thaliana* sono stati trasformati in piante di tabacco. I geni scelti condividono un'omologia di sequenza con il gene P450 2E1 umano. Il gene marcatore selettivo scelto è stato il gene *bar* che codifica per l'enzima fosfonitrocina acil transferasi (PAT). Quest'enzima ha la capacità di detossificare l'erbicida glufosinate (Mayer *et al.*, 2004). Sono state inoltre ottenute piante nulle contenente solo il gene *bar*. Queste piante sono state analizzate per determinare l'impatto del gene sulla tossicità, la distribuzione e il metabolismo del TCE e del TCAA all'interno delle piante di tabacco.

Le piante di tabacco esprimenti il gene *bar* hanno mostrato meno sensibilità al tricloroetilene e hanno assorbito maggior TCE rispetto alle piante *wild type*. Nelle piante transgeniche è stato osservato un aumentato assorbimento del tricloroetilene rispetto alle piante non trasformate e questo potrebbe essere dovuto ad una più

bassa concentrazione del tricloroetilene trovato nei fusti delle piante transgeniche, che permetterebbe al tricloroetilene di muoversi all'interno della pianta lungo il gradiente di concentrazione. Non si conosce perché più tricloroetilene è stato degradato nelle piante esprimenti il gene *bar*. L'enzima fosfinotricina acetil trasferasi lavora acetilando gruppi amminici da erbicidi come il glufosinate (Mayer *et al.*, 2004). Né il tricloroetilene né l'acido tricloroacetico hanno gruppi amminici nella loro struttura chimica. In ogni modo gli erbicidi attaccati dall'enzima PAT contengono nella loro struttura acidi carbossilici e questo potrebbe avere un ruolo nell'attacco dell'enzima al substrato. Comunque attualmente non è stato definito se l'enzima PAT è attivo sul TCAA o se agisce su un altro metabolita a valle. L'aumentata degradazione di simili metaboliti potrebbe potenzialmente aumentare il tasso di degradazione dell'acido tricloroacetico.

Si è osservato che le piante transgeniche, inoltre, sono capaci di degradare più velocemente il TCAA rispetto alle piante non trasformate. Si può concludere, quindi, che le piante transgeniche presentano livelli più bassi di TCAA quando sono state dosate sia per il TCE che per il TCAA. Comunque allo stesso tempo noi non abbiamo determinato il destino dell'acido tricloroacetico nelle piante.

Il gene *bar* è un comune marcatore selettivo usato sia negli studi con piante che batteri. Marcatori selettivi come il gene *bar* potrebbero causare potenzialmente risposte inattese quando le piante sono studiate per l'espressione di altre caratteristiche. Questo studio ha trovato che il gene *bar* potrebbe fornire un'aumentata capacità fitorisanatrice.

## 5. Conclusioni

Nel presente lavoro di tesi sono state ottenute piante di tabacco esprimenti geni utili per il fitorisanamento dei suoli e acque contaminate da inquinanti organici.

Una classe di geni utilizzati è stata quella delle laccasi, che sono degli enzimi capaci di catalizzare l'ossidazione di composti aromatici in composti meno tossici. Per la trasformazione genetica è stato utilizzato il cDNA del gene *poxA1b* isolato dal fungo *Pleurotus ostreatus*. Le piante transgeniche sono state caratterizzate con analisi molecolari e saggi d'attività enzimatica. Tutte le linee transgeniche ottenute hanno espresso correttamente il gene esogeno e hanno mostrato un'attività enzimatica variabile tra le varie linee trasformate e all'interno della pianta. L'attività è stata saggiata con tre differenti substrati, l'ABTS, la siringaldazina e il 2.6-DMP. L'attività è stata saggiata in tre stadi fenologici della pianta e nell'intera pianta mostrando un livello di attività variabile. Quando le piante sono state saggiate con l'ABTS il valore di attività massimo riscontrato è stato di  $366 \text{ mUmg}^{-1}$ ; per la siringaldazina è stato di  $10 \text{ mUmg}^{-1}$  e con il 2.6-DMP è stato di  $392 \text{ mUmg}^{-1}$ . Inoltre l'attività enzimatica è stata saggiata anche negli essudati radicali con gli stessi tre substrati. Anche in questo caso i valori riscontrati sono stati variabili tra le diverse linee.

Sono state inoltre analizzate le progenie delle piante esprimenti il gene *poxC*, un'altra laccasi isolata da *P.ostreatus*. Le piante saggiate hanno mostrato una buona capacità di degradare i fenoli contenuti in acque di vegetazione e coloranti tessili. Inoltre queste ultime non hanno mostrato alterazioni del fenotipo.

Al fine di ottenere una maggiore capacità da parte di queste piante di degradare composti organici inquinanti, saranno progettati esperimenti futuri riguardanti l'espressione in pianta di entrambe le isoforme della laccasi di *P.ostreatus*. Saranno inoltre progettati esperimenti per una migliore comprensione dell'effetto della laccasi esogena in pianta.

Per quanto riguarda lo studio delle piante di tabacco esprimenti il gene *bar* per la degradazione del tricloroetilene, si è visto che queste ultime hanno una capacità maggiore ad assorbire e degradare il tricloroetilene rispetto alle piante non trasformate.

Il gene *bar* è un comune marcatore selettivo usato sia in piante che batteri. I marcatori selettivi, come il gene *bar*, potrebbero potenzialmente causare una risposta imprevista quando le piante sono studiate per l'espressione di altri caratteri. Questo studio, quindi, ha trovato che il gene *bar* potrebbe fornire alle piante un'aumentata capacità fitorisanatrice.

## 6. Tabelle e figure

**Tabella 2.1:** Codice e sequenza 5'→3' dei primer utilizzati per la costruzione dei vettori di espressione

Primer	
Codice	Sequenza 5'→ 3'
PoxA1b F	TGCTGGGTCCATTTATGAC
PoxA1b R	AGGAGTTTCGATGGGTTCG
PGREENPoxA1b F	CATTCGTTCCGCTTGTTCCTACTC
PGREENPoxA1b R	CTTTCAATGGCGCAGGGCAGAC
30 F	ATTGATATCGTACCCCTACTCAAAAATG
30 R	AGTGAATTCGGGCTGTCCTCTCCAGATG
BAR F	CAG GAA CCG CAG GAG TGG A
BAR R	CCA GAA ACC CAC GTC ATG CC
ACTINA F	TGG AAC TCC AAT GGT TAA GGC TGG
ACTINA R	TCT CCA GAG TCG AGC ACA ATA CCG

**Tabella 3.1:** Valori medi e deviazione standard del saggio spettrofotometrico con ABTS dell'attività fenol-ossidasi effettuato su proteine totali solubili estratte da foglie di piante allevate *in vivo* a differenti stadi fenologici. Legenda: 3.1-3.8, piante transgeniche esprimenti il gene *poxA1b*; NN, pianta di tabacco non trasformata. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative per  $p < 0,05$ .

Genotipo	Attività enzimatica (mU/mg)							
	f. apicale (m ± d.s.)		f. mediana (m ± d.s.)		f. basale (m ± d.s.)		Pianta (m ± d.s.)	
3.1	584 ±	122 a	119 ±	8 c	395 ±	9 c	366 ±	234 c
3.3	133 ±	33 b	164 ±	23 d	143 ±	24 d	147 ±	16 b
3.4	30 ±	18 c	63 ±	10 a	27 ±	9 a	40 ±	20 a
3.5	44 ±	11 ce	36 ±	12 ab	97 ±	7 e	59 ±	33 a
3.6	21 ±	7 c	16 ±	3 b	28 ±	7 a	22 ±	6 a
3.7	122 ±	46 be	207 ±	19 e	167 ±	8 bd	166 ±	43 b
3.8	329 ±	39 d	203 ±	20 e	292 ±	38 f	275 ±	65 d
NN	30 ±	15 c	72 ±	42 a	4 ±	4 a	35 ±	34 a



**Tabella 3.2:** Valori medi e deviazione standard del saggio spettrofotometrico con la Siringaldazina dell'attività fenol-ossidasi effettuato su proteine totali solubili estratte da foglie di piante allevate *in vivo* a differenti stadi fenologici. Legenda: 3.1-3.8, piante transgeniche esprimenti il gene *poxA1b*; NN, pianta di tabacco non trasformata. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative per  $p < 0,05$ .

Genotipo	Attività enzimatica (mU/mg)									
	f. apicale (m ± d.s.)		f. mediana (m ± d.s.)		f. basale (m ± d.s.)		Pianta (m±d.s.)			
3.1	6 ±	5 a	0		2 ±	1 b	3 ±	3	a	
3.3	7 ±	6 a	0		9 ±	3 c	5 ±	4	ab	
3.4	0	a	0		1 ±	0 a	0.3 ±	0.6	a	
3.5	4 ±	1 a	0		3 ±	0 b	2 ±	2	a	
3.6	0	a	0		0	a	0		a	
3.7	27 ±	16 b	0		2 ±	0 b	10 ±	15	b	
3.8	0	a	0		0	0 a	0		a	
NN	0	a	0		0	0 a	0		a	

**Tabella 3.3:** Valori medi e deviazione standard del saggio spettrofotometrico con il 2.6-dimetossifenolo dell'attività fenol-ossidasi effettuato su proteine totali solubili estratte da foglie di piante allevate *in vivo* a differenti stadi fenologici. Legenda: 3.1-3.8, piante transgeniche esprimenti il gene *poxA1b*; NN, pianta di tabacco non trasformata. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative per  $p < 0,05$ .

Genotipo	Attività enzimatica (mU/mg)									
	f. apicale (m ± d.s.)		f. mediana (m ± d.s.)		f. basale (m ± d.s.)		Pianta (m ± d.s.)			
3.1	331 ±	20 b	240 ±	32 c	310 ±	14 c	294+	48	b	
3.3	333 ±	42 b	184 ±	29 d	221 ±	6 d	246+	77	b	
3.4	88 ±	10 c	84 ±	21 a	71 ±	11 e	81+	9	a	
3.5	337 +	37 b	255 ±	12 ae	319 ±	26 c	304+	43	b	
3.6	68 +	8 ac	179 ±	43 e	46 ±	3 e	98+	71	c	
3.7	493 +	40 d	340 ±	38 b	344 ±	22 f	392+	87	c	
3.8	263 +	58 e	138 ±	5 b	279 ±	12 b	227+	77	c	
NN	24 +	12 a	55 ±	19 a	17 ±	6 a	32+	20	a	

**Tabella 3.4:** Valori medi e deviazione standard del saggio spettrofotometrico con ABTS, Siringaldazina e 2.6-dimetossifenolo dell'attività fenol-ossidasi effettuato su proteine totali solubili di essudati radicali di piante allevate in coltura idroponica *in vitro*. Legenda: 3.1-3.8, piante transgeniche esprimenti il gene *poxA1b*; NN, pianta di tabacco non trasformata. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative per  $p < 0,05$ .

Genotipo	Attività enzimatica (mU/mg)					
	ABTS (m ± d.s.)		Siringaldazina (m ± d.s.)		2,6-DMP (m ± d.s.)	
3.1	168 ±	15 a	11 ±	2 a	168 ±	19 a
3.3	43 ±	2 b	20 ±	1 b	41 ±	5 <u>b</u>
3.4	0	c	6 ±	1 c	2 ±	0 c
3.5	12 ±	4 d	8 ±	3 c	25 ±	6 d
3.6	6 ±	2 cd	3 ±	1 e	11 ±	6 cd
3.7	35 ±	3 e	4 ±	2 e	45 ±	7 b
3.8	29 ±	1 e	7 ±	3 c	66 ±	8 e
NN	3 ±	1 cd	4 ±	1 e	3 ±	1 c

**Tabella 3.5a:** Percentuale di chiarificazione di acque di vegetazione con piante di tabacco T<sub>1</sub> esprimenti il gene *poxC* allevate in coltura idroponica *in vivo*. I valori qui riportati rappresentano la percentuale di chiarificazione al settimo giorno di coltura. NN, pianta di tabacco non trasformata. Lettere differenti indicano differenze significative per  $p < 0,05$ .

Genotipo	Percentuale di chiarificazione	
17-102	76%	b
17-108	57 %	c
17-115	81 %	d
17-116	66 %	e
17-117	95 %	g
17-121	79 %	c
23-100	86 %	e
23-104	84 %	g
23-117	103 %	i
23-122	99 %	e
NN	62 %	a

**Tabella 3.5b:** Percentuale di chiarificazione di acque di vegetazione con piante di tabacco T<sub>1</sub> esprimenti il gene *poxC* allevate in coltura idroponica *in vivo*. I valori qui riportati rappresentano la percentuale di chiarificazione al settimo giorno di coltura. NN, pianta di tabacco non trasformata. Lettere differenti indicano differenze significative per  $p < 0,05$ .

Genotipo	Percentuale di chiarificazione	
28-102	79 %	a
33-107	94 %	b
33-119	86 %	b
34-110	84 %	b
35-108	84 %	b
35-109	95 %	ab
35-111	99 %	ab
36-104	88 %	ab
4-0	97 %	ab
4-104	90 %	b
54-109	88 %	b
NN	62 %	a

**Tabella 3.6a:** Valori medi e deviazione standard dell'assorbanza a 750nm per la quantificazione dei fenoli su acque di vegetazione raccolte dopo la coltura idroponica *in vivo* con piante T<sub>1</sub> esprimenti il gene *poxC*. NN, pianta di tabacco controllo. Lettere differenti indicano differenze significative per p<0,05.

GENOTIPO	OD (m ± d.s.)	
17-102	0.109 ± 0.003	a
17-108	0.027 ± 0.004	b
17-115	0.047 ± 0.025	c
17-116	0.016 ± 0.010	bd
17-117	0.030 ± 0.001	bcd
17-121	0.035 ± 0.002	bcde
23-100	0.023 ± 0.009	bcdf
23-104	0.054 ± 0.005	ce
23-117	0.114 ± 0.005	a
23-122	0.060 ± 0.002	ceg
28-102	0.045 ± 0.018	bcde
33-107	0.021 ± 0.002	bcdef
NN	0.043 ± 0.011	a

**Tabella 3.6b:** Valori medi e deviazione standard dell'assorbanza a 750nm per la quantificazione dei fenoli su acque di vegetazione raccolte dopo la coltura idroponica *in vivo* con piante T<sub>1</sub> esprimenti il gene *poxC*. NN, pianta di tabacco controllo. Lettere differenti indicano differenze significative per p<0,05.

GENOTIPO	OD (m ± d.s.)	
34-101	0.056 ± 0.004	a
34-109	0.037 ± 0.011	a
34-110	0.050 ± 0.002	a
35-108	0.022 ± 0.019	ab
35-109	0.034 ± 0.025	ab
35-111	0.035 ± 0.004	ab
36-104	0.074 ± 0.013	ab
4-0	0.149 ± 0.006	ab
4-104	0.023 ± 0.015	abc
54-109	0.012 ± 0.014	abc
NN	0.043 ± 0.011	abc

**Tabella 3.7:** Percentuale di RBBR degradata nell'intervallo temporale di una settimana. Il saggio è stato effettuato in coltura idroponica *in vivo* con piante di tabacco T<sub>1</sub> esprimenti il gene *poxC*. Legenda: tempo1, valore rilevato dopo 2 giorni di incubazione; tempo2 valore rilevato dopo 5 giorni di incubazione; tempo 3 valore rilevato dopo 7 giorni di incubazione; NN pianta di tabacco non trasformata.

Genotipo	Tempo1 (% <u>±</u> d.s.)	Tempo2 (% <u>±</u> d.s.)	Tempo3 (% <u>±</u> d.s.)
NN100	55 <u>±</u> 1	46 <u>±</u> 0	52 <u>±</u> 0
NN102	65 <u>±</u> 1	69 <u>±</u> 2	51 <u>±</u> 0
<i>poxc</i> 17-105	39 <u>±</u> 1	34 <u>±</u> 0	23 <u>±</u> 1
<i>poxc</i> 17-107	51 <u>±</u> 0	44 <u>±</u> 1	26 <u>±</u> 2
<i>poxc</i> 17-110	59 <u>±</u> 1	56 <u>±</u> 1	43 <u>±</u> 1
<i>poxc</i> 17-111	47 <u>±</u> 1	41 <u>±</u> 3	20 <u>±</u> 0
<i>poxc</i> 23-101	35 <u>±</u> 0	33 <u>±</u> 1	29 <u>±</u> 2
<i>poxc</i> 23-105	66 <u>±</u> 1	56 <u>±</u> 1	43 <u>±</u> 1
<i>poxc</i> 23-106	50 <u>±</u> 1	48 <u>±</u> 1	37 <u>±</u> 1
<i>poxc</i> 23-109	41 <u>±</u> 2	27 <u>±</u> 1	19 <u>±</u> 2
<i>poxc</i> 26-104	53 <u>±</u> 1	55 <u>±</u> 1	50 <u>±</u> 1
<i>poxc</i> 26-105	63 <u>±</u> 1	69 <u>±</u> 1	60 <u>±</u> 1
<i>poxc</i> 26-106	47 <u>±</u> 0	45 <u>±</u> 1	33 <u>±</u> 1
<i>poxc</i> 41-101	67 <u>±</u> 1	84 <u>±</u> 1	57 <u>±</u> 0
<i>poxc</i> 41-102	67 <u>±</u> 1	75 <u>±</u> 1	56 <u>±</u> 1
<i>poxc</i> 41-103	49 <u>±</u> 1	47 <u>±</u> 1	36 <u>±</u> 1
<i>poxc</i> 54-100	45 <u>±</u> 2	42 <u>±</u> 1	32 <u>±</u> 1
<i>poxc</i> 54-107	38 <u>±</u> 2	34 <u>±</u> 0	19 <u>±</u> 2
<i>poxc</i> 4-C	55 <u>±</u> 1	84 <u>±</u> 1	49 <u>±</u> 1
<i>poxc</i> 4-115	44 <u>±</u> 1	39 <u>±</u> 1	30 <u>±</u> 3
<i>poxc</i> 35-100	28 <u>±</u> 1	29 <u>±</u> 1	30 <u>±</u> 1

**Tabella 3.8:** Confronto delle altezze dei genotipi transgenici con il controllo al 1°, al 15° ed al 30° giorno di allevamento *in vivo*. Il confronto con il controllo è eseguito per singolo giorno di osservazione.

Genotipo	giorno	altezza Media+d.s.
Controllo	1	29,2+ 5,8a
T1-29	1	24,3+ 7,9a
T1-34	1	14,1+ 6,3b
T1-39	1	20,2+ 5,9a
T1-54	1	18,7+ 5,2a
T2-29	1	18,1+ 6,7a
T2-39	1	19,7+ 5,8a
Controllo	15	62,4+ 8,4a
T1-29	15	52,3+17,3a
T1-34	15	52,9+ 6,3a
T1-39	15	47,7+ 11,7a
T1-54	15	53,4+ 12,2a
T2-29	15	55,6+ 11,8a
T2-39	15	50,7+ 8,5a
Controllo	30	95,3+ 9,3a
T1-29	30	77,4+ 26,0b
T1-34	30	89,9+ 15,7a
T1-39	30	84,0+ 23,1ab
T1-54	30	86,5+ 14,1a
T2-29	30	87,5+ 16,4a
T2-39	30	80,2+ 16,8a

**Tabella 3.9:** Confronto del diametro del colletto dei genotipi transgenici con il controllo al 1°, al 15° ed al 30° giorno di allevamento *in vivo*. Il confronto con il controllo è eseguito per singolo giorno di osservazione.

