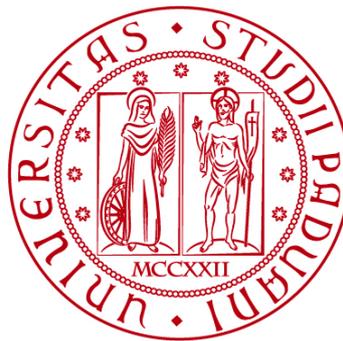


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biotecnologie**



**ELABORATO DI LAUREA**

**EFFETTO DELL'ESPRESSIONE DI DUE FATTORI DI  
TRASCRIZIONE *MYB* DI *CANNABIS SATIVA* IN *NICOTIANA  
TABACUM***

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

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

**Laureando: Riccardo Berro**

**ANNO ACCADEMICO 2023/2024**



## ABSTRACT

*Cannabis sativa* è una pianta officinale che produce una vasta serie di composti fitochimici usati in ambito farmaceutico e nutraceutico. In questa categoria rientrano i cannabinoidi, che sono dei metaboliti secondari ottenuti dalle infiorescenze femminili della pianta. Sebbene ad oggi il meccanismo biosintetico dei cannabinoidi sia noto, non si può dire altrettanto del suo meccanismo di controllo, che avviene tramite un'azione finemente regolata da fattori di trascrizione (TFs). Tra questi se ne conoscono alcuni che appartengono alla famiglia genica *MYB*, molti dei quali hanno una funzione ignota da studiare. L'obiettivo di questa ricerca mira proprio a comprendere gli effetti fenotipici di due *MYB TFs* espressi nelle ghiandole dei tricomi che fungono da unità di sintesi e di accumulo dei cannabinoidi. Si utilizzeranno differenti piante di tabacco transgeniche esprimenti soltanto uno dei due fattori o entrambi. In particolare, si effettuerà una descrizione morfologica dei tricomi di cloni di una generazione parentale e si genotipizzerà la generazione filiale generata sia per autoincroci sia per incroci fra due diversi genotipi per accumulare entrambi i caratteri. Parallelamente a questo lavoro, si ricaveranno curve di crescita di cellule in coltura ricavate dai trasformanti primari.



# INDICE

|  |     |
|--|-----|
| ABSTRACT .....   | III |
| 1. STATO DELL'ARTE.....  | 1   |
| 1.1 <i>Cannabis sativa</i> .....   | 1   |
| 1.2 Morfologia e funzione dei tricomi .....  | 1   |
| 1.2.1 Regolazione dello sviluppo dei tricomi ghiandolari .....                     | 2   |
| 1.3 I geni <i>CBD 1b (CAN738)</i> e <i>CBD 2b (CAN833)</i> .....                   | 3   |
| 1.3.1 I geni orologi <i>HIMYB8</i> e <i>HIMYB3</i> in <i>Humulus lupulus</i> ..... | 4   |
| 2. APPROCCIO SPERIMENTALE.....   | 6   |
| 2.1 Curve di crescita cellulare della generazione T0.....                          | 6   |
| 2.2 Osservazione di foglie di <i>N. tabacum</i> della generazione T1 .....         | 7   |
| 2.2.1 Diagnostica per immagini allo stereomicroscopio .....                        | 8   |
| 2.2.2 Diagnostica per immagini al microscopio invertito.....                       | 8   |
| 2.3 Protocollo per genotipizzare la generazione T2/F2 .....                        | 8   |
| 2.3.1 Raccolta dei semi di tabacco transgenici e semina su capsule Petri.....      | 9   |
| 2.3.2 Crescita dei germogli.....   | 9   |
| 2.3.3 Estrazione del DNA genomico dalle piante germinate .....                     | 10  |
| 2.3.4 Amplificazione dei geni <i>MYB</i> tramite PCR.....                          | 10  |
| 2.3.5 Corsa elettroforetica degli amplificati .....                                | 11  |
| 3. RISULTATI E DISCUSSIONE .....   | 12  |
| 3.1 Confronto delle curve di crescita .....  | 12  |
| 3.2 Valutazione della densità e della morfologia dei tricomi.....                  | 13  |
| 3.3 Genotipizzazione delle piante della generazione T2/F2 .....                    | 16  |
| 4. CONCLUSIONI.....  | 19  |
| MATERIALE SUPPLEMENTARE .....  | 20  |
| BIBLIOGRAFIA .....   | 21  |



# 1. STATO DELL'ARTE

## 1.1 *Cannabis sativa*

*Cannabis sativa* è una pianta erbacea annuale dicotiledone diploide ( $2n=20$ ) della famiglia delle *Cannabaceae*.

Originaria dell'Asia Centrale e Sudorientale, questa pianta, oggi diffusa in tutto il mondo, è stata addomesticata dall'uomo già dal III° millennio a.C. per via dei suoi molteplici scopi di utilizzo (McPartland et Small, 2020). La pianta ha un elevato interesse commerciale in quanto i suoi fusti sono usati nella produzione di fibre, i suoi frutti, nelle culture orientali, sono usati sia come medicinali sia come cibo, e le sue radici sono usate per trattare infiammazioni e dolore (Xie et al., 2023). Ma la canapa è anche nota per la produzione, nelle infiorescenze femminili, dei cannabinoidi, le cui proprietà medicinali e ricreative hanno spinto negli ultimi decenni a livello globale la richiesta di liberalizzazione della coltivazione a livello industriale. Infatti, *C. sativa* è una pianta con un profilo metabolico unico nel suo genere in quanto produce e immagazzina nei tricomi ghiandolari più di 560 molecole fitochimiche di diversa natura, come alcaloidi, terpeni e fenoli (Bautista et al., 2021), di cui i cannabinoidi sono i metaboliti secondari più abbondanti.

In particolare, questi composti sono dei terpenofenoli esistenti sia in una forma carbossilata, nei tessuti vivi, sia in una decarbossilata, a seguito di reazioni non enzimatiche (Xie et al, 2023). A loro volta, i cannabinoidi sono suddivisi, in base alla loro struttura chimica, in 11 sottoclassi, delle quali le più importanti sono due: il THC ( $\Delta^9$  – Tetraidrocannabinolo) e il CBD (cannabidiolo). Il primo è una sostanza psicoattiva responsabile degli effetti psicotropi per i quali è conosciuta comunemente la canapa (marijuana). Il CBD, invece, è un composto non psicoattivo, considerato “safe” per l'uomo, con proprietà farmacologiche antibatteriche, antinfiammatorie, ansiolitiche e antiepilettiche (Atalay et al., 2020; Blessing et al. 2015).

Ad oggi, le due principali vie di sintesi dei cannabinoidi sono note, così come lo è la morfologia dei tricomi ghiandolari, nei quali avvengono tali reazioni metaboliche. Ciò che si conosce ancora poco però è il meccanismo di regolazione della sintesi dei cannabinoidi e dello sviluppo del tricoma, che sono gestiti in maniera molto fine da specifici fattori di trascrizione (TFs). L'ambito di ricerca svolto da questo progetto mira proprio a comprendere la funzione di due di questi TFs denominati *CBD 1b* e *CBD 2b*, identificati nelle ghiandole dei tricomi.

## 1.2 Morfologia e funzione dei tricomi

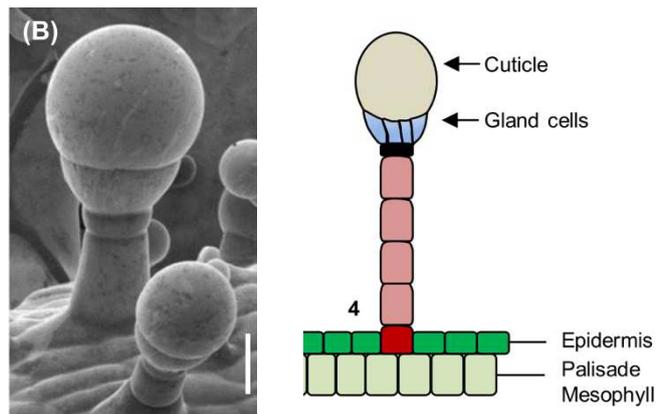
Come accennato, la sintesi dei cannabinoidi e, più in generale, dei metaboliti secondari avviene a livello di specifiche strutture secretrici differenziate dell'epidermide: i tricomi. Essi possono essere considerati come una “fabbrica di produzione e un magazzino di composti fitochimici”.

