
**BIOTECNOLOGIE VEGETALI
APPLICATE AL MIGLIORAMENTO
DELLA LIGNINA E DELLA
CELLULOSA NELLE PIANTE DA
FIBRA**

Gianluca Ruotolo

Dottorato in Scienze Biotecnologiche – XX ciclo
Indirizzo Biotecnologie vegetali
Università di Napoli Federico II



Dottorato in Scienze Biotecnologiche – XX ciclo
Indirizzo Biotecnologie vegetali
Università di Napoli Federico II



**BIOTECNOLOGIE VEGETALI
APPLICATE AL MIGLIORAMENTO
DELLA LIGNINA E DELLA
CELLULOSA NELLE PIANTE DA
FIBRA**

Gianluca Ruotolo

Dottorando: Gianluca Ruotolo

Relatore: Prof. Edgardo Filippone

Coordinatore: Prof. Giovanni Sannia

A Mia madre

INDICE

RIASSUNTO	PAG.	1
SUMMARY	PAG.	2
1. INTRODUZIONE	PAG.	8
1.1 LA PIANTA DI KENAF	PAG.	8
1.1.1 LE CARATTERISTICHE BOTANICHE E LE CONDIZIONI DI CRESCITA	PAG.	8
1.1.2 ORIGINE E STORIA DELLA SPECIE	PAG.	10
1.1.3 VARIETA' GERMOPLASMA E CULTIVAR	PAG.	11
1.1.4 IMPORTANZA PRODUZIONE E USI DEL KENAF	PAG.	12
1.1.5 QUALITA' DELLE FIBRE	PAG.	14
1.2. LA PARETE CELLULARE	PAG.	15
1.2.1 I POLIMERI DELLA PARETE CELLULAREE GLI ENZIMI COINVOLTI NELLA LORO BIOSINTESI	PAG.	15
1.2.2 LA BIOSINTESI DELLA CELLULOSA	PAG.	16
1.2.3 LA BIOSINTESI DELLA LIGNINA	PAG.	18
1.3 SCOPO DELLA TESI	PAG.	21
2. MATERIALI E METODI	PAG.	22
2.1 SUBSTRATI DI COLTURA	PAG.	22
2.2 CLONAGGIO DI SEQUENZE DI GENI DELLE BIOSINTESI DELLA CELLULOSA E DELLE LIGNINA	PAG.	23
2.2.1 MATERIALE VEGETALE	PAG.	23
2.2.2 ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO	PAG.	23
2.2.3 CORSA ELETTROFORETICA E QUANTIZZAZIONE DEL DNA ESTRATTO	PAG.	23
2.2.4 ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE E SINTESI DEI CDNA	PAG.	24
2.2.5 DISEGNO DEI PRIMER	PAG.	24
2.2.6 ANALISI DI AMPLIFICAZIONE DI DNA GENOMICO MEDIANTE PCR (POLIMERASE CHAIN REACTION)	PAG.	25
2.2.7 ANALISI DI AMPLIFICAZIONE DELLE SEQUENZE ESPRESSE MEDIANTE RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTASE POLIMERASE CHAIN REACTION)	PAG.	26
2.2.8 PURIFICAZIONE DEL DNA DOPO REAZIONI DI PCR O RT-PCR	PAG.	26
2.2.9 CLONAGGIO DELLE SEQUENZE ISOLATE IN PLASMIDI	PAG.	26
2.2.10 SEQUENZIAMENTO ED INSERIMENTO DELLE SEQUENZE IN BANCA DATI	PAG.	28
2.3 STUDIO DI ESPRESSIONE DI SEQUENZE GENICHE	PAG.	29

