

DOTTORATO DI RICERCA IN AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA  
XXI CICLO  
INDIRIZZO ORTICOLTURA E MIGLIORAMENTO GENETICO  
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
FEDERICO II

**Interventi di ingegneria genetica per  
aumentare la produzione di metaboliti  
vegetali con attività biocida**

Dottoranda: Dott.<sup>ssa</sup> Paola Pecchia

Tutore:

Dott.<sup>ssa</sup> Clara Conicella

Coordinatore:

Ch.<sup>mo</sup> Prof. Matteo Lorito

Co-tutore:

Dott.<sup>ssa</sup> Maria Cammareri

# INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	pag. 5
<b>1. INTRODUZIONE</b>	
1.1 Metaboliti secondari nelle piante e loro impiego	pag. 8
1.2 Pathway biosintetico delle saponine triterpenoidiche	pag. 13
1.3 Strategie per aumentare la produzione di metaboliti vegetali	pag. 18
1.4 Scopi e contenuti della tesi	pag. 25
<b>2. MATERIALI E METODI</b>	
2.1 Materiale vegetale	pag. 27
2.2 Estrazione della frazione di saponine	pag. 27
2.3 Saggio di attività nei confronti di insetti e nematodi	pag. 31
2.4 Saggi tossicologici <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	pag. 32
2.5 Trasformazione di <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	pag. 34
2.6 Trasformazione dei ceppi di <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	pag. 34
2.7 Ottenimento del materiale vegetale transgenico	pag. 35
2.8 Analisi molecolari del materiale transgenico	pag. 36
2.9 Analisi chimiche del materiale transgenico	pag. 38
2.10 Analisi statistiche	pag. 39

### 3. RISULTATI

- 3.1 Attività biologica dei macinati di *Aster sedifolius* e *Aster caucasicus* nei confronti di insetti e nematodi pag. 41
- 3.2 Valutazioni tossicologiche in vivo ed in vitro degli estratti di *Aster sedifolius* pag. 45
- 3.3 Analisi funzionale del gene *AsOXAI* pag. 50
- 3.4 Ingegneria genetica con CaMV35S::*AsOXAI* pag. 53
- 3.4.1 Induzione di callo transgenico CaMV35S::*AsOXAI* in *Aster caucasicus*: analisi molecolari e chimiche pag. 56
- 3.4.2 *Medicago truncatula* trasformata con CaMV35S::*AsOXAI*. Analisi molecolari e chimiche pag. 67
- 3.4.2 *Arabidopsis thaliana* trasformata con CaMV35S::*AsOXAI*. Analisi molecolari pag. 72

### 4. DISCUSSIONE

- 4.1 Attività biologica contro insetti e nematodi e valutazioni tossicologiche delle saponine di *Aster sedifolius* pag. 74
- 4.2 Analisi funzionale del gene *AsOXAI* codificante una  $\beta$ -amirina sintasi pag. 78
- 4.3 Interventi di ingegneria genetica in *Aster caucasicus* per la produzione di metaboliti bioattivi pag. 80
- 4.4 Effetti dell'espressione costitutiva del gene *AsOXAI* sul pathway dei triterpeni in *Medicago truncatula* pag. 82
- 4.5 Interventi di ingegneria genetica in *Arabidopsis thaliana* con il gene *AsOXAI* pag. 84

## **5. CONCLUSIONI**

pag. 87

## **6. BIBLIOGRAFIA**

pag.89

## RIASSUNTO

Nelle piante sono presenti numerosi metaboliti con attività biocida tra cui le saponine triterpenoidiche, implicate nei meccanismi di difesa della pianta. La loro attività biologica, principalmente legata all'interazione con le membrane cellulari, si manifesta inibendo la crescita di funghi, batteri, insetti e nematodi. Tre nuove saponine triterpenoidiche, Astersedifolioside A, B, C, identificate nella specie *Aster sedifolius*, mostrano un'inibizione della crescita di funghi fitopatogeni tellurici e del batterio *Xanthomonas campestris*. Le saponine sono costituite da una porzione glicosidica e da una agliconica detta sapogenina. Il primo step nella sintesi dell'aglicone avviene ad opera degli enzimi 2,3-ossidosqualene ciclasi (OSC) che ciclizzano il 2,3 ossidosqualene. Presso il gruppo di ricerca del CNR-IGV di Portici, dove si è svolta la tesi di dottorato, in *A. sedifolius* era stato isolato il gene *AsOXAI* (GenBank AY836006) codificante l'OSC coinvolta presumibilmente nella biosintesi della  $\beta$ -amirina, che costituisce l'aglicone degli Astersedifoliosidi. Poiché il fattore limitante per l'uso delle biomolecole su larga scala è rappresentato dalla ridotta produzione *in planta* l'obiettivo principale della tesi di dottorato è stato quello di definire una strategia genetica idonea a migliorare la produzione di tali sostanze utilizzando il gene *AsOXAI*. Inoltre, il progetto della presente tesi di dottorato si è proposto di verificare la possibilità di impiegare le saponine triterpenoidiche estratte dall'*Aster* come biopesticidi.

Nell'ambito di quest'ultimo obiettivo sono stati eseguiti saggi di attività biologica con le farine di foglia e radice di *A. sedifolius* e *A. caucasicus* nei confronti di insetti, in collaborazione con il Dott. De Cristofaro (Dipartimento di Scienze Animali, Vegetali e dell'Ambiente, Università del Molise), e nei confronti di nematodi, in collaborazione con il Dott. Di Vito (CNR-IPP, Bari). I risultati hanno indicato una significativa riduzione nello sviluppo del *Tenebrio molitor* e nella riproduzione del nematode galligeno *Meloidogyne javanica*. Sono state, inoltre, effettuate in collaborazione con la Dott.ssa Borrelli (Dipartimento di Farmacologia

Sperimentale, Università di Napoli Federico II) valutazioni tossicologiche su topi *in vivo* ed *in vitro* per esaminare la tossicità acuta e cronica degli estratti dalle parti aeree di *A. sedifolius*, della miscela di saponine e dell'Astersedifolioside C che sono risultati innocui anche a dosi elevate.

Per quanto riguarda l'intervento di ingegneria genetico-metabolico eseguito in questo progetto di dottorato, come primo risultato è stata dimostrata mediante la trasformazione del lievito *Saccharomyces cerevisiae* la funzione di *AsOXAI* come  $\beta$ -amirina sintasi. E' stato costruito un vettore di espressione con il cDNA full-length di *AsOXAI* sotto il controllo del promotore CaMV35S e tale costrutto è stato inserito in diversi ceppi di *Agrobacterium tumefaciens* (EHA105 e GV3101). Tali ceppi sono stati usati per la trasformazione delle specie *Aster caucasicus* (specie affine all'*A. sedifolius*), *Medicago truncatula* e *Arabidopsis thaliana*. Quest'ultime sono specie modello che producono rispettivamente saponine triterpenoidiche e triterpeni.

In *A. caucasicus* è stato messo a punto il metodo di trasformazione e sono stati prodotti da espianiti fogliari calli transgenici che esprimono *AsOXAI*. Sono state effettuate diverse subculture dei calli transgenici per ottenere quantità sufficienti ad eseguire le analisi biochimiche, svolte in collaborazione con la Prof. De Tommasi, Università di Salerno, dove la dottoranda ha trascorso alcuni mesi. Le parti aeree di *A. caucasicus* producono derivati dell'acido quinico e sorprendentemente mostrano l'assenza di saponine triterpenoidiche tipiche del genere *Aster*. Il callo trasformato di *A. caucasicus* ha evidenziato mediante analisi LC/MS dell'estratto solubile in butanolo la presenza di composti triterpenici tipici di *A. sedifolius*, oltre che una maggiore quantità di composti derivati dall'acido quinico.

La trasformazione genetica di *M. truncatula* è stata effettuata in collaborazione con il Dott. Confalonieri (CRA, Istituto Sperimentale delle Colture Foraggere di Lodi). Analisi a livello genomico hanno evidenziato la trasformazione di sei linee che, analizzate tramite Real Time, hanno mostrato diversi livelli di espressione di *AsOXAI*. Le stesse linee transgeniche, sottoposte all'analisi biochimica delle principali saponine prodotte in foglia e radice, hanno evidenziato che il contenuto

totale delle saponine aumenta rispetto al controllo non trasformato. In particolare risultano incrementate le concentrazioni dell'acido medicagenico, dell'acido zanico e di quello bayogenico.

La trasformazione di *A. thaliana* è stata realizzata presso il Dept. of Horticulture and Landscape Architecture della Purdue University (U.S.A.) ed ha consentito di selezionare dieci piante transgeniche T<sub>1</sub> per *AsOXAI*. E' stata ottenuta una linea omozigote per il transgene sulla quale sono in corso le analisi biochimiche. La specie modello *A. thaliana* è un eccellente sistema genetico che consentirà tramite le analisi combinate del genoma, del trascrittoma e del metaboloma, di valutare gli effetti che la sovraespressione di *AsOXAI* causa sul pathway biosintetico dei triterpeni ed, eventualmente, su altri pathway.

I risultati conseguiti con la presente tesi di dottorato indicano che esiste la possibilità di individuare in *Aster* molecole con attività biocida da utilizzare in ambito agrochimico. Inoltre è possibile tramite ingegneria genetica intervenire nel pathway di sintesi delle saponine triterpenoidiche agendo sull'enzima OSC (*AsOXAI*) che catalizza la produzione della porzione agliconica triterpenica. Infine, occorre sottolineare come la realizzazione di questo progetto sia stata possibile grazie alla sinergia tra ricercatori con diverse competenze.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Metaboliti secondari nelle piante e loro impiego

Oltre ai metaboliti essenziali definiti primari (carboidrati, lipidi e aminoacidi), le piante sono in grado di sintetizzare una grande varietà di composti indicati come metaboliti secondari. Questi possono essere definiti come composti che non hanno un ruolo ben riconosciuto nel mantenimento dei processi vitali fondamentali per la pianta, ma hanno un importante ruolo nell'interazione della pianta con l'ambiente (Oksman-Caldentey e Inzè, 2004). Nonostante la definizione di "secondari", questi composti giocano, quindi, un ruolo importante conferendo vantaggi selettivi alle specie vegetali mediante la soppressione della crescita di specie infestanti, la protezione da predatori, patogeni e da stress abiotici, l'attrazione di impollinatori, diversi benefici nei confronti di animali e microrganismi, oltre che servire come segnali nell'interazione con le altre piante (Duradeva e Pichersky, 2008). Inoltre, è stato identificato un loro ruolo anche a livello cellulare come regolatori della crescita, modulatori dell'espressione genica e trasduttori di segnale (Kaufman *et al.*, 1999). Poiché si stima che le piante producano oltre 200000 metaboliti (Fiehn, 2002), negli ultimi anni un crescente interesse si è concentrato sulla ricerca di nuove sostanze di origine naturale da impiegare in campo farmaceutico, agrochimico e agroindustriale per la produzione di farmaci, biopesticidi ed additivi alimentari. Tra gli organismi di interesse, le piante hanno un ruolo rilevante perché rappresentano tuttora la base della medicina fitoterapica e sono la fonte di nuove sostanze farmacologiche. Gli esempi di medicinali ottenuti dalle piante sono numerosi: la digossina estratta da *Digitalis* spp., il chinino e la chinidina da *Cinchona* spp., l'atropina dall'*Atropa belladonna*, la morfina dal *Papaver sumniferum*, la vincristina da *Catharanthus roseus* (Oksman-Caldentey e Inzè, 2004). Delle oltre 400000 specie di piante, solo una piccola percentuale è stata finora studiata per la produzione di fitochimici e di essi solo per una piccolissima parte sono state esaminate le proprietà farmacologiche essendo questo tipo di ricerca complessa ed onerosa. Comunque è stato dimostrato che oltre il

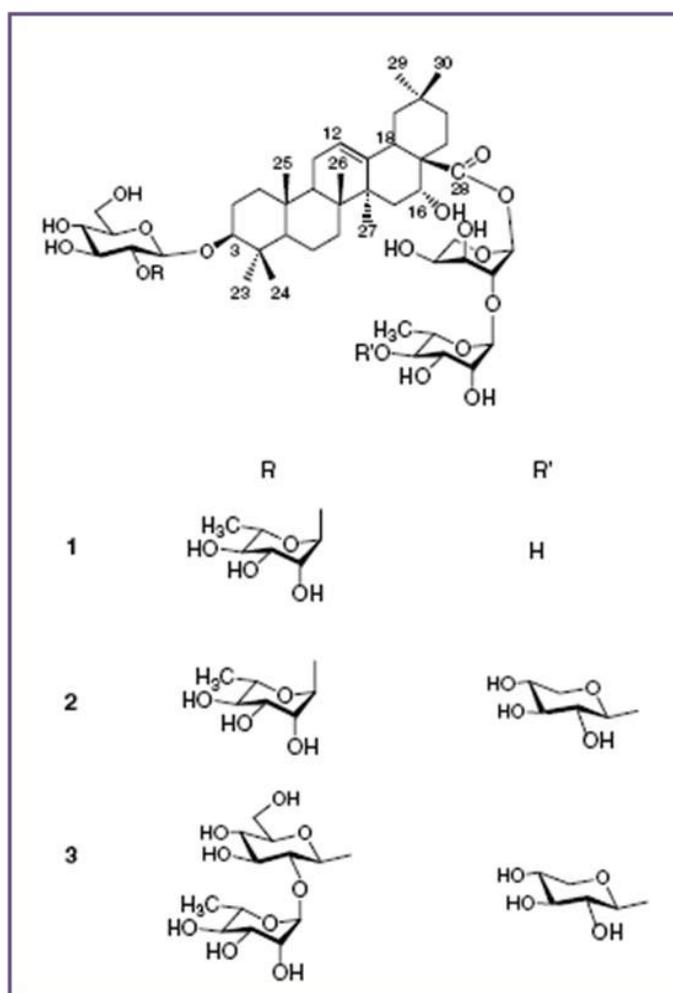
60% dei farmaci antitumorali e il 66% degli antimicrobici (che includono antibatterici, antifungini, antivirali) presenti attualmente sul mercato sono prodotti naturali o da essi derivati (Newman e Cragg, 2008). Nonostante le difficoltà legate allo studio e all'isolamento dei fitochimici, essi hanno il vantaggio della maggiore efficacia rispetto ai medicinali di sintesi per alcune patologie e una minore incidenza di effetti collaterali. Un esempio rilevante è rappresentato dal *Ginseng*, usato come pianta medicinale in Asia per migliaia di anni, in possesso di numerose proprietà farmacologiche tra cui, effetti anticancerogeni, antidiabetici, neuroprotettivi (Kiefer e Pantuso, 2003). Queste proprietà sono state attribuite ai ginsenosidi, saponine triterpenoidiche in esso presenti (Liang e Zhao, 2008). Inoltre non bisogna sottovalutare il problema che una larga percentuale della popolazione mondiale non ha accesso ai trattamenti farmacologici convenzionali. Le diverse motivazioni soprariportate costituiscono un contesto in cui la ricerca ha ampi margini per migliorare e semplificare i protocolli di estrazione e per aumentare nelle piante il contenuto dei metaboliti di interesse attraverso tecniche classiche di miglioramento genetico o approcci biotecnologici innovativi volti a modificare i pathway biosintetici. Oltre al campo farmacologico, i metaboliti secondari estratti da pianta possono essere impiegati anche nel settore agrochimico. L'esigenza di disporre di sistemi di difesa delle colture agrarie a minor impatto sia sull'ambiente che nei confronti degli operatori del settore e dei consumatori ha stimolato in questi ultimi anni la ricerca per isolare nuove molecole di origine naturale da utilizzare come biopesticidi (Kaufman *et al.*, 1999). Nelle piante sono presenti numerosi principi attivi biocidi essendo questi il risultato di processi evolutivi finalizzati all'autoprotezione della pianta da patogeni, erbivori e competitori (Bourgaud *et al.*, 2001). Esistono esempi di utilizzazione di composti del metabolismo delle piante come erbicidi naturali (Duke *et al.*, 2000) ed insetticidi come l'olio di Neem (Henkel *et al.*, 1999).

Tra le innumerevoli sostanze biologicamente attive di origine vegetale una grande attenzione è stata rivolta alle saponine, molecole complesse ad alto peso

molecolare costituite da una porzione glicosidica e da una non saccaridica detta sapogenina. In funzione della natura chimica della sapogenina, le saponine sono distinte in due classi: triterpenoidiche e steroidiche. In relazione al numero di zuccheri, le saponine sono classificate in monodesmosidi con una sola catena saccaridica legata generalmente al C-3, bidesmosidi con due catene zuccherine legate al C-3 e l'altra in posizione C-28, nelle saponine triterpenoidiche, o C-26, nelle saponine steroidiche, e tridesmosidi con tre catene saccaridiche. Gli zuccheri possono essere sia lineari che ramificati; le molecole più diffuse nelle saponine triterpenoidiche sono: D-glucosio, D-galattosio, L-arabinosio, L-ramnosio, D-xilosio, D-fucosio e l'acido glucuronico (Osborn, 1996).

Le saponine triterpenoidiche risultano estremamente interessanti in campo agrochimico perché implicate nei meccanismi di difesa della pianta, appartengono infatti alla classe delle "fitoanticipine", ossia composti presenti prima dell'attacco del patogeno. La loro attività biologica è principalmente legata ai meccanismi di interazione con le membrane cellulari. Le piante risultano protette dalle loro stesse saponine poiché le tengono compartimentalizzate nei vacuoli, le cui membrane hanno un basso o alterato contenuto di steroli. Il principale meccanismo di azione delle saponine contro i funghi sembra legato alla loro abilità a complessare gli steroli delle membrane fungine alterandone l'integrità (Osburn, 2003). Per quanto riguarda la loro attività inibitoria nei confronti della crescita di batteri, studi condotti utilizzando le saponine prodotte da *Gypsophila* hanno dimostrato differenze qualitative e quantitative riguardo alla crescita di ceppi Gram negativi presenti nella rizosfera (Fons *et al.*, 2003). Le saponine triterpenoidiche agiscono anche contro gli insetti fitofagi perché formano un complesso insolubile con il colesterolo, che è il precursore nella biosintesi dell'ormone ecdisone. Poiché la sola fonte di questi steroli per la maggioranza degli insetti è l'alimentazione, il colesterolo legato alle saponine non può essere utilizzato (Harmatha, 2000). Inoltre, molte saponine triterpenoidiche con attività nematocida sono state isolate da specie della famiglia delle Asteraceae che rappresenta una delle maggiori fonti di tali sostanze (Chitwood, 2002). Infatti, sono

state estratte saponine da specie appartenenti ai genere *Helianthus* (Bader *et al.*, 1991) e *Solidago* (Bader *et al.*, 1995). In particolare, anche nel genere *Aster* sono state purificate saponine da diverse specie tra cui *A. bellidiastrum* (Schopke *et al.*, 1995), *A. yunnanensis* (Shao *et al.*, 1995b), *A. batagensis* (Shao *et al.*, 1995a), *A. tataricus* (Cheng e Shao, 1994), *A. scaber* (Nagao *et al.*, 1996) e *A. lingulatus* (Shao *et al.*, 1997). Presso il gruppo di ricerca dove si è svolto il progetto della presente tesi sono state identificate in *Aster sedifolius* tre nuove saponine triterpenoidiche chiamate Astersedifolioside A, B, C (Fig. 1.1) che oltre a determinare una riduzione della proliferazione cellulare quando saggiate su cellule tiroidee tumorali di ratto (Corea *et al.*, 2004), hanno inibito la crescita di diversi funghi fitopatogeni e del batterio *Xanthomonas campestris* (Cammareri *et al.*, 2003).



**Fig. 1.1** – Struttura chimica degli Astersedifoliosidi A-C (1-3). R e R' indicano i differenti gruppi di sostituzione (Corea *et al.*, 2004).

L'attività inibitoria degli Astersedifoliosidi sembra aumentare all'aumentare del numero di molecole di zuccheri presenti (Corea *et al.*, 2004); è infatti riportato che saponine isolate dalla parte aerea della specie di *Solidago virgaurea* mostrano differenti azioni antifungine contro *Candida albicans* in funzione della loro porzione gliconica (Bader *et al.*, 2000). I funghi, come messo in evidenza da recenti studi, usano differenti strategie per contrastare l'azione di difesa della pianta tra cui la degradazione di composti antimicrobici preformati come le saponine. E' stato studiato il caso del fungo *Septoria lycopersici*, patogeno del pomodoro, in cui è stato osservato che il glicoalcaloide steroidico  $\alpha$ -tomatina era idrolizzato dalla tomatinasi, un'enzima idrolitico ad azione extracellulare secreto dal fungo nei primi stadi dell'infezione, che inattiva l'azione della saponina implicata nel sistema di difesa del pomodoro (Bouarab *et al.*, 2002). La concentrazione delle saponine è notevolmente influenzata dall'età della pianta, dallo stadio fisiologico e dall'interazione della pianta con i fattori ambientali; inoltre, la distribuzione delle saponine triterpenoidiche non è solo specie-specifica ma, nell'ambito della stessa pianta, è anche organo-specifica. In *A. sedifolius* la quantità degli Astersedifoliosidi risulta 10 volte maggiore nelle radici rispetto alle parti aeree (Cammарeri *et al.*, 2008). In altre Asteraceae, come la *Calendula officinalis*, le saponine sono sintetizzate nelle foglie e trasportate alle radici (Hostettman *et al.*, 1995). I ginsenosidi sono stati individuati nelle radici di *Panax ginseng*, considerato come il principale organo di accumulo delle saponine (Liang e Zhao, 2008); tuttavia sono presenti anche nelle foglie (Dou *et al.*, 2001) e nei bocci fiorali (Yoshikawa *et al.*, 2007), mentre in *Glycyrrhiza glabra* (Hayashi *et al.*, 2004) e in *Avena sativa* (Mylona *et al.*, 2008) le saponine si accumulano prevalentemente nelle radici.

## 1.2 Pathway biosintetico delle saponine triterpenoidiche

Nonostante l'interesse per le saponine, molto poco si conosce circa gli enzimi del pathway biochimico ed i corrispondenti geni codificanti coinvolti nella biosintesi. Comunque, è noto che il substrato limitante è rappresentato dall'aglicone delle saponine piuttosto che dagli zuccheri che sono abbondantemente forniti dal processo fotosintetico. A dispetto della grande variabilità di strutture e funzioni, la porzione agliconica delle saponine triterpenoidiche appartiene ad un importante gruppo di metaboliti secondari, gli isoprenoidi, e in particolare alla classe dei triterpeni, così denominata sulla base del numero di unità isopreniche coinvolte. Gli isoprenoidi derivano da due precursori a 5 atomi di carbonio, l'isopentenil pirofosfato (IPP) e il dimetil allil pirofosfato (DMAPP) (Lois *et al.*, 1998). La molecola a 5 atomi di carbonio è l'unità base a partire dalla quale, attraverso condensazioni testa-coda e/o testa-testa catalizzate dalla preniltransferasi, sono sintetizzate molecole via via più complesse, formate da un numero di atomi di carbonio multiplo di cinque (Bohlmann *et al.*, 1998). Queste condensazioni di unità isopreniche avvengono attraverso due vie, dalla condensazione di 2 unità isopreniche C<sub>15</sub> si formano i triterpeni e gli steroidi, dalla condensazione di 2 unità C<sub>20</sub> si formano i tetraterpeni. Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato l'esistenza di due diverse vie biosintetiche per la formazione del precursore fondamentale IPP: la via dell'acido mevalonico attiva nel citosol e nel reticolo endoplasmatico (Rohmer *et al.*, 1999) e la via del piruvato/gliceraldeide-3-fosfato, detta anche "MEP pathway", operativa nei plastidi (Lichtenthaler *et al.*, 1997). La via dell'acido mevalonico è stata per lungo tempo considerata l'unica via operante nella biosintesi di tutti i terpeni. Essa prevede la condensazione di 3 molecole di acetilCoA a formare l'idrossi-3-metilglutarilCoA, che viene ridotto ad acido mevalonico, dal quale, attraverso successive reazioni si forma l'IPP. Esperimenti di marcatura e studi enzimatici hanno permesso l'individuazione del "MEP pathway". Esso prende il via dal legame di unità C<sub>2</sub> derivante dalla decarbossilazione dell'acido piruvico, con un'unità C<sub>3</sub>, la

gliceraldeide 3-fosfato, formandosi così un composto a 5 atomi di carbonio, l'1-deossixilulosio da cui viene sintetizzato l'IPP (Fig. 1.2).

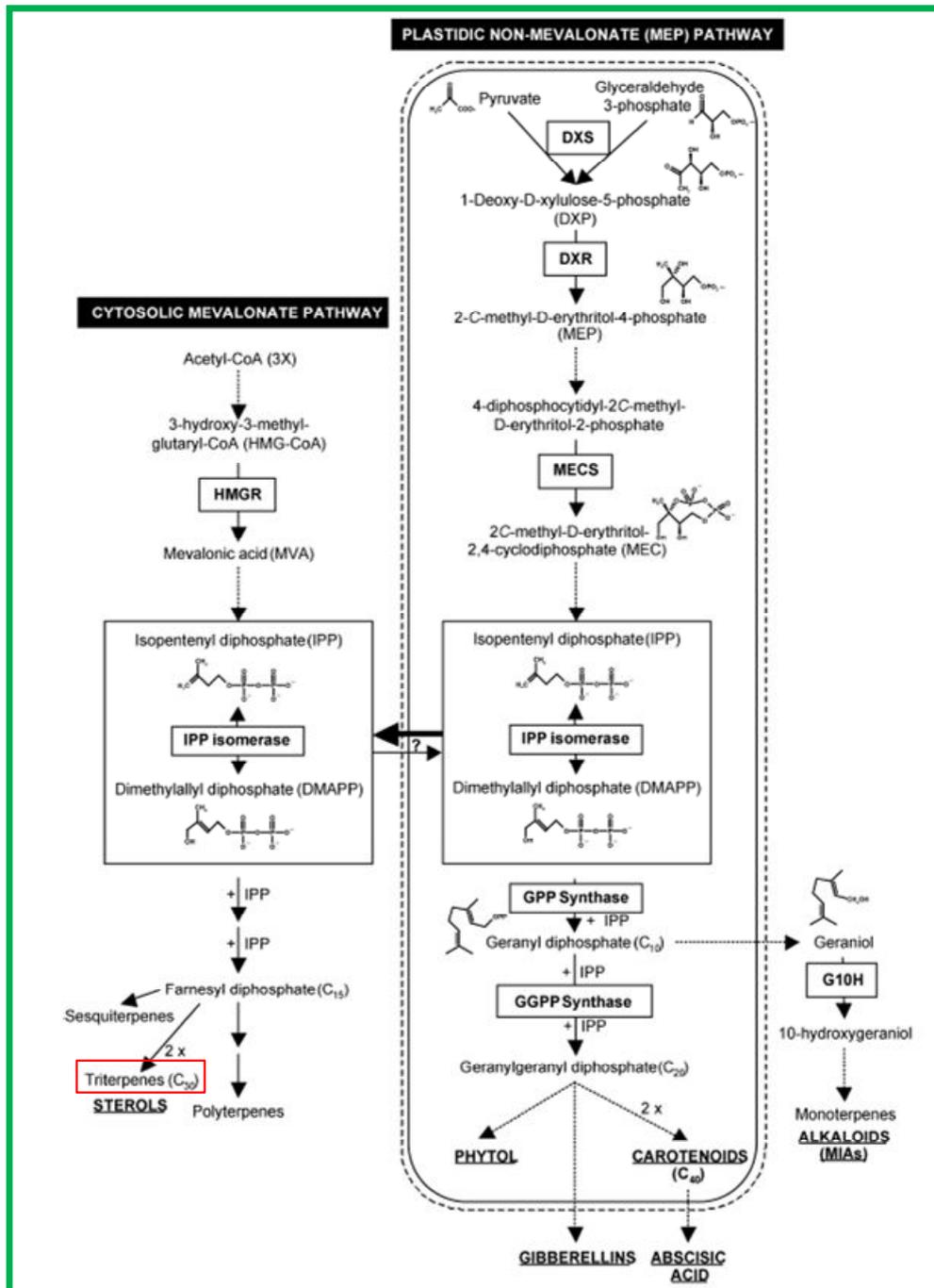
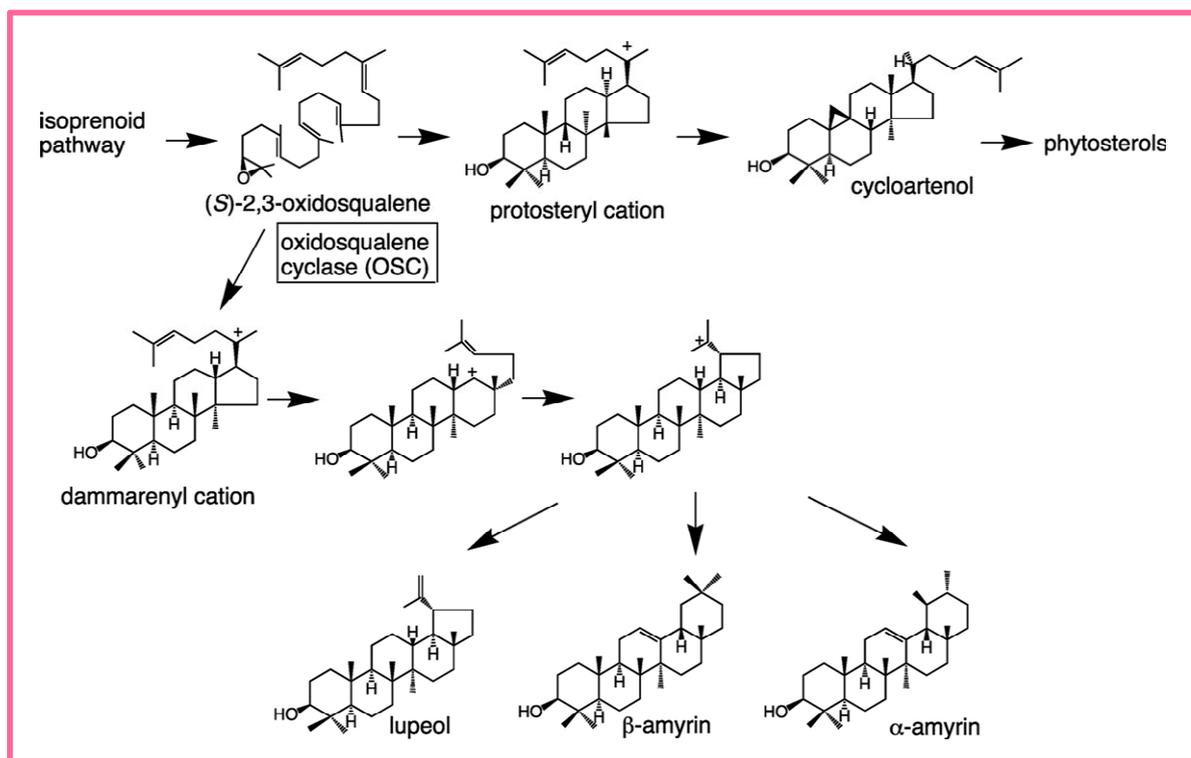


Fig. 1.2 – Le due possibili vie di sintesi dell'IPP (Burlat *et al.*, 2004).

