



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea magistrale in Scienze Ambientali

Tesi di Laurea magistrale

—

Ca' Foscari
Dorsoduro 3246
30123 Venezia

Studio del bioaccumulo di cadmio sia in piante wild-type che in piante opportunamente ingegnerizzate al fine di modularne la resistenza al metallo

Relatore

Ch. Prof. Emanuele Argese

Correlatrici:

Prof.ssa Antonella Furini

Dott.ssa Fabiola Minello

Laureanda

Erica Palumbo

Matricola 819085

Anno Accademico

2012 / 2013

INDICE	pag.
1. INTRODUZIONE	5
1.1 I METALLI ESSENZIALI E LA CONTAMINAZIONE DA METALLI PESANTI E METALLOIDI	5
1.2 LA BIODISPONIBILITA' DI METALLI E METALLOIDI	6
1.3 L'ASSORBIMENTO DI METALLI NELLE PIANTE	8
1.4 LA CONTAMINAZIONE DA CADMIO	9
1.5 LA TOSSICITA' DEL CADMIO NELLE PIANTE	10
1.6 I SISTEMI FISIOLGICI DI RESISTENZA E TOLLERANZA AI METALLI NELL PIANTE	12
1.7 <i>Nicotiana Tabacum</i>	14
1.7.1 FIOLOGIA DELLA PIANTA	14
1.7.2 DISTRIBUZIONE	15
1.7.3 STUDI DI ACCUMULO DI CADMIO IN <i>Nicotiana tabacum</i>	15
1.8 STUDI DI TOLLERANZA AL CADMIO IN <i>Pseudomonas putida</i>	16
1.8.1 IL SISTEMA DI EFLUSSO CzcCBA	17
1.9 TRASFORMAZIONE GENETICA DI ORGANISMI VEGETALI CON GENI BATTERICI	19
2. OBIETTIVO DELLA TESI	20
3. MATERIALI E METODI	22
3.1 IDENTIFICAZIONE E CLONAGGIO DEI GENI CzcA, CzcB e CzcC IN <i>P. putida</i>	22
3.2 MUTAZIONE DELLA SEQUENZA CzcA	24
3.3 CLONAGGIO DELLE SUB UNITA' PROTEICHE DEL COMPLESSO CzcCBA IN VETTORI DI ESPRESSIONE	25
3.4 INSERIMENTO DEI PLASMIDI ALL'INTERNO DI <i>A. tumefaciens</i>	26
3.5 TRASFORMAZIONE DI <i>N. tabacum</i> ATTRAVERSO CRESCITA CON <i>A. tumefaciens</i>	27
3.6 ANALISI DEL LIVELLO DI TRASCRIZIONE CON REAL TIME PCR E INCROCIO DELLE PIANTE	29
3.7 CRESCITA DELLE PIANTE IN IDROPONICA E TRATTAMENTO CON CADMIO	30
3.8 DIGESTIONE DEL MATERIALE VEGETALE	32
3.9 ANALISI DEL CONTENUTO DI METALLI CON ASSORBIMENTO ATOMICO	34
3.10 CONTROLLO DI QUALITA' DEL DATO	35
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	36
4.1 RISULTATI DELL' ANALISI DEL CONTENUTO DI Cd NEI TESSUTI FOGLIARI	36
4.2 RISULTATI DELL' ANALISI DEL CONTENUTO DI Cd IN FOGLIE E RADICI	38

5. CONCLUSIONI	44
6. BIBLIOGRAFIA	46
Ringraziamenti	53

1. INTRODUZIONE

1.1 I METALLI ESSENZIALI E LA CONTAMINAZIONE DA METALLI PESANTI E METALLOIDI

Le piante necessitano di alcuni nutrienti essenziali per la sopravvivenza: alcuni sono necessari a concentrazioni basse, altri a concentrazioni più elevate e sono per questo definiti rispettivamente micronutrienti e macronutrienti.

I macronutrienti sono C, H, O, N, P, K, S, Ca e Mg. Essi sono i principali elementi costituenti di biomassa, proteine e DNA, oltre a svolgere diverse funzioni metaboliche (Stanley and Manahan, 2010).

I micronutrienti sono B, Cl, Co, Cu, Fe, Mo, Mn, Na, Si, V, Zn: svolgono funzioni importanti all'interno del metabolismo cellulare essendo costituenti essenziali di molti enzimi (Stanley and Manahan, 2010, Clemens, 2000). Questi elementi sono fondamentali per la cellula ma risultano tossici per la stessa se presenti a concentrazioni superiori del necessario (Barbieri and Bestetti, 2008; Clemens, 2000).

Il grafico di Bertrand, infatti, mostra la letalità della cellula se sottoposta ad una concentrazione elevata di un elemento essenziale (curva verde): la curva grigia, invece, mostra che una cellula sottoposta a concentrazioni minime di un elemento tossico mostra fin da subito inibizione della crescita (Barbieri and Bestetti, 2008).

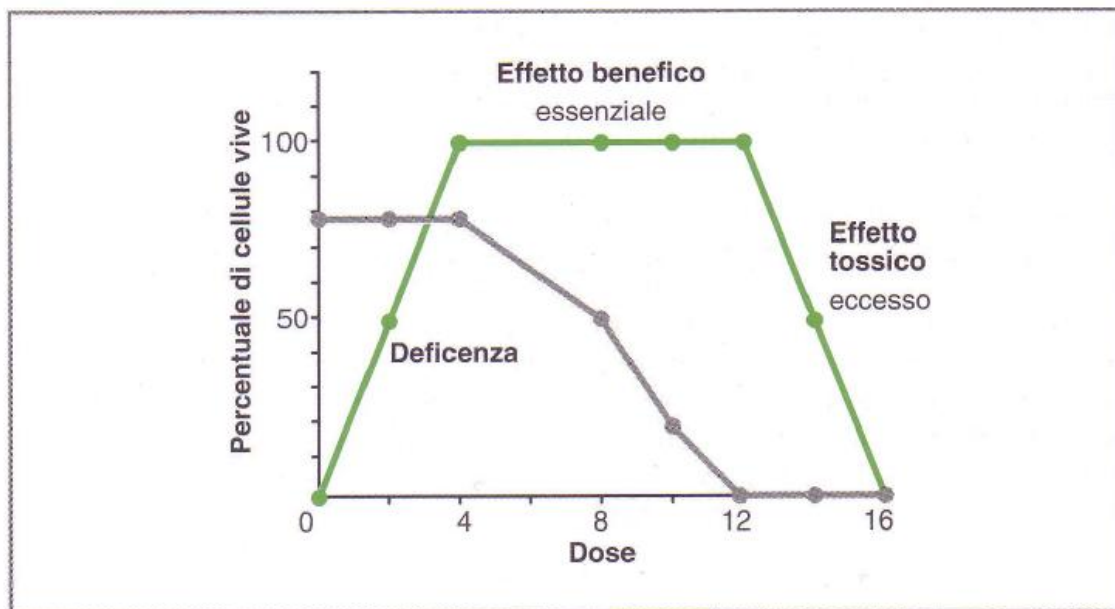


Figura 1: Effetti fisiologici correlati alle concentrazioni crescenti di un elemento essenziale (linea verde) e tossico (linea grigia) (Barbieri and Bestetti, 2008)

I metalli pesanti sono un gruppo di elementi con densità superiore a $5,0 \text{ g/cm}^3$ e con peso atomico superiore a venti, ma in questo gruppo vengono inseriti anche elementi con densità inferiori e dei non metalli (As, Mo, Se e B) accumulati tra loro per alcune caratteristiche: si comportano generalmente come cationi, le forme idrate sono poco solubili, hanno una buona attitudine a formare complessi, sono molto affini ai solfuri con i quali tendono a reagire e cambiano stato di ossidazione in relazione al pH e all' Eh (Lorito and Vianello, 2010). Alcuni metalli pesanti risultano tossici per gli organismi oltre una certa soglia, altri evidenziano tossicità già a concentrazioni molto basse (Bhargava *et al.*, 2012).

Le fonti di metalli pesanti sono naturali e antropiche: quelle di origine naturale sono principalmente emissioni vulcaniche e da processi di pedogenesi che degradano rocce e substrati mettendo in circolo i metalli presenti all' interno del reticolo cristallino per sostituzioni isomorfe (Lorito and Vianello, 2010).

L'inquinamento da metalli pesanti è il risultato di attività antropiche e ha subito una drammatica crescita a partire dalla rivoluzione industriale (Fusco *et al.*, 2005): le fonti antropiche di metalli pesanti sono, infatti, sono principalmente attività industriali e chimiche, cartiere e concerie, industrie tessili, depositi di rifiuti e di scarti di lavorazione, attività marittime, tecniche di agricoltura intensiva, liquami zootecnici, inceneritori, miniere, processi di combustione e centrali termoelettriche (Bhargava *et al.*, 2012).

Un sito è definito 'contaminato' quando anche solo un elemento eccede il limite imposto dalla legge per la specifica destinazione d'uso di quel sito (Barbieri and Bestetti 2008): la contaminazione da metalli è un problema sentito a causa degli impatti che può avere sulla salute umana e sull' ecosistema, poiché gli inquinanti possono entrare all' interno dei cicli biogeochimici e quindi all' interno della catena trofica.

1.2 LA BIODISPONIBILITA' DI METALLI E METALLOIDI

Un metallo risulta tossico per un essere vivente in relazione alla sua biodisponibilità: ci si riferisce, cioè, alla forma di metallo che è facilmente acquisita dalla pianta o dall' organismo in questione, e che spesso rappresenta solo una piccola parte del contenuto totale di metallo nel mezzo (Liu *et al.*, 2011). In questo senso si può distinguere la frazione del metallo biodisponibile per la pianta, o un altro essere vivente potenzialmente pericolosa, da quella non biodisponibile e quindi non pericolosa perché non accessibile agli organismi (Ivask *et al.*, 2004).

Il National Research Council (NRC, 2003) ha definito la biodisponibilità dei metalli considerando tra gli organismi recettori anche l' uomo, definendo quindi la biodisponibilità come la frazione di massa totale di metallo accessibile attraverso cibo e ambiente abiotico (Navarro *et al.*, 2006).

La biodisponibilità di un metallo dipende dalle tipologie di fenomeni fisico-chimici e biologici nel mezzo, dalle caratteristiche del mezzo e dalle caratteristiche intrinseche dell' elemento, primo fra tutti il suo stato di ossidazione perché ogni metallo reagisce con elementi diversi all' interno della cellula solo in una determinata forma (Barbieri and Bestetti , 2008).

La biodisponibilità dipende anche dalle proprietà chimico-fisiche del comparto ambientale: pH, potenziale redox, capacità di scambio cationico, salinità, contenuto di materia organica, granulometria e mineralogia (per quanto riguarda un suolo). Trasformazioni chimico-fisiche possono infatti mobilizzare i metalli trasformandoli da una forma più stabile ad una meno stabile e per questo più biodisponibile (Argese *et al.*, 2005; Qiana *et al.*, 1996).

Gli acidi organici a basso peso molecolare (acido malico, citrico, fitico, aspartico, tannico), per esempio, hanno molti centri attivi che favoriscono l'assorbimento superficiale per scambio cationico (Huang and Violante, 1986).

Un metallo può essere presente sotto forma ionica, come acido volatile, complessato con composti organici o con ossidi, idrossidi, fosfati, solfati e carbonati.

Un metallo può anche essere legato alle particelle del suolo: terreni costituiti da particelle molto fini mostrano una concentrazione maggiore di metalli pesanti grazie alla presenza di un' area superficiale maggiore, di minerali argillosi e di materia organica (Qiana *et al.*, 1996).

E' stato dimostrato che la biodisponibilità di un metallo nel suolo diminuisce con la presenza di materia organica e aumenta con l'abbassamento del pH (Argese *et al.*, 2005): in uno studio di suoli nell' area dei Paesi Bassi, è stato dimostrato che la disponibilità di alcuni metalli (Cu e Pb) era bassa in suoli con pH maggiore di 7 e con alto contenuto di materia organica e minerali argillosi (8-30 % e 13-42%) (Van Gestel, 2008).

La percentuale di metallo biodisponibile risulta essere maggiore anche a causa della presenza di essudati vegetali o di molecole organiche prodotte dai microrganismi. I siderofori sono un esempio: si identificano come composti organici a bassa massa molecolare prodotti da alcuni microrganismi della rizosfera e sono specifici ligandi che complessano Cd, Ni, Pb e Zn. I metalli sono mobilizzati per l'adsorbimento radicale anche attraverso acidificazione della rizosfera, essudazione di composti carbossilati e meccanismi legati all' acquisizione di P. Si legano anche a ligandi come acidi organici, amminoacidi, peptidi e proteine (Bhargava *et al.*, 2012).

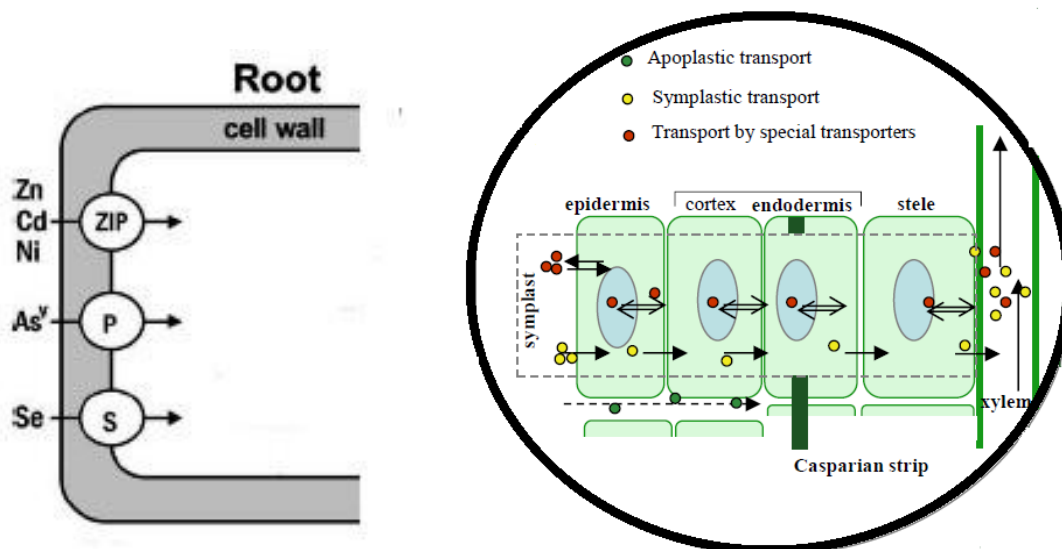
L'utilizzo di chelanti sintetici come EDTA aumenta la biodisponibilità di un metallo all' interno del suolo e per questo motivo essi sono utilizzati soprattutto in progetti di fitorimediazione (*Bhargava et al.*, 2012).

1.3 L'ASSORBIMENTO DI METALLI NELLE PIANTE

Le piante, oltre ad assorbire attraverso le radici i nutrienti necessari alla crescita ed allo sviluppo, sono anche in grado di escludere o accumulare metalli pesanti dal suolo e per questo possono essere classificate in tre categorie: "piante escluditrici" in grado di mantenere la concentrazione del metallo ad un livello critico ostacolando l'ulteriore assorbimento da parte dell'apparato radicale ed evitandone quindi l'accumulo nella parte aerea della pianta; le "piante accumulatrici", in cui il metallo è concentrato nelle parti aeree essendo favorito l'assorbimento ed il trasporto; le "piante indicatrici" in cui la concentrazione interna del metallo riflette quella esterna presente nel suolo (*Peralta-Videa et al.*, 2009, *Bhargava et al.*, 2012).

Una categoria particolare è rappresentata dalle piante iperaccumulatrici che sono in grado non solo di tollerare alcuni metalli pesanti, ma anche di iperaccumularli: nel dettaglio sono definite tali le piante che accumulano Ni, Co, Pb in concentrazioni maggiori dello 0.1% del loro peso secco (p.s.), Zn in concentrazione maggiore dell' 1% e Cd in concentrazione maggiore dello 0.01% (*Clemens*, 2000). Le caratteristiche che le distinguono sono una grande capacità di assorbire i metalli dal suolo, una grande abilità di traslocarli nelle loro parti aeree e di detossificarli grazie all'accumulo all' interno dei vacuoli o per legami con amminoacidi, acidi organici o peptidi (*Rascio and Navari-Izzo*, 2011). Queste specie sono in genere caratterizzate da una crescita lenta ed una ridotta produzione di biomassa.