Questo genere di tricomi è definito come ghiandolare, in quanto la sua funzione è appunto quella di sintetizzare, accumulare e rilasciare all'occorrenza composti fitochimici che svolgono varie funzioni, ma esistono anche tricomi non

ghiandolari la cui funzione primaria, invece, è di proteggere l'epidermide e le strutture sottostanti da stress abiotici, senza secrezione di composti (Xie et al., 2023).

*C. sativa* presenta sia tricomi non ghiandolari, che sono divisi in due ulteriori tipi che svolgono un ruolo puramente di protezione della pianta, sia tricomi ghiandolari, che producono e immagazzinano principalmente cannabinoidi. Di questi tricomi se ne identificano tre tipi: tricomi peduncolari, sessili e bulbosi. Ciascuno di essi varia per la diversa lunghezza dello stelo, che risulta essere ben presente in quelli peduncolari (12-16 cellule del disco), intermedio in quelli sessili (8 cellule del disco) e assente in quelli bulbosi (Xie et al., 2023).

In generale, i tricomi ghiandolari sono presenti in circa il 30% di tutte le piante vascolari, sono pluricellulari e si compongono di tre parti. Ossia, di una base che collega il tricoma alle altre cellule dell'epidermide, di una ghiandola che secerne specifici metaboliti, e di uno stelo di lunghezza variabile che collega base e ghiandola. La secrezione avviene da parte delle cellule del disco, che secernono, tramite delle vescicole, i metaboliti e gli enzimi per il loro processamento in una cavità di accumulo che può essere sia subcuticolare (Figure 1 e 2) sia intercellulare (Chalvin et al., 2020).



**Figure 1 e 2:** esempio di un tricoma maturo ghiandolare, notare la presenza della cuticola sopra la ghiandola; di fianco un'illustrazione schematica delle parti che lo compongono. (Figure tratte da Chalvin et al., 2020).

### 1.2.1 Regolazione dello sviluppo dei tricomi ghiandolari

Nonostante le loro piccole dimensioni, i meccanismi di sviluppo delle differenti morfologie dei tricomi ghiandolari, che hanno diretta conseguenza su quali metaboliti secondari produrranno, non sono ancora noti (Xie et al., 2023). Visto però che la loro struttura morfologica (base, stelo, ghiandola) è sempre la stessa, si è ipotizzato che tutti i tricomi secretori si sviluppino seguendo dei passaggi chiave comuni. Essenzialmente, questi passaggi consistono in una serie di segnali di differenziazione inviati dalle cellule dell'epidermide verso altre specifiche cellule, le quali inizieranno lo sviluppo in tricoma dividendosi seguendo uno specifico numero di divisioni e specifiche orientazioni, inizieranno a modificare l'ultrastruttura e attiveranno le vie di sintesi metaboliche (Chalvin et al., 2020).

In questo quadro appena delineato, un ruolo cruciale di regolazione lo hanno alcuni fattori di trascrizione (TFs) che sono stati caratterizzati nelle specie

vegetali di *Artemisia annua* e in pomodoro (*Solanum lycopersicum*). In particolare, questi TFs, che hanno un effetto regolatorio positivo o nella specializzazione metabolica o nel differenziamento delle cellule epidermiche in tricomi, appartengono alle due famiglie R2R3-MYB e HD-ZIP IV.

Per quanto concerne la famiglia R2R3-MYB, come riportato nel lavoro di S. F. Brockington e colleghi (2013), i geni per questi fattori appartengono alle sottofamiglie geniche MIXTA e MIXTA-like.

In tutto sono stati identificati tre geni, *AaMYB1* (un MIXTA) e *AaMIXTA1* (un MIXTA-like) in *A. annua*, e *SIMX1* (un MIXTA-like probabile ortologo di *AaMIXTA1*) in pomodoro. Se sovraespressi, tutti e tre hanno mostrato, nelle rispettive specie vegetali, la capacità di indurre un aumento delle densità dei tricomi ghiandolari; viceversa, se i due MIXTA-like vengono sottoespressi si è assistito ad una diminuzione delle densità di tricomi (Chalvin et al., 2020). Inoltre, questi TFs possono agire interagendo con altri fattori, formando dei complessi regolatori che agiscono su ulteriori TFs a valle. Un esempio è il complesso *AaMIXTA1/AaHD8*, che induce l'espressione del gene HD-ZIP IV *AaHD1*, un regolatore positivo per l'induzione del pelo in *A. annua* (Yan et al., 2018).

Anche in *Cannabis sativa* è stata scoperta la presenza di alcuni geni MYB che potrebbero essere coinvolti nei processi di formazione del pelo ghiandolare e nella regolazione delle vie di sintesi dei cannabinoidi. Per esempio, il fattore *MIXTA1* di canapa, se sovraespresso transientemente nelle foglie di *Nicotiana tabacum*, è stato dimostrato che porta ad un aumento della densità dei tricomi (Haiden et al. 2022).

Per quanto concerne il lavoro di questa tesi, anche i due fattori di *C. sativa* oggetto di studio, *CBD 1b* e *CBD 2b*, sono espressi nelle ghiandole dei tricomi da due omonimi geni MYB chiamati anche, rispettivamente, *CAN738* e *CAN833*.

### 1.3 I geni *CBD 1b* (*CAN738*) e *CBD 2b* (*CAN833*)

I geni *CBD 1b* e *CBD 2b*, i cui effetti dell'espressione sono oggetto di studio di questo lavoro, sono stati identificati per la prima volta nelle ghiandole dei tricomi di marijuana Skunk #1, una varietà di *C. sativa* in cui la via biosintetica del  $\Delta^9$  – Tetraidrocannabinolo (THC) è mediamente attiva (Marks et al., 2009).

La scoperta dei due geni si inserisce all'interno di un lavoro di trascrittomico più ampio, compiuto da Marks e colleghi (2019), volto a identificare i geni che esprimono nella varietà Skunk gli enzimi e i fattori regolatori coinvolti nella sintesi del THC.

In particolare, venne analizzata una libreria di cDNA formata dai retrotrascritti isolati dalle ghiandole dei tricomi delle infiorescenze, delle brattee e delle foglie di piante Skunk femminili. Dalla libreria, composta da oltre 100.000 ESTs, vennero sequenziati 2.112 cloni e, successivamente, tramite un lavoro di allineamento dei tag espressi, si ottennero oltre 1.000 contigs/unigeni.

Per ricercare i fattori di trascrizione, gli oltre 1.000 unigeni, vennero confrontati con i TFs noti di *Arabidopsis thaliana*. Dal confronto si constatò che 80 unigeni codificavano per proteine simili ai fattori espressi nella pianta modello. Di questi, undici contenevano domini MYB di legame al DNA, pertanto potenzialmente potevano appartenere alla famiglia R2R3-MYB. Quattro di questi geni MYB

furono isolati sia in foglie che in tricomi di *C. sativa*, pertanto, tramite qPCR, fu testata separatamente l'espressione dei corrispettivi quattro putativi TFs.

Lo studio rilevò che i geni *CBD 1b* e *CBD 2b*, denominati nell'articolo rispettivamente *CAN738* e *CAN833*, erano gli unici espressi preferenzialmente nelle ghiandole rispetto alle foglie, con un'espressione che nelle ghiandole era maggiore rispettivamente di 586 e 954 volte.

Sebbene la funzione dei putativi TFs *CBD 1b* e *2b* non sia ancora stata studiata, l'omologia dei rispettivi geni *CAN738* e *CAN833* con i geni *AtMYB12* e *AtMYB112* di *A. thaliana*, i cui effetti dell'espressione sono noti, ha fornito ipotesi sul loro ruolo biologico. È logico pensare che *CAN833* sia coinvolto nei meccanismi di tolleranza allo stress ossidativo verso quei ROS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) che nella biosintesi dei cannabinoidi vengono prodotti nell'ultima reazione, mediata da ossidociclasti, di sintesi di THCA, il principale precursore del THC. Infatti, i mutanti *bosl* per il gene *AtMYB112* di *A. thaliana* presentano, oltre ad una maggiore suscettibilità verso certi patogeni, anche una ridotta tolleranza verso lo stress ossidativo (Marks et al., 2009; Duraisamy et al., 2018). *AtMYB12*, invece, codifica per un TF regolatore della sintesi dei flavonoidi, per cui è logico pensare un'azione simile anche per *CAN738*, per esempio nei fiori e nelle foglie di *C. sativa*. Però, la sua espressione accentuata nelle ghiandole dei tricomi, in cui la via biosintetica di questi pigmenti non è presente, ha fatto supporre che *CBD 1b* sia invece un fattore regolatore di altri metaboliti secondari con biosintesi attive nei tricomi, primo fra tutti quello di sintesi di THC/THCA.