Genotipo	giorno	diametro Media+d.s.
Controllo	1	0,9+ 0,3a
T1-29	1	0,8+ 0,2a
T1-34	1	0,8+ 0,2b
T1-39	1	0,8 + 0,2a
T1-54	1	0,8+ 0,2a
T2-29	1	0,8+ 0,2a
T2-39	1	0,8+ 0,2a
Controllo	15	1,0+ 0,2a
T1-29	15	1,1+0,2a
T1-34	15	1,0+ 0,2a
T1-39	15	1,0+ 0,2a
T1-54	15	1,1+ 0,2a
T2-29	15	1,1+ 0,2a
T2-39	15	1,1+ 0,1a
Controllo	30	1,3+ 0,1a
T1-29	30	1,2+ 0,2a
T1-34	30	1,3+ 0,1a
T1-39	30	1,2+ 0,1a
T1-54	30	1,2+ 0,1a
T2-29	30	1,2+ 0,1a
T2-39	30	1,2+ 0,1a

**Tabella 3.10:** Confronto della lunghezza del sesto internodo dei genotipi transgenici con il controllo al 1°, al 15° ed al 30° giorno di allevamento *in vivo*. Il confronto con il controllo è eseguito per singolo giorno di osservazione.

Genotipo	giorno	lunghezza 6°Internodo Media+d.s.
Controllo	1	2.0+ 1.0a
T1-29	1	1.6+ 0,7a
T1-34	1	1.9+ 0,9a
T1-39	1	1,5 + 0,9a
T1-54	1	1.6+ 0,9a
T2-29	1	1.7+ 0,9a
T2-39	1	1.8+ 1,0a
Controllo	15	2.4+ 1.3a
T1-29	15	2.5+0.9ab
T1-34	15	3.1+ 1,1ab
T1-39	15	2.3+ 0.9c
T1-54	15	2.5+ 1.2abc
T2-29	15	3.1+ 1.1ab
T2-39	15	2.8+ 1.2abc
Controllo	30	3.2+ 1.1a
T1-29	30	3.1+ 1.0b
T1-34	30	4.0+ 0.9a
T1-39	30	3.2+ 1.0ab
T1-54	30	3.6+ 1.3ab
T2-29	30	3.8+ 1.5a
T2-39	30	3.7+ 1.0ab

**Tabella 3.11:** Confronto del numero di nodi dei genotipi transgenici con il controllo al 1°, al 15° ed al 30° giorno di allevamento *in vivo*. Il confronto con il controllo è eseguito per singolo giorno di osservazione.

Genotipo	giorno	N°nodi Media+d.s.
Controllo	1	13.9+ 2.0a
T1-29	1	10.4+ 2.8a
T1-34	1	8.9+ 2.3
T1-39	1	10.4 + 2.2a
T1-54	1	11.9+ 2.4a
T2-29	1	10.4+ 3.0a
T2-39	1	10.2+ 1.7a
Controllo	15	19.9+ 3.2a
T1-29	15	19.2+5.5a
T1-34	15	15.7+ 4.6a
T1-39	15	19.1+ 4.2a
T1-54	15	18.5+ 5.3a
T2-29	15	19.6+ 4.8a
T2-39	15	20.0+ 4.5a
Controllo	30	36.6+ 7.2a
T1-29	30	32.5+ 12.5b
T1-34	30	34.4+ 7.5ab
T1-39	30	36.5+ 9.4a
T1-54	30	33.3+ 8.7ab
T2-29	30	36.3+ 7.9a
T2-39	30	34.4+ 7.4ab

**Tabella 3.12:** Numero di semi di genotipi T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub> esprimenti il gene *poxC* cresciuti in mezzo selettivo contenente Kanamicina.

Genotipo	N°semi su kanamicina	N°semi germinati
T <sub>1</sub> 29	36	32
T <sub>1</sub> 34	16	3
T <sub>1</sub> 39	27	21
T <sub>1</sub> 54	30	28
T <sub>2</sub> 29	24	17
T <sub>2</sub> 39	30	27

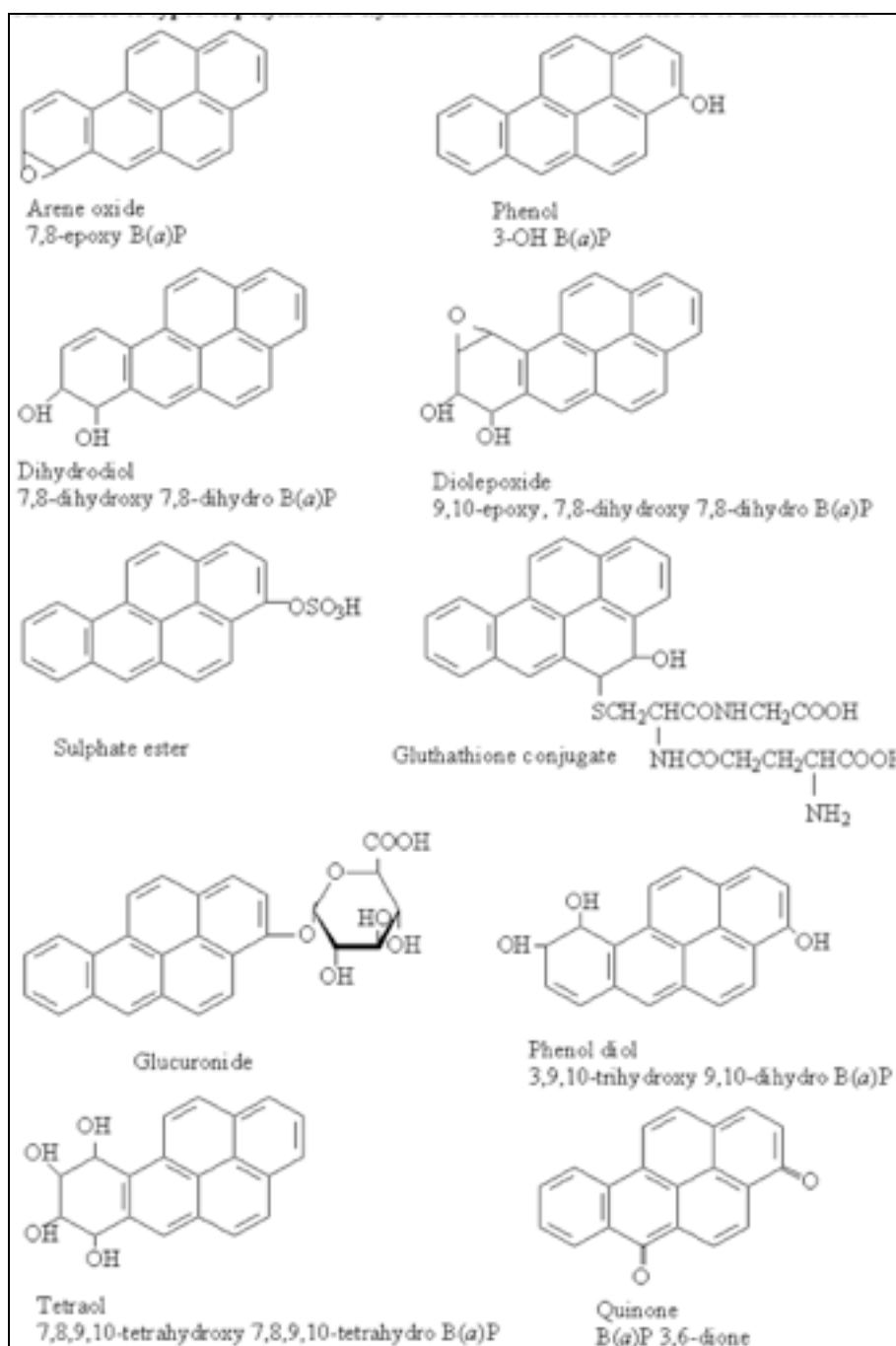
**Tabella 3.13:** Valori medi e deviazione standard di millilitri d'acqua delle piante di tabacco dosate con livelli tossici e non di tricloroetilene.

<b>Millilitri di Acqua Assorbita da Piante dosate con Tricloroetilene</b>		
	<b>Transgenic</b>	<b>Wild Type</b>
Concentrazione non tossica	211 ± 20	221 ± 38
<b>Concentrazione tossica</b>	110 ± 26	137 ± 49

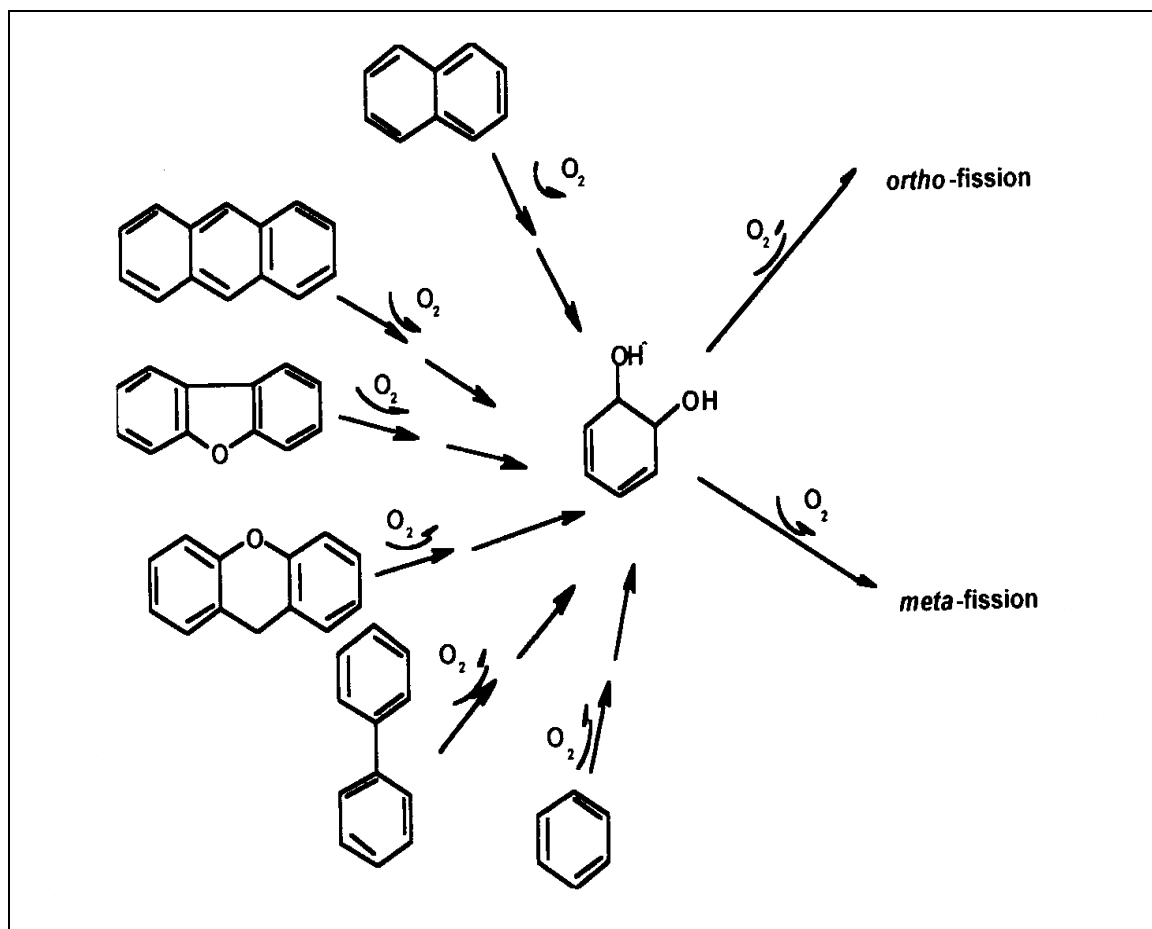
**Tabella 3.14:** Valori medi e deviazione standard di millilitri d'acqua delle piante di tabacco dosate con livelli tossici e non di acido tricloroacetico.

<b>Millilitri di acqua assorbiti da piante dosate con Acido Tricloroacetico</b>		
	<b>Transgeniche</b>	<b>Wild Type</b>
Concentrazione non tossica	151 ± 30	186 ± 36
<b>Concentrazioni tossica</b>	61 ± 15	52 ± 6

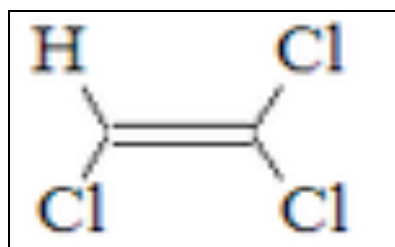




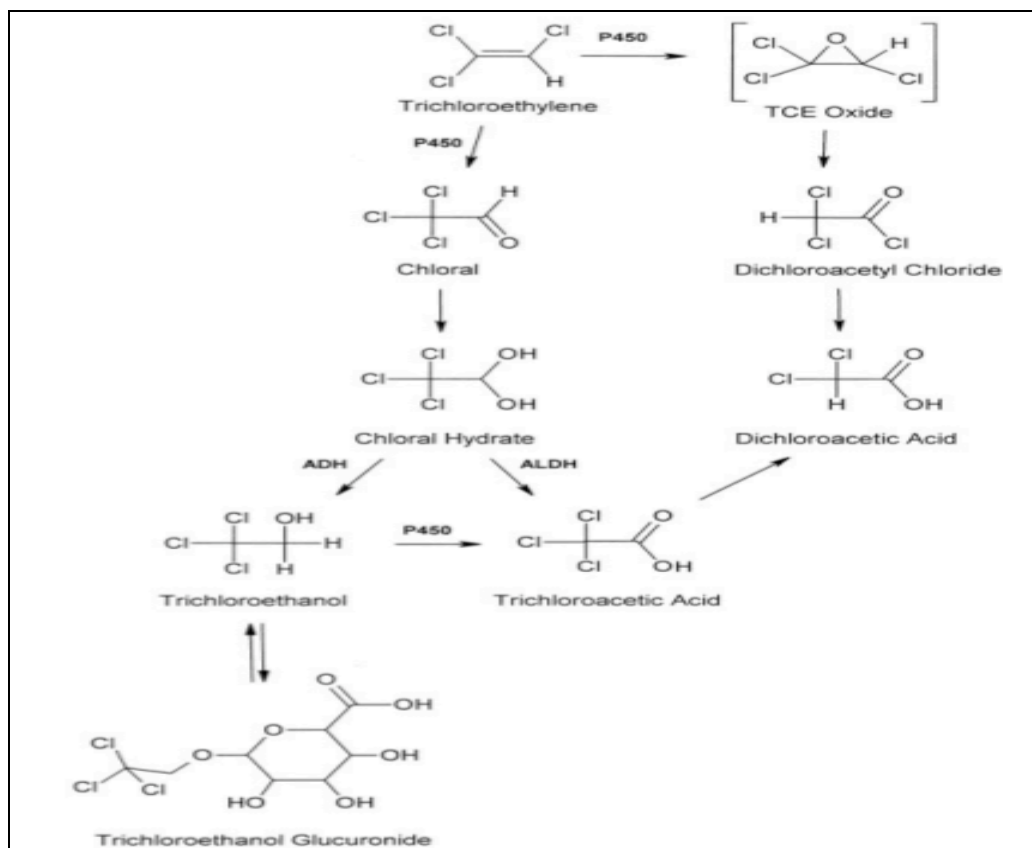
**Figura 1.2** : Alcuni esempi di idrocarburi policiclici aromatici.



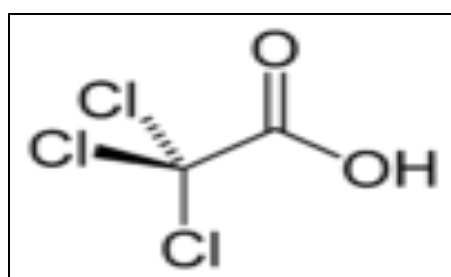
**Figura 1.2:** Formazione del catecolo intermedio chiave del processo degradativo di diverse classi di IPA in condizioni aerobiche.



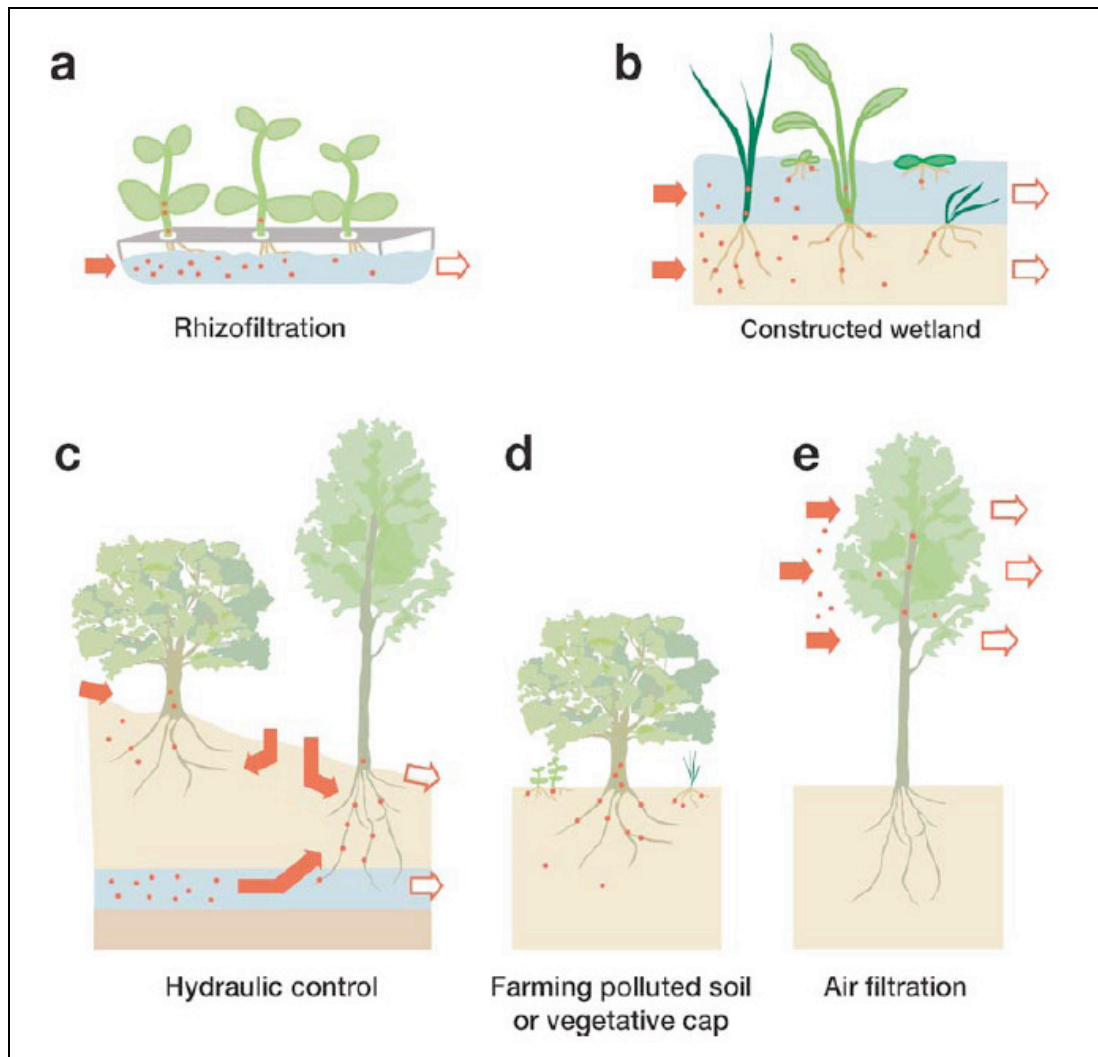
**Figura 1.3:** Struttura chimica del Tricloroetilene



