

UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”

DIPARTIMENTO DI AGRARIA



**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
BIOTECNOLOGIE AGRO-AMBIENTALI E ALIMENTARI**

Tesi di laurea sperimentale

**INTERVENTI BIOTECNOLOGICI
IN MICROALGHE VERDI E *NICOTIANA TABACUM*
PER LA PRODUZIONE DI TRITERPENI**

RELATORE

Ch.mo Prof.

Pasquale Chiaiese

CORRELATORE

Dott.ssa

Maria Cammareri

CANDIDATO

Vittorio Manca

Matr. P07000093

ANNO ACCADEMICO 2020/2021

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Le biotecnologie nel XXI secolo	1
1.2 Microalghe come bioreattori e biocarburanti	3
1.2.1 Biodiesel	6
1.2.2 Prodotti ad elevato valore aggiunto	9
1.3 Ingegneria metabolica	10
1.4 Triterpeni: struttura chimica e proprietà biologiche.....	12
2. OBIETTIVI DELLA TESI	14
3. MATERIALI E METODI	15
3.1 Accessioni algali e vegetali	15
3.2 Preparazione dei substrati di coltura	16
3.3 Allevamento del materiale vegetale	16
3.4 Allevamento delle colture algali	16
3.5 Determinazione degli indici di correlazione tra densità cellulare e ottica dei ceppi microalgali saggiati	17
3.6 Saggi di inibizione della crescita algale su substrato solido e in liquido in presenza dell'antibiotico geneticina.....	17
3.7 Colture batteriche	18
3.8 Geni e vettori utilizzati	18
3.9 Estrazione e determinazione quantitativa del DNA plasmidico estratto	19
3.10 Ottenimento di cellule elettrocompetenti di <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
3.11 Elettroporazione di <i>A. tumefaciens</i>	20
3.12 Trasformazione genetica delle alghe mediata da <i>A. tumefaciens</i>	21
3.13 Trasformazione genetica di <i>Nicotiana tabacum</i>	23
3.14 Estrazione di DNA da ceppi algali e piante di tabacco putativi transgenici	24
3.15 Analisi quantitativa e qualitativa del DNA genomico	24
3.16 Analisi di amplificazione <i>in vitro</i> di DNA di microalghe putative transgeniche	25
3.17 Analisi di amplificazione <i>in vitro</i> di campioni di DNA di piante di tabacco putative transgeniche.....	26
3.18 Analisi elettroforetiche dei prodotti estratti ed amplificati <i>in vitro</i>	27
3.19 Analisi di espressione genica in piante di tabacco.....	28

3.20	Analisi statistiche	29
4.	RISULTATI	30
4.1	Correlazione tra densità della coltura cellulare e densità ottica delle accessioni algali	30
4.2	Saggi di inibizione della crescita algale su substrato solido e in liquido in presenza dell'antibiotico geneticina.....	32
4.3	Analisi molecolari dei ceppi di <i>A. tumefaciens</i> geneticamente manipolati mediante elettroporazione.....	36
4.4	Trasformazione genetica di microalghe mediata da <i>A. tumefaciens</i>	37
4.5	Analisi quantitativa e qualitativa del DNA genomico di microalghe.....	41
4.6	Analisi molecolari delle alghe putative transgeniche	42
4.7	Trasformazione genica di espianti fogliari di tabacco tramite metodo indiretto	44
4.8	Analisi molecolari di piante di tabacco putative transgeniche:.....	45
5.	DISCUSSIONE	47
6.	CONCLUSIONI	54
7.	BIBLIOGRAFIA.....	55

1. INTRODUZIONE

1.1 Le biotecnologie nel XXI secolo

Il termine “biotecnologia” deriva dall’unione dei sostantivi “biologia” e “tecnologia”, in cui il primo indica lo studio e la conoscenza (*logos*) degli esseri viventi (*bios*) e il secondo (*technè*) l’applicazione e l’utilizzo di strumentazioni tecniche. Numerose sono state negli anni le definizioni attribuite a questa parola. Tra le prime definizioni ufficiali di “biotecnologia” vi è quella dell’*European Federation of Biotechnology* nel 1982, che fa riferimento all’uso integrato di microbiologia, biochimica, genetica e ingegneria chimica, “allo scopo di ottenere applicazioni di microrganismi e di altri sistemi cellulari per la produzione di composti di vario interesse o per terapie cliniche”.

Dopo 10 anni, nel 1992 è stata invece proposta dalla *Convention On Biological Diversity* una definizione più moderna e completa, e ad oggi ancora utilizzata, secondo cui la biotecnologia è da considerarsi “l’applicazione tecnologica che si serve dei sistemi biologici, degli organismi viventi o di derivati di questi, per produrre o modificare prodotti o processi per un fine specifico” (Dunham & Karissa, 2002).

I traguardi raggiunti dalla biologia nell’ambito delle ricerche sul DNA e le conquiste dell’ingegneria genetica inducono a distinguere tra le biotecnologie tradizionali (o convenzionali) e le biotecnologie innovative (o avanzate). Le prime accompagnano la storia dell’uomo da migliaia di anni e continuano a farlo, ed includono tutte quelle tecnologie strettamente produttive nel campo della zootecnia e della filiera agroalimentare, che si basano ad esempio sullo sfruttamento delle attività fermentative dei microrganismi per la produzione di particolari alimenti, si pensi alle bevande alcoliche, al formaggio o al pane. Il vero salto di qualità per le biotecnologie si ha a partire dal 1860 con la nascita della microbiologia grazie alle evidenze di Pasteur, e della genetica con il contributo di Mendel, che hanno posto le basi per la biotecnologia moderna. Il ‘900 ha visto l’innovazione biotecnologica diventare pervasiva in tutti i settori: dall’insulina agli antibiotici, dalla chimosina per la caseificazione alla rivoluzione verde in agricoltura. È nel XXI secolo però che le biotecnologie vivono il loro momento più stimolante, trasformandosi da una scienza industriale ad una che ha il potere di essere personalizzata e rispondere ai bisogni specifici di ciascuno. Le biotecnologie avanzate, le quali si fondano sulle moderne scoperte dell’ingegneria genetica e della biologia molecolare offrono un vastissimo ventaglio di applicazioni e secondo l’OCSE –

Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico- possono includere numerose macro aree, ed alcune di queste vengono di seguito riportate. Ad esempio, le Biotecnologie Mediche, soprattutto nel campo della diagnostica, portano allo sviluppo di metodiche sempre più accurate e meno invasive per l'identificazione di un particolare stato patologico nei pazienti, orientandosi sempre di più verso la medicina predittiva e personalizzata. L'obiettivo è infatti una più puntuale definizione della diagnosi, avendo così la possibilità di attuare trattamenti medici ad *hoc*.

Altra macro area biotecnologica di notevole importanza è quella occupata dalle Biotecnologie Agrarie, che consentono all'uomo di manipolare gli organismi vegetali permettendogli ad esempio un più rapido adattamento alle mutevoli, e spesso sfavorevoli, condizioni ambientali e meteorologiche, una maggiore resistenza agli agenti patogeni, contribuendo simultaneamente ad incrementare la produzione agricola e a fronteggiare la malnutrizione nei paesi sottosviluppati.

Infine, altre biotecnologie degne di nota sono quelle ambientali, che sono focalizzate sulla salvaguardia e la tutela dell'ambiente e della biodiversità. Questa macro area si occupa infatti della rilevazione e rimozione di inquinanti e contaminanti dagli ecosistemi, di biorisanamento e riciclaggio dei rifiuti – sfruttando enzimi oppure impiegando organismi quali batteri, funghi o piante – nonché della produzione di biocombustibili.

Data la forte interconnessione tra salute, ambiente, industria e agricoltura, la biotecnologia rappresenta quindi la candidata migliore per affrontare i problemi che possono scaturire in ciascuno di questi ambiti, tramite la messa a punto di soluzioni e strategie innovative, ma soprattutto rispettose dell'ambiente e dell'uomo.

1.2 Microalghe come bioreattori e biocarburanti

Le alghe sono costituite da un insieme di organismi unicellulari (*microalghe*) e pluricellulari (*macroalghe*) in grado di svolgere la fotosintesi ossigenica, come le piante superiori, da cui però si differenziano per la mancanza di radici, foglie e soprattutto dimensioni, spaziando infatti in un range compreso tra 0.2–2 µm nelle microalghe tondeggianti, fino a superare i 100 µm nelle filamentose. Sono altamente eterogenee in termini di caratteristiche fisiologiche ed ecologiche, motivo per cui risulta piuttosto difficile classificarle in modo univoco e indiscusso in un'unica unità tassonomica. Inoltre, la biodiversità microalgale è un tema tutt'oggi ancora in fase di studio e approfondimento, dato che delle 800.000 specie di alghe esistenti, stimate dalla Wageningen University, solo 35.000 sono state descritte e classificate in Regni, Divisioni e Classi.

Per l'identificazione e la classificazione nell'ambito delle alghe, ci si affida principalmente al microscopio ottico per evidenziare le caratteristiche morfologiche, e al microscopio elettronico per approfondire gli aspetti ultrastrutturali. Inoltre, vengono ampiamente sfruttate anche le chiavi dicotomiche (Barsanti & Gualtieri, 2006).

Sebbene questi elementi aiutino una classificazione piuttosto precisa di questi organismi, nel corso degli anni le distinzioni precedentemente stilate sono state ripetutamente modificate e aggiornate, e ciò è dovuto all'affinamento delle tecnologie molecolari applicate alle microalghe nell'ambito genomico, trascrittomico, proteomico e metabolomico. Essenziali risultano essere tecniche quali la DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e l'utilizzo di marcatori (microsatelliti) sulle molecole di DNA o RNA, approfondendo le conoscenze sulle variazioni genetiche tra le specie e/o il grado di polimorfismo osservati tra queste (Paris, 1997).

Proprio a causa delle indagini sopra riportate, la ripartizione degli organismi algali proposta dai biologi europei Haeckel E. ed Chatton E. agli inizi del XX secolo è oramai di gran lunga superata. Questa prevedeva una mera inclusione delle alghe nel regno dei Protisti, all'epoca identificati come quegli organismi sia Eucarioti che Procarioti, che si distinguevano dal Regno delle Piante e degli Animali a causa della loro organizzazione unicellulare estremamente semplice e priva di differenziamento in tessuti. Nei Procarioti, tuttavia,

rientravano alghe azzurre e cianobatteri, ovvero batteri in grado di compiere la fotosintesi e di estrema importanza in quanto al centro della Teoria Endosimbiontica.

Un secolo dopo, a partire dagli anni 2000, con l'introduzione del regno Chromista in cui sono stati collocati organismi unicellulari e pluricellulari fotosintetici, le alghe hanno subito un'ulteriore riclassificazione, e ad oggi, secondo il CoL (*Catalogue of Life*), gli organismi algali sono riconosciuti come un gruppo polifiletico, suddiviso in tre grandi regni, Piante, Chromista e Protozoa (Ruggiero et al., 2015), in cui è possibile distinguere le seguenti classi: le alghe brune e rosse, che appartengono al gruppo delle macroalghe, e le diatomee, alghe verdi, dorate, gialle-verdi e blu che appartengono alle microalghe, le quali verranno di seguito brevemente descritte (Hemaiswarya et al., 2013):

- **Diatomee** (*Bacillariophyceae*): contano oltre 100.000 specie, pertanto rappresentano il gruppo di alghe unicellulari più numeroso. Oltre ad essere il punto cardine come fonte di cibo per lo zooplancton in acque dolci e salate, si caratterizzano per le grandi quantità di oli che possono immagazzinare, e che regolano inoltre la loro galleggiabilità.
- **Alghe verdi** (*Chlorophyta*): a cui appartengono oltre 7000 specie. Comprendono organismi unicellulari o pluricellulari, e come le piante superiori contengono due tipi di clorofilla. Inoltre, sintetizzano e accumulano notevoli quantità di amido e lipidi.
- **Alghe dorate** (*Chrysophyta*): includono un migliaio di specie, e sono principalmente alghe unicellulari diffuse in acque dolci. Normalmente sono fotosintetiche, ma in assenza di luce e in condizioni di stress diventano eterotrofe facoltative, nutrendosi di batteri e/o diatomee.
- **Alghe gialle-verdi** (*Xanthophyceae*): comprendenti circa 600 specie eterotrofe e aerobiche, e sono strettamente correlate dal punto di vista filogenetico alle alghe brune. Sono unicellulari e vivono in acque sia dolci che marine. Sono prive di parete cellulare e contengono particolari composti come β -carotene e diversi tipi di xantofille.
- **Alghe blu o Cianobatteri** (*Cyanophyta*): pur essendo essenzialmente batteri fotosintetizzanti e unicellulari, spesso danno origine a colonie tanto grandi da diventare visibilmente apprezzabili ad occhio nudo. Le loro pareti cellulari non contengono cellulosa, non presentano un nucleo (sono procariote) né i cloroplasti, motivo per cui i pigmenti come carotenoidi, xantofille, ficocianine e ficoeritrine in questi organismi sono ancorati alla membrana citoplasmatica. A questo gruppo

appartiene una delle specie microalgali più conosciute, *Arthrospira platensis*, meglio nota come 'Spirulina'.

A causa della grande biodiversità microalgale è possibile osservare differenti meccanismi biologici finalizzati alla sintesi di energia necessaria alla loro crescita e sostentamento, e bisogna inoltre considerare che in risposta a stress biotici e/o abiotici è possibile assistere a cambiamenti metabolici con ripercussioni su diversi fattori, come il tempo di duplicazione, con gli innumerevoli vantaggi che questo può comportare, ad esempio un più elevato assorbimento di CO₂, o un enfatizzato stoccaggio di molecole tossiche, che possono pertanto essere sfruttati per molteplici scopi tecnologici.

Generalmente, come riportato da Özçimen et al. (2016), per le microalghe si riscontrano tre meccanismi principali di crescita:

1. **Fotoautotrofia:** in cui la luce e l'anidride carbonica rappresentano la fonte di energia principale per la produzione di energia chimica, tramite la fotosintesi. È la condizione maggiormente diffusa tra le alghe, e sembrerebbe offrire il più basso rischio di contaminazione quando queste vengono coltivate.
2. **Eterotrofia:** appartengono a questa condizione le microalghe in grado di crescere in assenza di luce, e che sfruttano il carbonio organico come fonte energetica. Metabolizzano zuccheri semplici come glucosio, fruttosio e saccarosio, ed ovviamente, potendo essere coltivate anche al buio, comportano notevoli risparmi energetici assicurando comunque un'elevata resa. Tuttavia, quando la densità cellulare inizia ad aumentare notevolmente, i rischi di contaminazione tendono ad essere molto elevati.
3. **Mixotrofia:** è una condizione intermedia tra la fotoautotrofia e l'eterotrofia. Le specie con questo metabolismo sono infatti in grado di utilizzare sia il carbonio organico quando vi è un'elevata concentrazione di composti organici nel mezzo di coltura, sia il carbonio inorganico quando le condizioni luminose lo permettono.

Scaturiscono quindi rispettivi vantaggi e svantaggi in un'ottica di coltivazione su larga scala di questi organismi, ad esempio: le alghe a crescita eterotrofica si prestano principalmente per la produzione di biodiesel, sebbene quando sono coltivate su larga scala in vasche aperte vadano facilmente incontro a contaminazioni, e a ciò si aggiungono i costi piuttosto elevati per le materie prime a base di carbonio organico da somministrare. Pertanto, la crescita

fototrofica sembrerebbe il meccanismo preferito per dare luogo ad un sistema di coltivazione economicamente vantaggioso, sfruttando anche anidride carbonica proveniente dai gas di scarico di alcune fabbriche, tuttavia la biomassa ottenibile risulta minore.

Le microalghe grazie alla loro capacità di sintetizzare un'ampia gamma di metaboliti primari e secondari rappresentano un'ottima risorsa genetica per applicazioni biotecnologiche ai fini della produzione di biodiesel e prodotti ad alto valore aggiunto.

1.2.1 Biodiesel

A livello globale, l'attenzione rivolta alle alternative sostenibili è sempre maggiore. In particolare, per quanto riguarda i *biocarburanti*, o comunemente definiti “combustibili derivati da fonti rinnovabili”, possono essere considerati una valida alternativa “verde” alle fonti di energia provenienti dai comuni combustibili fossili, principalmente per il loro contributo nel ridurre le emissioni di CO₂ in atmosfera (Chiaiese et al., 2014).

