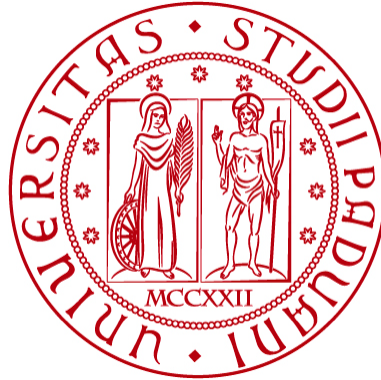


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**VALUTAZIONE DI COSTRUTTI GENICI PER LA
PRODUZIONE DI CANNABINOIDI IN COLTURE
CELLULARI DI *CANNABIS SATIVA***

**Tutor: Prof. Livio Trainotti
Dipartimento di Biologia**

**Co-tutor: Dott. Marco Armellin
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Giorgia Gregolon

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

1	ABSTRACT.....	3
2	STATO DELL'ARTE.....	4
	2.1 <i>CANNABIS SATIVA</i>	4
	2.2 STRUTTURA E FORMAZIONE DEI TRICOMI.....	5
	2.3 GENI <i>MIXTA</i> E <i>CD2</i>	6
3	APPROCCIO SPERIMENTALE: MATERIALI E METODI.....	7
	3.1 AGROINFILTRAZIONE.....	7
	3.1.1 VETTORI PLASMIDICI.....	7
	3.1.2 SISTEMA INDUCIBILE.....	8
	3.2 PROTOCOLLO DI INFILTRAZIONE.....	8
	3.2.1 INFILTRAZIONE MEDIANTE POMPA A VUOTO.....	9
	3.2.2 INDUZIONE CON DESAMETASONE.....	9
	3.3 SAGGIO ISTOCHIMICO GUS.....	10
	3.3.1 PROTOCOLLO SAGGIO ISTOCHIMICO.....	10
	3.4 SAGGIO FLUORIMETRICO.....	10
	3.4.1 PROTOCOLLO SAGGIO FLUORIMETRICO.....	11
4	RISULTATI	12
	4.1 SAGGIO GUS IN <i>N. BENTHAMIANA</i>	12
	4.2 SAGGIO GUS IN <i>C. SATIVA</i>	14
	4.3 SAGGIO FLUORIMETRICO.....	15
	4.4 VALUTAZIONE DENSITA' TRICOMI.....	16
5	DISCUSSIONE.....	18
6	BIBLIOGRAFIA.....	20

1

ABSTRACT

I cannabinoidi sono sostanze di interesse farmaceutico e nutraceutico sempre più richieste e per questo risulta necessaria la messa a punto di un sistema di produzione di questi metaboliti secondari che ne renda più efficiente la sintesi ed estrazione. Il progetto in cui si inserisce questo lavoro è finalizzato all'allestimento di un sistema per la produzione di cannabinoidi da colture cellulari di *Cannabis sativa*, inducendone il differenziamento in tricomi, l'unità di sintesi e accumulo di cannabinoidi nella pianta. Nella seguente ricerca verranno analizzati più costrutti genici mediante agroinfiltrazione in *Nicotiana benthamiana*. In particolare, verrà testato un sistema di espressione inducibile con desametasone e l'effetto dell'induzione controllata dell'espressione di diversi geni coinvolti nel differenziamento dei tricomi.

2

STATO DELL'ARTE

2.1 CANNABIS SATIVA

La *Cannabis sativa*, comunemente detta canapa, è una pianta a fiore molto conosciuta per la versatilità di applicazioni che spaziano dal settore alimentare, tessile fino ad applicazioni in ambito medico e farmacologico.

Caratterizzata da foglie palmate e dalla divisione in base al sesso delle strutture riproduttive, la canapa è principalmente conosciuta per la produzione dei suoi metaboliti secondari, in particolare i cannabinoidi, secreti dai tricomi ghiandolari presenti sulle superfici fogliari della pianta.

I cannabinoidi maggiormente conosciuti sono delta-9-tetraidrocannabinolo (THC) e cannabidiolo (CBD), la cui combinazione viene studiata a fini medici come integrazione al trattamento di malattie come sclerosi multipla, epilessia, gestione del dolore oltre che per il trattamento dell'ansia, ma le sue proprietà medicinali sono conosciute da millenni e per questo la pianta è utilizzata dall'antichità.

La coltivazione e l'uso della *C. sativa* subiscono però un rigido controllo sotto le regolamentazioni nazionali e internazionali, che hanno rallentato le ricerche delle applicazioni medicinali della pianta.

Nonostante i pregiudizi culturali, *C. sativa* è una pianta estremamente interessante e non ignorabile per le proprietà che offre in ambito medico e farmacologico.

L'efficienza di produzione dei cannabinoidi, tuttavia, non è molto elevata nelle piante, che sono soggette a gran variabilità di crescita e differenziamento ma anche di composizione chimica dei metaboliti secondari a causa di condizioni climatiche ed altri fattori ambientali non controllabili.

La produzione eccessiva di cannabinoidi influisce oltremodo sulla salute della pianta e non è quindi possibile aumentare di molto l'efficienza di produzione delle piante differenziate.

La seguente ricerca è per questo finalizzata a testare diversi geni che codificano fattori di trascrizione coinvolti nel differenziamento delle cellule dell'epidermide in tricomi. Questo al fine sia di aumentare la densità di formazione dei tricomi nelle piante che di indurne il differenziamento in colture cellulari, in modo da aumentare la produzione di cannabinoidi.

2.2 STRUTTURA E FORMAZIONE TRICOMI

Il tricoma è una struttura simile ad un pelo presente sulla superficie di molte piante. Si tratta di un elemento con funzione protettiva e difensiva, che crea una barriera contro parassiti, regola la temperatura e riduce la traspirazione dell'acqua dalla pianta.

Tra i diversi tipi di tricomi si distinguono quelli secretori (o ghiandolari), unità di sintesi e di accumulo di metaboliti secondari, di solito composti da tre parti principali, una base, un gambo e una ghiandola con capacità secretorie (Figura 1); in generale la densità di tricomi sulla superficie fogliare è quindi direttamente proporzionale all'efficienza di sintesi dei metaboliti secondari; in *C. sativa* i tricomi responsabili della sintesi dei cannabinoidi sono localizzati sulle brattee del fiore femminile e anche dalla loro densità dipende la quantità di metaboliti che viene prodotta.