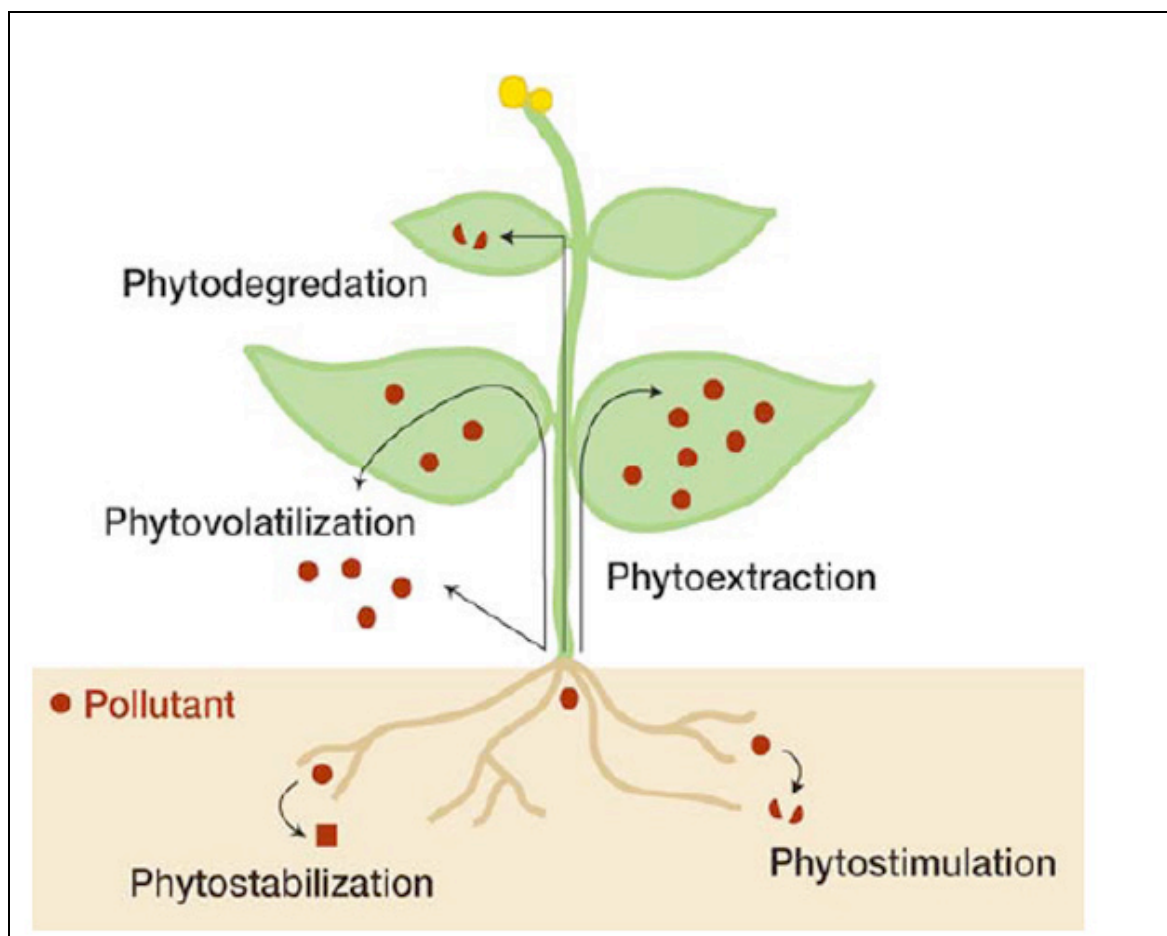
**Figura 1.4:** Schema proposto per il metabolismo del tricloroetilene mediato dall'enzima citocromo P450.



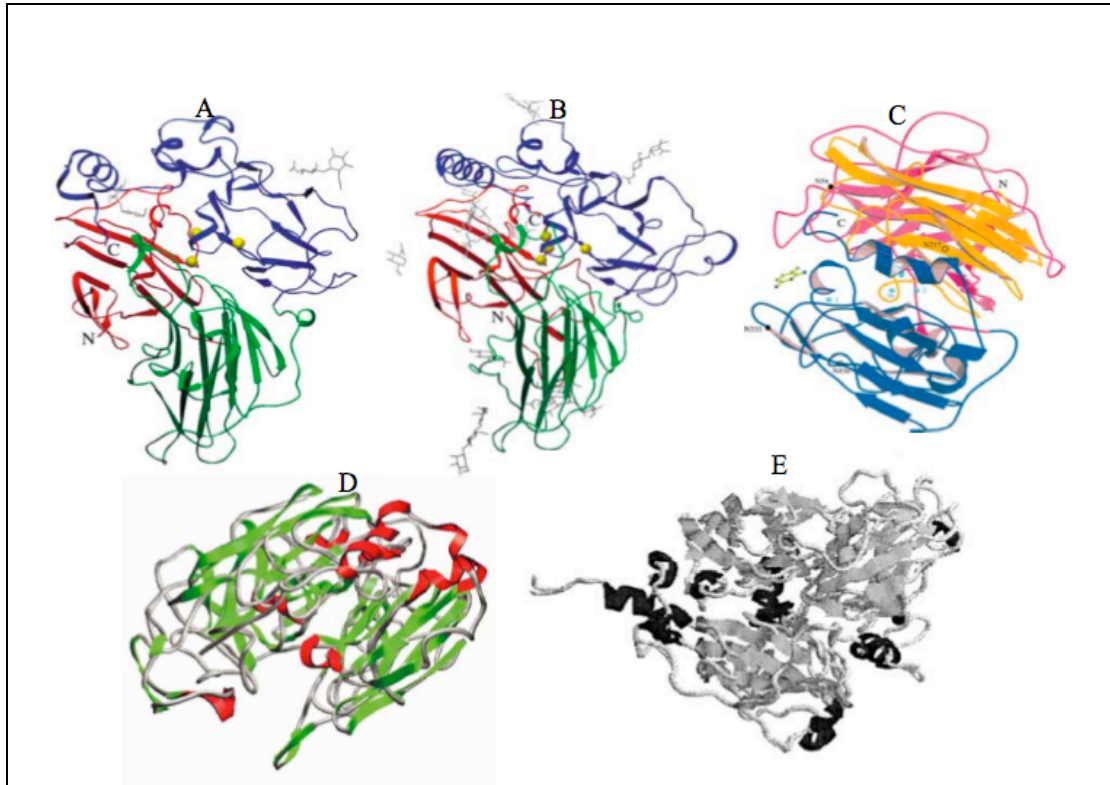
**Figura 1.5:** Struttura chimica dell'acido tricloroacetico



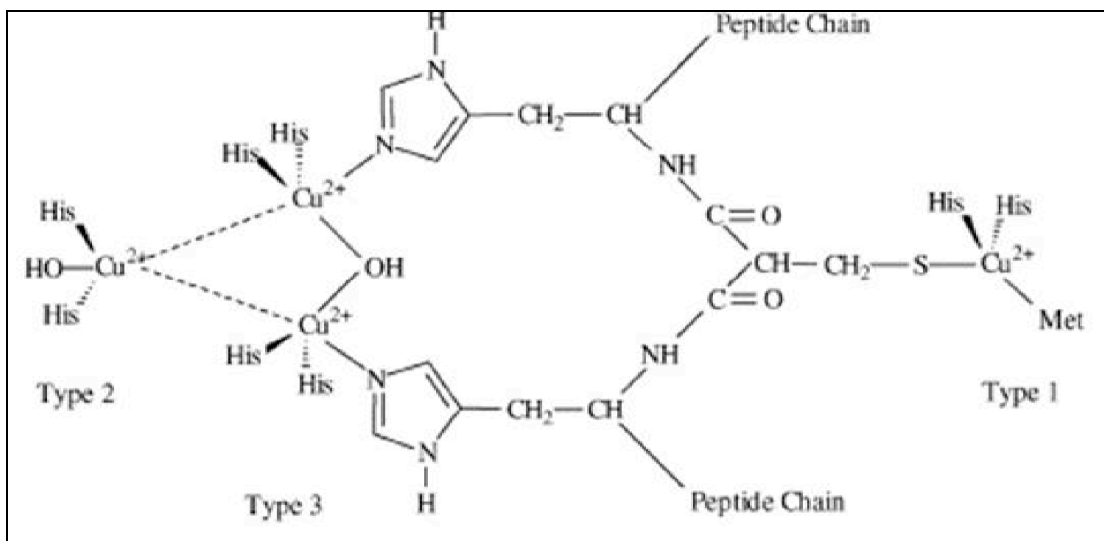
**Figura 1.6:** Esempi di tecnologie di fitorisanamento usate per risanare il suolo, l'acqua e l'aria. I cerchi rossi indicano gli inquinanti.



**Figura 1.7:** Possibile fato dei contaminanti durante il processo di fitorisanamento: i contaminanti (rappresentati con cerchi rossi) possono essere stabilizzati o degradati nella rizosfera, sequestrati o degradati all'interno dei tessuti della pianta, o volatilizzare.



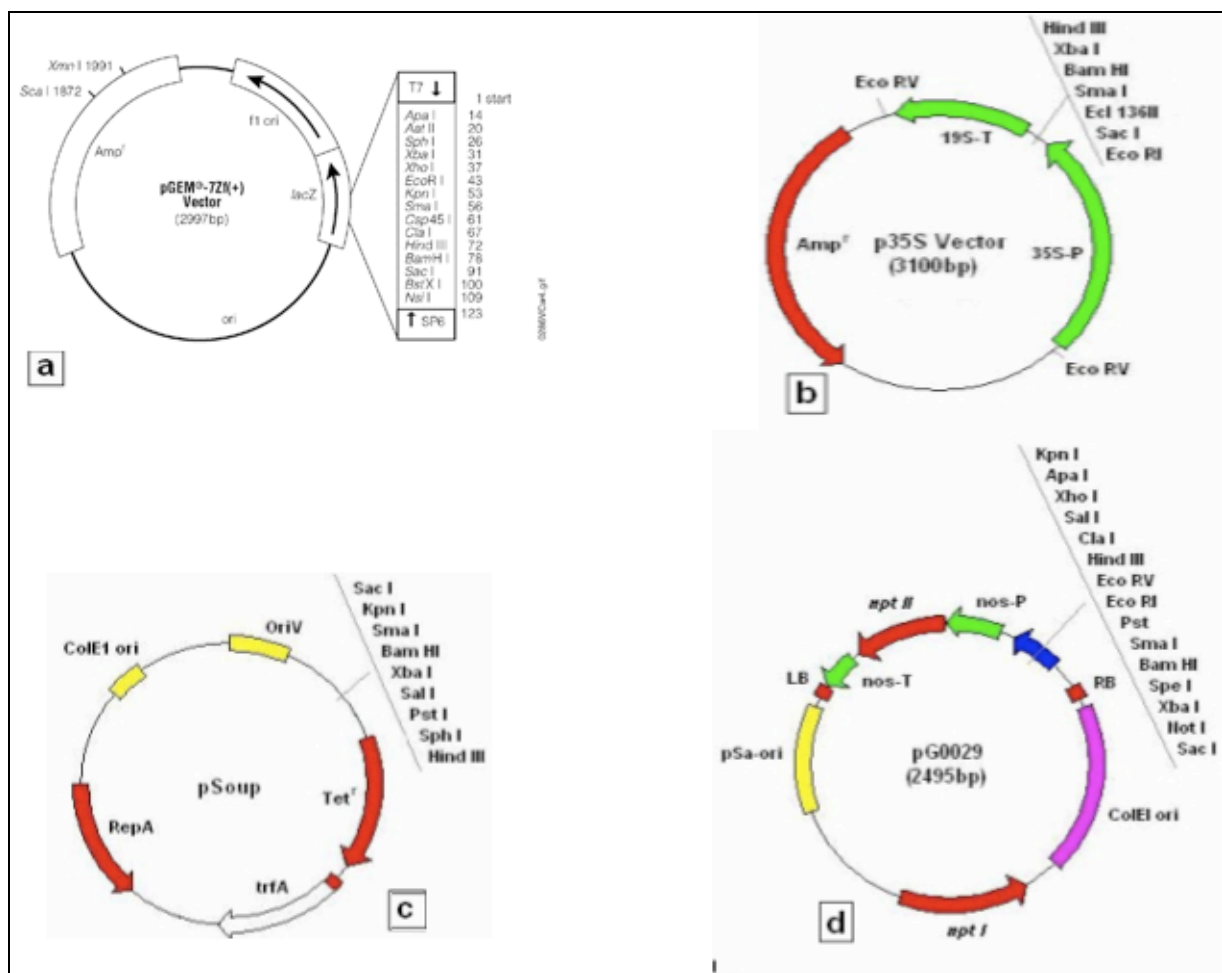
**Figura 1.8:** Struttura terziarie di alcuni laccasi presenti in regni differenti. A) struttura cristallina della laccasi da *Coprinus cinereus*; B) struttura cristallina della laccasi da *Melanocarpus albomices*; C) struttura cristallina della laccasi da *Trametes versicolor*; D) modello per un omologo della laccasi, PcoA da *Escherichia Coli*; E) struttura predetta per la laccasi LpLAC5-6 di loglio (*Lolium perenne*).



**Figura 1.9:** Struttura di una laccasi

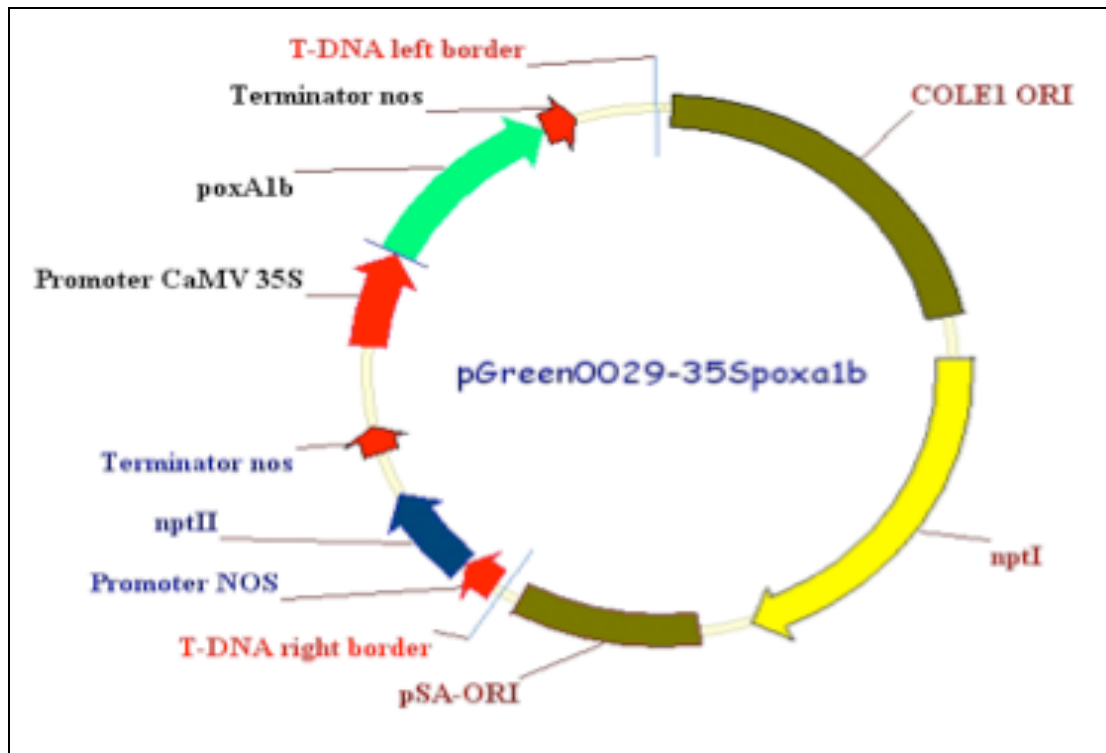


**Figura 2.1:** Beuta con braccio laterale e sigillata con una piastra di vetro in superficie in modo da evitare la volatilizzazione del tricloroetilene.

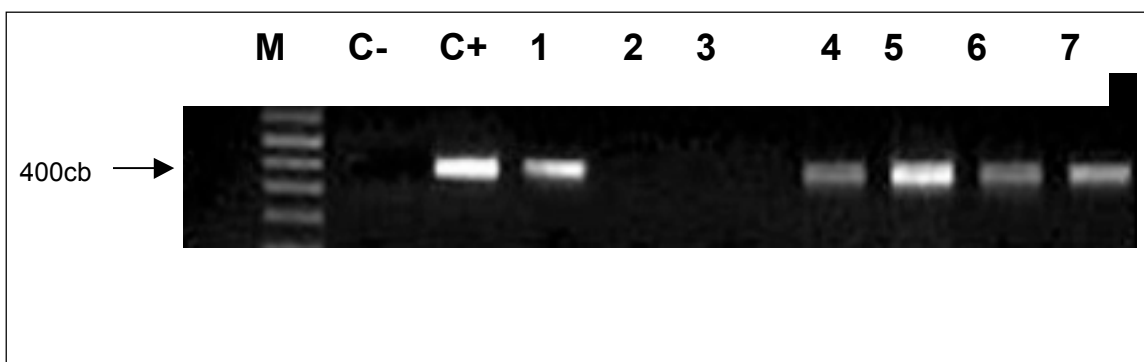


**Figura 2.2:** Mappa dei vettori utilizzati. Immagini adattate da Promega (PGEM), <http://www.pgreen.ac.uk/> (pG35S, pG0029 e pSOUP).