Volendo definire i biocombustibili, possono essere considerati dei veri e propri combustibili ottenuti dall'impiego di biomasse: colture saccarifere (barbabietola da zucchero e sorgo) ed amidacee (mais), sono questi solo alcuni degli esempi di piante comunemente usate per la produzione di bioetanolo, pertanto definite “alcoligene”. Al contrario, colture prettamente oleaginose vengono usate per la produzione di biodiesel, un altro biocarburante liquido. Insieme al bioetanolo e al biodiesel, sono considerati biocarburanti anche il biometanolo, biodimetiltere, bioidrogeno ed il biogas (Pimentel & Patzek, 2005).

Tramite approcci biotecnologici gli esperti si impegnano a limitare le criticità e gli svantaggi legati all'utilizzo industriale dei biocombustibili, tramite un miglioramento dei bilanci energetici e aumento delle rese, a fronte di una riduzione dei costi di produzione. La sostituzione dei combustibili fossili con i biocarburanti comporta inoltre un impatto importante sulla quantità e qualità dei gas di scarico emessi: ad esempio, il biodiesel, in funzione del tipo di motore e della percentuale miscelata al gasolio, consente di ridurre le emissioni di monossido di carbonio, idrocarburi incombusti e particolato.

In particolare, il biodiesel di seconda generazione è un biocarburante liquido ottenuto dalla biomassa algale. Numerose specie microalgali sono caratterizzate da un tenore elevato di sostanze lipidiche, adatte ad essere convertite efficientemente in biodiesel. A differenza delle piante oleaginose come la colza e il girasole che permettono di ottenere il biodiesel di

prima generazione, le alghe offrono il vantaggio di preservare le colture prima citate, potendole quindi destinare all'alimentazione umana.

Numerosi sono gli studi che mettono in evidenza la competitività di questo biocarburante rispetto ai classici combustibili fossili in termini di costi di produzione, rappresentando una valida alternativa anche al bioetanolo prodotto dalla canna da zucchero. Tra l'altro, alcune microalghe, come *Botryococcus brunii* e *Parietochloris incisa* presentano un contenuto in olio che supera l'80% del peso secco della biomassa totale, rispetto alle colture di soia (*Glycine max*) e palma da olio (*Elaeis guineensis*) che raggiungono appena il 5% di contenuto in olio sul peso della biomassa.

Altro punto a favore rispetto al biodiesel di prima generazione è l'elevata velocità di crescita delle microalghe rispetto alle piante superiori. Si ricorda infatti che generalmente il peso della biomassa algale raddoppia in meno di 24 ore, e addirittura in 3.5 ore se considerata la fase di crescita esponenziale. Ovviamente il peso secco delle microalghe non è costituito solo da sostanze lipidiche, bensì anche da carbonio, che rappresenta circa la metà del peso secco (Chiaiese et al., 2014).

È stato stimato che 100 tonnellate di biomassa algale sono in grado di fissare più di 180 tonnellate di CO₂, e proprio per questo, in un'ottica di economia circolare in determinate realtà industriali, l'anidride carbonica da immettere nel sistema di crescita potrebbe provenire da centrali termo-elettriche, favorendo un bilanciamento del carbonio con comprovati benefici ambientali.

La coltivazione su larga scala di microalghe comporta il consumo di ingenti quantità di acqua, talvolta dolce, e sostanze nutritive, potendo perciò impattare negativamente sulla vantaggiosità economica dell'intero processo colturale. Una possibile soluzione a questo inconveniente è sfruttare per la crescita algale delle risorse reperibili a costo zero, come l'acqua marina, disponibile in quantità praticamente illimitata, o le acque reflue, le quali rappresentano un'ottima fonte di composti organici quali azoto e fosforo, e che rappresentano, se disperse inopportuno nell'ambiente, la prima causa di eutrofizzazione negli habitat acquatici. Dalle osservazioni di Yang et al. (2011) si evince che la coltivazione di microalghe con queste acque, comporterebbe nel ciclo di produzione una riduzione dell'aggiunta di N e P di circa il 55%, con un'efficienza media di rimozione del 72% per l'azoto e del 28% per il fosforo impiegando *Chlorella vulgaris*, e ulteriori studi su specie quali *Nannochloris gaditana* e *Botryococcus braunii* sono attualmente in corso. Oltre a consentire la redditività economica del processo, lo sfruttamento di tali risorse

comporterebbe un impatto positivo su importanti preoccupazioni ambientali in quanto contribuisce alla riduzione dell'inquinamento e del consumo di suddette acque, trasformandole in vere e proprie risorse. Questi organismi fotosintetizzanti, come dimostrato anche in studi condotti da Woertz et al. (2009), possono essere impiegati per il trattamento di acque reflue sia urbane che industriali. Infine, la biomassa derivante dall'impiego di alghe destinate al trattamento di queste acque, piuttosto che impiegarla come integratore alimentare nell'alimentazione umana e/o animale, potrebbe essere destinata ad un'ulteriore produzione di biodiesel.

1.2.2 Prodotti ad elevato valore aggiunto

Le microalghe rappresentano potenziali fonti di PUFA ad oltre 18 atomi di carbonio, ovvero *Acidi Grassi Polinsaturi* caratterizzati da più di un doppio legame lungo la catena carboniosa. Questi composti abitualmente si rilevano nei pesci, e a questa classe appartengono gli omega-3, omega-6 e omega-9, importanti dal punto di vista nutrizionale in quanto mediano processi infiammatori e di segnalazione cellulare (Thomas, 2011).

Tra i PUFA microalgali di particolare interesse vi sono l'acido γ -linolenico (GLA), arachidonico (AA), eicosapentaenoico (EPA) ed infine il docosaesaenoico (DHA). Tuttavia, attualmente il DHA è l'unico PUFA algale disponibile in commercio, sebbene si stia sperimentando anche la produzione industriale dell'EPA in alcune specie come *Monodus subterraneus*, *Cryptocodinium cohnii* e *Porphyridium purpureum* (Belarbi, 2000).

Normalmente, la produzione dei composti bioattivi eterogenei sopra riportati richiede l'uso di monoculture al fine di garantire la standardizzazione della produttività, accompagnata ad un'elevata resa. Per tali motivi, in questi contesti si preferisce la coltivazione in fotobioreattori controllati piuttosto che in sistemi a vasche aperte (Wang & Chen, 2008).

A causa degli effetti tossici e/o allergenici di individui nei confronti di diversi coloranti sintetici, negli ultimi anni si è osservato un crescente interesse riguardo all'ottenimento di coloranti provenienti da fonti naturali, e le microalghe sono tra queste. *Dunaliella*, *Haematococcus*, e *Spirulina* rappresentano solo alcuni dei numerosi generi algali sfruttati per l'estrazione di composti quali carotenoidi, astaxantine, ficobiliproteine e ficocianine (Begum et al., 2016). Per la produzione di questi composti vengono sfruttate microalghe in cui viene inserito un transgene che ne permette la sintesi, oppure si sfrutta il corredo genetico di alghe *wild-type* normalmente in grado di fabbricarli, come il β -carotene e l'astaxantina in *D. salina* e *H. pluvialis* (Steinbrenner & Sandmann, 2006).

Altre molecole di grande interesse prodotte dalle alghe sono i triterpeni, molecole a 30 atomi di carbonio prodotte nella via biosintetica degli isoprenoidi mediante condensazione di due molecole di farnesil pirofosfato. Negli organismi fotosintetici, generalmente i triterpeni sono prodotti nella via citosolica del mevalonato, mentre nelle alghe verdi, come *Botryococcus braunii*, sono prodotti principalmente nella via del non-mevalonato (Murakami et al., 2003).

Questi studi mettono in luce il grande potenziale delle microalghe per la produzione di molecole ad elevato valore aggiunto che trovano impiego non solo nelle industrie alimentari, ma anche in quelle farmaceutiche e cosmetiche.

1.3 Ingegneria metabolica

L'ingegneria genetica nel campo delle piattaforme vegetali non è la sola ad essere abbondantemente migliorata negli ultimi decenni, infatti nelle ultime due decadi anche l'ingegneria metabolica ha contribuito al raggiungimento di notevoli successi in numerose specie vegetali, sia piante modello che piante coltivate. Questa branca della scienza, nata agli inizi degli anni '90, non si occupa semplicemente dell'aumento della produzione di composti di origine vegetale, bensì di aspetti molto più ampi e complessi, come la modifica e l'intera ottimizzazione dei flussi metabolici in cellula, o addirittura la messa a punto di nuove vie metaboliche. Può essere descritta come la strategia chiave per modulare il metabolismo degli organismi con lo scopo di produrre le quantità richieste del metabolita desiderato attraverso tecniche di genetica (Keasling, 2010).

Le cellule svolgono numerose reazioni biochimiche, e alcuni dei metaboliti generati durante questi processi possono rappresentare per l'uomo ottimi elementi in diverse applicazioni. Gli interventi dell'ingegneria metabolica sono molteplici, e per citarne alcuni si può fare riferimento alla sovra-espressione costitutiva o inducibile di determinati geni, al silenziamento di *pathway* competitivi tramite tecniche di *RNA interference*, o ancora al miglioramento della compartimentalizzazione di specifiche biomolecole.

Tuttavia, per realizzare un intervento di ingegneria metabolica, e quindi la modifica di una via metabolica, è necessario considerare diversi aspetti soprattutto legati alla conoscenza della via biosintetica della molecola di interesse, ai geni coinvolti nella codifica dei relativi enzimi e alle sequenze regolatrici dei geni strutturali coinvolti (Kulkarni, 2016).

Batteri e semplici organismi eucariotici, quali i lieviti, sono stati i pionieri dell'ingegneria metabolica, ma al giorno d'oggi, grazie all'approfondimento delle conoscenze, le piattaforme viventi utilizzate sono le più disparate, come funghi, cellule animali, piante e microalghe. I risultati conseguiti dall'ingegneria genetica e metabolica hanno permesso di approfondire ad esempio i meccanismi di difesa contro agenti patogeni o condizioni abiotiche estreme, e di

ottenere ceppi/genotipi più produttivi e caratterizzati da un maggiore valore nutrizionale, salutistico ed industriale (Chiaiese et al., 2014).

Per riportare alcuni esempi in ambito vegetale è possibile citare lo studio condotto su *Arabidopsis thaliana* per la sovraespressione del gene che codifica per l'enzima *tocopherolmetiltransferasi*, che ha determinato un incremento della sintesi e dell'accumulo di vitamina E (Shintani & Della Penna, 1998). Altro esempio rilevante è la possibilità di espressione di un gene in un ospite eterologo, come l'espressione in tabacco (*Nicotiana tabacum*) dell'*ApoA1*, un'apolipoproteina umana (Chiaiese et al., 2011).

Anche nelle microalghe si apprezzano innumerevoli studi di applicazione dell'ingegneria metabolica per la produzione di svariati composti. Ad esempio, molti studi sono stati incentrati sulle molecole lipidiche per permettere la sintesi di nuove tipologie di oli che si predispongano maggiormente alla produzione di biodiesel (Culaba et al., 2020), e altri sulla sovra-espressione ed accumulo di particolari composti come i polioidrossialcanoati per la fabbricazione di bioplastiche, o di violaxantina e luteina in *Chlorella zofingiensis* e *C. reinhardtii* tramite una sovraespressione del gene codificante la *fitoene desaturasi* (Chen & Patel, 2012; Cordero et al., 2011). Inoltre, un recente studio riporta, l'espressione eterologa di geni per la produzione di terpeni in microalghe eucariotiche (Lauersen, 2019).

Dai casi studio sopra riportati è perfettamente apprezzabile come l'ingegneria metabolica sia diventata un'area della biotecnologia con un enorme potenziale commerciale, capace di offrire solide basi per la sintesi su larga scala di biomolecole in modo sostenibile e economicamente competitivo.

1.4 Triterpeni: struttura chimica e proprietà biologiche

I terpeni sono tra i più numerosi composti organici naturali, definiti anche isopreni poiché sono costituiti dalla ripetizione di unità isopreniche. L'isoprene è una molecola a 5 atomi di carbonio, e in funzione del numero di ripetizioni isopreniche si distinguono le classi mono-, di-, tri-, tetra-, sesqui- e poli- terpeni.

In particolare, i triterpeni sono caratterizzati da sei unità isopreniche, e contengono pertanto 30 atomi di carbonio. Nei vegetali sono i principali costituenti delle resine, degli oli essenziali, degli ormoni stimolatori della crescita ed inoltre svolgono azione deterrente nei confronti di batteri, funghi e parassiti (Murakami et al., 2003). Sono considerati una grande classe di metaboliti secondari che vengono sintetizzati durante lo sviluppo e in risposta ad adattamento ambientale, o per le reazioni di difesa, e suscitano grande interesse nel campo alimentare, salutistico e biotecnologico. Numerosi studi hanno infatti dimostrato diverse attività biologiche dei triterpeni quali: attività antinfiammatoria, antivirale, anticolesterolemica, anticancerogica (El-Seedi et al., 2005; Gill, B et al., 2016; Zhou et al., 2017), nonché immunostimolatrice (Rios JL, 2010) che rendono queste molecole particolarmente interessanti per la cura di diverse patologie in campo umano.

Nelle piante superiori i triterpeni si ritrovano in forma lineare o ciclica, e in letteratura ne sono riportati migliaia: ad esempio, il *limonoide* contenuto nell'esperidio degli agrumi, che ne conferisce il sapore amaro ed è un deterrente per gli insetti; o le *saponine*, glicosidi triterpenici che permettono la difesa delle piante erbacee provocando la rottura delle membrane delle ife fungine (Adam, 2013).

Nelle microalghe invece le conoscenze sui triterpeni sono limitate, e si stanno approfondendo solo negli ultimi anni. Infatti, sono stati identificati in minor numero rispetto alle piante, e il meccanismo di biosintesi non è ancora stato del tutto chiarito, sebbene il *pathway* più accettato dalla comunità scientifica sarebbe quello della via dello squalene (Murakami et al., 2003). Tra i più conosciuti triterpeni algali vi è il *tetrametil-botryococcene* (TMB) a struttura lineare; o le saponine pentacicliche, come la α -*amirina*, β -*amirina* e l'*acido betulinico* (D'Adamo et al., 2019).

Inoltre, due nuovi triterpeni algali dotati di una spiccata azione fungicida, il *capisterone A* e *B*, sono stati identificati in *Penicillus capitatus*, una delle alghe verdi più diffuse nell'oceano Atlantico (Puglisi et al., 2004).

È importante notare che in alcune accessioni algali, diversi olii triterpenici rappresentano fino all'86% del peso secco, e suscitano un grande interesse negli studiosi, in quanto possono essere convertiti chimicamente in combustibili (Murakami et al., 2003). Tuttavia, è doveroso sottolineare che la reazione di trans-esterificazione sfruttata normalmente sui trigliceridi per produrre biodiesel in questo caso non può essere utilizzata, in quanto i triterpeni lineari mancano dell'ossigeno libero, rendendo impraticabile tale tecnica. Proprio per questo motivo sono in corso diversi studi per la sintesi di validi triterpeni ciclici in alga che possano presentare caratteristiche chimico-fisiche simili a quelle dei combustibili, e quindi potenzialmente impiegabili come biocarburanti, ma anche in altri settori, come quello della cosmetica (Niehaus et al., 2011).

L'interesse maggiore per la sintesi di triterpeni nelle microalghe rispetto ad altre piattaforme biologiche è legato al fatto che nelle piante superiori questi composti vengono sintetizzati in minime quantità ed in miscele piuttosto complesse, rendendo i processi di isolamento ed estrazione su larga scala costosi oltre che estremamente laboriosi, mentre nelle alghe gran parte dei triterpeni viene secreto nello spazio extracellulare, e non accumulato nell'ambiente citoplasmatico. Questo è un grande vantaggio a favore di questi organismi, in quanto permetterebbe su larga scala un'estrazione semplice degli olii semplicemente tramite solventi, ad esempio l'esano (Niehaus et al., 2011).

Va inoltre considerato che il trasferimento degli enzimi coinvolti nella biosintesi in altre specie vegetali è tutt'altro che semplice e talvolta ostacolato dalla presenza di enzimi endogeni che possono apportare modifiche indesiderate alle molecole intermedie e/o finali, come è stato rilevato in *Nicotiana benthamiana* e *Oryza sativa* (Huang et al., 2015).

Le alghe rappresenterebbero i migliori ospiti eterologhi per la produzione di triterpeni anche per altri motivi: intanto sfruttano la via di biosintesi dello sterolo, la quale è presente in tutti gli eucarioti ma rara nei procarioti, escludendo vari batteri tra cui *E. coli* come possibile candidato per la produzione, ed inoltre possono sfruttare la luce solare e la CO₂ per ottenere energia e carbonio per la crescita, riducendo così al minimo l'impatto ambientale del ciclo di produzione.