La formazione dei tricomi avviene quando una cellula epidermica riceve un segnale di differenziamento dalle cellule circostanti, determinando una rigida serie di divisioni cellulari che portano alla formazione della struttura tricomiale.

Sono state individuate due famiglie di fattori trascrizionali che regolano la formazione dei tricomi: *R2R3-MYB* (tra cui *AaMYB1* e *AaMIXTA1* in *Artemisia annua* e *SIMX1* in pomodoro, *Solanum lycopersicum*) e *HD-ZIP IV* (tra cui *AaHD1* e *AaHD8* in *A. annua* e *SICD2* in *S. lycopersicum*).¹

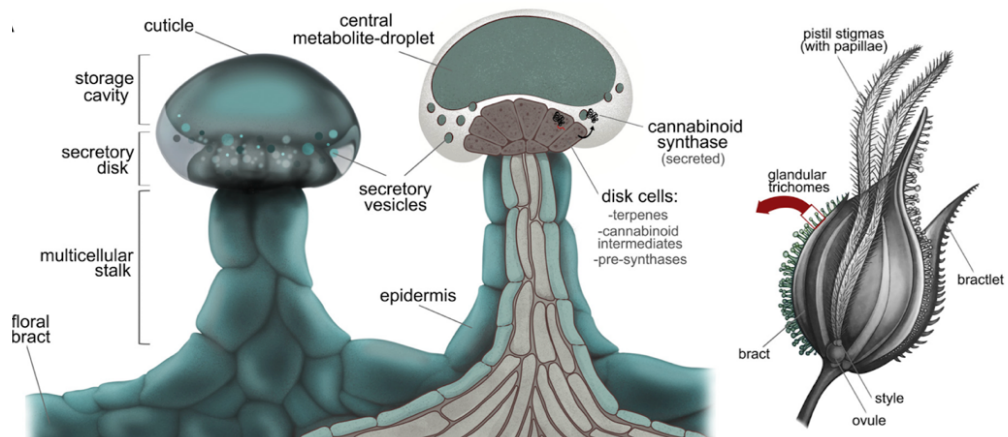


Figura 1: Struttura di un tricoma ghiandolare di *C. sativa* ²

2.3 GENI MIXTA E CD2

Delle due principali famiglie di fattori di trascrizione regolanti la formazione dei tricomi, nella seguente ricerca si andranno ad utilizzare il gene *SIMIXTA* e *SICD2* derivanti da *S. lycopersicum*, ma sono stati studiati anche i corrispondenti geni di cotone (*Gossypium hirsutum*) e pesco (*Prunus persica*), al fine di individuare i fattori di trascrizione più adatti ad essere utilizzati per indurre il differenziamento nelle colture cellulari.

I fattori *MIXTA* sono una sottocategoria dei fattori di trascrizione *R2R3-MYB* mentre *CD2* o *HD8* sono sottocategorie di *HD-ZIP IV*.

Da studi pregressi è stata evidenziata una chiara correlazione tra aumento della trascrizione di *AaMIXTA1* (gene *MIXTA* in *A. annua*) e aumento dei tricomi ghiandolari; anche nel *S. lycopersicum*, l'over-espressione di *SIMIXTA* aumenta la formazione dei tricomi negli apici delle piante transgeniche, mentre *SICD2* regola la densità tricomiale.³

Usando lo stesso fattore di trascrizione per controllare sia la formazione dei tricomi che le regolazioni metaboliche primarie, le piante possono coordinare la produzione dei metaboliti secondari e la formazione di compartimenti di accumulo. Possono così fornire un'accurata regolazione alla produzione di metaboliti specializzati tossici senza danneggiare la normale crescita.

Da altri studi è stato possibile dimostrare come fattori di trascrizione costitutivi siano meno efficienti di quelli tessuto specifici, suggerendo quindi la possibilità di utilizzare dei costrutti attivabili solo in alcune zone.⁴

AaHD8 (*SICD2* in *S. lycopersicum*) associato alla biosintesi della cuticola e alla formazione dei tricomi, promuove la formazione di tricomi ghiandolari e non ghiandolari in *A. annua*. Quando over espresso, però, il gene determina una crescita ritardata e di foglie più piccole e rivolte verso il basso, indicando la necessità di attivare il gene solo quando ad un sufficiente stato differenziativo della pianta in modo da non intaccarne la struttura.

Oltremodo, si è osservato come *AaHD8* interagisce fortemente con *AaMIXTA1*; l'effetto combinatorio sinergico nella attivazione dei promotori promuove l'espressione dei geni per il differenziamento cuticolare e l'inizio del differenziamento tricomiale regolando positivamente l'espressione di *AaHD1*, regolatore positivo del differenziamento tricomiale.⁵

3

APPROCCIO SPERIMENTALE: MATERIALI E METODI

3.1 AGROINFILTRAZIONE

L'agroinfiltrazione è un processo tramite il quale è possibile inserire all'interno delle cellule di una pianta un costrutto genico contenente i geni d'interesse.

Il meccanismo che sta alla base del processo deriva dalla capacità di un batterio, *A. tumefaciens*, di infettare cellule vegetali inserendo il proprio T-DNA contenuto all'interno di un plasmide Ti in grado di entrare nella cellula e di inserirsi nel genoma di questa determinando la trascrizione dei propri geni. L'infezione dell'*A. tumefaciens* viene indotta da una sostanza fenolica, l'acetosiringone, rilasciato in natura dalle cellule danneggiate, ma utilizzabile in laboratorio per l'attivazione controllata dell'infezione batterica.

A. tumefaciens può essere utilizzato come metodo per l'ingegneria genetica andando ad inserire i geni d'interesse all'interno dei confini del T-DNA contenuto nel plasmide Ti, eliminando i geni normalmente espressi dal T-DNA.

3.1.1 VETTORI PLASMIDICI

In questo studio è stato utilizzato un sistema a due componenti, e cioè costituito da due plasmidi, un plasmide contenente un promotore costitutivo che controlla un attivatore trascrizionale (linea driver) e un plasmide con un gene target sotto controllo del sito di legame dell'attivatore trascrizionale (linea effector o responder).

Nel caso specifico abbiamo utilizzato plasmidi pBIN e pGREEN come plasmidi driver, dotati di LhG4 come fattore di trascrizione, sotto controllo del promotore costitutivo 35S; e di pH-TOP come plasmide effector, caratterizzato da un promotore bidirezionale pOp6 seguito da un gene reporter (*GUS*) e da un sito di clonaggio dove sono inseriti i geni d'interesse da testare.