La biosintesi dei terpeni sembra essere caratterizzata da una precisa ed universale organizzazione a livello subcellulare: steroli, sesquiterpeni ed ubiquinoni, metaboliti essenziali come componenti delle membrane cellulari e per la respirazione

cellulare, sono sintetizzati assieme ai triterpeni nel citoplasma, nel mitocondrio e nel reticolo endoplasmatico, mentre monoterpeni, diterpeni e tetraterpeni sono sintetizzati nei plastidi (Eisenreich *et al.*, 2001; Rohmer *et al.*, 1999). Per la biosintesi di alcuni isoprenoidi, è stato documentato un “cross talk” metabolico tra i due pathway (Bick e Lange, 2003). Ad esempio, per il sesquiterpene  $\beta$ -caryophyllene prodotto nelle radici delle carote (Hampel *et al.*, 2005) e per il nerolidolo, sintetizzato nei fiori della bocca di leone (Duradeva *et al.*, 2005), è stata ipotizzata una biosintesi mista, che vede coinvolte entrambe le vie metaboliche.

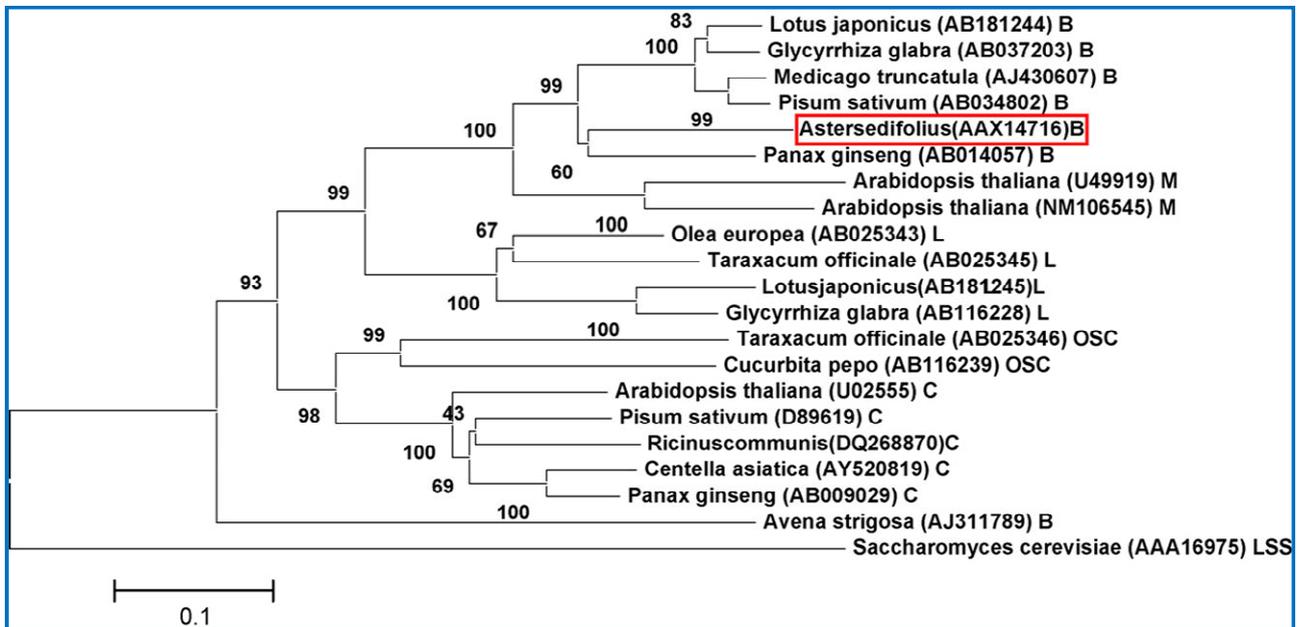
I triterpeni condividono con gli steroli un comune precursore: il 2,3-ossidosqualene. Il primo step nella sintesi dell'aglicone sia delle saponine triterpenoidiche che steroidiche coinvolge la ciclizzazione del 2,3 ossidosqualene da cui derivano differenti prodotti, tra i quali lupeolo,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina (Fig . 1.3).



**Fig. 1.3** – Ciclizzazione del 2,3-ossidosqualene in cicloartenolo, lupeolo,  $\beta$ -amirina e  $\alpha$ -amirina. (Sawai *et al.*, 2006).

Le ossidosqualene ciclasi (OSC) che catalizzano questa ciclizzazione costituiscono un'ampia famiglia enzimatica piuttosto eterogenea: infatti, alcuni enzimi sono altamente specifici per il prodotto che essi generano (es. la  $\beta$ -amirina sintasi del *Panax ginseng*) laddove altri sono multifunzionali e formano un numero vario di prodotti differenti (Haralampidis *et al.*, 2002). Diversi esperimenti di mutagenesi dimostrano che piccoli cambiamenti nella sequenza delle OSC determinano la formazione di prodotti differenti (Segura *et al.*, 2003). Recentemente sono stati isolati più di 30 geni codificanti OSC (Phillips *et al.*, 2006); in particolare sono stati caratterizzati quelli della  $\beta$ -amirina sintasi in diverse specie vegetali come: *Panax ginseng* (Kushiro *et al.*, 1998), *Pisum sativum* (Morita *et al.*, 2000), *Glycyrrhiza glabra* (Hayashi *et al.*, 2001), *Avena strigosa* (Haralampidis *et al.*, 2001), *Medicago truncatula* e *Lotus japonicus* (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2003), *Betula platyphylla* (Zhang *et al.*, 2003), *Euphorbia tirucalli* (Kajikawa *et al.*, 2005) e *Saponaria vaccaria* (Meesapyodsuk *et al.*, 2007). Nella pianta modello *Arabidopsis thaliana* sono state isolate 16 OSC che al momento formano il gruppo più numeroso e più diversificato anche rispetto alle specie della famiglia delle Euphorbiaceae e delle Leguminosae che sono rinomate per la produzione dei triterpeni (Lodeiro *et al.*, 2007). Per molti anni la struttura delle OSC è stata poco conosciuta; infatti, la ridotta quantità di queste proteine nella pianta ha creato difficoltà nella purificazione e nella produzione di anticorpi. Attualmente, le informazioni relative alla sequenza amminoacidica di molte OSC sono dedotte dalla sequenza nucleotidica. La dimensione dedotta di questi enzimi si aggira su 85 kDa, ma la caratterizzazione proteica mostra che gli enzimi purificati hanno spesso dimensioni più piccole. Le sequenze generalmente più lunghe di 2000 nucleotidi codificano per proteine di oltre 700 amminoacidi. Le omologie tra le sequenze nucleotidiche delle OSC disponibili in banca dati rivelano basse identità e questo rende necessario ricorrere a primer degenerati per realizzare una strategia di isolamento genico basata sull'impiego della Nested-PCR e della RACE. Tramite questa strategia, presso il gruppo di ricerca dove si è svolta la tesi di dottorato, è stato isolato in *A. sedifolius* il gene di una nuova

triterpene ciclasi, denominato *AsOXAI* (Cammareri *et al.*, 2008), appartenente alla classe delle  $\beta$ -amirina sintasi, che rappresenta l'enzima chiave del pathway biosintetico delle saponine triterpenoidiche (Fig. 1.4).



**Fig. 1.4** – Relazioni filogenetiche delle OSC. La funzione catalitica è indicata dalle lettere: B =  $\beta$ -amirina sintasi, M = triterpene sintasi multifunzionle, L = lupeolo sintasi, OSC = ossiidosqualene sintasi, C = cicloartenolo sintasi e LSS = lanosterolo sintasi. (Cammareri *et al.*, 2008).

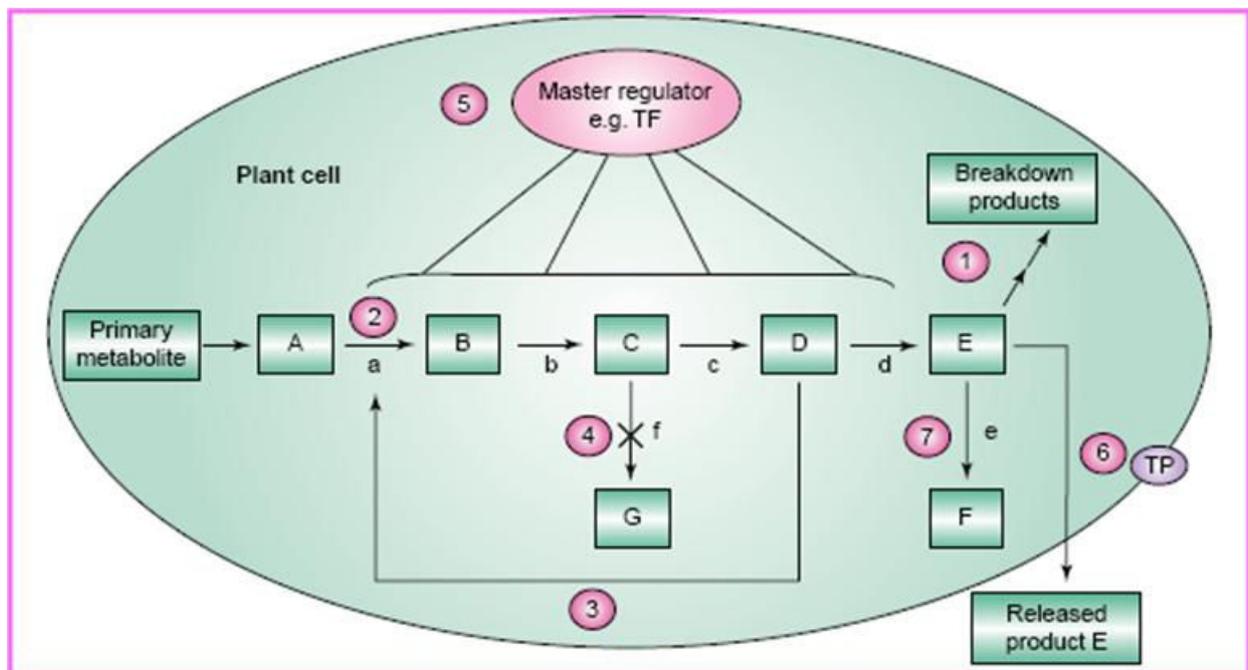
### 1.3 Strategie per aumentare la produzione di metaboliti vegetali

A causa della loro complessità strutturale e dei numerosi step biosintetici, per molti metaboliti di interesse non è possibile ottenere produzioni su larga scala, come richiesto dall'industria farmaceutica, alimentare e chimica. A tutt'oggi, la maggior parte di metaboliti secondari bioattivi è prodotta attraverso tecniche di estrazione partendo da matrici vegetali. Tuttavia, esiste il problema che i composti bioattivi sono generalmente presenti solo in basse percentuali rispetto al peso totale della pianta, e che le piante d'interesse sono spesso endemiche di regioni inaccessibili dal punto di vista geografico e/o politico. Un altro problema è rappresentato dai danni all'ecosistema, in quanto, in alcuni casi, il rinnovato interesse per i metaboliti secondari sta causando il depauperamento delle specie vegetali che li producono. E' necessario, quindi, individuare sorgenti e/o metodi alternativi che consentano di adeguare la produzione dei metaboliti alle richieste di commercializzazione. Per questo motivo, in un contesto industriale bisogna diversificare la fonte naturale da cui ricavare, mediante processi biotecnologici, i principi attivi, garantendo anche la costanza nell'approvvigionamento e la riduzione dei costi con il conseguente aumento della competizione sul mercato. Quindi, spesso strategie basate sulle biotecnologie associate ai metodi chimici rappresentano il prerequisito necessario per la produzione dei metaboliti secondari. A tal proposito, diversi sistemi biotecnologici sono stati proposti per incrementare la produzione di metaboliti secondari di interesse. I sistemi attualmente più utilizzati, in quanto rappresentano alternative eco-sostenibili di produzione di composti naturali biologicamente attivi, si basano sull'allestimento di colture *in vitro* di cellule, tessuti e piante intere che rappresentano un sistema di produzione standardizzato e completamente controllabile, a differenza della coltivazione in pieno campo, dove il materiale può subire fluttuazioni sia qualitative che quantitative del metabolismo secondario dovute a cambiamenti climatici o attacchi di patogeni. Ad esempio, sono state allestite sospensioni cellulari da numerose specie medicinali, tra cui *Catharantus* (Scragg, 1999) e *Taxus* (Brincat, 2002). Nonostante i triterpeni siano prodotti per la maggior parte da fonti naturali, la

loro resa è bassa: infatti, generalmente rappresentano meno del 2-3% del peso secco totale (Roberts, 2007). Per garantire una maggiore produzione si è fatto ricorso alle colture cellulari di cui ci sono diversi esempi per la produzione di numerosi terpeni e composti da loro derivati, soprattutto per sostanze di interesse farmaceutico come i terpeni indolici (TIA) da *Catharanthus roseus* (Pasquali *et al.*, 2006), i derivati del taxolo da *Taxus* (Frense, 2007) e l'artemisina da *Artemisia annua* (Liu *et al.*, 2006). Alle colture *in vitro* si è associato l'impiego di elicitori, molecole che stimolano le risposte di difesa delle piante (Hahn, 1996), come l'acido salicilico, l'acido jasmonico o il metil jasmonato (El-Sayed e Verpoorte, 2002). Per esempio, Lee *et al.* (2004) hanno dimostrato come il trattamento con il metiljasmonato delle radici avventizie di *Panax ginseng*, induce l'attivazione dei trascritti di geni chiave per la biosintesi di triterpeni e un aumento del contenuto di saponine triterpenoidiche.

Sempre allo scopo di incrementare la produzione dei metaboliti interessanti, è recente l'applicazione di strategie di ingegneria genetico-metabolica (Morandini e Salamini, 2003). Infatti, grazie allo sviluppo di tecniche di trasformazione genetica delle piante sempre più efficienti e delle conoscenze di base dei meccanismi che regolano la sintesi e l'accumulo nelle cellule dei metaboliti, è stato possibile utilizzare piante intere non solo per la sintesi di prodotti vegetali (metaboliti bioattivi), ma anche di molecole esogene di interesse farmaceutico (proteine, anticorpi, vaccini) e industriale. I vantaggi che questo sistema offre sono numerosi, tra cui costi di produzione più bassi rispetto ai sistemi basati sull'uso di fermentatori o bioreattori, perché le piante hanno un'elevata produzione di biomassa e non richiedono tecnologie molto sofisticate (Daniell, 2001). La trasformazione mediante *Agrobacterium tumefaciens* viene preferita grazie alla sua semplicità ed efficienza nel determinare un'integrazione stabile del DNA da trasferire nel genoma vegetale (Korocho *et al.*, 2002). La realizzazione degli interventi di ingegneria genetico-metabolica è stata resa possibile anche per lo sviluppo delle tecnologie molecolari che hanno consentito, oltre all'isolamento ed alla caratterizzazione di geni codificanti per enzimi chiave dei pathway biosintetici, di attivare o inattivare il pathway

metabolico di interesse. Un aumento delle attività enzimatiche in un pathway metabolico può essere ottenuto agendo sui fattori di trascrizione che regolano i geni codificanti gli enzimi in maniera positiva o negativa (Della Penna, 2001). L'inattivazione del pathway metabolico, invece, può avvenire mediante la mutagenesi inserzionale (Reintanz *et al.*, 2001), la co-soppressione (Abbott *et al.*, 2002) o la regolazione antisenso (Jobling *et al.*, 2002) (Fig. 1.5).



**Fig. 1.5** – Ipotetica via biosintetica di un metabolita secondario E. I geni a-d sono coinvolti nella biosintesi del metabolita di interesse E. Il gene e è coinvolto nel metabolismo di un ulteriore composto F. La funzione del gene può essere bloccata usando tecniche antisenso. TF sono i fattori di trascrizione con il ruolo principale di regolazione. TP è un trasportatore proteico che è coinvolto nel trasporto di E dall'interno della cellula vegetale allo spazio extracellulare (Oksman-Caldentey e Inzè, 2004).

Molti sono gli esempi in cui mediante manipolazione genica è stato possibile aumentare o diminuire l'attività di enzimi specifici. I pathway biosintetici degli isoprenoidi (flavonoidi, antocianine, caroteni, terpeni) sono stati il primo target dell'ingegneria genetica. In pomodoro, l'overespressione del gene calcione isomerasi (CHI) di petunia, il primo enzima del pathway dei flavonoidi, ha incrementato di 78 volte il livello di flavonoidi nell'epidermide dei frutti (Verpoorte e Memelink, 2002). Trasferendo il gene che codifica per una chetolasi  $\beta$ -carotene da un alga (*Haematococcus pluvialis*) in tabacco si è ottenuta la produzione di astaxantina nei fiori con variazione del colore da giallo a rosso (Mann *et al.*, 2000). Usando tecniche di ingegneria metabolica è stata ottenuta la sintesi di  $\beta$ -carotene nell'endosperma di riso (Ye *et al.*, 2000) e in pomodoro (Roemer *et al.*, 2000). Enzimi coinvolti nella via biosintetica degli alcaloidi indolici, vincristina e vinblastina, sono stati sovraespressi in tabacco (Leech *et al.*, 1998). E' nota la possibilità di incrementare ed alterare la composizione degli olii essenziali delle piante intervenendo sul pathway metabolico dei monoterpeni (Mahmoud e Croteau, 2001), ed inoltre gli interventi di ingegneria metabolica hanno consentito di aumentare la concentrazione dei composti volatili responsabili dei meccanismi di difesa delle piante, del profumo, dell'aroma e della qualità dei fiori e dei frutti (Duradeva e Pichersky, 2008).

La complessità dei "network" metabolici da un lato e le scarse conoscenze dei singoli step e della loro regolazione dall'altro, rendono, talvolta, poco prevedibili i risultati degli interventi dell'ingegneria metabolica. L'overespressione di un gene codificante un enzima chiave può non portare ad un aumento del prodotto, ma solo ad un aumento di espressione del gene stesso, oppure si può assistere alla produzione di composti assolutamente nuovi. Un esempio a riguardo è rappresentato dall'overespressione in tabacco dell'idrossimetilglutaril CoA (HMG CoA) reductasi, un gene coinvolto nel pathway degli isoprenoidi, che determina una iperproduzione di steroli con conseguente dannoso accumulo dei lipidi nel citoplasma (Schaller *et al.*, 1995). L'ingegneria metabolica richiede la formulazione di modelli che siano in grado di predire il comportamento dei "network" metabolici in termini di flusso e

concentrazione di metaboliti. L'Analisi del Controllo Metabolico (ACM) ha lo scopo, descrivendo i pathway metabolici e il loro comportamento, di suggerire gli interventi di ingegneria metabolica che possono avere successo per un determinato scopo (Morandini e Salamini, 2003). Infatti, la quantità di un prodotto finale di un pathway dipende in genere da molti enzimi, per cui il prodotto non aumenta in maniera comparabile con l'incremento dell'attività di un solo enzima (Morandini e Salamini, 2003). Per esempio, Takahashi *et al.* (2001) aumentarono la quantità dell'enzima nicotianamina aminotransferasi (un enzima richiesto per la biosintesi dei fitosiderofori) di 60 volte ma ottennero un incremento modesto del flusso metabolico (1,8 volte). In *Brassica napus*, invece, il contenuto di carotenoidi aumentò di 50 volte sovraesprimendo l'enzima fitoene sintasi (Shewmaker *et al.*, 1999). Quindi la possibilità di intervenire con manipolazioni genetiche è legata alla conoscenza dei pathway metabolici e alla possibilità di isolare i geni che codificano gli enzimi chiave e i fattori di trascrizione. Comunque, gli approcci di manipolazione dell'espressione genica nel pathway metabolico, anche se non determinano incremento dei prodotti finali, contribuiscono alla comprensione dei processi biosintetici delle sostanze d'interesse e della regolazione (Roberts, 2007).

Le potenzialità dell'ingegneria metabolica aumenteranno con i risultati delle analisi del genoma, del trascrittoma e, soprattutto, del metaboloma (Sweetlove e Fernie, 2005) sebbene questi siano ancora limitati a poche specie vegetali. Il profilo metabolico è determinato dall'interconnessione di diversi processi. Infatti, i cambiamenti nell'attività e nei livelli di espressione genica, possono comportare modifiche nell'attività e nei livelli di concentrazione delle proteine con conseguente alterazione nel pattern e/o nella concentrazione dei metaboliti. Quest'ultimi possono esser visti come i prodotti finali dell'espressione genica e dell'attività enzimatica; pertanto la loro analisi qualitativa e quantitativa permette di definire il fenotipo biochimico di un sistema biologico integrale e di assegnare ad un gene la propria funzione (Goodacre *et al.*, 2004). Poiché una singola tecnica analitica non permette una sufficiente visualizzazione del metaboloma, tecnologie multiple sono necessarie

per ottenere una visione globale della complessità chimica del metaboloma di una pianta. A tale scopo molte tecniche analitiche trovano applicazione, tra cui i metodi basati sulla risonanza magnetica nucleare (NMR), cromatografia su strato sottile (TLC), cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC), cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC/MS). La scelta di una metodica piuttosto che un'altra è un compromesso tra velocità, selettività e sensibilità (Fig. 1.6).

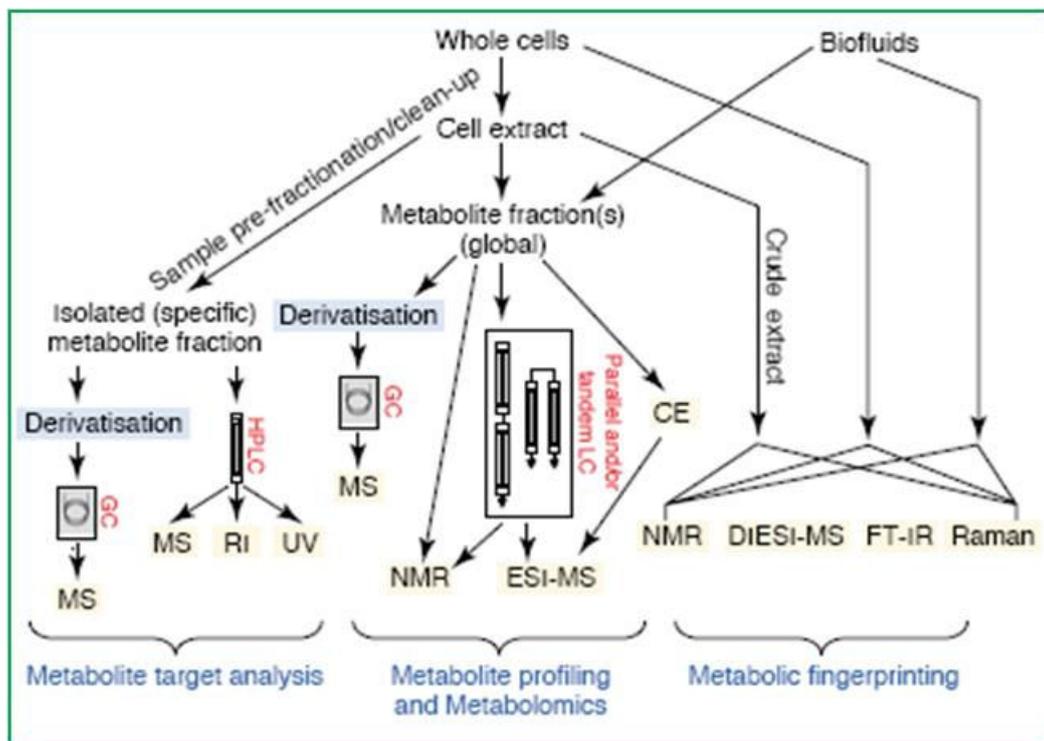


Fig. 1.6 – Principali strategie per l'analisi del metaboloma (Goodacre *et al.*, 2004).

Tecniche come l’NMR sono rapide e selettive, ma relativamente poco sensibili. Altre metodiche, come LC/MS offrono una buona selettività e sensibilità, ma in tempi di analisi relativamente più lunghi; tuttavia LC/MS insieme a GC/MS è la metodica più largamente usata e più potente per individuare composti a basso peso molecolare. Si basano, infatti, sulla separazione cromatografica, seguita dall’individuazione delle molecole nelle frazioni mediante spettrometria di massa (Goodacre *et al.*, 2004). Le analisi dei metaboliti sono state anche utilizzate a scopi tassonomici essendo in grado di differenziare specie, genotipi o ecotipi diversi mediante la valutazione del livello dei metaboliti che produce o meno un fenotipo visibile (Raamsdonk *et al.*, 2001; Roessner *et al.*, 2001), oppure a scopi biochimici per lo sviluppo di processi di maturazione del frutto (Aharoni *et al.*, 2002). E’ possibile, inoltre, monitorare il comportamento di specifiche classi di metaboliti in relazione all’applicazione di stimoli esterni chimici e/o fisici, paragonare il contenuto metabolico di mutanti e di piante transgeniche con piante “wild-type” allo scopo di decifrare la causa biochimica o la relazione tra fenotipo osservato e mutazioni genetiche (Boyes *et al.*, 2001).

## 1.4 Scopi e contenuti della tesi

Il progetto della presente tesi di dottorato si è proposto di verificare la possibilità di impiegare le saponine triterpenoidiche estratte dall'*Aster* come biopesticidi e di definire una strategia genetica idonea a migliorare la produzione di triterpeni intervenendo nel pathway di sintesi delle saponine a livello dell'enzima OSC che catalizza la produzione della porzione agliconica.

Per quanto riguarda il primo aspetto, le indagini effettuate hanno avuto lo scopo di verificare l'attività biocida di farine di *Aster* spp. nei confronti di insetti e nematodi oltre che valutare la tossicità delle saponine presenti in *A. sedifolius*. Presso il gruppo di ricerca dove si è svolta la tesi di dottorato erano state identificate tre nuove saponine triterpenoidiche, Astersedifolioside A-C, nella specie *Aster sedifolius* (Corea *et al.*, 2004). Saggi con queste saponine avevano mostrato un'inibizione della crescita di funghi fitopatogeni tellurici e del batterio *Xanthomonas campestris* (Cammарeri *et al.*, 2003). In questa tesi sono stati eseguiti saggi di attività biologica con le farine di foglia e radice da *A. sedifolius* e *A. caucasicus* nei confronti del *Tenebrio molitor*, in collaborazione con il Dott. De Cristofaro (Università del Molise), e nei confronti del nematode galligeno *Meloidogyne javanica*, in collaborazione con il Dott. Di Vito (CNR-IPP, Bari). Sono state eseguite sui topi valutazioni tossicologiche *in vitro* ed *in vivo* con gli estratti grezzi ottenuti da foglia di *A. sedifolius* in collaborazione con la Dott.ssa Borrelli (Università di Napoli Federico II).

Per quanto riguarda la strategia di ingegneria genetica, l'attività svolta in questa tesi si è basata sulla sovraespressione del gene *AsOX1* (GenBank AY836006) precedentemente isolato in *A. sedifolius*, la cui funzione dedotta da analisi bioinformatiche è quella di una  $\beta$ -amirina sintasi. Durante lo svolgimento del dottorato, è stata dimostrata mediante la trasformazione del lievito *Saccharomyces cerevisiae*, la funzione di *AsOX1* come  $\beta$ -amirina sintasi, enzima chiave del pathway biosintetico dei triterpeni. Inoltre, sono state realizzate le trasformazioni

genetiche tramite *A. tumefaciens* di *Aster caucasicus*, di *Medicago truncatula* e *Arabidopsis thaliana* per trasferire il gene *AsOXAI* sotto il controllo del promotore CaMV35S. I motivi dell'utilizzazione di queste tre specie sono i seguenti: *A. caucasicus* è una specie affine all'*A. sedifolius*, che risponde meglio di quest'ultima alle manipolazioni *in vitro* e che produce sostanze biologicamente attive contro il fungo *Botrytis cinerea*; la *Medicago truncatula* e l'*Arabidopsis thaliana* sono specie modello che producono, rispettivamente, saponine triterpenoidiche e triterpeni. La trasformazione genetica di *M. truncatula* è stata effettuata in collaborazione con il Dott. Confalonieri (CRA, Istituto Sperimentale delle Colture Foraggere, Lodi), mentre la trasformazione di *A. thaliana* è stata realizzata presso il Dept. of Horticulture and Landscape Architecture della Purdue University (U.S.A.) dove la dottoranda ha svolto un breve stage. Sul materiale transgenico sono state condotte le analisi molecolari per confermare l'introggressione a livello genomico e l'espressione di *AsOXAI*, nonché le analisi biochimiche che sono state eseguite in collaborazione con il Dott. Tava (CRA, Istituto Sperimentale delle Colture Foraggere, Lodi) su *M. truncatula* e in collaborazione con la Prof.ssa De Tommasi presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche (Università degli Studi di Salerno) dove la dottoranda ha trascorso alcuni mesi su *A. caucasicus*.

I risultati conseguiti con la presente tesi di dottorato indicano la possibilità di individuare in *Aster* molecole con attività biocida da utilizzare in ambito agrochimico e che esiste la possibilità tramite ingegneria genetica di indurre modifiche nel pathway di sintesi dei triterpeni.

## 2. MATERIALE E METODI

### 2.1 Materiale vegetale

Per saggiare l'attività biologica dei metaboliti di *Aster sedifolius* nei confronti di insetti e nematodi sono state adoperate piante adulte dell'accessione 151 proveniente dall'Orto Botanico di Stuttgart (Germania). Dalle piante allevate in vasi (Ø 40 cm) in pien'aria sono state prelevate foglie e radici in primavera nella fase della massima crescita vegetativa per ottenere macinati ed estratti contenenti saponine.

Per effettuare la trasformazione genetica sono stati utilizzati diversi materiali:

1. piante di *Aster caucasicus*, accessione 81 dell'Orto Botanico di Bayreuth (Germania), allevate sia in pien'aria che in serra ed *in vitro* in camera di crescita a 24°C (luce/buio 14/10 ore);
2. piante di *Medicago truncatula* Gaertn., cv. Jemalong (R108);
3. piante di *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0).

### 2.2 Estrazione della frazione di saponine

Il materiale fresco proveniente dalle parti aeree (1.22 Kg) e ipogee (0.91 Kg) di *Aster sedifolius* è stato separatamente essiccato in stufa a condizioni di temperatura controllate (30°C). Presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche (DIFARMA), Università degli Studi di Salerno, il materiale essiccato, rispettivamente 150g di foglie e 220g di radici, è stato sottoposto ad estrazione esauriente con *n*-esano ed etanolo 85% (Carlo Erba) ripetendo ciascuna estrazione per tre volte con 1L di solvente. L'estratto etanolicco è stato ripartito tra AcOEt, *n*-BuOH e H<sub>2</sub>O. I pesi dei diversi residui ottenuti per completa evaporazione del solvente sono riportati in Tabella 2.1. L'estratto *n*-BuOH è stato sottoposto a cromatografia mediante Solid Phase Extraction (SPE) su colonna LiChroprep C-18 (40-63 µm) usando un sistema di gradiente H<sub>2</sub>O/MeOH da MeOH 5% al 100%. Le frazioni eluite sono state

analizzate mediante Thin Layer Chromatography (TLC) utilizzando come sistema eluente BAW (*n*-BuOH-AcOEt-H<sub>2</sub>O 60:15:25) e riunite sulla base dell'omogeneità cromatografica. Quelle che presentavano lo stesso profilo cromatografico sono state analizzate mediante LC/MS allo scopo di confermare la presenza degli Astersedifoliosidi come riportato in Corea *et al.*, 2004.