I metalli essenziali entrano all' interno della pianta grazie a sistemi specifici di *uptake* che sono sistemi di trasporto attivo mediato da carriers o canali specifici (*Trombetta et al.*, 2008,): grazie ad essi entrano metalli essenziali ma anche metalli tossici, privi di ruolo fisiologico, con un'alta somiglianza chimica ai primi. I carriers coinvolti sono soprattutto proteine ZIP (Zinc-regulated transporter & Iron-regulated transporter Proteins) che, come mostra la figura 2a, possono trasportare all' interno delle cellule delle radici Zn, Ni e Cd, trasportatori di fosfato che possono far entrare nella cellula As come arsenato per la sua grande somiglianza nel comportamento chimico a questo metallo, trasportatori di solfato affini anche al Se nella forma di selenato (*Rascio and Navari-Izzo*, 2011).



a)

b)

Figura 2: a) Trasportatori di metalli all' interno di una cellula delle radici; b) Traslocazione dei metalli per via apoplastica o simpatica (Rascio and Navari-Izzo, 2011)

Gli ioni entrano nella cellula attraverso la via simplastica e apoplastica. La figura 2b mostra nel dettaglio i due tipi di trasporto: il sistema apoplastico avviene attraverso gli spazi intercellulari e al di fuori della parete cellulare, il sistema simplastico avviene per passaggio degli ioni all'interno della cellula, grazie alla connessione continua tra le cellule attraverso il plasmodesma e grazie alla presenza di gruppi carbossilici sulla superficie esterna della membrana. La terza via di trasporto dei metalli include diversi trasportatori e pompe ioniche. (Krystofova *et al.*, 2012).

1.4 LA CONTAMINAZIONE DA CADMIO

Il cadmio è un metallo pesante presente in ambiente in concentrazione di 0.1 mg/kg di crosta terrestre. E' uno dei metalli più tossici per l'uomo (Gill *et al.*, 2013; Nordberg, 2003): la sua solubilità in acqua lo rende disponibile all'assorbimento da parte delle piante ed entra quindi facilmente nella catena alimentare.

Infatti, le fonti principale di assunzione da parte dell' uomo sono il cibo ed il fumo (Jarup, 2003): Il Cd è presente in tracce nei fertilizzanti inorganici a base di P, deriva inoltre dai processi industriali, emissioni da auto e acque di scarico (Linger *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2012).

Inoltre, questo metallo pesante è usato come stabilizzante nei prodotti del PVC, come pigmento nei coloranti (nello specifico si usa solfuro di cadmio) e recentemente anche in alcune batterie

ricaricabili di nickel-cadmio; la cadmiatura, cioè il rivestimento di un materiale metallico con cadmio, è usata per l'anticorrosione dello stesso (Chaney *et al.*, 1999).

Come sopraesposto il Cd viene assorbito attraverso il cibo ma la fonte principale di assunzione di Cd per l'uomo è il fumo di sigaretta: il livello di cadmio nei fumatori risulta essere circa 4-5 volte superiore rispetto ai non fumatori (Chaney *et al.*, 1999).

Ha effetti sulla salute sia a livelli acuti che cronici ed il problema principale è il suo tempo di emivita che è di circa 15-20 anni nell'uomo (Nordberg, 2003).

La sindrome di Itai itai, malattia che è legata all'esposizione da Cd e che comporta seri danni all'apparato scheletrico, fu descritta per la prima volta nel 1970 in Giappone, quando alcune acque di scarico ricche di Cd contaminarono campi agricoli raggiungendo piante edibili e quindi l'uomo (Mc Laughlin and Singh, 1999).

Il pH del suolo è il fattore determinante nell'influencare la biodisponibilità del cadmio (Lugon-Moulin, *et al.*, 2006; Millis *et al.*, 2004), ma anche potenziale redox, la presenza di acidi organici, di ioni e di microrganismi nella rizosfera e la competizione con i nutrienti influenzano la sua mobilità. Inoltre le pratiche agricole, come l'utilizzo di fertilizzanti ricchi di Cd come contaminante, possono aumentare la concentrazione o modificare le caratteristiche fisico-chimico del suolo rendendo il metallo più biodisponibile (Grant *et al.*, 1999).

Nello specifico, molti lavori dimostrano che l'*uptake* di Cd da parte di una pianta è minore in suoli acidi con alto contenuto di materia organica e in suoli ricchi di nutrienti come Ca e Zn (DalCorso *et al.*, 2008; Prasad, 1995).

1.5 LA TOSSICITA' DEL CADMIO NELLE PIANTE

Il cadmio viene assorbito da microrganismi e piante attraverso i sistemi di trasporto di membrana degli ioni bivalenti oppure può essere co-trasportato con il manganese o ancora entra attraverso i canali del calcio (Barbieri and Bestetti, 2008; DalCorso *et al.*, 2008).

E' assorbito facilmente grazie alla sua mobilità e alla solubilità in acqua, per cui si distribuisce in ambiente, entra facilmente nelle radici delle piante e attraverso lo xilema, complessato con acidi organici o fitochelatine, raggiunge le parti aeree (DalCorso *et al.*, 2008).

La tossicità del cadmio è dovuta alla sua capacità di interferire con il metabolismo dello zinco e di reagire con i gruppi sulfidrilici delle proteine, oltre che di danneggiare la membrana cellulare (Barbieri and Bestetti, 2008); inoltre, fattore di alto rischio è anche la produzione di ROS (specie

reattive dell'ossigeno) come sottoprodotti di via metaboliche interferite dalla presenza del metallo, che portano al danneggiamento dei lipidi di membrana e alla perdita di ioni e quindi a stress ossidativo (Uruç *et al.*, 2013).

All'interno della pianta il Cd crea problemi di inibizione della fotosintesi e di molti enzimi, di alterazione dell'equilibrio idrico e generazione di radicali liberi (Clemens, 2006; Prasad, 1995).

La produzione di ROS crea problemi a diversi livelli nella cellula vegetale come il danneggiamento della membrana lipidica, delle proteine, dei pigmenti, degli acidi nucleici (Uruç *et al.*, 2013).

Ci sono inoltre lavori che evidenziano come il cadmio in alcune piante crei aberrazioni nei cromosomi, alterazione del ciclo di divisione cellulare e quindi alti tassi di mutazione ed embrioni malformati (DalCorso *et al.*, 2010; Fojta *et al.*, 2006).

Il Cd influenza il metabolismo cellulare con diverse azioni: interagisce con i gruppi sulfidrilici della membrana plasmatica provocando la perdita di ioni K⁺, inibisce l'attività delle proteine di membrana per il trasporto degli ioni K⁺ all'interno della cellula perché si lega a particolari siti di legami specifici per il potassio, entra attraverso i canali del calcio e ne imita l'attività, all'interno delle radici riduce il trasporto e la traslocazione del nitrato poiché riduce l'attività delle nitrato riduttasi, inibisce la fotosintesi poiché si lega alle membrane tilacoidali del fotosistema 2, influenza l'assorbimento di nutrienti e il bilancio idrico poiché altera l'azione stomatica diminuendo la velocità di traspirazione, e quindi, in linea generale, diminuisce la crescita della pianta. (Nesler, 2010; DalCorso *et al.*, 2008; Piccioni *et al.*, 2002); è stata inoltre dimostrata la diminuzione della concentrazione di clorofilla a in diverse piante dopo esposizione a cadmio (Shi and Cai, 2009). Il metallo, in particolare, danneggia il complesso di raccolta della radiazione dei due fotosistemi nei cloroplasti e causa una diminuzione del contenuto di clorofilla e di carotenoidi, per cui si ha una diminuzione dell'efficienza fotosintetica (DalCorso *et al.*, 2008).

Il cadmio interferisce anche con il metabolismo dello zolfo: un'esposizione prolungata al metallo induce un aumento dei composti tiolici ed una conseguente diminuzione dell'attività di due enzimi nella via di assimilazione di questo elemento (DalCorso *et al.*, 2008).

Durante un'esposizione di cadmio, inoltre, gli stomi delle cellule si chiudono indipendentemente dal contenuto di acqua. La chiusura, infatti, è guidata dall'acido abscissico (ABA) indotto dall'

accumulo di Ca^{2+} nel citosol ed il cadmio, imitandone l'attività, crea una produzione di ABA che porta alla chiusura degli stomi (DalCorso *et al.*, 2008; Perfus-Barbeoch *et al.*, 2002).

A livello delle radici della pianta interferisce con l'assorbimento di molti nutrienti (Ca, Mg, K, P), con l'attività di diversi enzimi coinvolti nel metabolismo del nitrato e con altri enzimi coinvolti nel metabolismo dell'ammonio (GS:glutamine synthase e GoGAT: glutamate synthase): è inibita l'attività di riduzione e di trasporto, e ciò causa una diminuzione di assimilazione dei questi nutrienti essenziali da parte della pianta (Dal Corso *et al.*, 2008).

1.6 I SISTEMI FISIOLGICI DI RESISTENZA E TOLLERANZA AI METALLI NELLE PIANTE

Durante l'evoluzione le piante hanno sviluppato meccanismi di tolleranza e resistenza ai metalli che si trovano in concentrazione sempre più crescenti all'interno dei suoli a partire dalla rivoluzione industriale (Fusco *et al.*, 2005).

La resistenza e la tolleranza dipendono dall'abilità della singola pianta di attivare meccanismi molecolari e fisiologici diversi in difesa contro lo stress da metalli pesanti (Citterio *et al.*, 2003): in generale si parla di omeostasi intendendo la capacità della cellula di attivare questi sistemi di difesa a livello di uptake, accumulo e detossificazione dei metalli (Clemens, 2000).

Nello specifico, i principali meccanismi di omeostasi sono: riduzione dell'uptake da parte delle radici attraverso legami con essudati (siderofori, acidi organici, malato e citrato ecc) o con siti di legami presenti sulla parte esterna della parete e membrana cellulare (peptidi e carboidrati), produzione di enzimi antiossidanti in generale e produzione di composti chelanti (metallotioneine e fitochelatine) per la detossificazione e compartimentazione del metallo una volta entrato nella cellula (DalCorso *et al.*, 2010).

La figura 3a mostra la catena di reazioni causate dalla presenza di cadmio all'interno della cellula vegetale: il metallo, una volta entrato nella cellula induce la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), di calmodulina e calcio (che sono 'messaggeri' di stimoli esterni) e di alcuni ormoni, quali acido jasmonico (JA), acido salicilico (AS). La presenza dei ROS porta alla fosforilazione a cascata di diverse chinasi (MAPK) e queste, con gli ormoni e il sistema Ca-calmodulina convergono nel nucleo regolando l'attività di alcuni fattori di trascrizione (TF). (DalCorso *et al.*, 2010).

La figura 3b mostra, quindi, l'espressione di geni responsabili della detossificazione del cadmio indotti dai fattori di trascrizione attraverso particolari vie di trasduzione del segnale.

Nello specifico l'espressione dei geni porta alla formazione di molti enzimi: trasportatori di membrana (principalmente proteine ABC), fitochelatine (PC) e metallotioneine (MT) (DalCorso *et al.*, 2010; Fojta *et al.*, 2006).

Queste molecole hanno la funzione di trasportare il metallo al di fuori della cellula o all'interno del vacuolo, per la sua compartimentazione, e sono il meccanismo più utilizzato dalle piante per la detossificazione di cadmio e arsenico (Clemens, 2006; DalCorso *et al.*, 2008).

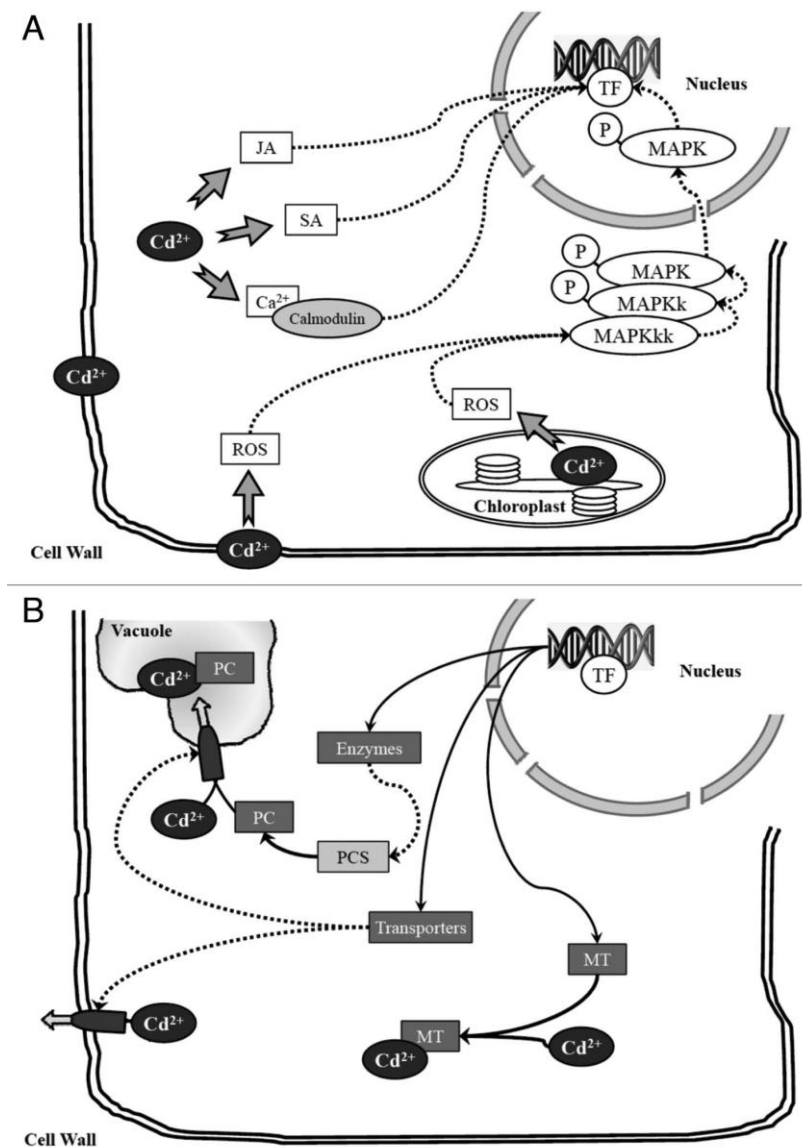


Figura 3: Catena di reazioni indotte dalla presenza di Cadmio in una cellula vegetale (DalCorso *et al.*, 2010)

Le fitochelatine sono peptidi ricchi di cisteina, acido glutammico, glicina o alanina, e possono comprendere da 2 a 11 unità glutamilmcisteiniche coinvolti nella detossificazione dei metalli pesanti nelle piante, per cui sono sintetizzate in risposta ad una esposizione a queste sostanze (Trombetta et al., 2008): il glutatione (o un'altra fitochelatina a PM più basso) è il blocco di partenza per la produzione di queste molecole ed è catalizzato dall' enzima fitochelatin- sintetasi o PC-sintetasi (PCS).

La formula generale della struttura delle fitochelatiche è $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, dove Glu è l' acido glutammico, Cys è la cisteina, Gly è la glicina e n può variare da 2 a 11. (Fojta et al., 2006).

Grazie alla presenza di gruppi tiolici della cisteina, le fitochelatine, come le metallotioneine che hanno la medesima funzione, chelano il cadmio e formano complessi di peso molecolare tra 2500 e 2600 Da.

I complessi ad alto peso molecolare (HMW complexes), sono quindi trasferiti nel vacuolo attraverso sistemi specifici, le proteine di membrana ABC (Guo-ming and Jiang-xin, 2012).

Anche le metallotioneine sono peptidi ricchi di cisteina con la medesima funzione delle fitochelatine, ma, mentre la sintesi di queste ultime avviene per attivazione da parte degli ioni metallici dell' enzima che promuove il processo di polimerizzazione, l' induzione delle metallotioneine avviene a livello genetico, per cui sono sintetizzate a partire dall' mRNA sui ribosomi (Trombetta et al., 2008).

Molte piante non solo sono in grado di tollerare alte concentrazioni di metalli pesanti, ma sono anche in grado di iperaccumularli: circa 400 specie di diversi taxa sono state evidenziate come piante iperaccumulatrici di metalli pesanti, cioè piante in grado di accumulare Ni, Co, Pb in concentrazioni maggiori dello 0.1% del loro peso secco, Zn in concentrazione maggiore dell' 1% e Cd in concentrazione maggiore dello 0.01% (Clemens, 2000). Questa capacità delle piante è sfruttata nelle tecnologie di fitorimediazione: con questo termine si indica l' utilizzo di piante per la decontaminazione di suoli inquinati da metalli pesanti, grazie alla loro capacità di accumularli e stocarli all' interno della biomassa epigea (Mart, 2004).

1.7 *Nicotiana tabacum*

1.7.1 FISILOGIA DELLA PIANTA

Nicotiana tabacum è una pianta erbacea della famiglia delle *Solanaceae*: è una pianta annuale con fusto eretto di 1-3 metri, foglie ellittiche o lanceolate di 100 cm di lunghezza che crescono a spirale

intorno allo stelo e che terminano con infiorescenze rose o rosse: dopo la semina, che avviene in primavera, ci vogliono circa 3-5 mesi per la crescita completa (Magness, 1971).