### 1.3.1 I geni ortologhi *HIMYB8* e *HIMYB3* in *Humulus lupulus*

Oltre in *Arabidopsis*, *CBD 1b* e *CBD 2b* hanno omologia anche in luppolo (*Humulus lupulus*) rispettivamente con i geni *HIMYB8* e *HIMYB3*, le cui funzioni sono state caratterizzate.

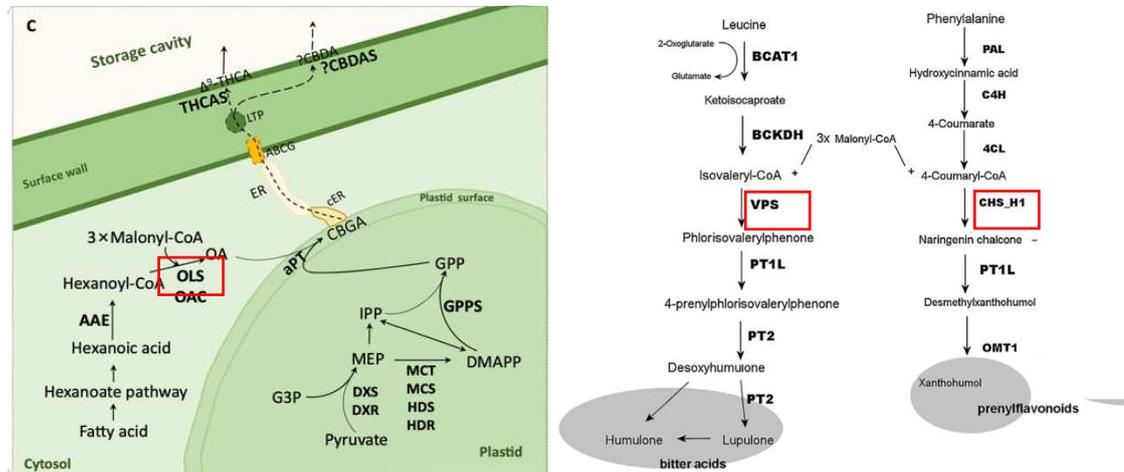
*Humulus lupulus* è una pianta erbacea perenne appartenente, come *C. sativa*, alla famiglia delle *Cannabaceae*. Comunemente conosciuta per il suo impiego nell'industria birraria, anche questa pianta è caratterizzata da un particolare profilo metabolico, i cui metaboliti secondari, in particolare i flavonoidi, prodotti e immagazzinati nelle ghiandole dello strobilo, oltre ad aromatizzare la bevanda, trovano impiego nell'industria farmaceutica e medica grazie alle loro proprietà antiossidanti e anticancerogene (Gatica-Arias et al, 2012).

Le vie di sintesi dei flavonoidi sono regolate da specifici TFs, tra i quali rientrano anche quelli espressi da *HIMYB8* e *HIMYB3* (Kocábek et al., 2018; Gatica-Arias et al, 2012).

Il gene *HIMYB8*, omologo anche ad *AtMYB12*, se sovraespresso in piante di luppolo o in foglie di *Arabidopsis* e di *Nicotiana benthamiana* transgeniche, ha dimostrato di svolgere un ruolo modulatore di transattivazione dei promotori di alcuni geni coinvolti nella via biosintetica dei flavonoidi (Kocábek et al., 2018). Se sovraespresso in luppolo, un'attività transattivatoria simile è stata rilevata anche per il gene *HIMYB3* (Gatica-Arias et al, 2012).

Le specie vegetali di *Humulus* e *Cannabis* spesso condividono intermedi comuni nelle vie del metabolismo secondario. In particolare, la sintesi del THCA in canapa e di humulone (un acido) e del calcene xantumolo (un flavonoide) in

luppolo avvengono a livello delle ghiandole dei tricomi delle brattee tramite l'azione della stessa categoria di enzimi delle polichetide sintasi (PKS) (Figure 3 e 4) (Marks et al., 2009).



**Figure 3 e 4:** a sinistra le due vie di sintesi del precursore THCA in *Cannabis*, accennati in 1.1: la via di sintesi citosolica del polichetide OA e la via plastidiale di sintesi MEP. A destra le vie metaboliche di humolone e xantumolo in *Humulus*.

Nei riquadri rossi sono evidenziati i differenti enzimi PKS utilizzati negli intermedi di sintesi. (Figura 3 tratta da Xie et al., 2023 e Figura 4 tratta da Kocábek et al., 2018).

Il promotore di PKS è stato dimostrato che possiede vari elementi in *cis* tra cui un *Myb-box* di legame a fattori MYB (Duraisamy et al., 2018). È logico quindi supporre che gli enzimi PKS siano soggetti a regolazione trascrizionale.

In *Cannabis*, il promotore del gene codificante l'enzima acido olivetolico sintasi (OLS), coinvolto nella sintesi del polichetide acido olivetolico (OA), precursore del THCA, è stato oggetto di studio, da parte di G. S. Duraisamy e colleghi (2018), in un esperimento volto a caratterizzare gli effetti sul promotore di vari TFs di luppolo, tra cui *HIMYB3*. In particolare, tramite la trasformazione di foglie di *Nicotiana benthamiana* con vettori pro PKS::GUS e successiva coinfiltrazione dei TFs nelle stesse, si è misurata l'attività del promotore tramite rilevazione dell'attività GUS.

Per quanto concerne il *HIMYB3 TF*, lo studio ha rilevato una transattivazione del promotore sia con il fattore singolo, sia con il fattore congiuntamente ad altri TFs in complessi regolatori.

Pertanto, la caratterizzazione dei geni ortologhi in luppolo ha chiarito non solo il loro ruolo, a livello dei tricomi, come regolatori positivi nelle vie di metaboliti secondari specifici della pianta, ma anche, nel caso di *HIMYB3*, il coinvolgimento nella regolazione di enzimi PKS del metabolismo dei cannabinoidi. Questo, aggiunto al fatto che il luppolo è la specie più prossima a *C. sativa*, fornisce informazioni sulle possibili funzioni di *CBD 1b* e *CBD 2b*, i cui effetti fenotipici di espressione, in questo lavoro, verranno analizzati in piante transgeniche di *Nicotiana tabacum*.

## 2. APPROCCIO SPERIMENTALE

### 2.1 Curve di crescita cellulare della generazione T0

In questa fase del progetto si ricavano curve di crescita di colture cellulari transgeniche di *Nicotiana tabacum*, in particolare si studiano le loro tempistiche di duplicazione a seguito del cambio del medium di coltura.

Le curve di crescita vengono ricavate dopo il cambio del terreno, che avviene ogni 8-10 giorni, reso necessario dall'impovertimento del medium e dall'accumulo di prodotti di scarto del metabolismo cellulare.

Per garantire l'ossigenazione ed evitare la formazione di aggregati, le cellule vengono fatte crescere in sospensione in beute da 250 mL riempite soltanto per 1/5 del loro volume, ossia per un volume totale di 50 mL. Il cambio avviene, con l'ausilio di una pipetta sierologica, prelevando dalla coltura madre 1,5 mL di cellule, il più possibile non aggregate, e trasferendole in una nuova beuta con 48,5 mL di terreno fresco. Il terreno di coltura, la cui composizione è riportata nella Tabella 1, è un medium liquido specifico per la crescita di calli di tabacco con sali MS, vitamine, saccarosio e ormoni.

| Terreno di crescita per calli di tabacco |                 |           |
|--|-----------------|-----------|
|  | Componente      | Quantità  |
| Sali e vitamine                          | MS con vitamine | 4,4 g/L   |
| Regolatori di crescita                   | 2,4-D           | 0,5 mg/L  |
|  | 6-BAP           | 0,25 mg/L |
| Fonte di carbonio                        | Saccarosio      | 20 g/L    |
| Gelificante                              | /               |           |
| pH                                       | 5,5             |           |

**Tabella 1:** terreno di crescita usato per mantenere e amplificare le colture di tabacco transgeniche.

In questo lavoro, le colture oggetto di studio sono state ricavate da piante T0, ossia piante trasformate con agrobatterio che esprimono alcune il transgene *CBD 1b* e altre *CBD 2b*. In particolare, le colture provengono da tre differenti piante: il wild-type di controllo (wt), il clone 2 transgenico esprime *CBD 1b* (CBD 1b #2) e il clone 1 transgenico esprime *CBD 2b* (CBD 2b #1) (Figura 5).