**Tabella 2.1** – Pesì dei residui ottenuti dagli estratti delle foglie e delle radici di *Aster sedifolius*

<b>Estratti</b>	<b>FOGLIE</b>	<b>RADICI</b>
<i>n</i> -esano	1.87 g	1.14 g
EtOH 85%	17.5 g	10.73 g
AcOEt	1.24 g	1.21 g
<i>n</i> -BuOH	2.27 g	2.48 g
H <sub>2</sub> O	4.16 g	2.86 g

Le foglie (525g peso fresco) e le radici (303g peso fresco) di *Aster caucasicus* sono state sottoposte ad estrazione secondo lo stesso procedimento descritto in precedenza, dopo essiccamento in stufa a 30°C ottenendo rispettivamente 64.5g e 72.8g . I residui delle relative estrazioni, ottenuti per completa evaporazione del solvente sono riportati in Tabella 2.2. Le frazioni ottenute sono state analizzate mediante HPLC-DAD, LC/MS ed NMR.

**Tabella 2.2** – Pesì dei residui ottenuti dagli estratti delle foglie e delle radici di *Aster caucasicus*

<b>Estratti</b>	<b>FOGLIE</b>	<b>RADICI</b>
<i>n</i> -esano	1.6 g	1.4 g
EtOH 85%	12.8 g	5,6g
AcOEt	1.7 g	0.8 g
<i>n</i> -BuOH	1.5 g	1.5 g
H <sub>2</sub> O	3.5 g	2.6 g

### Metodi cromatografici: HPLC-DAD

L'analisi HPLC-DAD è stata condotta usando una colonna analitica Waters C<sub>18</sub> µ-Bondapak (300 x 3.9 mm), a temperatura ambiente. E' stata utilizzata come fase eluente un sistema gradiente: solvente A = H<sub>2</sub>O acidificata con acido acetico allo 0.4%; solvente B = acetonitrile; 0-16 min., 0-11% B; 16-28 min., 16% B; 28-50 min., 30% B; 50-70 min., 90% B. Il flusso è stato mantenuto a 1 ml/min e l'assorbanza misurata a 330 nm. Sono stati iniettati 20 µl (1mg/20 µl). Le analisi HPLC-DAD (Diode Array Detector), sono state realizzate utilizzando un cromatografo Agilent 1100 Series, prodotto dalla Agilent Technologies, costituito da una pompa binaria (G-1312), un iniettore Rheodyne (G-1328A), un degasatore (G-1322A) ed un rilevatore a serie di diodi (G-1315A), equipaggiato con software HP-9000.

### Metodi chimico-fisici: Spettrometri di massa

Per l'analisi LC-MS ed LC-MS/MS è stato utilizzato lo spettrometro di massa, collegato con un sistema HPLC, Spectra System HPLC, (Thermo Finnigan, San José, CA, USA), caratterizzato da degasatore, un auto campionatore, (Spectra System AS 3000) ed un rilevatore PDA (Spectra UV 6000 LP). La colonna cromatografica utilizzata per l'analisi LC-MS è stata: C<sub>18</sub> LUNA PHENOMENEX (150 x 2.2 mm) da 5 µm. L'eluato proveniente dal LC è stato separato da uno "splitter" in modo tale che solo 0.3 ml/min sono stati indirizzati verso lo spettro di massa costituito da una pompa quaternaria con miscelatore ad alta pressione (Surveyor LC), un degasatore, un auto campionatore (Surveyor AS). Le analisi LC-MS sono state condotte utilizzando uno spettrometro a sorgente electrospray (ES-MS); in questo tipo di tecnica (Chait e Kent 1992) i campioni vengono ionizzati a pressione atmosferica, direttamente a partire da una soluzione diluita (1-0.1 nmol/ml). Il campione da analizzare sciolto in una soluzione acquosa costituita per il 50% da solvente organico

(acetonitrile, metanolo ed isopropanolo i più utilizzati), viene indotto attraverso un capillare di silice nella sorgente, dove incontra un flusso di gas parallelo al suo moto ed una differenza di potenziale di alcune migliaia di volt (3500-5000 V). Ciò comporta la formazione di uno spray microdisperso, nel quale ogni goccia è costituita da una molecola ionizzata, circondato da molecole di solvente. Il campione viene poi sottoposto a desolvatazione, ciò porta alla formazione di ioni liberi che vengono diretti all'analizzatore. Gli spettri di massa sono stati registrati sia in modalità ioni positivi che ioni negativi per mezzo di uno strumento Finnigan LCQ Deca ion trap, con sorgente electrospray, prodotto dalla Thermo Finnigan (San José, CA, USA), software Exalibur per l'elaborazione dei dati acquisiti. I composti puri sono stati analizzati per infusione diretta al flusso di 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ , utilizzando i seguenti parametri strumentali: temperatura capillare 288.20  $^{\circ}\text{C}$ ; Shean Gas Flow 45.95 psi; flusso del gas ausiliare 2.8 psi; voltaggio del capillare -25.54 v. I dati sono stati acquisiti sia attraverso scansione MS1 che attraverso MS/MS, facendo uso della trappola ionica; per la determinazione delle MS2 è stata utilizzata una energia di collisione pari a 30 Ev.

### Spettri di Risonanza Magnetica Nucleare

Per la registrazione degli Spettri di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR), uno spettro Bruker DXR 600 (software UxnMR), operante a 599.19 MHz per  $^1\text{H}$  e 150.86 MHz per  $^{13}\text{C}$  è stato utilizzato per registrare gli spettri NMR. Negli spettri  $^1\text{H}$ -NMR in  $\text{CD}_3\text{OD}$  è stato usato come standard il segnale relativo al  $\text{CHD}_2\text{OD}$  a 3.34 ppm; per la misurazione in  $\text{CDCl}_3$  è stato usato il segnale relativo al  $\text{CHCl}_3$  a 7.27 ppm. I valori  $^1\text{H}$ -NMR sono riportati in  $\delta$  per ppm, assieme alla molteplicità, ai valori delle costanti di accoppiamento.

Per gli spettri  $^{13}\text{C}$ -NMR è stato usato come riferimento il segnale del solvente, rispettivamente a 49.0 ppm per il  $\text{CD}_3\text{OD}$  e 77.0 per il  $\text{CDCl}_3$ .

### 2.3 Saggio di attività nei confronti di insetti e nematodi

In collaborazione con il Dott. De Cristofaro (Dipartimento di Scienze Animali, Vegetali e dell'Ambiente, Università del Molise) sono stati eseguiti saggi di attività biologica con macinati di foglia e radice di *A. sedifolius* e di *A. caucasicus* nei confronti del *Tenebrio molitor* L. (*Coleoptera, Tenebrionidae*). Sono state raccolte le foglie e le radici da entrambe le specie e il materiale è stato separatamente essiccato in stufa a 30°C e successivamente ridotto in farina. Le farine sono state mescolate allo 0,1-1-10% con il substrato fornito *ad libitum* per l'allevamento del *T. molitor* e sono stati valutati gli effetti sullo sviluppo del *T. molitor* mediante un biosaggio condotto in condizioni di "non scelta". Sono state effettuate tre repliche di 100 larve ciascuna per ogni concentrazione e per il controllo (dieta senza farine di *Aster*) allevando le larve in cella climatica alle seguenti condizioni: 25±2°C; 60±5% U.R.; 12:12 h di luce/buio. Sono stati rilevati i dati relativi alla mortalità e al peso delle larve e delle pupe ottenute.

In collaborazione con il Dott. Di Vito (CNR-IPP, Bari) sono state eseguite prove sperimentali *in vivo* e *in vitro* per saggiare l'attività biologica di *A. sedifolius* e di *A. caucasicus* nei confronti del nematode galligeno *Meloidogyne javanica*. Per valutare la reazione di *A. sedifolius* e *A. caucasicus* agli attacchi di *M. javanica* sono state adoperate per ogni specie 10 plantule allevate in vasi di argilla di 350 ml di volume riempiti di sabbia sterilizzata a vapore fluente per 6 ore contemporaneamente inoculate con 10.000 larve di *M. javanica* insieme a 10 piante di pomodoro cv Rutgers come controllo positivo. L'esperimento è stato effettuato in una serra a 26 ±3°C. Il piano sperimentale ha previsto tre trattamenti e dieci ripetizioni. La prova è durata 40 giorni e alla fine è stato rilevato l'indice delle galle e delle masse d'uova sulle radici stabilito come segue: 0 = nessuna galla e/o masse d'uova, 1 = 1-2 galle e/o masse d'uova, 2 = 3-10, 3 = 11-30, 4 = 31-100 e 5 = > 100 galle e/o masse d'uova. Per saggiare l'attività delle farine di foglie e di radice ottenute sia da *A. sedifolius* che da *A. caucasicus* sono stati adoperati 50 vasetti di argilla di 100 ml di volume riempiti di sabbia sterilizzata a vapore fluente per 6 ore. A ciascun vasetto è

stato mescolato 0.5 o 1 g delle farine. Come controllo 10 vasi non hanno subito nessun trattamento con le farine e di questi soltanto 5 sono stati inoculati con il nematode. Ogni vasetto è stato trapiantato con una plantula di pomodoro cv Rutgers e contemporaneamente inoculato con 10.000 larve di *M. javanica*. I vasetti sono stati posti su un bancale in una serra a  $26\pm 3^{\circ}\text{C}$ . Il piano sperimentale ha previsto 10 trattamenti e 5 ripetizioni e la prova è durata 36 giorni. I rilievi a fine prova hanno riguardato: altezza, peso della parte aerea e delle radici del pomodoro, indice delle galle (0-5) e delle masse d'uova (0-5) sulle radici del pomodoro, numero di larve (II, III e IV età), numero di femmine e numero di uova sulle radici. Il saggio *in vitro* con le farine e la miscela delle saponine estratte da *A. sedifolius* come descritto nel paragrafo 2.2., è in corso di svolgimento.

#### **2.4 Saggi tossicologici *in vitro* ed *in vivo***

Con gli estratti grezzi ottenuti da foglie di *A. sedifolius* sono state eseguite in collaborazione con la Dott.ssa Borrelli (Dipartimento di Farmacologia Sperimentale, Università di Napoli Federico II) valutazioni tossicologiche *in vitro* ed *in vivo*. Gli studi *in vitro* hanno riguardato la funzionalità di organi quali stomaco, ileo, vescica e vaso deferente prelevati da topi maschi di ceppo Swiss, allevati in stabulario e alimentati con una dieta standard per un periodo di 6-7 giorni prima di essere sacrificati in atmosfera satura di anidride carbonica. In seguito al prelievo degli organi, è stata valutata la risposta delle contrazioni in presenza di concentrazioni cumulative (EFS) e non cumulative (acetilcolina) dell'estratto esanico, cloroformico, metanolico e cloroformio/metanolico (9:1) di *Aster sedifolius* (1-1000  $\mu\text{g/ml}$ ).

La valutazione della vitalità e della proliferazione di due linee cellulari quali Caco-2 (cellule di adenocarcinoma umano) e macrofagi peritoneali di topo è avvenuta mediante incubazione per 24 ore con i suddetti estratti, le frazioni isolate dall'estratto metanolico ed il principio attivo, Astersedifolioside C isolato, alle concentrazioni di 0,01-1000  $\mu\text{g/ml}$ . La valutazione della vitalità si basa sulla trasformazione del bromuro di 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT), sostanza di colore

giallo, in formazano, sostanza di colore viola. Le deidrogenasi mitocondriali delle cellule vive sono in grado di tagliare l'anello tetrazolico dell'MTT determinando la formazione di sali violacei insolubili in soluzione acquosa che sono dosati spettrofotometricamente a 490 nm. La proliferazione è stata valutata mediante il saggio del Neutral Red che si basa sulla capacità di assorbimento, da parte delle cellule vive e intatte del colorante NR (3-amino-7dimethyl-amino-2-methylphenazinehidrochloride). Dopo tre ore di incubazione con una soluzione di NR 50µg/ml, le cellule sono lisate con acido acetico e la soluzione rossa viene dosata spettrofotometricamente a 532 nm. Gli studi *in vivo* di tossicità acuta sono stati effettuati per determinare la dose letale 50 (DL<sub>50</sub>) ossia il dosaggio di una sostanza che in seguito ad una singola somministrazione causa la morte del 50% degli animali sottoposti alla sperimentazione, i sintomi indicativi di tossicità e il tempo necessario per la loro comparsa. La DL<sub>50</sub> è stata determinata somministrando per via intraperitoneale gli estratti n-esanico, metanolico e cloroformio/metanolico, alla dose di 50-1000 mg/kg. Al fine di valutare il potenziale effetto letale degli estratti o la semplice comparsa di effetti tossici, gli animali sono stati osservati nei tre giorni successivi alla somministrazione.

Negli studi *in vivo* di tossicità cronica, ai topi sono stati somministrati, per sette giorni consecutivi, gli estratti n-esanico, metanolico e cloroformio/metanolico alle dosi di 50-500 mg/kg per via orale. Come controllo positivo è stato utilizzato il rotenone, sostanza notoriamente tossica alla dose di 50 mg/kg per via orale. La tossicità cronica è stata determinata in base ai dati forniti dall'osservazione (giornaliera o periodica) di alcuni parametri: andamento della curva ponderale, consumo quotidiano di cibo, stato generale dell'animale (aspetto, stato del pelo, comportamento, tono muscolare, diametro pupillare, quantità ed aspetto delle urine, quantità e consistenza delle feci, ecc.), costanti emato-metaboliche (formula leucocitaria, Hb, glicemia, colesterolemia, ecc.) e mortalità. Al termine dello studio, gli animali sono stati sacrificati e sono stati eseguiti esami anatomio-patologici (macro e microscopici) dei principali organi (polmoni, reni, fegato, intestino, ecc.).

## 2.5 Trasformazione di *Saccharomyces cerevisiae*

Come riportato in Cammareri *et al.*, 2008 per confermare la funzione dedotta di  $\beta$ -amirina sintasi del gene *AsOXAI* (GenBank AY836006) è stata eseguita dal Dott. José Ignacio Ibeas (Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Spain) la trasformazione del lievito *S. cerevisiae*. Il cDNA di *AsOXAI* è stato clonato nel vettore di espressione pYES sotto il controllo del promotore GAL. La trasformazione batterica e la purificazione dei plasmidi sono state realizzate come descritto in Sambrook e Russell, 2001. Il vettore vuoto e quello contenente *AsOXAI* sono stati inseriti nel ceppo YNN295 di *S. cerevisiae* secondo il metodo LiAc/SSDNA/PEG riportato in Gietz *et al.*, 1995. La crescita è avvenuta a 30°C su substrato selettivo privo di uracile contenente come unica fonte di carbonio dapprima il glucosio e poi il galattosio per indurre l'espressione di *AsOXAI*.

Successivamente entrambi i trasformanti sono stati sottoposti dal Dott. Tava (CRA, Istituto Sperimentale delle Colture Foraggere, Lodi) ad analisi biochimiche GC e GC/MS per individuare la presenza di steroli e di triterpeni prima e dopo l'idrolisi acida dell'estratto di etilacetato ottenuto dal materiale liofilizzato.

## 2.6 Trasformazione dei ceppi di *Agrobacterium tumefaciens*

I ceppi EHA105 e GV3101 di *Agrobacterium tumefaciens* sono stati sottoposti a trasformazione mediante elettroporazione secondo il protocollo riportato da Cangelosi *et al.* (1991) con il vettore binario pGreen II 0029 ([www.pgreen.ac.uk](http://www.pgreen.ac.uk)) contenente il costrutto *CaMV35S::AsOXAI* (in seguito indicato *AsOXAI*) e, alternativamente, come controllo, solo il promotore *CaMV35S* (in seguito indicato *35S*).

Per la verifica dell'avvenuta trasformazione è stata eseguita PCR su colonia con Taq DNA polymerase (INVITROGEN, CA, USA) e i primer RT1 e RT2 che amplificano un frammento di 400 bp del gene *AsOXAI* o i primer 35S F e 35S R

specifici del promotore CaMV35S, le cui sequenze sono riportate in tabella 2.3. Sono state seguite le condizioni di reazione suggerite da INVITROGEN (CA, USA).

## 2.7 Ottenimento del materiale vegetale transgenico

I ceppi trasformati di *A. tumefaciens* sono stati utilizzati per la trasformazione genetica di *Aster caucasicus*, *Medicago truncatula* e *Arabidopsis thaliana*.

E' stato utilizzato il ceppo EHA105-AsOXA1 e -35S per mettere a punto la trasformazione genetica di *A. caucasicus*. Per produrre e selezionare i calli trasformati ottenuti da espunti fogliari è stato utilizzato il substrato solido MS<sub>30</sub>, basato sulla formulazione di Murashige e Skoog (1962), con aggiunta di saccarosio 30 g/L e Microagar (Duchefa) 4 g/L quale gelificante, con 2,4 acido diclorofenossiacetico (2,4D) (0,94 mg/L), 6-benzilaminopurina (BAP) (0,18 mg/L) e kanamicina (50 mg/L) tenendo il materiale in camera di crescita a 24°C con luce/buio di 14/10 ore. In dettaglio, la trasformazione effettuata su *A. caucasicus* prevede i seguenti step:

1. preparare l'inoculo del batterio con O.D. pari a 1-1,8 (max 2,0);
2. sezionare le foglie di *A. caucasicus* allevato *in vitro* ponendole successivamente su carta da filtro bagnata con acqua sterile;
3. porre gli espunti in capsula Petri a contatto con il batterio (10% in 20 ml acqua) agitando con movimenti circolari per 20 min;
4. trasferire gli espunti su MS<sub>30</sub> con la pagina superiore rivolta verso il basso a 28°C per 72h al buio;
5. trasferire gli espunti su MS<sub>30</sub> + Claforan (500 mg/L) + 2.4D (0.94 mg/L) + BAP (0.18 mg/L) + kanamicina (50 mg/L) a 24°C per 48h alla luce;
6. trasferire gli espunti su mezzo fresco ogni 2 giorni per almeno 2 settimane;
7. separare i calli dagli espunti e trasferirli ogni 2-3 settimane sul substrato selettivo sopra riportato;
8. ridurre gradualmente la concentrazione di Claforan fino alla completa eliminazione.

*M. truncatula* Gaertn. cv. Jemalong (R108) è stata trasformata utilizzando il ceppo EHA105-AsOXA1 di *A. tumefaciens*. Questa parte della ricerca è stata svolta in collaborazione con il Dott. Confalonieri (CRA, Istituto Sperimentale delle Colture Foraggere, Lodi) secondo quanto riportato da Neves *et al.* (2001).

La trasformazione di *A. thaliana* (Col-0), eseguita presso il laboratorio del Prof. R. Bressan (Purdue University, Indiana, USA), è avvenuta mediante il metodo denominato “spray-method” tramite il quale è stata effettuata la nebulizzazione sui bocci fiorali della sospensione in mezzo idoneo del ceppo GV3101-AsOXA1 e -35S di *A. tumefaciens* (Chung *et al.*, 2000). I semi ottenuti dalle piante sottoposte a trasformazione sono stati disposti su mezzo selettivo contenente Kanamicina. Per la sterilizzazione dei semi e la semina *in vitro* sul mezzo selettivo sono stati utilizzati i protocolli riportati in Weigel e Glazebrook (2002).

## **2.8 Analisi molecolari del materiale transgenico**

### Estrazione del DNA e reazione Polymerase Chain Reaction (PCR)

L'estrazione del DNA genomico dai calli di *A. caucasicus* e dal tessuto fogliare di *M. truncatula* e di *A. thaliana*, è stata effettuata utilizzando il “DNeasy Plant Mini Kit” (Quiagen, Hilden, Germany) seguendo il protocollo descritto dalla casa produttrice. La reazione PCR è stata allestita seguendo il protocollo suggerito relativamente alla Taq DNA polymerase (Invitrogen, CA, USA) utilizzando i primer RT1/RT2, specifici per il gene *AsOXA1*, i primer NPTII F /NPTII R per il gene *NptII* che conferisce resistenza alla kanamicina, e i primer 35S F/35S R specifici per il promotore CaMV35S (Tella 2.3). I prodotti di reazione sono stati separati e visualizzati su gel di agarosio all'1%.

**Tabella 2.3** - Elenco dei primer utilizzati negli esperimenti PCR in *Aster caucasicus*

Primer	Sequenza	T <sub>m</sub> (°C)
RT1	5'- GCC GGT GCA TGC TTT TGA AGT CAC CGG -3'	69.5
RT2	5'- ACC GAG CCT CTA TTA AAT CGT TGG CCG -3'	66.5
35S F	5'-ATT GAT ATC GTA CCC CTA CTC CAA AAA TG-3'	62.4
35S R	5'-AAG GGT TCC TTA TAT GCT CAA C-3'	54.7
NPTII F	5'- ACG TGC TAT TCG GCT ATG ACT GGG - 3'	64.4
NPTII R	5'- TCA GAA GAA CTC GTC AAG AAG GCG – 3'	62.7

#### Estrazione dell'RNA e analisi di espressione

L'RNA totale è stato estratto dai calli di *A. caucasicus* utilizzando l'“RNeasy Plant Mini Kit” (Quiagen, Hilden, Germany) secondo il protocollo consigliato. Per l'analisi di espressione è stato utilizzato il sistema “Superscript™ One-Step RT-PCR” (Invitrogen, CA, USA) allestendo una reazione di RT-PCR con i primer RT1/RT2 (Tabella 2.3).

I trasformanti di *M. truncatula* positivi per la presenza del gene *AsOX1* sono stati sottoposti a PCR Real Time per individuare differenze di espressione. Sono state analizzate tre repliche per ogni campione. Dal tessuto fogliare (100 mg) è stato estratto l'RNA totale mediante “RNeasy Mini Kit” (Qiagen, Hilden, Germany) e da 2 µg è stato sintetizzato il cDNA usando la SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, CA, USA). Per l'analisi Real Time è stato utilizzato il kit “SYBR® Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, UK). La reazione è stata allestita in “Optical tubes” con annessi “Optical caps” (Applied Biosystems, UK) in un volume finale di 25 µl, con 12,5 µl di SYBR® Green, 1,5 µl di 5 µM primer forward e reverse e 1 µl di cDNA. Il ciclo di amplificazione è stato impostato come suggerito dal software “ABI Prism 7000 Sequence Detection System” con temperatura di melting (T<sub>m</sub>) in funzione dei primer (Tabella 2.4). Sulla base delle informazioni

riportate in letteratura è stato scelto come controllo endogeno l'amplicone per l'actina (*Act11*). Sono stati disegnati i primer sia del gene *Act11* che di *AsOXA1* mediante il programma informatico "Primer Express" (Tabella 2.4). I dati sono stati analizzati con il software sopra citato, utilizzando *Act11* per normalizzare la quantità di mRNA del gene target, ed espressi mediante l'indice di Relative Quantity (RQ) che quantifica i livelli di trascritto.

**Tabella 2.4** - Elenco dei primer utilizzati per gli esperimenti Real Time in *Medicago truncatula*

Primer	Sequenza	T <sub>m</sub> (°C)
Act11 F	5'- GAA TTG CCT GAT GGA CAG GT -3'	58.2
Act11 R	5'- AAT CCA CAT CTG CTG GAA GG -3'	58.8
RTOXA1 F	5'- GGC ATG TGG TTG CAA AGG A -3'	56.7
RTOXA1 R	5'- CCA GCG ATT TAA TAG AGG CTC G -3'	60.3

## 2.9 Analisi chimiche del materiale transgenico

Allo scopo di confrontare il materiale transgenico sono stati sottoposti ad estrazione i calli provenienti da espianti fogliari di *A.caucasicus* e quelli trasformati con il ceppo EHA105-AsOXA1 denominato callo-AsOXA1. I calli sono stati precedentemente liofilizzati e polverizzati in mortaio (175 mg di callo controllo e 629 mg di callo-AsOXA1). Il metodo ha previsto un'estrazione esauriente in 100 ml di n-esano per 48 h e in 100 ml di etanolo 85% per 24 h ripetendo quest'ultima due volte. I residui, ottenuti per completa evaporazione del solvente, sono stati sciolti in metanolo e l'estratto etanolicò è stato ripartito tra AcOEt, *n*-BuOH e H<sub>2</sub>O. I pesi dei residui sono riportati in Tabella 2.5. La frazione solubile in *n*-BuOH è stata sottoposta a cromatografia SPE usando un sistema di gradiente H<sub>2</sub>O/MeOH da MeOH 5% al 100%. Le frazioni ottenute sono state analizzate mediante HPLC-DAD, LC/MS ed NMR secondo quanto riportato nel paragrafo 2.2.

**Tabella 2.5** – Pesi dei residui ottenuti dagli estratti del callo di *Aster caucasicus* e del callo-AsOXA1

<b>Estratti</b>	<b>Callo</b>	<b>Callo-ASOXA1</b>
<i>n</i> -esano	0.01 g	0.05 g
EtOH 85%	0.60 g	2.10 g
AcOEt	0.04 g	0.32 g
<i>n</i> -BuOH	0.10 g	0.30 g
H <sub>2</sub> O	0.33 g	1.04 g

In collaborazione con il Dott. Tava (CRA, Istituto Sperimentale delle Colture Foraggere, Lodi) sono state condotte le analisi chimiche delle principali saponine prodotte in foglia e radice delle linee transgeniche di *M. truncatula*. Il contenuto di saponine è stato rilevato mediante GC/MS considerando la quantità di sapogenine derivate dall'idrolisi delle saponine come descritto in Tava *et al.* (1993). Sono state analizzate tre repliche per ogni campione.

## **2.10 Analisi statistiche**

I dati ottenuti dal saggio di attività biologica con i macinati di foglia e radice di *A. sedifolius* nei confronti del *Tenebrio molitor* sono stati elaborati mediante analisi della varianza utilizzando il test di Tukey e, considerando significativo un valore per  $P \leq 0.05$ .

I risultati provenienti dal saggio dell'attività biologica di *A. sedifolius* e di *A. caucasicus* nei confronti del nematode *M. javanica* sono stati elaborati statisticamente con l'analisi della varianza ed è stata calcolata la differenza minima significativa (LSD).

Per le valutazioni tossicologiche *in vitro* ed *in vivo* è stato utilizzato il t-test di Student e l'analisi della varianza considerando statisticamente significativo un valore di  $P \leq 0.05$ .

I dati ottenuti dall'analisi di espressione mediante Real Time delle linee di *M. truncatula* trasformate con il gene *AsOXAI* e quelli ricavati dalle analisi chimiche per individuare il contenuto di saponine delle linee transgeniche di *M. truncatula* sono stati sottoposti ad analisi della varianza utilizzando il programma statistico SPSS.

L'analisi di segregazione delle progenie derivanti dai trasformanti di *A. thaliana* è stata elaborata mediante il test del  $\chi^2$ .

### 3. RISULTATI

#### 3.1 Attività biologica dei macinati di *Aster sedifolius* e *Aster caucasicus* nei confronti di insetti e nematodi

Nell'ambito della tesi di dottorato, saggi preliminari sono stati allestiti con foglie e radici essiccate e macinate di due specie di *Aster* per valutarne l'attività biologica nei confronti di insetti e nematodi. Da precedenti esperimenti era risultato che le tre principali saponine triterpenoidiche (Astersedifoliosidi A-C) isolate da *A. sedifolius* nella parte aerea e, ad una concentrazione dieci volte superiore, nelle radici, avevano inibito la crescita di alcuni funghi tellurici fitopatogeni e del batterio *Xanthomonas campestris* (cfr. Introduzione, par. 1.1).

I macinati provenienti da foglia e radice di *A. sedifolius* e di *A. caucasicus* sono stati saggiati nei confronti del *Tenebrio molitor* L. (*Coleoptera*, *Tenebrionidae*) in collaborazione con il Dott. De Cristofaro (Dipartimento di Scienze Animali, Vegetali e dell'Ambiente, Università del Molise). Oltre alla mortalità, sono stati considerati parametri associati allo sviluppo dell'insetto quali il peso delle larve e delle pupe ottenute. L'assenza di mortalità nei primi stadi larvali alle diverse concentrazioni utilizzate dimostra che nei macinati non vi sono sostanze in grado di determinare letalità. L'attività dei macinati di foglie e radici contro l'insetto diventa apprezzabile osservando lo sviluppo delle larve e il ciclo biologico completo del *T. molitor*. Infatti, sono state evidenziate significative riduzioni rispetto al controllo sia del peso delle larve, neonate e di II età, che del peso delle pupe, parametro quest'ultimo particolarmente importante in quanto direttamente correlato alla fertilità delle femmine. I risultati più significativi si sono avuti in seguito al trattamento con i macinati provenienti sia dalle foglie che dalle radici di *A. sedifolius* (Tabella 3.1) rispetto a quelli provenienti da *A. caucasicus* (dati non mostrati).

**Tabella 3.1** - Effetto dei macinati di foglie e radici di *A. sedifolius* (AS) sul peso delle larve di *Tenebrio molitor* dopo allevamento, in condizioni di non scelta per periodi variabili (0-80 gg), su substrati contenenti diverse percentuali (0.1, 1.0, 10%) di macinati.

Trattamento	0 gg	20 gg	40 gg	60 gg	80 gg
Controllo	3.4 ± 0.7	6.9 ± 1.2	17.7 ± 2.2	38.0 ± 4.1	65.9 ± 5.5
AS macinato di foglie 0.1%	3.2 ± 0.7	4.8 ± 1.7	13.2 ± 2.1*	15.7 ± 2.1**	25.8 ± 3.7**
AS macinato di radici 0.1%	3.2 ± 0.6	6.0 ± 1.4	12.2 ± 1.8*	24.3 ± 3.4*	41.0 ± 5.7*
AS macinato di foglie 1%	4.0 ± 0.8	7.5 ± 1.8	19.0 ± 3.2	21.5 ± 4.3*	25.0 ± 3.5**
AS macinato di radici 1%	4.1 ± 0.8	6.8 ± 1.1	10.0 ± 1.2*	16.7 ± 2.3**	18.7 ± 1.9***
AS macinato di foglie 10%	3.0 ± 0.7	7.5 ± 1.9	19.1 ± 2.7	41.7 ± 5.3	64.7 ± 6.1
AS macinato di radici 10%	3.0 ± 0.7	6.6 ± 1.5	15.9 ± 2.5*	38.0 ± 4.9	78.6 ± 8.2

I dati rappresentano il peso medio (mg±D.S.) delle larve (n=300/tesi). \* indicano differenze significative: \* P≤0,05; \*\* P≤0,01; \*\*\* P≤ 0,001.

Si è verificata infatti una riduzione del peso delle larve rispetto al controllo, dopo 40 giorni di alimentazione. E' possibile quindi ipotizzare che i composti presenti nei macinati interferiscano con l'assorbimento dei nutrienti in modo da influenzare il normale accrescimento del *T. molitor*.

I macinati provenienti da foglie e radici di *A. sedifolius* e *A. caucasicus* sono stati saggiati *in vivo* anche nei confronti del nematode galligeno *Meloidogyne javanica* in collaborazione con il Dott. Di Vito (CNR-IPP, Bari). Preliminarmente entrambe le specie *A. sedifolius* e *A. caucasicus* sono state inoculate con *M. javanica* ma né galle né masse d'uova sono state riscontrate sulle radici. Successivamente è stato effettuato il saggio su piante di pomodoro (cv Rutgers) inoculate con *M. javanica* mescolando nel substrato i macinati di foglie e di radici delle due specie di *Aster* e rilevando i dati relativi all'altezza, al peso della parte aerea e delle radici, e su quest'ultime alla presenza di galle e di masse d'uova nonché il numero di larve a diversi stadi, di femmine adulte e di uova. L'aspetto delle piante di pomodoro non

era diverso dal controllo per quanto riguarda il peso e l'altezza della parte aerea (dati non mostrati) ed il peso delle radici (Tabella 3.2).