Il frutto è una piccola capsula bruna sferica o ellittica di 15-20 mm di lunghezza che contiene circa 10.000 semi per grammo.

Le foglie contengono il principale alcaloide, la nicotina, in percentuali di 0.2-0.5 % di peso secco.

Al genere *Nicotiana* appartengono due specie: *Nicotiana tabacum* e *Nicotiana rustica* (Carne and Sbattella, 2006).



Figura 4: Pianta di *N. tabacum* con infiorescenze rosa

1.7.2 DISTRIBUZIONE

E' nativa dell' America del sud, in particolare delle regioni dell' Argentina e della Bolivia. Nel periodo pre-Colombiano era coltivata in Messico e centro America. In seguito è stata importata in Europa ed ora è coltivata anche in Italia per la produzione di sigarette e sigari (Rossi, 2005).

1.7.3 STUDI DI ACCUMULO DI CADMIO IN *Nicotiana tabacum*

La pianta di tabacco (*Nicotiana tabacum*) è in grado di accumulare all' interno dei propri tessuti una grande quantità di cadmio. E' stata definita come una specie Cd-accumulatrice (Mench et al, 1989; Frank et al, 1877, Clarke and Brennan, 1983): nello specifico, mentre *N. rustica* accumula il metallo nelle radici, *N. tabacum* è definita una specie Cd-accumulatrice nelle foglie.

E' una pianta molto studiata non solo per l'importanza economica ma anche perché è una specie modello per gli studi di biologia vegetale e soprattutto per la facilità di essere ingegnerizzata per studi di ingegneria genetica: in letteratura molti lavori hanno evidenziato la grande capacità di questa pianta di accumulare il metallo (Jarup, 2003; Lugon-Moulin *et al.*, 2006) e altrettanti hanno cercato di migliorare questa caratteristica attraverso tecniche di ingegneria genetica (Arslan *et al.*, 2010). E' stato inoltre dimostrato che la capacità della pianta *N. tabacum* di accumulare Cd è superiore rispetto a *N. rustica* e che la maggior parte si accumula nelle foglie (81 % e 75% rispettivamente, rispetto al contenuto nel mezzo da cui il metallo è assorbito) (Mench *et al.*, 1989).

Questo aspetto particolare può portare all'assunzione di cadmio da parte dei fumatori (Marano *et al.*, 2012; Benavides *et al.*, 2005).

1.8 STUDI DI TOLLERANZA AL CADMIO IN *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida è un batterio Gram negativo, aerobio, ubiquitario e non patogeno appartenente al phylum dei Proteobacteria. Il genere *Pseudomonas* fu descritto per la prima volta nel 1894 e a questo genere appartengono 19 gruppi filogenetici identificati in base allo studio della sequenza di DNA dell'unità 16S dell' rRNA (Mulet *et al.*, 2013): *Pseudomonas* è un genere ubiquitario, è stato infatti identificato in numerosi habitat acquatici e terrestri, dall'Antartide ai Tropici, all'interno di sedimenti, suoli, acque, piante, funghi e rizosfera vegetale (Peix *et al.*, 2009). Come mostra la figura il batterio ha forma bastoncellare e con uno o più flagelli per il movimento.

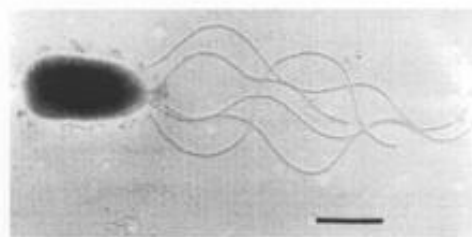


Figura 5: Immagine di *Pseudomonas Putida*

E' noto per la sua versatilità e adattabilità metabolica: è infatti un batterio chemioeterotrofo saprofito in grado di utilizzare diversi substrati come fonte di energia, anche composti xenobiotici alifatici. E' in grado di sopravvivere in ambienti contaminati, giocando un ruolo importante anche a livello di risanamento degli stessi.

Molti studi di ingegneria genetica sono stati effettuati su questo batterio sia grazie alle sue proprietà cataboliche per la degradazione di composti xenobiotici come benzene ed etilbenzene, sia grazie alla sua grande tolleranza nei confronti dei metalli pesanti quali il Cd (Barbieri and Bestetti, 2008). Inoltre il genoma di *P. Putida* è stato sequenziato ed è a disposizione della comunità scientifica.

La grande tolleranza di questo batterio nei confronti dei metalli pesanti è legata alla presenza del sistema di efflusso come il sistema CzcCBA, che permette di estrarre Cd Co e Zn verso l'esterno.

1.8.1 IL SISTEMA DI EFLUSSO CzcCBA

Nel corso dell'evoluzione, i microorganismi hanno evoluto sistemi di resistenze e tolleranza ai metalli: alcuni metalli sono indispensabili a concentrazioni basse per necessità fisiologiche, ma diventano tossici a concentrazione elevate, molti altri, tra cui il cadmio, risultano tossici anche a concentrazioni molto basse.

Tra i sistemi di resistenza ai metalli pesanti i batteri hanno sviluppato diversi meccanismi: riduzione enzimatica, sequestro intra o extracellulare (all'interno di strutture o come granuli), pompe di efflusso ATP-dipendenti e pompe di efflusso dipendenti dal gradiente chemiosmotico, tra cui il sistema di efflusso CzcCBA.

Il sistema CzcCBA è un sistema di trasporto di membrana che trasporta cadmio, cobalto e zinco al di fuori della cellula dei batteri Gram negativi (Barbieri and Bestetti, 2008).

La capacità di *P. Putida* di sopravvivere in ambienti ricchi di metalli pesanti, è legata anche alla presenza di questo sistema che permette di espellere i metalli tossici dalla cellula.

Il sistema è stato identificato anche in altre specie del genere *Pseudomonas*, come *P. aeruginosa*, che è stata ritrovata in diversi ambienti contaminati da metalli pesanti (Hassan, 1999), ed in generale nella maggior parte dei batteri Gram negativi di altri generi, come in *Escherichia coli* e *Alcaligenes eutrophus* (Nies, 1995).

Nello specifico il sistema sfrutta il gradiente protonico trans-membrana, ed è un sistema antiporto, cioè è costituito da proteine che trasportano le molecole in direzione opposte, una all'interno e una all'esterno della membrana (Campbell, 2010).

Il sistema antiporto è una pompa di membrana che ricava energia per trasportare ioni al di fuori della cellula: ad ogni ione di cadmio pompato all'esterno, vengono introdotti due ioni H⁺ (Silver and Phung, 2009). Il gradiente protonico della membrana citoplasmatica è sufficiente per guidare

lo scambio catione/protone. Cd e Zn sono trasportati al di fuori della cellula con diverse cinetiche: Cd^{2+} è trasportato con alta affinità, il Co con bassa affinità, mentre il trasporto dello Zn sembra essere lento a basse concentrazioni ed alto a concentrazioni elevate e tossiche (Nies, 1995).

Il sistema è costituito da tre sub unità proteiche (fig. n. 6): CzcA è la sub unità localizzata nella membrana citoplasmatica e funziona come un trasportatore di membrana, CzcC è la sub unità posta sulla membrana esterna, mentre CzcB è localizzata nel periplasma del batterio e funge da canale mettendo in comunicazione CzcA con CzcC. Essa presenta un dominio N-terminale nel lato citoplasmatico, e un dominio C-terminale nel lato esterno e appare come una proteina di fusione di membrana che lega le altre due sub unità proteiche (Silver, 1996; Barbieri and Bestetti, 2008).

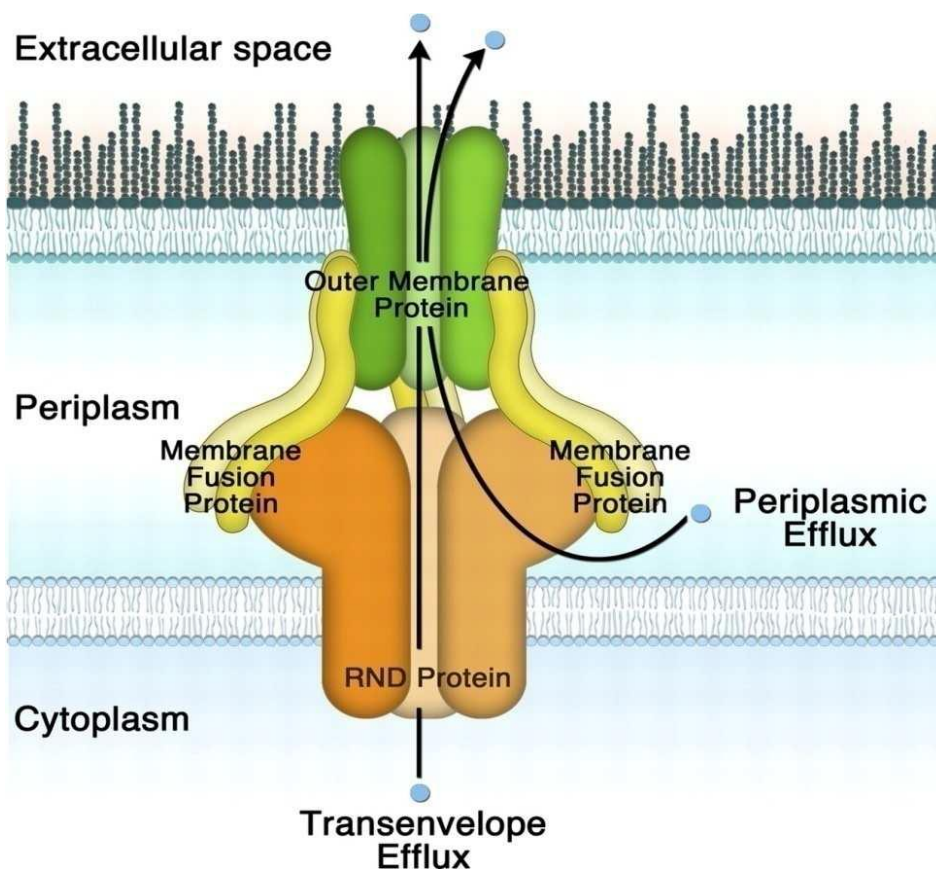


Figura 6: Sistema di efflusso CzcCBA (Kim et al., 2011)

1.9 TRASFORMAZIONE GENETICA DI ORGANISMI VEGETALI CON GENI BATTERICI

Le tecnologie del DNA ricombinante forniscono la possibilità di modificare geneticamente organismi vegetali attraverso la manipolazione genetica dei loro genomi, in particolare attraverso l'inserimento nel genoma vegetale di geni provenienti da altri organismi. Il metodo più utilizzato per trasferire geni alla cellula vegetale è quello che prevede l'utilizzo dell'*Agrobacterium tumefaciens*, un proteobatterio Gram-negativo aerobo e flagellato, fitopatogeno per molte specie dicotiledoni e per questo in grado di trasferire parte del suo DNA alla cellula vegetale.

Le piante cresciute dopo trasformazione con *Agrobacterium* sono fertili e i geni esogeni sono trasmessi alla progenie (Alimohammadi *et al.*, 2009).

Nello specifico è in grado di trasformare le cellule della radice delle piante in cellule tumorali, e questa caratteristica è dovuta al trasferimento del plasmide Ti (chiamato T-DNA), contenente il gene di induzione del tumore, che è integrato nel genoma della pianta: questo sistema è quindi sfruttato dall'ingegneria genetica per il trasferimento di geni da un batterio ad una pianta (Wullems *et al.*, 1981).

Per il trasferimento dei plasmidi nel batterio *Agrobacterium tumefaciens* si utilizza il cosiddetto sistema a vettore binario costituito da due plasmidi: uno è il plasmide disarmato, cioè il plasmide che contiene solo i geni per il trasferimento (geni *vir*) ma non i geni codificanti la il tumore (Kiyokawa, 2009); l'altro plasmide invece contiene il DNA esogeno di interesse.

L'utilizzo di questo batterio è un sistema naturale di trasferimento di materiale genetico all'interno di una pianta, ma è limitato solo ad un range di piante suscettibili all'infezione dello stesso (Hain, *et al.*, 1985). Questa tecnica fu descritta per la prima volta nel 1980.

I geni di interesse sono clonati sul plasmide che attraverso elettroporazione viene inserito all'interno dell'*Agrobacterium*: questa tecnica usa un campo elettrico per rendere reversibilmente permeabile la membrana del batterio per facilitare l'ingresso del DNA esogeno al suo interno (Fromm *et al.*, 1986).

Dopo questa operazione, il batterio trasformato viene posto in un mezzo di coltura adatto alla sua crescita e successivamente la sospensione batterica viene utilizzata per la co-coltivazione con l'espanto vegetale (foglie, radici, cotiledoni ecc.): la trasformazione avviene quindi *in vitro* (Liu, Suh, Choi, 2000). Sarà necessario dalla singola cellula trasformata rigenerare una pianta completa.

2. OBIETTIVO DELLA TESI

La presenza di metalli pesanti all'interno del suolo è un fattore di rischio, poiché essi possono raggiungere l'uomo attraverso la catena trofica direttamente da suolo, acque sotterranee e piante (Wu et al., 2012). Infatti il consumo di piante che hanno accumulato metalli dal suolo è una delle vie principali di esposizione dell'uomo ad elementi tossici e a cadmio nello specifico (Millis et al., 2004): questo elemento è associato a danni a fegato, ossa e apparato respiratorio, sistema cardiovascolare, immunitario, ematopoietico ed epatico (Lars et al., 2000; Marano et al., 2012) ed è stato classificato come "probabile elemento cancerogeno per l'uomo" (gruppo 2A) dall'International Agency for Research on Cancer (IARC) nel 1993 poiché collegato a casi di cancro a polmoni, pancreas, reni e prostata (Lugon-Moulin et al., 2006; Millis et al., 2004).

Anche il fumo di tabacco è una delle vie principali di assunzione di cadmio da parte dell'uomo: le foglie di tabacco che hanno assorbito il metallo, per la grande capacità di questa pianta di assorbirlo e stoccarlo nei propri tessuti (Jarup, 2003; Lugon-Moulin et al., 2006), sono utilizzate nella produzione di sigarette, per cui il metallo arriva facilmente all'uomo nel momento di utilizzo delle stesse (Marano et al., 2012; Benavides et al., 2005). Uno studio ha evidenziato una possibile concentrazione di Cd di 1-2 µg per sigaretta (Nordbergm, 2003). Molti lavori hanno evidenziato la presenza di cadmio all'interno di sangue ed urina di alcuni fumatori, mostrando la correlazione, rispettivamente, con esposizione acuta e cronica (Marano et al., 2012): in altri studi i fumatori mostrano una concentrazione doppia di Cd all'interno delle urine rispetto ai non fumatori (Chaney et al., 1999).

Il problema della contaminazione da metalli pesanti può essere risolto con i sistemi di fitorimediazione: è definita come la tecnologia di bonifica biologica di terreni contaminati da metalli pesanti attraverso l'utilizzo di piante (Bettiol et al., 2012) ed è una tecnologia sempre più sfruttata poiché è un sistema di bonifica *in situ*, a basso costo e a impatto sull'ambiente nullo.

In relazione a queste premesse, l'obiettivo di questo progetto è la valutazione della capacità della pianta di *Nicotiana tabaccum* di accumulare o di escludere il cadmio dai propri tessuti fogliari, dopo un opportuno trattamento con sistemi di ingegnerizzazione.

Questo lavoro sperimentale fa parte di un progetto di ricerca più ampio che vede la collaborazione del Dipartimento di Scienze Molecolari e Nanosistemi con il Dipartimento di Biotecnologie dell'Università di Verona: incrementare la capacità di accumulo di Cd potrebbe essere utile per i programmi di fitorimediazione e quindi per la bonifica di suoli contaminati, mentre diminuire la

presenza di questo metallo pesante, tossico per tutti gli organismi viventi potrebbe essere vantaggioso per le piante coltivate a scopo alimentare o per il tabacco utilizzato per la fabbricazione di sigarette.

Le biotecnologie vegetali offrono, la possibilità del trasferimento di uno o più geni che aumentano la resistenza delle piante a stress ambientali quali la contaminazione da metalli pesanti (Bhargava et al., 2012; DalCorso et al., 2008): in questo caso, permettono di esprimere in pianta geni batterici che, nel batterio *Pseudomonas putida*, codificano le tre proteine del sistema di efflusso CzcCBA, responsabile dell'efflusso di Cd, Co e Zn e quindi della resistenza ad essi.

La valutazione della capacità della pianta di escludere il cadmio dai propri tessuti fogliari o di accumularlo è effettuata attraverso analisi del contenuto del metallo con spettrofotometria di assorbimento atomico presso il laboratorio di Ecologia Applicata e Biotecnologie Ambientali dell'Università Ca' Foscari di Venezia.