2.3.1 DISEGNO DEI PRIMER PER LA PCR QUANTITATIVE (QPCR)	PAG.	29
2.3.2 PCR QUANTITATIVA	PAG.	29
2.3.3 ANALISI STATISTICA	PAG.	30
2.4 ANALISI DEI CONTENUTI DI LIGNINA E DELLA CELLULOSA NEI TESSUTI DI KENAF	PAG.	31
2.5 DIFFERENZIAMENTO IN VITRO, INDUZIONE DI GEMME MULTIPLE E TRASFORMAZIONE GENETICA	PAG.	32
2.5.1 CEPPI BATTERICI UTILIZZATI	PAG.	32
2.5.2 CULTIVAR SAGGIATE	PAG.	32
2.5.3 SUBSTRATI PER LA PROPAGAZIONE ED IL DIFFERENZIAMENTO <i>IN VITRO</i>	PAG.	32
2.5.4 SUBSTRATI PER LA MASSIVA PROPAGAZIONE	PAG.	33
2.5.5 STERILIZZAZIONE ED IMBIBIZIONE DEI SEMI	PAG.	33
2.5.6 TRASFORMAZIONE GENETICA CON METODO BIOLISTICO	PAG.	33
2.5.7 STRATEGIE DI TRASFORMAZIONE GENETICA CON METODO BIOLISTICO	PAG.	34
2.5.8 TRASFORMAZIONE GENETICA MEDIANTE AGROBATTERIO	PAG.	35
2.5.9 TESSUTI DI KENAF UTILIZZATI PER LA TRASFORMAZIONE GENETICA.	PAG.	35
2.5.10 SAGGIO ISTOCHEMICO GUS	PAG.	36
3. RISULTATI	PAG.	37
3.1 DISEGNO DEI PRIMER, CLONAGGIO ED INSERIMENTO IN BACA DATI DI SEQUENZE GENICHE	PAG.	37
3.1.1 DISEGNO DEI PRIMER	PAG.	37
3.1.2 AMPLIFICAZIONE DI DNA E CDNA DI KENAF ED INSERIMENTO DEGLI AMPLICONI IN VETTORI DI CLONAGGIO	PAG.	37
3.1.3 SEQUENZIAMENTO ED INSERIMENTO IN BANCA DATI DELLE SEQUENZE	PAG.	38
3.2 ESPRESSIONE TEMPORALE DELLE SEQUENZE CLONATE	PAG.	39
3.2.1 DISEGNO DEI PRIMER PER LE ANALISI DI PCR QUANTITATIVA	PAG.	39
3.2.2 ANALISI DI ESPRESSIONE TEMPORALE DEI GENI DELLA CELLULOSA E DELLA LIGNINA	PAG.	39
3.2.3 QUANTIFICAZIONE DELLA CELLULOSA E DELLA LIGNINA NEL TIGLIO E NEL KENAPULO	PAG.	40
3.3 MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLI PER DIFFERENZIAMENTO IN VITRO, MASSIVA PROPAGAZIONE E TRASFORMAZIONE GENETICA DEL KENAF.	PAG.	41
3.3.1 DIFFERENZIAMENTO <i>IN VITRO</i> DI TESSUTI DI KENAF	PAG.	41
3.3.2 EFFETTO DEL PICLORAM (ACIDO 4-AMINO-3,5,6-TRICLOROPYRIDIN-2-CARBOSSILICO) SU IPOCOTILI E FOGLIE	PAG.	41

COTILEDONARI DI KENAF	
3.3.3 MASSIVA PROPAGAZIONE IN KENAF	PAG. 42
3.3.4 TRASFORMAZIONE GENTICA DEL KENAF	PAG. 42
3.3.4.1 PROVE DI RESISTENZA ALL'ANTIBIOTICO	PAG. 42
3.3.4.2 ESPERIMENTI DI TRASFORMAZIONE GENETICA MEDIANTE CANNONE GENETICO	PAG. 42
3.3.4.3 ESPERIMENTI DI TRASFORMAZIONE GENETICA MEDIANTE AGROBACTERIO	PAG. 43
3.3.4.4 CO-COLTURA SU EMBRIONI DI KENAF CON AT8	PAG. 43
3.3.4.5 CO-COLTURA SU EMBRIONI DI KENAF CON AGROBACTERIO AT18	PAG. 44
4. DISCUSSIONE	PAG. 45
4.1 CLONAGGIO E STUDIO D'ESPRESSIONE DEI GENI DELLA BIOSINTESI DELLA CELLULOSA E DELLA LIGNINA	PAG. 45
4.2 DIFFERENZIAMENTO IN VITRO, MASSIVA PROPAGAZIONE E TRASFORMAZIONE GENETICA DEL KENAF	PAG. 51
5. FIGURE	PAG. 55
6. TABELLE	PAG. 78
7. BIBLIOGRAFIA	PAG. 92