Il promotore pOp6 è transattivabile da LhG4 e per questo sono state fatte co-infiltrazioni con due ceppi di batteri, uno contenente il plasmide 35S::LhG4 e uno il plasmide pHTOP ingegnerizzato.

Nel plasmide pGREEN, LhG4 è in versione inducibile (GR-LhG4), attiva quindi la trascrizione del gene d'interesse solo in presenza di desametasone.

3.1.2 SISTEMA INDUCIBILE

La crescita delle colture cellulari non è compatibile con il differenziamento in tricomi ed è per questo che si è scelto di utilizzare un sistema inducibile per indurre il differenziamento solo dopo che le cellule sono già cresciute. Un sistema inducibile è un metodo tramite il quale è possibile attivare la trascrizione di un gene solo in presenza di un attivatore trascrizionale specifico.

In questo studio il sistema inducibile di cui si fa uso è basato sul desametasone, che permette, attivando il fattore di trascrizione GR-LhG4, di indurre la formazione di tricomi dopo che la pianta è sufficientemente differenziata da poter sostenere la sintesi dei metaboliti secondari, che avrebbero altrimenti ritardato la crescita della stessa.

Vengono ottenute tre diverse linee di colonie di *A. tumefaciens*: una linea con plasmide pBIN con LhG4 da utilizzare come controllo negativo, una linea con il fattore di trascrizione *SIMIXTA* e una con *SICD2*.

3.2 PROTOCOLLO DI INFILTRAZIONE

L'esperimento di agroinfiltrazione viene condotto su piante di *N. benthamiana*, cresciute in terra in camere di crescita a 25°C.

Viene utilizzato *A. tumefaciens* AtGV 3101 con plasmidi GR-LhG4::pGREEN, 35S-LhG4::pBIN e *RUBY*::pHTOP.

Viene allestita una reazione di PCR seguita da corsa elettroforetica per verificare la presenza del plasmide nei batteri cresciuti in terreno liquido di ciascuna delle tre linee. Per procedere con l'infiltrazione delle linee di *A. tumefaciens* in *N. benthamiana* è necessario verificare la concentrazione delle colture liquide dei batteri per ottenere una concentrazione equivalente per ogni infiltrazione.

Si effettua quindi una valutazione di O.D., a 600nm di lunghezza d'onda, dalle tre diverse colture di colonie batteriche tramite spettrofotometro, la concentrazione ottenuta viene utilizzata per calcolare il volume di inoculo per ottenere un $O.D.600=0,02$. Le colonie vengono quindi inoculate nel

relativo terreno YEB al quale vengono aggiunti antibiotici (kanamicina 50mg/L, rinfampicina 100mg/L e gentamicina 25mg/L) e acetosiringone in concentrazione 20 μ M e poi vengono fatte crescere tutta la notte.

Il giorno seguente vengono risospese in MMA con l'aggiunta di acetosiringone 200 μ M per ottenere una concentrazione O.D.=2,4, le colonie vengono poi incubate a 25°C per due ore al buio.

3.2.1 INFILTRAZIONE MEDIANTE POMPA A VUOTO

Vengono preparate 4 piante di *N. benthamiana*, da infiltrare tramite pompa a vuoto in modo da far passare la sospensione batterica attraverso l'apertura degli stomi; il vuoto rimuove l'aria dagli spazi intercellulari e permette così una maggiore infiltrazione di *A. tumefaciens* all'interno del volume fogliare.

Per l'infiltrazione, 35S-LhG4::pBIN e GR-LhG4::pGREEN e vengono unite a *RUBY*::pHTOP in rapporto 1:1 con concentrazione finale O.D.=0,2 ciascuna.

Tre piante vengono infiltrate con GR-LhG4::pGREEN + *RUBY*::pHTOP e una con 35S-LhG4::pBIN + *RUBY*::pHTOP usando il metodo della pompa a vuoto a 20kPa per un minuto.

Vengono infiltrate anche delle piante di *C. sativa* con 35S-LhG4 + *SIMIXTA_H*-TOP + *SICD2_pH*-TOP e saggiate con GUS dopo 72h.

3.2.2 INDUZIONE CON DESAMETASONE

In seguito all'infiltrazione, si può procedere con l'induzione delle piante per far attivare la trascrizione dei geni d'interesse.

Una pianta GR-LhG4::pGREEN + *RUBY*::pHTOP (DEX-48) è stata indotta a 48 ore dall'infiltrazione con una soluzione di desametasone 30 μ M e 0,15% Silwet e posta sotto pompa a vuoto a 20kPa per 1 minuto.

Dopo 72 ore dall'infiltrazione, anche una seconda pianta (DEX-72) è stata indotta allo stesso modo con desametasone in soluzione.

Si sono ottenute così 4 piante così suddivise:

- 1) 35S-LhG4 + pH-TOP (controllo negativo);
- 2) GR-LhG4 + pH-TOP no DEX;
- 3) GR-LhG4 + pH-TOP DEX-48;
- 4) GR-LhG4 + pH-TOP DEX-72.

3.3 SAGGIO ISTOCHIMICO GUS

Il saggio GUS serve per determinare l'efficienza di un determinato promotore sotto il cui controllo vi è la trascrizione del gene d'interesse.

Il gene reporter *uidA* codifica per un enzima, la β -glucuronidasi, in grado di scindere il substrato X-GLUC che così assume una colorazione blu.

Quando il promotore pOp6 utilizzato viene attivato e quindi trascrive per il gene d'interesse e per il gene reporter, il campione assume colorazione blu distinta nel punto di attivazione di questo.

3.3.1 PROTOCOLLO SAGGIO ISTOCHIMICO

La soluzione per il saggio GUS (100ml) è composta da 50ml di soluzione tampone, 100 μ L di Triton, 1ml di $K_3Fe(CN)_6$ e 1ml di $K_4Fe(CN)_6$, 2ml di EDTA, 20ml di MeOH, 23,3ml di H_2O e 2,58ml di X-GLUC da aggiungere appena prima dell'uso.

Dalle piante precedentemente infiltrate, vengono prelevati dei frammenti che vengono inseriti in provette con la soluzione per il saggio che viene lasciata agire a 37°C.

Nei giorni successivi si procede con dei lavaggi in metanolo e acido acetico 3:1 per decolorare i frammenti di foglia e procedere poi alla loro osservazione.