Il lavoro di tesi che di seguito viene presentato si articola in due fasi distinte: la prima parte riguarda la manipolazione genetica delle piante per l'espressione di proteine batteriche e si è svolta presso il Dipartimento di Biotecnologie dell'Università di Verona; la seconda parte riguarda il trattamento di digestione del materiale vegetale, la successiva analisi per la determinazione del contenuto di Cd nei tessuti fogliari e la valutazione della capacità della pianta di escludere o concentrare questo metallo nei propri tessuti, ed è svolta presso il laboratorio di Ecologia Applicata e Biotecnologie Ambientali.

Lo studio prevede la determinazione del Fattore di traslocazione (TF) e del Coefficiente di assorbimento biologico (BAC) delle piante wild type (WT) e delle piante transgeniche, cresciute in soluzione idroponica con concentrazione di Cd di $0.7 \mu\text{M CdSO}_4$, al fine di valutare le diverse concentrazioni del metallo nei vari tessuti delle piante.

Gli esperimenti sono svolti in condizioni controllate di laboratorio: camere di crescita in cui le piante transgeniche venivano confrontate durante lo sviluppo e per l'accumulo di Cd con piante wild type e sistemi di idroponica con soluzione contaminata con Cd a diversi livelli di concentrazione. Gli obiettivi dello studio erano quelli di valutare l'efficienza di trascrizione dei geni batterici del sistema di efflusso nella pianta.

La ricerca di base effettuata in condizioni controllate di laboratorio ha scopi conoscitivi ed indagativi ed è il punto di partenza per una successiva sperimentazione attraverso l'uso di suolo contaminato sia in vaso che direttamente in campo.

3. MATERIALI E METODI

Le piante modificate e le wild type, che possono essere definite il 'controllo', sono state coltivate in idroponica affinché fossero trattate con Cd durante la loro crescita: il sistema di idroponica è una tecnica di coltivazione delle piante che utilizza, al posto del suolo, una soluzione acquosa contenente i nutrienti necessari per la crescita. La più nota di queste soluzioni nutritive è quella definita soluzione di Hoagland (Hoagland e Arnon, 1938).

Le piante, dopo circa due settimane di trattamento con il metallo, sono state inviate al nostro laboratorio per analizzare il contenuto di cadmio nei tessuti: l'analisi è stata effettuata sia nelle piante trattate geneticamente sia in quelle non trattate (wild type) per valutare la differenza di assorbimento tra le piante transgeniche per CzcCBA e le piante controllo non trasformate.

E' stata svolta un'analisi preliminare del contenuto del metallo nei tessuti fogliari delle piante WT e di 4 linee transgeniche generate per talea da una pianta madre nella quale sono stati inseriti i geni batterici. Le piante sono germinate in terreni di coltura, trasferite in idroponica per il trattamento con il metallo, raccolte e le foglie sono state sottoposte ad analisi.

La seconda analisi, invece, è stata effettuata sia nelle foglie che nelle radici nelle piante generate dai semi delle piante precedenti. L'obiettivo era la valutazione della traslocazione e della distribuzione del metallo all'interno dei vari tessuti della pianta. I semi sono germinati in terreni di coltura, le piante cresciute sono state trasferite in serra per il trattamento con Cd in idroponica e successivamente sono state raccolte, separando radici dalle foglie, essiccate, macinate e inviate al nostro laboratorio per l'analisi.

3.1 IDENTIFICAZIONE E CLONAGGIO DEI GENI CzcA, CzcB e CzcC IN *P. putida*

Il gruppo di lavoro della professoressa Antonella Furini del Dipartimento di Biotecnologie dell'Università di Verona si è occupato dell'isolamento dei geni CzcA, CzcB e CzcC da *P. putida* con tecniche di PCR, utilizzando le sequenze geniche presenti in banca dati e disegnando i primer al 5' e 3' di ogni sequenza come indicato nelle figure 7, 8 e 9.

ATGTTTGAACGTATCATCAGATTCGCCATCGAGCAGCGCATCGTAGTAATGATCGCTGTTCTGATCATGGCGGGTATCGGT
ATCTACAGCTATCAAAAGCTGCCATCGATGCGGTACCCGATATCACCAACGTCACAGGTGCAGATCAACACTGCAGCGCT
GGTTACTCGCCCTTGAAACCGAACACGGATCACGTTTCCAGTTGAAACGGCCATGGCCGGTCTCCCGGGTCTTCAGCAG
ACCCGTTCCCTGTCTCGCTCTGGCTGTCTCAGGTACCCGTGATCTTCAAGGATGGCACTGACATTTTCTTGGCCGCCAG
TTGATCAACGAGCGGCTGCAGGTTGCGAAGGAACAGCTGCCAGACGGTGTAGAGGCCGTATGGGTCCGGTATCTACCGGC
CTCGCGAGATCTTCTGTGGACTGTTGAAGCCGAAGATGGCGGGTCAAAGAGGACGGTACGCCGTACACCCCAACCGAC
CTGCGCGTATCCAGGATTGGATCATCAAGCCTCAGCTGCGCAACGTCGCCGGTGTGGCCGAGATCAATACCATCGGCGGC
TATGCCAAGCAGTTCTGGTTGCGCCAGATCCAAAGCGCCTGGCTACCTACAAGCTGACACTCAATGACCTGGTCGCAGCG
TTGGAAAGTAACAACGCTAACGTCGGCGCCGGCTACATCGAGCGTAATGGTGAGCAGTTGCTCATCCGTGCGCCGGGCCAG
GTAGGCAACATCGAAGACATCGCCAACATCGTGATCACAGTGTGGATGGTGCACCGATTGCGATCAGCAGCGTTGCTGAC
GTCAGCATCGGTAAGAGCTCCGTACAGCGCTGTACTGAGAAGCGCCGCGAAGTGTGCTCGGTACCGTGTTCATGCTG
ATTGGTGAAGACAGCCGTACCGTATCTCAAGCTGTGCGCGCAAACCTGGCGGACATCAACCGCACCTGCCAAGGGCGTG
GTGGCTGTGACCGTTTACGACCGTACCAACCTGGTTGAAAAAGCCATCGCGACGGTGAAGAAGAACCTGGTGAAGGCGCG
ATCTGGTTATCGCCATTCTGTTCCTGTTCCTCGGCAACATCCGTGCGGCACTGATCACCGCATGGTGTATCCCGTGTCC
ATGCTGTACCTTCACAGGCATGTTTAAACAACAGGTCAGTGCCAACTTAATGAGTTTGGGGGCACTCGACTTCGGCATC
ATCTGCGACGGTGGCCGGTTATTGTAGAAAACCGCATCCGTGACTCGCTCATGCGCAACATAAGCATGGCCGCATGCTC
ACCAAAACCGAACGCTTCCACGAGGCTTTGCGCGGGCTCGAGAAGCTCGCGCCCGCTGATCTTCGGTCAGCTGATCATC
ATGGTGGTGTACCTGCGCATCTTCGCCCTCACCGCGTGCAGAGGAAATGTTCCACCCGATGGCTTCACCGTTGTGATG
GCGCTGCTGGGTGCAATGGTCTGTCCGTTACCTTTGTTCTGACGCTATTGCCATGTTGCTCACTGGCAAGGTGAAGGAA
GAGGAAGCGTGGTCAATGCGCACAGCTCGACTGCGCTATGAGCCGGTCTTCAATGGGTGCTGGGACACCGGAACATCGCT
TTCTCGCCGCTGTAGCCTTGGTCGTGCTGAGCGGTGACTGGCAAGTCGATGGGTAGCGAGTTCAATCCCAAGCCTCAGT
GAGGGCGACTTTGCGCTTCAGGCCATGCGTGTGCTGGAACGAGCCTCACTCAGTCCGTCGAGATGCAGCAGCGCTGGAG
AAAGCGTAATAGCGCAGGTGCCTGAAGTTGAGCGGATGTTGCGACGCTCGGGTACCAGGAAATTCATCTGACCCGATG
CCGCGAACCGCTCCGACGCCTACATCATGCTTAAGCCTCAGGACCAGTGGCTAACCCCAAGAAGCCCGCGATGAAGT
ATTGCTGAAGTGCAGAAAGCCGAGCGGGTGTCCAGGAAGCAACTATGAGTTGTCACAGCCAATCCAGCTTCGTTTCAAC
GAGCTGATTTCCGGCGTACGTAGTGACGTCGCTGTGAAGTCTTCGGCGATGACATGGACGTGCTTAAACAACCCGCAAC
AAGATCGCGCAGCGCTCAAAGCGTACCAGGCTCGTCGGAAGTGAAGTTGAACAGACATCCGGCCTGCCGGTGTGACT
ATCAACATCGACCGCAAAAGCAGCAGCTACCGCCTGAATATCGCGGATGTTCAGAACTCGATCGCTATCCCGTGGGT
GGCCGCCAGGCCGACGCTGTATGAAGCGACCGCCGATTCGACATGGTTGTGCGCCTGCCAGAGACCGTCCGCAACGAC
GTAGCGGGTATGTCCAGCTGTCTATCCCGTACCTGCCAATGCGGCTCAGGGTGCCAATCAGATCGGCTTCATCCCGCTG
TCCAGGTCGCTAATCTGGACCTGCAATGGGCCGAAACCAATCAGCCGCAAAACGGCAAACGCTGTGGTCAATCGTTAGT
GCCAACGTTGAGGCCGACCTGGGGTCTTCTGTTGAGGAGCGACCGCTTCGCTGGATAAGAAGGTGCAAAATCCCTGCG
GGCTACTGGACGACCTGGGGTGGCCAGTTCGAGCAGCTGCAATCGGCAGCCAAACGCTGCAGATCGTTGTCCAGTCCGC
TTGCTGCTGGTATGACCTTGTGTTCCTGATGTTCAACAACCTGAAGGACGGCATGCTGGTCTTACCCGGTATTCATTTC
GCACTACCCGGTGGTGTCTGGCGCTCTGGCTGCGGGATATCCCACTGTCGATCTCGGCAGGTGTGGCTTCATCGCGCTG
TCCGGTGTTCAGTACTGAACGGCTGGTGTGATTGCCTTCATCCCGGGCTAAGGGAGGAGGGACGAACGCTCAGGCAG
GCAGTCGATGAAGGCGCATTGACCCGCTGTCGACCTGTTCTGATGACAGCCTTGGTAGCGTCTTGGGCTTCATCCCGATG
GCTTTGGCCACCGGTACCCGGTGCAGAAGTTGAGCGCCACTGGCGACTGTGGTAATTGGCGGGATCCTGTCTCCACCGCA
TTGACCTTGTGGTACTGCTGCCCTGTATCACTGGGCACACCGCAAGGATGAAGACGGCGAC**GAGGCCGAAGTGGT****TAGC**
TAA

Figura 7: Sequenza nucleotidica del gene CzcA

ATGGATAACAAACGCAAGATCGCCCTCGCGGTAGCCGCTGTGGCAGCCCTCGGATTTGGCAGCCTTGCCTGGAACAACAGT
 TCCGGACAGCAGGCCCGCCAGTACCCGCGAGCATGGCGCTAACGATGGCCATGGCGACGAAAAGAAAGCCGATCTGCCGCC
 AAAGAGGAAGGTGATGAGGGCCATGGTGAAGAAGGCCACAGCGAAGAGGGCGGTGAAGAAGAGGGCAAGCTGACGCTCAGC
 GCTGAACAGATCAAGGCAGCCGGCGTTGCCCTGGAAGCTGCAGCGCCTCGTGATCTCGGTACCGTCTGTGAGCTTCCCAGGCC
 GAAATTCGCTTCGATGAAGACCGTACTGCCCATGTGGTTCTCTCGTGTCTTGGCGTTGTTGAGGGCTGTCCAGGCCAACCTA
 GCGGAGACGGTCAAGAAAGGCCAAGTCTCTCGCGGTAATCGCCAGTGCAGCAGATCTGACCTGCGCAGCGAACCAACAGGCC
 GCACAGCGTCGCGTCGAACCTGGCGCGTGTGACCTTCGAGCGTGAAAAGCAGCTGTGGCAGGACAAGATTTCCGAGAGCAA
 GACTACCTCCAAGCACGCCAAGCGCTGCAGGAAGCAGATATCTCCTTGGCCAAACGCCAAGCAGAAGTTCGGCGCAATCGGT
 GCCTCGGTTAACTCCGTTGGCGGTAATCGTTACGAGCTCCGCGCTCCCTTCGACGCCGTGGTAGTGGAGAAACACCTGACC
 GTTGGCGAAGTCGTTAGCGAGGGCACCAACGCCCTTCATCCTTCCGACCTGAACCAAGTCTGGGCAACCTTCGCGTCCC
 CCTACCGATCTGGGCAAGGTCACGACTGGTCTGCGGTGAAAGTCTCTTCGCTGATATGAACGTCGAGGTGGAAGGGAAG
 GTGGGTTATGTGGCAGCCTGCTGGGCGAGCAAAACCGTGCAGTACTGTCCGCGTACCTTGACCAACCCCAACGGCGCC
 TGGCGTCCAGGCCCTGTTCGTGAACATTGCGGTCACTTCCCAGACCGATCGAGTTGCCGTAGCGGTCCCTGAGCACGCGGTG
 CAGACCGTTGAAGACAATCCTCGGTATTCTGACGACCCAGATGGCTTTGACACCCGCCCCGGTAAACTGGGCCGCCGC
 GACAATGGGTACGTGGAATCATCGACGGTATTGGAGCCGGCGCCAGGTAGCAACCAGTGGCAGCTTCACTCAAGTCC
 GAGCTCGGCAAGGCTT**CTGCCGAACACGGTCACTGA**

Figura 8: Sequenza nucleotidica del gene CzcB

ATGGCGCTGCAGCCCTTGCCAAAGCATCAGCTTGCCCCAGGCGCTTTCGACGCCATGGATGCCAACCCCTGACCTGGCC
 GCGGCCAGGCAAGAGATTGGCATCGCTGATGGTGTCTCGCAAGCAGGCCCGGGCTTATCCCCAACCCCAACAATTTCTGACGAC
 GTGGAAGACACCCGTCGTAACACCAGCAGCAGCAGCCGTGCTGCTTAGCCAGACCCCTGGAGCTGGGTGGTAAGCGGGGAGCT
 CGTGTGACGTCGCCACTTACGGGCAGACCGCCGACAGCTGGAGTTGGACCGTCCGCTGAACGGTCTGCGTGCAGATGTC
 GTGCAGGCCCTTCTACGCCGCTTGGCGGCCAGACTGGCCCTGACCTGGCCAAGCAATCTCTTGAACGACTGAGCGCGGT
 CTCGCAATCGTCGATGGCCGTGTTGCGCAGGTAATCGTCCCCGTTAGAAGCCACCCGCCCCAAGTGAATTTGCCGAA
 GCTAAGCTGCAAGTTTCGACGTGCCGAAACGAAAAGAGCAGCAGCTTACGACGAGCTCGCTCAAATTACGGGGAGCTCGGTC
 ACCGTTCTTTGACAGACTCGAATCGCCAATCTCTCCCGGACTCCCTCCGACAGTGAAGAAGTCTGGCAAGCTCGAT
 CAGACCGCAGAAATGCGCCAGGCCGTGGTTTCAGATCGACAAGAGCGACGCTCGCTCGGTTTCAGAGAAAGCTCAGCGTATC
 CCGAACCTTACCCTCAGCGTAGGTAGCCAGTACGACCGCTCTGTGCGCGAGCGAGTCAACACTGTGGGCTGTCTATGCTT
 TTGCCGCTGTTCGATCGTAACCAGGGCAACATCTTTCCGCTTCTCGGCGTGCAGATCAGGCCCGAGACCAGCGCAATGCT
 GTGGAGCTGCGCCTGCGCACCGAAACCCAAACCGCGTTGAACCAAGTGGTCCACCGCCATGCAGGAGGTGAGTCTACGAC
 AAGACCAATTCGCGCTCAGCCCAACAGCCGTAGATACCGCAACCCGCGGCTTCGAGATGGGCAAAATTCGGCTTACGAA
 GTGCTGGATGCCAGCGACCTTGATCGTCTGCTGGCCAAATACCTGAATCGTTGGCAGCGGCGACCAATGCGCGTGGC
 CAGGTGAAAAGGTT**TATGGCGAAGTCGGCTCAACCGCGGCACTCGCTGA**

Figura 9: Sequenza nucleotidica del gene CzcB

3.2 MUTAZIONE DELLA SEQUENZA CzcA

Prima di inserire i geni nei plasmidi è necessario aggiungere il sito di Kozak: questa sequenza permette la traduzione della proteina nel sistema eucariotico. La sequenza di Kozak è una serie di nucleotidi presente vicino al codone AUG di inizio che permette il riconoscimento del gene batterico per l'inizio della trascrizione negli eucarioti.