Vengono preparate in tutto sei colture, ossia due, che vengono chiamate A e B, per ciascuna delle tre colture madri di partenza. Dopo un'incubazione di sette giorni in agitazione per garantire una corretta ossigenazione e in una cella termica a 22°C, si ricavano i valori di crescita cellulare. Per questo scopo, si misurano i volumi delle cellule e ammassi cellulari sedimentati per centrifugazione. Per garantire la sedimentazione tramite centrifuga e la lettura del valore del volume le colture vengono trasferite in tubi Falcon graduati (Figura 6). Al termine della misurazione, ciascuna coltura viene rimessa nella corrispettiva beuta. Visto che l'approccio qui descritto espone le colture a facili contaminazioni, è cruciale lavorare in sterilità sotto cappa, usando il becco Bunsen al termine di ogni passaggio.



**Figura 5 (sinistra):** in ordine a partire da sinistra le colture madri wt, CBD 1b #2, CBD 2b #1.  
**Figura 6 (destra):** due tubi Falcon con a fianco la coltura wt (A), della quale verrà misurato il volume cellulare.

## 2.2 Osservazione di foglie di *N. tabacum* della generazione T1

In quest'altra fase del progetto si osservano i tricomi sulle foglie sia di differenti cloni di *N. tabacum* della generazione T1, generata per autoincroci da piante trasformate T0, sia di una pianta wild-type, usata come controllo. In particolare, le linee oggetto d'analisi sono quattro, alcune sovraesprimenti *CBD 1b* e altre *CBD 2b*. Sono presenti, inoltre, più individui per linea:

- il clone 2, che esprime *CBD 1b*, presenta due individui 2.3 e 2.2, entrambi caratterizzati da un particolare fenotipo a livello di foglie e fiori rispetto al wt (Figure 7 e 8);
- il clone 7, che esprime *CBD 1b*, presenta due individui 1.2 e 1.3, entrambi con fenotipo simile al wt;
- il clone 1, che esprime *CBD 2b*, presenta due individui 7.1 e 7.3, anch'essi con fenotipo simile al wt;
- il clone 13, che esprime *CBD 2b*, presenta un solo individuo con fenotipo simile al wt.



**Figure 7 e 8:** l'esemplare 2.2 del clone CBD 1b #2. A sinistra, particolare della corolla a fiore doppio; a destra, particolare delle foglie con pelo accentuato.

### 2.2.1 Diagnostica per immagini allo stereomicroscopio

Per la diagnostica per immagini si usa uno stereomicroscopio Leica MZ16. Si osservano i tricomi lungo la venatura principale di foglie provenienti dal wild-type e dai quattro cloni distinti, compresi anche tutti gli individui per clone accennati in 2.2. In tutto quindi si prelevano otto foglie, una per ciascuna pianta, con l'ausilio di una lametta sartoria (Figura 9). Per preparare il campione si recidono delicatamente le foglie con la lametta lungo i margini della venatura.



**Figura 9:** le otto foglie appena recise su cui si osserveranno dei tricomi allo stereomicroscopio.

Dopo l'osservazione al microscopio, per ciascuna foglia si scattano tre foto, dalle quali si contano quanti tricomi sono presenti in una porzione di venatura di lunghezza 2,5 mm. Tale lunghezza, che funge da unità di misura per la conta, è stata misurata usando il software per l'elaborazione e l'analisi di immagini scientifiche ImageJ.

### 2.2.2 Diagnostica per immagini al microscopio invertito

Una successiva diagnostica per immagini si effettua usando un microscopio invertito Leica DMI4000 con ingrandimento 20x. Lo scopo è osservare la morfologia dei tricomi lungo i bordi della foglia e lungo la venatura principale. Si prelevano, sempre con una lametta sartoria, una foglia dal wild-type, e una ciascuna dagli individui transgenici 2.2, 1.3, 7.1, per un totale di quattro foglie. Per ciascuna foglia, inoltre, vengono scattate due foto per il bordo e due per la venatura.

## 2.3 Protocollo per genotipizzare la generazione T2/F2

Sono state genotipizzate piante di *N. tabacum* generate da diversi incroci fra cloni *CBD 1b* e *CBD 2b* della generazione T1, effettuati allo scopo di ottenere piante sovraesprimenti entrambi i transgeni. Ciascun incrocio è stato allestito impollinando un fiore emasculato con il polline di un'altra pianta o della stessa per generare gli autoincroci.

Le generazioni filiali sono derivate in tutto da quattro autoincroci T2 e da quattro incroci fra due piante diverse F2.

- Gli autoincroci T2 allestiti fra cloni T1 sono:  
(1b #2 x 1b #2); (1b #7 x 1b #7); (2b #1 x 2b #1); (2b #13 x 2b #13).
- Gli incroci F2 allestiti fra cloni T1 sono:  
(♂ 2b #13 x ♀ 1b #7); (♂ 2b #13 x ♀ 1b #2); (♂ 2b #1 x ♀ 1b #2);  
(♂ 1b #7 x ♀ 2b #1).

### 2.3.1 Raccolta dei semi di tabacco transgenici e semina su capsule Petri

Come primo passaggio, si sono prelevati i semi di ogni incrocio dai frutti delle piante parentali. Il frutto di tabacco è una capsula bislunga, membranosa, a due logge, che può contenere da una decina fino anche a qualche migliaio di semi. Perciò, per raccoglierne il più possibile, dopo aver aperto la capsula su un foglio di carta, questi vengono setacciati con l'ausilio di un retino di metallo e successivamente vengono raccolti su un secondo foglio e infine trasferiti in una provetta Eppendorf per la loro conservazione.

Di ciascuno degli otto tipi di semi, ne vengono fatti germinare alcune decine in diverse capsule Petri. In ciascuna viene fornito un supporto solido, su cui far crescere i semi, costituito da un dischetto di carta che viene imbevuto con dell'acqua. Le piastre vengono tenute in una cella termica a temperatura costante attorno i 20°C per 12 giorni.

### 2.3.2 Crescita dei germogli

Come secondo passaggio, si procede a piantare i semi germogliati in vassoi per la germinazione da dodici celle. Dalle piastre sono stati selezionati 4 semi per ciascun autoincrocio T2 e 12 semi per ciascun incrocio F2. Sono stati usati in tutto sei germinatori, precedentemente riempiti con del terriccio universale, piantando un singolo seme in ciascuna cella (Figura 10). Infine, i germogli vengono fatti sviluppare comprendo i germinatori con le rispettive cupole e lasciandoli sviluppare in serra per 15 giorni.



**Figura 10:** uno dei sei germinatori all'ottavo giorno dalla semina.

### 2.3.3 Estrazione del DNA genomico dalle piante germinate

Per capire quali piante della generazione T2/F2 esprimano i due geni *CBD* di canapa, occorre estrarre per prima cosa il loro DNA genomico.

Innanzitutto, si prepara il tampone di estrazione composto da una miscela con 1 volume di buffer di estrazione del DNA, 1 volume di buffer per la lisi del nucleo e 0,4 volumi di sarkosyl 5%, a cui si aggiunge 0,38g/100mL di sodio bisolfito ( $\text{NaHSO}_3$ ). Successivamente, in differenti eppendorf, si prelevano 100 mg di tessuto vegetale, corrispondente ad un pezzo di foglia o ad una fogliolina intera delle piante cresciute in serra, e, in ciascuna provetta, si allestisce l'estrazione aggiungendo 250  $\mu\text{L}$  del tampone di estrazione e omogeneizzando il tessuto per qualche secondo con un pestello di plastica. Si aggiungono poi alla miscela altri 500  $\mu\text{L}$  di tampone di estrazione e si incuba il tutto a 65°C per un'ora. Trascorso il tempo, vengono aggiunti 750  $\mu\text{L}$  di una soluzione 24:1 di cloroformio e alcol isoamilico, poi si agita la soluzione con forza per 30 secondi e infine la si centrifuga per 10 minuti a 10.000 rpm. L'aggiunta del cloroformio fa precipitare le proteine nella fase organica più densa, lasciando il DNA nella fase acquosa superficiale al termine della centrifuga. La fase acquosa viene poi prelevata con una pipetta e spostata in una nuova eppendorf, a cui si aggiungono altri 750  $\mu\text{L}$  di isopropanolo per far precipitare il DNA. Si procede centrifugando la provetta a 10.000 rpm per 5 minuti e, infine, si elimina il surnatante con una pipetta cercando di toccare il meno possibile il pellet di DNA, che viene poi lavato con etanolo 70%. L'estrazione termina risospesando l'acido nucleico con l'aggiunta di tampone TE. I campioni, infine, sono conservati a -20°C.