3.4 SAGGIO FLUORIMETRICO

Il saggio fluorimetrico permette di valutare l'espressione del gene *GUS* tramite la fluorescenza emessa da MU, prodotto per scissione del substrato MUG ad opera dell'enzima β -glucuronidasi.

Sono state utilizzate 4 diverse tipologie di piante infiltrate per il saggio e campionate in momenti diversi:

- 1) 35S-LhG4 a 48 ore dall'infiltrazione (35S-LhG4-48) e a 72 ore dall'infiltrazione (35S-LhG4-72);
- 2) GR-LhG4 no DEX a 48 ore dall'infiltrazione (GR-LhG4-noDEX-48) e a 72 ore dall'infiltrazione (GR-LhG4-noDEX-72);
- 3) GR-LhG4 indotta dopo 48 ore, a 48 ore dall'induzione (GR-LhG4-48-DEX-48) e a 72 ore dall'induzione (GR-LhG4-48-DEX-72);

4) GR-LhG4 indotta dopo 72 ore, a 48 ore dall'induzione (GR-LhG4-72-DEX-48) e a 72 ore dall'induzione (GR-LhG4-72-DEX-72);

3.4.1 PROTOCOLLO SAGGIO FLUORIMETRICO

Viene preparato il tampone di estrazione con NaPO_4 a concentrazione 50mM e $\text{pH}=7,0$ a cui viene aggiunto Na_2EDTA 10mM, poi Triton-X100 a 0,1% e 2-mercaptoetanolo 10mM appena prima dell'uso.

Viene preparato anche il tampone di reazione con MUG 2mM (da sciogliere in metanolo) in tampone di estrazione e anche il tampone di stop con Na_2CO_3 0,2mM.

Si procede pestellando in eppendorf con il tampone di estrazione gli 8 dischetti equivalenti delle stesse dimensioni di foglie precedentemente congelate in azoto liquido.

La soluzione omogenizzata viene centrifugata per 5 minuti a massima velocità e successivamente viene spostato il surnatante in una nuova provetta, che viene nuovamente centrifugata per 5 minuti sempre alla massima velocità.

Si recupera nuovamente il surnatante, contenente anche il prodotto del gene reporter, che viene messo in ghiaccio e nel frattempo si preparano 3 cuvette per ogni campione con 1950 μL di tampone di stop.

Viene poi preparata la miscela di reazione mescolando 300 μL di tampone di reazione ai 10 o 20 μL di estratto enzimatico. La soluzione viene agitata e poi incubata in bagno a 37°C.

Da questa vengono prelevati 50 μL della miscela di reazione dopo 5, 10, 25, 45 e 90 minuti e posti nelle relative eppendorf contenenti il tampone di stop.

Le reazioni vengono fermate e le soluzioni sono misurate in cuvette con il fluorimetro per determinare i valori di fluorescenza dai quali si potrà calcolare l'attività dell'enzima β -glucuronidasi.

4

RISULTATI

4.1 SAGGIO GUS IN *N. BENTHAMIANA*

Nell'esperienza svolta, sono state utilizzate 4 diverse piante di *N. benthamiana* con 4 combinazioni diverse dei costrutti.

In queste si è osservata la colorazione data dal saggio istochimico con GUS:

1) 35S-LhG4 + pH-TOP, 48 ore dall'infiltrazione (Figura 2)

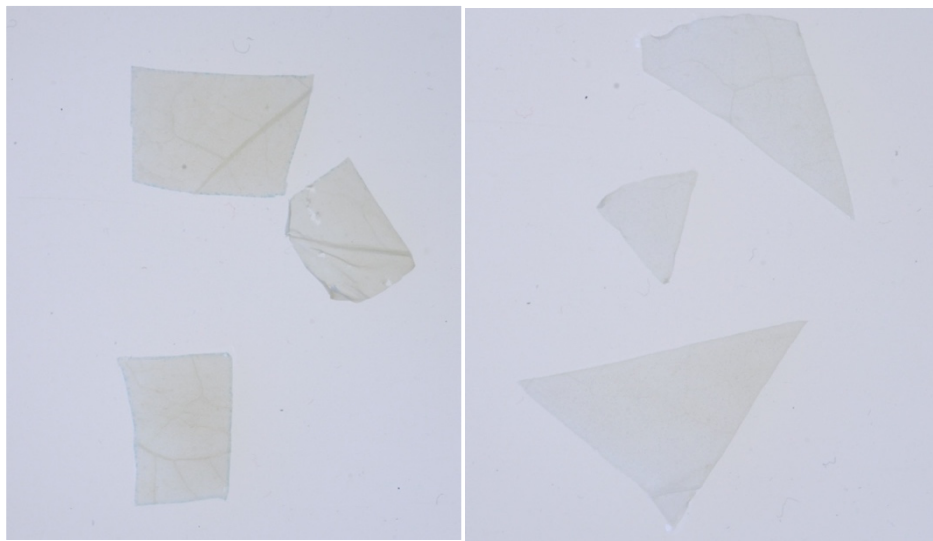


Figura 2: Frammenti *N. benthamiana* 35S-LhG4 + pH-TOP a 48 ore dall'infiltrazione

e a 72 ore dall'infiltrazione (Figura 3).

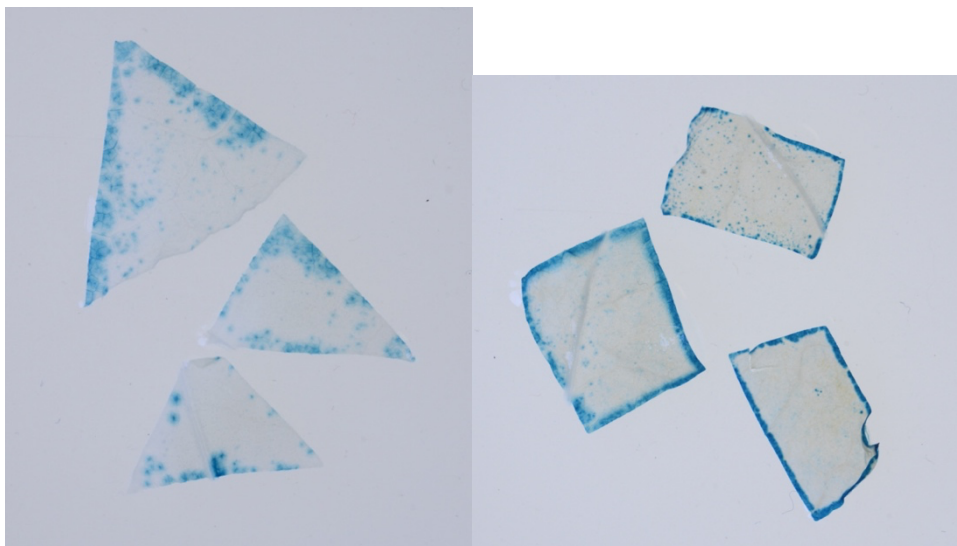


Figura 3: Frammenti *N. benthamiana* 35S-LhG4 + pH-TOP a 72 ore dall'infiltrazione

2) GR-LhG4 + pH-TOP no DEX (Figura 4).