Nei geni per la proteina B e C la sequenza era già presente, mentre è stata inserita nel gene codificante la subunità A: la seconda tripletta TTT del gene è stata modificata con la sequenza GCT, per cui nella sequenza aminoacidica, la fenilalanina è stata sostituita con la alanina.

Gene	Sequenza	Sequenza aminoacidica	Sequenza modificata	Sequenza aminoacidica modificata
czcA	ATG TTT GAA	M F E	ATG GCT GAA	M A E
czcB	ATG GAT AAC	M D N	ATG GAT AAC	M D N
czcC	ATG GCG CCT	M A P	ATG GCG CCT	M A P

Figura 10: Modificazione della sequenza genica dei gene CzcA codificante la sub unità A del sistema di efflusso e conseguente modificazione della sequenza aminoacidica

3.3 CLONAGGIO DELLE SUB UNITA' PROTEICHE DEL COMPLESSO CzcCBA IN VETTORI DI ESPRESSIONE

Le sequenze sono quindi state clonate singolarmente in vettori (o plasmidi) per l'espressione in pianta. Come indicato nella figura 11 a, b e c, le sequenze codificanti per CzcA, CzcB e CzcC sono state clonate a valle del promotore costitutivo CaMV35S, promotore riconosciuto dagli organismi eucariotici per la trascrizione genica.

Nello specifico ogni cassetta contenente il promotore e la regione codificante del gene viene inserita nel T-DNA del plasmide già provvisto del gene per la selezione in pianta, ed il plasmide è inserito singolarmente in una cellula di *Agrobacterium tumefaciens*.

Ogni T-DNA contiene:

- ❖ right border e left border (di colore rosa) che ne delimitano i bordi all'interno del plasmide e sono costituiti da circa 25 paia di basi;
- ❖ la sequenza nucleotidica codificante le singole subunità proteiche del sistema di efflusso (colore giallo e arancione): nello specifico il gene PpCzcA ha 3162 basi nucleotidiche, il gene PpCzcB ne contiene 1251 mentre il gene PpCzcC ne contiene 1185;
- ❖ il promotore 35S e il terminatore NosT per il riconoscimento da parte della RNAPolimerasi eucariotica del sito di inizio e di fine della trascrizione del gene;
- ❖ Il gene codificante la resistenza all'igromicina e alla kanamicina (colore azzurro e verde) rispettivamente per il T-DNA contenente il gene per la subunità A, B e C.

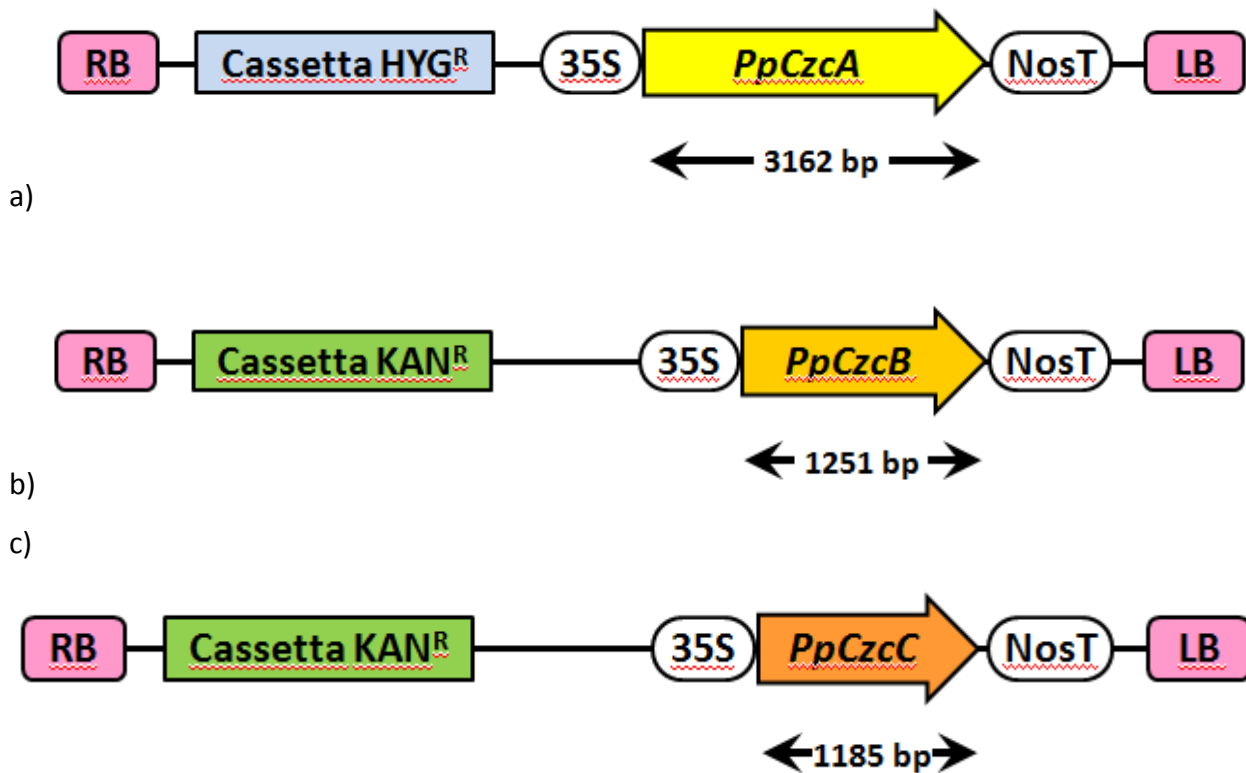


Figura 11: Costrutti di T-DNA inseriti nei tre plasmidi e quindi nella pianta di tabacco attraverso *Agrobacterium*

3.4 INSERIMENTO DEI PLASMIDI ALL' INTERNO DI *A. tumefaciens*

I plasmidi sono inseriti nel batterio attraverso elettroporazione.

Come mostra la figura 12, le cellule del batterio sono poste in soluzione con i plasmidi che si vogliono inserire al suo interno, nella cuvette è quindi creata una differenza di potenziale e l'impulso elettrico permette alla membrana di far passare al suo interno i nucleotidi poiché apre temporaneamente i pori (Campbell, 2010). L'impulso elettrico conferito in un range di tempo molto stretto (livello dei μ s) rende la membrana più permeabile senza danneggiarla, per cui il DNA esogeno che è ancorato alla membrana esterna del batterio, è in grado di attraversarla (Neumann et al., 1982).

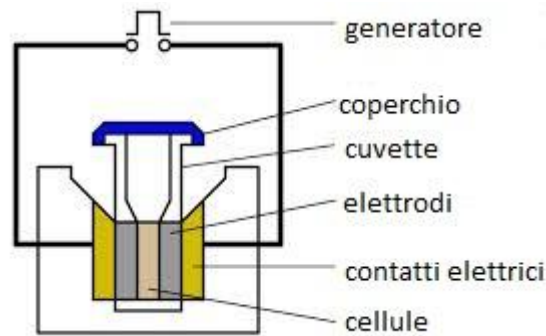


Figura 12: Sistema per elettroporazione

Neumann et al. (1982) definiscono le condizioni ottimali per un sistema di elettroporazione efficiente: a livello generale si effettuano 3-4 impulsi di circa 8 kV/cm di differenza di potenziale in pochi μ s (5-6); la temperatura rimane intorno ai 20° C., e ci vogliono circa 10 minuti di tempo per l'entrata del DNA esogeno nella cellula. Le condizioni ottimali variano comunque in relazione al tipo di cellula e alla grandezza (Neumann et al., 1982).

3.5 TRASFORMAZIONE DI *N. tabacum* ATTRAVERSO CRESCITA CON *A. tumefaciens*

Dopo questa operazione, i batteri con i plasmidi portanti i singoli geni sono stati inseriti in un terreno con nutrienti ed ormoni e a loro volta co-coltivati con espianti di foglie di tabacco per la loro trasformazione in vitro (Liu, Suh, Choi, 2000): l'utilizzo di questo batterio è un sistema naturale di trasferimento di materiale genetico all'interno di una pianta, ma è limitato solo ad un range di piante suscettibili all'infezione dello stesso (Hain, et al., 1985). La trasformazione avviene intorno tra 18 e 22° C, la temperatura ideale per la trasformazione del tabacco è, infatti, intorno ai 22 ° C (Alimohammadi et al., 2009), e alternando 16 ore di luce e 8 di buio.

Lo schema seguente evidenzia i passaggi essenziali per l'inserimento di geni batterici all'interno di una pianta attraverso l'utilizzo di *Agrobacterium tumefaciens*.

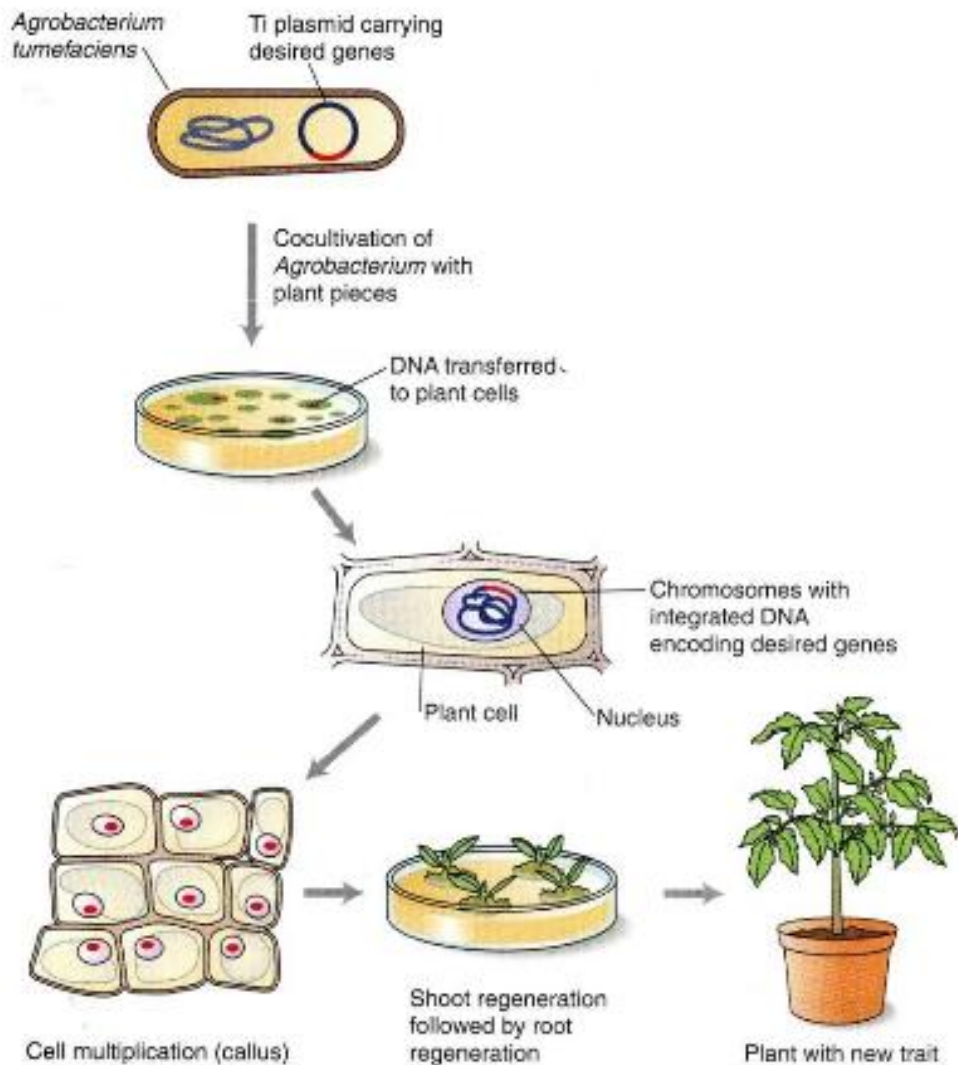


Figura 13: Schema della trasformazione di espianti fogliari di tabacco con *Agrobacterium*

La selezione delle piante trasformate avviene attraverso l'utilizzo di kanamicina e igromicina.

Nel terreno per la crescita delle piante transgeniche per il gene CzcA è aggiunta l'igromicina al fine di selezionare solo le piante trasformate. Allo stesso modo è stata aggiunta la kanamicina nel mezzo di crescita per la selezione delle piante transgeniche per CzcB e CzcA.

La crescita *in vitro* di espianti fogliari richiede la presenza di ormoni in rapporti ben precisi che ne favoriscono la crescita e che sono in grado di intervenire nella regolazione della divisione cellulare: auxina e citochinine.

3.6 ANALISI DEL LIVELLO DI TRASCRIZIONE CON REAL TIME PCR E INCROCIO DELLE PIANTE

Nel corso dello studio del gruppo di lavoro della dottoressa Furini, sono state effettuate le analisi con Real Time PCR su mRNA per la valutazione del livello di trascrizione dei singoli geni all'interno della pianta: le piante che hanno mostrato la più alta trascrizione dei singoli geni sono state utilizzate per i successivi esperimenti.

Nello specifico, le piante contenenti il gene per la proteina CzcA sono state incrociate con le piante contenenti il gene codificante la proteina CzcB e, a sua volta, la pianta risultante è stata incrociata con la pianta per il gene codificante per la proteina CzcC, al fine di ottenere piante transgeniche per CzcA/CzcB/CzcC. L'incrocio avviene attraverso impollinazione artificiale, cioè attraverso l'uso di appositi pennelli che trasferiscono il polline sugli stigmi femminili.

Lo schema seguente evidenzia l'incrocio delle piante contenente i singoli geni. per ottenere un'entità contenente tutti e tre i geni del sistema di efflusso.

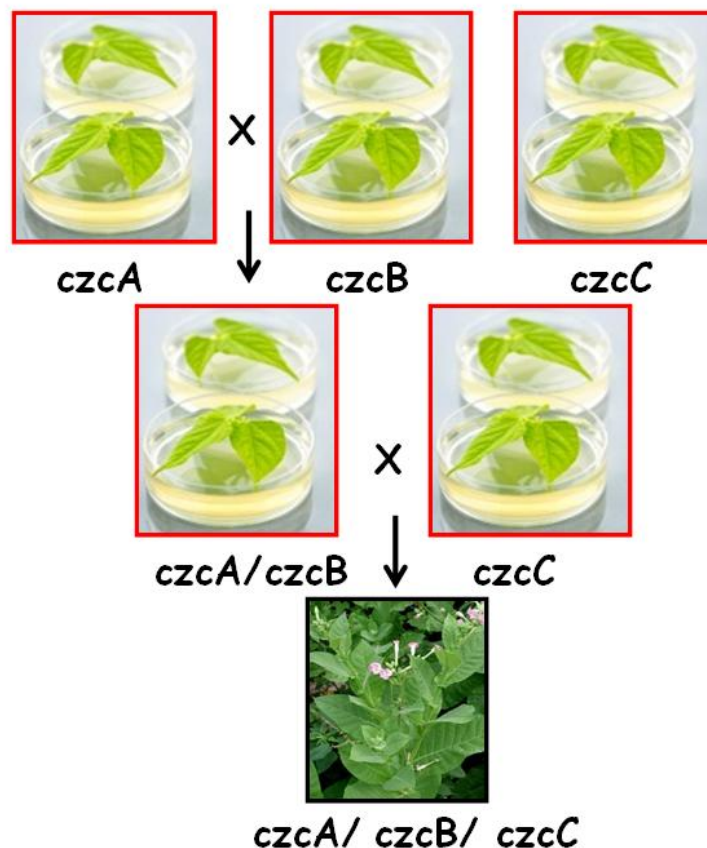


Figura 14: Schema dell'incrocio delle piante contenente i singoli geni

3.7 CRESCITA DELLE PIANTE IN IDROPONICA E TRATTAMENTO CON CADMIO

Dalla pianta contenente i tre geni sono stati ottenuti tre cloni: alcuni espianti fogliari sono stati messi in terreno di coltura e sono stati fatti crescere *in vitro* grazie all'utilizzo di ormoni (auxina e citochinine) in rapporti ben precisi che ne favoriscono la crescita intervenendo nella regolazione della divisione cellulare.

I germogli, al raggiungimento di 5-7 cm di altezza, sono stati posti in idroponica con la soluzione di Hoagland per circa due settimane.

Nel sistema di idroponica utilizzato nella prima parte dell' esperimento, le piante sono rette da una struttura ricoperta di perline di perlite e le loro radici sono immerse nella soluzione che fornisce i nutrienti necessari alla crescita, inoltre è stata fornita aria attraverso una pompa apposita (figura 15).

Dopo il periodo di acclimatazione di circa due settimane, alla soluzione circolante è stato aggiunto un quantitativo noto di cadmio, nello specifico $0.7 \mu\text{M}$ di CdSO_4 , per un periodo totale di trattamento di 22 giorni.

Le piante potevano quindi assorbire direttamente dalle radici il metallo, che è presente in soluzione acquosa in forma ionica.