### 2.3.4 Amplificazione dei geni *MYB* tramite PCR

A questo punto, per verificare la presenza dei geni target *MYB*, si procede per PCR utilizzando coppie di primer specifici rilevanti o *CBD 1b* o *CBD 2b*. A questo scopo, vengono preparati in eppendorf da 0,2 mL 20  $\mu\text{L}$  di mix con Taq Mix Red (PCRBiosystems), DNA genomico, acqua e i primer forward (F) e reverse (R). La composizione dei reagenti della miscela è riportata nella Tabella 2.

| Reagenti                     | Volume ( $\mu\text{L}$ ) |
|------------------------------|--------------------------|
| Taq Mix Red (PCRBio)         | 10                       |
| Primer F                     | 0,8                      |
| Primer R                     | 0,8                      |
| DNA genomico                 | 3                        |
| H <sub>2</sub> O             | 5,4                      |
| <b>Volume totale miscela</b> | <b>20</b>                |

**Tabella 2:** composizione della miscela di amplificazione per la rilevazione dei geni *EF*, *CBD 1b* e *CBD 2b* nella generazione F2/T2.

Le mix vengono poi messe in termociclatore a condurre una PCR a 40 cicli composti da una fase di denaturazione della doppia elica a 95°C per 15", una fase di ibridazione dei primer a 60°C per 15" e una fase di estensione del target a 72°C per 120".

Per ciascun clone T2/F2 si allestiscono tre differenti miscele di amplificazione utilizzando differenti coppie di primer, una coppia è specifica per amplificare il gene *CBD 1b*, un'altra per amplificare il gene *CBD 2b* e infine una terza coppia amplifica il gene per il fattore di allungamento traduzionale *EF*, usato come gene di controllo in quanto specifico e caratteristico nelle piante di tabacco.

Quest'ultima coppia di primer amplifica una porzione del gene bersaglio corrispondente a 400 bp, mentre le altre due coppie amplificano una porzione dei loro geni bersaglio corrispondente a circa 150 bp. Le sequenze dei primer usati e la lunghezza degli amplificati sono riportati nelle Tabelle Supplementari 1,2,3.

### 2.3.5 Corsa elettroforetica degli amplificati

Per visualizzare se si sia formato un amplificato, al termine dei cicli in termociclatore, gli ampliconi vengono fatti correre su un gel di agarosio al 1,2%.

Il gel è prodotto sciogliendo al microonde l'agar addizionato in un tampone TAE 1x, a volume variabile a seconda di quante vasche si vuole riempire. Al prodotto viene poi aggiunto l'intercalante Midori Green a concentrazione 4 $\mu$ L/100mL.

In ogni pozzetto vengono caricati 10  $\mu$ L di amplificato di ciascun clone. Con la stessa quantità, viene caricato anche un controllo negativo costituito da una reazione di PCR priva di DNA. Vengono, inoltre, caricati 5  $\mu$ L del marcatore di peso molecolare PCRBio Ladder IV 1.5 Kb (Figura 16), indispensabile per la lettura delle bande.

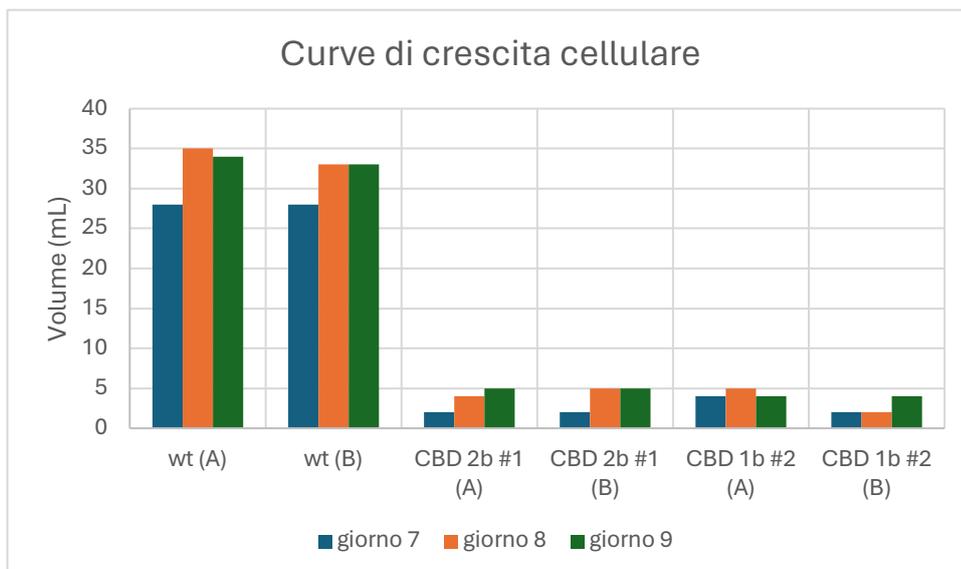
Per ciascun clone si fanno correre prima la miscela di amplificazione con primer per la rilevazione del gene *EF*, e poi le due miscele con i primer specifici per i due *MYB*. Questa procedura è resa necessaria poiché la rilevazione del gene *EF* funge da controllo positivo e permette fin da subito di escludere errori durante la preparazione della miscela o durante l'estrazione dell'DNA genomico e, quindi, di verificare che gli eventuali risultati negativi delle due successive corse siano validi.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.1 Confronto delle curve di crescita

Il volume cellulare sedimentato è stato misurato al settimo, ottavo e nono giorno dall'inoculo delle cellule nel terreno.

In tutto si sono quindi ottenute tre serie di dati per ciascuna delle sei colture, denominate wt (A), wt (B), CBD 1b #2 (A), CBD 1b #2 (B), CBD 2b #1 (A), CBD 2b #1 (B) (Figura 11). I dati sono riportati nell'istogramma sottostante:



**Figura 11:** da destra, le colture wt (A), wt (B), CBD 2b #1 (A), CBD 2b #1 (B), CBD 1b #2 (A), CBD 1b #2 (B) al nono giorno dall'inoculo.

Guardando le curve risulta che, a sette giorni dall'inoculo e per i successivi due giorni, le colture di controllo (wt (A) e wt (B)) sono le uniche cresciute in modo rapido e regolare nel terreno, in quanto già stabilizzate. Infatti, sebbene in tutte il volume cellulare misurato è sempre maggiore di 1,5 mL, cosa che evidenzia che le cellule non sono rimaste soltanto vitali, ma sono anche cresciute, il tasso di

crescita per le colture transgeniche è rimasto molto basso, tanto che non è mai stato misurato un volume cellulare oltre i 5 mL in nessuna coltura. Il fatto che le colture transgeniche non si siano stabilizzate è confermato anche visivamente dalla Figura 11, in cui si vede chiaramente la maggiore densità e la minore trasparenza del mezzo delle colture wt rispetto alle altre, nelle quali, invece, sono presenti prevalentemente solo aggregati cellulari molto compatti.

Dato il differente stato delle colture transgeniche e di quelle wt utilizzate come controllo, le misure effettuate non consentono di osservare un eventuale effetto dei geni *CBD* sulla crescita cellulare.

Per avere un risultato differente si potrebbero filtrare le colture transgeniche, in modo da evitare di prelevare aggregati cellulari, come i calli solidi, che richiedono tempo per la stabilizzazione e pertanto non sono idonei alla crescita nel terreno fresco nel breve periodo. Per far questo, prima di procedere con il cambio, le colture vengono setacciate con un filtro a maglie da 0,5 mm, in modo da separare i calli più grossi dalle cellule. Il filtrato viene raccolto in un bicchiere di vetro da cui, seguendo il procedimento in 2.1, verrà raccolta l'aliquota di 1,5 mL di cellule per ottenere la nuova coltura da cui calcolare la curva di crescita.