2. OBIETTIVI DELLA TESI

L'obiettivo del seguente lavoro di tesi svolto presso il laboratorio del Prof. Pasquale Chiaiese si integra in un progetto di biologia sintetica volto alla modificazione del profilo terpenoidico di accessioni microalgali e di piante superiori mediante manipolazione genica. Allo scopo, il mio lavoro di tesi ha avuto come obiettivo principale l'ottenimento di accessioni microalgali e piante di *Nicotiana tabacum* geneticamente modificate ottenute mediante trasformazione genica con metodo indiretto mediato dall'*Agrobacterium tumefaciens*.

Gli organismi transgenici ottenuti nella sperimentazione hanno integrato nel loro genoma il gene di *Aster sedifolius*, *AsOXAI*, codificante per una triterpene ciclasi sotto il controllo di un promotore costitutivo 35S e potrebbero rappresentare delle valide piattaforme vegetali per la modificazione dei triterpeni, offrendo interessanti applicazioni nel campo nutraceutico, farmacologico e soprattutto dei biocarburanti.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Accessioni algali e vegetali

Le accessioni algali utilizzate in questo lavoro di tesi e riportate in Tabella 3.1 appartengono tutte alla classe delle *Chlorophyceae*, e ai generi: *Ankistrodesmus*; *Botryococcus*; *Chlamydomonas*; *Chlorella*; *Selenastrum*, *Scenedesmus* e *Chromochloris*.

Esse sono presenti nella collezione di microalghe disponibile presso il Dipartimento di Scienze Biologiche dell'Università degli studi di Napoli Federico II; ACUF (Algal collection University Federico II) e sono state rese disponibili per gli esperimenti di questa tesi grazie alla collaborazione esistente tra il prof. Pasquale Chiaiese e il prof. Antonino Pollio. I ceppi mutanti della specie *Chlamydomonas reihardtii*, sono stati acquistati presso il Chlamydomonas Resource Center (<http://www.chlamy.org/>).

Per gli esperimenti sul tabacco (*Nicotiana tabacum*) è stata utilizzata la cultivar Samsun NN.

Tabella 3.1. Elenco dei generi di microlaghe appartenenti alla classe delle Chlorophyceae utilizzati in questa tesi. Per ogni specie sono riportati il codice dell'accessione nella banca del germoplasma ACUF e la sigla identificativa riportata in questo lavoro.

Accessione	Genere	Codice
#101	<i>Chlorella</i>	Che
#103	<i>Chlamydomonas</i>	Cre
#104	<i>Ankistrodesmus</i>	Abr
#112	<i>Chlorella</i>	Chv
#115	<i>Scenedesmus</i>	Sva
#120	<i>Chlamydomonas</i>	Cpi
#122	<i>Scenedesmus</i>	Sov
#124	<i>Chlorella</i>	Chl
#125	<i>Chlorella</i>	Chs
#126	<i>Scenedesmus</i>	Scq
#132	<i>Scenedesmus</i>	Sob
#133	<i>Botryococcus</i>	Bob
#140	<i>Chromochloris</i>	Chz

3.2 Preparazione dei substrati di coltura

I substrati di coltura sono stati preparati utilizzando acqua demineralizzata, con una conducibilità elettrica di $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, ottenuta con deionizzatore ad osmosi inversa (Millipore).

La sterilizzazione dei mezzi di coltura è stata effettuata in autoclave alla temperatura di 121°C ed alla pressione di $0,12 \text{ Mpa}$ per 20 minuti.

Tutte le operazioni in sterilità sono state eseguite sotto cappa a flusso laminare orizzontale per la manipolazione delle alghe piante e verticale per la manipolazione dei batteri, il cui interno è stato reso sterile prima dell'uso per azione di una lampada germicida a raggi UV tenuta accesa per almeno 20 minuti ed il cui piano di lavoro era stato preventivamente trattato con una soluzione di alcool etilico denaturato al 70%.

3.3 Allevamento del materiale vegetale

Le piante di tabacco della cv Samsun NN sono state micropropagate ed allevate in armadi di crescita alla temperatura di $24\pm 1^\circ\text{C}$ e con fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio. I nodi sono stati micropropagati ogni 30 giorni su substrato di crescita minerale, basato sulla formulazione di Murashige & Skoog (1962) con l'aggiunta del 3% di saccarosio (POC). Il differenziamento degli espianti fogliari di tabacco è stato ottenuto su substrato di crescita RTE; basato sul substrato POC, addizionato con gli ormoni benzil-amminopurina (BAP, 2 mg l^{-1}) e acido indolacetico (IAA, $0,4 \text{ mg l}^{-1}$).

3.4 Allevamento delle colture algali

Il substrato di coltura utilizzato per le specie algali è il Bold Basal Medium (BBM) (Toyub et al., 2012).

Il mantenimento delle colture algali è stato effettuato con un rinfresco quindicinale in beute di vetro Pyrex da 250 ml contenenti 100 ml di BBM.

Le beute sono state poste su agitatore planetario alla velocità di 100 rpm in camera di crescita ad una temperatura di $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ e un fotoperiodo di 16 ore di luce ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e 8 ore di buio.

3.5 Determinazione degli indici di correlazione tra densità cellulare e ottica dei ceppi microalgali saggiati

Per determinare la densità algale espressa in numero di cellule per volume di substrato sono stati calcolati gli indici di correlazione tra numero di cellule algali per millilitro e densità ottica della coltura mediante un'analisi della densità ottica tramite spettrofotometro (Perkin Elmer serie Lambda 25 UV/VIS) a differenti lunghezze d'onda comprese tra 490 nm e 800 nm e la densità cellulare espressa come numero di cellule in volume è stata effettuata mediante una camera contaglobuli (Fuchs-Rosenthal; Brand).

Per ciascuna accessione è stata determinata la correlazione tra densità ottica e concentrazione di cellule per ml.

3.6 Saggi di inibizione della crescita algale su substrato solido e in liquido in presenza dell'antibiotico geneticina

Sono stati effettuati saggi di inibizione alla crescita di microalghe all'agente selettivo geneticina (G418). Le concentrazioni di G418 saggiate sono state di 0; 30; 60; 90 mg l^{-1} .

Il saggio di sensibilità ha previsto l'ottenimento di colture microalgali in fase di crescita esponenziale mediante allevamento dei ceppi microalgali nel mezzo nutritivo. Successivamente la sensibilità della geneticina è stata saggiata mediante inoculo in piastre da 96 pozzetti (M-Medical) contenenti ciascuno 100 μl della coltura, allestendo 3 pozzetti per ciascun trattamento e per ciascuno dei ceppi algali saggiati. La crescita della coltura è stata seguita mediante rilevazione al lettore luminometrico (Perkin Elmer serie Victor modello Wallac).

La percentuale di inibizione della crescita algale è stata determinata con la seguente equazione:

$$\%I = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} * 100$$

Dove μ_c e μ_t rappresentano rispettivamente la velocità specifica di crescita nel ceppo controllo (in assenza di antibiotico nel mezzo di coltura) e nel ceppo allevato in presenza

dell'agente selettivo. Risulta pertanto necessario calcolare prima la velocità di crescita μ , la quale è determinata dalla seguente formula:

$$\mu = \frac{\ln(N_f - N_i)}{(t_f - t_i)}$$

In cui N_f e N_i rappresentano rispettivamente il numero di cellule risultanti alla fine (t_f) e all'inizio dell'esperimento (t_i).

I saggi in solido sono stati effettuati in piastre Petri strisciate con cinquanta milioni di cellule per ogni ceppo algale su substrato solido in presenza dell'agente selettivo geneticina e la presenza di colonie è stata rilevata dopo 20 giorni dall'inoculo.

3.7 Colture batteriche

Le specie batteriche utilizzate sono state *Escherichia coli*, ceppo DH5 α , contenenti il gene *oxa1*, utilizzato per l'estrazione del vettore pG0029-*CaMV35S::AsOXA1* e *A. tumefaciens*, ceppo LBA4404, veicolo per la trasformazione genetica nucleare indiretta.

Il substrato di coltura utilizzato per *E. coli* è stato il Luria-Bertani Broth (LB) (Miller, 1972) in presenza di kanamicina (50 mg l⁻¹) e gli inoculi batterici sono stati cresciuti alla temperatura di 37 \pm 1°C in agitazione alla velocità di 150 rpm.

Il substrato di coltura utilizzato per *A. tumefaciens* è stato lo YEP (Tremaine, 1957) in presenza di kanamicina (50 mg l⁻¹) e rifampicina (50 mg l⁻¹) e gli inoculi batterici sono stati cresciuti alla temperatura di 27 \pm 1°C in agitazione alla velocità di 150 rpm.

3.8 Geni e vettori utilizzati

Il vettore binario utilizzato per gli esperimenti di trasformazione genetica nucleare indiretta è stato il pG0029-*CaMV35S::AsOXA1* (Confalonieri et al., 2009; Pecchia, 2008), reso disponibile dal CNR-Istituto di Bioscienze e BioRisorse (IBBR) SS Portici grazie ad una collaborazione esistente tra il relatore il Prof. Pasquale Chiaiese e la Dott.ssa Maria Cammareri.

In figura 3.1 è riportato il vettore 35SOXA1 contenente il gene *AsOXA1* (numero di accessione AY836006), isolato dalla pianta erbacea *Aster sedifolius* e codificante per una β -amirina sintasi (Cammareri et al., 2008) enzima chiave coinvolto nel *pathway* di ciclizzazione dei triterpeni, posto sotto il controllo del promotore costitutivo 35S.

Inoltre, il promotore del gene codificante l'enzima nopalina sintetasi controlla l'espressione del gene di resistenza *nptII*, codificante per l'enzima neomicina fosfotransferasi II che conferisce la resistenza agli antibiotici del gruppo degli amminoglicosidi (Beck et al., 1982).

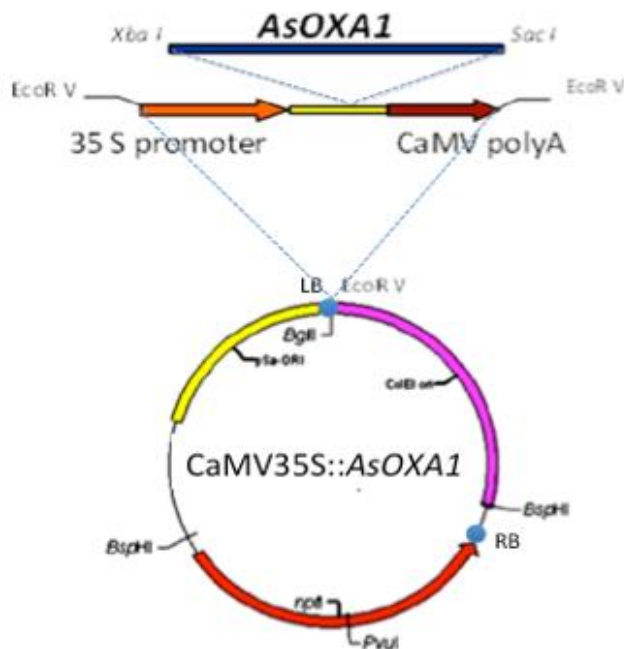


Figura 3.1 Rappresentazione schematica del vettore di espressione pG0029-35SCaMV::AsOXA1. La sequenza del gene *AsOXA1*, codificante per l'enzima β -amirina sintasi, è compresa tra il promotore 35S del CaMV ed il terminatore. La cassetta di espressione è presente nel vettore binario pG0029 derivato dal plasmide pGreenII, il cui T-DNA presenta al suo interno il gene *nptII* che determina la resistenza agli antibiotici del gruppo degli amminoglicosidi.

3.9 Estrazione e determinazione quantitativa del DNA plasmidico estratto

Le cellule di *E. coli* contenenti il gene *oxa1* e mantenute in una soluzione di LB e glicerolo al 20% a -80°C sono state inoculate in tubi da 50 ml contenenti 20 ml di substrato di coltura LB in presenza di kanamicina (50 mg l^{-1}) e sono state cresciute alla temperatura di $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ in agitazione alla velocità di 150 rpm per 16 ore.

L'estrazione del DNA plasmidico è stata effettuata con il kit "Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System" (Promega) e il DNA isolato è stato successivamente quantificato mediante l'utilizzo del "Nanodrop 1000" (*Thermo Scientific Inc.*) ed analizzato attraverso il software fornito dalla casa produttrice.

3.10 Ottenimento di cellule elettrocompetenti di *Agrobacterium tumefaciens*

Una colonia di *A. tumefaciens* è stata inoculata in tubi da 15 ml contenenti 5 ml di substrato di coltura LB in presenza di streptomicina (200 mg ml^{-1}) ed è stata cresciuta alla temperatura di $28 \pm 1^\circ\text{C}$ in agitazione alla velocità di 200 rpm per 24 ore.

Le cellule ottenute sono state inoculate in beute di vetro Pyrex da 1 l contenenti 200 ml di substrato LB alle stesse condizioni fino al raggiungimento di $\text{OD}_{600} = 0,6$.

La coltura è stata mantenuta in ghiaccio per 15 minuti e sottoposta a centrifugazione per 15 minuti alla velocità di $6000 \times g$.

Il *pellet* ottenuto è stato risospeso con 200 ml di acqua Milli Q sterile fredda conservata a 4°C e la soluzione ottenuta è stata centrifugata alle stesse condizioni.

Il *pellet* ottenuto è stato risospeso con 100 ml di acqua Milli Q sterile fredda conservata a 4°C .

Il *pellet* ottenuto è stato risospeso con 4 ml di una soluzione di glicerolo al 10% e la soluzione ottenuta è stata nuovamente centrifugata alle stesse condizioni. Il *pellet* ottenuto è stato risospeso con $150 \mu\text{l}$ di una soluzione di glicerolo al 10% e state ottenute aliquote da $40 \mu\text{l}$ ciascuna che sono state stoccate a -80°C .

3.11 Elettroporazione di *A. tumefaciens*

L'elettroporazione del DNA nelle cellule batteriche è stata ottenuta con l'impiego dell'elettroporatore "Biorad *E. coli* Pulser" (Biorad) secondo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

Le cellule del ceppo LBA4404 di *A. tumefaciens* elettroporate sono state strisciate in piastre Petri contenenti substrato di coltura solido LB in presenza di kanamicina (50 mg l^{-1}) e rifampicina (50 mg l^{-1}) e sono state cresciute alla temperatura di 27°C per 48 ore.

Per verificare l'avvenuta integrazione del plasmide sono state prelevate dodici colonie le quali sono state cresciute su substrato di coltura liquido selettivo ed è stata effettuata una PCR *colony* utilizzando oligonucleotidi specifici (riportati in tabella 3.2) per la sequenza nucleotidica del gene di interesse *AsOXAI* per verificare l'avvenuta integrazione del vettore binario nel batterio.

Le analisi di amplificazione *in vitro* del DNA sono state eseguite con l'impiego di un termociclatore PCR (Eppendorf). Le reazioni di amplificazione sono state effettuate impiegando una concentrazione finale di 5 ng di DNA plasmidico per reazione.

La miscela di reazione è stata allestita come segue: 5 µl di buffer 5X (Life Technologies); 100 µM dNTP; 10 µM di coppie di oligonucleotidi; 1,5 mM MgCl₂; 1,5 unità di Taq Polimerasi; acqua sterile al volume finale di 25 ml.

Il programma di amplificazione utilizzato è descritto di seguito:

- 1 ciclo a 94°C per 5 minuti per la denaturazione del DNA;
- 35 cicli comprendenti: una fase di denaturazione a 94°C per 45 secondi, una fase di appaiamento dei oligonucleotidi per 30 secondi ad una temperatura di 53°C ed una fase di elongazione a 68°C per 2 minuti;
- 1 ciclo terminale di elongazione a 68° C per 8 minuti.

I prodotti di amplificazione sono stati caricati su gel di agarosio allo 0.8% (w/v) e sottoposti a migrazione elettroforetica in TAE 1x (Tris base 1 M; CH₃COOH glaciale 17,48 M; EDTA pH 8, 0,5M) applicando una differenza di potenziale di 70 V per circa 40 minuti e il gel è stato visualizzato con un trans illuminatore UV (BioRad Molecular Imager Gel Doc XR Imaging system).