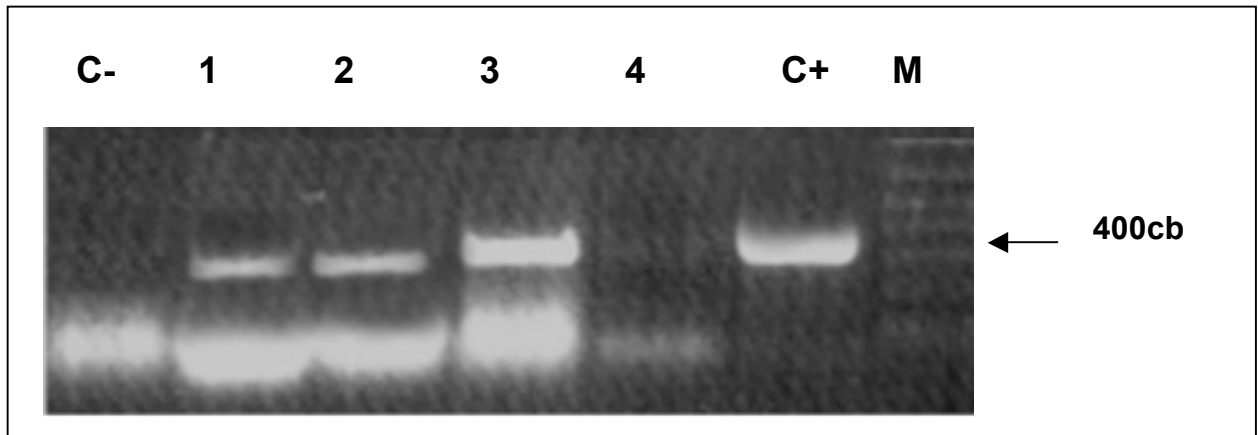


**Figura 3.1:** Mappa del vettore binario pG002935SpoxA1b.

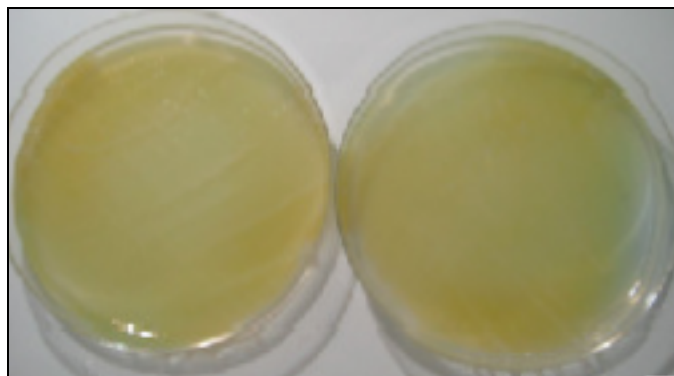


**Figura 3.2:** Gel elettroforetico dei prodotti di amplificazione dei pDNA estratti da colonie di *E.coli* trasformate con il prodotto di ligazione pG0029-35SpoxA1b. Legenda: M, 1Kb Plus DNA ladder; C-, amplificato di cellule non trasformate; C+,

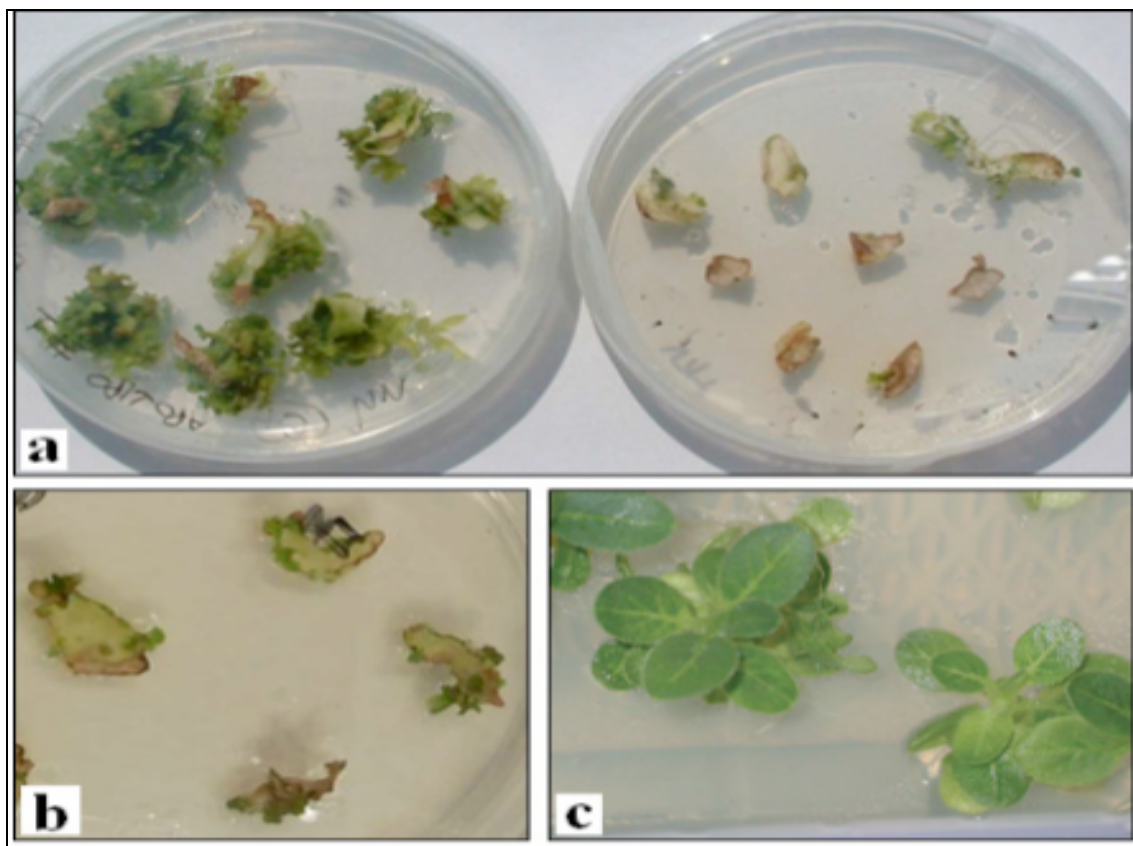
amplificato del vettore pG002935SpoxA1b; corsie da 1 a 7 colonie di *E. Coli* trasformate con il vettore di interesse.



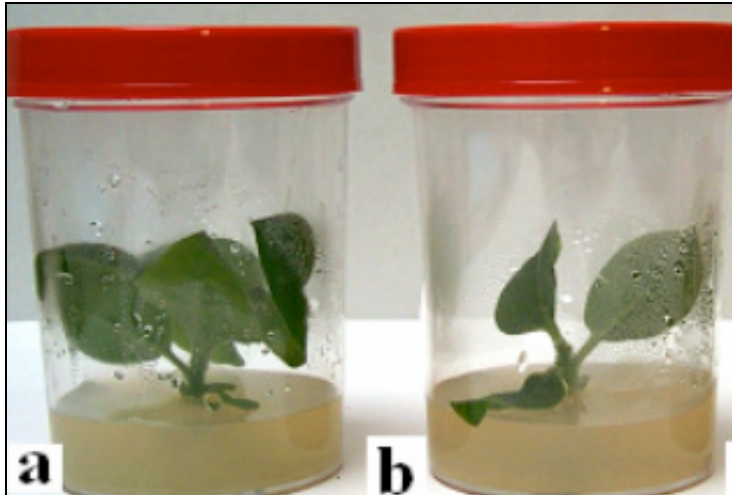
**Figura 3.3:** Gel di elettroforesi dei prodotti di amplificazione del DNA di colonie di *A.tumefaciens* trasformate con pGreen35SPOXA1b. Legenda: corsie da 1 a 4 pDNA estratto da colonie di *A. tumefaciens* trasformate; C+, vettore recante il cDNA di interesse; C-, pDNA estratto da colonie di *A.tumefaciens* non trasformate; M, 1Kb Plus DNA ladder.



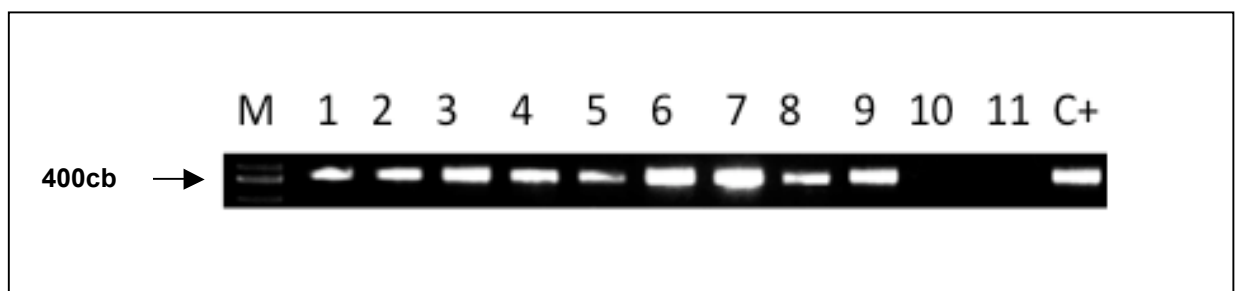
**Figura 3.4:** Risultato del saggio di Benedict effettuato su alcuni ceppi di *A.tumefaciens*.



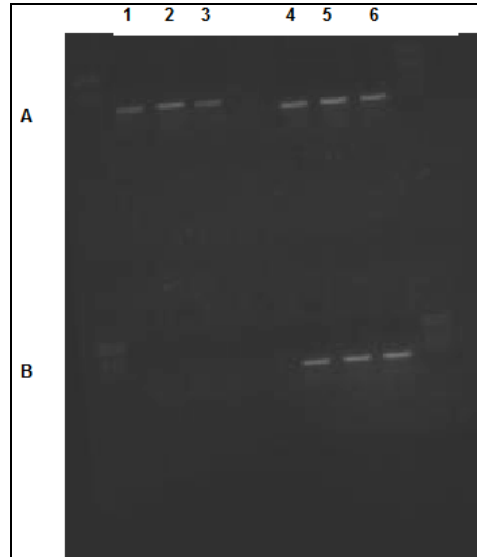
**Figura 3.5:** Ottenimento dei germogli putativi transgenici da espianti fogliari di tabacco cv Samsun NN posti su mezzo di differenziamento. A) Espianti non co-coltivati posti su substrato privo di kanamicina (sinistra) e, espianti co-coltivati con il ceppo di agrobatterio contenente il costrutto pG002935SpoxA1b (destra), posti su substrato contenente kanamicina. B) Germogli di tabacco putativi transgenici per *poxA1b* differenziatisi dopo 45 giorni di coltura *in vitro*. C) Germogli putativi transgenici per *poxA1b*, posti su substrato di radicazione contenente l'antibiotico selettivo.



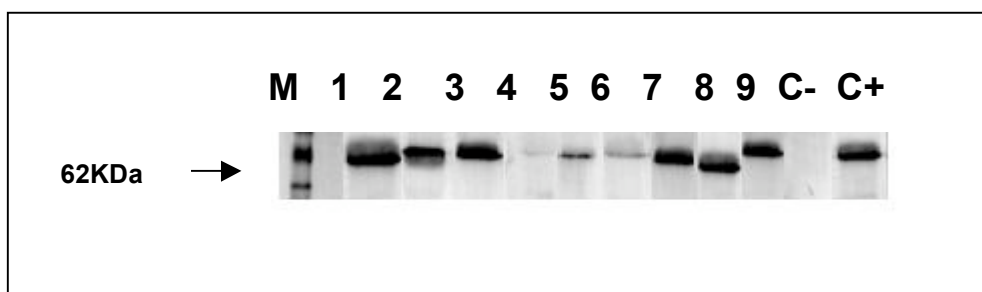
**Figura 3.6:** Germogli di *N. tabacum* cv Samsun NN differenziatisi da espianti fogliari co-coltivati con *A. tumefaciens* e trasferiti su substrato di radicazione *in vitro*. Legenda: a) piantina sviluppata da germoglio differenziato da espianto non co-coltivato in assenza di antibiotico selettivo; b) germogli derivanti dalla co-coltura con il ceppo di agrobatterio pG002935SpoxA1b.



**Figura 3.7:** Gel di elettroforesi dei prodotti di amplificazione con *primer* specifici su DNA genomico estratte da piante di tabacco trasformate per *poxA1b* radicate su mezzo selettivo. Legenda: M, 1Kb Plus DNA Ladder; corsie da 1 a 11, DNA isolate da piante putative transgeniche; C+, DNA plasmidico contenete il frammento di interesse.

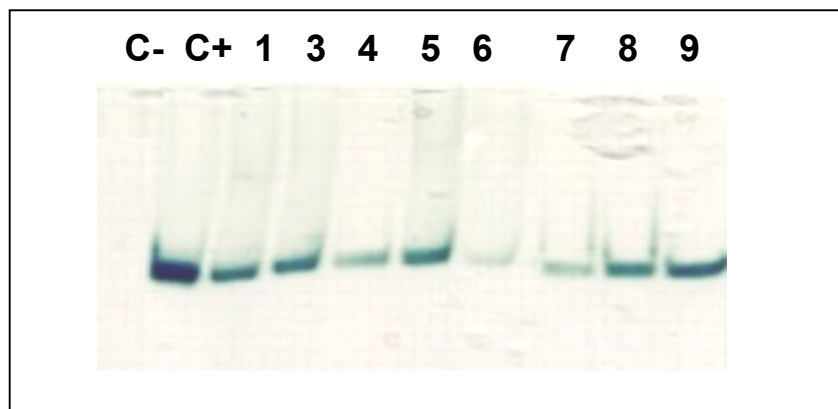


**Figura 3.8:** Gel di elettroforesi dei prodotti di amplificazione con *primer* specifici su DNA genomico estratto da piante di tabacco trasformate per il gene *bar*. Legenda: A) DNA isolato da piante di tabacco putative transgeniche; B) DNA isolato da piante di tabacco *wild type*; colonne da 1 a 3 campioni amplificati con i *primer* per il gene *bar*; colonne da 4 a 6 campioni amplificati con *primer* per il gene dell'actina.

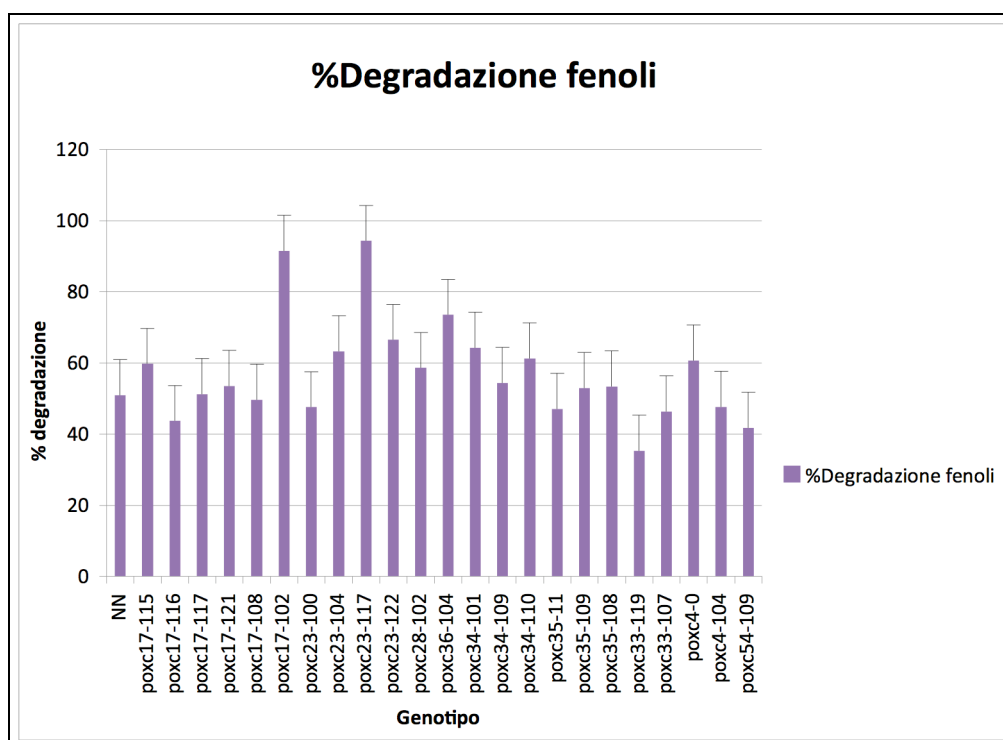


**Figura 3.9:** Analisi western delle proteine totali solubili isolate da foglie di piante di tabacco esprimenti il gene *poxA1b*. Legenda: M, BenchMark *Pre-stained* protein ladder (INVITROGEN); corsie da 1 a 9 proteine estratte da piante putative

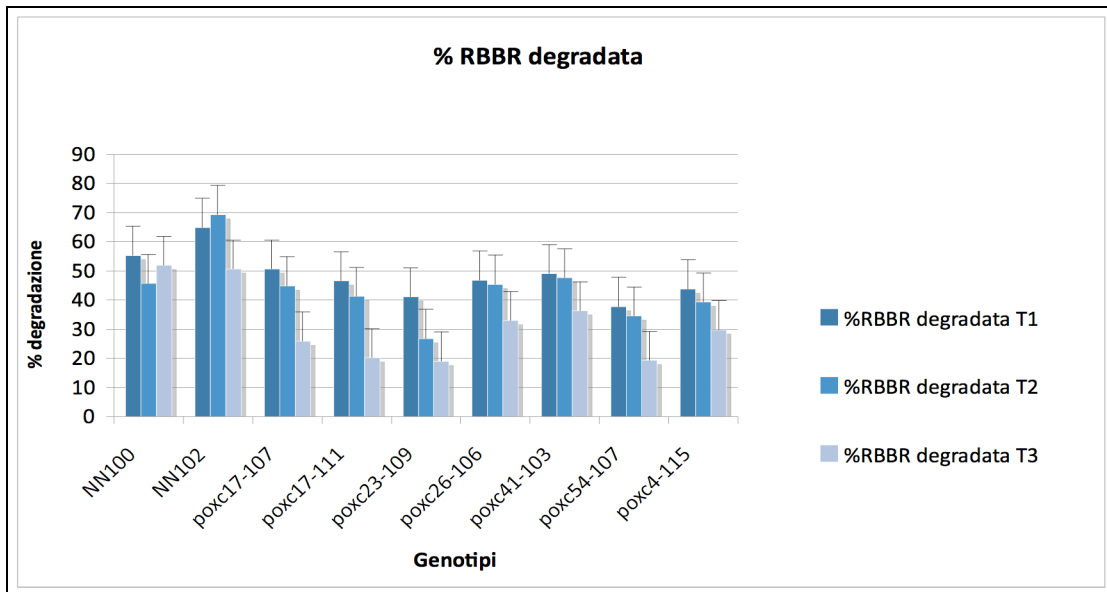
transgeniche; C-, proteine totali isolate da piante di tabacco non transgenico; C+, proteina purificata utilizzata come controllo positivo.



**Figura 3.10:** Zimogramma di fenolossidasi estratta da foglie di tabacco transgenico condotto in presenza di ABTS. Sono state utilizzate 100 mg di proteine solubili totali. Legenda: corsie da 1 a 9, piante transgeniche; C-, pianta non trasformata; C+, laccasi purificata da *Trametes versicolor*.