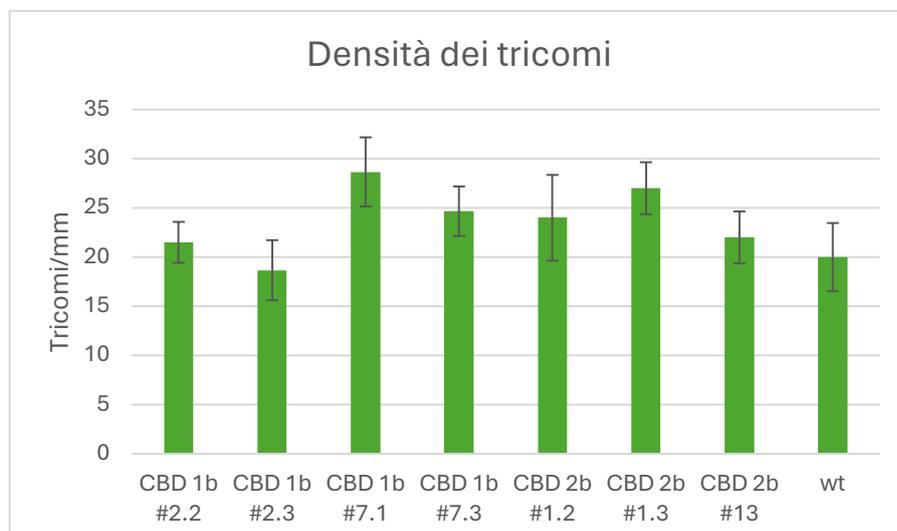
L'eventuale effetto dell'espressione dei geni *CBD 1b* e *CBD 2b* nelle vitalità e nell'amplificazione delle colture transgeniche di *N. tabacum* che li esprimono si potrà studiare confrontando le loro curve di crescita con quelle del wild-type.

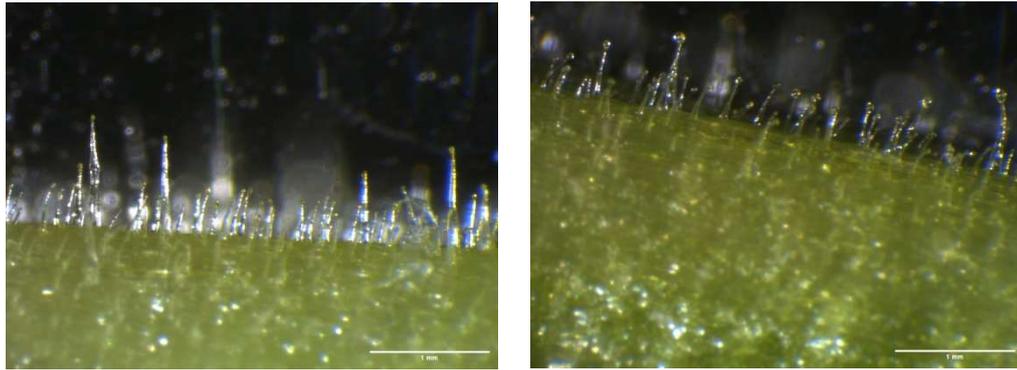
Nel caso in esame, però, per quanto già detto, si può concludere affermando che il confronto fra le varie curve di crescita non ha evidenziato nulla di significativo.

### 3.2 Valutazione della densità e della morfologia dei tricomi

#### Conta dei tricomi

Per ciascuna delle otto piante analizzate, dalla diagnostica per immagini allo stereomicroscopio, sono state ricavate tre foto differenti delle foglie e dei tricomi posti sulla venatura principale (Figure 12 e 13). La successiva conta di queste strutture epidermiche lungo 2,5 mm di venatura e il successivo calcolo degli otto valori medi, con relative deviazioni standard, ha fornito un valore di densità dei tricomi per ciascun clone, riportati di seguito.





**Figure 12 e 13:** due delle foto da cui si sono contati i tricomi. A sinistra, tricomi della pianta wt; a destra, tricomi della pianta CBD 1b #2.2

L'istogramma fornisce informazioni sui possibili effetti di espressione dei geni *CBD 1b* e *2b*, sovraespressi nelle piante transgeniche di tabacco. I dati mostrano che tra le otto piante ci sono delle differenze di densità dei tricomi, per esempio l'esemplare CBD 1b #7.1 presenta un pelo più folto rispetto al wild-type o a CBD 1b #2.3, il quale, invece, ha il pelo più diradato rispetto alle altre piante. Però, dall'istogramma non si evidenziano un aumento o una diminuzione nette della densità dei tricomi nelle piante trasformate. Infatti, i risultati del test t con *p-value* hanno evidenziato che, se confrontata con la densità media del controllo (IC95%= (20±3,92) tricomi/mm), la differenza di densità delle piante trasformate rispetto al wt, entro i rispettivi intervalli di confidenza, non è significativa per cinque piante su sette ( $p > 0,050$ ).

Invece, delle restanti due, ossia CBD 2b #1.3 (IC95%= (27,00±2,99) tricomi/mm) e CBD 1b #7.1 (IC95%= (28,70±3,97) tricomi/mm), la maggiore densità rispetto al wt è significativa in quanto il test t restituisce valori, rispettivamente 0,047 e 0,038, tali per cui  $p < 0,050$ . Le differenze di densità, però, non sono rilevanti negli individui CBD 1b #7.3 e CBD 2b #1.2, nonostante siano della stessa linea e abbiano lo stesso fenotipo, rispettivamente, di 7.1 e 1.3. Quindi, queste differenze sembrano dovute più alla variabilità delle singole piante, piuttosto che all'espressione nel genoma di specifici fattori di induzione del pelo.

Visto che la principale differenza a livello genomico fra le varie piante trasformate e il controllo è rappresentato dall'espressione dei due geni *MYB* di *C. sativa*, è probabile che, se sovraespressi in foglie di tabacco, questi geni non intervengano nei processi di formazione dei tricomi. Questo dato non è sorprendente in quanto è in accordo anche con i dati in letteratura visto che, come accennato in 1.3 e 1.3.1, *CBD 1b* e *CBD 2b* più che nello sviluppo del pelo sembrano essere coinvolti nella regolazione del metabolismo secondario.

### Morfologia dei tricomi

Dalla diagnostica per immagini al microscopio invertito si è osservata la morfologia dei tricomi lungo il bordo delle foglie e lungo la venatura principale confrontando quella del wt con quella degli esemplari transgenici 2.2, 1.3, 7.1.

L'analisi qualitativa ha mostrato che, sia sui bordi che sulle venature, le ghiandole apicali dei tricomi di tutte le tre piante trasformate presentano una

particolare morfologia comune. Infatti, le ghiandole appaiono più grandi e grosse se confrontate con quelle del wt, che invece sono più sottili e piccole. Le Figure 14a, 14b, 15a, 15b mostrano proprio questa differenza nell'esemplare di controllo e in CBD 1b #2.2.



**Figura 14a:** in alto a sinistra, tricomi sulla venatura principale del clone CBD 1b #2; **Figura 14b** in basso a sinistra, tricomi sulla venatura del wt; **Figura 15a:** in alto a destra, tricomi sul bordo della foglia del clone CBD 1b #2; **Figura 15b:** in basso a destra, tricomi sul bordo della foglia del wt.

CBD 1b #2.2 presenta visivamente foglie più pelose rispetto al wt. Questa differenza non è dovuta ad una maggiore densità del pelo, visto che dall'istogramma si nota che la densità non risulta maggiore rispetto a quella del controllo, ma probabilmente sarà dovuta ad altri fattori come, per esempio, una maggiore dimensione o una particolare morfologia dei tricomi.

Per quanto concerne quest'ultimo aspetto, ciò che si nota dalla diagnostica per immagini al microscopio invertito è che le porzioni apicali dei tricomi ghiandolari in CBD 1b #2.2 sono più grosse rispetto a quelle dei tricomi ghiandolari del controllo. Dato che tali strutture sono presenti anche nelle altre due piante transgeniche, questa caratteristica non è specifica solo del clone 2.

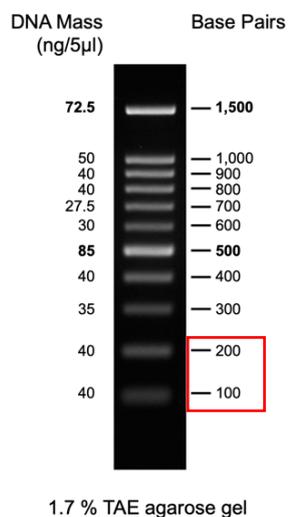
Dalle foto non sono visibili distintamente la cavità di accumulo e la porzione ghiandolare, ma questa morfologia potrebbe indicare una maggiore presenza di

metaboliti nella cavità correlato ad una maggiore attività secretoria della ghiandola, che è determinata, a sua volta, dall'attivazione di nuove vie metaboliche o dall'amplificazione di quelle già attive. Quest'iperattività, se confermata da studi più approfonditi, potrebbe essere dovuta alla sovraespressione dei transgeni *CBD 1b* e *CBD 2b*, che ipoteticamente potrebbero regolare la produzione di metaboliti secondari in tabacco, alterandone il metaboloma.