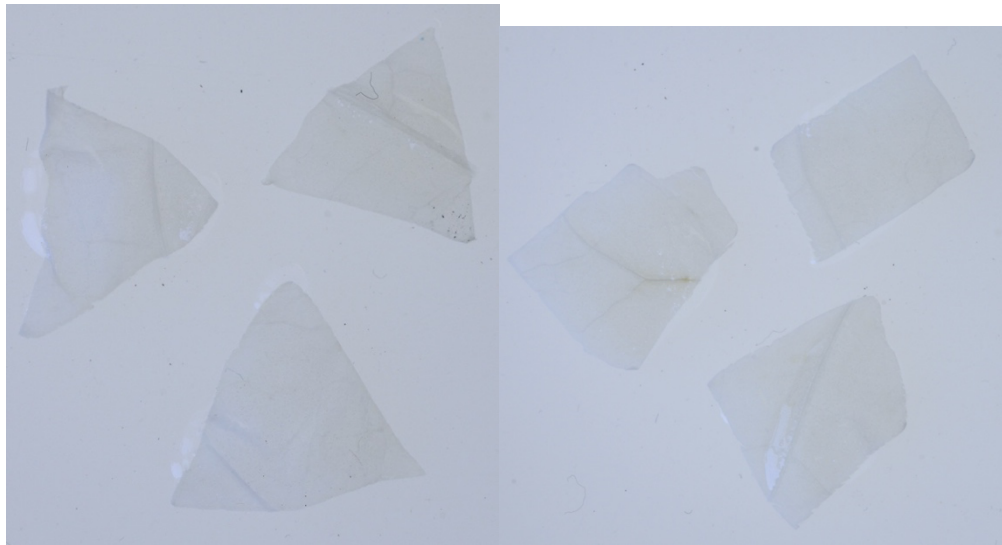


Figura 4: Frammenti *N. benthamiana* GR-LhG4 + pH-TOP senza induzione

3) GR-LhG4 + pH-TOP DEX-48 (Figura 5, GUS-48 a sinistra, GUS-72 a destra).

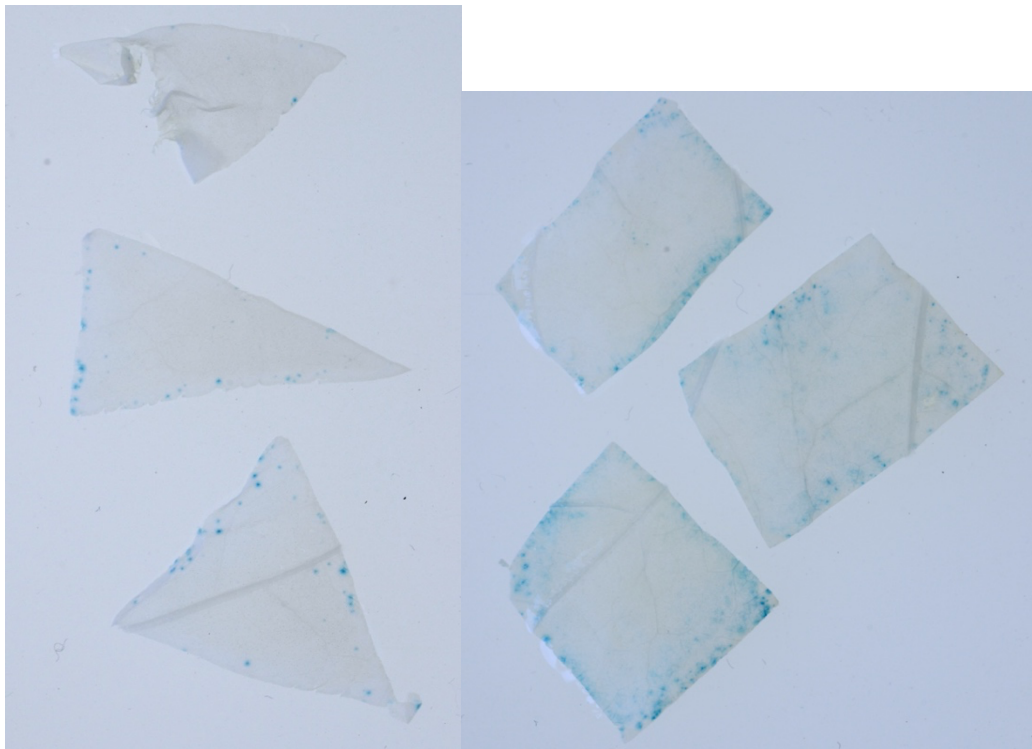


Figura 5: Frammenti *N. benthamiana* GR-LhG4 + pH-TOP indotte a 48 ore dall'infiltrazione e saggate a 48 (sinistra) e 72 (destra) ore dall'induzione

4) GR-LhG4 + pH-TOP DEX-72 (Figura 6, GUS-48 a sinistra e GUS-72 a destra).