RIASSUNTO

La pianta di kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) è un'erbacea annuale coltivata essenzialmente per la produzione di fibre vegetali. Queste stanno assumendo sempre maggiore interesse in campo tecnologico per la produzione di materiali biocompositi che presentano, oltre a caratteristiche di buone proprietà meccaniche, anche quella della biodegradabilità.

Gli steli di Kenaf sono costituiti da una parte corticale chiamata tiglio, da una parte più interna detta kenapulo e dal midollo centrale.

Tali materiali sono oggiparticolarmenre apprezzati, anche a seguito di specifiche direttive della UE, nel campo della bioedilizia e della componentistica ad alta biodegradabilità impiegata nell'industria automobilistica. L'industria dei materiali biocompositi richiede fibre vegetali con caratteristiche che sempre più si adattino al processo di lavorazione ed agli usi finali. La modifica delle caratteristiche reologiche dei materiali passa anche attraverso l'ottenimento di fibre con adeguati contenuti di cellulosa e lignina e, quindi, particolare importanza rivestono ricerche tese a delucidare i processi di biosintesi di questi importanti polimeri vegetali.

Il nostro gruppo ha iniziato una ricerca allo scopo di isolare e caratterizzare i principali geni

coinvolti nella biosintesi della lignina e della cellulosa nella pianta di kenaf. Per quanto concerne la via biosintetica della lignina, i geni studiati sono stati: cinnamato-4-idrossilasi (*c4h*); cinnamilalcol-deidrogenasi (*cad*); cinnamil-CoA-ossidoreduttasi (*ccr*) e 4 cumarato-CoA-ligasi (*4cl*). Per la via biosintetica della cellulosa è stato studiato un gene della famiglia genica CeSA (cellulosa-sintetasi). Per isolare sequenze geniche putativamente riferite ai geni sopra citati è stato scelto un approccio bioinformatico. Zone altamente conservate sono state identificate a seguito di allineamento di tutte le sequenze di pianta reperibili in banca per ogni singolo gene studiato ed i primer disegnati sulla base delle sequenze mostrandoti la più alta identità. Le reazioni di amplificazione sono state condotte sia su DNA genomico sia su cDNA isolati da piante della cv Dowling allevate in camera di crescita. Tale cultivar è stata scelta in quanto rappresenta quella che fornisce la più alta quantità di fibre tra quelle in commercio. I frammenti di amplificazione ottenuti sono stati clonati e sequenziati. L'analisi comparativa delle sequenze nucleotidiche dei singoli geni ha mostrato un'alta percentuale d'identità con le sequenze degli stessi geni di altre specie, principalmente con quelli appartenenti alla famiglia delle Malvaceae. Tali sequenze sono state poi depositate in banca dati e rese pubbliche.

Inoltre è stata valutata l'espressione dei geni *c4h*, *cad* e CeSA dopo 30,60 e 90 giorni dalla semina, mediante analisi qPCR mettendola in relazione con le quantità di lignina e cellulosa estratte dai tessuti. La qPCR è stata eseguita su mRNA isolati dal tiglio e dal kenapulo di piante allevate in condizioni controllate. È stato possibile notare che talvolta le variazioni dell'espressione dei geni della biosintesi di un polimero non sono in accordo con l'accumulo del polimero all'interno del tessuto, talaltra invece questa correlazione è positiva.

Un altro obiettivo è stato quello di mettere a punto un protocollo efficiente per la trasformazione genetica del kenaf, sia con l'utilizzo di *Agrobacterium tumefaciens* sia con l'utilizzo del metodo biolistico, dopo studi preliminari di massiva propagazione e di differenziamento *in vitro*. I dati ottenuti indicano la possibilità di trasformare il kenaf con un approccio innovativo basato sulla trasformazione degli embrioni e la successiva induzione alla proliferazione di gemme multiple.