### 3.3 Genotipizzazione delle piante della generazione T2/F2

Se tutte le piante parentali T1 fossero omozigoti per il transgene, nella generazione filiale i cloni T2 dovrebbero tutti presentare uno solo dei due transgeni *CBD* di canapa, in quanto ereditato da uno stesso parentale T1, i cloni F2, invece, li dovrebbero presentare entrambi in quanto sono stati generati da due piante T1 differenti che sovraesprimono ciascuna un diverso *MYB*. Queste ultime piante, sovraesprimendo entrambi i geni, rendono la generazione F2 oggetto di ulteriori studi morfologici e molecolari per comprendere gli effetti combinatori di espressione di *CBD 1b* e *2b* sul fenotipo di *N. tabacum*.

Non è detto però che i parentali siano omozigoti; infatti, ci potrebbero essere piante T1 eterozigoti che sviluppano gameti privi del transgene. Quindi i cloni F2, per esempio, potrebbero esprimere entrambi i geni, uno solo dei due, oppure nessuno, a seconda di quali siano i parentali incrociati. Visto che non sono note quali piante T1 sono omozigoti, occorre genotipizzare la generazione filiale.



▪ PCRBio Ladder IV

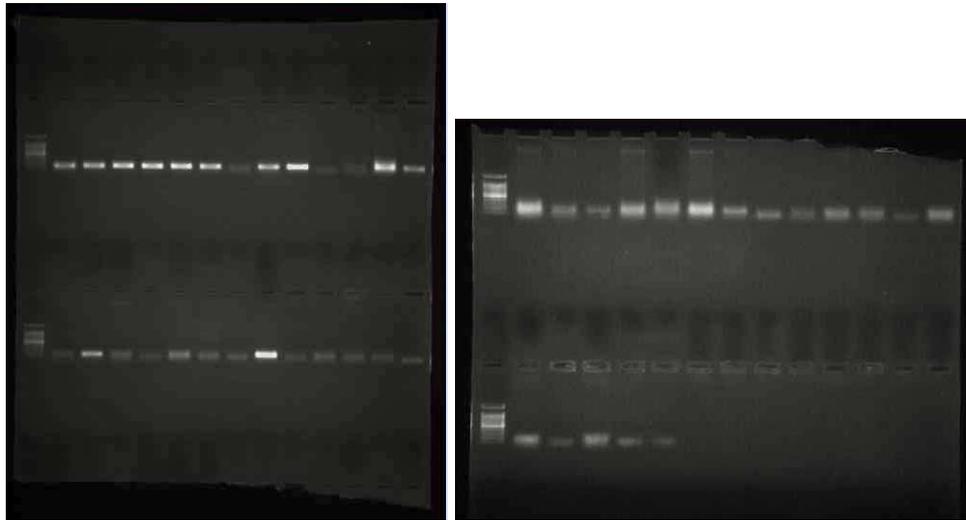
**Figura 16:** il marcatore PCRBio con evidenziato l'intervallo di banda d'interesse.

Per ciascun clone F2, l'osservazione delle bande a 150 bp, al termine della corsa elettroforetica, è quindi indispensabile per capire quali siano gli individui che li esprimono entrambi. Come detto in 2.3.5, per compiere queste rilevazioni, per uno stesso clone F2 si conducono differenti elettroforesi prima con il controllo positivo *EF* e poi, nel caso si evidenziasse la banda a 400 bp, si procede con le miscele di amplificazione con primer per i due transgeni *MYB*.

Nelle Figure 17a e 17b sono riportati due gel su cui è stata osservata la presenza della banda caratteristica attorno le 150 bp su 21 cloni F2 generati dagli incroci ♂2b #13 x ♀1b #7, ♂2b #1 x ♀1b #2, ♂1b #7 x ♀2b #1. Nei primi 21 pozzetti del gel della Figura 17a, a partire dalla prima riga, si sono usati i primer specifici per il gene *CBD 1b*, nei restanti 21, ossia a partire dal quinto pozzetto da destra della seconda riga della Figura 17a fino al terzo pozzetto da sinistra della seconda riga del gel della Figura 17b, invece, si sono usati primer specifici per il gene *CBD 2b*. Inoltre, per

confermare la correttezza dei risultati, sono stati aggiunti due controlli negativi, uno per ciascuna coppia di primer (ultimi due pozzetti da sinistra della Figura 17b), entrambi risultati negativi. Infine, per ciascun clone i risultati sulle positività per *CBD 1b* vengono confrontati con le positività per *CBD 2b* nelle Tabelle 3 e 4.

Dalle tabelle si è evidenziato che in tutto 7 dei 21 cloni analizzati esprimono entrambi i geni di canapa.



**Figura 17a (sinistra) e Figura 17b (destra):** gel di agarosio 1,2% per lo screening di 21 cloni F2. Nei primi 21 pozzetti dalla prima riga di sinistra di 17a sono stati usati primer di rilevamento per *CBD 1b*, nei restanti e in 17b si sono usati primer di rilevamento per *CBD 2b*, gli ultimi due pozzetti negativi da sinistra in 17b sono i controlli. Per verificare la positività, ossia la presenza dell'amplificato, si osserva la banda attorno le 150 bp facendo attenzione a non confonderla con loading dye o primer in eccesso, rilevati in smear o su bande di lunghezza inferiore.

| 1b<br>2b   | 7x1<br>#1 | 7x1<br>#2 | 7x1<br>#3 | 7x1<br>#4 | 7x1<br>#7 | 7x1<br>#8 | 7x1<br>#10 | 7x1<br>#11 | 7x1<br>#12 | 13x7<br>#1 | 13x7<br>#2 |
|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 7x1<br>#1  |           |           |           |           |           |           |            |            |            |            |            |
| 7x1<br>#2  |           |           |           |           |           |           |            |            |            |            |            |
| 7x1<br>#3  |           |           |           |           |           |           |            |            |            |            |            |
| 7x1<br>#4  |           |           |           |           |           |           |            |            |            |            |            |
| 7x1<br>#7  |           |           |           |           |           |           |            |            |            |            |            |
| 7x1<br>#8  |           |           |           |           |           |           |            |            |            |            |            |
| 7x1<br>#10 |           |           |           |           |           |           |            |            |            |            |            |
| 7x1<br>#11 |           |           |           |           |           |           |            |            |            |            |            |
| 7x1<br>#12 |           |           |           |           |           |           |            |            |            |            |            |
| 13x7<br>#1 |           |           |           |           |           |           |            |            |            |            |            |
| 13x7<br>#2 |           |           |           |           |           |           |            |            |            |            |            |

| 1b<br>2b   | 13x7<br>#3 | 13x7<br>#4 | 7x13<br>#5 | 13x7<br>#6 | 13x7<br>#7 | 1x2<br>#3 | 1x2<br>#4 | 1x2<br>#7 | 1x2<br>#11 | 1x2<br>#12 |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|
| 13x7<br>#3 |            |            |            |            |            |           |           |           |            |            |
| 7x13<br>#4 |            |            |            |            |            |           |           |           |            |            |
| 13x7<br>#5 |            |            |            |            |            |           |           |           |            |            |
| 13x7<br>#6 |            |            |            |            |            |           |           |           |            |            |
| 13x7<br>#7 |            |            |            |            |            |           |           |           |            |            |
| 1x2<br>#3  |            |            |            |            |            |           |           |           |            |            |
| 1x2<br>#4  |            |            |            |            |            |           |           |           |            |            |
| 1x2<br>#7  |            |            |            |            |            |           |           |           |            |            |
| 1x2<br>#11 |            |            |            |            |            |           |           |           |            |            |
| 1x2<br>#12 |            |            |            |            |            |           |           |           |            |            |

**Tabelle 3 e 4:** tabelle di positività a entrambi i geni *CBD* in piante di tabacco F2. Sugli assi sono riportati il numero del clone (ex: #1) e dell'incrocio dei parentali (ex: 7x1). I cloni i cui gel in 17a e 17b hanno evidenziato positività per *CBD 1b* sono evidenziati in giallo, in azzurro invece è evidenziata la positività per *CBD 2b*. In verde sono evidenziati i cloni positivi per entrambi i geni, obiettivo di quest'ultima parte del progetto di tesi.