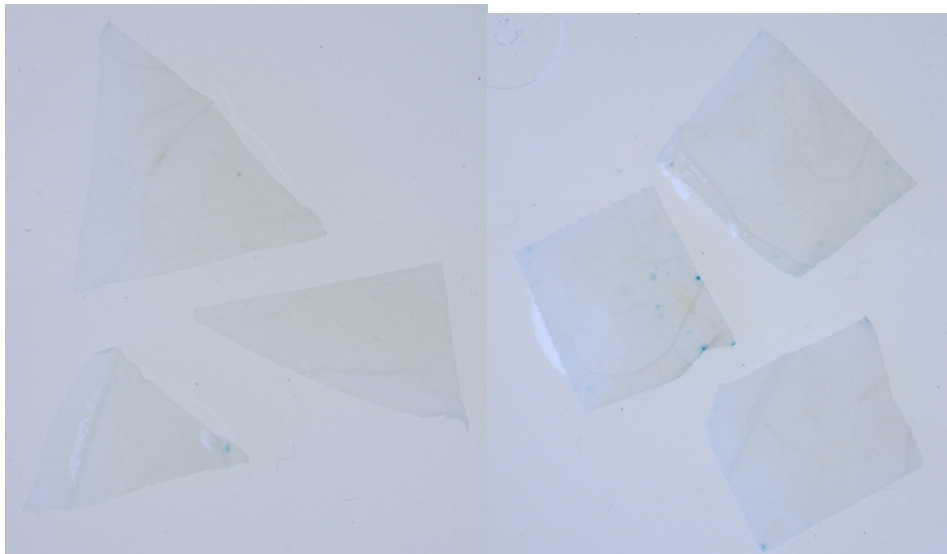


Figura 6: Frammenti *N. benthamiana* GR-LhG4 + pH-TOP indotte a 72 ore dall'infiltrazione e saggate a 48 (sinistra) e 72 (destra) ore dall'induzione

4.2 SAGGIO GUS IN *C. SATIVA*

Sono state infiltrate anche delle piante di *C. sativa* con i costrutti 35S-LhG4 + *SIMIXTA*_H-TOP + *SICD2*_pH-TOP.

Il saggio GUS è stato effettuato a 72 ore dall'infiltrazione (Figura 7).

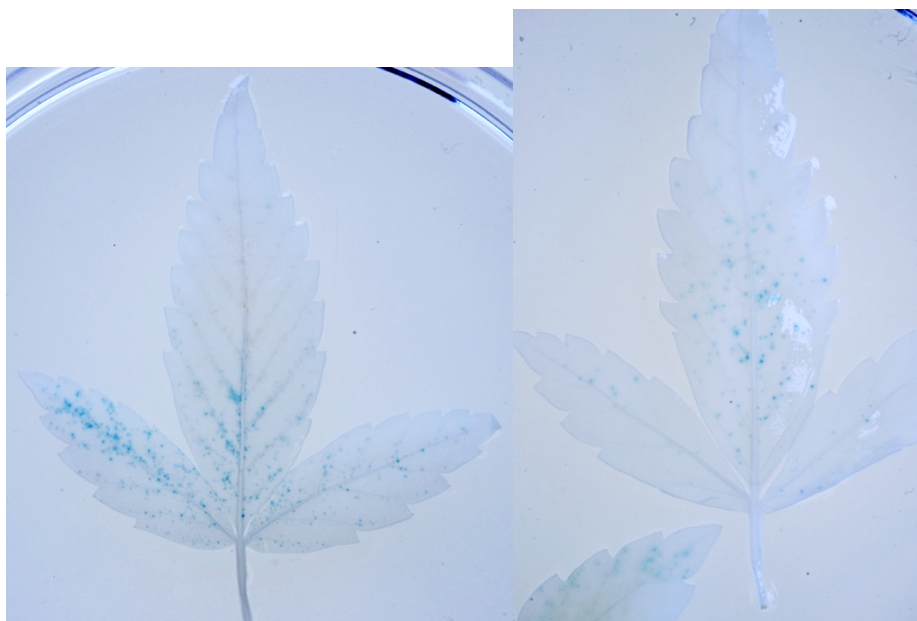


Figura 7: *C. sativa* 35S-LhG4 + *SIMIXTA*_pH-TOP + *SICD2*_pH-TOP a 72 ore dall'infiltrazione

4.3 SAGGIO FLUORIMETRICO

I valori di fluorescenza dati dall'emissione di fluorescenza di MU sono stati rilevati e riportati come la corrispondente quantità di MU in nM; infatti, ad un'intensità 10 rilevata dal fluorimetro, corrisponde 1nM di MU, quindi i valori riportati dallo strumento sono stati divisi per 10.

Le misure corrispondenti ai costrutti 2 e 4 hanno rivelato una fluorescenza ridotta, indicante una scarsa attività del promotore nella trascrizione di β -glucuronidasi, mentre il costrutto 1 (35S-LhG4) ha mostrato una maggiore quantità di nM di MU, nel campione a 72 ore dall'infiltrazione, come anche il costrutto 3 (GR-LhG4-48-DEX-48 e GR-LhG4-48-DEX-72; Figura 9).

Nel seguente grafico (Figura 8) sono riportate le rette delle misurazioni di 35S-LhG4-72: in arancione le misurazioni con 20 μ L di estratto enzimatico mentre in azzurro le misurazioni a 10 μ L.

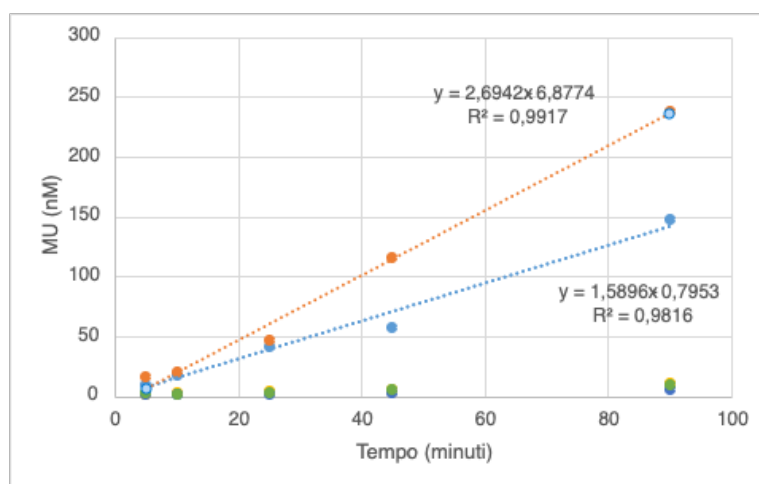


Figura 8: Grafico saggio fluorimetrico 35S-LhG4-72

Nel secondo grafico (Figura 9) invece sono rappresentate le misurazioni del costrutto 3: in giallo i valori di GR-LhG4-48-DEX-48 a 20 μ L, in verde GR-LhG4-48-DEX-72 a 20 μ L, in grigio GR-LhG4-48-DEX-48 a 10 μ L e in blu GR-LhG4-48-DEX-72 10 μ L. Anche da questo grafico è possibile osservare un'attività maggiore in relazione ad un maggiore quantitativo di estratto enzimatico, ma si evidenzia anche come il campione visualizzato a 48 ore dall'infiltrazione abbia più attività enzimatica di quello visualizzato dopo 72 ore.