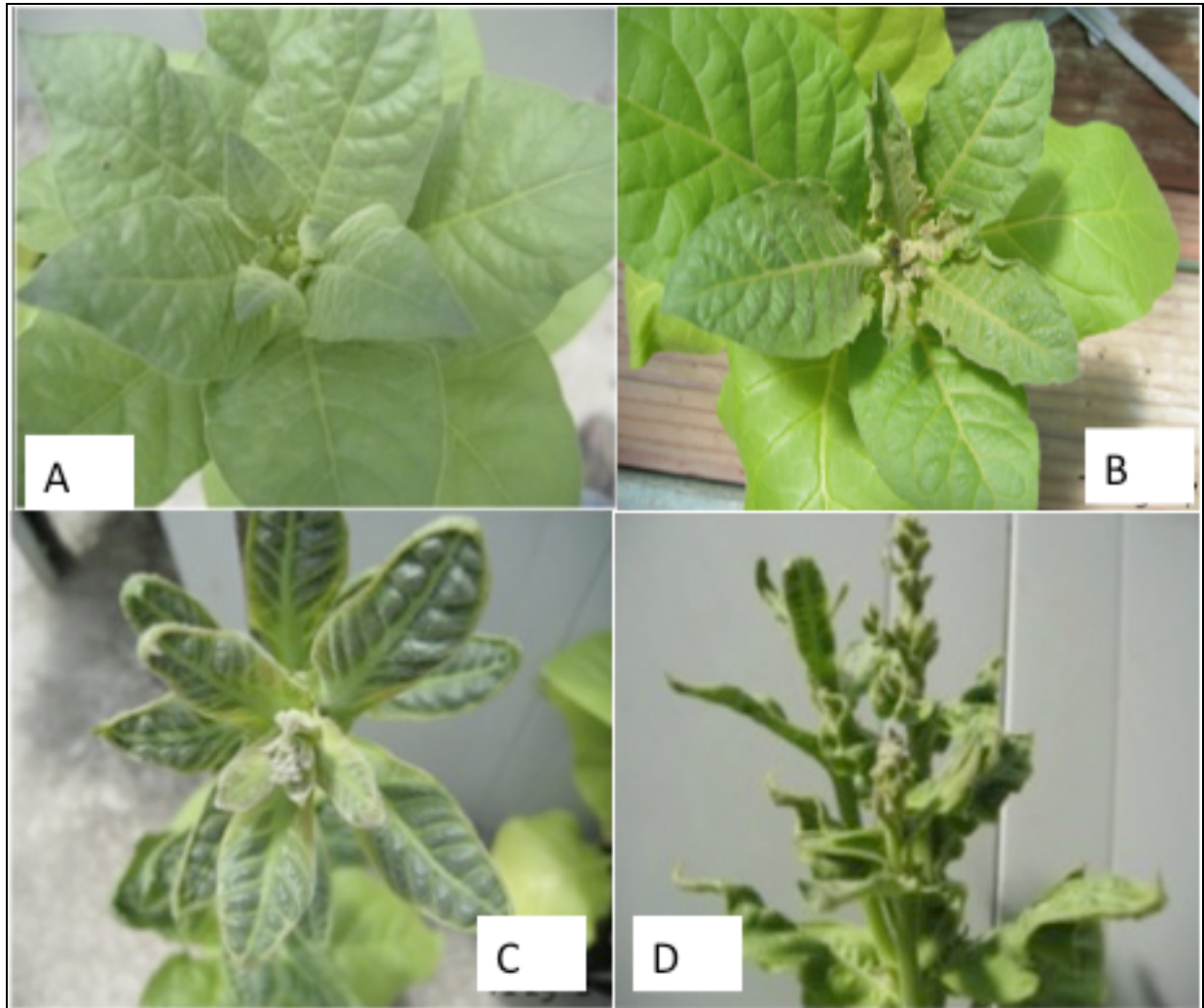
**Figura 3.11:** Grafico rappresentate la percentuale di degradazione dei fenoli contenuti nelle acque di vegetazione dopo sette giorni di coltura *in vivo* con piante di tabacco esperimenti il gene *poxC* della progenie T<sub>1</sub>. NN, pianta di tabacco non trasformata.



**Figura 3.12:** Grafico rappresentante la percentuale di RBBR degradata in piante di tabacco T<sub>1</sub> esprimenti il gene *poxC* allevate *in vivo* in coltura idroponica per sette giorni. La percentuale di degradazione e' stata rilevata in tempi differenti. Legenda: T1, valore rilevato dopo 2 giorni di incubazione; T2, valore rilevato dopo 5 giorni di incubazione; T3, valore rilevato dopo 7 giorni di incubazione; NN, pianta di tabacco controllo.

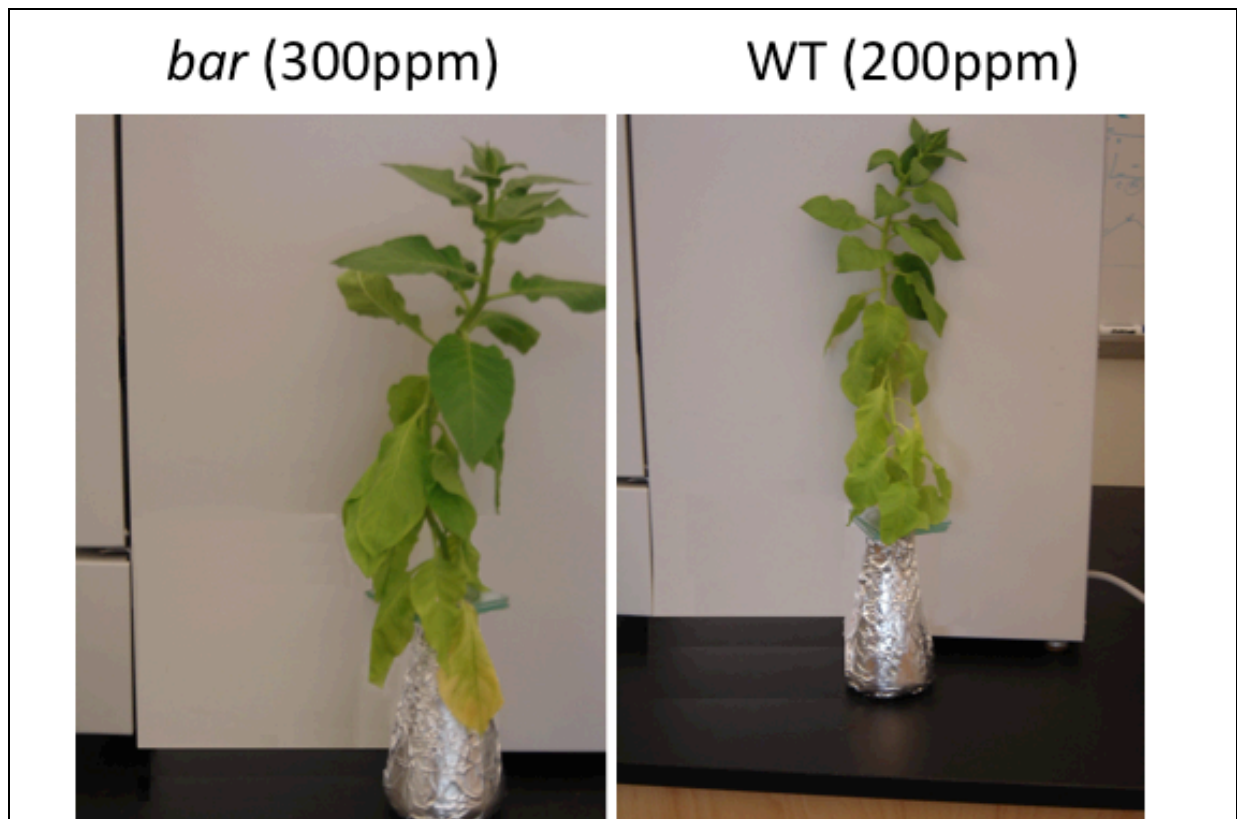


**Figura 3.12 :** B,C,D) Foglie di piante transgeniche T<sub>1</sub> esprimenti *poxC* ; A) Foglia di piante di tabacco controllo.

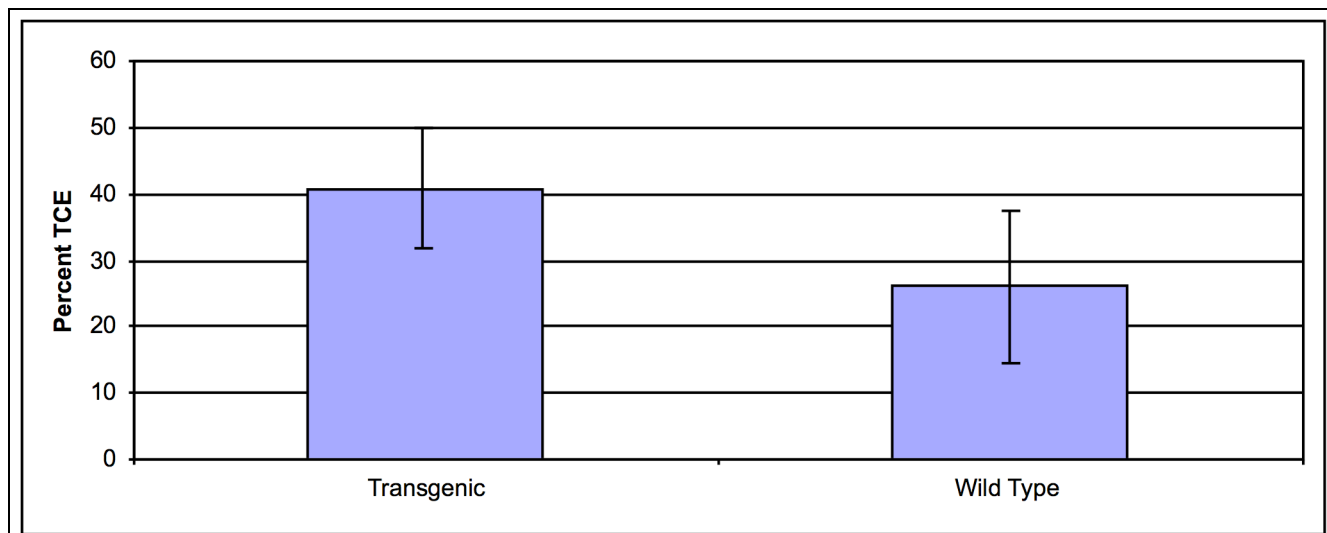


**Figura 3.13:** Esempi di apici e infiorescenze di A) pianta di tabacco controllo e B,C,D) piante di tabacco transgeniche poxC.

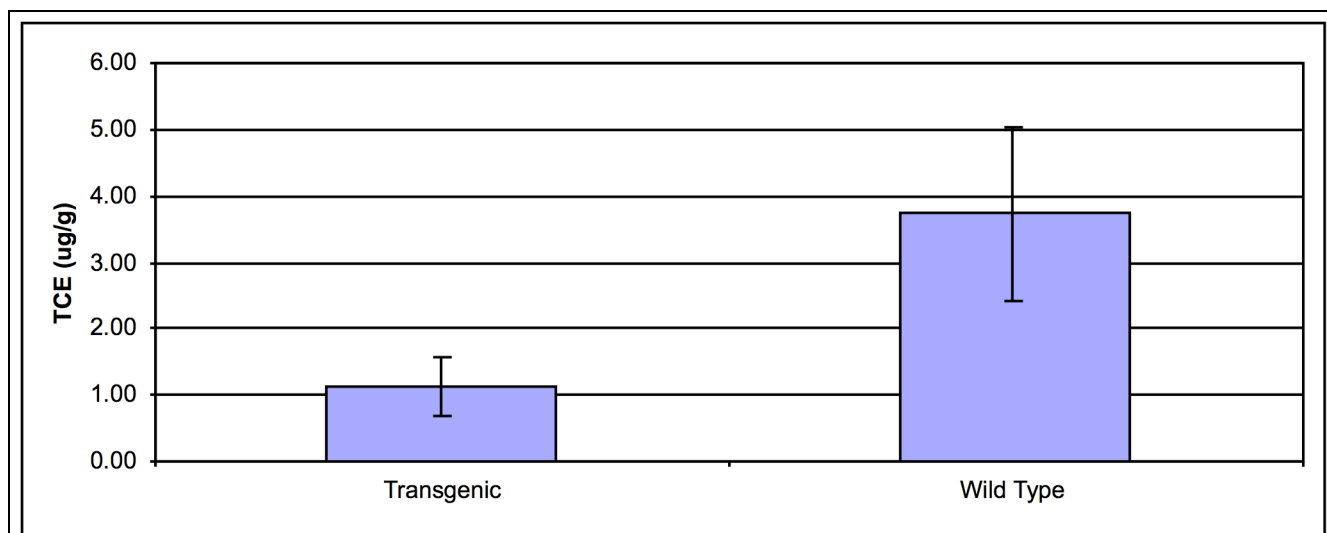




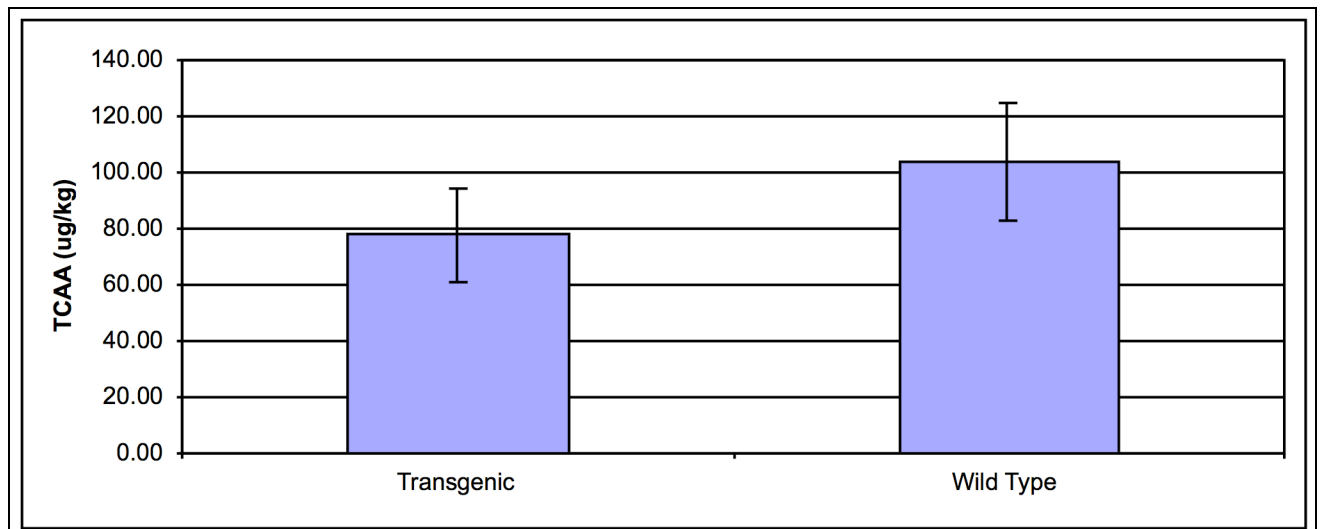
**Figura 3.14:** Tossicità del Tricloroetilene. Confronto tra una pianta esprimente il gene *bar* e una pianta non trasformata.



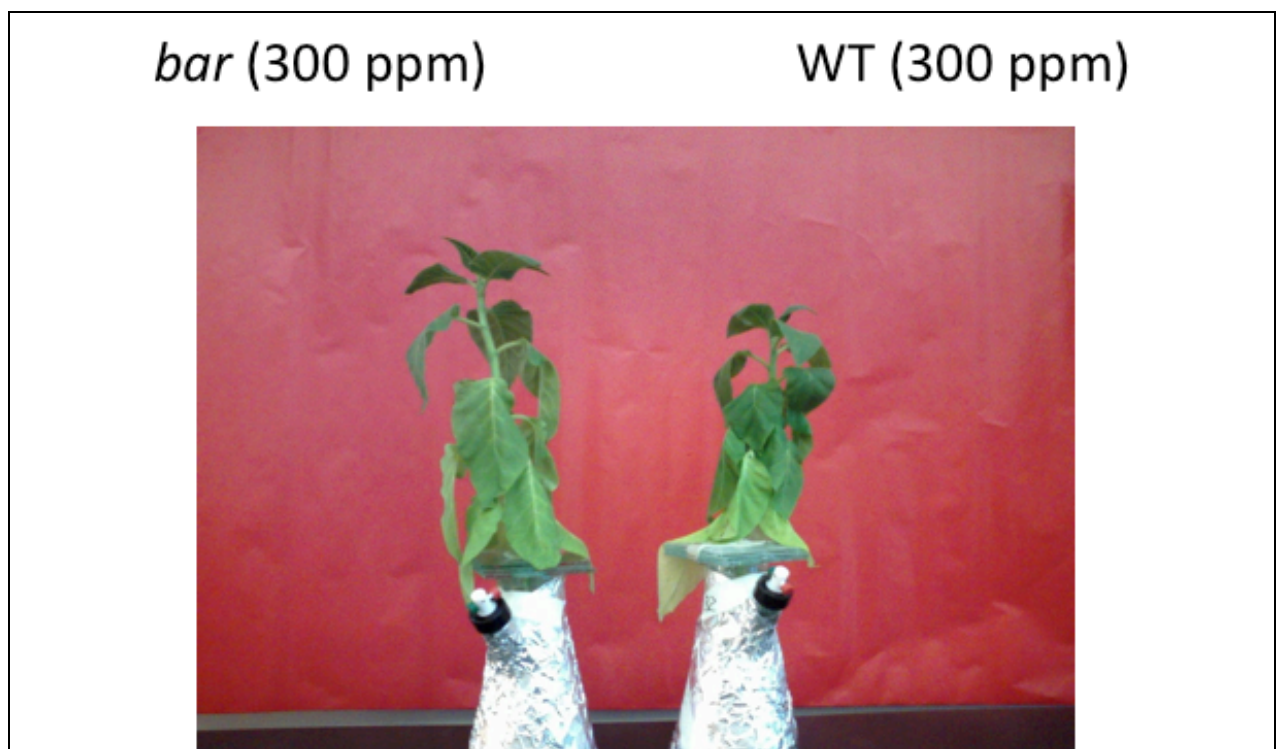
**Figura 3.15:** Il grafico rappresenta la quantità di TCE rimossa dalle beute con le piante di tabacco transgeniche e controllo. L'assorbimento del tricloroetilene e' data in percentuale piu o meno la deviazione standard.



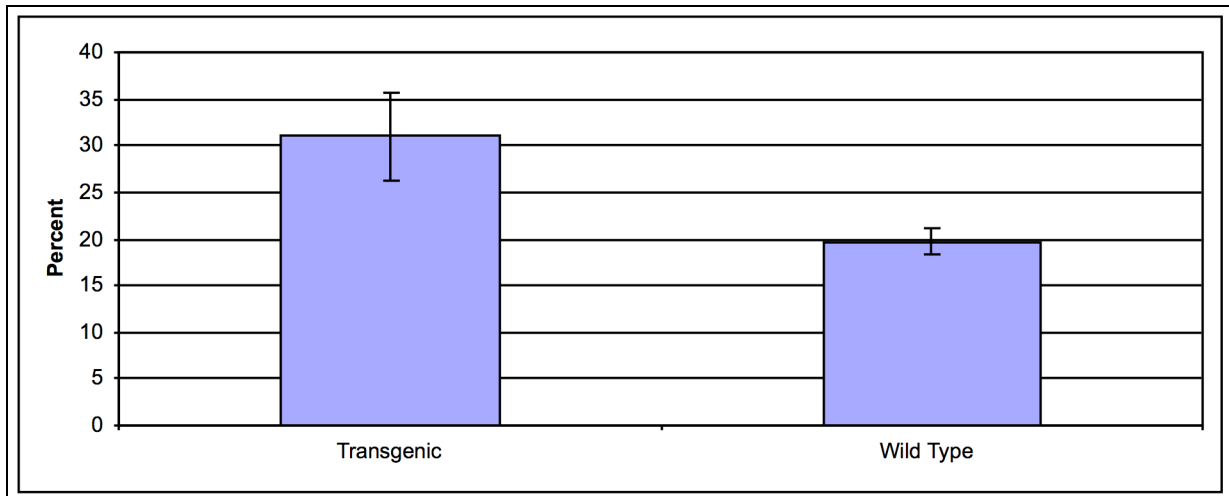
**Figura 3.16:** Concentrazione del tricloroetilene nei fusti di piante di tabacco esprimenti il gene *bar* e nelle piante controllo.