3.12 Trasformazione genetica delle alghe mediata da *A. tumefaciens*

La specie batterica utilizzata per esperimenti di manipolazione genetica è stata *A. tumefaciens*. Il ceppo utilizzato è stato LBA4404 cresciuto in terreno di coltura YEP in presenza di kanamicina (50 mg l⁻¹) e rifampicina (50 mg l⁻¹) alla temperatura di 27°C al buio e in agitazione.

Per realizzare il processo di trasformazione si è seguito il protocollo descritto in letteratura da Kumar et al. (2004) per il trasferimento genico nucleare della specie *Chlamydomonas reinhardtii*, con opportune modifiche. La procedura è stata la seguente: 200 µl di ciascuna coltura algale sono stati inoculati in capsule Petri contenenti il substrato di coltura BBM ottenendo 6 piastre.

Dalla sospensione batterica sono stati prelevati 3 ml utilizzati per analisi spettrofotometrica, la restante parte è stata centrifugata per 15 minuti, alla temperatura di 25°C a 4000 rpm.

Dopo centrifugazione è stato allontanato il surnatante e il *pellet* è stato risospeso in una soluzione contenente substrato di coltura BBM e acetosiringone 100 mM e la soluzione è stata mantenuta in agitazione per due ore, alla temperatura di 27°C al buio.

200 µl di sospensione batterica sono stati inoculati in capsule Petri contenenti microalghe utilizzando un'ansa ad L e le piastre sono state poi poste per 48 ore alla temperatura di 27°C in presenza di luce con fotoperiodo di 16h/8h di luce/buio.

Per ogni ceppo algale sono state preparate cinque piastre cocoltivate con *A. tumefaciens* e una piastra contenente microalghe non cocoltivate (controllo negativo).

Dopo 48 ore, sono state effettuate le rilevazioni per determinare il numero di colonie cresciute su substrato di coltura selettivo.

Le colonie putative transgeniche cresciute su substrato solido sono state sottoposte a due cicli di selezione in substrato liquido selettivo. Il primo ciclo di selezione è stato effettuato dopo 20 giorni di crescita delle colonie algali su substrato solido, inoculando singole colonie in piastre da 96 pozzetti ciascuno contenente 200 µl di substrato liquido BBM addizionato con geneticina 60 mg l⁻¹ e cefotaxime 250 mg l⁻¹.

Dopo ulteriori 20 giorni di crescita in substrato liquido selettivo, i pozzetti risultati positivi sono stati sottoposti ad un secondo ciclo di selezione in piastre da 24 pozzetti ciascuno contenente 1 ml di substrato liquido BBM addizionato con geneticina (60 mg l⁻¹) e 200 µl di sospensione algale.

3.13 Trasformazione genetica di *Nicotiana tabacum*

Le piante di tabacco sono state trasformate sfruttando il protocollo descritto in letteratura per il trasferimento genico nucleare della specie *N. tabacum* (Horsch et al., 1985) con opportune modifiche. La procedura impiegata è stata la seguente:

- il ceppo di *A. tumefaciens* recante il vettore pGreenII0029 è stato inoculato in LB liquido addizionato con kanamicina e rifampicina (50 mg l^{-1}) al fine di selezionare le cellule contenenti il plasmide di nostro interesse, e incubato a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ in agitazione per 48 ore;
- la sospensione batterica ottenuta è stata poi centrifugata ed il pellet risospeso in RTE tale da ottenere una soluzione avente densità ottica di 0,5 (λ 600);
- Giovani foglie di piante di tabacco allevate *in vitro* su substrato POC sono state tagliate in sezioni di 1 cm^2 e trasferite in capsule Petri sterili contenenti 10 ml di sospensione batterica, incubate per 2 minuti a temperatura ambiente, poste su substrato RTE ed infine incubate a 27°C alla luce;
- Dopo 48 h gli espianti sono stati trasferiti su POC addizionato con kanamicina (50 mg l^{-1}) e cefatoxime sodico (250 mg l^{-1}) e posti a 24°C in camera di crescita per circa 4 settimane.

I germogli transgenici putativi differenziati, sono stati tagliati e trasferiti su POC addizionato con kanamicina (50 mg l^{-1}) e cefatoxime sodico (250 mg l^{-1}) per la radicazione.

3.14 Estrazione di DNA da ceppi algali e piante di tabacco putativi transgenici

Il DNA genomico è stato isolato da microalghe e piante putative transgeniche secondo la seguente procedura sperimentale: sono stati aggiunti 500 µl di soluzione di tampone di isolamento (Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) 54 mM; EDTA 20 mM; NaCl 1,4 mM; Tris-HCl 100 mM, β-mercaptoetanol 0,25% (v/v)) a 50 mg di pellet algale e la soluzione così composta è stata incubata a 65°C per 10 minuti.

Successivamente la miscela è stata centrifugata per 10 minuti a temperatura ambiente a 14.000 rpm. Il surnatante è stato prelevato e 1 µl di enzima RNasi (100 mg/ml) è stato aggiunto alla soluzione che è stata incubata a 37°C per 1h. Un ugual volume di una soluzione composta da cloroformio-alcol isoamilico (24:1 v/v) è stato aggiunto e miscelato delicatamente prima di essere centrifugato a 14.000 rpm per 2 minuti a temperatura ambiente. Dopo centrifugazione, la fase acquosa è stata trasferita in un nuovo tubo da centrifuga sterile. Al fine di permettere la precipitazione del DNA 1 volume di isopropanolo freddo è stato aggiunto e la soluzione è stata centrifugata per 2 minuti a temperatura ambiente a 14.000 rpm.

Il *pellet* è stato risospeso in 500 µl di soluzione di lavaggio (C₂H₂OH 95% v/v, CH₃COONH₄ 10 mM) e la miscela è stata posta in agitazione per 2 minuti a temperatura ambiente e successivamente centrifugata per 3 minuti a temperatura ambiente a 14.000 rpm.

La frazione solida composta da DNA è stata trasferita in una centrifuga da vuoto per la completa evaporazione dell'etanolo.

Il *pellet* è stato risospeso in 50 µl di acqua Milli Q sterile.

3.15 Analisi quantitativa e qualitativa del DNA genomico

Il DNA genomico ottenuto è stato sottoposto ad un'analisi spettrofotometrica per determinarne la concentrazione. A tale scopo è stato utilizzato un spettrofotometro-fluorimetro da banco, il *Nanodrop 1000* della *Thermo Scientific* grazie al quale è possibile saggiare volumi di campione nell'ordine dei microlitri.

Sono stati rilevati i rapporti di assorbanza a 260 nm e 280 nm e a 260 nm e 230 nm, entrambi indicativi della qualità del DNA estratto.

3.16 Analisi di amplificazione *in vitro* di DNA di microalghe putative transgeniche

La miscela di reazione è stata allestita come segue: 5 µl di buffer 5X (Life Technologies); 100 µM dNTP; 10 µM di coppie di oligonucleotidi per l'amplificazione; 1,5 mM MgCl₂; 1,5 unità di Taq Polimerasi (Life Technologies); acqua sterile al volume finale di 25 ml.

Il programma di amplificazione utilizzato è descritto di seguito:

- 1 ciclo a 95 °C per 2 minuti per la denaturazione del DNA;
- 35 cicli comprendenti: una fase di denaturazione a 95° C per 45 secondi, una fase di appaiamento dei oligonucleotidi per 30 secondi ad una temperatura di 53° C ed una fase di elongazione a 72 °C per 2 minuti;
- 1 ciclo terminale di elongazione a 72 °C per 8 minuti.

Il bianco è stato preparato in assenza di DNA genomico come stampo, il controllo negativo è stato preparato con i medesimi ceppi algali non transgenici, il controllo positivo è stato preparato con il ceppo di *E. coli* contenente il gene *oxa1*.

L'amplificazione è stata eseguita utilizzando un termociclatore (Eppendorf ® Mastercycler® epgradient) e le sequenze degli oligonucleotidi (Oxa-F e Oxa-R) utilizzati per le reazioni di amplificazione *in vitro* sono riportati in tabella 3.2.

3.17 Analisi di amplificazione *in vitro* di campioni di DNA di piante di tabacco putative transgeniche

Al fine di identificare i trasformanti di *N. tabacum* l'analisi di amplificazione *in vitro* del DNA è stata eseguita con l'impiego di un termociclatore PCR (Eppendorf). In tabella 3.2 sono riportate le sequenze degli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione di ciascun gene.

Le reazioni di amplificazioni sono state condotte utilizzando concentrazioni finali di 50 ng del DNA plasmidico per reazione. La miscela di reazione era costituita come segue: 2,5µl di buffer 10X (Life Technologies), 0,5µl di dNTP (10mM), 1µl di MgCl₂ (50mM), 1µl di ciascuna sequenza di oligonucleotidi NPTII (10 µM) e 0,2µl di Taq Life Technologies (5 U/µl).

Il programma di amplificazione adottato è descritto di seguito:

- 1 ciclo a 94°C per 5 minuti per ottenere la denaturazione del DNA;
- 30 cicli comprendenti: una fase di denaturazione a 94°C per 30 secondi, una fase di appaiamento per 30 secondi a 55°C ed una fase di elongazione a 72°C per 1 minuto;
- 1 ciclo terminale di elongazione a 72°C per 10 minuti.

Tabella 3.2. Elenco dei oligonucleotidi utilizzati nelle amplificazioni PCR. È indicato il codice, la sequenza nucleotidica, la lunghezza dell'amplicone atteso e le relative temperature di *annealing*.

oligonucleotidi	Sequenza (5'-3')	Lunghezza amplificato atteso (cb)	Temperatura di <i>annealing</i> (°C)
35S-F	ATTGATATCGTACCCCTACTCCAAAAATG	400	57,3
35S-R	AGTGAATTCGGGCTGTCTCTCCAAATG		61,4
Oxa-F	GCAAAGTATGTGGAGAATG	1300	46,8
Oxa-R	GCCGGTGCATGCTTTTGA		50,3
qRT_Oxa-F	GGCATGTGGTTGCAAAGGA	104	51,7
qRT_Oxa-R	CCAGCGATTTAATAGAGGCTCG		55,3
qRT_Act-F	GGCAGGGTTTGCTGGAGATG	87	55,0
qRT_Act-R	CCATGCCAACCATCACACCT		55,0
NPTII-F	ACGTGCTATTCGGCTATGACTGGG	1100	64,4
NPTII-R	TCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGGCG		62,7

3.18 Analisi elettroforetiche dei prodotti estratti ed amplificati *in vitro*

La separazione elettroforetica del prodotto di amplificazione *in vitro* è stata visualizzata su gel di agarosio alla concentrazione di 0,8% (w/v). Il gel di agarosio è stato preparato secondo la seguente procedura sperimentale: sono stati pesati 0,8 g di agarosio in una beuta e mescolati a 100 ml di TAE 1x (Tris base 1 M; CH₃COOH glaciale 17,48 M; EDTA pH 8, 0,5M).

La sospensione contenente agarosio è stata posta in un forno a microonde e agitata ripetutamente fino all'ottenimento di una soluzione trasparente alla quale sono stati aggiunti 4 µl di intercalante per il DNA (Gel Red).

La soluzione è stata versata su una piastra in modo continuo e deciso per evitare la formazione di bolle ed è stato aggiunto il pettine per permettere la formazione di pozzetti di caricamento.

Il gel è stato lasciato raffreddare fino alla sua completa polimerizzazione seguita dalla rimozione del pettine. Nella camera elettroforetica è stata aggiunta la soluzione TAE 1X fino a coprire il gel completamente.

Alla camera elettroforetica è stata applicata una differenza di potenziale di circa 70 V per circa 1 ora.

Successivamente il gel è stato visualizzato con un trans illuminatore UV (BioRad Molecular Imager Gel Doc XR Imaging system).

3.19 Analisi di espressione genica in piante di tabacco

L'RNA totale è stato estratto con il Kit Qiagen "Rneasy Plant mini Kit" da foglie non completamente espanse di piante di tabacco.

La reazione di retrotrascrizione è stata condotta in un volume finale di 20 µl contenente 4 µl di buffer 5X, 2 µl di MgCl₂ 25 mM, 2 µl dNTP 10 mM, 0,5 µl di Rnase Inhibitor, 2 µl di DTT 100 mM, 0,3 µl di SuperScript III (50 U/µl) (Life Technologies) e 1 µg di RNA. La reazione è stata posta per 10 min a 25°C e successivamente a 42°C per 20 min.

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 (Life Technologies), 1 µl di 5 µM oligonucleotidi forward e reverse (per l'amplificazione del gene *AsOXA1* gli oligonucleotidi qRT_OXA-F e R, mentre per il gene dell'actina la coppia di oligonucleotidi qRT_ACT-F e R) (Tab. 3.2) 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_m) in funzione degli oligonucleotidi. Come gene endogeno è stato utilizzato l'actina di tabacco (accession number EU938079).

3.20 Analisi statistiche

Per determinare le differenze esistenti tra i diversi trattamenti per i parametri fisiologici calcolati è stata eseguita un'analisi ANOVA, ed è stata scelta una probabilità di $p < 0,05$ come livello di significatività per i test statistici. I valori che sono risultati statisticamente differenti sono stati sottoposti al Fisher's Last Significant Difference (LSD) test.

Per determinare le percentuali di inibizione nelle differenti accessioni algali è stata eseguita un'analisi di Shapiro Wilk test per determinare la distribuzione di normalità dei risultati e successivamente è stata eseguita un'analisi della varianza.

4. RISULTATI

4.1 Correlazione tra densità della coltura cellulare e densità ottica delle accessioni algali

Per determinare la densità cellulare dei ceppi microalgali è stata necessaria la determinazione degli indici di correlazione tra i parametri densità ottica e densità cellulare. Per ogni accessione è stata determinata la densità della coltura cellulare, espressa come numero di cellule ml di mezzo di coltura e la relativa densità ottica, rilevata attraverso analisi spettrofotometrica. In tabella 4.1 sono riportati i parametri delle rette di regressione ed i relativi coefficienti di determinazione calcolati per ogni ceppo algale sulla base di almeno 10 rilevazioni. Essendo il valore di R^2 osservato per ognuno dei ceppi prossimo a 1, la probabilità di errore è inferiore all'1% le rette di regressione hanno mostrato che i ceppi hanno un simile andamento di crescita, quindi si può concludere che la relazione tra densità cellulare e densità ottica non è genotipo-specifica. Dalla correlazione tra la costante ed il coefficiente angolare è stato possibile stimare la densità cellulare in base alla densità ottica della coltura.

La crescita su substrato BBM in tubi di plastica sterili è stata valutata tramite analisi qualitativa dopo 10 giorni dall'inoculo. I ceppi algali hanno mostrato anche su substrato solido una crescita profusa (fig. 4.1).

Tabella 4.1. Correlazione tra densità della coltura cellulare (DC) e densità ottica (OD 550 nm) delle accessioni algali. Sono riportati i parametri delle rette di regressione ed i relativi coefficienti di determinazione per ciascuna delle accessioni saggiate. La densità della coltura cellulare, espressa come numero di cellule per ml, risulta pari a: $DC = 1.000 (b + m (OD_{550 \text{ nm}}))$.

Accessione algale	Costante (b)	Coefficiente angolare (m)	Coefficiente di determinazione R ²
#101	123,34	18,51	0,92
#103	45,9	55,89	0,97
#104	68,22	23,84	0,89
#112	35,18	13,88	0,90
#115	95,04	11,37	0,92
#120	101,23	18,73	0,92
#122	110,36	32,12	0,93
#124	70,35	22,88	0,96
#126	52,67	0,02	0,87
#132	10,20	88,10	0,93
#133	178,93	11,44	0,95
#140	6,39	8,06	0,99

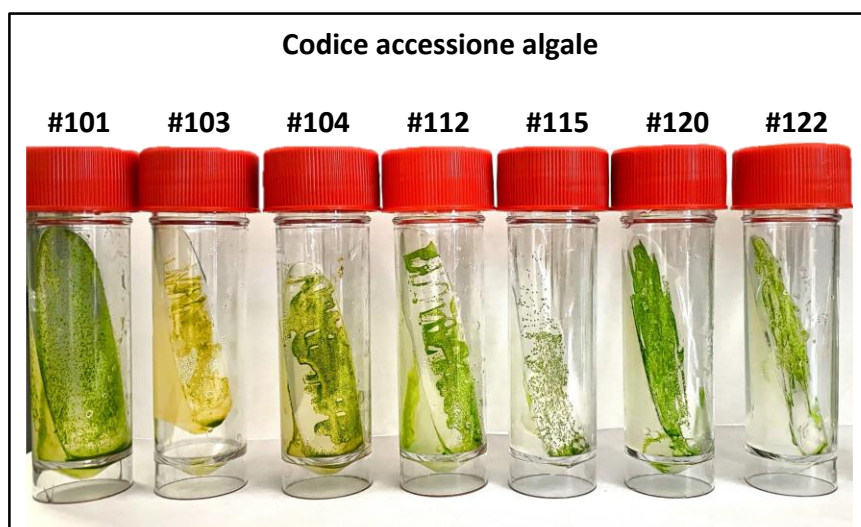


Figura 4.1. Crescita algale su substrato solido BBM. È riportata la crescita di colonie dei ceppi algali dopo 10 giorni dall'inoculo.