**Tabella 3.2** -Effetto dei macinati di foglie e radici di *A. caucasicus* (AC) e *A. sedifolius* (AS) sul peso delle radici, sulle galle e sulle masse d'uova di *Meloidogyne javanica* (MJ), espresse tramite indici, dopo inoculo su piante di pomodoro cv Rutgers.

Trattamento	Peso radici (g)	Indice galle (0-5)	Indice masse d'uova (0-5)
AC macinato di foglie 0.5 g + MJ	2.1	3.5	3.6
AC macinato di foglie 1 g + MJ	1.8	4.2	3.4 *
AC macinato di radici 0.5 g + MJ	2.8	3.7	3.8
AC macinato di radici 1 g + MJ	2.8	4.7	4.0
AS macinato di foglie 0.5 g + MJ	1.5	3.5	3.0 **
AS macinato di foglie 1 g + MJ	3.5	3.7	2.6 **
AS macinato di radici 0.5 g + MJ	1.5	4.5	4.2
AS macinato di radici 1 g + MJ	1.5	4.0	4.2
Nessun macinato + MJ	3.0	3.8	4.4

\* significativamente differenti per  $P < 0.05$ ; \*\* significativamente differenti per  $P < 0.01$ .

Tuttavia, come evidenziato nella Tabella 3.2, le masse d'uova sono significativamente diminuite in seguito al trattamento con i macinati di foglie di *A. caucasicus* (1g) ( $P \leq 0.05$ ) e di *A. sedifolius* (0,5 e 1 g) ( $P \leq 0.01$ ).

I dati relativi al numero di larve di II, III e IV età di *M. javanica* riportati in Tabella 3.3 hanno indicato un inaspettato aumento delle stesse sulle radici di pomodoro trattate con i macinati di foglia e radice di *A. sedifolius* rispetto al numero presente sulle radici del controllo inoculato e non trattato con i macinati.

**Tabella 3.3** - Effetto dei macinati di foglie e radici di *Aster caucasicus* (AC) e *A. sedifolius* (AS) sul numero di larve di seconda, terza e quarta età, di femmine e uova di *Meloidogyne javanica* (MJ) analizzate dopo inoculo sulle radici di pomodoro cv Rutgers.

Trattamento	Numero di larve di II, III e IV età/g radice	Numero di femmine/g radice	Numero di uova/g radice
AC macinato di foglie 0.5 g + MJ	5.5	87.4	2956 **
AC macinato di foglie 1 g + MJ	5.9	68.8 **	1219 **
AC macinato di radici 0.5g + MJ	5.6	104.0	12144
AC macinato di radici 1 g + MJ	5.4	93.4	19219
AS macinato di foglie 0.5 g + MJ	8.4 **	6.2 **	331 **
AS macinato di foglie 1 g + MJ	12.3 **	10.0 **	475 **
AS macinato di radici 0.5g + MJ	8.0 *	38.0 **	456 **
AS macinato di radici 1 g + MJ	8.9 **	27.2 **	481 **
Nessuno macinato + MJ	3.6	99.8	16681
Nessuno macinato e non inoculato	0	0	0

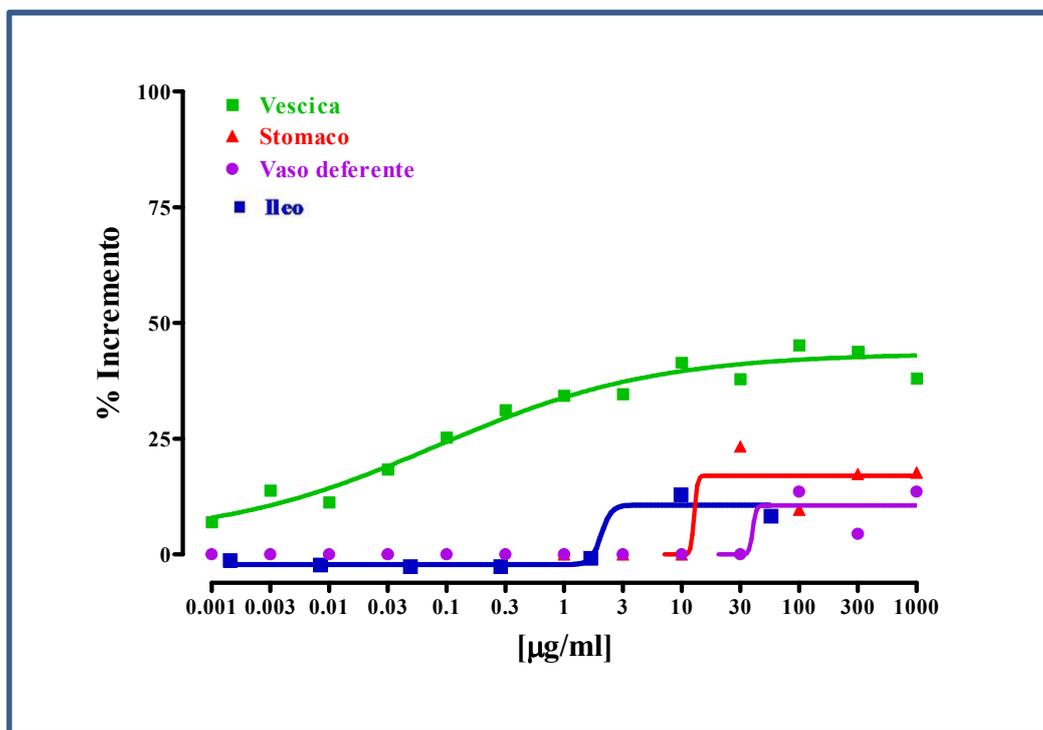
\* significativamente differenti per  $P < 0.05$ ; \*\* significativamente differenti per  $P < 0.01$ .

Tuttavia, successivamente, il numero di femmine per grammo di radice è significativamente diminuito con il trattamento dei macinati di *A. sedifolius* ed anche con il trattamento di 1 g di foglie di *A. caucasicus*. Conseguentemente, è stata rilevata anche una drastica riduzione del numero di uova/g di radice: da 16681 nel controllo a poche centinaia nel pomodoro trattato con i macinati di *A. sedifolius* (0,5 e 1g). L'effetto delle foglie macinate di *A. caucasicus* è risultato meno drastico ma comunque significativo. Si può, quindi, concludere che, soprattutto nelle foglie e

nelle radici di *A. sedifolius*, sono presenti sostanze in grado di inibire lo sviluppo delle femmine di *M. javanica* e la loro fertilità. Allo scopo di confermare che gli effetti rilevati sono dovuti alla presenza degli Astersedifoliosidi, sono in corso i saggi *in vitro* con i macinati e la miscela delle saponine estratte da *A. sedifolius*.

### **3.2 Valutazioni tossicologiche *in vivo* ed *in vitro* degli estratti di *Aster sedifolius***

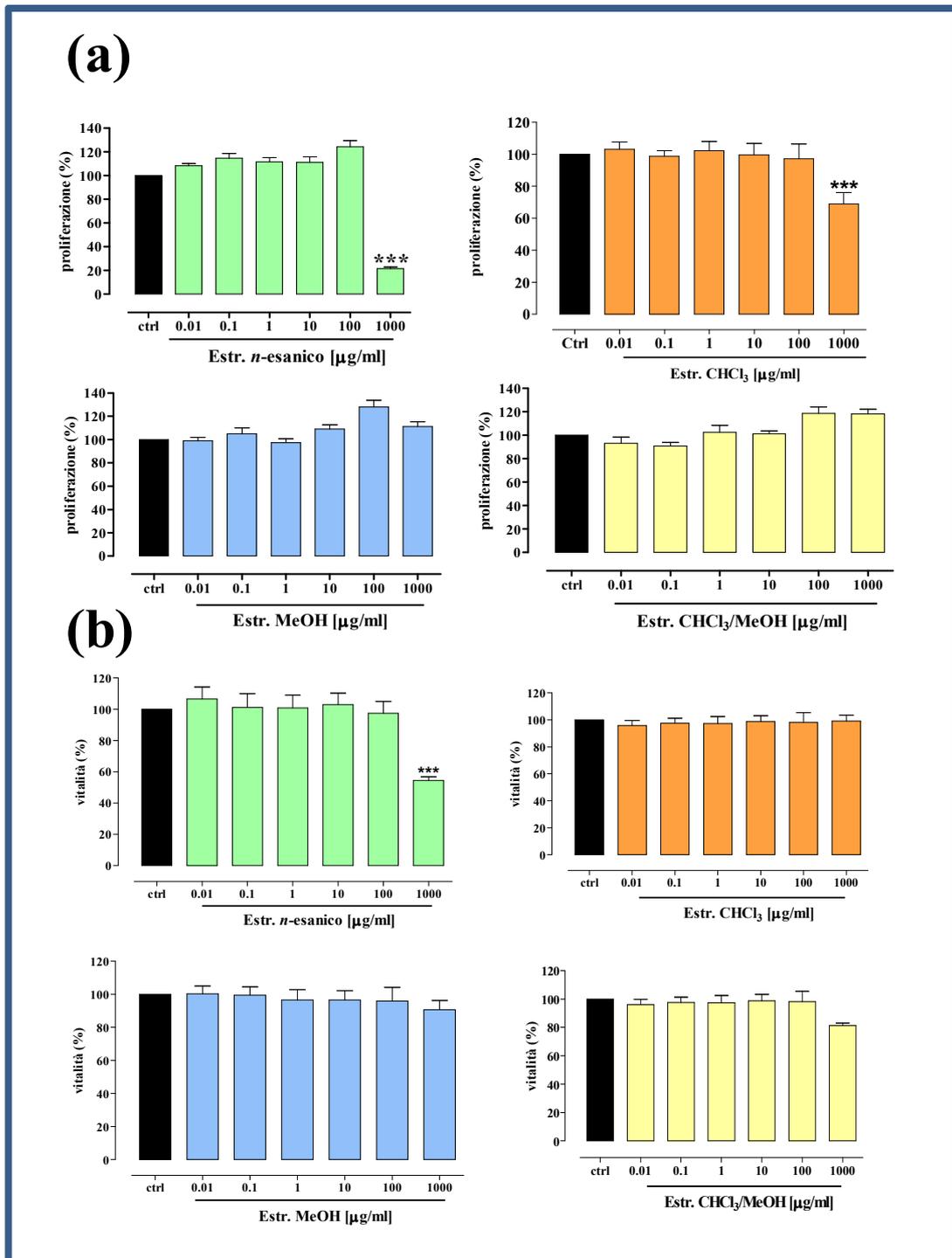
Sono stati eseguiti sui topi saggi tossicologici *in vitro* ed *in vivo* con gli estratti ottenuti da foglie di *A. sedifolius*, in collaborazione con la Dott.ssa Borrelli (Dipartimento di Farmacologia Sperimentale, Università di Napoli Federico II). La presenza di principi tossici avrebbe, infatti, fatto escludere a priori l'utilizzazione dei composti come biopesticidi. Negli studi *in vitro* sono stati considerati gli effetti delle frazioni dell'estratto metanolico (AS5, AS6, AS7, AS14/4) e della saponina triterpenoidica, Astersedifolioside C, oltrechè dei diversi estratti (n-esanico, cloroformico, metanolico e cloroformio/metanolico 9:1) sulla funzionalità di alcuni organi isolati quali stomaco, intestino, vescica e vaso deferente e sulla vitalità e proliferazione di due linee cellulari. I risultati hanno mostrato che l'estratto n-esanico, quello cloroformico e cloroformio/metanolico, che non contengono le saponine, alla concentrazione di 300 e 1000 µg/ml, hanno ridotto le contrazioni dell'ileo, della vescica indotte dall'acetilcolina, del vaso deferente indotte dalla stimolazione elettrica (EFS) e dello stomaco (dati non mostrati) indicando tossicità dei composti presenti negli estratti. Al contrario, l'estratto metanolico che contiene le saponine non ha modificato le contrazioni dello stomaco, dell'ileo e del vaso deferente ma, addirittura, ha stimolato positivamente, dipendentemente dalla concentrazione, le contrazioni della vescica fino ad un effetto massimo del 50% (Fig. 3.1).



**Fig. 3.1** – Effetto dell’estratto metanolico di *A. sedifolius* (0.001-1000 µg/ml) sulle contrazioni indotte da acetilcolina (Ach, 10-6M) e da stimolazione elettrica (EFS, 2.5 Hz per 20 secondi, 400 mA, 1.0 ms la durata di ogni singolo impulso) sullo stomaco, vescica, ileo (Ach) e vaso deferente (EFS). Ogni punto rappresenta la media ± SEM di 3-5 esperimenti.

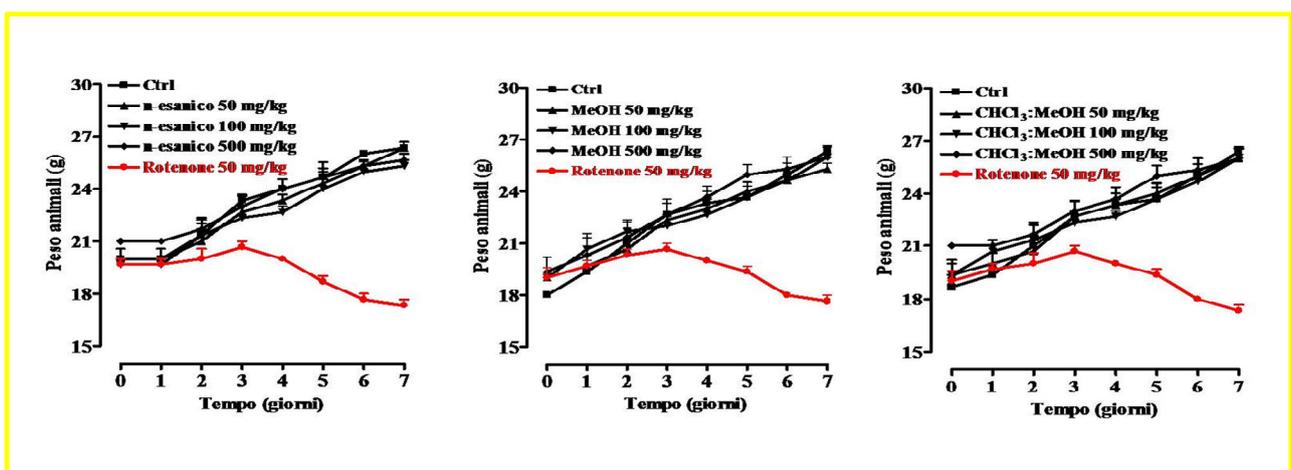
Per quanto riguarda gli effetti sulla proliferazione e la vitalità cellulare valutati sulle cellule Caco-2 e sui macrofagi peritoneali murini (Fig. 3.2), solo ad una concentrazione elevata, pari a 1000 µg/ml, gli estratti n-esanico e cloroformico hanno mostrato una riduzione significativa ( $P \leq 0.001$ ) della proliferazione e della vitalità di entrambe le linee cellulari.

Al contrario, gli estratti metanolico e cloroformio-metanolico non hanno modificato né la proliferazione, né la vitalità di entrambe le linee cellulari. Le frazioni dell’estratto metanolico, che contengono la miscela di Astersedifoliosidi A, B, e C, e l’Astersedifolioside C singolarmente non hanno ridotto significativamente la proliferazione e la vitalità cellulare né nelle cellule Caco-2 né nei macrofagi peritoneali murini (dati non mostrati).



**Fig. 3.2** – Effetto degli estratti n-esanico, cloroformico, metanolico e cloroformio/metanolico (9:1) ottenuti dalle parti aeree di *A. sedifolius* (0.01-1000 µg/ml) sulla proliferazione cellulare dei macrofagi peritoneali murini (a) e sulla vitalità cellulare delle Caco-2 (b). n=8, media ± SEM, \*\*\*P<0.001.

Negli studi *in vivo* è stata stimata la tossicità cronica e quella acuta stabilita come dose letale 50 (DL<sub>50</sub>) cioè in grado di causare la morte del 50% degli animali trattati. Gli estratti n-esanico, metanolico e cloroformio/metanolico (9:1), somministrati per via intraperitoneale alle dosi di 50-1000 mg/kg, non hanno determinato la morte degli animali. Tale risultato consente di stabilire che la DL<sub>50</sub> di tutti gli estratti è superiore a 1000 mg/kg. L'osservazione di tali animali per un periodo di tempo di tre giorni (tempo massimo di osservazione) non ha evidenziato, inoltre, la comparsa di effetti tossici (es. piloerezione, sofferenza addominale, diametro pupillare ridotto). Per quanto riguarda la tossicità cronica, sono stati considerati diversi parametri in seguito alla somministrazione quotidiana per via orale per sette giorni consecutivi alle dosi di 50-500 mg/kg degli estratti n-esanico, metanolico e cloroformio/metanolico (9:1) e del rotenone, somministrato alla dose di 50 mg/kg per via orale, come sostanza tossica di riferimento. Gli estratti in esame hanno determinato un aumento fisiologico del peso corporeo degli animali e del consumo quotidiano di cibo paragonabile a quello degli animali di controllo. Al contrario, il rotenone ha indotto una riduzione significativa del peso corporeo degli animali e dell'assunzione di cibo (Fig. 3.3).



**Fig. 3.3** – Effetto degli estratti n-esanico, metanolico, cloroformio/metanolico (50-500 mg/kg) e del rotenone (50 mg/kg), somministrati per via orale, sull'incremento del peso corporeo degli animali. n=8, media ± SEM; \*\*\*P≤0.001.

In seguito alla somministrazione degli estratti non sono stati determinati effetti riguardo allo stato generale dell'animale (aspetto, stato del pelo, comportamento, tono muscolare, diametro pupillare, quantità ed aspetto delle urine, quantità e consistenza delle feci, ecc.), alle costanti emato-metaboliche (formula leucocitaria, Hb, azotemia, glicemia, colesterolemia, ecc.) e all'esame macro- e microscopico dei principali organi al termine del trattamento (polmoni, reni, fegato, intestino, ecc.). Questi risultati hanno permesso di stabilire che gli estratti ottenuti dalle parti aeree di *A. sedifolius*, la miscela di saponine ed una delle principali saponine, l'Astersedifolioside C, sono privi di effetti tossici anche a dosi elevate.

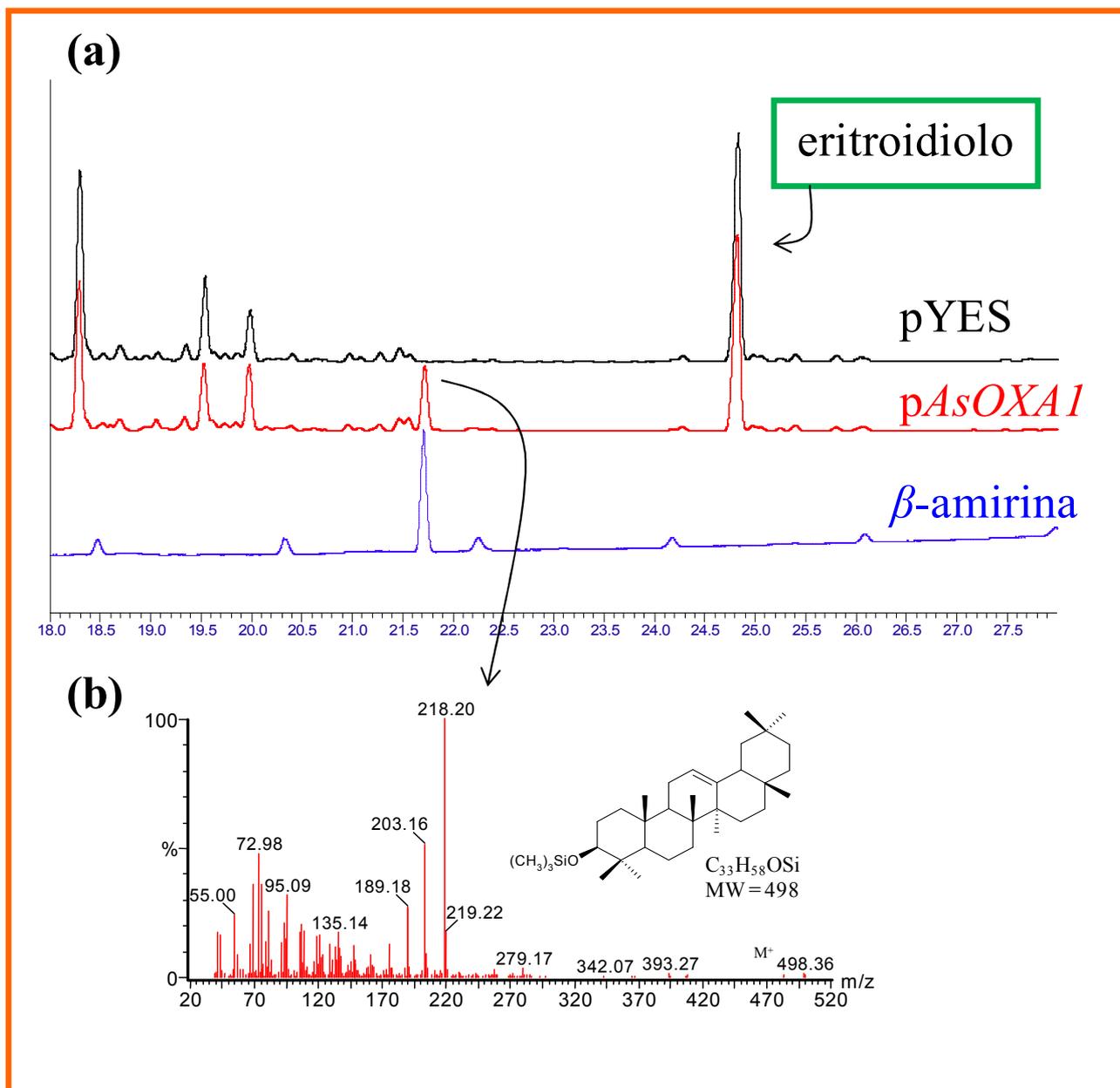
### 3.3 Analisi funzionale del gene *AsOX1*

Il gene *AsOX1* (GenBank AY836006) era stato in precedenza isolato in *Aster sedifolius* presso l'Istituto CNR di Genetica Vegetale (Portici) dove si è svolta la maggior parte dell'attività di ricerca della presente tesi (Cammарeri *et al.*, 2008). L'analisi *in silico* suggeriva che *AsOX1* codificava per una  $\beta$ -amirina sintasi, che nel pathway biosintetico dei triterpeni rappresenta l'enzima chiave che interviene nella ciclizzazione del 2,3-ossidosqualene per strutturare gli scheletri pentaciclici. Infatti, tale gene era stato clonato sulla base delle regioni conservate di geni omologhi di ossidosqualene ciclasi (OSC) isolati da altre specie. Oltre ad avere i motivi QW e DCTAE che sono altamente conservati tra le OSC (Figura 3.4), *AsOX1* di *A. sedifolius* mostrava un'elevata identità a livello aminoacidico con PgPNY2, codificante una  $\beta$ -amirina sintasi di *Panax ginseng* (79%), e con AtLUP1, lupeolo sintasi di *Arabidopsis thaliana* (70%).

<i>AsOX1</i>	HGWQVS	<b>DCTAE</b> GLK	_537	<i>AsOX1</i>	-SQE <b>W</b>	417
ATLUP1	HGWQVS	<b>DCTAE</b> ALK	_536	ATLUP1	-CQ <b>I</b> W	416
ATLUP2	HGWQVS	<b>DCTAE</b> ALK	_496	ATLUP2	-SQ <b>I</b> W	349
PNY2	HGWQVS	<b>DCTAE</b> ALK	_537	PNY2	-SQE <b>W</b>	417
OSC1	HGWQVS	<b>DCTAE</b> GLK	_538	OSC1	-SQE <b>W</b>	418
GgbAS1	HGWQVS	<b>DCTAE</b> GLK	_468	GgbAS1	-SQE <b>W</b>	348
$\beta$ AS	HGWQVS	<b>DCTAE</b> GLK	_468	$\beta$ AS	-SQE <b>W</b>	348
PSY	HGWQVS	<b>DCTAE</b> GLK	_538	PSY	-SQE <b>W</b>	418
PNX1	HGWPI S	<b>DCTAE</b> GFK	_536	PNX1	-SQ <b>I</b> W	416

**Fig. 3.4** – Allineamento multiplo della sequenza aminoacida di *AsOX1* con altre triterpene ciclasi. In evidenza i residui aminoacidici conservati delle OSC. ATLUP1 lupeolo sintasi (*Arabidopsis thaliana*); ATLUP2 triterpene sintasi multifunzionale (*Arabidopsis thaliana*); PNY2  $\beta$ -amirina sintasi (*Panax ginseng*); OSC1  $\beta$ -amirina sintasi (*Lotus japonicus*); GgbAS1  $\beta$ -amirina sintasi (*Glycyrrhiza glabra*); PSY  $\beta$ -amirina sintasi (*Pisum sativum*); PNX1 cicloartenolo sintasi (*Panax ginseng*).

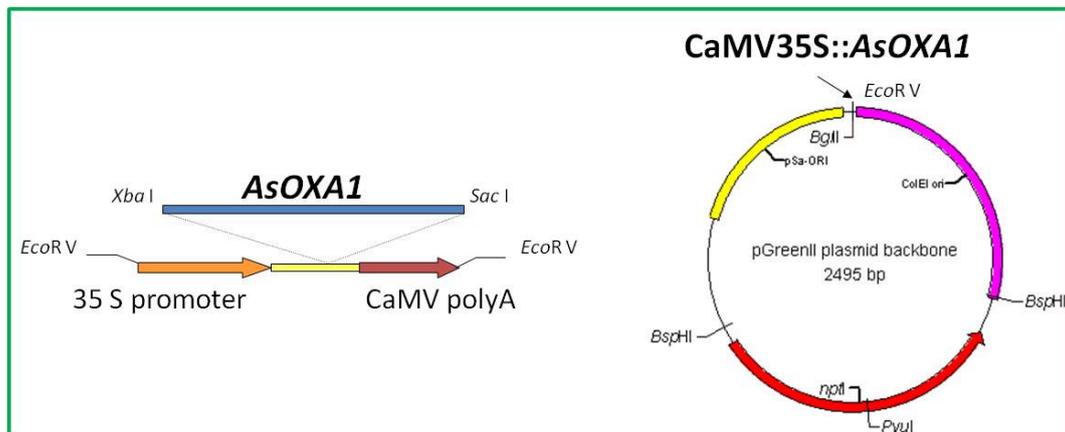
Allo scopo di confermare la funzione di  $\beta$ -amirina sintasi del gene *AsOXAI* dedotta dalle analisi bioinformatiche è stata eseguita l'analisi funzionale mediante trasformazione del lievito (*Saccharomyces cerevisiae*) come era stato effettuato per il gene OSC del *P. ginseng* (Kushiro *et al.*, 1998). Il lievito trasformato con *AsOXAI* e quello controllo trasformato con il vettore senza *AsOXAI*, sono stati sottoposti alle analisi chimiche con GC e GC/MS per la valutazione degli steroli e dei composti triterpenici. L'analisi condotta sull'estratto ottenuto direttamente dal materiale liofilizzato tramite etilacetato senza idrolisi acida, ha rilevato sia nel lievito con *AsOXAI* che nel controllo la presenza degli steroli, tra cui l'eritroidiolo che è risultato il composto più abbondante. Per quanto riguarda i triterpeni, in seguito ad idrolisi acida dell'estratto, solo nel lievito trasformato con *AsOXAI*, è stato identificato un picco corrispondente alla  $\beta$ -amirina ( $0,36 \pm 0,05$  mg/g di liofilizzato) il cui spettro GC/MS è sovrapponibile allo standard della  $\beta$ -amirina. L'analisi ha quindi dato conferma tramite l'espressione di *AsOXAI* nel lievito della sua funzione di  $\beta$ -amirina (Fig. 3.5).



**Fig. 3.5** - Analisi GC (a) e GC/MS (b) condotta sul lievito liofilizzato trasformato con *AsOXAI* (*pAsOXAI*) e senza *AsOXAI* (*pYES*).

### 3.4 Ingegneria genetica con CaMV35S::*AsOX1*

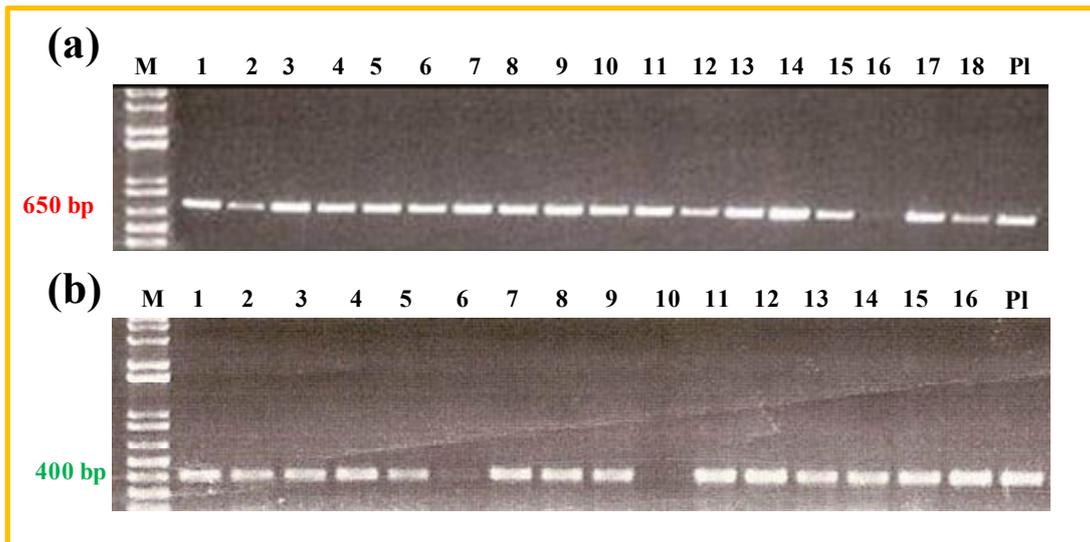
L'isolamento del gene della  $\beta$ -amirina sintasi (*AsOX1*) in *A. sedifolius* e la conferma della sua funzione ha creato la premessa per effettuare interventi di ingegneria metabolica con il duplice scopo di aumentare la produzione dell'aglicone, che rappresenta il substrato limitante delle saponine triterpenoidiche, ed acquisire informazioni genetiche sul pathway dei triterpeni. Tra le diverse strategie possibili di ingegneria metabolica (Morandini e Salamini, 2003) in questa tesi è stato seguito l'approccio basato sul potenziamento di espressione di *AsOX1* sotto il controllo del promotore costitutivo del Virus del Mosaico del Cavolfiore, CaMV35S. In tale contesto, è stato sviluppato un sistema di trasformazione genetica di *Aster caucasicus* con *Agrobacterium tumefaciens*, ed è stato costruito un vettore binario contenente CaMV35S::*AsOX1* che è stato trasferito tramite diversi ceppi di agrobatterio in tre specie vegetali. Per inserire il gene *AsOX1* nel vettore p35S-2 ([www.pgreen.ac.uk](http://www.pgreen.ac.uk)), alle estremità del full-length di *AsOX1* sono stati creati un sito di restrizione per *XbaI* a monte del codone di inizio ATG ed uno per *SacI* a valle del codone di stop. Il plasmide p35S-2 contenente il gene *AsOX1* è stato digerito con l'enzima *EcoRV* ed il costrutto CaMV35S::*AsOX1* è stato inserito nel vettore binario pGreenII0029 ([www.pgreen.ac.uk](http://www.pgreen.ac.uk)) utilizzato per la trasformazione di *Agrobacterium tumefaciens*, il cui T-DNA presenta al suo interno il gene *NPTII* che determina la resistenza all'antibiotico Kanamicina (Fig. 3.6).