## 4. CONCLUSIONI

*Cannabis sativa* è una pianta officinale le cui molecole fitochimiche ad alto interesse farmaceutico e nutraceutico, prime fra tutti i cannabinoidi, sono sempre più richieste dal mercato. Tuttavia, la mancanza di conoscenza sui meccanismi regolatori che stanno alla base della loro produzione pone un limite considerevole all'utilizzo della pianta. Comprendere questi meccanismi, oltre alla pura conoscenza, potrebbe permettere di controllare il suo metaboloma.

Il lavoro di questa tesi, che si inserisce all'interno di un progetto più ampio, persegue questo obiettivo mirando a comprendere gli effetti fenotipici dei due geni *MYB CBD 1b* e *CBD 2b*, la cui espressione nelle ghiandole dei tricomi di *C. sativa* sembrerebbe regolare vie metaboliche.

Viste le complessità del lavorare con la canapa, gli effetti dell'espressione sono stati studiati su diverse generazioni di piante transgeniche di *Nicotiana tabacum* che sovraesprimono i due geni.

In particolare, attraverso il confronto fra le curve di crescita ricavate su una coltura wt e su colture cellulari di piante T0, si è cercato di capire se i geni regolassero la crescita delle colture e, nel caso in cui lo facessero, in che modo. I risultati, però, probabilmente a causa di errori di procedura, non hanno fornito dati significativi.

Successivamente, attraverso diagnostica per immagini con diverse tipologie di microscopi si sono osservati i tricomi sulle foglie di piante T1, calcolandone la densità e osservandone la morfologia. Il confronto con un wt ha evidenziato non esserci una correlazione fra l'espressione dei transgeni e la densità dei tricomi, mentre una diversa morfologia, comune in tutti gli individui trasformati, è stata osservata a livello delle ghiandole. Tale morfologia fa supporre un aumento dell'attività secretoria. I due geni *CBD*, pertanto, sembrano essere coinvolti in tabacco in attività di regolazione metabolica, mentre sembrano non intervenire nei meccanismi di formazione del pelo.

Infine, con la genotipizzazione della generazione T2/F2, si sono ricercati tramite PCR e osservazione dei gel elettroforetici quali piante esprimono entrambi i transgeni. Da due corse elettroforetiche sono state identificate sette piante trasformate che soddisfano questo criterio. Queste piante potranno essere fenotipizzate in successivi lavori, che potrebbero aiutare a comprendere meglio, dal punto di vista morfologico e molecolare, l'effetto dell'espressione congiunta di entrambi i *MYB* in tabacco.

## MATERIALE SUPPLEMENTARE

1.

| <b>Gene: <i>CBD1b RT</i></b>                |       |       |
|---|-------|-------|
| <b>FORWARD PRIMER: GGTTAGCGGCCCTTACGATT</b> |       |       |
| Strand length                               | Tm    | GC%   |
| 20  | 60,18 | 55,00 |
| <b>REVERSE PRIMER: GGTCAGAAGGTGGGAGTCG</b>  |       |       |
| Strand length                               | Tm    | GC%   |
| 20  | 60,04 | 60,00 |
| Lunghezza prodotto: 143 bp                  |       |       |

2.

| <b>Gene: <i>CBD2b RT</i></b>                |       |       |
|---|-------|-------|
| <b>FORWARD PRIMER: GGCAACTACATGTCCACCGA</b> |       |       |
| Strand length                               | Tm    | GC%   |
| 20  | 60,04 | 55,00 |
| <b>REVERSE PRIMER: CGAGAGTAGAGCCCTGGTTG</b> |       |       |
| Strand length                               | Tm    | GC%   |
| 20  | 59,54 | 60,00 |
| Lunghezza prodotto: 154 bp                  |       |       |

3.

| <b>Gene: <i>NtEF1a</i></b>                    |       |       |
|---|-------|-------|
| <b>FORWARD PRIMER: TGAGAAAGAAGCTGCTGAGATG</b> |       |       |
| Strand length                                 | Tm    | GC%   |
| 22  | 58,40 | 45,45 |
| <b>REVERSE PRIMER: AGAAACCTCCTTCACGATTTCA</b> |       |       |
| Strand length                                 | Tm    | GC%   |
| 22  | 57,65 | 40,91 |
| Lunghezza prodotto: 400 bp                    |       |       |

**Tabelle Supplementari 1,2,3:** i tipi di primer, con le relative caratteristiche e la lunghezza degli amplificati, usati nella genotipizzazione della generazione filiale T2/F2.

## BIBLIOGRAFIA

- Z. Xie, Y. Mi, L. Kong, M. Gao, S. Chen, W. Chen, X. Meng, W. Sun, S. Chen, Z. Xu (2023). *Cannabis sativa*: origin and history, glandular trichome development, and cannabinoid biosynthesis. *Horticulture Research*, 2023, 10: uhad150. <https://doi.org/10.1093/hr/uhad150>
- S. Atalay, I. Jarocka-Karpowicz, E. Skrzydlewska (2020). Antioxidative and anti-inflammatory properties of cannabidiol. *Antioxidants*. 2020;9:21. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31881765/>
- E. M. Blessing, M. M. Steenkamp, J. Manzanares, C. R. Marmar (2015). Cannabidiol as a potential treatment for anxiety disorders. *Neurotherapeutics*. 12(4):825–36. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4604171/>
- J. M. McPartland, E. Small (2020). A classification of endangered high THC cannabis (*Cannabis sativa* subsp. *indica*) domesticates and their wild relatives. *PhytoKeys*. 144:81–112. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7148385/>
- J. L. Bautista, S. Yu, L. Tian (2021). Flavonoids in *Cannabis sativa*: biosynthesis, bioactivities, and biotechnology. *ACS Omega*. 6(8): 5119–23. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00318>
- C. Chalvin, S. Drevensek, M. Dron, A. Bendahmane, A. Boualem (2020). Genetic Control of Glandular Trichome Development. *Trends in Plant Science*, 25(5), 477–487. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.12.025>
- S. F. Brockington, R. Alvarez-Fernandez, J. B. Landis, K. Alcorn, R. H. Walker, M. M. Thomas, L. C. Hileman, B. J. Glover (2013). Evolutionary analysis of the *MIXTA* gene family highlights potential targets for the study of cellular differentiation. *Molecular Biology Evolution* 30, 526–540. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss260>
- T. Yan, L. Li, L. Xie, M. Chen, Q. Shen, Q. Pan, X. Fu, P. Shi, Y. Tang, H. Huang, Y. Huang, Y. Huang, K. Tang (2018). A novel HD-ZIP IV/*MIXTA* complex promotes glandular trichome initiation and cuticle development in *Artemisia annua*. *New Phytologist* 218, 567–578. <https://doi.org/10.1111/nph.15005>
- S. R. Haiden, P. V. Apicella, Y. Ma et G. A. Berkowitz (2022). Overexpression of Cs*MIXTA*, a transcription factor from *Cannabis sativa*, increases glandular trichome density in tobacco leaves. *Plants (Basel)* 11:1519. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9182785/>
- M. D. Marks, L. Tian, J. P. Wenger, S. N. Omburo, W. Soto-Fuentes, J. He, D. R. Gang, G. D. Weiblen, R. A. Dixon (2009). Identification of candidate genes affecting  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol biosynthesis in *Cannabis sativa*. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 60, No. 13, pp. 3715–3726. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp210>
- G. S. Duraisamy, A. K. Mishra, T. Kocábek, J. Matoušek (2018). Activation of polyketide synthase gene promoter in *Cannabis sativa* by heterologous transcription factors

derived from *Humulus lupulus*. *Biologia Plantarum* 62 (2): 250-260.  
<https://doi.org/10.1007/s10535-017-0766-z>

A. Gatica-Arias, M. Stanke, K. R. Häntzschel, J. Matoušek, G. Weber (2012). Over-expression of the transcription factor HIMYB3 in transgenic hop (*Humulus lupulus* L. cv. *Tettnanger*) modulates the expression of genes involved in the biosynthesis of flavonoids and phloroglucinols. *Biologia Plantarum* 62 (2): 250-260.  
<https://doi.org/10.1007/s11240-012-0268-9>

T. Kocábek, A. K. Mishra, J. Matoušek, J. Patzak, A. Lomnická, M. Khare, K. Krofta (2018). The R2R3 transcription factor HIMYB8 and its role in flavonoid biosynthesis in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Science* 269 32–46.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.01.004>