4.2 Saggi di inibizione della crescita algale su substrato solido e in liquido in presenza dell'antibiotico geneticina

Le accessioni algali da utilizzare per la trasformazione genetica attraverso il metodo indiretto mediante l'utilizzo di *A. tumefaciens* sono state sottoposte a saggi di sensibilità su substrato solido e liquido in presenza dell'agente selettivo geneticina.

In tabella 4.2 sono riportate le osservazioni effettuate per le diverse specie algali sottoposte ai saggi di inibizione su substrato solido. Le accessioni algali #122 e #126, rispetto alle altre specie algali, hanno mostrato una minore sensibilità all'agente selettivo con formazione di colonie anche alle concentrazioni di geneticina di 60 mg l⁻¹. Invece, per le altre specie algali saggiate la concentrazione di geneticina inibente la crescita è risultata essere pari a 60 mg l⁻¹.

In figura 4.2 sono riportati i valori percentuali dell'inibizione alla crescita delle specie algali in substrato liquido in presenza di concentrazioni crescenti dell'agente selettivo a 7 giorni dall'inoculo. La crescita di tutte le specie algali in assenza dell'agente selettivo non è stata inibita. In presenza della più bassa concentrazione di geneticina, pari a 30 mg l⁻¹ si rileva una percentuale di inibizione media tra i ceppi del 25%, mentre alla concentrazione di 60 mg l⁻¹ di agente selettivo tale valore aumenta a circa il 95%; va evidenziato che sorprendentemente, i ceppi #122 e #126 mostrano a questa concentrazione un effetto differente, con una percentuale di inibizione rispettivamente del 35 e 45%. Infine, alla più alta concentrazione di geneticina (90 mg l⁻¹) in tutte le accessioni algali si riscontra un'inibizione compresa tra il 97 e 98%, in concomitanza ad una diminuzione della densità ottica.

In figura 4.2.1 è riportata la crescita delle microalghe in piastra multipozzetto in presenza di concentrazioni crescenti dell'agente selettivo. Tutte le specie algali sono andate incontro a divisione cellulare con conseguente intorbidimento del mezzo di coltura in assenza dell'agente selettivo. In presenza di concentrazioni maggiori di geneticina è invece apprezzabile una più ridotta densità cellulare.

Tabella 4.2. Crescita delle microalghe in presenza di diverse concentrazioni di geneticina su substrato solido BBM. Sono state saggiate quattro diverse concentrazioni di antibiotico geneticina (0, 30, 60 e 90 mg l⁻¹). L'avvenuta crescita delle microalghe su piastra Petri è stata rilevata dopo 20 giorni dall'inoculo. Il simbolo + rappresenta la presenza di colonie, il simbolo - l'assenza di colonie.

Accessione algale	Geneticina (mg l ⁻¹)			
	0	30	60	90
#101	+	+	-	-
#103	+	+	-	-
#104	+	+	-	-
#112	+	+	-	-
#115	+	+	-	-
#120	+	+	-	-
#122	+	+	+	-
#124	+	+	-	-
#126	+	+	+	-
#132	+	+	-	-
#133	+	+	-	-
#140	+	+	-	-

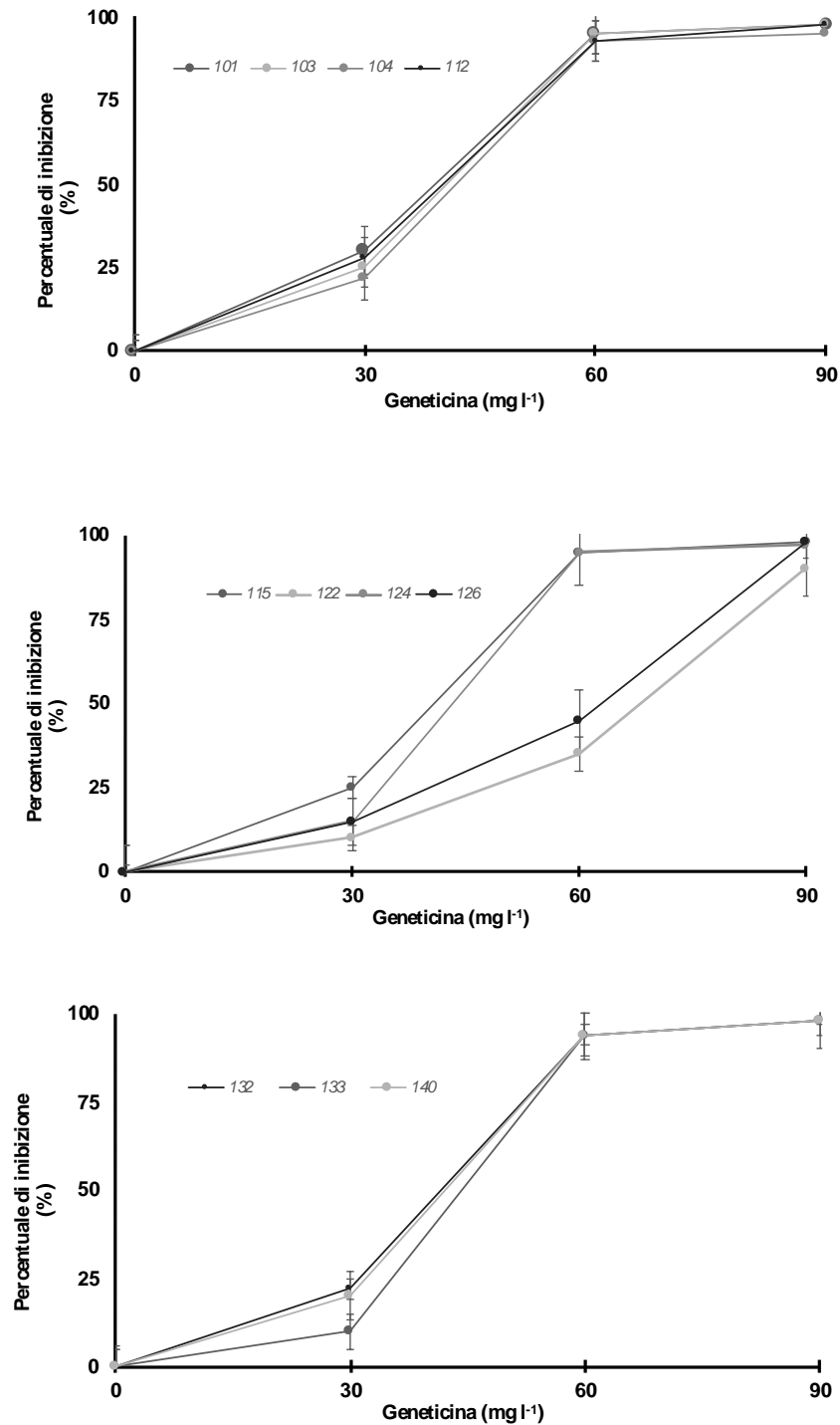


Figura 4.2. Valori percentuali dell'inibizione alla crescita delle specie algali in substrato liquido in presenza di concentrazioni crescenti dell'agente selettivo a 7 giorni dall'inoculo. Le sospensioni algali sono state inoculate in substrato liquido BBM contenente differenti concentrazioni di geneticina 0; 30; 60; 90 mg l⁻¹. La densità ottica e la percentuale di inibizione cellulare è stata determinata dopo 7 giorni dall'inoculo per ciascuno dei ceppi algali e per ciascuna concentrazione di antibiotico saggiata.

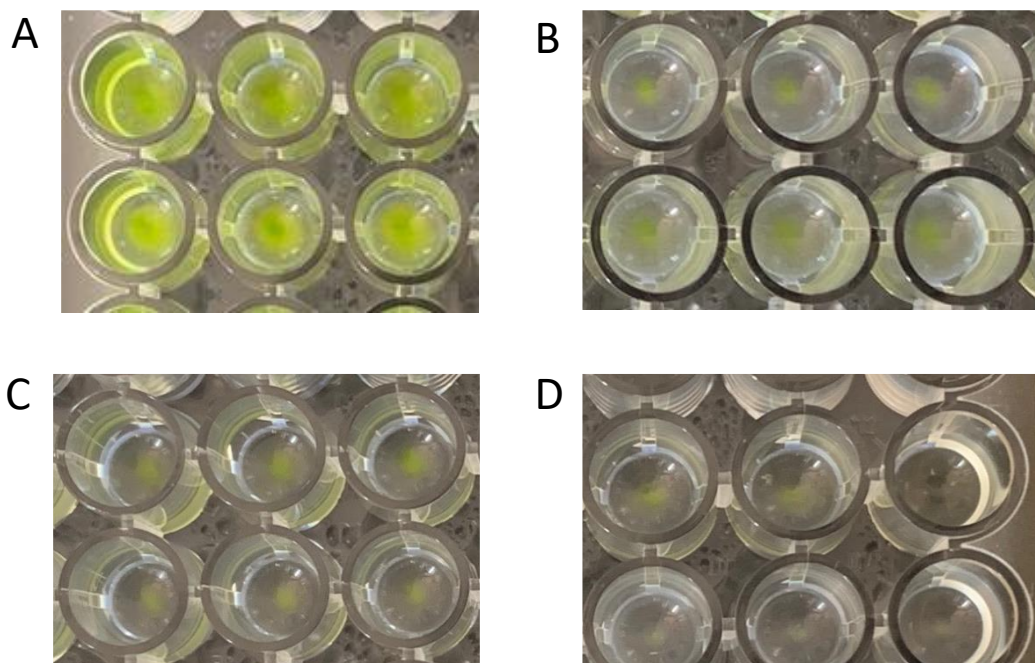


Figura 4.2.1. Crescita delle microalghe in piastre multipozzetto in presenza di diverse concentrazioni di gentamicina. Le sospensioni algali sono state inoculate in substrato liquido BBM contenente differenti concentrazioni di gentamicina 0 (A); 30 (B); 60 (C) e 90 mg l⁻¹ (D). La crescita cellulare è stata determinata dopo 20 giorni dall'inoculo.

4.3 Analisi molecolari dei ceppi di *A. tumefaciens* geneticamente manipolati mediante elettroporazione

Per la trasformazione indiretta dei ceppi algali è stato utilizzato l'*A. tumefaciens*. A tale scopo il plasmide pG0029-35SCaMV::*AsOXAI* è stato trasferito mediante elettroporazione nel ceppo di agrobatterio LBA4404.

L'efficienza di trasformazione con il plasmide pGreenII0029 contenente *CaMV35S*::*AsOXAI* è stata accertata tramite PCR *colony* che ha amplificato il frammento di 400 cb del promotore CaMV35S, con le coppie di oligonucleotidi 35SF-35SR.

I frammenti dell'amplificazione sono risultati presenti in tutte e 12 le colonie analizzate, e sono riportati in figura 4.3.

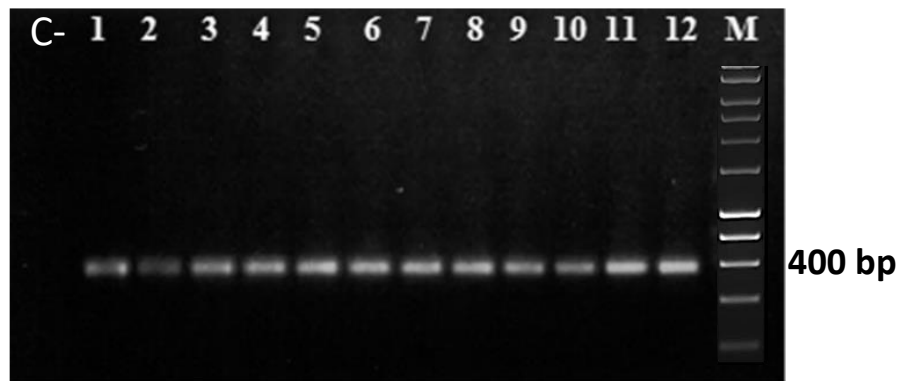


Figura 4.3. Analisi elettroforetica di amplificazione di DNA isolato da colonie del ceppo LBA4404 di *A. tumefaciens* dopo elettroporazione con il plasmide pG0029_35SCaMV::*AsOXAI*. Legenda: le colonne da 1 a 12 rappresentano i prodotti della reazione di amplificazione *in vitro* del DNA isolato dalle 12 colonie di *A. tumefaciens*. La colonna M rappresenta il marcatore molecolare 1Kb.

4.4 Trasformazione genetica di microalghe mediata da *A. tumefaciens*

Sulla base dei saggi di inibizione, la concentrazione dell'antibiotico geneticina come agente selettivo per gli esperimenti di trasformazione genetica indiretta è stata portata a 60 mg l⁻¹ per tutte le specie algali ad eccezione di #122 e #126 per le quali è stata impiegata una concentrazione di 100 mg l⁻¹.

Le specie algali del controllo positivo, cioè di cellule co-coltivate con *A. tumefaciens* e trasferite su terreno di coltura privo di agente selettivo, sono cresciute come riportato in figura 4.4, mentre 5 delle 12 specie algali co-coltivate e trasferite su mezzo di coltura selettivo hanno mostrato la formazione di colonie (fig. 4.4). In tabella 4.4 sono riportate le frequenze di trasformazione genetica delle specie algali per cui è stata osservata formazione di colonie su terreno selettivo. La specie algale che ha mostrato una frequenza di trasformazione maggiore è risultata la #103 con una frequenza pari a $5,48 \times 10^{-6}$ e 274 colonie sviluppate su substrato selettivo, mentre le specie algali che hanno mostrato la frequenza di trasformazione minore sono la #140 con una frequenza di $0,72 \times 10^{-6}$ con la formazione di 36 colonie su substrato selettivo, seguita dalla #115 con una frequenza di $0,84 \times 10^{-6}$ e con la formazione di 42 colonie, sempre su substrato selettivo.

Data la maggiore specificità di selezione in terreno liquido le colonie ottenute su terreno solido sono state successivamente inoculate in terreno liquido in presenza dell'agente selettivo. In tabella 4.4.1 sono riportate le frequenze di sopravvivenza delle specie algali in terreno liquido in presenza di agente selettivo. Le specie algali che hanno mostrato una maggiore frequenza di sopravvivenza sono state la #124 e la #112 con tassi di sopravvivenza del 97% e del 40%, rispettivamente. La specie algale che ha mostrato una minore frequenza di sopravvivenza è la #103 con tasso di sopravvivenza dell'1%. In figura 4.4.1 sono riportate alcune colonie algali sottoposte ai due cicli di selezione, il primo in substrato liquido addizionato con geneticina 50 mg l⁻¹ (A) ed il secondo in substrato liquido addizionato con geneticina 60 mg l⁻¹ (B).