In conclusione, i risultati ottenuti rappresentano un interessante contributo alla difficile problematica del miglioramento produttivo del kenaf.

SUMMARY

Plant cell walls are important in human life, providing major dietary fibers and essential raw materials for textile, lumber, pulping, and potentially for biofuels. It is composed of cellulose, hemicellulose, pectin, proteins, and/or lignin, which vary in amount depending on cell types that providing mechanical support to individual cells and the whole plant. .

Woody plants and herbaceous fast growing plants are the main source of lignin and cellulose. In this scenario kenaf (*Hibiscus cannabinus L.*) is an important herbaceous, short-day, annual malvacea native to tropical regions of Asia and Africa that has been used for over 6000 years due to a rapid growth and erect stem (Dempsey, 1975). To beginning of human cultivation of kenaf , the main products obtained from it were mainly cordage and secondarily used as livestock fed (Dempsey, 1975).

Kenaf has a high growth rate, reaching heights of 4-6 m in about 4-5 months and its yields of 6-10 tonnes of dry mass per acre each year, is generally 3-5 times greater than the yield of pine tree which can take from 7-40 years to reach harvestable size.

After it was domesticated and used in Africa for over six millennia, kenaf was first introduced to India in the last 200 years, Russia started producing kenaf in 1902 (Dempsey, 1975; Charles, 2002; Li, 2002). Kenaf was cultivated commercially as a fiber crop in Asia and the USSR in the 1930's. During the Second World War, as foreign fiber supplies were interrupted, kenaf research and production was started in the U.S. to supply cordage material for the war effort (Dempsey, 1975).

In the 1950's, researchers in the USA identified kenaf as an excellent cellulose fiber source for a large range of paper products (Nelson *et al.*, 1962).

Currently, many countries pay more attention to kenaf research and cultivation because of its high biological efficiency and wide ecological adaptability.

In the modern day, kenaf is an important source of raw material for industrial uses. Recent research and development efforts have further increased the diversity of uses for kenaf; lignin is collected from the external part of stem called bark making up 35-40% of total stem weight composed mainly by long fiber (2-6 mm).

The bark is transformed into high quality paper pulp and that is particularly amenable to be used in bio-composite materials, mainly for automotive and house building industries (particle boards of various densities, thicknesses, with fire and insect resistance) due to his degree of purity from the woody impurities and from the pectines equal to 99%.

The core is the inside part of stem that furnishes light and absorbent wood. Core has short fibers (0.6 mm) and making up the remanding 60-65% of total stem weight (Lin *et al.*, 2004) and it is used for making board or packaging materials, adsorbents, textiles, livestock feed, animal bedding and fibers in new and recycled plastics (Li, 2002).

Today in the greater agronomic-industrial cultivars of *Hibiscus cannabinus* the relationship between bark and core is of around 1:3 , so to move such relationship for the bark is an objective how much ever panted. Increase the amount of lignin in the bark is an other important objective because kenaf's fibers consequential from the workmanship of the bark is a product very appreciated. It, indeed, has a degree of purity from the woody impurities and from the pectines equal to 99% and it is extremely appreciated in the construction of bio-composites material helpful for the bio-housebuilding and car industry.

On the other hand for paper industry a reduction in lignin amount in the core is strongly desired for the paper industry. Indeed, the high presence of lignin in stem of

kenaf causes a higher utilization of energy in the retting process and a greater use of chemicals agent, that are toxic for human health and for environment.

As a result of the diverse uses for kenaf and the different portions of the plant being used, it is important to gain a greater understanding of the yield components and the factors affecting composition of the plant.

Despite the fact, that lignifications of plant cell wall and the metabolic pathway of lignin has been studied for long time we still do not have a whole picture of those two biological process. In brief, lignin is a plant phenolic biopolymer of complex structure made up of three monolignols, namely p-coumaryl, coniferyl and sinapyl alcohols and lignification is the process of polymerization of the above mentioned monolignols each giving rise to the hydroxyphenyl (H) guaiacyl (G) or syringyl (S) lignin units, respectively (Anterola e Lewis 2002).