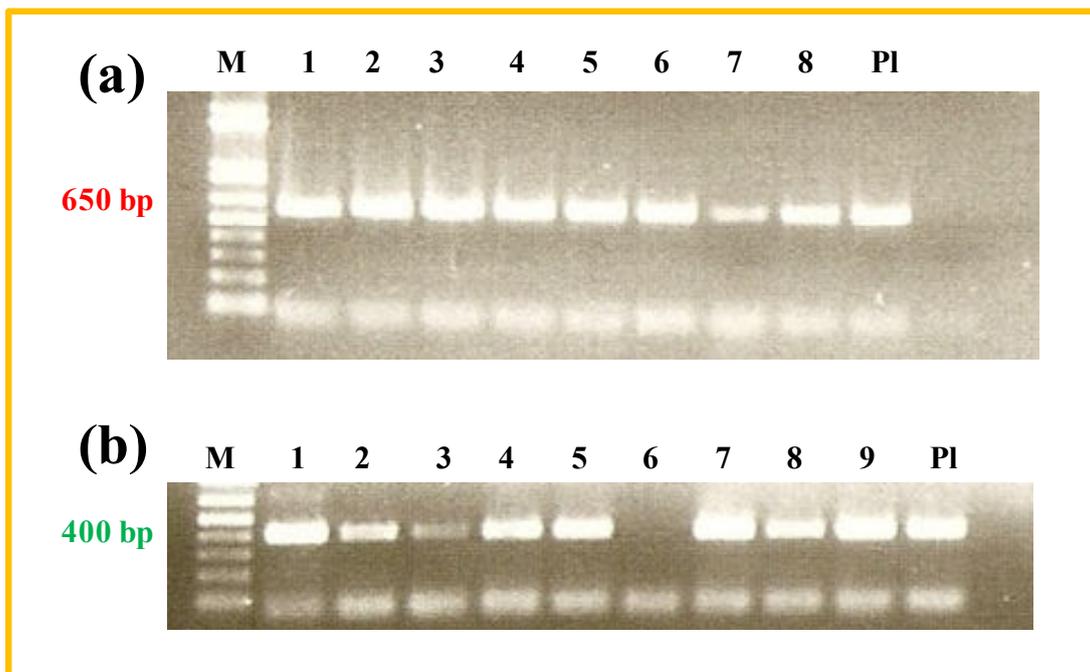
**Fig. 3.6** – Costruzione del vettore di espressione in *A. tumefaciens*

Il vettore pGreenII0029 contenente CaMV35S::*AsOXA1* e quello con il costrutto CaMV35S senza il gene sono stati utilizzati separatamente per trasformare mediante elettroporazione i ceppi EHA105 e GV3101 di *A. tumefaciens*. Per la trasformazione, è stato co-elettroporato con pGreenII0029 il plasmide pSoup, poiché reca il gene RepA codificante una replicasi che agisce in *trans* per la replicazione nel genere agrobatterio, essendo il suo target la sequenza pSaOri presente sul plasmide pGreenII0029. Dopo la trasformazione sono state analizzate le colonie trasformate che crescevano su substrato con l'antibiotico Kanamicina.

L'efficienza della trasformazione con il plasmide pGreenII0029 contenente CaMV35S::*AsOXA1* è stata accertata tramite PCR colony che ha amplificato il frammento di 400 bp, interno al gene *AsOXA1*, con la coppia di primer RT1 e RT2 (Tab. 2.1). I frammenti dell'amplificazione sono risultati presenti in 14 delle 16 colonie saggiate per il ceppo EHA105 (Fig. 3.7b) e in 8 colonie su 9 per GV3101 (Fig. 3.8b). L'avvenuta trasformazione con il plasmide controllo è stata valutata utilizzando la combinazione di primer 35S F e 35S R (Tab. 2.1), che amplificano un frammento di circa 650 bp specifico del promotore 35S. Sono state ottenute 17 colonie positive per il ceppo EHA105 (Fig. 3.5.7a) e 8 colonie per il ceppo GV3101 (Fig. 3.5.8a).



**Fig. 3.7** - Prodotti di amplificazione della PCR delle colonie di *A. tumefaciens* EHA105 contenenti CaMV35S (a) e CaMV35S::AsOXA1 (b). **M**: marcatore molecolare; **PI**: plasmide.

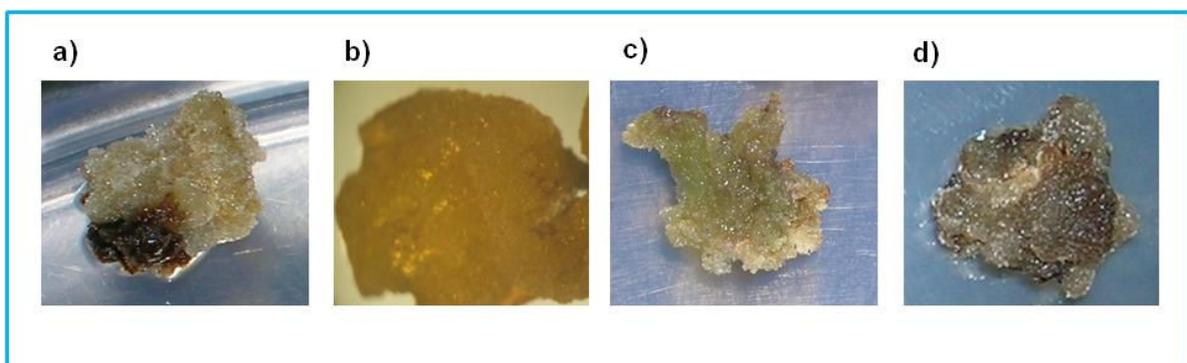


**Fig. 3.8** - Prodotti di amplificazione PCR delle colonie di *A. tumefaciens* GV3101 contenenti CaMV35S (a) e CaMV35S::AsOXA1 (b). **M**: marcatore molecolare; **PI**: plasmide.

E' stata selezionata una colonia per ogni ceppo di *A. tumefaciens* con CaMV35S::AsOXA1 (EHA105-AsOXA1 e GV3101-OXA1) e con il vettore senza il gene (EHA105-35S e GV3101-35S). I diversi ceppi sono stati utilizzati per la trasformazione genetica di *Aster caucasicus*, *Medicago truncatula* e *Arabidopsis thaliana*.

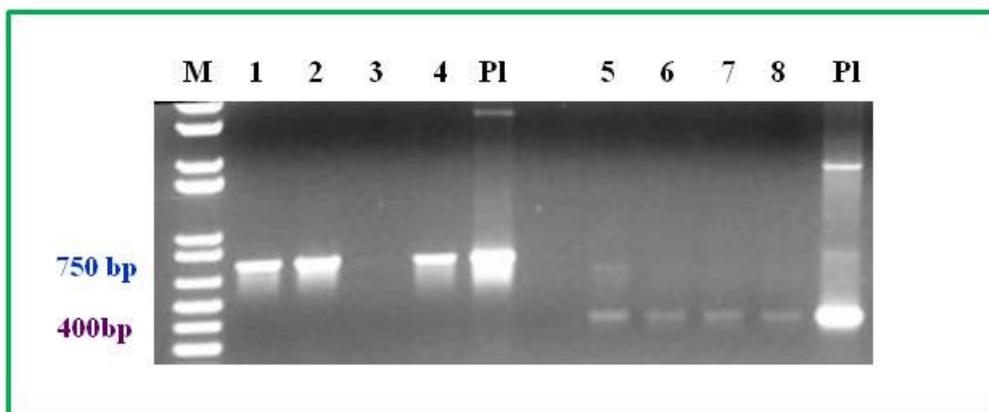
### 3.4.1 Induzione di callo transgenico *CaMV35S::AsOXA1* in *Aster caucasicus*: analisi molecolari e chimiche

Vista la difficoltà di manipolare *in vitro* l'*A. sedifolius*, per la trasformazione di *Aster*, è stata selezionata l'*A. caucasicus*, una specie affine all'*A. sedifolius*, sulla base di precedenti esperimenti relativi all'inibizione della crescita di funghi fitopatogeni tellurici, poiché aveva mostrato una forte inibizione del fungo *Botrytis cinerea*, fornendo indicazioni sul contenuto di sostanza ad attività biocida, e sulla quale con esperimenti preliminari era stato messo a punto un protocollo per l'ottenimento di callo da espianti fogliari. L'*A. caucasicus* sviluppava callo su substrato MS<sub>30</sub> + 2,4 acido diclorofenossiacetico (2,4D) (0.94 mg/L) + 6-benzilaminopurina (BAP) + (0.18 mg/L) (Fig. 3.9a) in 4 settimane. Prima della trasformazione è stata valutata la crescita del callo in presenza dell'antibiotico Kanamicina alla concentrazione di 50 mg/L. Dopo una prima fase di crescita stentata, l'arresto di sviluppo del callo si è verificato dopo 6 settimane (Fig. 3.9b). In seguito alla trasformazione con il gene *AsOXA1* mediante co-coltura del ceppo EHA105-AsOXA1 con espianti di foglia posti sul substrato selettivo con Kanamicina, il callo indotto si presentava dopo 6 settimane molto sviluppato consentendo così la moltiplicazione tramite successive sub-culture (Fig. 3.9c). Il ceppo EHA105-35S è stato utilizzato nella co-coltura per ottenere callo trasformato controllo (Fig. 3.9d).



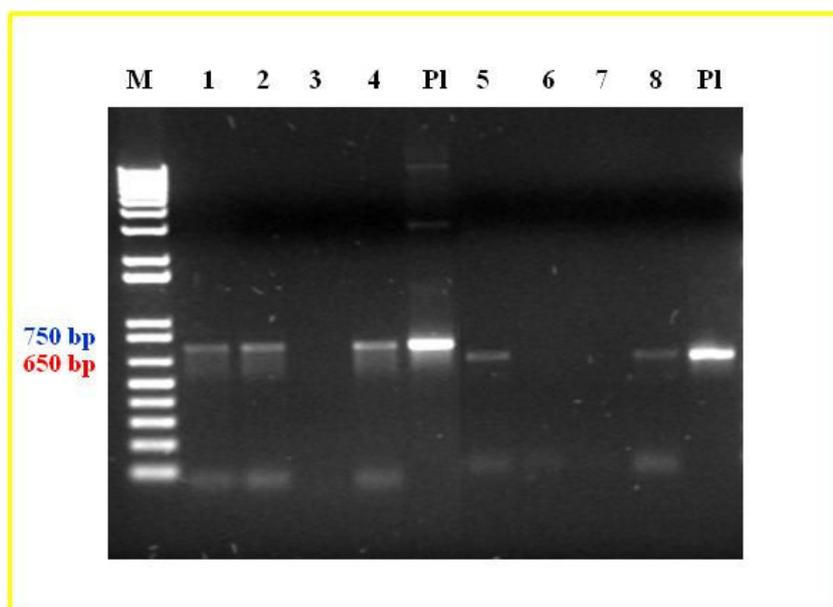
**Fig. 3.9** – a) Callo ottenuto da espianti fogliari di *A. caucasicus* su MS<sub>30</sub> + 2,4D (0.94 mg/L) + BAP (0.18 mg/L);  
b) Callo ottenuto da espianti fogliari di *A. caucasicus* su MS<sub>30</sub> + 2,4D (0.94 mg/L) + BAP (0.18mg/L) in presenza di Kan (50 mg/L);  
c) Callo ottenuto da espianti fogliari di *A. caucasicus* sottoposti a trasformazione con EHA105-AsOXA1;  
d) Callo ottenuto da espianti fogliari di *A. caucasicus* sottoposti a trasformazione con EHA105-35S.

I calli putativamente trasformati sono stati sottoposti a successive sub-culture per circa 4 mesi; quelli che mostravano una vigorosa crescita sono stati selezionati per confermare l'integrazione del T-DNA con le analisi molecolari. E' stato estratto il DNA totale da sei calli putativamente trasformati derivanti da eventi indipendenti di trasformazione con il ceppo di *A. tumefaciens* EHA105-AsOXA1. I calli analizzati mediante PCR con i primer NPTII F e NPTII R (Tab 2.1), che amplificano un frammento di circa 750 bp specifico del gene *NPTII* responsabile della resistenza all'antibiotico Kanamicina, e i primer RT1 e RT2 (Tab. 2.1) che amplificano un frammento di 400 bp interno al gene *AsOXA1* hanno confermato l'integrazione del gene *AsOXA1*. In Figura 3.10 è riportato il risultato relativo a quattro calli tra quelli analizzati.



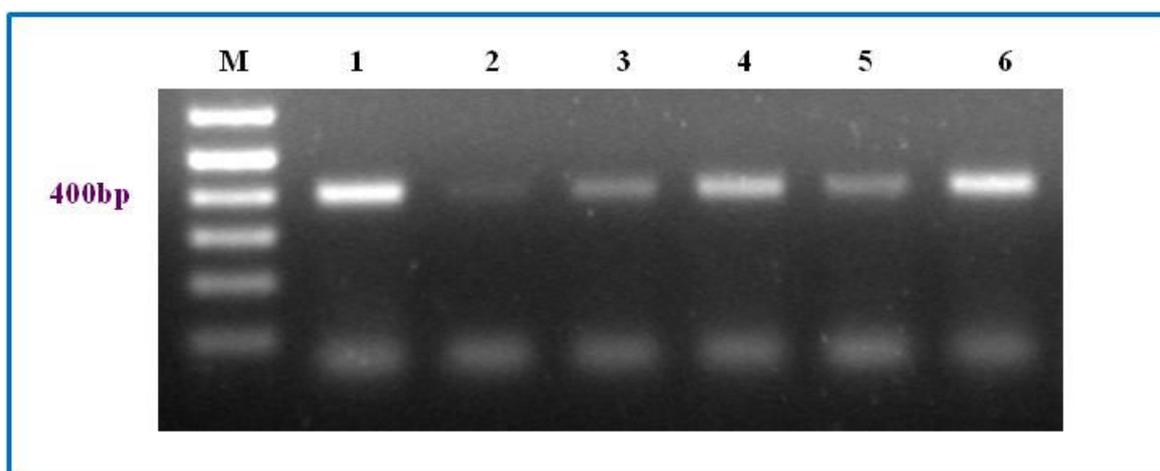
**Fig. 3.10** – Prodotti di amplificazione della PCR sul DNA dei calli di *A. caucasicus* sottoposti a trasformazione con EHA105-AsOXA1. **M**: marcatore molecolare; **1-4**: calli transgenici per il gene *NPTII*; **5-8**: calli positivi per CaMV35S; **PI**: plasmide CaMV35S::*AsOXA1*.

Anche i calli provenienti dalla trasformazione con il costrutto CaMV35S sono stati analizzati a livello genomico tramite PCR con i primer NPTII F e NPTII R (Tab 2.1) e i primer 35S F e 35S R, che amplificano un frammento di 650 bp specifico del promotore CaMV35S. In Figura 3.11 è riportato il risultato relativo a quattro calli putativamente trasformati, dei quali due presentano entrambi i segnali corrispondenti ai pesi molecolari attesi, confermando l'avvenuta trasformazione.



**Figura 3.11** – Analisi PCR sul DNA dei calli di *A. caucasicus* sottoposti a trasformazione con EHA105-35S. **M**: marcatore molecolare; **1,2,4**: calli transgenici positivi alla Kanamicina; **5,8**: calli positivi al CaMV35S; **PI**: plasmide CaMV35S.

I sei calli risultati positivi alla trasformazione con *AsOXAI* sono stati analizzati mediante RT-PCR per valutarne l'espressione. La presenza della banda a 400 bp in tutti i campioni ha confermato che il gene *AsOXAI* si esprime in tutti i calli risultati positivi alla trasformazione (Fig. 3.12).

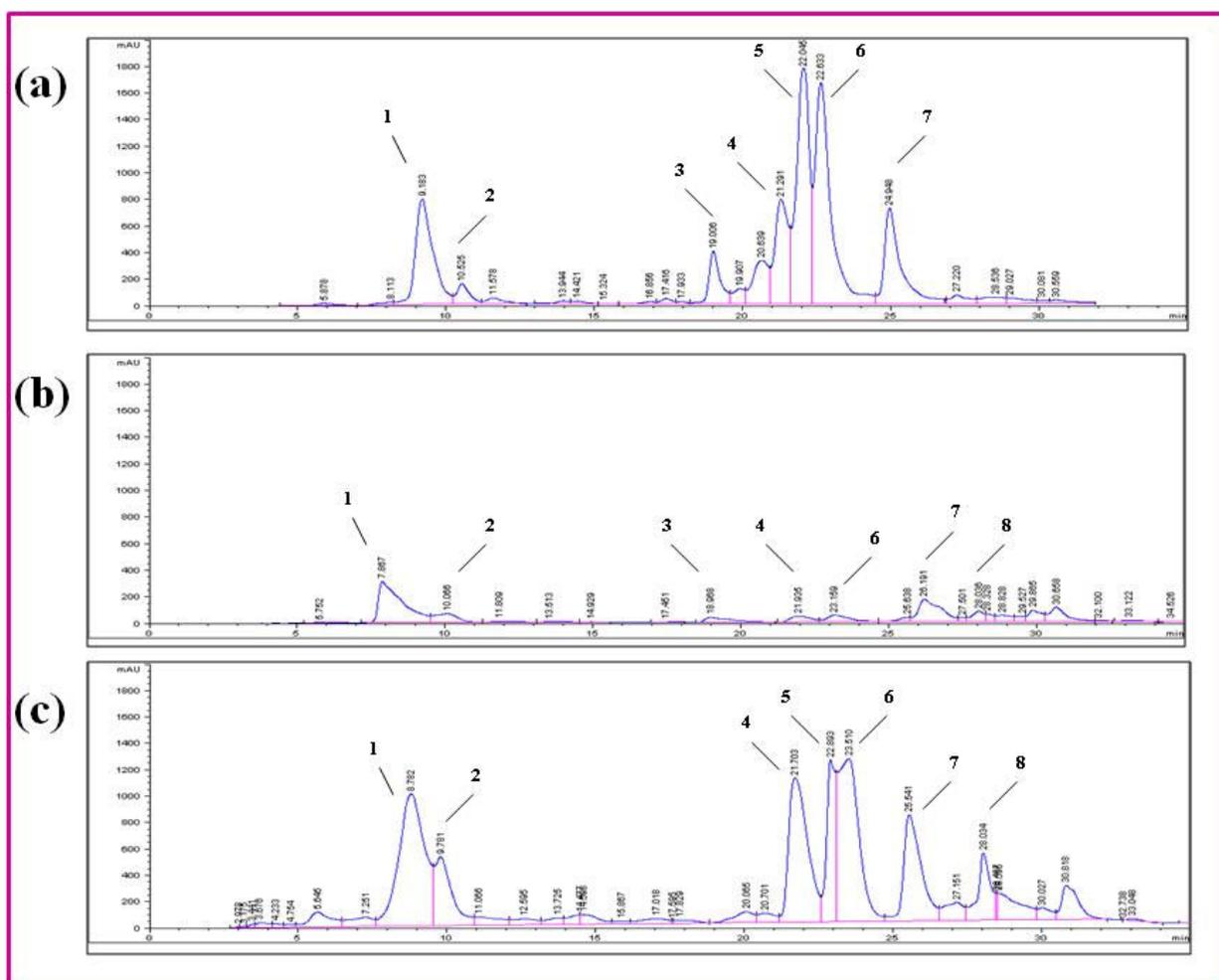


**Fig. 3.12** – Prodotti di amplificazione dell'RT-PCR per l'analisi di espressione del gene *AsOXAI* nei calli di *A. caucasicus* trasformati.

**M:** marcatore molecolare; **1-6:** Calli trasformati con EHA105-AsOXAI.

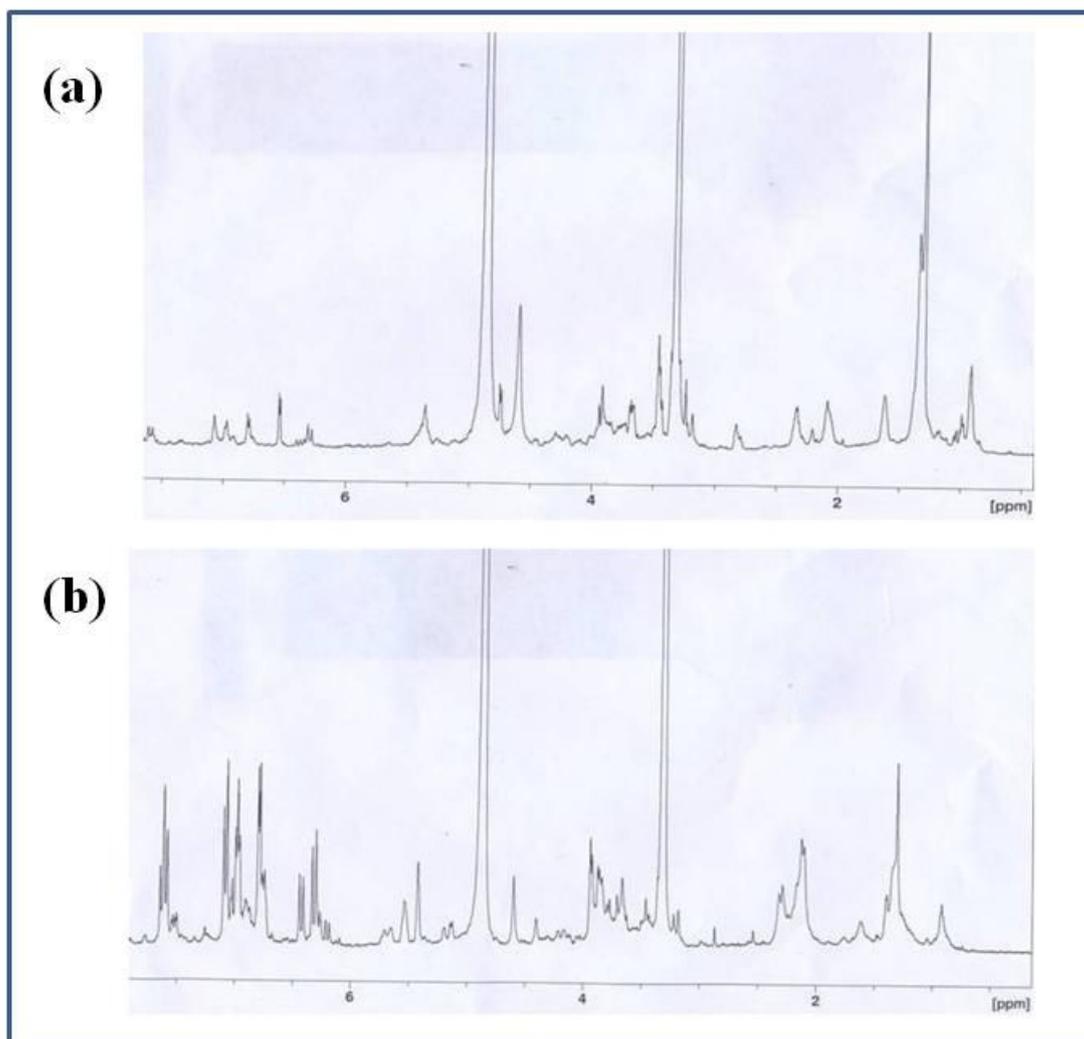
Allo scopo di rilevare e studiare la composizione quali-quantitativa dei metaboliti secondari del materiale trasformato e confrontarla con quella del materiale non trasformato, sono state condotte, presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Salerno in collaborazione con la prof. De Tommasi, le analisi chimiche sugli estratti di foglia e radici di *A. caucasicus* per caratterizzare i principali metaboliti secondari prodotti. Lo studio fitochimico delle parti della pianta *in vivo* che si è reso necessario per l'assenza di dati sulla composizione fitochimica di *A. caucasicus*, è stato realizzato dopo estrazioni del materiale vegetale utilizzando tecniche cromatografiche e spettroscopiche. L'identificazione strutturale dei costituenti è stata agevolata dai dati ottenuti dall'analisi degli standard e dal confronto con i dati della letteratura mediante tecniche di spettroscopia e NMR. Le parti aeree di *A. caucasicus* risultavano produttive di derivati dell'acido quinico e sorprendentemente mostravano l'assenza di

saponine triterpenoidiche tipiche del genere *Aster*. L'analisi successiva condotta per confronto cromatografico con HPLC-DAD (Fig. 3.13) e  $^1\text{H}$  NMR (Fig. 3.14) sugli estratti ottenuti dalle parti aeree, dal callo non trasformato e da uno dei sei calli-AsOXA1 ha mostrato la presenza dei derivati esteri dell'acido quinico.



**Fig. 3.13** – Cromatogrammi HPLC-DAD

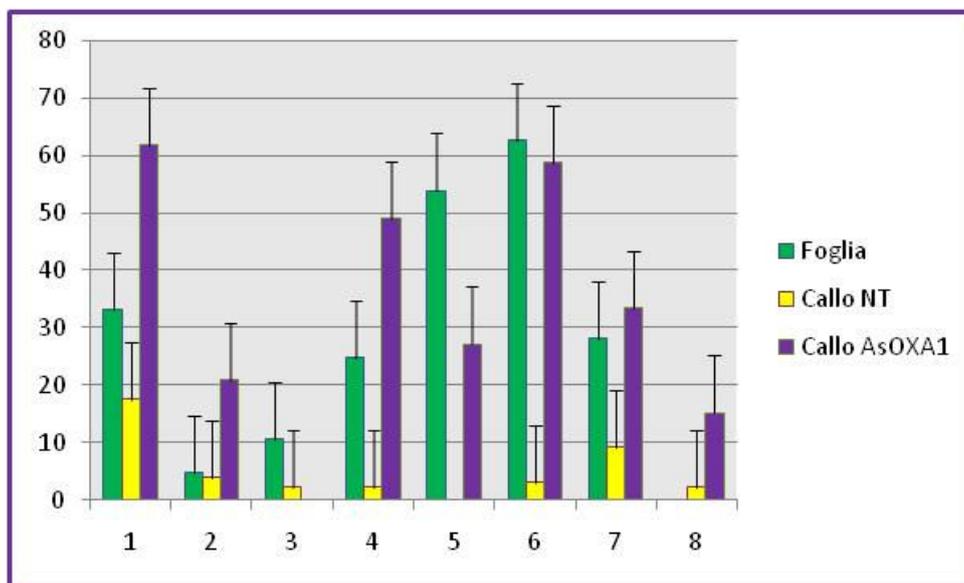
- (a) Estratto butanologico della foglia di *A. caucasicus*;
- (b) Estratto butanologico del callo non trasformato di *A. caucasicus*;
- (c) Estratto butanologico del callo trasformato con *AsOXA1* di *A. caucasicus*.



**Fig. 3.14** -  $^1\text{H}$  NMR dell'estratto n-BuOH della foglia (a) e del callo-AsOXAI (b) di *A. caucasicus*.

Al fine di individuare la percentuale di produzione di tali composti negli estratti ottenuti è stata messa a punto una metodica HPLC quali-quantitativa, utilizzando le condizioni cromatografiche riportate in Materiali e Metodi (Capitolo 2, par. 2.2). L'assegnazione dei picchi cromatografici ai vari metaboliti è stata ottenuta sia mediante il confronto con standard, sia attraverso indagini  $^1\text{H}$  NMR. In Fig. 3.15 sono mostrati i grafici delle quantità relative osservate nella foglia, nel callo non trasformato e nel callo trasformato con *AsOXAI* di *A. caucasicus*, ottenute misurando

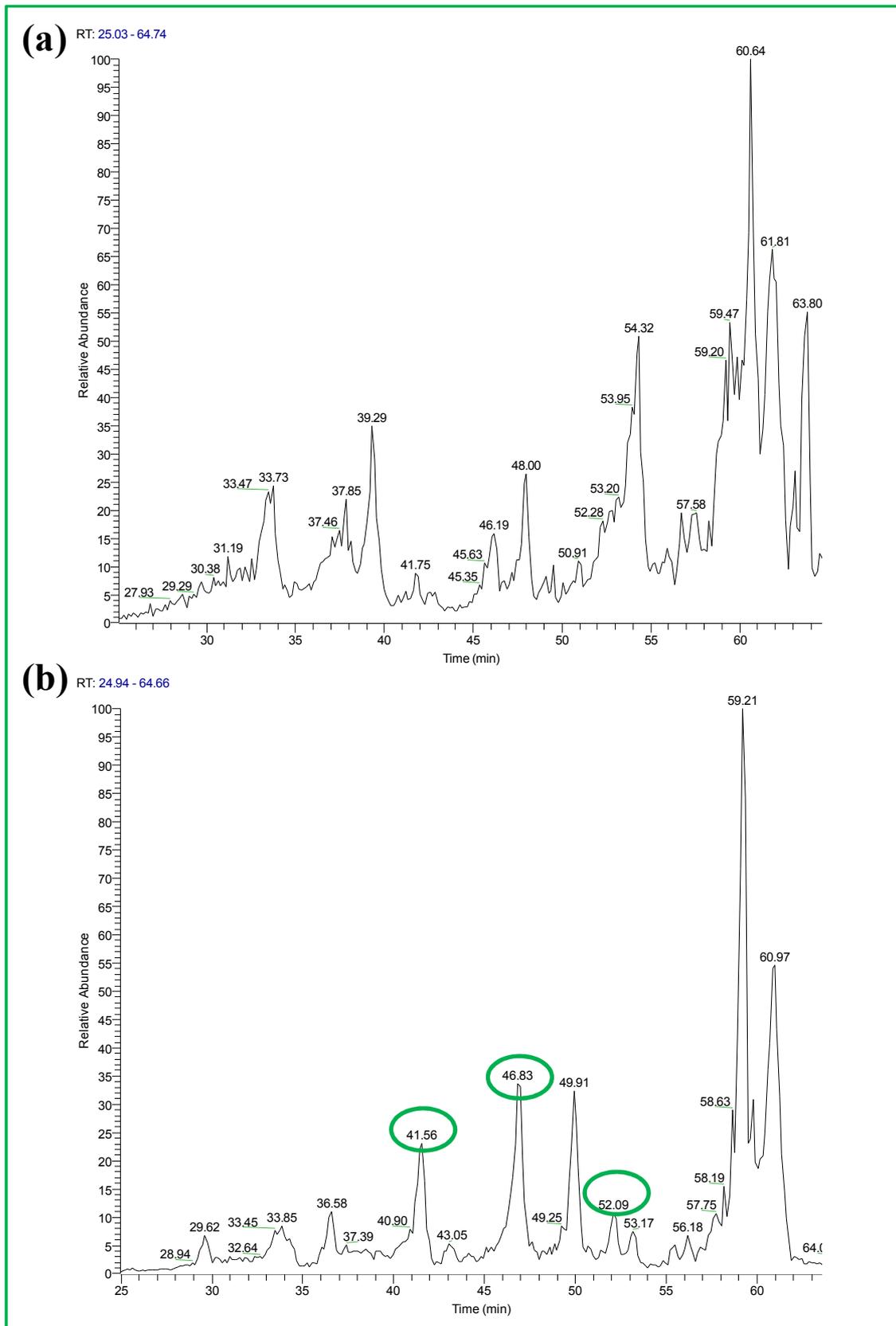
l'area dei picchi presenti nei cromatogrammi HPLC-DAD dell'estratto butanologico di ciascun campione.