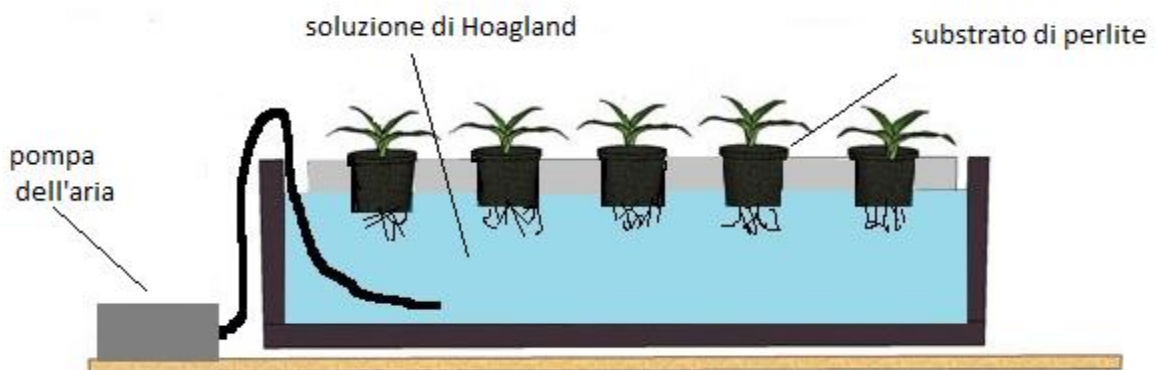


Figura 15: Schema del sistema di idroponica utilizzato nel primo esperimento

Nel sistema di idroponica utilizzato, invece, per il secondo esperimento, cioè per le piante derivanti dai semi dalle precedenti, il substrato di perlite è stato sostituito da strutture in plastica rigide con il fine di tenere in posizione retta le radici: questa opzione è stata scelta affinché le radici non crescessero nella perlite ma si sviluppassero in soluzione acquosa facilitandone la successiva raccolta per la determinazione del contenuto di metallo (figura 16).



Figura 16: Sistema di idroponica utilizzato nel secondo esperimento

Ogni singola pianta è inserita nel sistema di idroponica specifico con 860 mL di soluzione di Hoagland ed è stata trattata singolarmente con $0.7 \mu\text{M CdSO}_4$ le piante sono state raccolte dopo 14 giorni di trattamento.

Sono stati separati i germogli dalle radici: queste ultime sono state trattate per circa 10 minuti con EDTA e CaCl_2 (5mM) per eliminare il Cd adsorbito alle pareti dell'apparato radicale.

Le foto 17 a, b, c e d mostrano una pianta per linea transgenica al momento della raccolta.



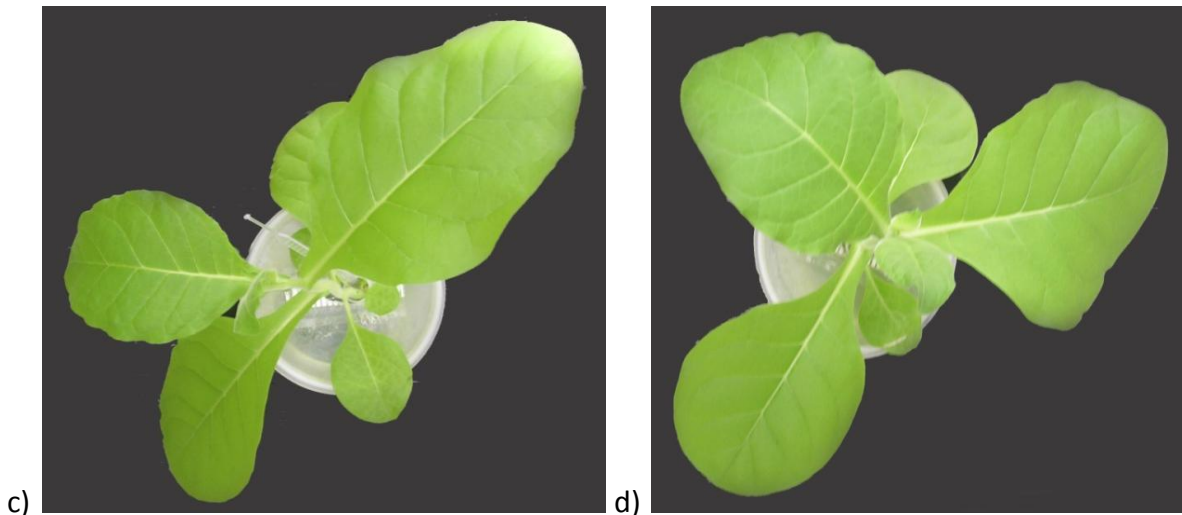


Figura 17: Una pianta per linea transgenica al momento della raccolta: a) wild-type, b) linea 6, c) linea 8, d) linea 9;

3.8 DIGESTIONE DEL MATERIALE VEGETALE

Questa seconda parte di lavoro è stata eseguita presso il laboratorio di Ecologia Applicata e Biotecnologie Ambientali del Dipartimento di Scienze Molecolari e Nanosistemi dell'Università Ca' Foscari di Venezia. Alla digestione del materiale vegetale, è seguita l'analisi della concentrazione di cadmio con spettroscopia di assorbimento atomico.

Tutte le diluizioni sono state effettuate con acqua ultrapura Milli Q- ditta Millipore (Mi) e tutta la vetreria è stata inserita in bagno acido (HNO_3 0.6 M) per 24 ore e risciacquata con acqua distillata Milli Q, secondo quanto descritto in letteratura (Batley and Gardner, 1977).

Le foglie di tabacco sono state seccate a 60° per 36 ore, macinate e omogeneizzate per ottenere un campione significativo e rappresentativo e per ogni campione è stato determinato il peso secco.

I campioni seccati sono stati quindi sottoposti ad analisi per la determinazione della concentrazione dei Cd nella biomassa.

Un'aliquota del campione è sottoposta a digestione con acido concentrato e acqua ossigenata: questo processo è il più usato per il pre-trattamento di campioni di materiale organico per la determinazione della loro concentrazione di metalli (Gonzalez et al., 2009; P. Bermejo-Barrer et al., 2000; Tinggi et al., 1992). L'obiettivo di questa operazione è portare in soluzione il Cd attraverso la completa digestione della biomassa vegetale (Hseu, 2004).

È stata messa a punto una digestione con acido nitrico e perossido di idrogeno, descritta da molti lavori come un valido trattamento per la digestione completa di materiale organico vegetale

(Argese et al., 2005; Bettiol et al., 2008; Castro et al., 2009; Hseu, 2004; Rodushkin and Ruth, 1999; Sastre, et al, 2002; Soylak, et al., 2007).

Tale trattamento è stato effettuato con il digestore a microonde Cem Discoveri/SPD: i campioni presenti all'interno dei contenitori di pyrex, sono digeriti completamente per un tempo totale di circa 20 minuti ciascuno.



Figura 18: Digestore a microonde Cem Discoveri/SPD

I campioni sono posti all'interno di contenitori di pyrex di 35 mL: il contenitore è inserito all'interno di una struttura, una camera di digestione, in cui vengono aumentate nel tempo la temperatura e pressione fino al raggiungimento della totale digestione del tabacco, secondo un trattamento ottimizzato per le foglie di tabacco.

A circa 0.1 g di campione sono stati aggiunti: 2 mL di H₂O, 3 mL di HNO₃ e 3 mL di H₂O₂: la soluzione ha subito un trattamento di digestione secondo il seguente programma:

T_{MAX} : 175 °C

P_{MAX} : 400 PSI

Tempo: 5 minuti di raggiungimento

12 minuti di lavoro

10 minuti (ca.) di raffreddamento

I campioni sono stati raffreddati con aria compressa e sono stati portati a volume di 25 mL in matracci di vetro; successivamente sono stati trasferiti in contenitori di polietilene e risposti in frigo fino al momento dell'analisi.

3.9 ANALISI DEL CONTENUTO DI METALLI CON ASSORBIMENTO ATOMICO

La determinazione della concentrazione di Cd nei tessuti fogliari sono state effettuate con assorbimento atomico Spectr AA 250 PLUS Varian nelle configurazione con fornetto di grafite: questa tipologia di atomizzazione è usata per la determinazione delle concentrazioni di metalli dell'ordine dei $\mu\text{g/L}$, mentre per la determinazione delle concentrazioni dei ppm si utilizza la configurazione in fiamma (Tinggi et al., 1992).

Il protocollo di analisi ottimizzato per il metallo in esame prevede il raggiungimento delle seguenti temperature all'interno del fornetto di grafite: 250° C per l'incenerimento della matrice e 1800° C per l'atomizzazione del metallo.

Si utilizza una lampada a catodo cavo che emette una radiazione luminosa alla lunghezza d'onda assorbita dal cadmio, 228,8 nm per la precisione, la radiazione passa all'interno del fornetto di grafite dove è presente il campione e viene assorbita dal metallo.

Dalla differenza tra l'energia luminosa emessa dalla lampada e quella assorbita dal metallo si ricava, quindi, la concentrazione del metallo all'interno del campione.



Figura 19: Assorbimento atomico Spectr AA 250 PLUS Varian

Il metodo per la determinazione della concentrazione di cadmio nei tessuti è stato calibrato attraverso utilizzo di standard ionici di concentrazione 1000 mg/L della ditta Merck.

3.10 CONTROLLO DI QUALITA' DEL DATO

La valutazione dell'affidabilità e della riproducibilità del protocollo di digestione e di analisi è stata effettuata attraverso l'analisi di un campione certificato: è stato utilizzato campione BCR di *Olea europaea* n. 62 della Commission of the European Communities di concentrazione di Cd $0.12 \mu\text{g}/\text{kg} \pm 0.02$ (di peso secco) ed è stata effettuata una digestione ed un'analisi in tripla replica.

Il protocollo di digestione è risultato affidabile e riproducibile, in quanto dalle analisi risulta una concentrazione di Cd di $0.14 \mu\text{g}/\text{kg} \pm 0.01$ (di peso secco).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 RISULTATI DELL' ANALISI DEI CONTENUTI DI Cd NEI TESSUTI FOGLIARI

La tabella 1 e il grafico della figura 20 mostrano i risultati dell' analisi del contenuto di cadmio all'interno dei tessuti fogliari delle piante del primo esperimento: in ogni linea transgenica sono presenti 3 piante (2 nel caso della linea 8) generate per talea da quella di incrocio contenente tutti e tre i geni del sistema di efflusso.

I campioni 1-11 sono le foglie delle piante di tabacco nelle quali sono stati inseriti i geni che codificano per le proteine del sistema di efflusso CzcCBA: il contenuto di Cd espresso in mg/kg di peso secco (p.s.) mostra che il sistema di efflusso è in grado di escludere dalla foglia il metallo al contrario delle piante wild type usate come controllo (campioni 12-14).

Come si evince dalla tabella 1, in media le piante transgeniche hanno una concentrazione di Cd di 4.3 mg/kg p.s, mentre le piante WT stoccano in media 58.1 mg/kg p.s. : il contenuto di metallo nelle foglie delle piante WT è circa 13 volte superiore rispetto alla concentrazione osservata nelle piante transgeniche.

Tabella 1: Contenuto di Cd all' interno delle foglie di *N. tabacum* ingegnerizzata (campioni 1-11) e wild type (campioni 12-14). (Concentrazione espressa in mg/kg di peso secco).

campioni	mg/kg p.s.	media (mg/kg p.s.)	SD%
1 L2I	3,6		
2 L2II	4,2	3,9	7.7
3 L2III	3,9		
4 L6I	4,7		
5 L6II	4,4	4,4	5.7
6 L6III	4,2		
7 L8II	4,0		
8 L8III	4,3	4,2	5.1
9 L9I	4,1		
10 L9II	4,9	4,7	10.5
11 L9III	5,0		
12 WTI	68,7		
13WTII	50,5	58,1	19.8
14 WTIII	47,4		

La deviazione standard % (SD%) mostra una buona correlazione tra piante della stessa linea transgenica (L2, L6, L8): ogni linea deriva da una stessa pianta iniziale di cui sono state fatte tre talee (due nel caso della linea 8) per cui ogni linea rappresenta tre piante con stesso genoma.

Solo per la linea transgenica 9 la SD% risulta essere il doppio delle altre.

Il contenuto di cadmio nelle piante wild type, campioni 12-14, invece, varia molto da una pianta all'altra. Si può attendere un risultato simile, poiché sono piante fisiologicamente diverse, quindi con sistemi di resistenza e tolleranza leggermente diversi, e non risultano 'standardizzate' e 'uniformate' da trattamenti genetici.

I risultati confermano che la pianta in esame è in grado di accumulare il metallo nei tessuti fogliari: alcuni lavori mostrano concentrazioni medie di Cd di 7 mg/kg p.s. nelle foglie. Questa concentrazione è minore dei valori appena presentati, ma è necessario sottolineare che questa concentrazione media è riscontrata in piante cresciute in terreno contaminato con Cd ,e non in idroponica dove il metallo è più biodisponibile (Jarup, 2003; Lugon-Moulin et al., 2006).

Anche la figura n. 18 mostra i risultati delle analisi del contenuto di cadmio delle foglie nelle analisi preliminari: le linee arancioni mostrano le concentrazioni dei singoli campioni mentre le linee azzurre sono le medie di ogni linea transgenica e delle piante WT.

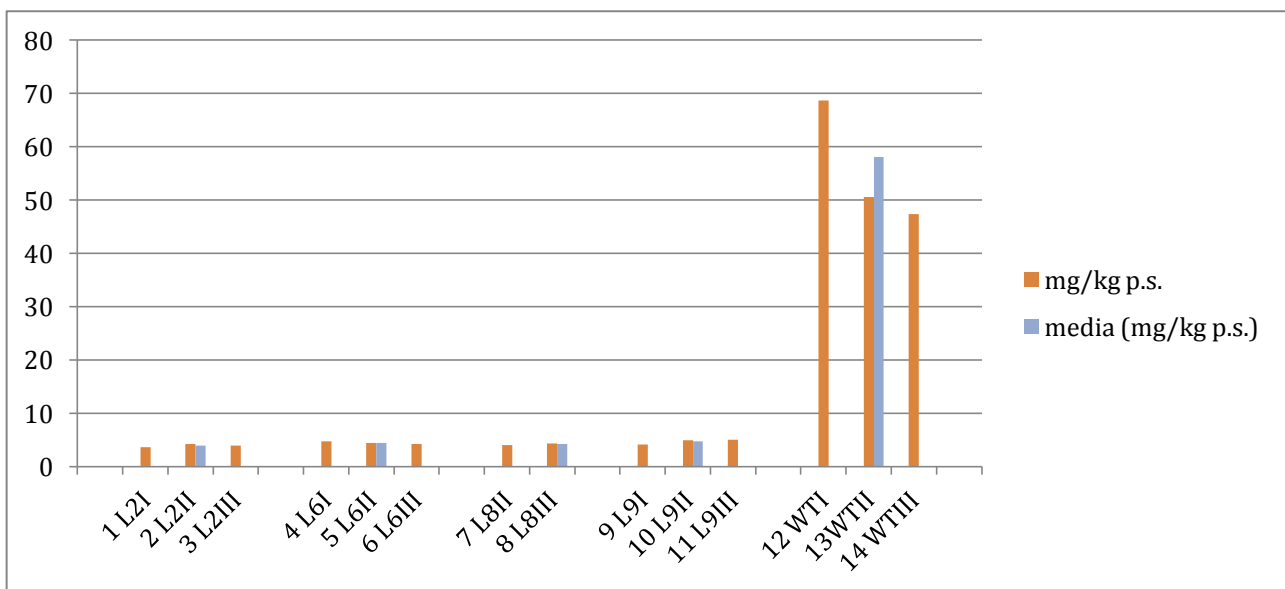


Figura 20: Contenuto di Cd all' interno delle foglie di *N. tabacum* ingegnerizzata (campioni 1-11) e wild type (campioni 12-14). (Concentrazione espressa in mg/kg di peso secco).

4.2 RISULTATI DELL' ANALISI DEI CONTENUTI DI Cd IN FOGLIE E RADICI

Lo studio successivo ha riguardato le piante generate dai semi delle piante dell'esperimento precedente.

Nello specifico è stato valutato il contenuto di cadmio presente all'interno dei tessuti fogliari e nei tessuti radicali. In questo caso sono stati analizzati i pool di 3 linee transgeniche (6, 8 e 9) e per ogni pool sono state effettuate 3 repliche di analisi (1, 2 e 3), mentre per le radici sono state effettuate 2 repliche (1 e 2) a causa della scarsa quantità di materiale ottenuto.