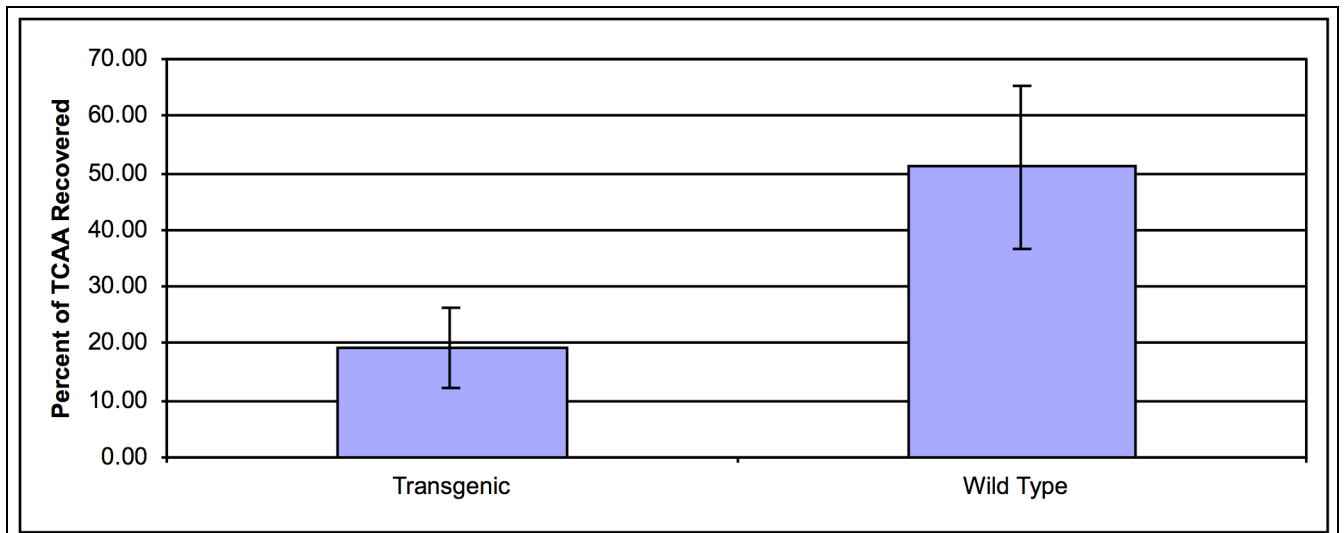
**Figura 3.17:** Concentrazione di acido tricloroacetico in foglie di piante di tabacco trasformate e *wild type* dosate per il TCE.



**Figura 3.18:** Tossicità dell'Acido Tricloroacetico. Confronto tra una pianta esprime il gene *bar* e una pianta controllo.



**Figura 3.19:** Assorbimento dell'acido tricloroacetico in piante di tabacco transgeniche e controllo dosate per il TCAA. La quantità di TCAA rimossa e' data in percentuale più o meno la deviazione standard.



**Figura 3.20:** Percentuale d'acido tricloroacetico ritrovato in piante di tabacco trasformate e non dosate per il TCAA.

## 7. Bibliografia

- Abudulla E., Tzanov T., Costa S., Robra K.H., Cavaco-Paulo A., Gubitz G.M., 2000.** Decolorization and Detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes irsuta*. *Appl and Environ. Microbiol.* 66: 3357-3362.
- Adam G., Duncan H., 2002.** Influence of diesel fuel on seed germination. *Environ Pollut*, 120: 363-370.
- Aggelis G., Iconomou D., Christou M., Bokas D., Kotzailias S., Christou G., Tsagou V., Papanikolaou S., 2003.** Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Res*, 37: 3897-3904.
- Alexander M., 1994.** Bioremediation technologies in Biodegradation and bioremediation. *Accademic Press.*, 248-271.
- Alexander M., 2000.** Aging bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ Sci Technol*, 34: 4259-4265.
- Alexandre G, Zhulin IB, 2000.** Laccases are widespread in bacteria. *Trends Biotechnol*, 18: 41-42.
- Alves A., Record E., Lomascolo A., Scholtmeijer M., Asther M., Wessels J., Wosten H., 2004.** Highly efficient production of laccase by the Basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl. and Envir. Microbiol.*, 70: 6379-6384.
- Ammirato P.V., 1983.** Embryogenesis. In: Handbook of Plant Cell Culture. Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y (editori), MacMillan Publishing Co., New York: 82-123.
- Attanasio A., Diano N., Grano V., Sicuranza S., Rossi S., Bencivenga U., Fraconte L., Di Martino S., Canciglia P., Mita D.G., 2005.** Nonisothermal bioreactors in the treatment of vegetation waters from olive oil: laccase versus syringic acid as bioremediation model. *Biotechnol Prog*, 21: 806-815.
- Aprill W. e Sims R.C., 1990.** Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chem*, 20: 253-265.
- Balaskshin M., Cheng C., Gratz J., Kirkman A., Jakob H., 2001.** Biobleaching of pulp with dioxygen in laccase-mediator system-effect of variables on the reaction kinetics. *J. Mol. Catal. B: Enzyme*, 16: 205-215.
- Baldrian P., in Der Wiesche C., Gabriel J., Nerud F., Zadrazil F., 2000.** Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil. *Appl Environ Microbiol*, 66: 2471-2478.
- Balice V., Boari G., Cera O. Abbaticchio P. 1982.** Indagine analitica sulle acque di vegetazione. *Inquinamento* 7: 49-53.
- Banuelos G.S., 1990.** Accumulation of selenium in plant grown on selenium-treated soil. *J Environ Qual*, 19: 772-77.
- Barac T., Taghavi S., Borremans B., Provoost A., Oeyen L., Colpaert J.V., Vangronsveld J., van der Lelie D., 2004.** Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nat Biotechnol*, 22: 583-588.
- Baranger A., Delourme R., Foisset N., Eber F., Barret P., Dupuis P., Renard M., Chevre A.M., 1997.** Wide mapping of a T-DNA insertion site in oilseed rape using bulk segregant analysis and comparative mapping. *Plant Breeding*, 116: 553- 560.

- Barton S., Pickard M., Vazquez-Duhalt R., Heller A., 2002.** Electroreduction of O<sub>2</sub> to water at 0,6 V (SHE) at pH7 on the "wired" *Pleurotus ostreatus* laccase cathode. *Biosens. Bioelectron.*, 17: 1071-1074.
- Bayer P., Finkel M., 2006.** Life Cycle Assessment of Active and Passive Groundwater Remediation Technologies *Journal of Contaminant Hydrology*. 83:171-199.
- Bedard D.L., 1990.** Bacterial transformation of polychlorinated biphenyls. In: Kamely D, Chaprabarty A, Omenn GS (eds). *Biotechnology e biodegradation*. Portolio Publishing, The Woodlands, Tex pp369-388.
- Berti W.R., Cunningham S.D., 2000.** Phytostabilization of metals. *Phytorem Toxic Metals*, ed Raskin, Ensley: 71-88.
- Bevan M., 1984.** Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res*, 12: 8711-8721.
- Bizily S.P., Rugh C.L., Summers A.O., Meagher R.B., 1999.** Phytoremediation of methylmercury pollution: merB expression in *Arabidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 6808-6813.
- Blaylock M., Huang J.W., 2000.** Phytoextraction of toxic metals using plants to clean up the environment. *Ed. Raskin e Ensley, New York*: 53-70.
- Bonomo R.P., Cennamo G., Purrello R., Santoro A.M., Zappala R., 2001.** Comparison of three fungal laccases from *Rigidoporus lignosus* and *Pleurotus ostreatus*: correlation between conformation changes and catalytic activity. *J Inorg Biochem*, 83: 67-75.
- Borisjuk N.V., Borisjuk L.G., Logendra S., Petersen F., Gleba Y., Raskin I., 1999.** Production of recombinant proteins in plant root exudates. *Nat Biotechnol*, 17: 466-469.
- Bourbonnais R., and Paice M., 1992.** Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 823-827.
- Boyajian G.E., Carreira L.H., 1997.** Phytoremediation: a clean transition from laboratory to marketplace? *Nat Biotechnol*, 15: 127-128.
- Bradford M.M., 1976.** A refined and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *An Biochem*, 72: 248-52.
- Braida W., Ong S.K. 2000.** Modeling of air spargine of VOC contaminated soil columns. *Journal of Contaminane Hydrology*, 41: 385-402.
- Breen A., Singleton F.L., 1999.** Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. *Curr Opin Biotechnol*, 10: 252-258.
- Broer I., Hokkanen H.M.T., Tsafaris S.A., 1996.** Stress inactivation of foreign genes in transgenic plants. *Field Crops Res.*, 45:1-3, 19-25.
- Brooks R., Lee J., Reeves R., Jaffrè T., 1977.** Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *J. Geochem. Explor.*, 7: 49-77.
- Brown, L.P., Farrar, D.G., and De Rooij, C.G. 1990.** Health risk assessment of environmental exposure to trichloroethylene. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 11:24-41.
- Burken J., Schnoor J., 1998.** Predictive relationships for uptake of organic contaminants by hybrid poplar trees. *Environ Sci Technol*, 32: 3379-3385.

- Burken J., Shanks J., Thompson P., 2000.** Phytoremediation and plant metabolism of explosives and nitroaromatic compounds. *Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosive*. 239-275.
- Cangelosi G.A., Best E.A., Martinetti G., Nester E.W., 1991.** Genetic analysis of *Agrobacterium*. *Methods Enzymol*, 204: 384-397.
- Champagne P.P., Ramsay J.A., 2005.** Contribution of manganese peroxidase and laccase to dye decoloration by *Trametes versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Campbell S., Paquin D., Awaya J., Li Q., 2002.** Remediation of benzoapyrene and chrysene-contaminated soil with industrial hemp. *Int J. Phytoremed.*, 4: 157-168.
- Capasso R., Evidente A., Avorio S., e Solla F., 1999.** A highly convenient synthesis of hydroxytyrosol and its recovery from agricultural waste waters. *Agricultural and Food Chemistry*, 4: 1745-1748.
- Capasso R., 2002.** Recovery and characterization of metal polymeric organic fraction from olive oil mill wastewaters. *American Chemical Society*, 50: 2846-2855.
- Careira L., Wolfe N., 1995.** Isolation of a sediment nitroreductase, antibody production, and identification of possible plant sources. *JBC Int Symp Phytoremed*.
- Cassland P., Jonsson L.J., 1999.** Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 52: 393-400.
- Chabbanes M., Barakate A., Lapierre C., Marita J.M., Ralph J., Pean M., Danoun S., Halpin C., Grima-Pettenati J., Boudet A.M., 2001.** Strong decrease in lignin content without significant alteration of plant development is induced by simultaneous down-regulation of cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in tobacco plants. *Plant J.*, 28: 257-270.
- Champagne P.P. e Ramsay J.A., 2005.** Contribution of manganese peroxidase and laccase to dye decoloration by *Trametes versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 69: 276-285.
- Chaney R., Brown S., Li Y., Angle J., Homer F., Green C., 1995.** Potential use of metal hyperaccumulation. *Mining Vnviron Manage*, 3: 9-11.
- Chaney R., Li Y., Brown S., Homer F., Malik M., 2000.** Improving metal hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction systems: approaches and progress. *In Phytor. of Contam. Soils and Water, Ed. Terry e Banuelos*, 129-158.
- Chaudhry Q., Zandstra M., Gupta S., Joner E., 2005.** utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganism to enhance breackdown of organic pollutants in the environment. *Environ Sci e Pollut Res*, 12: 34-4.
- Cho C., Sung K., Coapcioglu M. Y., Drew M., 2005.** Influence of water content and plants on the dissipation of chlorinated volatile organic compound in soil. *Water, Air and Soil Pollution*. 167: 259-271.
- Chyi Y.S., Jorgensen R.A., Goldstein D., Tanksley S.D., Loaiza-Figueroa F., 1986.** Locations and stability of *Agrobacterium*-mediated T-DNA insertions in the *Lycopersicon* genome. *Mol. Gen. Genet.*, 204: 64-69.
- Clemens S., Palmgren M.G., Kramer U., 2002.** A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci.*, 7: 309-315.
- Claus H., Faber G., Konig H., 2002.** Redox-mediated decolorization of syntetic dyes by fungal laccases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59: 672-678.
- Claus H., 2003.** Laccases and their occurrence in prokariotes. *Arch Microbiol.*, 179: 145-150.
- Claus H., 2004.** Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, 35: 93-96.

**Crestini C., Jurasek L., Argyropoulos D.S., 2003.** On the mechanism of the laccase-mediator system in the oxidation of lignin. *Chemistry*, 9: 5371-5378.

**Cunningham S.D., Ow D.W., 1996.** Promises and Prospects of Phytoremediation. *Plant Physiol.*, 110: 715-719.

**D'Annibale A., Stazi S.R., Vinciguerra V., Giovannozzi Sermanni G., 2000.** Oxirane-immobilized Lentinula edodes laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *J. Biotechnol.*, 77: 265-273.

**Davin L.B., Wang H.B., Crowell A.L., Bedgar D.L., Martin D.M., Sarkanen S., Lewis N.G., 1997.** Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science*, 275: 362-366.

**DeAngelo A.B., McMillan L.P., 1998.** The carcinogenicity of the chlorinated acetic acids. *US Environmental Protection Agency*.

**Dean C., Jones J., Faureaw M., Bedbrook J., 1998.** Influence of flanking sequences on variability in expression level of an introduced gene in transgenic tobacco plant. *Nucl. Acids Res.*, 16: 9267-9283.

**Derek M., Dykxhoorn, Novina C.D., Sharp P.A., 2003.** Killing the messenger: short RNA that silence gene expression. *Mol Cell Biol.*, 4: 457-467.

**Dietz A.C., Schnoor J.L., 2001a.** Phytotoxicity of chlorinated aliphatics to hybrid poplar (*Populus deltoides* x *nigra* DN34). *Environ Toxicol Chem.*, 20: 389-393.

**Dietz A.C., Schnoor J.L., 2001b.** Advances in Phytoremediation. *Environ. Health Perspectives*, 109.

**Doty S., Shang T., Wilson A., Tangen J., Westergrees A., Newmann L., Strand S., Gordon M., 2000.** Enhanced metabolism of halogenated hydrocarbons in transgenic plants contaminating mammals cytochrome P450. *Prot Natl Acad Sci.*, 97:6287-6291.

**Doty S., Shang T., Wilson A., Moore A., Newman L., Strand S., Gordon M., 2003.** Metabolism of the soil and groundwater contaminants, ethylene dibromide and trichloroethylene, by the tropical leguminous tree, *Leuceana leucocephata*. *Water Res.*, 37: 441-449.

**Dubrow S.F., Boardman G.D., Michelsen D.J., (1996).** Chemical pretreatment and aerobic-anaerobic degradation of textile dye wastewater. In: Reife A, Freeman HS (eds) Environmental chemistry of dyes and pigments. Wiley, New York, pp 75-102.

**Duran N., Esposito E., 2000.** Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl. Cat. Environ.*, 28: 83-99.

**Eggert C., Temp U., Dean J.F., Eriksson K.E., 1996.** A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett.*, 391: 144-148.

**Elkind Y., Edwards R., Mavandad M., Hedrick S.A., Ribak O., Dixon R.A., Lamb C.J., 1990.** Abnormal plant development and down-regulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia-lyase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 9057-9061.

**Escalante-Espinosa E., Gallegos-Martinez M., Favela.Torres E., Gutierrez-Rojas M., 2005.** Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system. 2005, 59: 405-413.

**Fenice M., Giovannozzi Sermanni G., Federici F., D'Annibale A., 2003.** Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. *J Biotechnol.*, 100: 77-85.



- Ferro A.M., Rock S.A., Kennedy J., Herrick J.J., Turner L., 1999.** Phytoremediation of soils contaminated with wood preservatives: greenhouse and field evaluations. *J Phytoremed.*, 1: 289-306.
- Flathman P., Lanza G., Glass D., 1999.** Phytoremediation issue: soil and ground water cleanup. 2: 4-41.
- Flechas F.W., Latady M., 2003.** Regulatory evaluation and acceptance issues for phytotechnology projects. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, 78: 171-185.
- Folin O., e Ciocalteu V., 1927.** On tyrosine and tryptophan determinations in protein. *J. Biol. Chem.*, 73: 627-650.
- Foy C.L., 1975.** The chlorinated aliphatics acids. In: Kearney P.C. and Kaufman D.D., Edotors, 1975. *Herbicides: chemistry, degradation and mode of action*, Marcel Dekker, New York pp. 399-452.
- Freire D.D., Cammarota M.C., Santanna G.L., Jr., 2001.** Biological treatment of oil field wastewater in a sequencing batch reactor. *Environ Technol.*, 22: 1125-1135.
- French C., Rosser S., Davies G., Nicklin S., Bruce N., 1999.** Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase. *Nat. Biotechnol.*, 17: 491-494.
- Fu Y. e Viraraghavan T., 2001.** Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource Technology.* 79: 251-262.
- Gasser C.S., Budelier K.A., Smith A.G., Shah D.M., Fraley R.T., 1989.** Isolation of Tissue-Specific cDNAs from Tomato Pistils. *Plant Cell.*, 1: 15-24.
- Gavnholt B., Larsen K., 2002.** Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation. *Physiol. Plant.*, 116: 273-280.
- Gelvin S.B., 2000.** Agrobacterium and Plant Genes Involved in T-DNA Transfer and Integration. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 51: 223-256.
- Gendloff E.H., Bowen B., Buchholz W.G., 1990.** Quantitation of chloramphenicol acetyl transferase in transgenic tobacco plants by ELISA and correlation with gene copy number. *Plant Mol Biol.*, 14: 575-583.
- Gianfreda L., Xu F., Bollag J.M. 1999.** Laccase: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediat. J.*, 3: 1-25.
- Gianfreda L., Rao M., 2004.** Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme Microb Technol.*, 35: 339-354.
- Giardina P., Cannio R., Martirani L., Marzullo L., Palmieri G., Sannia G, 1995.** Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Envir. Microbiol.*, 61: 2408-2413.
- Giardina P., Palmieri G., Scaloni A., Fontanella B., Faraco V., Cennamo G., Sannia G., 1999.** Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemic. Journal.*, 341: 655-663.
- Giddings G., Allison G., Brooks D., Carter A., 2000.** Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat Biotech.*, 18: 1151-55.
- Glass D.J., 1999.** US Inter Markets Phytomed, 1999-2000.
- Gleba D., Borisjuk N.V., Borisjuk L.G., Kneer R., Poulev A., Skarzhinskaya M., Dushenkov S., Logendra S., Gleba Y.Y., Raskin I., 1999. Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 5973-5977.
- Goldman R., 2001.** Smoking increase carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in human lung tissue. *Cancer Res.*, 61: 6367-6371.
- Gonzalez T., Terron M.C., Yague S., Zapico E., Galletti G.C., Gonzalez A.E., 2000.** Pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry monitoring of fungal-biotreated distillery wastewater using *Trametes* sp. I-62 (CECT 20197). *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 14: 1417-1424.