**Fig. 3.15** – Quantità relativa della produzione di acidi chinici in callo non trasformato (callo NT) e del callo trasformato con *AsOX1* (callo AsOX1) rispetto alla foglia di *A. caucasicus*.

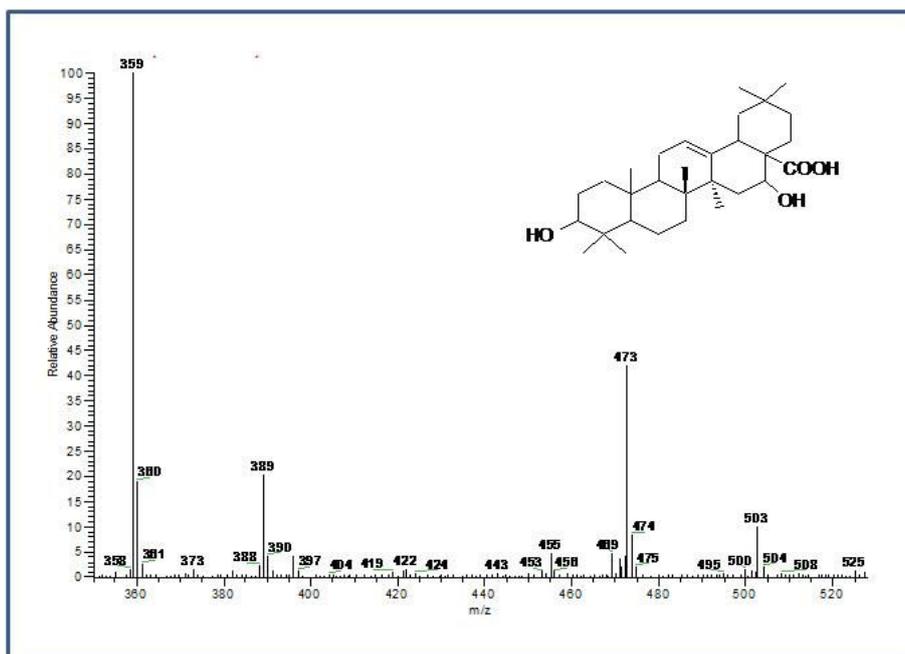
I numeri presenti nel grafico rispettano l'ordine con cui compaiono i picchi sul cromatogramma HPLC-DAD

E' possibile notare che la quantità di acidi chinici risulta notevolmente ridotta nel callo non trasformato, mentre nel callo-AsOX1 i livelli di produzione aumentano anche rispetto a quelli rilevati nella foglia di *A. caucasicus*. Tuttavia, per verificare se l'intervento di ingegneria genetica con *AsOX1* nel callo di *A. caucasicus* trasformato oltre a causare un cambiamento della produzione di derivati dell'acido chinico abbia determinato altri effetti, sono state condotte analisi LC-MS sull'estratto butanologico proveniente dalla foglia e dal callo-AsOX1. I cromatogrammi LC/MS (corrente ionica totale) messi a confronto, hanno permesso di identificare in quello del callo-AsOX1, tre picchi con diversi tempi di ritenzione ( $t_R$ ), che dall'analisi allo spettrometro di massa e di frammentazione hanno identificato derivati di natura triterpenica (Fig. 3.16).



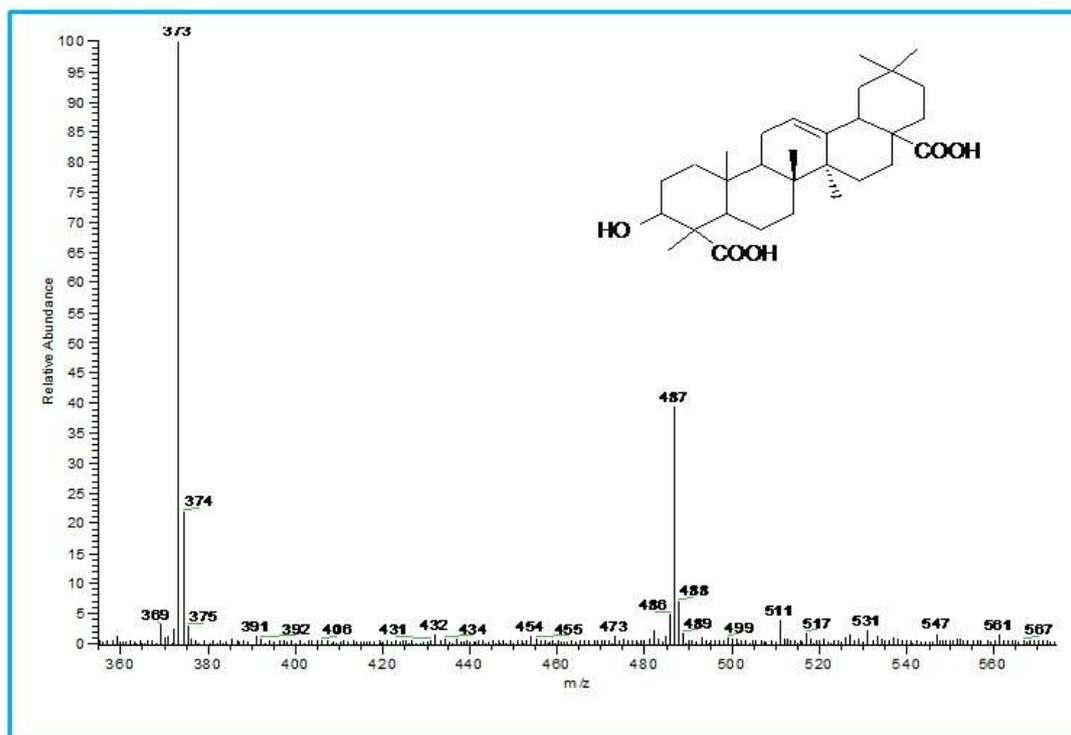
**Fig. 3.16** – Cromatogrammi LC/MS (corrente ionica totale)  
 (a) Estratto butanolicco della foglia *A. caucasicus*  
 (b) Estratto butanolicco del callo-AsOXA1 di *A. caucasicus*.

Allo stesso tempo, utilizzando uno strumento provvisto di analizzatore a trappola ionica, sono stati studiati i patterns di frammentazione. In Fig. 3.17 è riportato lo spettro di massa del composto con  $t_R$  41.96 minuti che ha mostrato un picco a  $m/z$  473  $[M+H]^+$ .



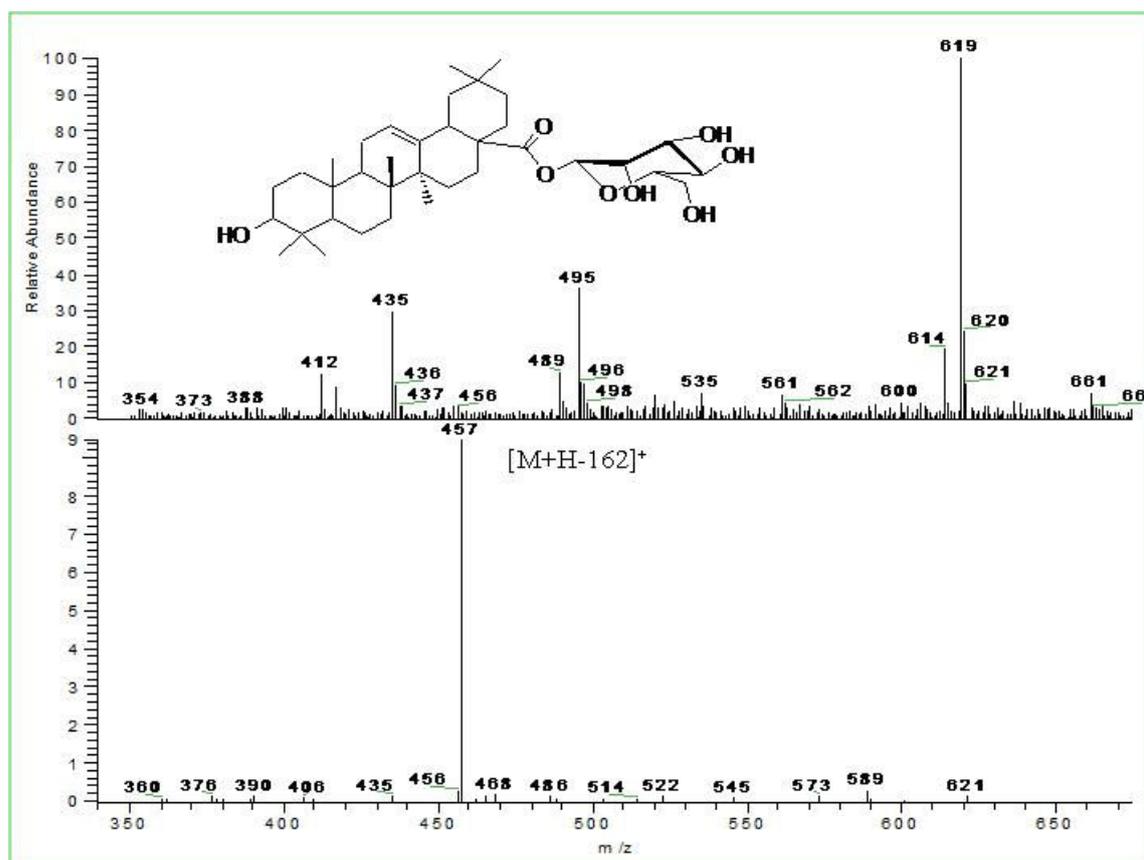
**Fig. 3.17** – Spettro di massa del composto con tempo di ritenzione 41.96 minuti

Dal cromatogramma LC/MS dell'estratto butanologico del callo-AsOXA1 si è evidenziato un secondo picco con  $t_R$  46.83 minuti, il cui spettro di massa ha mostrato un picco a  $m/z$  487  $[M+H]^+$  (Fig. 3.18).



**Fig. 3.18** – Spettro di massa del composto con tempo di ritenzione 46.83 minuti.

Lo spettro di massa del picco con  $t_R$  52.09 minuti ha mostrato un picco base a  $m/z$  619  $[M+H]^+$  e un frammento a  $m/z$  457  $[M+H-162]^+$ , indicando la presenza di un glicoside (Fig. 3.19).

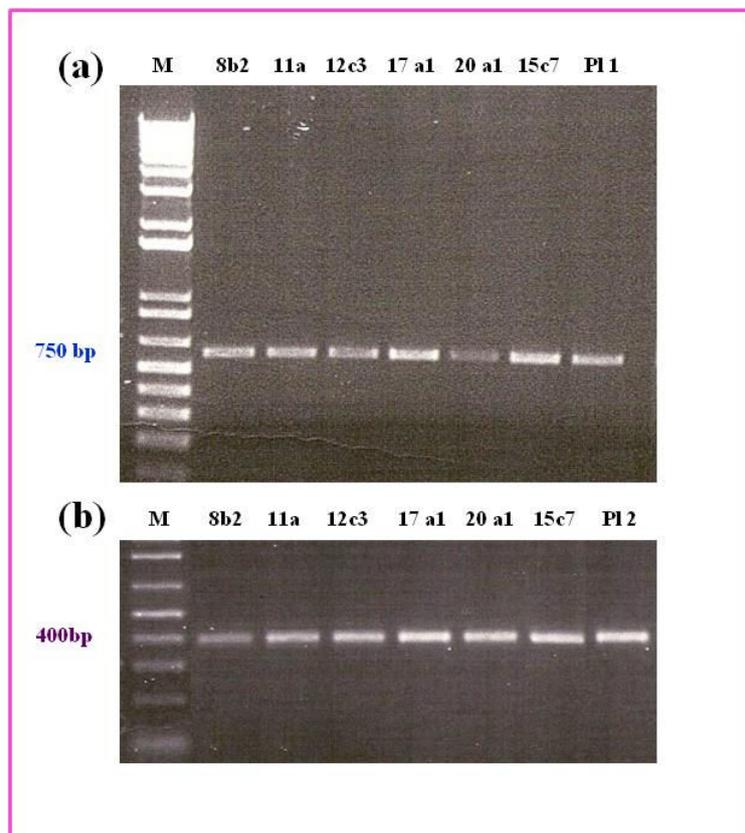


**Fig. 3.19** – Spettro di massa del composto con tempo di ritenzione 52.09 minuti

Questi risultati indicano la presenza nel callo-AsOXA1, anche se in tracce, di composti triterpenici tipici del genere *Aster*.

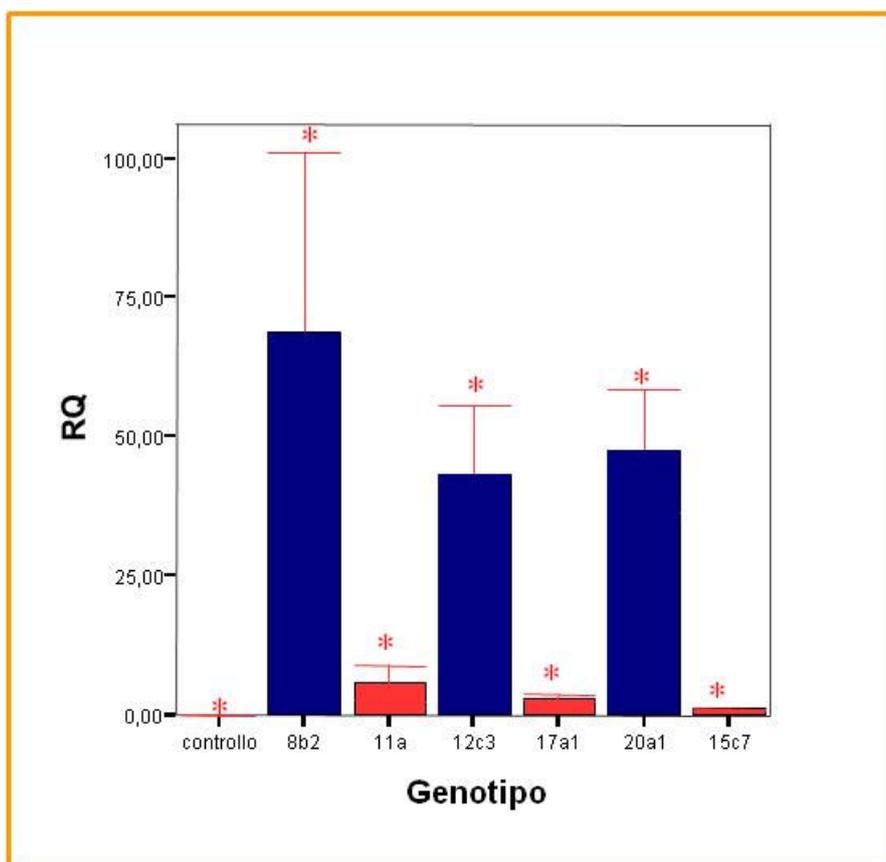
### 3.4.2 *Medicago truncatula* trasformata con CaMV35S::*AsOXA1*. Analisi molecolari e chimiche

*M. truncatula* Gaertn. (cv. Jemalong, linea R108) è stata sottoposta a trasformazione con il ceppo di *A. tumefaciens* EHA105-*AsOXA1* in collaborazione con il Dott. Confalonieri, presso il CRA, Istituto Sperimentale delle Colture Foraggere di Lodi. Sono state individuate tra quelle resistenti alla Kanamicina, sei linee indipendenti denominate 8b2, 11a, 12c3, 17a1, 20a1 e 15c7 che sono state micropropagate e coltivate in serra per ulteriori analisi. Tutte le linee selezionate hanno confermato l'integrazione del gene esogeno *AsOXA1* proveniente da *A. sedifolius*. Infatti tramite PCR sul DNA estratto da foglia è stato rilevato il gene *AsOXA1* corrispondente al prodotto di amplificazione di 400bp oltre al gene *NPTII* che conferisce la resistenza all'antibiotico (prodotto di amplificazione di 750bp) (Fig. 3.20).



**Fig. 3.20** – Prodotti di amplificazione della PCR sul DNA delle linee di *M. truncatula* sottoposti a trasformazione con EHA105-35S (a) e con EHA105-*AsOXA1* (b). **M**: marcatore molecolare; **8b2-11a-12c3-17a1-20a1-15c7**: linee transgeniche per il gene *NPTII* (a) e per *AsOXA1* (b); **PI 1**: plasmide CaMV35S; **PI 2**: plasmide CaMV35S::*AsOXA1*.

Allo scopo di valutare se esistevano differenze a livello di espressione del gene *AsOX1*, le sei linee sono state analizzate con Real Time PCR. I dati sono stati espressi mediante l'indice "Relative Quantity" (RQ), calcolato utilizzando come controllo endogeno l'amplicone per l'actina per normalizzare la quantità di mRNA. I risultati ottenuti hanno indicato che il gene *AsOX1*, assente nella linea controllo, si esprime nel tessuto fogliare delle linee trasformate e il livello di espressione del gene varia notevolmente tra le linee. Infatti, RQ di *AsOX1* ha un valore massimo di 69,02 nella linea 8b2 e uno minimo di 1,03 nella linea 15c7 rispetto alla linea non trasformata (Fig. 3.21).

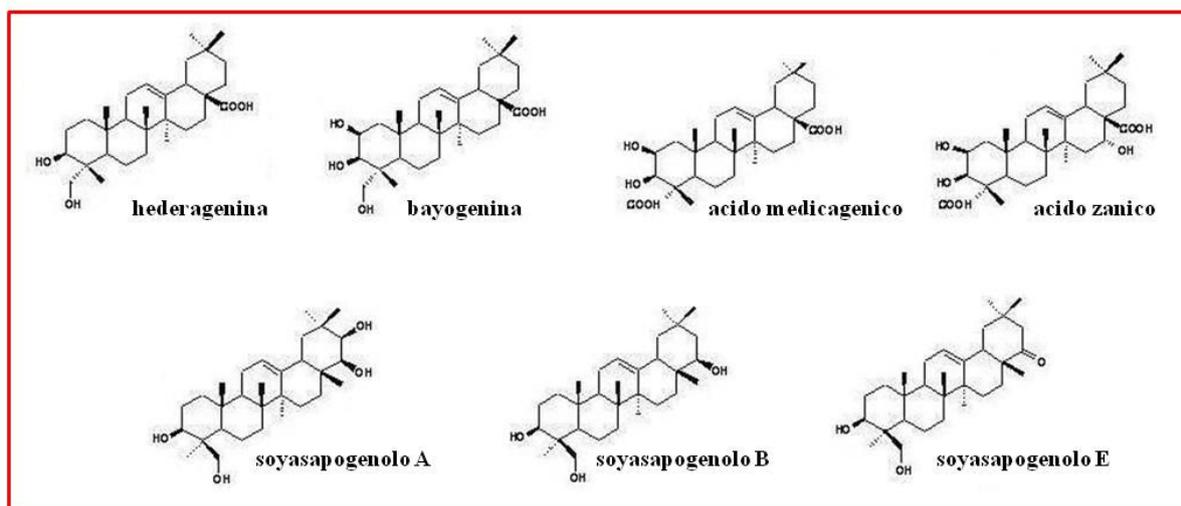


**Fig. 3.21** - Analisi di espressione mediante Real Time PCR del gene *AsOX1* nelle linee trasformate di *M. truncatula*.

Sono rappresentati la media e la deviazione standard di 3 esperimenti e di 3 repliche.

\* significativamente differenti per  $P \leq 0.05$ .

Le stesse linee trasformate sono state sottoposte ad analisi chimiche per rilevare il contenuto delle saponine triterpenoidiche e verificare la validità dell'intervento di ingegneria metabolica che dovrebbe portare ad un aumento della sapogenina, cioè la porzione agliconica triterpenica della saponina, la cui produzione è catalizzata dalla  $\beta$ -amirina sintasi (*AsOX1*). Le analisi chimiche sono state condotte dal Dott. Tava, presso il CRA, Istituto Sperimentale delle Colture Foraggere di Lodi, che ha valutato il contenuto delle principali sapogenine prodotte da *M. truncatula* isolate in seguito ad idrolisi degli estratti. La struttura delle sapogenine prese in esame è rappresentata in Figura 3.22.



**Fig. 3.22** – Struttura chimica delle sapogenine individuate nelle linee di *M. truncatula* sottoposte a trasformazione con EHA105-AsOX1.

Il contenuto totale e quello delle singole sapogenine è stato valutato separatamente sia in foglia che in radice. Il contenuto totale di sapogenine nelle foglie generalmente aumenta in tutte le linee trasformate e varia da un valore minimo di 4,31 mg/g di peso secco della linea 8b2 ad un massimo di 5,22 mg/g di peso secco della linea 12c3 (Tab. 3.4). Tuttavia l'analisi statistica ha rilevato una differenza significativa ( $P \leq 0.05$ ) solo nella linea 12c3 rispetto al controllo non trasformato. Per quanto riguarda il contenuto delle singole sapogenine nelle foglie delle linee trasformate, si evidenzia che nelle linee 11a e 12c3 i valori dell'acido zanico rispettivamente di 2,60 mg/g di peso secco e 2,58 mg/g di peso secco risultano significativamente differenti rispetto al controllo.

**Tabella 3.4** – Contenuto di sapogenine nelle foglie del controllo (ctr) e delle linee transgeniche di *M. truncatula*.

Sapogenina	ctr	15c7	8b2	11a	12c3	17a1	21a1
hederagenina	0.079 ± 0.008	0.100 ± 0.012	0.093 ± 0.034	0.056 ± 0.014	0.103 ± 0.048	0.113 ± 0.012	0.516 ± 0.009
bayogenina	0.092 ± 0.026	0.061 ± 0.009	0.058 ± 0.011	0.064 ± 0.033	0.133 ± 0.064	0.076 ± 0.090	0.061 ± 0.013
acido medicagenico	1.162 ± 0.012	1.188 ± 0.197	1.320 ± 0.171	1.420 ± 0.402	1.692 ± 0.402	1.372 ± 0.322	1.362 ± 0.163
acido zanico	1.696 ± 0.107	2.606 ± 0.264 *	2.272 ± 0.264	2.415 ± 0.658	2.585 ± 0.511 *	2.228 ± 0.085	2.266 ± 0.331
soyasapogenolo A	0.064 ± 0.043	0.074 ± 0.011	0.109 ± 0.022	0.057 ± 0.020	0.091 ± 0.040	0.094 ± 0.043	0.090 ± 0.046
soyasapogenolo B	0.458 ± 0.052	0.55 ± 0.048	0.488 ± 0.138	0.370 ± 0.097	0.618 ± 0.253	0.615 ± 0.070	0.516 ± 0.039
<b>sapogenine TOTALI</b>	<b>3.551 ± 0.105</b>	<b>4.576 ± 0.453</b>	<b>4.431 ± 0.175</b>	<b>4.382 ± 1.665</b>	<b>5.221 ± 1.204 *</b>	<b>4.498 ± 0.433</b>	<b>4.390 ± 0.387</b>

I dati rappresentano la media dei valori (mg/g di peso secco) + la SD di 3 repliche.

\* significativamente differenti dal controllo per  $P \leq 0.05$ .

Nelle radici si è verificato un aumento significativo rispetto al controllo per quanto riguarda il contenuto di alcune sapogenine, soprattutto nella linea 15c7. In particolare la quantità di bayogenina (0,3 mg/g di peso secco) è incrementata di 30 volte, quella dell'acido medicagenico (1,35 mg/g di peso secco) di circa 6 volte e quello dell'acido zanico (0,46 mg/g di peso secco) di 4 volte rispetto alla linea non trasformata (Tab. 3.5).

**Tabella 3.5** – Contenuto di sapogenine nelle radici del controllo (ctr) e delle linee transgeniche di *M. truncatula*.

I dati rappresentano la media dei valori (mg/g di peso secco) + la SD di 3 repliche.

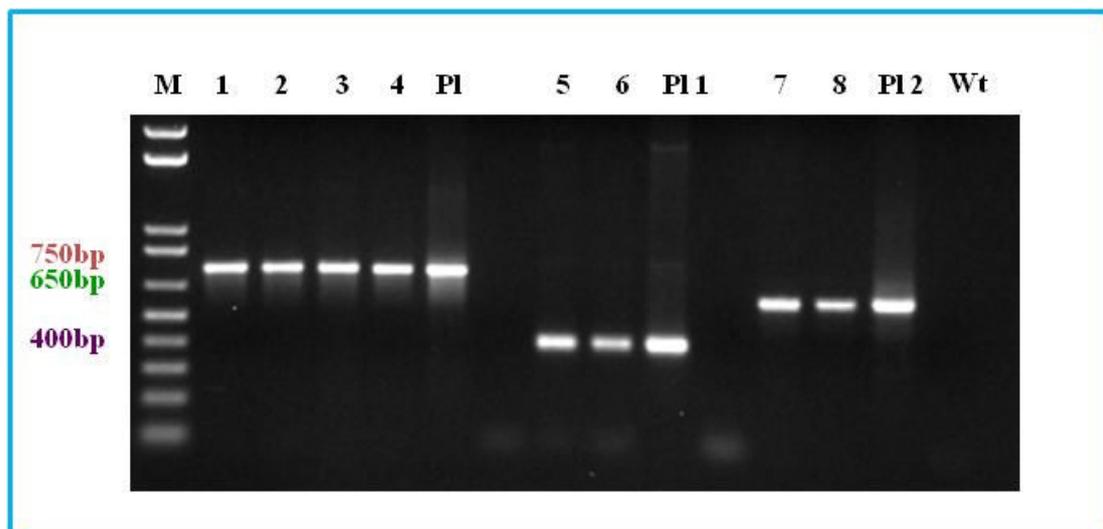
\* significativamente differenti dal controllo per  $P \leq 0.05$ .

sapogenina	ctr	15c7	8b2	11a	12c3	17a1	21a1
hederagenina	0.29 ± 0.089	0.33 ± 0.145	0.19 ± 0.201	0.13 ± 0.044	0.38 ± 0.04	0.24 ± 0.123	1.19 ± 0.028
bayogenina	0.01 ± 0.002	0.30 ± 0.155 *	0.01 ± 0.002	0.01 ± 0.008	0.02 ± 0.005	0.01 ± 0.004	0.01 ± 0.003
acido medicagenico	0.22 ± 0.094	1.35 ± 0.611 *	0.28 ± 0.116	0.47 ± 0.251	0.39 ± 0.290	0.28 ± 0.05	0.22 ± 0.092
acido zanico	0.11 ± 0.180	0.46 ± 0.080 *	0.12 ± 0.080	0.07 ± 0.020	0.14 ± 0.060	0.13 ± 0.04	0.14 ± 0.030
soyasapogenolo A	0.82 ± 0.293	0.02 ± 0.004	0.92 ± 0.446	1.37 ± 0.675	1.10 ± 0.871	0.87 ± 0.059	0.51 ± 0.238
soyasapogenolo B	1.23 ± 0.347	1.67 ± 0.207	1.33 ± 0.592	0.90 ± 0.154	1.72 ± 0.215	1.11 ± 0.421	1.19 ± 0.290
soyasapogenolo E	0.21 ± 0.070	0.19 ± 0.051	0.10 ± 0.025	0.09 ± 0.025	0.22 ± 0.152	0.20 ± 0.06	0.15 ± 0.025
<b>sapogenine TOTALI</b>	<b>2.89 ± 0.864</b>	<b>4.31 ± 1.344</b>	<b>3.02 ± 1.530</b>	<b>3.05 ± 0.988</b>	<b>3.96 ± 1.260</b>	<b>2.83 ± 0.628</b>	<b>2.34 ± 0.696</b>

L' espressione di *AsOXAI* ha determinato, quindi, una maggiore produzione di alcune sapogenine in *M. truncatula* sebbene le linee trasformate che mostrano l'incremento significativo non siano quelle con l'espressione più alta.

### 3.4.3 *Arabidopsis thaliana* trasformata con CaMV35S::*AsOXA1*. Analisi molecolari

La trasformazione di *A. thaliana* (Col-0) è stata eseguita presso il laboratorio del prof. R. Bressan, Dept. of Horticulture and Landscape Architecture della Purdue University, Indiana (USA), mediante il metodo denominato “Spray” sui bocci fiorali (Chung *et al.*, 2000). Per la trasformazione è stata usata una sospensione di *A. tumefaciens*, ceppo GV3101-*AsOXA1* e GV3101-35S. I semi ottenuti dalle piante sottoposte a trasformazione sono stati disposti su mezzo selettivo contenente kanamicina. In questo modo sono state selezionate 10 piante putativamente trasformate con GV3101-*AsOXA1* e 10 piante con GV3101-35S. Per verificare l’effettiva integrazione dei costrutti, il DNA proveniente dai putativi trasformanti nella generazione T<sub>0</sub> è stato sottoposto ad analisi PCR con i primer RT1/RT2 e NPTII F/NPTII R (Tab. 2.1) per i trasformanti con GV3101-*AsOXA1* e con i primer 35S F/35S R (Tab 2.1) per i trasformanti con GV3101-35S. In Figura 3.23 è riportata l’analisi con i relativi prodotti di amplificazione di due delle dieci piante selezionate per ogni trasformazione.



**Figura 3.23** – Prodotti di amplificazione della PCR condotta sul DNA delle piante T<sub>0</sub> trasformate di *Arabidopsis thaliana*.

**M:** marcatore molecolare; **1-4:** Piante transgeniche per il gene *NPTII*; **5-6:** Piante transgeniche per il gene *AsOXA1*; **PI 1:** plasmide CaMV35S::*AsOXA1* usato per la trasformazione; **7-8:** Piante transgeniche positive alla presenza di CaMV35S; **PI 2:** plasmide CaMV35S usato per la trasformazione; **Wt:** Pianta controllo non trasformata.

Tutte le piante selezionate presentano il gene che conferisce la resistenza alla Kanamicina, e sia quelle trasformate con GV3101-AsOXA1 che quelle trasformate con GV3101-35S presentano il prodotto di amplificazione atteso così da confermare l'avvenuta trasformazione. Per ottenere le linee omozigoti con una singola copia del transgene le piante che nella generazione  $T_0$  sono risultate effettivamente transgeniche sia per CaMV35S::*AsOXA1* che per il 35S senza il gene sono state autofecondate. Nella generazione  $T_1$  sono state identificate le linee che mostravano il rapporto di segregazione 3:1. Nella generazione successiva è stata individuata, per ogni tipo di trasformante, una linea omozigote, che ha mostrato progenie uniformemente resistenti alla Kanamicina. La specie modello *A. thaliana* è un eccellente sistema genetico che può consentire analisi combinate del genoma, del trascrittoma e del metaboloma, in modo tale che attraverso l'elaborazione dei dati e l'integrazione con le sequenze del genoma si potranno valutare gli effetti che la sovraespressione di *AsOXA1* ha causato sul pathway biosintetico dei terpeni in *A. thaliana* ed, eventualmente, su altri pathway.