Tabella 2 : Concentrazione di Cd in mg/kg di peso secco sia in foglie che in radici di piante ingegnerizzate (linea 6, 8 e 9) e di piante WT (tre repliche per ogni linea per le foglie, e due repliche per ogni linea per le radici).

campioni	mg/kg p.s.	media (mg/kg p.s.)	SD%
foglie			
L 6.1	136,8	144,3	9.3
L 6.2	136,3		
L 6.3	159,7		
L 8.1	123,8	122,4	1,1
L 8.2	121,2		
L 8.3	122,2		
L 9.1	143,2	139,8	3.3
L 9.2	141,8		
L 9.3	134,6		
WT 1	135,3	125,2	10.1
WT 2	129,3		
WT 3	111,0		
radici			
L 6.1	324,1	326,2	0.9
L 6.2	328,3		
L 8.1	191,6	196,4	3.4
L 8.2	201,1		
L 9.1	302,3	295,5	3.2
L 9.2	288,7		
WT1	145,7	152,7	6.4
WT2	159,6		

La tabella 2 mostra che le linee transgeniche hanno accumulato nelle foglie una concentrazione circa 2 volte inferiore rispetto alle radici. Nello specifico, in media, le linee transgeniche accumulano 135,5 mg/kg di peso secco nelle foglie, mentre nelle radici la concentrazione è, in media, 272,7 mg/kg di peso secco.

Le deviazioni standard % (SD%) mostrano una buona correlazione tra le repliche delle analisi nelle foglie di ogni linea, a dimostrazione dell'affidabilità del protocollo di digestione ed di analisi adottato.

E' necessario sottolineare che nel complesso la linea transgenica 8 ha accumulato, sia nelle radici che nelle foglie, un quantitativo minore rispetto alle altre linee transgeniche: questo può essere dovuto a caratteristiche fisiologiche, conferite dalla presenza del transgene, intrinseche delle piante appartenenti a quella linea.

Le piante wild type, invece, hanno accumulato una concentrazione leggermente superiore nelle radici rispetto alle foglie: in media 125,2 mg/kg di peso secco nelle foglie e 152,7 mg/kg di peso secco nelle radici.

Anche i grafici della figure 21 e 22 mostrano la concentrazione di Cd rispettivamente nelle foglie e nelle radici dei diversi campioni. Le linee blu sono le concentrazioni di ogni campione e le medie sono rappresentate dalle linee arancioni.

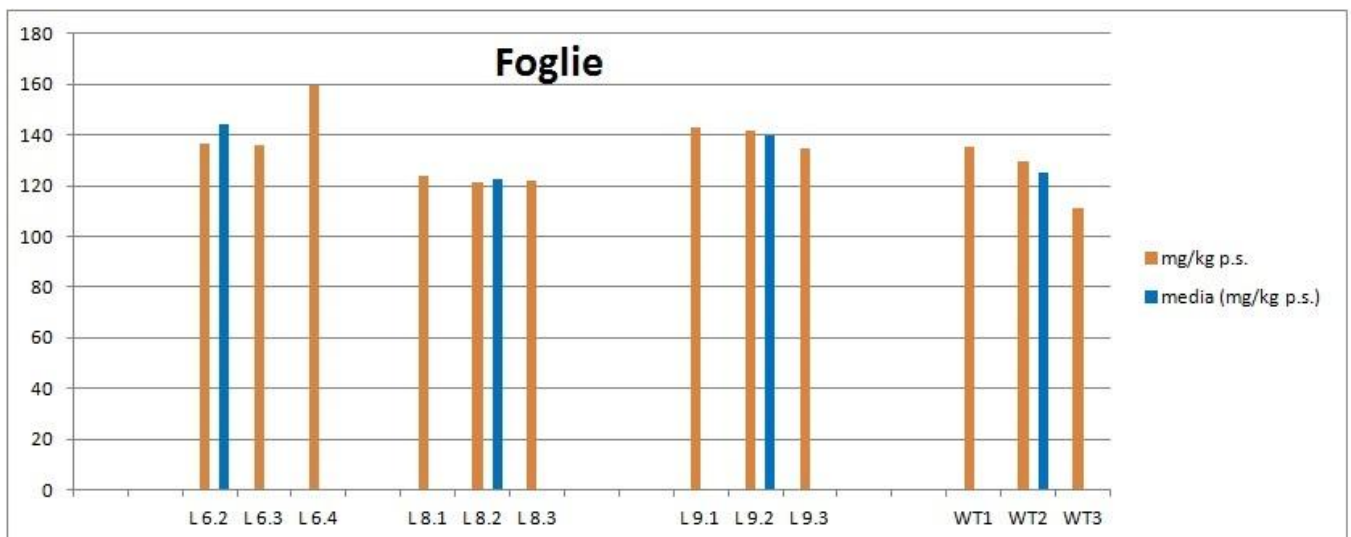


Figura 21: Contenuto di Cd all' interno delle foglie di *N. tabacum* (Concentrazione espressa in mg/kg di peso secco).

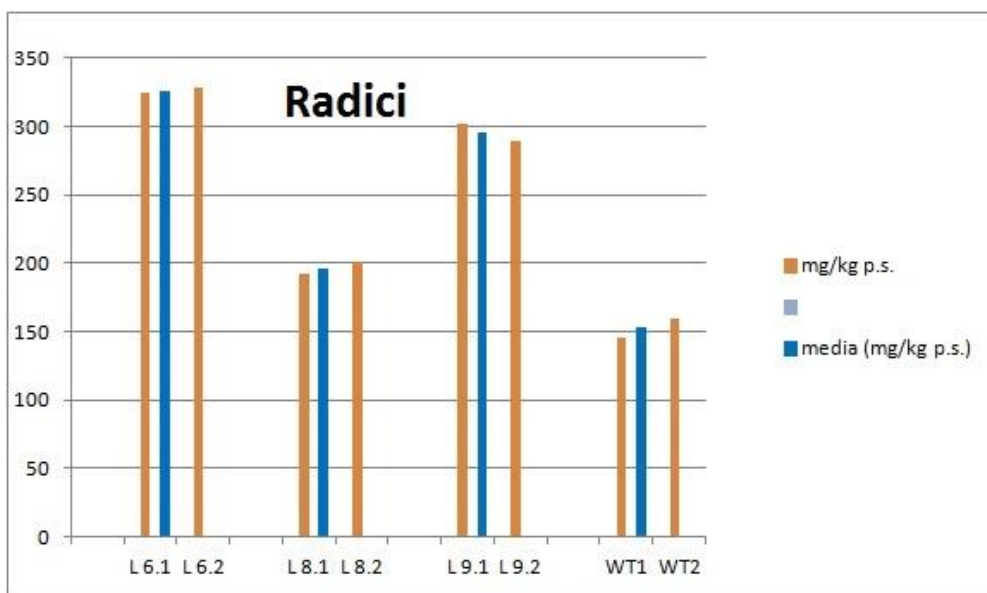


Figura 22: Contenuto di Cd all' interno delle radici di *N. tabacum* (Concentrazione espressa in mg/kg di peso secco).

Per ogni linea è stato calcolato il Fattore di traslocazione (TF), definito come il rapporto tra la concentrazione totale di metallo nelle foglie e quella nelle radici (Mesarovicova et al, 2010).

I fattori calcolati sono espressi nella tabella 3.

Tabella 3 : Fattore di traslocazione calcolato per ogni line transgenica e per le piante WT.

CAMPIONE	TF=[Cd _{shoot}]/[Cd _{roots}]
Linea 6	0.44
Linea 8	0.62
Linea 9	0.47
WT	0.82

La tabella mostra che il TF delle piante WT è circa il doppio di quello delle linee transgeniche, ad eccezione della linea 8 che, come si è detto in precedenza, ha accumulato meno sia nelle radici che nelle foglie ed ha un TF di 0.62.

Il valore 0.82 delle piante WT sta a significare che queste hanno accumulato più metallo nelle radici che nelle foglie (in media si calcolano 152.7 mg/kg di peso secco nelle radici rispetto alle foglie in cui si riscontrano 125.2 mg/kg di peso secco).

I valori di TF delle linee transgeniche sono minori rispetto al precedente: anche queste piante hanno accumulato più metallo nelle radici che nelle foglie, in generale in concentrazione maggiore rispetto alle radici delle WT, circa il doppio.

E' stato calcolato anche il Coefficiente di assorbimento biologico (BAC) definito come il rapporto tra la concentrazione del metallo nella pianta, espressa in $\mu\text{g/g}$ di peso secco, e la concentrazione nella soluzione esterna, espressa in $\mu\text{g}/\text{cm}^3$: è un parametro particolarmente adatto per piante acquatiche e sistemi di idroponica (Mesarovicova et al, 2010). Nello specifico, è stato calcolato per le foglie e per le radici di ogni campione.

Nel sistema di idroponica è stata inserita una concentrazione di $0.78 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ di Cd per cui risultano, come media delle concentrazioni di ogni linea transgenica, i seguenti valori di BAC (tabella 4):

Tabella 4: Coefficiente di assorbimento biologico (BAC) calcolato per foglie e radici per ogni linea trasgenica e per le WT

CAMPIONE	BAC=[Cd_{plant}]/[Cd_{solution}]
foglie	
L 6	185
L 8	157
L 9	179
WT	161
radici	
L 6	418
L 8	252
L 9	379
WT	196

Le foglie di tutti i campioni hanno BAC minori rispetto alle radici. Hanno un range di variazione che va da 157 a 185 per le piante delle linee transgeniche, mentre le piante WT hanno BAC di 161: per cui la differenza di accumulo tra radici e foglie nelle WT è minore.

Nello specifico i BAC delle radici delle linee transgeniche sono significativamente superiori a quello delle WT, e nel caso delle linee 6 e 9 sono in media il doppio.

E' stato calcolato il BAC anche considerando la concentrazione totale del metallo nella pianta, sommando le medie delle concentrazioni trovate in foglie e radici per ogni linea (tabella 5).

Tabella 5: Coefficiente di assorbimento biologico (BAC) calcolato in relazione alla concentrazione totale di Cd nelle piante di ogni linea transgenica e per le WT

CAMPIONE	$BAC = [Cd_{plant}] / [Cd_{solution}]$
totale	
L6	603
L8	409
L9	558
WT	356

I risultati evidenziano che le linee transgeniche hanno accumulato una concentrazione di Cd superiore di quella delle WT: tra la linea 6 e le WT il BAC è quasi doppio.

In generale, si può concludere che i risultati ottenuti in questo secondo esperimento, in cui le piante transgeniche sono state ottenute a partire dal seme delle piante utilizzate nel primo, sono contrastanti rispetto a quelli ottenuti nel primo esperimento.

Questa considerazione è anche confermata dalla differenza di concentrazione tra piante transgeniche e WT del primo esperimento, che è di circa 13 volte.

Le piante transgeniche del primo esperimento presentano una concentrazione circa 32 volte minore rispetto al secondo, supportando che il sistema di efflusso nel primo esperimento era perfettamente funzionante.

Questa discrepanza tra i risultati del primo e secondo esperimento può essere ipoteticamente attribuita alle diverse condizioni sperimentali utilizzate nei due esperimenti: nel secondo esperimento, infatti, le piante in questione sono state cresciute in singoli sistemi di idroponica con 0.7 µM di CdSO₄ ciascuna, per cui avevano a disposizione un quantitativo maggiore di Cd rispetto a quello disponibile nel primo esperimento. Di conseguenza i valori di concentrazione da parte delle piante della seconda analisi sono maggiori di circa 32 volte.

Una risposta definitiva ai risultati può essere data soltanto attraverso successivi esperimenti che sono già in corso: è necessario infatti comprendere se le diverse condizioni di crescita abbiano bloccato e saturato il sistema di efflusso, dato il maggiore quantitativo di Cd disponibile.

È tuttavia importante sottolineare che gli esperimenti riportati in questo lavoro di tesi hanno dimostrato che il sistema batterico può essere espresso in pianta ed offrire la possibilità di modulare l'accumulo di metalli sia nella radice che nella parte aerea. Sarebbe inoltre interessante, con l'utilizzo di opportuni promotori, testare l'espressione dei geni che compongono il sistema di efflusso CzcCBA solamente in alcuni organi della pianta per controllare, ad esempio, l'accumulo di metalli solo nella radice o solamente nel germoglio.

5. CONCLUSIONI

Il Decreto legislativo 206 del 2001 (che da attuazione alla Direttiva 98/81/CE) definisce *geneticamente modificato* qualsiasi organismo il cui materiale genetico sia stato modificato attraverso tecniche di manipolazione genetica *in vitro*: l'ingegneria genetica e le biotecnologie sono le discipline interessate a tale scopo (Barbieri and Bestetti, 2008).

Le biotecnologie sono sempre più utilizzate a scopi commerciali: nei Paesi nei quali la coltivazione di piante OGM edibili è autorizzata, l'ingegneria genetica è usata per migliorare la resistenza delle piante ad insetti, ad erbicidi ed a temperature estreme.

In Europa, in relazione al blocco dell'emissione e dell'utilizzazione di piante trattate geneticamente (Direttiva 2001/18/EC e successive modifiche), i campi di ricerca si stanno focalizzando su applicazioni diverse: molti sono gli studi che si concentrano sulla modificazione genetica delle piante per la produzione di molecole farmaceutiche come vaccini orali e anticorpi, altri sulla produzione di polimeri plastici, oli e fibre, molti sono stati eseguiti nel campo delle fermentazioni e altri studi si sono focalizzati sulla genomica funzionale a scopo di ricerca e conoscenza di interi genomi microbici (Fogher, 2005; Rossi et al., 2013).

Molti altri studi, invece, sono stati effettuati per valutare la possibilità di migliorare le caratteristiche delle piante a scopo di fitorimediazione: nello specifico la possibilità di migliorare la capacità delle piante di assorbire i metalli per poterle utilizzare in opere di bonifica biologica di suoli contaminati da metalli pesanti (Daghan et al, 2010; Daghan et al., 2013; Farinati et al., 2010; Liu et al., 2000; Zhi-xin, et al., 2007).

La possibilità che un metallo entri nei cicli biogeochimici fino ad arrivare all'uomo è il motivo per cui è importante approfondire la ricerca sui sistemi di modulazione del contenuto di questi elementi negli organismi vegetali.

Da una parte la possibilità di aumentare l'accumulo dei metalli nelle piante e nello specifico di cadmio nei sistemi vegetali risulta interessante dal punto di vista della fitoestrazione di metalli pesanti in suoli contaminati.

Dall'altra parte la diminuzione della presenza di metalli pesanti tossici potrebbe essere vantaggioso per le piante coltivate a scopo alimentare o per il tabacco utilizzato per la fabbricazione di sigarette.

Scopo di questa tesi era valutare la capacità della pianta di tabacco di esprimere tre proteine batteriche responsabili dell'efflusso di cadmio dall'interno delle proprie cellule: le tre proteine costituiscono il sistema di efflusso CzcCBA.

Nel primo esperimento, il sistema permette il minore accumulo di Cd nelle foglie (circa 13 volte meno che nelle piante WT): i risultati di questo lavoro evidenziano la possibilità di modulare l'accumulo in pianta di metalli pesanti.

Nel secondo esperimento sono state analizzate piante generate dal seme delle precedenti ed i dati risultano essere in contrapposizione con i primi. E' quindi necessario approfondire la ricerca con esperimenti successivi che sono già in corso.

Un'indagine preliminare come questa non può che essere fatta in condizioni controllate di laboratorio: è stato utilizzato un sistema di idroponica che comporta la completa biodisponibilità del metallo in soluzione senza interferenze da parte di matrici e camere di crescita in cui le piante transgeniche venivano confrontate durante lo sviluppo e per l'accumulo di Cd con piante wild type.

Gli obiettivi dello studio erano quelli di valutare l'efficienza nella trascrizione dei geni batterici del sistema di efflusso nella pianta e quindi fornire un primo contributo allo studio dell'espressione in pianta di tali geni.

La ricerca di base effettuata in condizioni controllate di laboratorio ha scopi conoscitivi ed indagativi ed è il punto di partenza per una successiva sperimentazione attraverso l'uso di suolo contaminato sia in vaso che direttamente in campo.