Cellulose, the most abundant plant polysaccharide, is synthesized by structures in the plasma membrane known as rosettes (Brown *et al.*, 1996). This plasma membrane complex is formed by membrane proteins named CeSA (Cellulose Synthase), that polymerize glucan chains by monomers of UDP-glucose (Delmer 1999). Cellulose providing mechanical support to individual cells and the whole plant. So far, the ratio on weight basis between bark and core is of around 1:3 in the greater agronomic-industrial cultivars of *Hibiscus cannabinus* and traditional breeding strategies have not improved the quality and quantity of lignin that industry requires. Therefore a biotechnological approach is necessary to obtain plant that meets the industry request. On this basis, one of our aims is to identify and clone the major genes of cellulose and lignin biosynthesis in kenaf and then monitoring the level of expression during some phenological age of plant.

As first step, we have identified on literature the major genes involved in cellulose and lignin biosynthesis: (a) lignin's biosynthesis genes, cinnamyl alcohol dehydrogenase (*cad*); cinnamoyl-CoA oxidoreductase (*ccr*); cinnamate 4-hydroxylase (*c4h*); 4-coumarate:CoA ligase (*4cl*); (b) cellulose synthase gene family CeSA.

In order to design useful primers for cloning the above-listed genes, we have used a bio-informatics approach. For each gene, primers were designed on highly conserved coding sequence regions of those genes already available in public database from several monocots and dycot species. Multialignments were performed using "T-Coffee", a public domain software (<http://www.es.embnnet.org/Services/MolBio/t-coffee/>). For every gene, several monocots and dycots species were used for the alignment. The software shows for every alignments the percentage of identity among the species.

On genomic DNA extracted from leaves collected from plantlet of 10 days old were performed PCR, while cDNA useful for RT-PCR analysis was obtained form reverse transcriptase of total RNA isolated from apexes of young plant of 10 day after sowing. Amplified fragments was obtained of amplification PCR and RT-PCR analysis, for *4cl*, *c4h*, *cad*, *ccr*, CeSA and *actin II* gene.

All amplified fragments were purified and cloned in to pGem T-easy vector (Promega) and recombinant plasmid were used to transform *Escherichia Coli* Dh5 α competent cells. Fragments were sequenced on both strands using SP6 and T7 universal primers.

For each kenaf fragments cloned we have found out a high high identity with related sequences genes from other plant species, mainly with the Malvaceae family. All of those are now available in NCBI data bank www.ncbi.nlm.nih.gov/

We have also cloned a actinII gene for internal control in quantitative PCR analysis (QPCR).

In order to know the time course expression of different genes in different plant tissue many specific couple qPCR primers have been designs using Primer Express®Software 2.0 software for each the following genes: the gene CeSA of the cellulose biosynthesis and of *c4h* and the *cad* of lignin biosynthesis:

For each qPCR primers couple were performed preliminary experiments in order to set the bests parameters and therefore choose the best primers couple for this goal.

Total mRNA was collected from bark and core of kenaf plants (cv Dowling) after 30, 60 and 90 days after sowing. Plants were grown in controlled growth chamber at 25 C and 16 hours of light and 8 hours of dark. The bark, and core samples were each prepared always from same positions of the kenaf stems, in particular we used 7 cm of tissue, comprised between tenth and the seventeenth centimeter of stalk beginning from the crown. cDNA synthesis was obtained by total RNA isolated from this tissue parts, by in vitro reverse transcriptase reaction using oligo dT(18), and was used as template for qPCR Four biological duplicates, and three experimental duplicates for each gene in every biological duplicate, were made for all qPCR analyses.

A post-hoc statistical analysis was made by SPSS13 software. Results has been used to compare the level expression of each gene studied at 60 and 90 days after sowing (DAS) to levels at 30 DAS.

In the bark, statistical difference were observed in bath *cad* and *c4h* gene between 30 and 60 DAS but between 60 and 90 DAS there aren't significant statistical differences.