## 4. DISCUSSIONE

### 4.1 Attività biologica contro insetti e nematodi e valutazioni tossicologiche delle saponine di *Aster sedifolius*.

Nell'ambito della presente tesi di dottorato, sono stati condotti saggi di attività biologica nei confronti di insetti e nematodi oltre ad una valutazione tossicologica delle saponine triterpenoidiche di *Aster sedifolius*, appartenente alla famiglia delle Asteraceae, notoriamente una delle maggiori fonti di questi metaboliti. Si tratta di indagini preliminari nella prospettiva di utilizzare le saponine come pesticidi di origine naturale. Le saponine triterpenoidiche risultano, infatti, estremamente interessanti in campo agrochimico perché implicate nei meccanismi di difesa della pianta; esse giocano un ruolo importante contro funghi (Osburn, 2003), batteri (Fons *et al.*, 2003), insetti (Harmatha, 2000) e nematodi (Chitwood, 2002). In particolare, in *A. sedifolius* sono state identificate tre nuove saponine triterpenoidiche, Astersedifolioside A, B, C (Corea *et al.*, 2004), che inibiscono la crescita di diversi funghi fitopatogeni e del batterio *Xanthomonas campestris* (Cammарeri *et al.*, 2003).

Per saggiare la risposta contro gli insetti, i biosaggi sono stati condotti sull'insetto *Tenebrio molitor* (Coleoptera Tenebrionidae) con i macinati provenienti da foglia e radice di *A. sedifolius*. Il *T. molitor* è tra gli insetti maggiormente utilizzati per verificare l'attività biologica di metaboliti incluso quelli strutturalmente correlati alle saponine (Camps *et al.*, 1991; La Font *et al.*, 1989; Belles *et al.*, 1985). In questo modo è stata valutata l'attività antinutritiva dei clerodani diterpenoidici confrontandola con quella dei withanolidi e delle azadiractine (Enriz *et al.*, 2000). In questa tesi è risultata positiva l'attività biologica contro *T. molitor* dei macinati di *A. sedifolius* poiché si verificano significative riduzioni sia del peso delle larve alimentate con i macinati che del peso delle pupe. Sebbene non sia ancora possibile attribuire l'effetto ad una determinata sostanza, si può ipotizzare che l'attività dei macinati contro l'insetto dipenda dall'elevata presenza di saponine biologicamente attive dell'*A. sedifolius*. In *Medicago sativa*, specie ricca di saponine triterpenoidiche,

è stata dimostrata la correlazione tra la crescita del *T. molitor* e il contenuto di saponine. In particolare il maggior effetto antinutrizionale è stato attribuito ai glicosidi dell'acido medicagenico. Inoltre, è interessante notare che alti livelli di espressione in *M. truncatula* di  $\beta$ -amirina sintasi sono associati all'attacco del *T. molitor* (Suzuki *et al.*, 2002).

In questo lavoro di tesi è stata valutata anche l'attività nematocida dei macinati derivati dalle foglie e dalle radici di *A. sedifolius*, oltrechè di *A. caucasicus*, nei confronti del nematode *Meloidogyne javanica*, che determina la formazione di galle sulle radici di pomodoro (Ladner *et al.*, 2008). Nuovamente si evidenzia una attività positiva con la diminuzione del numero di femmine e, conseguentemente, di masse d'uova di *M. javanica* sulle radici di pomodoro in presenza dei macinati di *Aster*.

In letteratura, i dati dell'attività nematocida delle saponine riguardano principalmente gli estratti di *Quillaria saponaria*. Precedenti studi *in vivo* e *in vitro* hanno dimostrato che le saponine di *Q. saponaria* riducono la popolazione totale di *M. javanica*, il numero delle masse d'uova e lo stadio larvale (Omar *et al.*, 1994). Formulati contenenti polifenoli e saponine di *Q. saponaria* dimostrano, contro diverse specie di nematodi, l'efficacia degli estratti di saponine a dosi economicamente convenienti, soprattutto nell'utilizzazione del formulato a composizione mista (6% di polifenoli e 25% di saponine) per un effetto sinergico (San Martin e Magnunacelaya, 2005). E' stata anche dimostrata l'attività nematocida delle saponine di *Medicago arborea*, *M. arabica* e *M. sativa* contro il nematode *Xiphinema index*, e l'attività delle prosapogenine e delle sapogenine ad esse correlate. I saggi con le sapogenine hanno dimostrato la relazione dell'attività nematocida di *M. sativa* e di *M. arborea* con il contenuto dei loro principali agliconi, rispettivamente acido medicagenico ed hederagenico (Argentieri *et al.*, 2008). L'attività nematocida è stata determinata anche per gli ammendanti organici provenienti da diverse parti delle piante di alcune specie appartenenti alla famiglia delle *Asteraceae* contro *Meloidogyne artiellia* (Perez *et al.*, 2003). L'effetto sui nematodi dei prodotti estratti da foglie e semi di *Azadirachta indica*, comunemente

noto come albero del Neem, sono stati rilevati dopo la loro incorporazione nel suolo e durante la loro decomposizione per cui l'attività è stata attribuita al rilascio di composti ad azione nematocida (Akthtar, 2000).

Il meccanismo di azione delle saponine è generalmente legato all'interazione con le membrane cellulari, delle quali modificano la permeabilità (Tava e Avato, 2006). Studi condotti con le saponine provenienti da *Q. saponaria* e da semi di soia hanno mostrato che questi composti sono in grado di interagire con le proteine (Heng *et al.*, 2004; Ikedo *et al.*, 1996; Potter *et al.*, 1993). Considerando che per la sopravvivenza dei nematodi è critica l'integrità della cuticola protettiva, una matrice extracellulare del loro esoscheletro principalmente composta da collagene (Page e Winter, 2003), è ragionevole ipotizzare che l'interazione delle saponine con le proteine del collagene possa essere responsabile dell'effetto nematocida. Per questi motivi è possibile che l'azione dei macinati di *Aster* si espliciti soprattutto grazie alle saponine e che queste abbiano una maggiore influenza sul numero di femmine adulte di *Meloidogyne javanica*. Dai dati riportati in questa tesi è possibile concludere che *A. sedifolius* ha maggiore attività contro i nematodi rispetto ad *A. caucasicus*. Questi risultati possono essere attribuiti alla differenza dei metaboliti presenti nelle due specie. Infatti in *A. sedifolius* è stata dimostrata la prevalenza di saponine triterpenoidiche con un contenuto totale degli Astersedifoliosidi A, B e C, pari a 13.8 mg/g di peso secco nelle foglie (Cammareri *et al.*, 2004) e di 139.1 mg/g di peso secco nelle radici (Cammareri *et al.*, 2008). Al contrario, in seguito alle analisi chimiche condotte sugli estratti di foglia di *A. caucasicus*, riportate in dettaglio nel paragrafo 3.4.1, *A. caucasicus* produce prevalentemente derivati dell'acido quinico e sorprendentemente non produce saponine triterpenoidiche.

La valutazione delle saponine pure nei confronti dei nematodi chiarirà se queste sostanze possono essere usate in maniera diretta contro i nematodi o, alternativamente, fornire il modello di struttura chimica per lo sviluppo di derivati sintetici eco-compatibili. Considerando le perdite economiche derivanti dagli attacchi dei nematodi nei confronti delle colture agrarie dovute alla diminuzione della resa e

della qualità, ai costi per il controllo e per i mancati introiti determinati dalla necessità di effettuare la rotazione con colture di minore reddito, assume particolare valenza l'interesse verso l'individuazione di composti eco-compatibili.

La ricerca e l'utilizzo di nuovi biopesticidi va nella direzione di evitare i maggiori svantaggi dei pesticidi di sintesi e dei deterrenti con la nuova consapevolezza dei rischi per l'uomo e per l'equilibrio biologico sulla terra e della loro tutela. Di conseguenza, prima di essere utilizzati tali prodotti devono essere sottoposti a ricerche tossicologiche complete tali da permettere una valutazione dei rischi effettivi per la salute dell'uomo e l'ambiente. In questa tesi, ci siamo occupati del primo aspetto, cioè di valutare la tossicità delle saponine tramite saggi tossicologici *in vitro* ed *in vivo* sui topi con gli estratti ottenuti dalle foglie di *A. sedifolius*. I risultati relativi alla tossicità acuta degli estratti di *A. sedifolius* concordano con quelli riportati per gli estratti di *Azadirachta indica*, una specie che fornisce molti agrofarmaci naturali. I composti degli estratti non acquosi sembrano essere più tossici di quelli degli estratti acquosi; comunque, la maggior parte dei composti puri tra cui le azadiractine hanno mostrato una bassa tossicità (15 mg/Kg al giorno), quando somministrati oralmente agli animali (Boeke *et al.*, 2004). Anche gli studi di tossicità cronica degli estratti di *A. sedifolius* hanno dimostrato l'innocuità degli estratti confermando le numerose evidenze presenti in letteratura della "non tossicità" delle saponine. Per esempio, ginsenosidi da *Panax ginseng* e l' $\alpha$ -hederina da *Kalopanax pictus* non hanno mostrato tossicità, ma addirittura, a basse concentrazioni, hanno aumentato la capacità di assorbimento intestinale sui topi. Allo stesso modo è stato dimostrato che le saponine estratte dalle radici di *Aralia elata* non solo non sono tossiche nei confronti della linea cellulare Caco-2, ma la somministrazione orale ai topi (250 mg/Kg) ha determinato un aumento della capacità di assorbimento intestinale mentre i tessuti gastrointestinali sono rimasti normali (Sim *et al.*, 2005). Le soyasaponine, purificate da diverse varietà di soia, non hanno effetti negativi sulla crescita dei topi, sul peso degli organi e sulla morfologia intestinale quando la dieta somministrata contiene saponine fino al 3% del loro peso

(MacDonald *et al.*, 2005). Queste evidenze ed i risultati ottenuti nell'ambito di questa tesi sono incoraggianti per l'uso come biopesticidi delle saponine o di estratti vegetali che le contengano in quanto sono compatibili con la salute dell'uomo.

#### **4.2 Analisi funzionale del gene *AsOXAI* codificante una $\beta$ -amirina sintasi**

L'attività di ricerca del dottorato si è concentrata sull'ingegneria genetica del pathway delle saponine triterpenoidiche ed, in particolare, sulla parte agliconica, cioè il triterpene, prendendo in considerazione il gene della triterpene ciclasi che nella biosintesi dei triterpeni rappresenta l'enzima chiave. Questo interviene, infatti, nella ciclizzazione del 2,3-ossidosqualene per strutturare lo scheletro pentaciclico. Il gene utilizzato in questa tesi è *AsOXAI* (GenBank AY836006) isolato da *Aster sedifolius* mediante una strategia basata sull'omologia di sequenza (Cammарeri *et al.*, 2008).

Nella presente tesi è stata dimostrata tramite la trasformazione del lievito *Saccharomyces cerevisiae* la funzione di *AsOXAI* dedotta in precedenza con l'analisi bioinformatica. Infatti, le analisi biochimiche hanno individuato nel lievito trasformato la presenza del triterpene  $\beta$ -amirina confermando la funzione di  $\beta$ -amirina sintasi del gene *AsOXAI* (Cammарeri *et al.*, 2008). La complementazione mediante espressione del c-DNA full-length in lievito è stata comunemente usata per confermare la funzione di altri geni della famiglia delle ossidosqualene Ciclasi (OSC), alla quale appartiene anche *AsOXAI*, in diverse specie vegetali (Kushiro *et al.*, 1998; Hayashi *et al.*, 2001; Guhling *et al.*, 2006; Sawai *et al.*, 2006).

La sequenza aminoacidica dedotta di *AsOXAI* mostra i motivi QW e DCTAE altamente conservati anche in altre triterpene sintasi. L'analisi mutazionale su altre OSC ha evidenziato che il motivo DCTAE è necessario per legare il substrato, mentre quello QW sembra essere importante per la struttura della proteina, la stabilità e l'attività catalitica (Haralampidis *et al.*, 2002). Il confronto delle sequenze nucleotidica e aminoacidica di *AsOXAI* con quelle presenti nelle banche dati ha mostrato un alto livello di identità (79%) con PNY2, una  $\beta$ -amirina sintasi di *P. ginseng* (Kushiro *et al.*, 1998). Inoltre la similarità di *AsOXAI* sia con una lupeolo

che con una cicloartenolo sintasi è un ulteriore contributo all'ipotesi che le OSC del pathway dei triterpeni e degli steroli hanno un'origine ancestrale comune (Haralampidis *et al.*, 2002). Infatti in *Panax ginseng* (Kushiro *et al.*, 1998), in *Olea europea* e *Taraxacum officinalis* (Shibuya *et al.* 1999) è stata dimostrata una stretta relazione evuzionistica tra la biosintesi dei triterpeni e quella degli steroli. La similarità di *AsOX1* è stata riscontrata anche con altre tre OSC di *A. thaliana*, quali AtLUP1 (70%), AtLUP2 (67%) e AtCAS1 (57%). In lievito AtLUP1 produce prevalentemente lupeolo oltre a piccole quantità di prodotti triterpenici tra cui la  $\beta$ -amirina, mentre AtLUP2 codifica per un enzima multifunzionale che determina la formazione di una miscela formata da più di 9 differenti prodotti triterpenici (Kushiro *et al.*, 2000).

I triterpeni quando legati a molecole di zuccheri formano le saponine triterpenoidiche le quali risultano composti di notevole interesse con molteplici attività biologiche. Tra queste la protezione contro l'attacco dei patogeni è stata illustrata nel paragrafo precedente mentre le principali attività farmacologiche sono quelle anticolesterolemica, emolitica, adjuvante e antitumorale (Roberts, 2007). Generalmente i triterpeni rappresentano meno del 2-3% del peso secco totale (Roberts, 2007). Per aumentare la produzione di questi interessanti metaboliti oltrechè studiare la loro biosintesi e regolazione possono essere applicate diverse strategie di ingegneria metabolica (Morandini e Salamini, 2003). L'approccio più semplice riguarda il potenziamento di espressione di un gene, in genere quello codificante l'enzima limitante (Oksman-Caldentey e Saito, 2005). La strategia adottata in questa tesi si è basata sulla sovraespressione del gene *AsOX1* il cui cDNA full-length è stato inserito in un vettore di espressione sotto il controllo del promotore costitutivo del Virus del Mosaico del Cavolfiore, CaMV35S. *A. tumefaciens* recante CaMV35S::*AsOX1* è stato utilizzato per la trasformazione di diverse specie quali *Aster caucasicus*, *Medicago truncatula* e *Arabidopsis thaliana* i cui risultati sono di seguito discussi.

### 4.3 Interventi di ingegneria genetica in *Aster caucasicus* per la produzione di metaboliti bioattivi

La scelta di *A. caucasicus* per la trasformazione con il gene *AsOXAI* si è resa necessaria a causa della difficile manipolazione *in vitro* di *A. sedifolius*. In *A. caucasicus*, quindi, è stato messo a punto un metodo efficiente di produzione di callo da espianti fogliari e un metodo di trasformazione mediante *A. tumefaciens*. In questo modo è stato possibile ottenere calli trasformati con il gene *AsOXAI*.

Prima di caratterizzare i metaboliti presenti nel materiale trasformato, si è reso necessario studiare la composizione chimica delle foglie di *A. caucasicus* di cui non erano disponibili in letteratura informazioni sul biochimismo secondario. Lo studio fitochimico degli estratti di *A. caucasicus* ha evidenziato la presenza come metaboliti principali i derivati esteri dell'acido quinico. E' riportato che questa classe di composti è presente nel genere *Aster* (Clifford *et al.*, 2003); in particolare l'*Aster scaber* produce l'acido 3,5-dicaffeoylquinico, l'acido 5-dicaffeoylquinico e l'acido 4,5-dicaffeoylquinico (Kwon *et al.*, 2000; Hur *et al.*, 2004). Gli esteri formati tra l'acido quinico e alcuni acidi *trans* cinnamici, o più comunemente l'acido caffeico, *p*-coumarico e ferulico, costituiscono la famiglia degli acidi clorogenici (Clifford, 2000). Nei bocci fiorali dell'*Aster ageratoides* Turcz. sono stati trovati 33 acidi clorogenici, il cui contenuto e la cui localizzazione risultano particolarmente variabili tra varietà della stessa specie (*A. ageratoides* Turcz. var. Gerla) o rispetto alla specie *Aster kalimeris indica* (Clifford *et al.*, 2006). Grazie alle loro proprietà antiossidanti e antibiotiche, questi composti sono coinvolti in numerose funzioni biologiche nelle piante, e principalmente nelle interazioni con predatori e agenti patogeni (Matsuda *et al.*, 2003; Szalma *et al.*, 2005). L'acido clorogenico sembra essere coinvolto anche in risposta a differenti stress abiotici. Un aumento del suo contenuto è stato notato in *Mahonia repens* in risposta alla siccità (Grace *et al.*, 1998) e in *Betula pendula* soggetta ad irradiazioni (Tegelberg *et al.*, 2004). Gli acidi caffeoylquinici di *Coffea canephora* i quali sono localizzati in foglia durante lo sviluppo sono strettamente associati allo stadio giovanile delle foglie, in particolare ai cloroplasti, suggerendo

una funzione protettiva nei confronti dei danni indotti dalla luce (Mondolot *et al.*, 2006).

Sorprendentemente le analisi chimiche sulla foglia di *A. caucasicus* non hanno individuato saponine triterpenoidiche, metaboliti secondari caratteristici del genere *Aster*.

Dall'analisi HPLC-DAD condotta sul callo non trasformato ottenuto dagli espianti fogliari di *A. caucasicus* è emerso che i metaboliti secondari principali erano gli stessi trovati in foglia, ma in quantità decisamente inferiore. E' noto che le colture vegetali, in particolare il callo, talvolta possono avere un profilo dei metaboliti secondari diverso dalla pianta da cui provengono perché producono quantità trascurabili o non producono affatto, nemmeno in tracce, i metaboliti originari o, addirittura, producono metaboliti diversi. Un esempio è rappresentato dalla *Glycyrrhiza glabra* le cui colture cellulari non producono glycyrrizzina, la principale saponina triterpenoidica prodotta dalla pianta di origine, ma producono acido betulinico e soyasaponina I. Un altro esempio sono le colture cellulari di *Olea europea* che producono maggiormente triterpeni di tipo ursanico, che sono presenti in tracce nella pianta madre, piuttosto che triterpeni di tipo oleanico che sono prevalenti in essa (Saimaru *et al.*, 2007).

Sul callo di *A. caucasicus* trasformato con *AsOXAI* l'analisi dei metaboliti condotta in questa tesi ha rilevato la presenza di tracce di composti triterpenici, tipici del genere *Aster*, ma soprattutto dei metaboliti tipici di *A. caucasicus* simili a quelli prodotti in foglia e nel callo non trasformato, ma in quantità maggiore rispetto a entrambi. L'aumento del contenuto di quest'ultimi metaboliti sembra, quindi, attribuibile all'intervento di ingegneria genetica. Tuttavia non ci sono evidenze che la via biosintetica dei triterpeni, in cui è coinvolto il gene *AsOXAI*, sia collegata a quella degli acidi quinici. La relazione potrebbe essere indiretta. L'inserimento del gene *AsOXAI* nel callo di *A. caucasicus* ha in qualche modo aumentato l'attività metabolica agendo probabilmente sulla divisione cellulare in cui è coinvolta la produzione degli acidi quinici. Un aumento della sintesi di alcaloidi indolici è stato

descritto nello sviluppo di giovani foglie in *Catharanthus roseus*, particolarmente nelle zone in attiva divisione cellulare (St-Pierre *et al.*, 1999). Un'altra possibilità è che la trasformazione con *AsOXAI* induca una condizione di stress e, di conseguenza, aumenti gli acidi quinici che, come soprariportato, sono coinvolti, in quanto tali o nella forma di esteri, nelle risposte a stress biotici e abiotici. Comunque, il risultato inatteso dell'incremento della concentrazione degli acidi quinici attraverso l'ingegneria genetica con *AsOXAI* apre la prospettiva di utilizzare colture cellulari in grado di sintetizzare in quantità maggiori gli acidi caffeoylquinici, che attualmente non hanno convenienti fonti commerciali (Clifford, 2003).

Per l'altra modifica che ci si aspettava dall'ingegneria genetica con *AsOXAI* il gene ha indotto in *A. caucasicus* la biosintesi di triterpeni ma solo in quantità trascurabile. Nonostante i successi ottenuti in questi ultimi anni nell'ingegneria genetica, sembra chiaro che la manipolazione di un singolo gene può non essere sufficiente ad alterare il livello di produzione dei metaboliti secondari. Una strategia più efficiente potrebbe essere quella di sovraesprimere più geni a diversi step cruciali del pathway o sottoesprimere geni antagonisti (Sato *et al.*, 2001; Morandini e Salamini, 2003).

#### **4.4 Effetti dell'espressione costitutiva del gene *AsOXAI* sul pathway dei triterpeni in *Medicago truncatula***

In questo lavoro di tesi, il gene *AsOXAI* codificante una  $\beta$ -amirina sintasi isolato da *A. sedifolius* (Cammarelli *et al.*, 2008) è stato trasferito in *M. truncatula*. È stato dimostrato che l'espressione costitutiva del gene *AsOXAI* in *M. truncatula* influenza i livelli di produzione di alcune sapogenine nell'ambito del pathway biosintetico dei triterpeni, questo è un effetto coerente con la funzione di *AsOXAI* di catalizzatore della produzione della porzione agliconica triterpenica delle saponine in *Aster*. Il contenuto totale di sapogenine nelle foglie delle piante trasformate aumenta ed, in particolare, nella linea 12c3 si osserva un incremento del 32%. In particolare, incrementa del 39% la quantità di acido zanico sia nella linea 12c3 che nella 15c7.

L'acido zanico oltre al medicagenico è tra le sapogenine più rappresentative nelle parti aeree di *M. truncatula* (Kapusta *et al.*, 2005a, 2005b).

Anche nelle radici delle piante trasformate si è verificato un aumento significativo del contenuto di alcune sapogenine soprattutto nella linea 15c7. In particolare, rispetto alla linea non trasformata, sono incrementate le quantità di bayogenina di 30 volte, dell'acido zanico di 4 volte e dell'acido medicagenico di circa 6 volte. Queste tre sapogenine sono triterpeni che condividono il gruppo COOH in posizione 28 ed un maggiore pattern di ossidrilazione. Considerando l'aumento delle sapogenine sia nelle foglie che nelle radici di *M. truncatula*, si può concludere che il substrato della  $\beta$ -amirina sintasi non è limitante in *M. truncatula* e che questo approccio basato sull'espressione ectopica di una OSC è un intervento valido di ingegneria metabolica. In *Panax ginseng* era stato ottenuto un aumento della biosintesi di triterpeni (fino a 3 volte) oltre che di fitosterolo, mediante la trasformazione di radici avventizie con il gene della squalene sintasi (*PgSSI*) sotto il controllo del promotore CaMV35S. Il gene *PgSSI* era stato anche trasferito nel *Siberian ginseng* (*Eleutherococcus senticosus*) e le piante transgeniche avevano accumulato una quantità di saponine triterpenoidiche di 2,5 volte maggiore del controllo (Seo *et al.*, 2005). Si era dimostrato, quindi, che la squalene sintasi interviene anche nella biosintesi dei fitosteroli che condividono con i triterpeni lo squalene come intermedio metabolico, e che interventi di ingegneria metabolica con *PgSSI* portano ad una iperproduzione di saponine triterpenoidiche in *P. ginseng* (Lee *et al.*, 2004) e nel *Siberian ginseng* (Seo *et al.*, 2005). *PgSSI* interviene nel pathway ad uno step precedente rispetto alla OSC descritta in questa tesi. Quest'ultima si rivela più efficiente nell'aumentare la produzione di triterpeni. I motivi possono dipendere oltre che dall'enzima anche da altri fattori correlati alla fisiologia delle specie saggiate (perenne *vs* annuale), ai tessuti analizzati (radici avventizie *vs* foglie e radici) e alle condizioni di crescita (*in vitro vs in vivo*).

Il confronto dei dati relativi al contenuto di sapogenine con quelli riguardanti i livelli di espressione del gene *AsOXAI* non ha indicato una corrispondenza tra la

quantità di sapogenine e il livello di trascritti. Infatti, la linea 15c7 che risulta avere il maggiore contenuto di diverse sapogenine nelle radici oltrechè di acido zanico nelle foglie è quella che ha mostrato il più basso livello di espressione. Questo risultato non è sorprendente perché sono numerosi gli esempi in cui un aumento dei livelli di espressione oltre una determinata soglia porta al fenomeno di regolazione tipo l'inibizione da "feedback" (Verpoorte e Memelink, 2002).

I trasformanti di *M. truncatula* ottenuti in questa tesi apparentemente non mostrano differenze morfologiche rispetto al controllo. Diversi effetti fisiologici sulla regolazione della crescita delle piante sono associati alle saponine triterpenoidiche (Hoagland *et al.* 1996; Waller *et al.*, 1996; Tsurumi e Ishizawa, 1997; Ohara e Ohira, 2003). Sono noti i ruoli ecologici che i composti triterpenoidici prodotti dalle piante rivestono nell'interazione con l'ambiente (Aharoni *et al.*, 2005). In particolare è stato studiato il ruolo delle saponine prodotte da *M. truncatula* come agenti allelopatici (Tava e Avato, 2006). Inoltre in un genotipo di *M. truncatula*, diverso da quello usato in questa tesi, trasformato con *AsOXAI* è stata dimostrata una correlazione tra il contenuto di saponine nelle radici e l'aumento della nodulazione, suggerendo un intervento delle saponine anche nelle relazioni simbiotiche con *Rhizobium meliloti* (Confalonieri *et al.*, 2008). Inoltre ci sono evidenze per l'espressione nei noduli del gene *MtAMY1*, isolato da *M. truncatula*, che codifica per una  $\beta$ -amirina sintasi (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2003). Ulteriori studi dovranno essere condotti sui trasformanti di *M. truncatula* ottenuti in questa tesi per verificare se l'accumulo di saponine a livello radicale influenza il processo della nodulazione.

#### **4.5 Interventi di ingegneria genetica in *Arabidopsis thaliana* con il gene *AsOXAI***

Il progetto della presente tesi di dottorato ha previsto un intervento di ingegneria metabolica sul pathway dei triterpeni, tramite la sovraespressione del gene *AsOXAI*, anche in *A. thaliana* allo scopo di acquisire conoscenze a livello genetico su questo processo biosintetico. La specie modello *A. thaliana* è un eccellente sistema genetico che può consentire analisi combinate del genoma, del trascrittoma e del

metaboloma (Oksman-Caldentey *et al.*, 2004), soprattutto grazie alle caratteristiche ben note della specie, quali la dimensione ridotta del genoma, la cui sequenza è accessibile all'intera comunità scientifica (<http://www.arabidopsis.org>), le banche dati disponibili (<http://www.tigr.org>; <http://www.jcvi.org>), il ciclo vitale breve, la facilità di propagazione e di trasformazione. Con *A. thaliana* è possibile, quindi, in modo rapido generare trasformanti con alterazioni metaboliche nei diversi pathway (Lodeiro *et al.*, 2007). E' noto che in *A. thaliana* sono presenti i triterpeni. E' stato dimostrato, infatti, che *A. thaliana* ha la capacità di produrre 35 triterpeni, un sesto del totale dei triterpeni naturali attualmente conosciuti. Contestualmente è emerso che nel genoma di *A. thaliana* sono presenti 14 geni codificanti ossidosqualene ciclasi (OSC), 9 dei quali caratterizzati mediante espressione eterologa in lievito. Tra questi sono inclusi i geni che codificano per cicloartenolo sintasi e quattro geni che codificano per triterpene sintasi multifunzionali che espresse in lievito sono in grado di convertire il 2,3 ossidosqualene in una varietà di prodotti triterpenici come lupeolo,  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina (Haralampidis *et al.*, 2002; Ebizuka *et al.*, 2003; Xiang *et al.*, 2006). L'espressione eterologa di una delle OSC di *A. thaliana* ha permesso l'identificazione di un nuovo triterpene chiamato thalianolo (Fazio *et al.*, 2004). Recentemente è stata isolata un'altra OSC, la baruolo sintasi, che è in grado di formare per il 90% baruolo oltre a 22 prodotti minori (0.02 - 3%) (Lodeiro *et al.*, 2007). Il gruppo di OSC in *A. thaliana* è al momento il più numeroso e il più diversificato anche rispetto alle specie della famiglia delle Euphorbiaceae e delle Leguminosae che sono rinomate per la produzione dei triterpeni (Lodeiro *et al.*, 2007). Come riportato da Haralampidis *et al.* (2002), i geni che codificano per le OSC costituiscono generalmente una superfamiglia genica e ciascun gene può codificare differenti forme dell'enzima. In *A. thaliana* non ci sono evidenze che siano presenti saponine triterpenoidiche o triterpeni glicosilati (Jenner *et al.*, 2005). Comunque, *AsOX1* agisce sul pathway dei triterpeni indipendentemente dal fatto che in *Aster* questi servano alla formazione dell'aglicone delle saponine. Dalla trasformazione di *A. thaliana* con questo gene esogeno ci si aspetta una modifica del pathway biosintetico dei triterpeni, che

potrebbe determinare variazioni quantitative per uno o più triterpeni oppure la produzione di nuove molecole triterpeniche. Non si può escludere, comunque, che *AsOXAI* possa avere un effetto anche sul pathway degli steroli considerando l'omologia di *AsOXAI* con le cicloartenolo sintasi coinvolte nella formazione degli steroli. Inoltre *AsOXAI*, come gli altri enzimi OSC, agisce al bivio tra il metabolismo primario degli steroli e quello secondario. Per i motivi sopramenzionati e per il fatto che finora non sono riportate in *A. thaliana* modifiche che riguardino l'inserimento di geni coinvolti nel pathway dei triterpeni, l'ottenimento nell'ambito di questa tesi delle piante transgeniche CaMV35S::*AsOXAI*, come confermato dai risultati ottenuti in seguito alle analisi molecolari, rappresenta un materiale di notevole interesse. Attraverso approcci di trascrittomica e metabolomica sui trasformanti ottenuti in questa tesi si potranno valutare gli effetti che l'espressione costitutiva di *AsOXAI* causa sul pathway biosintetico dei terpeni in *A. thaliana* ed, eventualmente, su altri pathway. L'analisi funzionale potrà generare, quindi, una serie di dati che miglioreranno la comprensione della via biosintetica a cui appartiene il gene in oggetto oltrechè delle relazioni con altri pathway, la conoscenza sul ruolo di fattori di trascrizione coinvolti nel metabolismo secondario, la comprensione dei meccanismi di evoluzione che hanno portato alla diversità chimica e alla regolazione dei metaboliti secondari nelle piante.

Le ricadute di questo approccio potranno essere anche applicative; infatti, un intervento di ingegneria genetica sul pathway biosintetico degli isoprenoidi in *Arabidopsis* per la produzione del taxadiene, un noto agente chemioterapico, dimostra non solo che l'aumento della produzione dei taxoidi è fattibile ma che il sistema pianta risulta migliore, in questo caso, rispetto alla trasformazione di *E. coli* con lo stesso costrutto (Huang *et al.*, 2001; Besumbes *et al.*, 2004).

## 5. CONCLUSIONI

Il progetto della presente tesi di dottorato si è proposto di verificare la possibilità di impiegare le saponine triterpenoidiche estratte dall'*Aster* come biopesticidi e di definire una strategia genetica idonea a migliorare la produzione di triterpeni. L'attività svolta per il primo aspetto ha dato le seguenti indicazioni:

- la riproduzione del nematode galligeno *M. javanica* è significativamente compromessa utilizzando le farine di *A. sedifolius*, in saggi di attività *in vivo*;
- sono presenti nelle foglie e radici di *A. sedifolius* sostanze biologicamente attive in grado di interferire con il normale accrescimento dell'insetto *Tenebrio molitor*;
- gli estratti ottenuti dalle parti aeree di *A. sedifolius*, la miscela di saponine e l'astersedifolioside C non hanno mostrato effetti tossici sui topi *in vivo* anche a dosi elevate.