- Guengerich F.P., Kim D., Iwasaki M., 1991.** Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem. Res. Toxicol.*, 4, 168-179.
- Guerineau F. e Mullineaux P., 1993.** Genes and vectors. In: Croy RRD, ed. Plant molecular biology LABFAX manual. *Oxford, Bios Scientific Publishers and Blackwell Scientific Publications*, 121-147.
- Guerinot M.L., Salt D.E., 2001.** Fortified foods and phytoremediation. Two sides of the same coin. *Plant Physiol.*, 125: 164-167.
- Guo M., Lu F., Du L., Pu J., Bai D. 2005.** Optimization of the expression of a laccase gene from *Trametes versicolor* in *Pichia methanolica*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 1-5.
- Halsey K. H. Sayavedra-Soto L. A., Bottomley P. J., Arp D. J.** Trichloroethylene degradation by Butane-Oxidizing Bacteria Causes a Spectrum of Toxic Effects *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 68: 794-801.
- Hammel K.E., 1995.** Mechanisms for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by ligninolytic fungi. *Environ Health Perspect.*, 103 Suppl 5: 41-43.
- Hannink N., Rosser S.J., French C.E., Basran A., Murray J.A., Nicklin S., Bruce N.C., 2001.** Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase. *Nat Biotechnol.*, 19: 1168-1172.
- Hansen D., Duna P., Zayed A., Terry N., 1998.** Selenium removal by constructed wetlands: role of biological volatilization. *Environ Sci. Technol.*, 32: 591-597.
- Hartman W., 1975.** An evaluation of land treatment of municipal wastewater and physical siting of facility installations. Washington Dc: US dep army.
- Hedge R., Fletcher J., 1996.** Influence of plant growth stage and season on the release of root phenolics by mulberry as related to the development of phytoremediation technology. *Chemosphere*, 23: 2471-2479.
- Hobbs S.L.A., Warketing T.D., DeLong C.M.O., 1993.** Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Mol. Biol.*, 21: 17-26.
- Hoegger P.J., Kilaru S., James T.Y., Thacker J.R., Kues U., 2006.** Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS Journal.*, 273: 2308-2326.
- Hood E., 2002.** From green plants to industrial enzymes. *Enzyme Microb Technol.*, 30: 279-283.
- Hood E., Bailey M., Beifuss, Magallanes M., Horn M., Callaway E., Drees C., Delaney D., Clough R., Howard J., 2003.** Criteria for high.level expression of a fungal laccase gene in transgenic maize. *Plant Biotech. J.*, 1: 129-140.
- Hoopen R., Montijn B.M., Veuskens J.T.M., Oud J.L., Nanninga N., Hoopen R., 1999.** The spatial localization of T-DNA insertions in petunia interphase nuclei: consequences for chromosome organization and transgene insertion sites. *Chromosomes Research.*, 7: 8, 611-623.
- Horne A., 2000.** Phytoremediation by constructed wetlands. *In Phytor. of Contam. Soils and Water.*
- Horsch R.B., Fry J.E., Hoffmann N.L., Eichholtz D., Rogers S.G., Fraley R.T., 1985.** A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227: 1229-1231.
- Huttermann A., Mai C., Kharazipour A., 2001.** Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 55: 387-394.

- Iglesias V., Moscone E., Papp I., Neuhuber F., Michalowski S., Matzke A., 1997.** Moleculer and cytogetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. *Plant Cell.*, 9: 1251-1264.
- Jaffrè T., Brooks R., Lee J., Reeves R., 1976.** *Sibertia acuminata*: a hyperaccumulator of nickel from new caledonia. *Science*, 193: 579-580.
- Jaouani A., Vanthourhout M., Penninckx M.J., 2005.** Olive oil mill wastewater purification by combination of coagulation- flocculation and biological treatments. *Environ Technol.*, 26: 633-641.
- Jeffers P., Liddy C., 2003.** Treatment of atmospheric halogenated hydrocarbons by plants and fungi. In *Phytor. Trans.and Contr. of Contam. Soils*, Ed. McCutcheon e Schnoor: 787-804.
- Jones J., Gilbert D., Grady K., Jorgensen R., 1987.** T-DNA structure and gene expression in petunia plants transformed by *Agrobacterium tumefaciens* C 58 derivatives. *Mol. Gen. Genet.*, 207: 478-485.
- Jonson A.C. e Larsen D. (1985).** The distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the surficial sediments of Penobscot Bay (Maine USA) in relation to possible sources and to other sites worldwide. *Marine Environmental Research*, 15: 1-16.
- Jonsson L., Saloheimo M., Penttil M., 1997.** Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor* cDNA cloning of lcc1 and expression in *Phichia pastoris*. *Curr. Genet.*, 32: 425-430.
- Jorgensen R., 1990.** Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *Trends Biotechnol.*, 8: 340-344.
- Kaeppler S.M., Kaeppler H.F., Youg R., 2000.** Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology*, 43: 179-188.
- Kiefer-Mayer M., Gomord V., O' Cnnell A., Halpin C., Faye L., 1996.** Cloning and sequence analysis of laccase-encoding cDNA clones from tobacco. *Gene*, 178: 205-207.
- Kilburn K.H. 2002.** Is Neurotoxicity Associated with Environmental Trichloroethylene (TCE)? *Archives of Environmental Health*. Vol. 57, No. 2, 113-120.
- Kissi M., Mountadar M., Assobher O., Gargiulo E., Palmiri G., Giardina P., 2001.** Roles of two white rot basidiomycetes fungi in decoloration and detoxification of olive mill waste water. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 57: 221-226.
- Klee H., Horsch R., Rogers S., 1987.** *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 38: 467-486.
- Kohli A., Richard M., Twyman, Abranches R., Wegel E., Stoger E., Christon P., 2003.** Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Mol. Biolog.*, 52: 247-258
- Kramer U., Chardonnens A.N., 2001.** The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 55: 661-672.
- Kumar S., Phale P., Durani S., Wangikar P., 2003.** Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnol Bioeng.*, 83: 386-394.
- Kurniawati S., Nicell J.A., 2005.** Kinetic model of laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol. *Biotechnol Bioeng.*, 91: 114-123.
- Kuznetsov, Shumakovich G.P., Koroleva O.V., Yaropolov A.L., 2001.** On applicability of laccase as label in the mediated and mediatorless electroimmunoassay: effect of distance on the direct electron transfer between laccase and electrode. *Biosens Bioelectron.*, 16: 73-84.

- LaFayette P., Eriksson K., Dean J., 1995.** Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding an acidic laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus* L). *Plant Physiol.*, 107: 667-668.
- Laufer Z., R.P. Beckett, F.V. Minibayeva 2006.** Co-occurrence of the multicopper oxidase tyrosinase and laccase in lichens in sub-order peltigerineae. *Annals of botany*, 98(5), 1035-1042.
- Leonowicz A., Cho N.S., Luterek J., Wilkolazka A., Wojtas-Wasilewska M., Matuszewska A., Hofrichter M., Wesenberg D., Rogalski J., 2001.** Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J Basic Microbiol.*, 41: 185-227.
- Lee H.Y. e. Pavlostathis S.G., 2004.** Decolorization and toxicity of reactive anthraquinone textile dyes under methanogenic conditions. *Water research.*, 38: 1838-1852.
- Lewis T.E., Wolfinger T.F., Barta M.L., 2004.** The ecological effects of trichloroacetic acid in the environment, *Environment International.*, 30: 1119-1150.
- Li Y., Chaney R., Brewer E., Rosenberg R., Angle J.S., Baker A., Nelkin J., 2003.** Development of a technology for commercial phytoextraction of nickel: economic and technical considerations. *Plant and Soil*, 249: 107-115.
- Li Y., e Hardin I.R., 1998.** Enzymatic scouring of cotton-surfactants agitation, and, selection of enzymes. *Text. Chem. Color.* 30: 23-29.
- Lijinsky W., (1991).** The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food. *Mutation Research*, 259,251-262.
- Lindsey K., Wei W., Clarke M., McArdle H., Rooke L., Topping J., 1993.** Tagging genomic sequences that direct transgenic expression by activation of a promoter trap in plants. *Transgenic Res.*, 2: 33-47.
- Liu W., Chao Y., Yang X., Bao H., Qian S, 2004.** Biodecolorization of azo, anthraquinonic and triphenylmethane dyes by white-rot fungi and a laccase-secreting engineered strain. *J. Ind Microbiol Biotechnol.*, 31: 127-132.
- Lurquin P.F., Filippone E., 1989.** Stable transformation of eggplant (*Solanum melanongena* L.) by co-cultivation of tissue with *Agrobacterium tumefaciens* carrying a binary plasmid vector. *Plant Cell Reports.*, 8: 370-373.
- Macek T., Mackova M., Kas J., 2000.** Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnol Adv.*, 18: 23-34.
- Mansur M., Suárez T., Gonzales A., 1998.** Differential gene expression in the laccase gene family from basidiomycete I-62. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 771-774.
- Marques De Souza C., Farani D., Peralta R., 2004.** Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *J. Basic Microbiol.*, 44: 129-136.
- Marschner H., 1995.** Mineral nutrition in higher plants. *Academic Press*, San Diego, Calif.
- Mastrangelo G., 1997.** Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environ. Health Perspect.* 104: 1166-1170.
- Mattinen M.L., Kruus K., Buchert J., Nielsen J.H., Andersen H.J., Steffensen C.L., 2005.** Laccase-catalyzed polymerization of tyrosine-containing peptides. *Febs J.*, 272: 3640-3650.
- Mayer A., Staples R., 2002.** Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochem.*, 60: 551-565.
- Mayer J., Sharples J., Nottenburg C., 2004.** Resistance to Phosphinothricin, CAMBIA Intellectual Property Resource, , 1-43.
- McCray J.E., Falta R.W.1996.** Defining the air sparging radius of influence for groundwater Remediation. *Journal of Contaminane Hydrology.* 24: 25-52.

- McCutcheon S., Schnoor J., 2003.** Overview of phytoremediation for explosives in water and soil. Ed. McCutcheon e Schnoor New York: 3-58.
- McGuirl M., Dooley D., 1999.** Copper-containing oxidases. *Cur. Opin. in Chem. Biol.*, 3: 138-144.
- Meagher R.B., 2000.** Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Curr Opin Plant Biol.*, 3: 153-162.
- Mersch-Sundermann, Mochayedi V., Kevekordes S., (1992).** Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Escherichia coli* PQ37. *Mutation research*, 278, 1-9.
- Michiels A., Van den Ende W., Tucker M., Van Riet L. e Van Laere A., 2003.** Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. *Analytical Biochemistry*, 315 85-89.
- Miller G.T., 1991** Sustaining the heart. *Environmental Science and Technology*.
- Minussi R., Pastore G., Duran N., 2002.** Potential applications of the food industry. *Trends in Foods Sc. e Technol.*, 13: 205-216.
- Miller J.H., 1972.** Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- Morikawa H., Takahashi M., Kawamura Y., 2003.** Metabolism and genetics of atmospheric nitrogen dioxide control using pollutant-philic plants. *In Phytor. Trans. and Contr. of Contam. , Ed. McCutcheon e Schnoor* 765-786.
- Mourgues F., Brisset M.N., Chevreau E., 1998.** Strategies to improve plant resistance to bacterial diseases through genetic engineering. *Trends Biotechnol.*, 16: 203-210
- Murashige T. e Skoog F., 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 15: 475-79.
- Nagel R.J., Manners J.M., Birch R.G., 1992.** Evaluation of an Elisa assay for rapid detection and quantification of neomycin phosphotransferase II in transgenic plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 10: 263-272.
- Negri M.C., Hinchman R.R., 2000.** The use of plants for the treatment of radionuclides. *Phytoremed Toxic Metals*, ed Raskin, Ensley: 107-132
- Neumann U., Brandizzi F., Hawes C., 2003.** Protein transport in plant cells: in and out of the Golgi. *Ann Bot (Lond)*, 92: 167-180
- Newmann L., Strand S., Choe N., Duffy J., Ekuan G., 1997.** Uptake and biotransformation of trichloroethylene by hybrid poplars. *Environ. Sci. Technol.*, 29: 318-329
- Nylund L., Heikkila P., Hameila M., Pyy, L.LinnainmaaK., Sorsa M., 1992.** Genotoxic effects and chemical composition of four creosotes. *Mutation research*, 265:223-236.
- O'Connell A., Holt K., Piquemal J., Grima-Pettenati J., Boudet A., Pollet B., Lapierre C., Petit-Conil M., Schuch W., Halpin C., 2002.** Improved paper pulp from plants with suppressed cinnamoyl-CoA reductase or cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Transgenic Res.*, 11: 495-503.
- Okazaki S., Michizoe J., Goto M., Furusaki S., Wariishi H., Tanaka H., 2002.** Oxidation of bisphenol A catalyzed by laccase hosted in reversed icelles in organic media. *Emzyme Microb. Technol.*, 31: 227-232.
- Olhoft P.M. e Phillips R.L., 1999.** Genetic and epigenetic instability in tissue culture and regenerated progenies. In: H.R. Lerner (Ed.) *Plant Responses to Environmental Stressed: From Phytohormones to Genome Reorganization*, Marcel Dekker, NY: 111-48.

**Olson P.E., Reardon K.F., Pilon-Smits E.A.H., 2003.** Ecology of rhizosphere bioremediation. *Phytoremed, McCutcheon, Schnoor*. 317-354.

**Ooms G., Hooykaas P.J.J., Van Veen R.J.M., Van Beelen P., Regensburg-Tunik R., Schilperoort R.A., 1982.** Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid*, 7: 15–9

**Palmieri G., Giardina P., Marzullo L., Desiderio B., Nitti G., Cannio R., Sannia G., 1993.** Stability and activity of a phenol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39: 632-636.

**Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Scaloni A., Capasso A., Sannia G., 1997.** A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J. Biol. Chem.*, 272:31301-31307.

**Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Fontanella B., and Sannia G., 2000.** Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 920-924.

**Palmieri G., Giardina P., Sannia G. 2005.** Laccase-mediated Remazol Brilliant Blue R decolorization in a fixed-bed bioreactor. *Biotechnol Prog.*, 21(5), 1436-1441.

**Peuke A.D., Rennenberg H., 2005.** Phytoremediation. *EMBO Rep*, 6: 497-501.

**Phillips, D.H., 1989.** Fifty years of benzo[a]pyrene. *Nature* 303:486-472.

**Piscitelli A., Giardina P., Mazzoni C., Sannia G., 2005.** Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*: 1-12.

**Prasad K., Mohan S., Bhaskar Y., Ramanaiah S., Babu V., Pati B., Sarma P., 2005.** Laccase production using *Pleurotus ostreatus* 1804 immobilized on PUF cubes in batch and packed bed reactors: influence of culture conditions. *J. Microbiol.* , 43: 301-307.

**Ranocha P., McDougall G., Hawkins S., Sterjides R., Borderies G., Stewar D., Cabanes M., Boudet A., Goffner D., 1999.** Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases- a divergent family- in poplar. *Eur J Biochem.*, 259: 485-495.

**Rao M., Sannino F., Gianfreda L., Bollag J., 2003.** Oxidative transformation of phenols in aqueous mixtures. *Water Res.*, 37: 3205-3215.

**Raskin I., Kumar P., Dshenkov S., Salt D., 1994.** Bioconcentration of heavy metals by plants. *Curr Opin Biotechnol.*, 5: 285-90.

**Raskin I., Smith R.D., Salt D.E., 1997.** Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Curr Opin Biotechnol.*, 8: 221-226.

**Raskin I., Ribnicky D.M., Komarnytsky S., Ilic N., Poulev A., Borisjuk N., Brinker A., Moreno D.A., Ripoll C., Yakoby N., O'Neal J.M., Cornwell T., Pastor I., Fridlender B., 2002.** Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol.*, 20: 522-531.

**Robbiano, L., Baroni, D., Carrozzino, R., Mereto, E., Brambilla, G., 2004.** DNA damage and micronuclei induced in rat and human kidney cells by six chemicals carcinogenic to the rat kidney. *Toxicology*, 204 187-195.

**Rock S.A., 2003.** Field evaluation of phytotechnologies. *Phytorem, McCutcheon, Schnoor*. 905-924.

- Roh Y., Edwards N.T., Lee S.Y., Stiles C.A., 2000.** Thermal-treated soil for mercury removal: soil and phytotoxicity tests. *J. Environ. Quality*, 29: 415-424.
- Roote D., 2003.** Treatment trains for remediation of soil and groundwater. *Technol Status Report, PA*.
- Rugh C.L., Senecoff J.F., Meagher R.B., Merkle S.A., 1998.** Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. *Nat Biotechnol.*, 16: 925-928.
- Rugh C.L., 2004.** Genetically engineered phytoremediation: one man's trash is another man's transgene. *Trends Biotechnol.*, 22: 496-498.
- Saghir S.A., Schultz I.R., 2005.** Toxicokinetics and oral bioavailability of halogenated acetic acids mixtures in naive and GST zeta-depleted rats. *Toxicological Sciences*, 84: 214-224.
- Salt D.E., Blaylock M., Kumar N.P., Dushenkov V., Ensley B.D., Chet I., Raskin I., 1995.** Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology (N Y)*, 13: 468-474.
- Salt D.E., Smith R.D., Raskin I., 1998.** Phytoremediation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 49: 643-668.
- Samanta S., Singh O., Jain R., 2002.** Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trend Biotech.*, 20: 243-246.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989.** Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Saparrat M.C., Guillen F., Arambarri A.M., Martinez A.T., Martinez M.J., 2002.** Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Corioloropsis rigida*. *Appl Environ Microbiol*, 68: 1534-1540.
- Saparrat M.C., Martinez M.J., Cabello M.N., Arambarri A.M., 2002.** Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. *Rev Iberoam Micol.*, 19: 181-185.
- Schnoor, J.L., Licht, L.A., McCutcheon, S.C., Wolfe, N.L. and Carreira, L.H. 1995.** *Environmental Science and Technology*, 29, 318–323.
- Schroeder P., Harvey P., Schwitzguebel J.P., 2002.** Prospect for phytoremediation of organic pollutants in Europe. *Environ Sci e Pollut Res.*, 9: 1-3.
- Selmin O., Thorne P. A., Caldwell P. T., Johnson P. D., Runyan R. B., 2005.** Effects of Trichloroethylene and its Metabolite Trichloroacetic acid on the Expression of Vimentin in the Rat H9c2 Cell Line. *Cell Biology and Toxicology*, 21, 83-95.
- Sharma K.K. e Kuhad R.C., 2008.** Laccase: enzyme revisited and function redefined. *Indian J. Microbial.*, 48: 309-316.
- Shirsat A., Wilford N., Croy R., Boulter D., 1989.** Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco. *Mol Gen Genet.*, 215: 326-331
- Shleev S., Tkac J., Christenson A., Ruzgas T., Yaropolov A., Whittaker J. Lo Gorton, 2005.** Direction electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. *Biosens. and Bioelect.*, 20: 2517-2554.
- Sijen T., Vijn I., Rebocho A., van Blokland R., Roelofs D., Mol J.N., Kooter J.M., 2001.** Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Curr Biol.*, 11: 436-440.
- Sims R.C. Overcash, M. R., 1983.** Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. *Residue Review*, 88: 1-68.
- Singh O., Jain R., 2003.** Phytoremediation of toxic aromatic pollutants from soil. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 65:128-135.
- Smits E, 2004.** Phytoremediation. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 56: 15-39
- Soares G.M., de Amorim M.P., Costa-Ferreira M., 2001.** Use of laccase

together with redox mediators to decolorize remazol brilliant blue R. *J Biotechnol.*, 89:123–129.