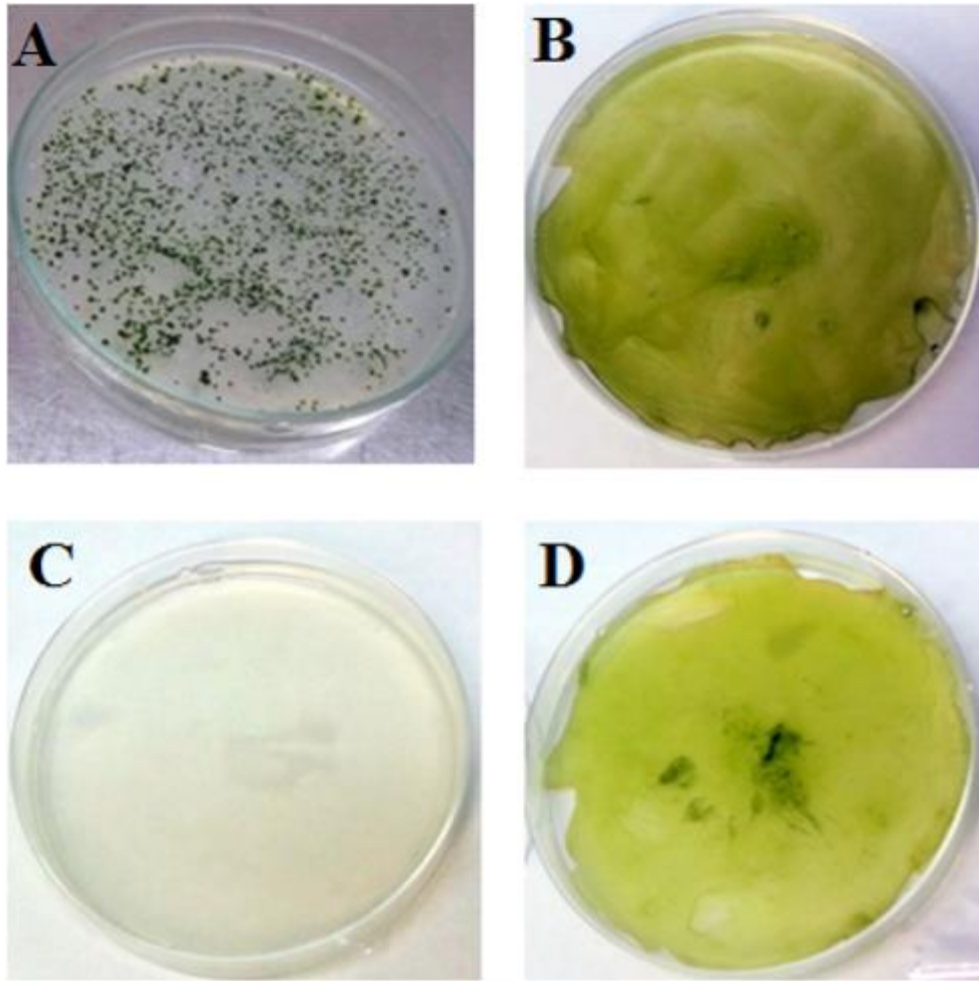


Figura 4.4. Trasformazione genetica di microalghe mediata da *A. tumefaciens*. Le colture algali manipolate sono state trasferite su terreno selettivo contenente 60 mg l^{-1} (A) e su terreno non selettivo (B). Le colture algali non manipolate sono state inoculate su terreno di crescita selettivo contenente geneticina 60 mg l^{-1} (C) e su terreno non selettivo (D).

Tabella 4.4. Trasformazione genetica mediata da *A. tumefaciens* di microalghe verdi con il plasmide contenente il gene *AsOXAI*. Sono riportate le frequenze di trasformazione per ciascuna specie algale, espresse come rapporto del numero di colonie rilevate dopo 20 giorni dall'inoculo su substrato solido selettivo ed il numero di cellule di partenza.

Accessione algale	N. di colonie inoculate	N. di colonie rilevate	Frequenza di trasformazione
#101	50 x10 ⁶	0	0
#103	50 x10 ⁶	274	5,48 x10 ⁻⁶
#104	50 x10 ⁶	0	0
#112	50 x10 ⁶	80	1,60 x10 ⁻⁶
#115	50 x10 ⁶	42	0,84 x10 ⁻⁶
#122	50 x10 ⁶	0	0
#124	50 x10 ⁶	69	1,38 x10 ⁻⁶
#126	50 x10 ⁶	0	0
#132	50 x10 ⁶	0	0
#133	50 x10 ⁶	0	0
#140	50 x10 ⁶	36	0,72 x10 ⁻⁶

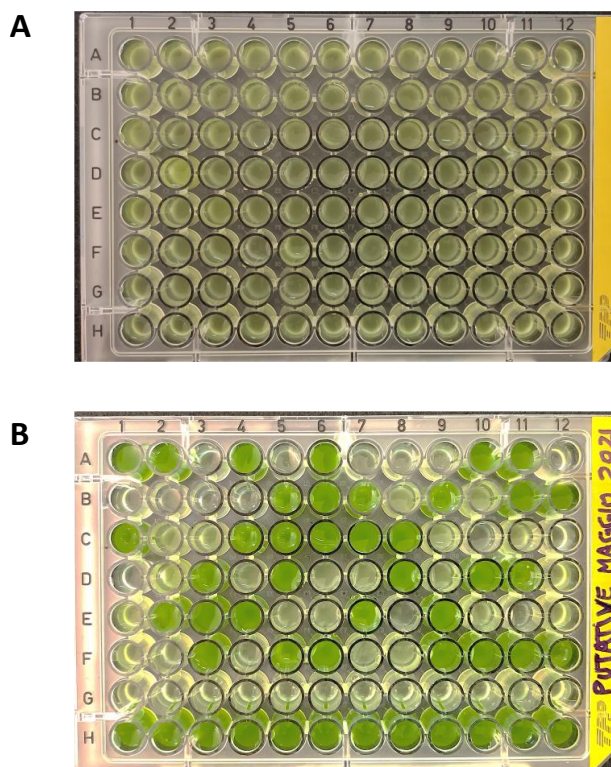


Figura 4.4.1. Saggi di sopravvivenza delle colonie putative transgeniche in terreno liquido selettivo. Le colonie algali dopo co-coltura cresciute su terreno selettivo solido sono state sottoposte a due cicli di selezione, ognuno di durata di 20 giorni, il primo in presenza di geneticina 50 mg l⁻¹ (A) ed il secondo in presenza di geneticina 60 mg l⁻¹ (B).

Tabella 4.4.1. Sopravvivenza di microalghe putative transgeniche sottoposte a due cicli di selezione in coltura liquida. Le colonie algali cresciute su substrato solido selettivo sono state trasferite singolarmente in piastre a 96 pozzetti contenente ciascuno substrato selettivo liquido addizionato con geneticina 50 mg l⁻¹. La sopravvivenza dopo 20 giorni di coltura è stata determinata come riportato in Materiali e metodi ed espressa in percentuale. Parte della sospensione algale risultata positiva è stata poi sottoposta al secondo ciclo di selezione in presenza di geneticina 60 mg l⁻¹ e la sopravvivenza è stata valutata dopo ulteriori 20 giorni di coltura.

Accessione algale	1° inoculo (geneticina 60 mg l ⁻¹)			2° inoculo (geneticina 60 mg l ⁻¹)		
	N. colonie inoculate	N. colonie cresciute	Sopravvivenza (%)	N. colonie reinoculate	N. colonie cresciute	Sopravvivenza (%)
#103	274	43	16	43	3	1
#112	80	46	57	46	32	40
#115	42	23	77	23	15	36
#124	69	69	100	69	67	97
#140	36	36	100	36	9	25

4.5 Analisi quantitativa e qualitativa del DNA genomico di microalghe

La metodica utilizzata per l'estrazione del DNA genomico è stata messa a punto dal gruppo di Ricerca dove è stata svolta l'attività di tesi. In tabella 4.5 è riportata la concentrazione del DNA genomico isolato espressa come ng mg^{-1} . La concentrazione del DNA genomico estratto da #103 e #124 è maggiore rispetto a quello estratto da #112 e #115.

In tutti i campioni analizzati il rapporto di assorbanza 260/230 è molto prossimo al valore teorico di 2,2 indicando la ridotta presenza di contaminanti quali carboidrati, fenoli o altri composti.

La ridotta presenza di residui proteici nei campioni è indicata dal rapporto di assorbanza 260/280 che ha valori ottimali intorno a 1,8.

Tabella 4.5. Analisi quantitativa e qualitativa del DNA genomico isolato da ceppi algali putativi transgenici. Sono riportate le concentrazioni del DNA genomico isolato espresse in ng mg^{-1} e i rapporti di assorbanza 260/280 e 260/230

Accessione algale	Concentrazione DNA (ng mg^{-1})	260/280	260/230
#103	246,4	2,21	1,77
#112	143,9	2,15	1,81
#115	146,4	2,10	1,79
#124	238,7	2,24	1,84
#140	80	2,10	1,77

4.6 Analisi molecolari delle alghe putative transgeniche

L'avvenuta integrazione del transgene è stata verificata mediante analisi molecolari prelevando per ciascuna specie algale alcune colonie putative transgeniche a partire dalle quali è stata preliminarmente condotta un'analisi di amplificazione *in vitro* con oligonucleotidi specifici per la regione di virulenza batterica che ha determinato esito negativo.

Il DNA genomico estratto è stato analizzato mediante PCR con i oligonucleotidi 35SF e 35SR che amplificano un frammento di circa 400 coppie di basi specifico della sequenza del promotore CaMV35S e gli oligonucleotidi Oxa-F e Oxa-R che amplificano un frammento di 1.300 coppie di basi interno al gene *AsOXA1*. Le analisi hanno confermato l'integrazione del gene *AsOXA1* in 47 colonie su un totale di 52 colonie analizzate. In tabella 4.6 è mostrata la frequenza di integrazione del DNA eterologo nel genoma delle cellule algali.

In figura 4.6 è riportato il gel di elettroforesi dei prodotti di amplificazione *in vitro* del DNA di alcuni ceppi algali transgenici che mostra l'integrazione del gene di interesse data la formazione degli ampliconi del peso molecolare atteso.

Tabella 4.6 Frequenza di trasformazione genetica delle accessioni algali con *A. tumefaciens* ceppo LBA4404 contenente il costrutto 35S::*AsOXA1*. Le colture algali cresciute in substrato liquido selettivo sono state analizzate mediante reazione di amplificazione *in vitro*. Sono riportate le frequenze di integrazione del DNA eterologo nel genoma delle cellule per ciascuna specie algale, espresse come rapporto del numero di colture risultate positive ed il numero di colture saggiate.

Accessione algale	Numero colture saggiate	Integrazione (%)
#103	3	100
#112	15	80
#115	15	87
#124	15	100
#140	4	75

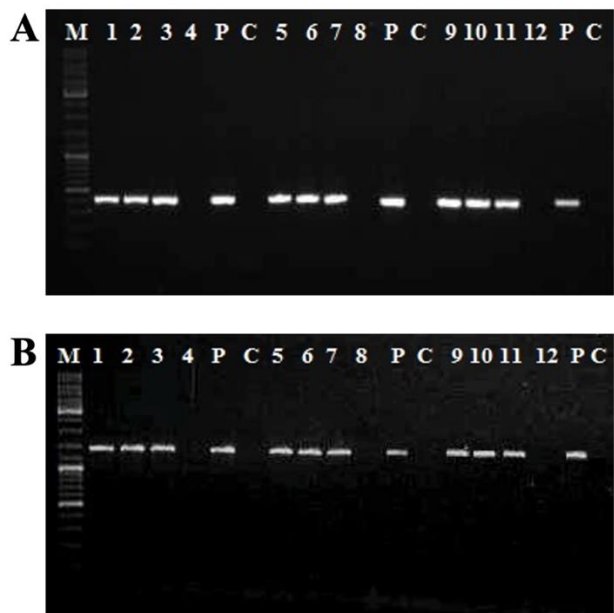


Figura 4.6. Analisi elettroforetica di amplificazione di DNA isolato da colonie di microalghe. Dopo due cicli di selezione in presenza di geneticina alcune colonie putative transgeniche sono state sottoposte ad analisi PCR con le coppie di oligonucleotidi 35SF-35SR (A) e OxaF-RT2 (B).

Legenda: le colonne 1-3, 5-7 e 9-10 rappresentano i campioni di DNA amplificato delle colonie algali putative transgeniche, le colonne 4, 8 e 12 rappresentano i campioni di DNA amplificato da colture algali non manipolate. Le colonne P rappresentano il controllo positivo (DNA plasmidico), le colonne C rappresentano il controllo negativo (bianco) e la colonna M rappresenta il marcatore molecolare: 1Kb.

4.7 Trasformazione genica di espianti fogliari di tabacco tramite metodo indiretto

I risultati della trasformazione su tabacco tramite *A. tumefaciens* sono riportati nella tabella 4.7. Dopo 45 giorni di coltura *in vitro* in presenza di antibiotico nel mezzo di coltura, l'80% degli espianti co-coltivati hanno mostrato formazione di callo e hanno differenziato germogli (fig. 4.7 A). Gli espianti fogliari in caulogenesi sono stati trasferiti dopo 2 mesi di coltura dal terreno selettivo (RTE) a quello per l'elongazione (fig. 4.7 B). Sono stati prelevati 20 germogli e fatti radicare su mezzo selettivo (fig. 4.7 C); tutti i germogli ottenuti dalla co-coltura hanno radicato.

Tabella 4.7. Numero di espianti di tabacco cv Samsun NN co-coltivati con il ceppo di agrobatterio LBA4404, percentuale di espianti formanti callo, caulogenesi dopo 45 giorni dalla co-coltura.

Ceppo	Trattamento	Espianti		
		Trattati (n°)	Formanti Callo (%)	In caulogenesi (%)
LBA4404	Controllo positivo	15	90	90
	Controllo negativo	15	0	0
	Co-coltivati	51	80	80



Fig 4.7. Fasi procedurali per la manipolazione genica di *Nicotiana tabacum* cv Samsun NN. Espianti fogliari di tabacco dopo co-coltura con il ceppo di *A. tumefaciens* contenente il costrutto 35S::AsOXA1 sono stati trasferiti su substrato di crescita RTE addizionato con cefotaxime sodico 500mg l⁻¹ e kanamicina 50mg l⁻¹ (A). Dopo due mesi dalla co-coltura gli espianti in caulogenesi sono stati trasferiti su substrato POC addizionato con Cefotaxime sodico 100mg l⁻¹ e KAN 50mg l⁻¹ per permettere l'elongazione dei germogli putativi transgenici (B). La radicazione dei singoli germogli è stata effettuata al termine della fase di elongazione con il prelievo di germogli che sono stati allevati in POC addizionato con Cefotaxime sodico 100mg l⁻¹ e KAN 50mg l⁻¹ (C).

4.8 Analisi molecolari di piante di tabacco putative transgeniche:

Al fine di verificare l'effettiva trasformazione di piante di *N. tabacum* col gene di interesse, è stata eseguita un'analisi di amplificazione (PCR) sul DNA genomico estratto da 5 piante di tabacco radicate su mezzo selettivo. A tale scopo è stata impiegata una coppia di oligonucleotidi NPTIIF e NPTIIR che amplifica un frammento di circa 1100 coppie di basi del gene di resistenza alla kanamicina- Tutte le piante sono risultate positive alla tr'integrazione del gene (figura 4.8) e sono state sottoposte ad analisi di espressione mediante Real-Time.

In figura 4.9 sono riportati i valori di espressione; in tutti i campioni transgenici il livello di espressione di *AsOXAI* risulta incrementato con un range compreso tra 1.0 a 2.4 (log).

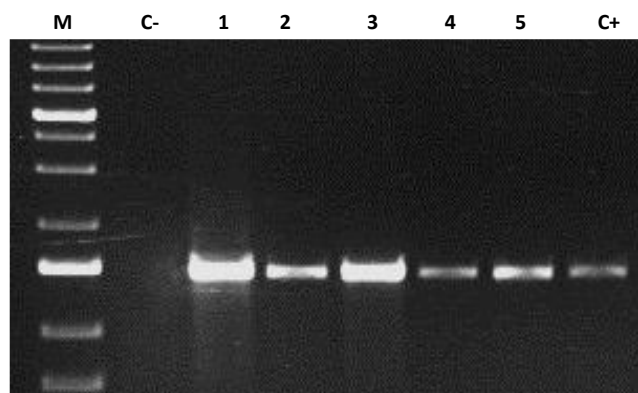


Fig. 4.8. Analisi elettroforetica su gel di agarosio dei prodotti di amplificazione del DNA genomico di tabacco. Il DNA genomico di cinque germogli putativi transgenici è stato sottoposto ad una reazione di amplificazione *in vitro* utilizzando gli oligonucleotidi complementari ad una porzione del gene *nptII*.

Legenda: la colonna M rappresenta il marcatore molecolare *1 Kb Plus DNA ladder* (GIBCO BRL); la colonna C- rappresenta il controllo negativo (DNA genomico di tabacco non co-coltivato); le colonne 1-5 rappresentano piante trasformate con il gene *Oxa*; la colonna C+ rappresenta il vettore contenente il gene *AsOxaI*.