In literature is reported that *cad* and *c4h* are the pivotal genes for lignin biosynthesis (Ralph *et al.*, 2001, Dimmel *et al.*, 2001, Li *et al.* 2003). and our data are in agreement with those results.

In addition, our analysis on kenaf lignin quantification support the idea that the expression level of those two genes are important for lignifications cell wall because quantity of lignin augment in bark and core during the development of plants.

A similar statistical approach was done for CeSA gene. The gene level shows that cellulose gene increased its level during plant growth.

In our condition, the cellulose biosynthesis increased steadily during the development of kenaf in the first 60 days after sowing in core and bark. Therefore, the expression of genes involved in lignin pathway by biotechnological approach for obtaining plant with an high content of lignin in bark should be done at this plant developmental stage.

In the core, our analysis for the two lignin genes and CeSA gene shows that CeSA expression has a maximum level at 60 DAS reaching a minimum level at 90 DAS. While for lignin genes the maximum high level of expression was measured at 30 DAS.

This data seems to be in agreement with the analyses of amount of cellulose but not with those of lignin amount. In addition form the literature we know that also in the core both lignin that cellulose increase their amount during plant development (Nishimura *et al.*, 2002).

Genetic transformation is an valid alternative to traditional breeding in obtaining elite plant genotypes for any feature required. However, this approach needs a robust regeneration procedure from any plant explants to mature fertile plants. Therefore, the third aim of my PhD project is to obtain a experimental procedure for *in vitro* regeneration and then a genetic transformation in kenaf.

Plant regeneration from the shoot apex of kenaf was reported by varying authors (Zapata *et al.*, 1990, Srivatanakul *et al.*, 2000), from nodal segments (Reichert *et al.*, 1996) and from cotyledons with plumes attached (McLean *et al.*, 1992). On the other hand, those experimental procedure are not useful for genetic transformation due to a low yield of regenerant shoot.

The final goal of my PhD project was to obtain adventitious shoots from differentiated explants such as petioles, cotyledonary leaves, hypocotyls, to be a target for any genetic transformation method. 5 culture substrates for regeneration of kenaf plant from different tissues like petioles, cotyledonary and hypocotyls were tested but the rate of shoot production was found to be not adequate to be used for developing a transformation protocol.

An alternative for genetic transformation is to use as explants target multiple shoots due to an increasing of number of meristematic center. In literature, is known a combined effect of benzyladenin with kinetin on meristematic cell division with the production of multiple shoots in different cultivars of kenaf (Herath *et al.*, 2004). Furthermore, thidiazuron (TDZ) herbicide that acts as plant hormone growth is known to be produced multiple shoots in different species (Huetteman *et al.*, 1993 Visser *et al.*, 1992) and in kenaf too (Srivatanakul *et al.*, 2000). We studied effect of TDZ, at three concentrations, on the kenaf seeds previously sterilized and cut lengthwise. The best results obtained in our study is that TDZ at 10 μM is the best concentration for inducing multiple shoot from kenaf seeds.

Multiple shoots from seeds were target material genetic transformation experiments by direct and indirect methods. Our results infer that the better way to introduce new genetic material in kenaf shoots is genetic transformation procedure mediated by *Agrobacterium tumefaciens*.

In order to obtained kenaf transformed plant we have cocultivated embryos contained in the seeds of kenaf with *Agrobacterium tumefaciens* that contain a plasmid with GUS as reporter gene and nptII as marker gene both drove by a constitutive promoter. After cocultivation, meristematic tissue of embryos were placed in the culture substrates that with TDZ for inducing multiple shoots production. On the seedling derived from cocultivated and induced embryos were made an histochemical assay in order to find the transient GUS expression. All tested germinated seedling after cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens* carrying the appropriate expression vector showing a high percentage of GUS expression.

This result were independent from the cultivar used, Dowling or SF459 but it was been cleared that C58C1 agrobacterium strain was more efficient of LBA4404 strain. This data in not agree with Srivatanakul's study (Srivatanakul *et al.* 2001).