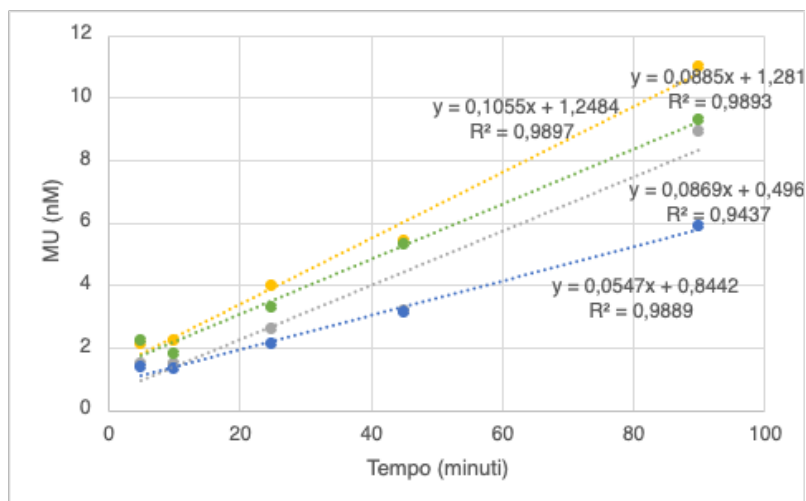


Figura 9: Grafico saggio fluorimetrico GR-LhG4-48-DEX-48/72

Nei seguenti grafici, la pendenza della retta è proporzionale alla quantità nano-molare di MU al minuto.

4.4 VALUTAZIONE DENSITA' TRICOMI

Lo scopo del seguente studio è quello di selezionare i geni che determinano una maggiore efficienza di differenziazione dei tricomi, che equivale quindi ad una maggiore densità delle strutture sulla superficie fogliare delle piante che vengono infiltrate con i diversi geni in esame.

Per valutare questa densità è necessario procedere contando il numero di tricomi sul margine della foglia di *N. benthamiana* (Figura 11), 14 giorni dopo l'infiltrazione.

Ogni gene è stato infiltrato in due piante (A e B), da ogni pianta sono state scelte tre foglie e da queste sono state scattate 3 foto per foglia, per un totale di 18 immagini per ogni gene, o combinazione di geni, testati. Sono stati poi contati i tricomi presenti sul margine fogliare.

Dai seguenti dati è stato possibile ricavare un grafico (Figura 10) con il numero di tricomi per millimetro contati per ogni costrutto:

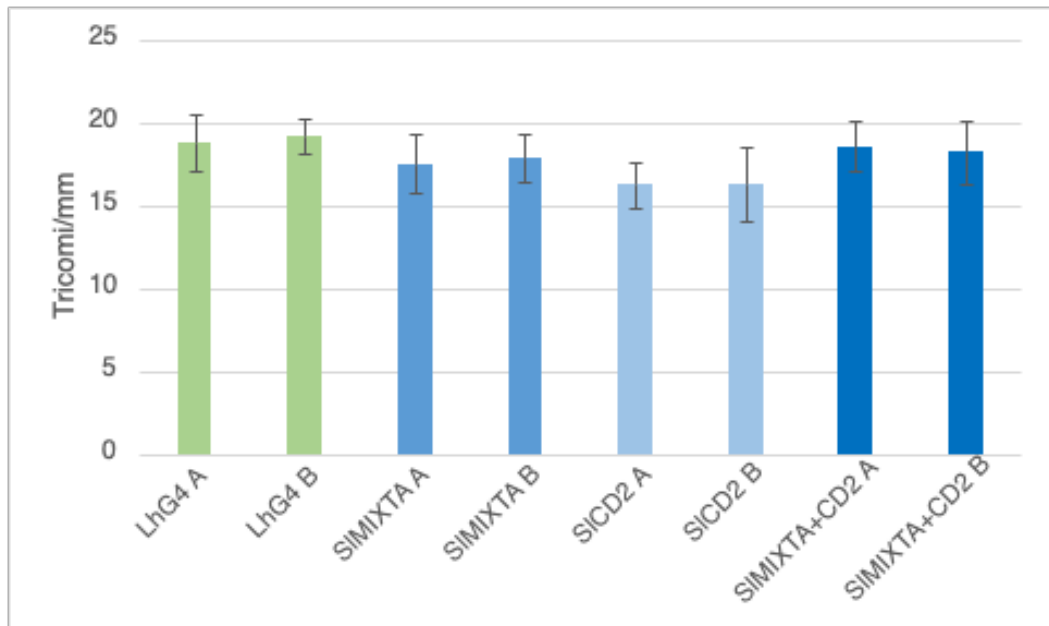


Figura 10: Grafico densità tricomi in correlazione ai geni testati

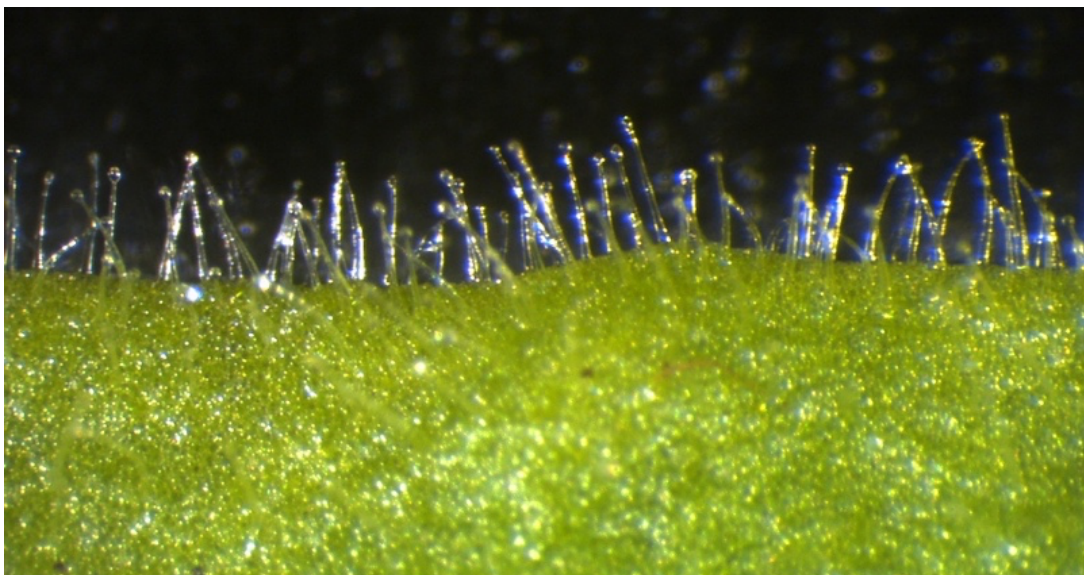


Figura 11: Tricomi sul margine di una foglia di *N. benthamiana*

5

DISCUSSIONE

Il progetto di ricerca, all'interno del quale si è inserito il mio tirocinio, si poneva come obiettivo quello di valutare sia l'efficienza di un costrutto inducibile, sia di determinare quali geni fossero più indicati nel differenziamento in tricomi, per poterli poi applicare a colture cellulari di *C. sativa*.