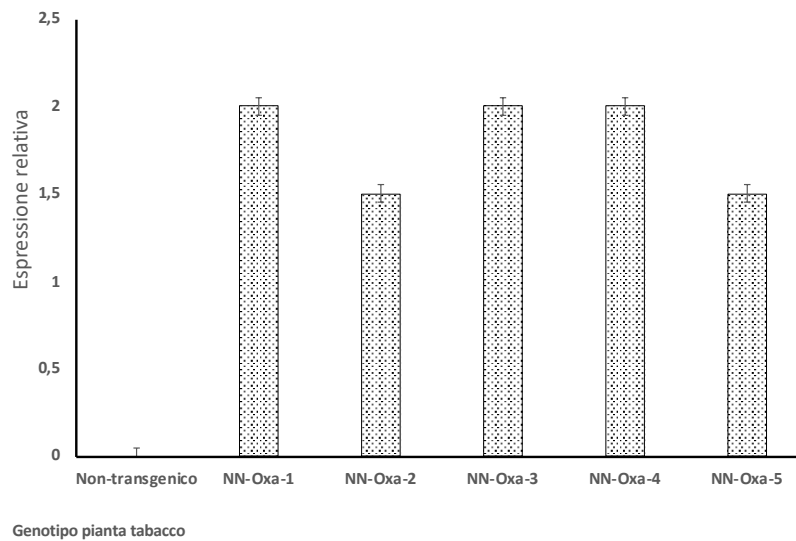


Figura 4.9. Quantificazione dell'espressione del gene *AsOXAI* in piante di tabacco geneticamente modificate. L'analisi qRT-PCR è stata realizzata utilizzando il gene dell'actina come gene di riferimento e il controllo non trasformato come calibratore interno per la quantificazione relativa mediante il metodo $\Delta\Delta Ct$.

5. DISCUSSIONE

La capacità di piante e microalghe di sintetizzare un'ampia gamma di metaboliti primari e secondari rende questi organismi dei veri e propri bioreattori naturali. Il loro impiego come tali è stato reso possibile grazie alla nascita delle biotecnologie vegetali e all'evoluzione di tutte le discipline ad essa correlata, come l'ingegneria genetica e metabolica, che hanno reso queste piattaforme vegetali utilizzabili in diversi settori, come quello farmacologico, cosmetico ed industriale. I traguardi raggiunti nelle ultime decadi sono notevoli, e i numerosi studi condotti hanno concretamente dimostrato l'enorme potenziale di tali organismi.

Con il perfezionamento delle tecnologie moderne è stato possibile l'inserimento e l'espressione di geni eterologhi in piante e microalghe eucariotiche per la produzione di molecole e peptidi bioattivi, di antigeni ed anticorpi, di enzimi e ancora di biocarburanti. Questi sistemi vegetali risultano particolarmente vantaggiosi in termini di facilità di manipolazione e realizzazione, costi da sostenere, e aspetti di biosicurezza rispetto ai classici modelli basati sull'impiego di altri organismi eucariotici come i lieviti o le cellule animali (Ng et al., 2020). Inoltre, in riferimento ai costi di produzione va evidenziato che la sintesi di molecole di interesse in piante permette di abbassare i costi del 50% rispetto a quelli sostenuti per l'espressione delle stesse molecole in batteri come *E. coli*, e del 90% rispetto alle colture cellulari di mammifero (Twyman et al., 2003).

L'impiego di questi organismi vegetali per la produzione di biomolecole bioattive di interesse comporta la presa in considerazione di molteplici aspetti: la scelta della specie ospite, l'ottimizzazione del *codon usage* del gene bersaglio in relazione all'ospite, la realizzazione di adeguati vettori e cassette di espressione, nonché la messa a punto del metodo di trasformazione genica di cui avvalersi. In riferimento a quest'ultimo fattore, a partire dalla metà del XX secolo sono state sviluppate svariate tecniche per il trasferimento dei geni di interesse negli organismi target, le quali possono essere essenzialmente classificate in due grandi categorie, dirette ed indirette, a seconda che ci si avvalga o meno di un intermediario biologico per il trasferimento del DNA eterologo (Lee & Tan, 1988).

In letteratura sono riportati diversi studi sulla manipolazione genica diretta su materiale vegetale, tra i più riportati vi è impiego di microsfere di vetro (*glass beads*). Tale tecnica si basa sull'agitazione delle cellule ospiti in presenza del DNA esogeno e delle *glass beads*, le quali causano una distruzione temporanea delle pareti cellulari, permettendo il passaggio del materiale genetico. Nonostante questa sia una tecnica di semplice esecuzione e relativamente

economica, le spesse pareti esterne delle cellule di piante e microalghe impediscono l'ottenimento di risultati soddisfacenti, con frequenze di integrazione di DNA eterologo nell'ospite, e quindi di successo della tecnica, piuttosto basse (Kindle, 1990).

Per fronteggiare tale problematica, per la realizzazione di questa tesi, incentrata sull'ottenimento di linee vegetali transgeniche recanti il gene *AsOXAI* in piante di tabacco (*N. tabacum* cv Samsun SS) e specie microalgali appartenenti alla classe delle *Chlorophyceae*, si è optato per un metodo differente di manipolazione genica, in particolare un metodo indiretto basato sull'impiego dell'*Agrobacterium tumefaciens* ceppo LBA4404, recante il vettore binario pG0029-*CaMV35S::AsOXAI*. Il gene eterologo *AsOXAI*, sotto il controllo di un promotore costitutivo 35S, codifica per una *triterpene ciclasi*, e le piattaforme vegetali ottenute rappresentano una valida alternativa per il *plant-molecular-farming*, offrendo interessanti applicazioni nel campo nutraceutico, farmacologico e soprattutto dei biocarburanti.

Si ricorda che i triterpeni, caratterizzati da sei unità isopreniche, nei vegetali sono i principali costituenti delle resine, degli oli essenziali, degli ormoni stimolatori della crescita ed inoltre svolgono azione deterrente nei confronti di batteri, funghi e parassiti (Murakami et al., 2003). Sono considerati una grande classe di metaboliti secondari, e l'ottenimento di forme cicliche di tali composti terpenici per azione della *triterpene ciclasi* risulterebbe particolarmente interessante, in quanto potrebbero offrire caratteristiche chimico-fisiche simili a quelle dei combustibili, e quindi potenzialmente impiegabili come biocarburanti, oltre che il loro coinvolgimento in altri settori, come quello della cosmetica (Niehaus et al., 2011). Suscitano grande interesse anche nel campo alimentare, salutistico e biotecnologico a causa della loro spiccata attività antinfiammatoria, antivirale, anticolesterolemica ed anticancerogena (El-Seedi et al., 2005; Gill, B et al., 2016; Zhou et al., 2017).

In questa tesi, l'espressione della *triterpene ciclasi* in piante e microalghe è stata resa possibile sfruttando l'agrobatterio, che si annovera tra uno dei metodi più impiegati per il trasferimento di DNA nel genoma di organismi fotosintetici, sia per le piante superiori che per le microalghe, sebbene sia necessario ribadire che il tasso di successo di trasformazione dipende fortemente dall'interazione tra il ceppo di agrobatterio e il genotipo dell'ospite, dando luogo ad interazioni compatibili o incompatibili (Cheng et al., 2012). Questo particolare aspetto giustifica i risultati da noi ottenuti a seguito della rilevazione della frequenza di trasformazione delle microalghe, che è risultata genotipo-specifica essendo variabile tra le differenti accessioni algali. Infatti, in sei delle undici accessioni algali non è

stato rilevato alcun evento di trasformazione, pertanto nessuna colonia è stata osservata a seguito dell'inoculo delle microalghe putative transgeniche in substrato selettivo. Al contrario, nelle cinque accessioni algali rimanenti sono stati rilevati eventi di transgenesi positivi, con una frequenza di trasformazione cellulare compresa tra un minimo di $0,72 \times 10^{-6}$ ed un massimo di $5,48 \times 10^{-6}$. In particolare, quest'ultima frequenza di trasformazione è relativa all'accessione algale #103, ovvero alla specie *Chlamydomonas reinhardtii*, e tale tasso è in accordo con quanto ottenuto negli studi condotti precedentemente da Kumar et al (2004), in cui è stata rilevata una frequenza leggermente superiore, pari a 6×10^{-6} , per la stessa specie algale impiegando lo stesso metodo di trasformazione; mentre con tecniche diverse di manipolazione genica i risultati tendono ad essere fortemente differenti. Ad esempio, tramite l'impiego dell'elettroporazione in uno studio condotto su *Chlamydomonas* si sono ottenuti tassi di trasformazione oltre 120 volte superiori, pari infatti a $732,5 \times 10^{-6}$ (Yamano et al., 2013)

Inoltre, nel nostro studio due ceppi algali su tre, appartenenti al genere *Scenedesmus*, si sono mostrati particolarmente recalcitranti alla trasformazione genica indiretta, con un tasso di trasformazione pari a zero, in accordo con quanto osservato da Dautor et al. (2014) su alghe appartenenti allo stesso genere e impiegando lo stesso ceppo di agrobatterio. Probabilmente questo potrebbe essere dovuto ad una interazione di tipo incompatibile tra la microalga e il ceppo di agrobatterio da noi impiegato, pertanto ulteriori studi sono necessari per finalizzare la trasformazione genica in questa specie algale. Ad esempio, potrebbe essere interessante l'utilizzo di un differente ceppo di agrobatterio, come l'EHA105.

In definitiva, questi tassi di trasformazione altamente variabili tra diverse accessioni microalgali sono in accordo con quanto riportato in merito alla trasformazione genetica degli organismi fotosintetici mediata da agrobatterio, la cui l'efficienza di trasformazione è genotipo-specifica e pertanto fortemente influenzata dal genere, specie e talvolta ceppo degli organismi impiegati (Niu et al., 2011).

Ulteriori due aspetti rilevanti che potrebbero aver influito sui tassi di trasformazione da noi ottenuti sono la concentrazione cellulare batterica e algale e le concentrazioni di acetosiringone impiegate durante la co-coltura. In riferimento al primo fattore, nei protocolli di trasformazione abbiamo impiegato inoculi algali contenenti mediamente 50 milioni di cellule, a fronte di un OD_{600} della coltura batterica pari 0,5, impiegando valori di densità cellulare differenti è possibile influire sul tasso di efficienza di trasformazione, una coltura batterica più concentrata potrebbe indurre tassi di successo maggiori. In secondo luogo, la

concentrazione di acetosiringone da noi impiegata è stata pari a 100mM. È noto che questa molecola liberata in natura dalle cellule vegetali a seguito di danneggiamenti, ad esempio una lesione alle pareti, provoca l'attivazione nel batterio dei geni *vir*, responsabili della virulenza e localizzati nel plasmide Ti *tumor inducing*. Pertanto, una più elevata concentrazione di tale composto potrebbe indurre una maggiore facilità di infezione da parte dell'agrobatterio.

Altro aspetto particolarmente importante è il ciclo di selezione delle cellule sottoposte ad eventi di trasformazione genetica nucleare. Tale metodica si basa sull'espressione di geni marcatori che conferiscono alla cellula un fenotipo dominante che permette la degradazione metabolica di un composto tossico. Gli agenti selettivi maggiormente utilizzati nella trasformazione genetica di organismi fotosintetici sono gli antibiotici appartenenti alla famiglia degli aminoglicosidi, tra cui la kanamicina e la geneticina; tuttavia in letteratura è riportato che la kanamicina è meno efficiente della geneticina nel selezionare gli eventi di trasformazione genetica nucleare (Chiaiese et al., 2011), motivo per cui in questa tesi si è optato per l'utilizzo della geneticina (G418) per la selezione degli organismi putativi transgenici, quali microalghe e piante di tabacco.

Nel caso delle microalghe, è stata preventivamente saggiata la sensibilità delle undici accessioni a concentrazioni crescenti G418, ricavando quindi il valore percentuale di inibizione alla crescita cellulare. Per nove specie algali tale concentrazione inibente è risultata pari a 60 mg l⁻¹, mentre i ceppi #122 e #126 (appartenenti al genere *Scenedesmus*) hanno mostrato una minore sensibilità all'agente selettivo permettendo di apprezzare la formazione di colonie anche alla concentrazione di geneticina sopra riportata, pertanto per le due accessioni di *Scenedesmus* si è optato di utilizzare una concentrazione di geneticina superiore in fase di co-coltura. In letteratura è riportato che G418, sintetizzato naturalmente dal batterio sporigeno gram-positivo *Micromonospora rhodorangea*, agisce in cellule procariotiche ed eucariotiche causando il blocco della fase di allungamento di sintesi proteica legandosi alla subunità 30S e 80S dei ribosomi, motivo per cui si osserva un'inibizione della proliferazione cellulare (Hadfield et al., 1990), e con le nostre osservazioni è stato confermato quanto rilevato in altri studi di inibizione condotti sia in differenti specie microalgali tra cui *C. reinhardtii* (Chiaiese et al., 2011; Hadfield et al., 1990) che in cellule di piante di tabacco (Matsumoto et al., 1993). Inoltre, il doppio ciclo selettivo a concentrazioni crescenti di geneticina ed allestito per le microalghe putative transgeniche è stato fondamentale per diminuire la presenza di falsi positivi.

Disporre di un sistema di trasformazione genetica per le piante e microalghe e di selezione degli organismi putativi transgenici apre nuove prospettive per l'ingegnerizzazione delle loro vie biosintetiche. In questa tesi è stato preso in considerazione il *pathway* metabolico dei triterpeni, i quali rappresentano lo 0.3-5% del peso secco in foglie di piante, e fino al 40% in alcune specie di microalghe (ad esempio il botriococcene in *Botryococcus braunii* race B) (Niehaus et al., 2011). Queste molecole a 30 atomi di carbonio sono prodotte nella via biosintetica degli isoprenoidi mediante condensazione di due molecole di farnesil pirofosfato. Negli organismi fotosintetici, che producono molecole terpeniche di diversa natura, generalmente i triterpeni sono prodotti nella via citosolica del mevalonato, mentre diterpeni e sesquiterpeni sono sintetizzati lungo la via non-mevalonato all'interno dei cloroplasti (Murakami et al., 2003). Sebbene nelle piante la via di biosintesi sia ad oggi più definita, nelle alghe verdi è noto che molti triterpeni sono prodotti nella via del non-mevalonato, ma non ci sono chiare evidenze se entrambe le catene metaboliche (citosoliche e plastidiali) siano presenti (Murakami et al., 2003). Data la molteplice possibilità di impiego dei triterpeni in ambito biotecnologico, particolarmente interessante sarebbe l'approfondimento della conoscenza del *pathway* di sintesi e la relativa possibilità di ingegnerizzazione.

Negli ultimi decenni diversi interventi di ingegneria metabolica per la produzione di terpeni sono stati applicati con successo in alcuni organismi come *E. coli*, *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica*, *P. pastoris* (Lauersen et al. 2018 et al., 2020): gli organismi eucariotici come i lieviti hanno un vantaggio sull'ospite procariotico grazie all'espressione di UbiA e CYP450, due proteine transmembrana solitamente "mal ripiegate" in *E. coli*. Anche le microalghe, come *Chlamydomonas reinhardtii* e la diatomea marina *Phaeodactylum tricorutum* sono state utilizzate come biofabbriche per la produzione di terpenoidi di origine vegetale, come (E)-bisabolene, 13R(+) manoilossido e geraniolo (Lauersen et al. 2018), trattasi generalmente di molecole mono e diterpeniche.

Ulteriori interessanti risultati sono stati ottenuti in pianta sia impiegando specie modello come l'*Arabidopsis* e *Nicotiana benthamiana* che colture come cereali, leguminose e asteracee. In molti di questi interventi di ingegneria metabolica si è intervenuti agendo sui geni posti a monte del *pathway* citosolico del mevalonato spingendo il flusso metabolico verso la formazione del 2,3-ossidpsqualene, molecola aciclica su cui intervengono le triterpene ciclastasi per la formazione delle molecole triterpeniche (Lauersen et al. 2018).

Inoltre, si rilevano anche interventi di overespressione delle triterpeni ciclasi, ad esempio nella strategia di overespressione del gene *AsOXA1* codificante per la β -amirina sintasi in *M. truncatula*, che ha determinato un accumulo di alcuni composti triterpenici nella foglia e nella radice. In particolare, la foglia ha mostrato livelli significativamente più elevati di bayogenina, acido medicagenico e acido zanico, mentre in radice il contenuto di bayogenina, ederagenina, soyasapogenolo E acido 2β -idrossioleanolico è stata aumentato significativamente (Confalonieri et al., 2009). Interventi di overespressione di *AsOXA1* in callo di *Aster caucasicus* hanno determinato invece un'overproduzione di acidi chinici a dimostrazione dell'imprevedibilità dei risultati finali quando si applicano strategie di ingegneria metabolica (Pecchia et al., 2011). Risultati simili, riguardanti un incremento di biosintesi di triterpeni in pianta, sono stati rilevati anche nel caso del ginseng (*Panax ginseng*), in cui la over-espressione del gene *PgSS1*, coinvolto in una delle reazioni di sintesi di molecole terpeniche, ha provocato una triplicazione dell'accumulo di questi composti (Seo et al., 2005).