Among the plants survived on the kanamicin only one was positive for analysis PCR with specific GUS gene primers.

Therefore we have established a regeneration protocol for multiple shoots from seeds and that multiple shoots are a good target for any genetic improvement in kenaf. On the other hand, modifications of genetic transformation procedure needs for improving the yield of transgenic plants.

In conclusion, this study can be considered as a initial point to be aware of how to modify the relationship between lignin and the cellulose inside kenaf.

The most important period for cellulose and lignin increasing in the bark is in the first 60 days of plant's life and therefore during this period is possible to interfere in order to modify the ratio of cellulose: lignin. In the core the maximum expression of lignin is in the first 30 day and for the cellulose is from 30 to 60 day after sowing.

High percentage of multiple shoots were obtained from germinated seeds onto TDZ containing medium and those explants are quite good explants for genetic transformation.

1. INTRODUZIONE

1.1 LA PIANTA DI KENAF

1.1.1 LE CARATTERISTICHE BOTANICHE E LE CONDIZIONI DI CRESCITA

Il kenaf (*Hibiscus cannabinus* L. $2n = 36$) è una pianta brevidiurna, annuale, erbacea appartenente alla famiglia delle Malvaceae, coltivata per la fibra di tiglio del suo stelo che è nota sia per la sua importanza sia industriale che orticola (Fig. 1.1).

Il genere *Hibiscus* è ampiamente diffuso, con oltre 400 specie. Esso è diviso in sei diverse sezioni: Furaria, Alyogen, Abelmoschus, Ketmia, Calyphyllia, e Avanza, il kenaf è classificato nella sezione Furaria. Questa sezione comprende circa 40-50 specie (Su *et al.*, 2004). Il kenaf è strettamente legato al cotone (*Gossypium hirsutum* L.), all'ocra (*Hibiscus esculentum* L.) e Hollyhock (*Althaea roseus* L.).

In tutte le specie della sezione Furaria, il numero dei cromosomi è multiplo di 18, da $2n = 36$ a $2n = 180$. La diversità del numero di cromosomi e genomi trovato in questa sezione non è comune nel mondo vegetale. Questa diversità cromosomica si riflette nell'elevato livello di diversità morfologiche e fisiologiche delle colture (Wilson, 2003; Su *et al.*, 2004).

Secondo Dempsey (1975), ci sono più di 129 nomi comuni per di kenaf in tutto il mondo, quali mesta (India, Bengala), stokroos (Sud Africa), Java juta (Indonesia), ambari (Taiwan) (Liu, 2000). Pochi sanno che sotto il nome di "kenaf", nome di origine persiana, è commercializzato anche il tiglio di un'altra specie, la rosella (*Hibiscus sabdariffa* var. altissima) coltivata nei paesi tropicali e sub tropicali al di sotto di 8° di latitudine Nord e Sud. Simile alla rosella è il karkadè (*Hibiscus sabdariffa* var. edulis) dal quale si ricava la nota bevanda che porta lo stesso nome anche detto "thé rosso".

Il kenaf ha un alto tasso di crescita, raggiungendo altezze di 4-6 metri in circa 4-5 mesi e la sua resa è di 6-10 tonnellate di sostanza secca per ettaro ogni anno, 3-5 volte maggiore rispetto alla resa del pino. Le piante di kenaf producono generalmente due tipi foglia (Fig. 1.2), che possono essere completamente intere o profondamente lobate oppure profondamente palmate. Il picciolo può essere di lunghezza variabile da 3 a 8 centimetri, finemente pubescente sulla superficie superiore oppure setoloso sulla superficie inferiore, rosso o verde. Talvolta, una stessa varietà come ad esempio nel caso della varietà El Salvador, può presentare una mescolanza eterogenea di piante a foglia intera ed a foglia palmata. Da un punto di vista genetico, il carattere "foglia palmata" è dominante rispetto al carattere "foglia intera" (Jones *et al.*, 1955). L'apice delle foglie è acuminato sia che si tratti di varietà a foglia lobata sia di varietà a foglia intera. Le foglie giovani su tutte le piante di kenaf sono semplici e intere. La posizione delle foglie è alternata sullo stelo. Le foglie del kenaf sono utilizzate per alimentazione animale ed anche per alimentazione umana in alcune salse della cucina africana ed asiatica. Poiché la pianta di kenaf cresce velocemente le foglie giovani iniziano a differenziarsi assumendo la forma caratteristica di quella particolare cultivar (Charles, 2002). Ogni foglia contiene anche ghiandole che producono una resina sulla parte inferiore della foglia (Dempsey, 1975) che attrae le api (Jones *et al.* 1955).