La ricerca necessita infatti di approfondimenti: lo sviluppo successivo farà parte di un più ampio progetto che vedrà la collaborazione dei due Dipartimenti delle due Università.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alimohammadi M., Bagherieh-Najjar M. (2009). Agrobacterium-mediated transformation of plants. *African journal of biotechnology* 8: 5142-514;
- Argese E., Bettiol C., Bertini S., Rigo C., Gobbo L., Colombari S., Frangipane G., Tagliapietra D., Volpi Ghirardini A., Ghetti P.F. (2005). An investigation on heavy metal and arsenic contamination in the Venice lagoon: a speciation approach. *Scientific Research and Safeguarding of Venice 3: Corila Research Program 2003 results*, Ed. P. Campostrini, Corila: 239–244.
- Baldwin P., Butcher D. (2005). Phytoremediation of arsenic by two hyperaccumulators in a hydroponic environment. *Microchemical Journal* 85 :297–300
- Barbieri P., Bestetti G., Galli E., Zannon G, (2011). *Microbiologia ambientale ed elementi di ecologia microbica*, casa editrice Ambrosiana;
- Batley G., Gardner D. (1977). Sampling and storage of natural waters for trace metal analysis, *Water Research Vol. It*, Pergamon Pres;
- Benavides M., Callego S., Tomaro M. (2005). Cadmium toxicity in plants, *Plant physiology* 17:21-34;
- Bermejo-Barrera P., Moreda-Pineiro A., Muniz-Naveiro O., Gomez- Fernandez A., (2000). Optimization of a microwave-pseudo-digestion procedure by experimental designs for the determination of trace elements in seafood products by atomic absorption spectrometry; *Spect Act B* 55: 1351-1371
- Bettiol C., Minello F., Gobbo L., Rigo C., Bedini S., Bona E., Berta G., Argese E. (2012) Phytoremediation potential of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*: preliminary results from a field study; DOI: 10.7361/SciCF-174
- Bettiol C., Stievanato L., Bertelle M., Delfino F., Argese E.(2008). Evaluation of microwave-assisted acid extraction procedures for the determination of metal content and potential bioavailability in sediments. *Applied Geochemistry* 23: 1140-1151;
- Bhargava A., Carmona F., Bhargava M., Srivastava S. (2012). Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Journal of Environmental Management*, 105, 103–20;
- Campbell Neil A., 2010, *Principi di biologia*, Zanichelli editore;
- Carne S., Sbattella F., 2006, *Quadro dei rischi connessi al fumo principale di sigaretta*, Università Cattolica del Sacro Cuore di Milano;

- Castro J. , Santos E., Santos C., Costa M., Korn M., Nóbrega J., Korn G. (2009). A critical evaluation of digestion procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta* 78: 1378–1382;
- Cheney R., Ryan J., Li Y., Brown S., 1999, Soil cadmium as a threat to human health, *Developments in Plant and Soil Sciences* 85: 219-256;
- Citterio S., Santagostino A., Fumagalli P., Prato N., Ranalli P., Sgorbati S.(2003).Heavy metal tolerance and accumulation of Cd , Cr and Ni by Cannabis sativa L. *Plant and Soil* 256: 243–252;
- Clarke B., Brennan E., 1983, Tobacco leaves accumulate cadmium from root applications of the heavy metals,*Journal of plant nutrition* 23.;
- Clemens, 2000, Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis; *Plant journal*;
- Clemens, S. (2006). Evolution and function of phytochelatin synthases. *Journal of plant physiology*, 163: 319–322;
- Daghan H., Arslan M., Uygur V., Koleli N., Eren A., 2010, The cadmium phytoextraction efficiency of SCMTII gene bearing transgenic tobacco plant, *Biotchnology* 23;
- Daghan H., Arslan M., Uygur V., Koleli N. (2013). Transformation of Tobacco with ScMTII Gene-Enhanced Cadmium and Zinc Accumulation. *CLEAN - Soil, Air, Water*, 41: 503–509;
- DalCorso, G., Farinati, S., Furini, A., 2010, Regulatory networks of cadmium stress in plants. *Plant signaling behavior*, 5(6), 663–667.
- DalCorso G., Farinati S., Maistri S., Furini, A. (2008). How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 1268–1280;
- Elinder C.(2000). Low damage exposure to cadmium and early kidney damage: the OSCAR study, *Occup Environ Med*;
- Farinati S., DalCorso G., Bona E., Corbella M., Lampis S., Cecconi D., Polati R., Berta G., Vallini G. Furini A. (2009). Proteomic analysis of Arabidopsis halleri shoots in response to heavy metals cadmium and zinc and rhizosphere microorganisms. *Proteomics* 9 : 4837-4850.
- Farinati, S., DalCorso, G., Varotto, S., & Furini, A. (2010). The Brassica juncea BjCdR15, an ortholog of Arabidopsis TGA3, is a regulator of cadmium uptake, transport and accumulation in shoots and confers cadmium tolerance in transgenic plants. *New Phytologist* 185: 964–978;
- Fogher C., 2005, Tabacco: biorettaore ideale per la produzione di molecole farmaceutiche;

- Fojta M., Fojtová, M., Havran, L., Pivoňková, H., Dorčák, V., & Šestáková, I. (2006). Electrochemical monitoring of phytochelatin accumulation in *Nicotiana tabacum* cells exposed to sub-cytotoxic and cytotoxic levels of cadmium. *Analytica Chimica Acta* 558: 171–178;
- Frank R., Braun H., Holdrinet M., Stonefield K., Elliot J., Zilkey B., Vickery L., Cheng H.(1977). Metal contents and insecticide residues in tobacco soils and cured tobacco leaves collected in southern Ontario, Tob. sq;
- Fromm M., Taylor L., Walbot V., 1986, Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation, *Nature* 319: 791-793.
- Fusco N., Micheletto L., Dal Corso G., Borgato L., Furini, A. (2005). Identification of cadmium-regulated genes by cDNA-AFLP in the heavy metal accumulator *Brassica juncea* L. *Journal of Experimental Botany* 56: 3017–3027;
- Gill S., Hasanuzzaman M., Nahar K., Macovei A., Tuteja N., (2013). Importance of nitric oxide in cadmium stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry* 63: 254–61;
- Gonzalez H., Souza G. B., Oliveira R. V, Forato L. Nóbrega J., Nogueira A. R. (2009). Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: identification of reaction products. *Talanta* 79: 396–401;
- Grant C., Bailey L., Mc Laughlin, Singh B., 1999, Management factors which influence cadmium concentration in crops, a review, Elsevier
- Guo-ming S. H. E. N., Jiang-xin W. A. N. G. (2012). Involvement of Plasma Membrane Ca²⁺ / H⁺ Antiporter in Cd²⁺ Tolerance , *Rice Science* 19: 1–5.
- Hain R., Stabel P., Czernilofsky A.P., Steinbib H.H., Herrera-Estrella L.(1985). Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimaeric gene by plant protoplasts. *Molecular and general genetics* 199: 161–168;
- Hassan M., Lelie D., Springael D., Romling U., Ahmed Mergeavy M. (1999). Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *Gene* 238: 417-425;
- Hseu Z.Y. (2004). Evaluating heavy metal contents in nine composts using four digestion methods. *Bioresource Technology* 95: 53–59;
- Huang P.M., Schnitzer M.(1986). Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes, *Soil Science Society of America* 17: 429-451;
- Huang P.M. Violante A. (1986). Influence of organic acids on crystallization and surface properties of precipitation products of aluminum *Soil Science Society of America* 17: 159-221;

- Ivask A., François M., Kahru A., Dubourguier H. C., Virta M., Douay F. (2004). Recombinant luminescent bacterial sensors for the measurement of bioavailability of cadmium and lead in soils polluted by metal smelters. *Chemosphere* 55: 147–156;
- Jarup L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68: 167–182;
- Järup L., Akesson A. (2009). Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicology and applied pharmacology* 238: 201–208.;
- Jarup L., Hellstrom L., Alfven T., Carlsson M., Grubb A., Persson B., Petterson C., Spang G. (2002). Cadmium and lead in blood in relation to low bone density and tubular proteinuria; *Environ. Health Perspect* 110: 699–702.;
- Kim E. H., Nies D.H., Mc Evoy M.M. Rensing C. (2011). Switch or Funnel: How RNDType Transport Systems Control Periplasmic Metal Homeostasis. *J. of Bacteriol.* 193: 2381-7
- Kiyokawa K., Yamamoto S., Sakuma K., Tanaka K., Moriguchi K., Suzuki K. (2009). Construction of Disarmed Ti Plasmids Transferable between *Escherichia coli* and *Agrobacterium* Species; *Appl Environ Microbiol*; *Appl Environ Microbiol.* 75: 1845–1851.
- Krystofova O., Zitka O., Krizkova S., Hynek D., Shestivska V. (2012). Accumulation of Cadmium by Transgenic Tobacco Plants (*Nicotiana tabacum* L .) Carrying Yeast Metallothionein Gene. *Electrochemistry* 7: 886–907.
- Lars J., Hellström L., Alfvén T., Carlsson M.D., Anders A., Persson B., Pettersson C., Spång G., Schütz A., Elinder C. (2000). Low level exposure to cadmium and early kidney damage: the OSCAR study; *Occup Environ Med* 57: 668-672;
- Laughlin M. J., Singh B.R., 1999 Cadmium in soil and plants, a global perspective;
- Lie J.R., Suh M.C., Choi D. (2000). Phytoremediation of cadmium contamination: overexpression of metallothionein in transgenic tobacco plants, *Perspektive zur Entwicklung der Grünen Gentechnik* 43: 126-130;
- Linger P., Ostwald A., Haensler, J. (2005). Cannabis sativa L. growing on heavy metal contaminated soil: growth, cadmium uptake and photosynthesis. *Biologia Plantarum*, 49: 567–576;
- Liu J.R. , Suh M.C., Choi D. (2000). Phytoremediation of cadmium contamination : Overexpression of metallothionein in transgenic, *Plant Cell Biotechnology* 46: 126–130;
- Liu L., Li Y., Tang J., Hu L., Chen X. (2011). Plant coexistence can enhance phytoextraction of cadmium by tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) in contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences* 23: 53–460;

- Lorito S., Vianello G. (2010). Il monitoraggio suolo-pianta per la valutazione dell' inquinamento da metalli pesanti nell' ambiente urbano, tesi di dottorato, Università degli studi di Bologna,
- Lu Z., Zhang Z., Su Y., Liu C., Shi, G. (2013). Cultivar variation in morphological response of peanut roots to cadmium stress and its relation to cadmium accumulation. *Ecotoxicology and environmental safety* 91: 147–55;
- Lugon-Moulin N., Martin F., Krauss, M. R., Ramey P. B., Rossi L. (2006). Cadmium concentration in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) from different countries and its relationship with other elements. *Chemosphere* 63: 1074–1086;
- Magness J.R., Markle G.M., Compton C. (1971). Food and feed crops of the United States. Interregional Research Project;
- Manahan S. E. (2010). Environmental chemistry, CRC press;
- Manara A., DalCorso G., Baliardini C., Farinati S., Cecconi D., Furini A. (2012). *Pseudomonas putida* response to cadmium: changes in membrane and cytosolic proteomes. *J. Proteom. Res.* 8: 4169-4179;
- Marano K.M., Naufal Z.S., Kathmasn S.J., Bodnar A.J., Borgerding M.F., Garner C.D., Wilson C.L. (2012). Cadmium exposure and tobacco consumption: Biomarkers and risk assessment; *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 64:243-252;
- Mart, C. M. (2004). Tolerance and bioaccumulation of heavy metals in five populations of *Cistus ladanifer*, *Plant and soil* 258: 189–205.
- Masarovicova E., Kralova K., Kummerova M., (2010). Principles of classification of medicinal plants as hyperaccumulators or excluders, *Acta Physiol Plant* 32: 823-829;
- Millis P. R., Ramsey M. H., John E. (2004). Heterogeneity of cadmium concentration in soil as a source of uncertainty in plant uptake and its implications for human health risk assessment. *The Science of the total environment*, 326: 49–53;
- Navarro M. C., Pérez-Sirvent C., Martínez-Sánchez M. J., Vidal J., Marimón, J., 2006, Lead, cadmium and arsenic bioavailability in the abandoned mine site of Cabezo Rajao (Murcia, SE Spain). *Chemosphere* 63: 484–489;
- Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields; *The EMBO Journal* 1: 841-845
- Nies D., 1995, The Cobalt, Zinc AND Cadmium Efflux System CzcCBA from *Alcaligenes eutrophus* Functions as a Cation-Proton Antiporter in *Escherichia coli*; *Journal of Bacteriology* 177: 2707-2712;

- Nordberg G.F. (2003). Historical perspectives on cadmium toxicology, *Toxicology and applied pharmacology* 3: 192-200
- Peix A., Ramirez-Bahena M., Velázquez E., 2009, Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*, *Ingestion, genetics and evolution* 3: 1132-1147
- Peralta-Videa J. R., Lopez M. L., Narayan, M., Saupe, G., Gardea-Torresdey J. (2009). The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: implications for the food chain. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41: 1665–77;
- Perfus-Barbeoch L., Leonhardt N., Vavasseur A., Forestier C. (2002). Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *The Plant journalnal for cell and molecular biology* 32: 539–48;
- Piccioni E., Argese E. (2002). Valutazione degli effetti di accumulo di Cd e Cu sulla prima fase di crescita di Canapa industriale (*Cannabis sativa sativa*), tesi di laurea specialistica, Università Ca' Foscari di Venezia;
- Prasad M. (1995). Pergamon cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Science* 35: 525–545;
- Qiana J., Shari X., Wangb Z., Tu Q. (1996). Distribution and plant availability of heavy metals in different particle-size fractions of soil. *Science of the totalenvironment* 187: 131–141;
- Rascio N., Navari-Izzo F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant science Shannon Ireland*, 180: 169–181;
- Reziani M., Zaefarian F. (2011). Bioaccumulation and translocation factors of cadmium and lead in *Aelorusus Littoralis*; *Australian journal of agricultural engineering* 2: 114-119;
- Rodushkin I., Ruth T. (1999). Comparison of two digestion methods for elemental determinations in plant material by ICP techniques. *Analytica Chimica Acta* 378: 191-200
- Ross I. (2005). Medicinal Plants of the World: Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses. *Humana Press*
- Rossi L., Fusi E., Baldi G., Fogher C., Cheli F., Baldi A., Dell'Orto V. (2013). Tobacco seeds by-product as a protein source for piglets. *Open Journal of Veterinary Medicine* 3: 73-78;
- Salas M.C., Park S.H., Srivatanakul M., Smith R.H. (2001). Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells, *Plant Cell Rep* 20: 701-705;
- Sastre J., Sahuquillo A., Vidal M., Rauret G. (2002). Determination of Cd, Cu, Pb and Zn in environmental samples: microwave-assisted total digestion versus aqua regia and nitric acid extraction. *Analytica Chimica Acta* 462: 59–72;

- Shi G., Cai Q. (2009). Cadmium tolerance and accumulation in eight potential energy crops. *Biotechnology advances* 27: 555–61;
- Silver S. (1996). Bacterial resistances to toxic metals ions- a review. *Gene* 71: 9-19
- Silver S., Phung L. (2009). Heavy metals, bacterial resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* 51: 730:750
- Soylak M., Tuzen M., Souza A., Das Graças M., Ferreira S. (2007). Optimization of microwave assisted digestion procedure for the determination of zinc, copper and nickel in tea samples employing flame atomic absorption spectrometry. *Journal of Hazardous Materials* 149: 264–268;
- Tinggi U., Reilly C., Hahn S., Capra M. J. (1992). Comparison of wet digestion procedures for the determination of cadmium and lead in marine biological tissues by Zeeman graphite furnace atomic absorption spectrophotometry. *Science of the Total Environment* 125: 15–23.
- Trombetta C., Gambari R., Filippone E. (2008). Isolamento e caratterizzazione di sequenze geniche per l'assorbimento e l'accumulo di metalli in pomodoro, tesi di dottorato, Università degli studi di Ferrara;
- Uruç Parlak K., Demirezen D. (2013). Ecophysiological tolerance of *Lemna gibba* L. exposed to cadmium. *Ecotoxicology and environmental safety* 91: 79–85;
- Van Gestel C. (2008). Physico-chemical and biological parameters determine metal bioavailability in soils. *Science of the Total Environment* 406: 385–395;
- Wu L., Tan C., Liu L., Zhu P., Peng C., Luo Y., Christie P. (2012). Cadmium bioavailability in surface soils receiving long-term applications of inorganic fertilizers and pig manure. *Geoderma*, 173: 224–230;
- Wullems G. J., Molendijk L., Ooms G., Schilperoort R. (1981). Differential expression of crown gall tumor markers in transformants obtained after in vitro *Agrobacterium tumefaciens*-induced transformation of cell wall regenerating protoplasts derived from *Nicotiana tabacum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78: 4344–8;
- Zhi-xin N., Sun L., Sun T., Li Y., Wang H. (2007). Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard in hydroponic culture. *Journal of environmental sciences* 19: 961–7;
- Zheljaskova D., Crakerb L., Xingb B., Nielsenc N., Wilcoxd A. (2008). Aromatic plant production on metal contaminated soils. *Science of the total environment* 395: 51-62

Ringraziamenti

Alla fine di questo percorso desidero ringraziare alcune persone: il mio relatore, il professor Emanuele Argese, sempre presente durante questo lavoro; le mie correlatrici: la prof.ssa Antonella Furini e la dott.ssa Fabiola Minello, che mi hanno seguito, da lontano e da vicino; tutto il gruppo di lavoro, in particolare Lorena e Silvia, per avermi costantemente aiutata.

Un ringraziamento particolare va ai miei genitori, a Pier Giuseppe, Giada e Diego per essere stati sempre accanto a me e per avermi incoraggiata in tutti questi anni di studio.