Anche nell'ambito delle microalghe negli ultimi anni iniziano ad essere riportati in letteratura interessanti studi condotti sull'ingegnerizzazione del metabolismo terpenico. Ad esempio, dalle osservazioni eseguite da D'Adamo et al. (2019) è stata ottenuta con successo, per la prima volta, la sintesi della betulina triterpenica e del suo precursore, il lupeolo, nella diatomea unicellulare *Phaeodactylum tricorutum*, a seguito di una manipolazione genica per il trasferimento di 3 enzimi eterologhi: una ossidosqualene ciclasi proveniente dal legume *Lotus japonicus*, ed una citocromo P450 monossigenasi dalla precedentemente menzionata *M. truncatula*, accompagnata dalla sua relativa reductasi. L'introduzione di tali sequenze geniche in microalga ha provocato con successo un incremento della sintesi di acido mevalonico, intermedio nel pathway di sintesi dei triterpeni ed altri metaboliti, quali carotenoidi e steroidi, importanti metaboliti in ambito vegetale.

In conclusione, nel nostro studio le analisi molecolari condotte sulle alghe e piante transgeniche putative hanno permesso di confermare l'avvenuta integrazione del gene eterologo in alcuni degli organismi saggiati, con frequenze soddisfacenti e che pertanto confermano l'importanza di approfondire gli studi nell'ambito dell'ingegneria metabolica delle molecole terpeniche, data l'elevata efficienza nell'impiego di questi organismi fotosintetizzanti come bioreattori rispetto ad altri modelli. Inoltre, è importante considerare che la over-espressione di determinati geni oltre una particolare soglia determina un fenomeno di inibizione conosciuto come *feedback di regolazione negativo*, provocando

perciò una diminuzione della sintesi di determinati composti (El-Sayed & Verpoorte, 2002). Per tale motivo, gli organismi transgenici ottenuti nel presente lavoro di tesi verranno successivamente sottoposti ad ulteriori analisi quali HPLC e spettrometria di massa per la caratterizzazione del profilo dei triterpeni e la loro quantificazione.

6. CONCLUSIONI

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato l'ottenimento di linee vegetali transgeniche quali piante di tabacco e microalghe verdi, recanti il gene *AsOXAI* codificante una triterpene ciclasti. Allo scopo sono stati impiegati metodi di trasformazione genica diretti, tramite elettroporazione, per l'inserimento del vettore pG0029-*CaMV35S::AsOXAI* in *Agrobacterium tumefaciens* ceppo LBA4404, e metodi indiretti sfruttando il batterio ingegnerizzato come vettore per la manipolazione delle specie vegetali.

Le analisi molecolari di amplificazione *in vitro* del gene condotte sugli organismi putativi transgenici hanno confermato l'integrazione della sequenza nucleotidica eterologa di interesse con frequenze di trasformazione variabili. Per le microalghe, sono state ottenute 5 accessioni transgeniche, con frequenze di trasformazione su terreno solido selettivo variabili da un minimo di $0,72 \times 10^{-6}$ per l'accessione #140 appartenente al genere *Chromochloris*, ad un massimo di $5,48 \times 10^{-6}$ per l'accessione #103, del genere *Chlamydomonas*.

Per le piante di *N. tabacum* cv Samsun NN sono stati ottenuti 40 espianti putativi transgenici differenzianti germogli, e su 5 di tali germogli è stata successivamente eseguita una misura del livello di espressione del gene *AsOXAI* tramite Real Time PCR, rilevando in tutti i casi l'over-espressione del gene.

I dati ottenuti confermano una possibile ingegnerizzazione della via metabolica dei triterpeni in piante e microalghe aprendo la strada a nuove applicazioni biotecnologiche sia in campo nutraceutico che per la produzione di biocombustibili.

7. BIBLIOGRAFIA

- Adam, A. (2013). *Britannica, T. Editors of Encyclopaedia. Saponin. Encyclopedia Britannica.*
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). *Algae: Anatomy, biochemistry, and biotechnology. Boca Raton, Fla: Taylor & Francis.*
- Beck, E., Luwdig, W., & Auerswald, E. A. (1982). *Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. Gene, 19: 327-336.*
- Begum, H., Yusoff, F. MD., Banerjee, S., Khatoon, H., & Shariff, M. (2016). Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56(13), 2209–2222.* <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.764841>
- Belarbi, E. (2000). *A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. Process Biochemistry; 35:951–969.*
- Cammareri, M., Consiglio, M., Pecchia, M., & Corea, G. (2008). *Molecular characterization of β -amyrin-like synthase from Aster sedifolius L. and triterpenoid saponin analysis. Plant Science, 175: 255–261.*
- Chen, G.-Q., & Patel, M. K. (2012). *Plastics Derived from Biological Sources: Present and Future: A Technical and Environmental Review. Chemical Reviews, 112(4), 2082–2099.* <https://doi.org/10.1021/cr200162d>
- Cheng, R., Rong, H., & Wang, Z. (2012). *Agrobacterium tumefaciens mediated transformation of marine microalgae Schizochytrium. Microbiol. Res. 167, 179–186. Doi: 10.1016/j.micres.2011.05.003.*
- Chiaiese, P., Filippone, E., & Rao, R. (2014). *Biotechnologie e genomica delle piante. Italia. Idelson-Gnocchi.*
- Chiaiese, P., Minutolo, P., Filippone, E., & Guglielmi, F. (2011). *Expression of human apolipoprotein A-I in Nicotiana tabacum. Biotechnology letters, 33(1), 159–165.* [https://doi.org/10.1007/s10529-010-0388-4.](https://doi.org/10.1007/s10529-010-0388-4)
- Confalonieri, M., Cammareri, M., Biazzi, E., Pecchia, P., & Salema Fevereiro, M. P. (2009). *Enhanced triterpene saponin biosynthesis and root nodulation in transgenic barrel*

- medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) expressing a novel β -amyrin synthase (AsOXA1) gene. *Plant Biotechnology Journal* 7: 172-182. *Plant Biotechnology Journal*, 11.
- Cordero, B. F., Couso, I., Rodríguez, H., & León, R. (2011). *Enhancement of carotenoids biosynthesis in Chlamydomonas reinhardtii by nuclear transformation using a phytoene synthase gene isolated from Chlorella zofingiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 341–351. Doi: 10.1007/s00253-011-3262-y.
- Culaba, A. B., Ubando, A. T., Ching, P. M. L., Chen, W.-H., & Chang, J.-S. (2020). Biofuel from Microalgae: Sustainable Pathways. *Sustainability*, 12(19). <https://doi.org/10.3390/su12198009>
- D'Adamo, S., Schiano di Visconte, G., Lowe, G., Szaub-Newton, J., Beacham, T., Landels, A., Allen, M. J., Spicer, A., & Matthijs, M. (2019). Engineering the unicellular alga *Phaeodactylum tricorutum* for high-value plant triterpenoid production. *Plant Biotechnology Journal*, 17(1), 75–87. <https://doi.org/10.1111/pbi.12948>
- Dautor, Y., Ubeda-Mínguez, P., Chileh, T., García-Maroto, F., & Lopez Alonso, D. (2014). Development of genetic transformation methodologies for an industrially-promising microalga: *Scenedesmus almeriensis*. *Biotechnology letters*, 36. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1641-z>
- Dunham, T., & Karissa, W. (2002). *Biotechnology Education: A Multiple Instructional Strategies Approach*. *Journal of Technology Education*. 14. 10.21061/jte.v14i1.a.5.
- El-Sayed, M., & Verpoorte, R. (2002). *Effect of phytohormones on growth and alkaloid accumulation by Catharanthus roseus cell suspension cultures fed 93 with alkaloid precursors tryptamine and loganin*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 68: 265-270.
- El-Seedi, H. R., Smet, P. A. G. M. D., Beck, O., Possnert, G., & Bruhn, J. G. (2005). Antimicrobial triterpenes from *Poulsenia armata* Miq. *Standl. Nat Prod Res.* 2005 Feb;19(2):197-202. Doi: 10.1080/14786410410001730724. PMID: 15715266. *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1), 238–242. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.022>
- Gill, B, Kumar, S., & Navgeet, S. (2016). *Triterpenes in cancer: Significance and their influence*. *Molecular biology reports*, 43(9), 881–896. <https://doi.org/10.1007/s11033-016-4032-9>.
- Hadfield, C., Jordan, B. E., Mount, R. C., Pretorius, G. H. J., & Burak, E. (1990). G418-resistance as a dominant marker and reporter for gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 18(4), 303–313. <https://doi.org/10.1007/BF00318211>
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Ravikumar, R., & Carvalho, I. (2013). Microalgae taxonomy

- and breeding. *Biofuel Crops: Production, Physiology and Genetics*, 44–53.
- Horsch, R., Hoffmann, N., & Eichholtz, D. (1985). *A simple and general method for transferring genes into plants. Science* 227, 1229–1231. Doi: [10.1126/science.227.46911229](https://doi.org/10.1126/science.227.46911229).
- Huang, Z., Lin, Z., Cheng, Z., & Huang, X. (2015). *Production of dammarane-type saponins in rice by expressing the dammarenediol-II synthase gene from Panax ginseng CA Mey. Plant Sci.* 239, 106–114.
- Keasling, D. (2010). *Produzione avanzata di biocarburanti nei microbi. Biotecnologie J.*,5,147-162.
- Kindle, K. (1990). *High-frequency nuclear transformation of Chlamydomonas reinhardtii. Proc Natl Acad Sci USA* 87, 1228-1232.
- Kulkarni, R. (2016). Metabolic engineering: Biological art of producing useful chemicals. *Resonance*, 21(3), 233–237. <https://doi.org/10.1007/s12045-016-0318-4>
- Kumar, S. V., Misquitta, R. W., Reddy, V. S., & Rao, B. J. (2004). *Genetic transformation of the green alga Chlamydomonas reinhardtii by Agrobacterium tumefaciens. Plant Science*, 166: 731-738.
- Lauersen et al. 2018, M., George, J., Kuzhiumparambil, U., Lawson, C. A., Jaramillo-Madrid, A. C., Abbriano, R. M., Vickers, C. E., & Ralph, P. (2020). Extrachromosomal Genetic Engineering of the Marine Diatom *Phaeodactylum tricorutum* Enables the Heterologous Production of Monoterpenoids. *ACS Synthetic Biology*, 9(3), 598–612. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00455>
- Lauersen, K. J. (2019). Eukaryotic microalgae as hosts for light-driven heterologous isoprenoid production. *Planta*, 249(1), 155–180. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3048-x>
- Lee, Y. K., & Tan, H. M. (1988). *Interphylum protoplast fusion and genetic recombination of the algae Porphyrium cruetum and Dunaliella spp. J Gen Microbiol* 134, 635-641.
- Matsumoto, S., Ishii, A., Ikura, K., Ueda, M., & Sasaki, R. (1993). Expression of Human Erythropoietin in Cultured Tobacco Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57(8), 1249–1252. <https://doi.org/10.1271/bbb.57.1249>
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.*
- Murakami, M., Sato, Y., & Abe, H. (2003). *Biosynthesis of the triterpenoids, botryococcenes and tetramethylsqualene in the B race of Botryococcus braunii via the non-*

- mevalonate pathway. Tetrahedron Letters, 44:7035–7037.*
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum, 15*(3), 473–497.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Ng, I., Keskin, B. B., & Tan, S. (2020). A Critical Review of Genome Editing and Synthetic Biology Applications in Metabolic Engineering of Microalgae and Cyanobacteria. *Biotechnology Journal, 15*(8), 1900228.
<https://doi.org/10.1002/biot.201900228>
- Niehaus, T. D., Okada, S., Devarenne, T. P., Watt, D. S., Sviripa, V., & Chappell, J. (2011). Identification of unique mechanisms for triterpene biosynthesis in *Botryococcus braunii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108*(30), 12260–12265. PubMed. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106222108>
- Niu, Y., Zhang, M. H., Xie, W. H., & Yang, W. (2011). A new inducible expression system in a transformed green alga *Chlorella vulgaris*. *Genetics and Molecular Research, 10*: 3427–3434.
- Özçimen, D., M. Gülyurt, & İnan, B. (2016). *Algal Biorefinery for Biodiesel Production*. In: *BIODIESEL - Feedstocks, Production and Applications. A cura di Zhen Fang*, pp. 25–48.
- Paris, G. (1997). *Fitoplancton: Cenni di sistematica, identificazione e conteggio. Criteri e metodologie per lo studio ed il controllo delle alghe in acque destinate alla potabilizzazione. Biologia Ambientale, n° 2.*
- Pecchia, P. (2008). *Interventi di ingegneria genetica per aumentare la produzione di metaboliti vegetali con attività biocida. Ph.D. thesis, University of Naples Federico II, Naples, Italy.*
- Pecchia, P., Cammareri, M., Malafrente, N., Consiglio, M., Gualtieri, M., & Conicella, C. (2011). Quinic Acids from *Aster caucasicus* and from Transgenic Callus Expressing a β -Amyrin Synthase \S . *Natural product communications, 6*, 1665–1669.
<https://doi.org/10.1177/1934578X1100601125>
- Pimentel, D., & Patzek, T. W. (2005). Ethanol Production Using Corn, Switchgrass, and Wood; Biodiesel Production Using Soybean and Sunflower. *Natural Resources Research, 14*(1), 65–76. <https://doi.org/10.1007/s11053-005-4679-8>
- Puglisi, M. P., Tan, L. T., Jensen, P. R., & Fenical, W. (2004). Capisterones A and B from the tropical green alga *Penicillus capitatus*: Unexpected anti-fungal defenses targeting the

- marine pathogen *Lindra thalassiae*. *Chemistry of biologically and physiologically intriguing phenomena*, 60(33), 7035–7039. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2003.10.131>
- Rios JL. (2010). *Effects of triterpenes on the immune system*. *Journal of Ethnopharmacology* 128(1):1-14.
- Ruggiero, M. A., Dennis, G., & Orrel, T. (2015). *A Higher Level Classification of All Living Organisms—PLoS ONE*, 10, 1–60 <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119248>.
- Seo, J. W., Jeong, J. H., Shin, C., & Harada, E. (2005). *Overexpression of squalene synthase in *Eleutherococcus senticosus* increases phytosterol and triterpene accumulation*. *Phytochemistry*, 66: 869-877.
- Shintani, D., & Della Penna, D. (1998). *Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering*. *Science*, 282(5396), 2098-2100.
- Steinbrenner, J., & Sandmann, G. (2006). *Transformation of the green alga *Haematococcus pluvialis* with a phytoene desaturase for accelerated astaxanthin biosynthesis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7477–7484. Doi: 10.1128/AEM.01461-06.
- Thomas, S. (2011). *Photoautotrophic growth of microalgae for omega-3 fatty acid production*.
- Toyub, M., Miah, M., Habib, Md. A., & Rahman, M. (2012). *Growth Performance And Nutritional Value Of Scenedesmus Obliquus Cultured In Different Concentrations Of Sweetmeat Factory Waste Media*. *Bangladesh Journal of Animal Science*, 37. <https://doi.org/10.3329/bjas.v37i1.9874>
- Tremaine, J. (1957). *Effect of yeast extract, peptone, and certain nitrogen compounds on sporulation of *Saccharomyces cerevisiae**. *Mycopathologia et mycologia applicata*, 7, 241–250. <https://doi.org/10.1007/BF02249074>
- Twyman, R., Stoger, E., & Schillberg, S. (2003). *Molecular farming in plants: Host systems and expression technology*. *Trends in biotechnology*, 21(12), 570–578. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.10.002>.
- Wang, J., & Chen, T. (2008). *The biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin producing green alga *Chlorella zofingiensis**. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*; 24:2927-2932.
- Woertz, i, Feffer, A., & Lundquist, T. (2009). *Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid oproduction for biofuel feedstock*. *Journal of Environmenatl Enginnering* ; 135:1115-1122.
- Yamano, T., Iguchi, H., & Fukuzawa, H. (2013). *Rapid transformation of *Chlamydomonas**

reinhardtii without cell-wall removal. *Journal of bioscience and bioengineering*, 115.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.12.020>

Yang, Z. H., Zeng, R., & Chang, X. (2011). *Microalgae capture of CO₂ from actual flue gas discharged from a combustion chamber. Industrial and Engineering Chemistry Research ; 50:6496-6502.*

Zhou, Y., Zeng, J., Duan, L., & Xue, X. (2017). *Anti-inflammatory pentacyclic triterpenes from the stems of Euonymus carnosus. 118:21-26. Fitoterapia, 118:21-26.*