**Sonoki T., Kajita S., Ikeda S., Uesugi M., Tatsumi K., Katayama Y., Iimura Y., 2005.** Transgenic tobacco expressing fungal laccase promotes the detoxification of environmental pollutants. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 67: 138-142.

**Suresh B., Ravinhankar A., 2004.** Phytoremediation- A novel and promising approach for environmental clean-Up. *Crit Rev Biotechnol.*, 24: 97-124.

**Susarla S., Medina F., McCutcheon S.C., 2002.** Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecol.Engin.*,18: 647-658.

**Tamagnone L., Merida A., Parr A., Mackay S., Culianez-Macia F., Roberts K., Martin C., 1998.** The amMYB308 and amMYB330 transcription factors from antirrhinum regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. *Plant Cell.*, 10: 135-154.

**Tao S., Jiao X.C., Chen S.H., Liu W.X., Coveney Jr.R.M., Zhu L.Z., Luo Y.M., 2006.** Accumulation and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in rice (*Oryza sativa*). *Environm. Pollution.*, 140: 406-415.

**Tiehm A., Stieber M. 2001.** Strategies to Improve PAH Bioavailability: Addition of Surfactants, Ozonation and Application of Ultrasound. In: *Treatment of Contaminated Soil* (Stegmann R., Brunner G., Calmano W., Matz G. Eds.) Springer, Berlin. pp 299-323.

**Timo H., Mikolasch A., Lalk M., 2005.** Nuclear amination catalyzed by fungal laccase: reaction products of p-hydroquinones and primary aromatic amines. *J Org Chem.*, 70: 2002-2008.

**Tinland B., 1996.** The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends Pla. Sci. Rev.*, 1: 178-184.

**Topfer R., Matzeit V., Gronenborn B., Schell J., Steinbiss H.H., 1987.** A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res.*, 15: 5890.

**Tremblay L., Levasseur C., e Tremblay F.M., 1999.** Frequency of somaclonal variation in plants of black spruce (*Picea mariana*, *Pinaceae*) and white spruce (*P. glauca*, *Pinaceae*) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability. *American Journal of Botany*, 86: 1373-81

**Tsao D.T., 2003.** Overview of phytotechnologies. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, 78: 1-50

**Tyagi R.D., 1993.** Biological Treatment of petroleum Refinery Wastewater. In: Martin A.M. Ed. *Biological Degradation of Waste. Elsevier Applied Science*, 323-340.

**Tzfira T., Rhee Y., Chen M., Kunik T., Citovsky V., 2000.** Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: the molecules that walk through the walls. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54: 187-219.

**Uchida E., Ouchi T., Suzuki Y., Yoshida T., Habe H., Yamaguchi I., Omori T., Nojiri H., 2005.** Secretion of bacterial xenobiotic-degrading enzymes from transgenic plants by an apoplastic expressional system: an applicability for phytoremediation. *Environ. Sci. Technol.*, 39: 7671-7677.

**U.S. Environmental Protection Agency 2001.** Trichloroethylene Health Risk Assessment: Synthesis and Characterization. External Review Draft. EPA/600/P-01/002A. Office of Research and Development, Washington, DC.

**van Leeuwen W., Ruttink T., Borst Vrenssen A.W.M., van der Plas L.H.W., van der Krol A.R., 2001.** Characterization of position induced spatial and temporal regulation of transgene promoter activity in plants. *J. of Exp. Bot.*, 52: 949-959.



- Wahleithner J.A., Xu F., Brown K.M., Brown S.H., Golightly E.J., Halkier T., Kauppinen S., Pederson A., Schneider P., 1996.** The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Curr Genet.*, 29: 395-403.
- Wallroth M., Gerats A., Rogers S., Fraley R., Horsch R., 1986.** Chromosomal localization of foreign genes in *Petunia hybrida*. *Mol. Gen. Genet.*, 202: 6-15.
- Wang G., LI Q., Luo B., Chen X., 2004.** Ex planta phytoremediation of trichlorophenol and phenolic allelochemicals via an engineered secretory laccase. *Nat Biotechnol.*, 22:893-897.
- Ward O, Singh A, Hamme J, 2003.** Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30: 260-270.
- Watanabe M., 1997.** Phytoremediation on the brink of commercialisation. *ESeT*, 31: 182A-186A.
- Williamson P.R., Wakamatsu K., Ito S., 1998.** Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol*, 180: 1570-1572.
- Winter S., Redente E., 2002.** Reclamation of high-evaluation, acidic mine waste with organic amendments and topsoil. *J Environ Qual.*, 31: 31-34.
- Wolfe N., Hoehamer C., 2003.** Enzymes used by plants microorganism to detoxify organic compounds. In *Phytor. Transf. and Contr. of Contam.*, Ed. McCutcheon e Schnoor: 159-187.
- Xu F., Kulis J.J., Duke K., Li K., Krikstopaitis K., Deussen H.J.W., Abbate E., Galinyte V., Schneider P., 2000.** Redox Chemistry in Laccase-Catalyzed Oxidation of N-Hydroxy Compounds. *Apply and Environ. Microbiol.*, 2052-2056.
- Xu J., Johnson R., 1997.** Nitrogen dynamics in soils with different hydrocarbon contents planted to barley and field pea. *Canadian J. of Soil Science*, 77: 453-458.
- Yague S., Terron M.C., Gonzalez T., Zapico E., Bocchini P., Galletti G.C., Gonzalez A.E., 2000.** Biotreatment of tannin-rich beer-factory wastewater with white-rot basidiomycete *Coriolopsis gallica* monitored by pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 14: 905-910.
- Yaver D.S., Xu F., Golightly E.J., Brown K.M., Brown S.H., Rey M.W., Schneider P., Halkier T., Mondorf K., Dalboge H., 1996.** Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl Environ Microbiol.*, 62: 834-841.
- Zouari-Mechichi H., T. Mechichi, A. Dhouib, S. Sayadi, A.T. Martínez, M.J. Martínez 2006.** Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 141-148.
- Zupan J., Muth T.R., Draper O., Zambryski P., 2000.** The transfer of DNA from agrobacterium tumefaciens into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J*, 23: 11-28, PA.

## 8. Allegati

### Laboratori esteri frequentati:

- Dipartimento della Salute e dell'Ambiente, Università del Sud Carolina (USA) dal 5 luglio 2007 al 10 luglio 2008.

### Elenco delle pubblicazioni:

- Poster: "Palomba F., Galante C., Chiaiese P., Filippone E (2006). **In planta expression of fungal laccase gene (POXC) for phytoremediation of PAHs polpute soils and waters.** VIII Convegno FISV 28 settembre-1 ottobre 2006 Riva del Garda.
- Poster: "Palomba F., Chiaiese P., Filippone E (2007). **In planta expression of *Pleurotus ostreatus* laccase gene (POXC) for phytoremediation of polyphenols polpute soils.** 4th International Conference on Phytotechnologies, Denver Colorado (USA), 24-26 settembre 2007.
- Poster: "La Russa M., Palomba F., De Biasi M.G., Chiaiese P., Pinto G., Pollio A., Filippone E.(2007). **Wastewater phytoremediation: Genomic Analysis and Screening of Green Microalgae species for extracellular laccase activity.** 51th Annual Congresso f Italian Society Of Agricultural Genetics, Riva del Garda 23-26 settembre 2007. ISBN 978-88-900622-7-8.
- Poster: Palomba F., Tatino F., Miraglia V., Faraco V., Sannia G., Chiaiese P., Filippone E. (2008). ***Pleurotus osreatus* poxA1b gene expression in tobacco plants.** 52th Annual Congresso f Italian Society of Agricultural Genetics, Padova 14-17 settembre 2008. ISBN 978-88-900622-8-5.
- Poster: "Lee A. Newman Tara Sabo-Attwood, Francesca Palomba, Soumitra Ghoshroy, Catherine Murphy, John Stone and Jason Unrine (2008). **Plant uptake and traslocation of gold nanoparticles.** 5<sup>th</sup> International Conference on Phytotechnologies China.
- Poster: "La Russa M., De Biasi M.G., Chiaiese P., Palomba F., Pollio A., Plnto G., Filippone E. (2008). **Screening of green microalgae species for extracellular phenoloxidase activity useful for wastewater phycoremediation.** 4th European BioRemediation Conference, Chania, Creta 3-6 settembre 2008.

## ***In planta* expression of *Pleurotus ostreatus* laccase gene (*poxC*) for phytoremediation of polyphenols polluted soils**

F. Palomba\*, P. Chiaiese, E. Filippone

Department of Soil, Plant, Environmental, and Animal Production Sciences  
School of Biotechnology, University of Naples "Federico II" (Italy)

In Southern Italy, as well as in other Mediterranean countries, severe soil polyphenols contamination is coming from olive oil milling and tanning plant wastewaters, which are often freely released into the environment. In nature, soil bacteria and white-rot fungi can oxidize organ pollutants by production of enzymes having degradation activity. Among enzymes capable of degrading phenolic pollutants, laccases (EC 1.10.3.2) have become of interest. Those enzymes are oxidoreductases catalysing non-specific oxidation of aromatic substrates with a concomitant reduction of molecular oxygen to water.

In our laboratory, an ongoing phytoremediation project is aimed to obtain transgenic plants overexpressing one or more laccase genes. The fungal *poxC* laccase gene, isolated from the basidiomycete edible fungus *Pleurotus ostreatus*, was transferred by *Agrobacterium*-mediated genetic transformation into tobacco (*Nicotiana tabacum*) cv Samsun NN genome. Twenty-eight independent transgenic tobacco clones were identified to express POXC enzyme by Western blot assay carried out on leaf total soluble proteins. In addition, further experiments showed that the transgenic laccase is released by the plant root apparatus into the growth substrate and the enzyme is fully functional, as reported by ABTS assay. Preliminary experiments of phenols degradation carried out on olive milling wastewaters resulted in an overall reduction of phenols. However, some plants showed from slight to severe morphological variations compared to non-transgenic plants.

Keywords: phytoremediation, laccase, tobacco transgenic plants, soil phenol pollution, olive milling wastewaters, *poxC*

\* presenting author, DiSSPAPA - Via Università 100, 80055 Portici (Italy), f.palomba@unina.it

## WASTEWATER PHYTOREMEDIATION: GENOMIC ANALYSIS AND SCREENING OF GREEN MICROALGAE SPECIES FOR EXTRACELLULAR LACCASE ACTIVITY

LA RUSSA M.\*, PALOMBA F.\*, DE BIASI M.G.\*, CHIAIESE P.\*, PINTO G.\*\*,  
POLLIO A.\*\*, FILIPPONE E.\*

University of Naples (\*) Department of Soil, Plant, Environmental and Animal Production Sciences, School of Biotechnology; (\*\*) Department of Biological Sciences

Phytoremediation deals with the use of plants, or other green photosynthetic organisms, to reduce organic or inorganic pollutant in the environment, mainly waters and soils (Pivetz. B.E. 2001. EPA /540/S-01/500). Our research group is involved in studies regarding the use of plants for soil phytoremediation (Galante *et al.*, 2005. Proc. SIGA Congress, L04) and, more recently, of unicellular green algae species (green microalgae) for wastewater treatments. Some microalgae species have been recently tested to degrade an array of pollutants such as phenols, polyphenolic aromatic compounds (PAH) and even hormones (Pollio *et al.*, 1994. *Phytochemistry*, 37:1269- 1272; Pinto *et al.*, 2003. *Biotechnol Lett.*, 25:1657-1659). It is worthy to note that about 2,500 species belong from Chlorophyceae, seldom living in contrasting habitat under severe environmental conditions. So far, a little has been done to exploit this genetic biodiversity bonanza; thus, few reports have been published on enzymes implicated in their degradative action (Semple *et al.*, 1996. *Appl. Envr. Micr*, 62:1265-1273). Since a wide collection of green microalgae species are available at the University of Naples, Department of Biological Science, recently we have started a research aimed to (a) find algae species with extracellular phenoloxidase enzymatic activity; (b) identify extracellular enzymes able to degrade xenobiotic like synthetic dyes and other PAHs; (c) clone and overexpress genes producing phenoloxidases in homologous and in heterologous systems, in order to use these enzymes primarily for phytoremediation of milling oil wastewaters. Among phenoloxidaes, we focused our interest on laccases (EC 1.10.3.2) that are phenol-oxidoreductases able to catalyze the oxidation of various aromatic compounds (particularly phenols) with the concomitant reduction of oxygen to water. Selected algae strains were grown in liquid culture at 22°C under continuous light conditions, starting with an inoculum of 0.1 OD. After ten days, the algal growth was measured as optical density at 600 nm. A screening was performed by detecting the laccase activity in the broth medium culture, deprived of algae cells, in the presence of 2,2-azino-bis 3-ethybenz-thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) at 420 nm. The laccase activity was referred to the polyphenol oxidase activity of *Trametes versicolor*; thus, each positive strain was assayed on industrial azo-dye Remazol Brilliant Blue R (RBBR) and on the natural phenol compound syringaldazine by kinetic analysis. Preliminary results, obtained comparing different species, showed a wide variation both within the same substrate and among the different microalgae. Microalgae strains able to produce and secrete laccase enzymes were further chosen for more detailed genetic studies. To clone phenoloxidase genes from those species, we have started a bio-informatics approach, on the basis of highly conserved coding sequences of laccases already isolated and sequenced from several higher plants. Primers drawn on the alignment of those sequences have been used to amplify genomic DNA.

## **PLEOROTUS OSTREATUS *poxA1b* GENE EXPRESSION IN TOBACCO PLANTS**

PALOMBA F.\*, TATINO F.\*, MIRAGLIA V.\*, FARACO V.\*\*, SANNIA G.\*\*, CHIAIESE P.\*, FILIPPONE E.\*

\*) Department of Soil, Plant, Environmental and Animal Production Sciences, School of Biotechnology, University of Naples "Federico II", Via Università 100, 80055 Portici (Italy)

\*\*) Department of Organic Chemistry and Biochemistry, School of Biotechnology, University of Naples "Federico II", Complesso Universitario Monte Sant'Angelo - Naples (Italy)

Phenols are very abundant compounds in the nature, due to their natural occurrence in the environment such as lignin and as pollutants from industrial activities. Among them, olive oil mills are the major environmental hazardous for releasing effluents (olive oil mill wastewaters-OMW), which are characterised by low pH and heavy presence of mono and polyaromatic compounds such as polyphenols. Those compounds are refractory to biodegradation and have high level of phytotoxic and microbial inhibitory compounds (El Hajjouji *et al.* 2008). It has been estimated that over 2.5 million metric tons per year of olive oil are produced worldwide, 98% of those in Mediterranean countries (FAOSTAT, 2007) and in most of them, OMW are used to be discharged in fresh waters. However, some European countries, including Italy (Law No. 574/1996), allow their spreading on agriculture soils between 50 to 80 m<sup>3</sup> per year. As results, it has been reported several effects on crops such as higher rate of mortality and low percentage of seed germination. In nature, some ligninolytic fungi are able to reduce the content of aromatic compounds and among them *Pleurotus ostreatus* (P.o.) has been intensively studied for its ability to degrade phenolic compounds into less toxic ones thanks to the production of several extracellular enzymes including laccases (Giardina *et al.* 1999) Therefore, our aim is to overexpress laccases in plant roots in order to evaluate their ability for reducing phenol content in OMW. In a previous SIGA communication (Galante *et al.*, 2005) we have reported that *Nicotiana tabacum* plants expressing the gene *poxC* from P.o. were able to release the enzyme in the root exudates into the *in vitro* culture medium; moreover, the laccase was fully active as resulted by an ABTS assay. Giardina *et al.* (1999) have also demonstrated that the laccase POXA1b is more stable than the other P.o. isoenzymes. Hence, the P.o. *poxA1b* cDNA was cloned into the pGreen binary vector under the CaMV35S promoter and electroporated in *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404, which has been used as carrier to transfer the *poxA1b* cassette into the genome of *N. tabacum* cv Samsun NN. The differentiated rooted shoots, selected in the presence of kanamycine, were screened by PCR analysis using specific primers for the *poxA1b* gene. The evaluation of laccase activity was performed by detection of a green band on native polyacrilamide gel electrophoresis using ABTS as chromogenic substrate. Quantification of phenol-oxidase activity was firstly performed by enzymatic assays in leaves protein extracts. In addition, transgenic plants were grown *in vitro* to measure the enzymatic activity of root exudates. In order to verify the synergic effects on phenols degradation of both POXA1b and POXC laccases, transgenic tobacco lines expressing each of those enzymes will be crossed and their progenies will be evaluated.

## Plant uptake and translocation of gold nanoparticles

Lee A. Newman<sup>1,2</sup>, Tara Sabo-Attwood<sup>1</sup>, Francesca Palomba<sup>1,3</sup>, Soumitra Ghoshroy<sup>4</sup>, Catherine Murphy<sup>5</sup>, John Stone<sup>5</sup> and Jason Unrine<sup>2,6</sup>

Research and application of nanoparticles are rapidly growing areas. However, little is known about the potential toxicity of the particles, and research is currently being done looking at inhalation and dermal contact exposure. Additionally, as manufacture and use increases, the potential for nanoparticles to be released into the environment increases, both from industrial accidents as well as normal use. Plants have been shown to be able to take up a variety of heavy metals, often in quite high concentrations as compared to soil concentrations. Thus, there is the potential for plants to take up and accumulated nanoparticles from the environment. Here we show that plants are capable of both uptake and translocation of gold nanospheres. We were able to visualize the movement of the particles through the plant with light and electron microscopy as well as with synchrotron x-ray microspectroscopy. Within root cells, gold nanoparticles appear to form dense clouds around fungal hyphae that penetrated individual root cells, and within leaves, cause necrosis along leaf edges. This shows that nanoparticles may have more than one way to move through the environment; that they can enter the food chain through plant uptake. Thus, particles can potential have an adverse environmental impact both on the plants that take them up, and also on any animals that might ingest the plants.

<sup>1</sup>Arnold School of Public Health, University of South Carolina, 921 Assembly St, Columbia, SC, USA [newman2@gwm.sc.edu](mailto:newman2@gwm.sc.edu)

<sup>2</sup>Savannah River Ecology Laboratory, Savannah River Site, Aiken, SC, USA

<sup>3</sup>University of Naples, Naples, Italy

<sup>4</sup>Department of Biological Sciences, University of South Carolina, Columbia, SC USA

<sup>5</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, University of South Carolina, Columbia, SC, USA

<sup>6</sup>Univerisity of Kentucky, Lexington, Kentucky, USA