Per quanto riguarda l'espressione eterologa e gli interventi di ingegneria genetica realizzati in *Aster caucasicus*, *Medicago truncatula* e *Arabidopsis thaliana* con il gene *AsOXAI* isolato da *Aster sedifolius* sotto il controllo del promotore CaMV35S, gli esperimenti hanno consentito di concludere che:

- il gene *AsOXAI* codifica per una beta-amirina sintasi, come dimostrato dalla trasformazione del *Saccharomyces cerevisiae*;
- è stata messa a punto in *A. caucasicus* la metodologia di trasformazione genetica con *A. tumefaciens*;
- il callo transgenico di *A. caucasicus* produce una maggiore quantità di derivati esteri dell'acido quinico rispetto al non trasformato e, in tracce, alcuni triterpeni specifici del genere *Aster*;
- sono state ottenute linee transgeniche indipendenti CaMV35S::*AsOXAI* di *Medicago truncatula* (genotipo R108) che mostrano un incremento nella produzione di sapogenine;

- è stata ottenuta una linea omozigote transgenica CaMV35S::*AsOXAI* di *A. thaliana* sulla quale sono in corso le analisi chimiche.

I risultati conseguiti con la presente tesi di dottorato indicano che esiste la possibilità di poter utilizzare in ambito agrochimico molecole con attività biocida prodotte da *Aster sedifolius*. Inoltre, è possibile tramite ingegneria genetica intervenire sul pathway di sintesi delle saponine triterpenoidiche agendo sull'enzima OSC (*AsOXAI*) che catalizza la produzione della porzione agliconica triterpenica.

In conclusione è necessario sottolineare come la realizzazione di questo progetto sia stata possibile grazie alla collaborazione di ricercatori con diverse competenze scientifiche e al finanziamento MiPAF del progetto “Nuove biomolecole per la difesa delle colture agrarie nel rispetto della salute umana e dell'ambiente (BIOPEST)”.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Abbott J.C., Barakate A., Pinçon G., Legrand M., Lapierre C., Mila I., Schuch W., Halpin C. (2002) Simultaneous suppression of multiple genes by single transgenes. Down-regulation of three unrelated lignin biosynthetic genes in tobacco. *Plant Physiology*, 128: 844-853.
- Aharoni A., De Vos C.H.R., Verhoeven H.A., Maliepaard C.A., Kruppa G., Bino R., Goodnowe D.B. (2002) Nontargeted metabolome analysis by use of Fourier transform ion cyclotron mass spectrometry. *OMICS*, 6: 217-234.
- Aharoni A., Jongsma M.A., Bouwmeester H.J. (2005) Volatile science? Metabolic engineer of terpenoids in plant. *Trends Plant Sci.*, 10: 594-602.
- Akhtar Mohammad (2000) Nematicidal potential of the neem tree *Azadirachta indica* (A. Juss). *Integrated Pest Management Reviews*, 5: 57-66.
- Argentieri M.P., D'Addabbo T., Tava A., Agostinelli A., Jurzysta M., Avato P. (2008) Evaluation of nematicidal properties of saponins from *Medicago* spp. *Eur. J. Plant Pathol.*, 120: 189-197.
- Bader G., Seibold M., Tintelnot K., Hiller K. (2000) Cytotoxicity of triterpenoid saponins. Part 2: Relationships between the structures of glycosides of polygalacic acid and their activities against pathogenic *Candida* species. *Pharmazie*, 55: 72-74.
- Bader G., Wray V., Hiller K. (1995) The main saponins from the aerial parts and the roots of *Solidago virgaurea* subsp. *virgaurea*. *Planta Medica*, 61: 158-161.
- Bader G., Zieschang M., Wagner K., Grundemann E., Hiller K. (1991) New triterpenoids saponins from *Helianthus annuus*. *Planta Medica*, 57: 471-474.

- Belles X., Camps F., Coll J., Piulachs M. D. (1985) Insect antifeedant activity of clerodane diterpenoids against larvae of *Spodoptero littoralis* (Lepidoptera). J. Chem. Ecol., 11: 1439-1445.
- Besumbes O., Sauret-Güeto S., Phillips M.A., Imperial S., Rodriguez-Conceptiòn M., Boronat A. (2004) Metabolic engineering of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis* for the production of taxadiene, the first committed precursor of taxolo. Biotechnology and Bioengineering, 88: 168-175.
- Bick J.A., Lange B.M. (2003) Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoids biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. Arch. Biochem. Biophys., 415: 146-154.
- Boeke S.J., Boersma M.G., Alink G.M., van Loon J.J., van Huis A., Dicke M., Rietjens I.M. (2004) Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. J Ethnopharmacol., 94(1): 25-41.
- Bohlmann J., Meyer-Gauen G., Croteau R. (1998) Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 4126-4133.
- Borevitz J.O., Xia Y., Blount J., Dixon R.A., Lamb C. (2000) Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. Plant Cell, 12: 2383-2394.
- Bouarab K., Melton R., Peart J., Baulcombe D. & Osburn A. (2002) A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. Nature, 418: 889-892.
- Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science, 161: 839-851.

- Boyes D.C., Zayed A.M., Ascenzi R., McCaskill A.J., Hoffman N.E., Davis K.R., Görlac J. (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell*, 13: 1499-1510.
- Brincat M.C., Gibson D.M., Shuler M.L. (2002) Alterations in Taxol production in plant cell culture via manipulation of the phenylalanine ammonia lyase pathway. *Biotechnol. Prog.*, 18: 1149-1156.
- Burlat V., Oudin A., Courtois M., Rideau M., St-Pierre B. (2004) Co-expression of three MEP pathway genes and geranyl 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites. *Plant Journal* 38: 131-141.
- Cammareri M., Consiglio M. F., Pecchia P., Corea G., Lanzotti V., Ibeas J.I., Tava A., Conicella C. (2008) Molecular characterization of  $\beta$ -amyrin-like synthase from *Aster sedifolius* L. and triterpenoid saponin analysis. *Plant Science* 175: 255–261.
- Cammareri M., Zaccadderli M., Corea G., Lanzotti V., Errico A., Conicella C. (2003) Antifungal and antibacterial activity of triterpenoid saponins from *Aster sedifolius*. *J. Plant Pathology*, 85 (4, special issue): 299.
- Camps F. (1991) In ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids; Harbone J.B., Tomas-Barberàn F.A. Eds. Clarendon Press: Oxford, U.K., pp 331-376.

- Cangelosi G.A., Best E.A., Marinetti G., Nester E.W. (1991) Genetic analysis of *Agrobacterium*. *Methods Enzymol.*, 204: 384-397.
- Chait B.T., Kent S.B. (1992) Weighing naked proteins: practical, high-accuracy mass measurement of peptides and proteins. *Science*, 257: 1885-1894.
- Cheng D., Shao Y. (1994) Terpenoid glycosides from roots of *Aster tataricus*. *Phytochemistry*, 35 (1): 173-176.
- Chitwood David J. (2002) Phytochemical based strategies for nematode control. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 40: 221-249.
- Chung M.H., Chen M.K., Pan S.M. (2000) Floral spray transformation can efficiently generate *Arabidopsis* transgenic plants. *Transgenic Research* 9: 471–476.
- Clifford M.N. (2000) Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 362-372.
- Clifford M.N. (2003) The analysis and characterization of chlorogenic acids and other cinnamates. In *Methods in Polyphenol Analysis*. Santos-Buelga C., Williamson G. (eds). Royal Society of Chemistry, Cambridge: 314-337.
- Clifford M.N., Zheng W., Kuhnert N. (2006) Profiling the chlorogenic acids of *Aster* by HPLC-MS. *Phytochemical Analysis*, 17: 384-393.
- Confalonieri M., Cammareri M., Biazzi E., Pechia P., Feveriero M.P.S., Balestrazzi A., Tava A., Conicella C. (2008) Enhanced triterpene saponin biosynthesis and root nodulation in transgenic barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) expressing a novel  $\beta$ -amyrin synthase (*AsOXAI*) gene. *Plant Biotechnology Journal* (in press).
- Corea G., Iorizzi M., Lanzotti V., Cammareri M., Conicella C., Laezza C., Bifulco M. (2004) Astersedifolioside A-C, three new olean-type saponins

- with antiproliferative activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12: 4909-4915.
- Daniell H., Streatfield S.J., Wycoff K. (2001) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci.*, 6: 219-226 .
  - Della Penna D. (2001) Plant metabolic engineering. *Plant Physiology*, 125: 160-163.
  - Dou D.Q., Chen Y.J., Liang L.H., Pang F.G., Shimizu N., Takeda T. (2001) Six new dammarane-type triterpene saponins from the leaves of *Panax ginseng*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 49: 442–446.
  - Duke S.O., Romagni J.G., Dayan F.E. (2000) Natural products as source for new mechanism of herbicidal action. *Crop Protection*, 19: 583-589.
  - Duradeva N., Anderson S., Orlova I., Gatto N., Reichelt M., Rhodes D., Boland W., Gershenzon J. (2005) The nonmevalonate pathway supports both monoterpenes and sesquiterpenes formation in snapdragon flowers. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 102: 933-938.
  - Duradeva N., Pichersky E. (2008) Metabolic engineering of plant volatiles. *Current Opinion in Biotechnology*, 19: 1-9.
  - Ebizuka Y., Katsube Y., Tsutsumi T., Kushiro T., Shibuya M. (2003) Functional genomics approach to the study of triterpene biosynthesis. *Pure Appl. Chem.*, 75: 369-374.
  - Eisenreich W., Rohdich F., Bacher A. (2001) Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science*, 6: 78-84.
  - El-Sayed M., Verpoorte R. (2002) Effect of phytohormones on growth and alkaloid accumulation by *Catharanthus roseus* cell suspension cultures fed

with alkaloid precursors tryptamine and loganin. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 68: 265-270.

- Enriz R.D., Baldoni H.A., Zamora M.A., Jàuregui E.A., Sosa M.E., Tonn C.E., Luco J.M., Gordaliza M. (2000) Structure-antifeedant activity relationship of clerodane diterpenoids. Comparative study with Withanolides and Azadirachtin. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 1384–1392.
- Fazio G.C., Xu R., Matsuda S.P.T. (2004) Genome mining to identify new plant triterpenoids. *J. Am. Chem. Soc.*, 126: 5678-5679.
- Fiehn O. (2002) Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 48: 155–171.
- Fons F., Amellal N., Leyval C., Saint-Martin N., Henry M. (2003) Effects of *Gypsophila* saponins on bacterial growth kinetics and on selection of subterranean clover rhizosphere. *J. Microbiol.*, 49: 367-373.
- Frense D. (2007) Taxanes: perspectives for biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73: 1233–1240.
- Gietz R.D., Schiestl R.H., Willems A.R., Woods R.A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11: 355–360.
- Goodacre R., Vaidyanathan S., Dunn W.B., Harrigan G.G., Kell D.B. (2004) Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol.*, 22: 249-252.
- Grace S.C., Logan B.A., Adams III W.W. (1998) Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. *Plant Cell and Environment*, 21: 513–521.

- Guhling O., Hobl B., Yeats T., Jetter Reinhard. (2006) Cloning and characterization of a lupeol synthase involved in the synthesis of epicuticular wax crystals on stem and hypocotyls surfaces of *Ricinus communis*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 448: 60–72.
- Hahn M.G. (1996) Microbial elicitors and their receptor in plants. Annu. Rev. Phytopathol., 34: 387-412.
- Hampel D., Monsadl A., Wüst M. (2005) Biosynthesis of mono- and sesquiterpenes in carrot roots and leaves (*Daucus carota* L.): metabolic cross talk of cytosolic mevalonate and plastidial methylerythritol phosphate pathways. Phytochemistry, 66: 305-31.
- Haralampidis K., Bryan G., Qi X., Papadopoulou K., Bakht S., Melton R., Osbourn A. (2001) A new class of oxidosqualene cyclases directs synthesis of antimicrobial phytoprotectants in monocots. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98: 13431-13436.
- Haralampidis K., Trojanowska M., Osbourn A. (2002) Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. In: Sceper T. (ed). Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, vol. 75. Sger-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 32-49.
- Harmatha J. (2000) Chemo-ecological role spirostanol saponins in the interaction between plants and insect. In : Olezsek W. and Marston A. (eds). Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants, Kluwer Academic, Netherlands.
- Hayashi H., Huang P., Takada S., Obinata M., Inoe K., Shibuya M., Ebizuka Y. (2004) Differential expression of three oxidosqualene cyclase mRNAs in *Glycyrrhiza glabra*. Biol. Pharm. Bull., 27: 1086-1092.

- Hayashi H., Huang P.Y., Kirakosyan A., Inoue K., Hiraoka N., Ikeshiro Y., Kushiro T., Shibuya M., Ebizuka Y. (2001) Cloning and characterization of a cDNA encoding  $\beta$ -amyrin synthase involved in glycyrrhizin and soyasaponin biosynthesis in liquorice. *Biol. Pharm. Bull*, 24: 912-916.
- Heng L., Koningsveld van G.A., Gruppen H., Boekel van M.A.J.S., Vinken J-P., Roozen J.P. (2004) Protein-flavour interactions in relation to development of novel protein foods. *Trends in Food Science & Technology*, 15: 217-224.
- Henkel T., Brunne R.M., Muller H., Reichel F. (1999) Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compound. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38: 643-647.
- Hoagland R.E., Zablotowicz R.M., Reddy K.N. (1996) Studies of the phytotoxicity of saponins on weed and crop plants. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology. Saponins Used in Food and Agriculture* (Waller G.R. and Yamasaki K., eds), pp. 57-73. New York: Plenum Press.
- Hostettman K., Marston A. (1995) Chemistry and pharmacology of natural products. *Saponins* (Phillipson J.D., Baxer H., eds), Cambridge University, UK.
- Huang Q., Roessner C.A., Croteau R., Scott A.I. (2001) Engineering *Escherichia coli* for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in biosynthesis of taxol. *Bioorg. Med. Chem.*, 9: 2237-2242.
- Hur J.Y., Lee P., Kim H., Kang I., Lee K.R., Kim S.Y. (2004) (-)-3,5-dicaffeoyl-muco-quinic acid isolated from *Aster scaber* contributes to the differentiation of PC12 cells: through tyrosine kinase cascade signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313: 948-953.

- Ikedo S., Shimoyada M., Watanabe K. (1996) Interaction between bovine serum albumin and saponin as studied by heat stability and protease digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 792-795.
- Iturbe-Ormaetxe I., Haralampidis K., Papadopoulou K., Osbourn A.E. (2003) Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Mol. Biol.*, 51: 731-743.
- Jenner H., Townsend B., Osbourn A. (2005) Unravelling triterpene glycoside synthesis in plants: phytochemistry and functional genomics join forces. *Planta* 220: 503–506.
- Jobling S.A., Westcott R.J., Tayal A., Jeffcoat R., Schwall G.P. (2002) Production of a freeze-thaw-stable potato starch by antisense inhibition of three starch synthase genes. *Nat. Biotechnol.*, 20: 295-299.
- Kajikawa M., Yamato K.T., Fukuzawa H., Sakai Y., Uchida H., Ohyama K. (2005) Cloning and characterization of a cDNA encoding beta-amyrin synthase from petroleum plant *Euphorbia tirucalli* L. *Phytochemistry*, 66(15): 1759-66.
- Kapusta I., Bogdan J., Stochmal A., Oleszek W. (2005a) Determination of saponins in aerial parts of barrel medic (*Medicago truncatula*) by liquid chromatography-electrospray ionization/mass spectrometry. *J. Ag. Food Chemistry*, 53: 7654-7660.
- Kapusta I., Stochmal A., Perrone A., Piacente S., Pizza C., Oleszek W. (2005b) Triterpene saponins from barrel medic (*Medicago truncatula*) aerial parts. *J. Ag. Food Chemistry*, 53: 2164-2170.
- Kaufman P.B., Cseke L.J., Warber S., Duke J.A., Brielmann H.L. (1999) *Natural products from Plants*. CRC Press Boca Raton, FL.

- Kiefer D., Pantuso T. (2003) *Panax ginseng*. Am. Fam. Physician., 68(8): 1539-42.
- Koroch A., Kapteyn J., Juliani H.R., Simon J.E. (2002) In Vitro regeneration and *Agrobacterium* transformation of *Echinacea purpurea* leaf explants. Trends in new crops and new uses. J. Janick and A. Whipkey (eds). ASHS Press, Alexandria, VA.
- Kushiro T., Shibuya M., Ebizuka Y. (1998) Beta-amyrin synthase: Cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. European Journal of Biochemistry, 256: 238-244.
- Kushiro T., Shibuya M., Masuda K., Ebizuka Y. (2000) A novel multifunctional triterpene synthase from *Arabidopsis thaliana*. Tetrahedron Lett., 41: 7705–7710.
- Kwon H.C., Jung C.M., Shin C.G., Lee J.K., Choi S.U., Kim S.Y., Lee K.R. (2000) A new caffeoyl quinic acid from *Aster scaber* and its inhibitory activity against human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) integrase. Chem. Pharm. Bull., 48: 1796–1798.
- La Font R., Horn D. M. S. (1989) In ecdysone: from chemistry to mode of action; Koolman, J., Ed. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, Germany, pp 39-64.
- Ladner D.C., Tchounwou P.B., Lawrence G.W. (2008) Evaluation of the effect of ecologic on root knot nematode, *Meloidogyne incognita*, and tomato plant, *Lycopersicon esculenum*. Int. J. Environ. Res. Public. Health., 5(2): 104-10.
- Lee M. H., Jeong J. H., Seo J. W., Shin C. G., Kim Y. S., In J. G., Yang D. C., Yi J. S., Choi Y. E. (2004) Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene. Plant Cell Physiology, 45(8): 976-984.

- Leech M. J., May K., Hallard D., Verpoorte R., De Luca V., Christou P. (1998) Expression of two consecutive genes of a secondary metabolic pathway in transgenic tobacco: molecular diversity influences levels of expression and product accumulation. *Plant Mol. Biol.*, 38: 765-774.
- Liang Y., Zhao S. (2008) Progress in understanding of ginsenoside biosynthesis. *Plant Biology*, 10: 415–421.
- Lichtenthaler H. K., Rohmer M., Schwender J. (1997) Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiol. Plant*, 101: 643-652.
- Liu C., Zhao Y., Wang Y. (2006) Artemisinin: current state and perspectives for biotechnological production of an antimalarial drug. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72(1): 11-20.
- Lodeiro S., Xiong Q., Wilson W.K., Kolesnikova M.D., Onak C.S., Matsuda S.P. (2007) An oxidosqualene cyclase makes numerous products by diverse mechanisms: a challenge to prevailing concepts of triterpene biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 29(36): 11213-22.
- Lois L.M., Campos N., Putra S.R., Danielsen K., Rohmer M., Boronat A. (1998) Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding and transketolase-like enzyme that catalyze the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isprenoid, thiamin and pyridoxol biosynthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 95: 2015-2110.
- MacDonald R.S., Guo J.Y., Copeland J., Browning J.J.D., Slepser D., Rottinghaus G.E., Berhow M.A. (2005) Environmental influences on isoflavones and saponins in soybeans and their role in colon cancer. *American Society for Nutritional Sciences*, 135: 1239–1242.

- Mahmoud S.S., Croteau R.B. (2001) Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 8925-8920.
- Mann V., Harker M., Pecker I., Hirschberg J. (2000) Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. *Nat. Biotechnol.*, 18: 888-692.
- Matsuda F., Morino K., Miyashita M., Miyagawa H. (2003) Metabolic flux analysis of the phenylpropanoid pathway in wound-healing potato tuber tissue using stable isotope-labeled tracer and LC-MS spectroscopy. *Plant Cell Physiology*, 44: 510-517.
- Meesapyodsuk D., Balsevich J., Reed D.W., Covello P.S. (2007) Saponin biosynthesis in *Saponaria vaccaria*. cDNAs encoding b-amyrin synthase and a triterpene carboxylic acid glucosyltransferase. *Plant Physiology*, 143: 959–969.
- Mondolot L., La Fisca P., Buatois B., Talansier E., De Kochko A., Campa C. (2006) Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during *Coffea canephora* leaf development. *Annals of Botany*, 98: 33–40.
- Morandini P. e Salamini F. (2003) Plant biotechnology and breeding: al lied for years to come. *Trends in Plant Science*, 8(2): 70-75.
- Morita M., Shibuja M., Kushiro T., Masuda K., Ebizuka. (2000) Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from pea (*Pisum sativum*). *European Journal Biochem.*, 267: 3453-3460.
- Murashige T., Skooge F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.*, 15: 473-497.
- Mylona P., Owatworakit A., Papadopoulou K., Jenner H., Qin B., Findlay K., Hill L., Qi X., Bakht S., Melton R., Osbourn A. (2008) Sad3 and Sad4 are

- required for saponin biosynthesis and root development in oat. *Plant Cell*, 20: 201–212.
- Nagao T., Tanaka R., Okabe H. (1996) Saponins from the compositae plants: structures of the saponins from *Aster scaber* Thunb. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 404: 297-307.
  - Neves L.O., Tomaz L., Fevereiro M.P.S. (2001) Micropropagation of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong and *Medicago truncatula* ssp. Narbonensis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 67: 81-84.
  - Newman D.J., Cragg G.M. (2008) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.*, 70: 461-477.
  - Ohara S. and Ohira T. (2003) Plant growth regulation effects of triterpenoid saponins. *J. Wood Sci.*, 49: 59-64.
  - Oksman-Caldentey K., Inzè D. (2004) Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*, 9: 433-440.
  - Oksman-Caldentey K.M, Saito K. (2005) Integrating genomics and metabolomics for engineering plant metabolic pathways. *Curr Opin Biotechnol.*, 16(2): 174-179.
  - Omar S.A., Abdel-Massih M.I., Mohamed B.E. (1994) Use of saponin to control the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in tomato plants. *Bulletin of Faculty of Agricultural of Cairo*, 45: 933-940
  - Osbourn A.E. (1996) Preformed antimicrobial compound and plant defense against fungal attack. *The Plant Cell*, 8: 1821-1831.
  - Osbourn A.E. (1996) Saponin and plant defence—a soap story. *Trends in Plant Science*, 1: 4-9.

- Osburn A.E. (2003) Saponin in cereals. *Phytochemistry*, 6: 1-4.
- Page A.P., Winter A.D. (2003) Enzymes involved in the biogenesis of nematode cuticle. *Advances in Parasitology*, 53: 85-148.
- Pasquali G., Porto D.D., Fett-Neto A.G. (2006) Metabolic engineering of cell cultures versus whole plant complexity in production of bioactive monoterpene indole alkaloids: recent progress related to old dilemma. *J. Biosci. Bioeng.*, 101(4): 287-96.
- Perez M. P., Navas-Cortés J. A., Pascual-Villalobos M. J. and Castillo P. (2003) Nematicidal activity of essential oils and organic amendments from Asteraceae against root-knot nematodes. *Plant Pathology*, 52: 395–401.
- Phillips D.R., Rasbery J.M., Bartel B., Matsuda S.P.T. (2006) Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 305-314.
- Potter S.M., Jimenez-Flores R., Pollack J., Lone T.A., Berber-Jimenez M.D. (1993) Protein-saponin interaction and its influence on blood lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 1287-1291.
- Raamsdonk L.M., Teusink B., Broadhurst D., Zhang N.S., Hayes A. (2001) A functional genomics strategy that use metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat. Biotechnol.*, 19: 45-50.
- Reintanz B., Lehnen M., Reichelt M., Gershenzon J., Kowalczyk M., Sandberg G., Godde M., Uhl R., Palme K. (2001) Bus, a bushy *Arabidopsis* cyp79f1 knockout mutant with abolished synthesis of short-chain aliphatic glucosinolates. *Plant Cell*, 13: 351-367.
- Roberts S.C. (2007) Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nat. Chem. Biol.*, 3(7): 387-95.

- Roemer S., Fraser P.D., Kiano J.W., Shipton C.A., Misawa N., Schuch W. Bramley P.M. (2000) Elevation of the provitamin content of transgenic tomato plants. *Nat. Biotechnol.*, 18: 666-669.
- Roessner U., Luedemann A., Brust D., Fiehn O., Linke T., Willmitzer L., Fernie A. (2001) Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *Plant Cell.*, 13(1): 11-29.
- Rohmer M. (1999) A mevalonate-independent route to isopentenyl disphosphate. In D Cane, ed, *Comprehensive Natural Product Chemistry, Isoprenoids including Steroids and Carotenoids, Vol. 2* . Pergamon Press, Oxford, pp 45-68.
- Saimaru H., Orihara Y., Tansakul P., Kang Y.H., Shibuya M., Ebizuka Y. (2007) Production of triterpene acids by cell suspension cultures of *Olea europaea*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 55(5): 784-788.
- Sambrook J., Russell D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual* 3<sup>th</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y.
- San Martin R., Magnunacelaya J.C. (2005) Control of plant-parasitic nematodes with extract of *Quillaja saponaria*. *Nematology*, 7: 577-585.
- Sato F., Hashimoto T., Hachiya A., Tamura K., Choi K.B., Morishige T., Fujimoto H., Yamada Y. (2001) Metabolic engineering of plant alkaloids biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 367-372.
- Sawai S., Shindo T., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Ayabe S., Aoki T. (2006) Functional and structural analysis of genes encoding oxidosqualene cyclase of *Lotus japonicus*. *Plant Science*, 170: 247-257.

- Schaller H., Grausem B., Benveniste P., Chye M.L., Tan C.T., Song C.T., Chua N.H. (1995) Expression of the *Hevea brasiliensis* (H.B.K.) Mull Arg 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 1 in tobacco results in sterol overproduction. *Plant Physiology*, 109: 761-770.
- Schopke T., al-Tawaka C., Wray V., Nimtz M., Meyer A., Hiller K. (1995) Triterpenoid saponins from the aerial parts of *Aster bellidiastrum*. *Phytochemistry*, 40: 1489-1492.
- Scragg A.H. (1999) Alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* suspension cultures. *Methods Mol. Biol.*, 111: 393- 402.
- Segura M.J., Jackson B.E., Matsuda S.P. (2003) Mutagenesis approaches to deduce structure-function relationships in terpene synthases. *Nat. Prod. Rep.*, 20(3): 304-17.
- Seo J.W., Jeong J.H., Shin C.G., Lo S.C., Han S.S., Yu K.W., Harada E., Han J.Y., Choi Y.E. (2005) Overexpression of squalene synthase in *Eleutherococcus senticosus* increases phytosterol and triterpene accumulation. *Phytochemistry*, 66: 869-877.
- Shao Y., Ho C.T., Chin C.K., Rosen R.T., Hu B., Qin G.W. (1997) Triterpenoid saponins from *Aster lingulatus*. *Phytochemistry*, 44: 337-340.
- Shao Y., Zhou B.N., Lin L.Z., Cordell G.A. (1995a) Asteryunnanoside F and G: two new triterpenoid saponins from *Aster yunnanensis*. *Planta Medica*, 61: 446-449
- Shao Y., Zhou B.N., Ma K., Wu H.M. (1995b). Medicagenic acid saponins from *Aster batagensis*. *Phytochemistry*, 39: 875-881.

- Shewmaker C.K. *et al.* (1999) Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant Journal*, 20: 401-412.
- Shibuya M., Zhang H., Endo A., Shishikura K., Kushiro T., Ebizuka Y. (1999) Two branches of the lupeol synthase gene in the molecular evolution of plant oxidosqualene cyclases. *Eur. J. Biochem.*, 266: 302-307.
- Sim Joo-Soon, Zhao H.L., Li D.W., Cho S.Y., Jeong C.S., Lee E.B., Kim Y.S. (2005) Effects of saponins from the root bark of *Aralia elata* on the transport of chondroitin sulfate in Caco-2 Cell monolayers and rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 28(6) : 1043-1048.
- St-Pierre B., Vazquez-Flota F.A., de Luca V. (1999) Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intracellular translocation of a pathway intermediate. *The Plant Cell*, 11: 887–900.
- Suzuki H., Achnine L., Xu R., Matsuda S.P.T. and Dixon R.A. (2002) A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant J.*, 32: 1033-1048.
- Sweetlove L.J., Fernie A.R. (2005) Regulation of metabolic networks: understanding metabolic complexity in the systems biology era. *New Phytologist*, 168: 9-24.
- Szalma S.J., Buckler E.S., Snook M.E., McMullen M.D. (2005) Association analysis of candidate genes for maysin and chlorogenic acid accumulation in maize silks. *Theoretical and Applied Genetics*, 110: 1324–1333.
- Takahashi M., Nakanishi H., Kawasaki S., Nishizawa N.K., Mori S. (2001) Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using

- baerley nicotianamine aminotransferase genes. *Nature Biotechnology*, 19: 466-469.
- Tava A. and Avato P. (2006) Chemical and biological activity of triterpene saponins from *Medicago Species*. *Natural Product Communications*, 12: 1159-1180.
  - Tava A., Oleszek W., Jurzysta M., Berardo N. and Odoardi M. (1993) Alfalfa saponins and sapogenins: isolation and quantification in two different cultivars. *Phytochemical Analysis*, 4: 269-274.
  - Tegelberg R., Julkunen-Tiitto R., Aphalo P.J. (2004) Red : far-red light ratio and UV-B radiation: their effects on leaf phenolics and growth of silver birch seedlings. *Plant, Cell and Environment*, 27: 1005–1013.
  - Tsurumi S., Ishizawa K. (1997) Involvement of ethylene in chromosaponin-induced stimulation of growth in lettuce roots. *Plant Cell Physiol.*, 38: 668-675.
  - Verpoorte R., Memelink J. (2002) Engineering secondary metabolite production in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 181-187.
  - Waller G.R., Yang C.F., Chen L.F., Su C.H., Liou R.M., Wu S.C., Young C.C., Lee M.R., Lee J.S., Chou C.H. and Kim D. (1996) Can soyasaponin I and mono- and bi-desmosides isolated from mungbeans serve as growth enhancers in mungbeans and lettuce? In: *Advances in Experimental Medicine and Biology. Saponins Used in Food and Agriculture* (Waller G.R. and Yamasaki K., eds), pp. 123-139. New York: Plenum Press.
  - Weigel D., Glazerbrook (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Edited by Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  - Xiang T., Shibuya M., Katsube Y., Tsutsumi T., Otsuka M., Zhang H., Masuda K., Ebizuka Y. (2006) A new triterpene synthase from *Arabidopsis thaliana*

produces a tricyclic triterpene with two hydroxyl groups. *Org. Lett.*, 8: 2835–2838.

- Ye X., Al-Babili S., Klöti A., Zhang J., Lucca P., Beyer P., Potrykus I. (2000) Engineering the provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287: 303-305.
- Yoshikawa M., Sugimoto S., Nakamura S., Matsuda H. (2007) Medicinal flowers. XI. Structures of new dammarane-type triterpene diglycosides with hydroperoxide group from flower buds of *Panax ginseng*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 55: 571–576.
- Zhang H., Shibuya M., Yokota S., Ebizuka Y. (2003) Oxidosqualene cyclases from cell suspension cultures of *Betula platyphylla* var. *japonica*: molecular evolution of oxidosqualene cyclases in higher plants. *Biol. Pharm. Bull.*, 26: 642–650.