A questo scopo sono state svolte tre sperimentazioni:

- 1) Infiltrazione e induzione di piante di *N. benthamiana* con successivi saggi GUS istochimico e fluorimetrico, per il costrutto inducibile;
- 2) Valutazione del numero di tricomi in *N. benthamiana*, per determinare i geni più efficienti per l'induzione della loro differenziazione;
- 3) Infiltrazione e successivo saggio GUS in *C. sativa*.

Nel primo esperimento, il saggio GUS ha evidenziato come nel caso del costrutto col promotore costitutivo 35S-LhG4, vi fosse una forte espressione dell'enzima β -glucuronidasi dopo 72 ore dall'infiltrazione, mentre nel caso del costrutto inducibile ma non attivato con desametasone non ci fosse attività enzimatica rilevabile col saggio.

Per quanto riguarda i costrutti inducibili e attivati, quello che risulta avere maggiore attività è quello attivato da desametasone dopo 48 ore dall'infiltrazione e saggiato dopo 48 o 72 ore dall'induzione.

Questi risultati vengono confermati anche nel saggio fluorimetrico, che evidenzia una maggiore quantità di MU in corrispondenza del promotore costitutivo 35S-LhG4-72 ore dall'infiltrazione e dei due costrutti inducibili GR-LhG4-DEX48 a 48 e a 72 ore dall'induzione.

Il fatto che i valori più alti del costrutto inducibile siano comunque più bassi del costrutto 35S, è probabilmente dato dal fatto che, essendo il costrutto infiltrato e quindi presente in forma transiente, e oltremodo in forma inducibile quindi legato anche ad una corretta attivazione da parte del suo attivatore trascrizionale, la sua trascrizione non sarà al massimo della sua potenzialità. Non per questo però si può valutare negativamente l'esperienza, che ha comunque dimostrato l'efficacia del sistema inducibile nella mancata trascrizione in assenza di induzione.

La seconda esperienza, volta a valutare l'efficienza di differenziamento in tricomi di due geni, *SIMIXTA* e *SICD2* e la loro combinazione, ha portato invece a risultati meno evidenti.

Non è stata infatti riscontrata una variazione nel numero di tricomi nel caso di infiltrazione con il costrutto; questo risultato può essere spiegabile o con l'inefficienza dei geni testati, o con il metodo utilizzato per testarli.

In uno studio⁶, è stato sperimentato come l'espressione di questi geni, in particolare la loro combinazione *SIMIXTA* + *SICD2*, in *N. benthamiana* determini un aumento del numero di tricomi quando espressi in maniera costitutiva.

Si può dedurre quindi che l'assenza di un aumento nel numero di tricomi sia reputabile all'uso di un sistema transiente (agroinfiltrazione); inserendo un sistema costitutivo inducibile nelle colture cellulari i risultati dovrebbero essere più positivi.

La terza esperienza consisteva invece nell'infiltrazione in *C. sativa* di un costrutto 35S con i geni *SMIXTA* e *SICD2*, seguita dopo 72 ore da un saggio GUS.

Il saggio istochimico evidenzia attività enzimatica, in particolare in corrispondenza degli stomi, tramite i quali è fluita l'infiltrazione di *A. tumefaciens*.

C. sativa è ipersensibile ad *A. tumefaciens*, tende a non reagire bene all'infezione e a morire, quindi normalmente non viene infiltrata.

Nel caso sperimentato però l'infiltrazione è stata fatta tramite pompa a vuoto anziché tramite siringa (come da standard); si è così verificato come il metodo di infiltrazione tramite pompa a vuoto sia più efficiente e permetta la trasformazione transiente di *C. sativa*.

Le esperienze svolte hanno permesso di valutare la sperimentazione in colture cellulari di *C. sativa*, tramite l'utilizzo di un sistema costitutivo inducibile, utilizzando i geni *SIMIXTA* e *SICD2*.

6

BIBLIOGRAFIA

- 1 C. Chalvin, S. Drevensek, M. Dron, A. Bendahmane, and A. Boualem, "Genetic Control of Glandular Trichome Development," *Trends in Plant Science*, vol. 25, no. 5. 2020. doi: 10.1016/j.tplants.2019.12.025.
- 2 P. Romero, A. Peris, K. Vergara, and J. T. Matus, "Comprehending and improving cannabis specialized metabolism in the systems biology era," *Plant Science*, vol. 298. 2020. doi: 10.1016/j.plantsci.2020.110571.
- 3 P. Shi *et al.*, "The roles of AaMIXTA1 in regulating the initiation of glandular trichomes and cuticle biosynthesis in *Artemisia annua*," *New Phytologist*, vol. 217, no. 1, 2018, doi: 10.1111/nph.14789.
- 4 S. Ying *et al.*, "Trichome regulator SIMIXTA-like directly manipulates primary metabolism in tomato fruit," *Plant Biotechnol J*, vol. 18, no. 2, 2020, doi: 10.1111/pbi.13202.
- 5 T. Yan *et al.*, "A novel HD-ZIP IV/MIXTA complex promotes glandular trichome initiation and cuticle development in *Artemisia annua*," *New Phytologist*, vol. 218, no. 2, 2018, doi: 10.1111/nph.15005.
- 6 S. R. Haiden, P. V. Apicella, Y. Ma, and G. A. Berkowitz, "Overexpression of CsMIXTA, a Transcription Factor from *Cannabis sativa*, Increases Glandular Trichome Density in Tobacco Leaves," *Plants*, vol. 11, no. 11, 2022, doi: 10.3390/plants11111519.