La parte economicamente più importante della pianta è lo stelo (Fig. 1.3). Il kenaf ha un stelo eretto, ramificato o non ramificato, che raggiungere un'altezza di 4-6 metri, si mostra esile verde o rosso, e spinoso. Esso si compone di due distinti tipi di fibre: all'esterno, le fibre di tiglio, che rappresentano circa il 35% del peso a secco, e

all'interno le fibre del kenapulo , che rappresentano circa il 65% del peso secco (Lin, *et al.* , 2004).

Sezionando lo stelo di una pianta di kenaf, si trovano differenti strati di tessuti:

- la cuticola, sulla quale si rileva spesso la presenza di cera avente la funzione di limitare le perdite di acqua dallo stelo;
- l'epidermide, rappresentata da uno strato di cellule a parete spessa, in cui si trovano gli stomi;
- la corteccia, rappresentata normalmente da due a sette strati di cellule;
- il floema, che contiene i vasi cribrosi e le fibre tessili molto spesso raggruppate in fasci di numero variabile, posizionate circolarmente nel parenchima floematico che costituiscono il "tiglio"(Fig. 1.4), cioè la vera e propria fibra tessile;
- il cambio, che separa la parte corticale dalla parte interna legnosa dello stelo, rappresentato da uno strato sottile di cellule di forma rettangolare allungata, a parete fine;
- lo xilema, costituito da cellule legnose, spesse e corte, relativamente larghe e ben lignificate che sostengono la pianta durante la crescita; disposte nel senso dello stelo a formare un cilindro continuo attraversato dai raggi midollari
- il midollo, posto all'interno di una cavità localizzata, o canale midollare, al centro dello stelo.

Lo xilema, la parte legnosa dello stelo, ha forma di cilindro cavo a sezione decrescente dal basso all'alto e forma il kenapulo (Fig. 1.5). Varia percentualmente in relazione alle altre componenti dello stelo a seconda della specie. Allo stadio di maturità della pianta può oscillare dal 50% ad oltre il 75% in peso dello stelo. Il suo spessore varia sensibilmente dalla base (ove risulta particolarmente ampio e sviluppato) verso l'apice, dove si assottiglia fino a diventare erbaceo.

Il kenaf ha grandi fiori (Fig. 1.6), di colore giallo chiaro o crema a forma di campana quando sono aperti. I fiori di molte cultivar hanno una parte centrale rossa o marrone. I fiori sono singoli, larghi 8-13 cm di diametro, con cinque petali e si alternano lungo il fusto, essi di solito si aprono poco prima del mattino, per poi iniziare a chiudersi a mezzogiorno circa e si chiudono a metà del pomeriggio, per riaprirsi nuovamente l'indomani. Dentro la corolla gli stami circondano lo stamma e le antere rilasciano il polline, poco prima che il fiore sbocci; lo stamma emerge subito dopo. La corolla si chiude a spirale in modo che le antere sono in contatto con lo stamma, e quindi se non si verifica l'impollinazione incrociata, può verificarsi l'autofecondazione (Jones *et al.* , 1955). L'impollinazione incrociata avviene tra il 2 ed il 24 % dei casi.

Il frutto (Fig. 1.7) è una capsula spinosa, a cinque loggie. Ogni pianta ha da 35 a 40 capsule contenenti ciascuna da 25 a 30 semi, cioè 5 - 6 semi per loggia. Il seme ha forma reniforme ed è di colore variante dal grigio al nerastro. Un chilogrammo di seme di kenaf contiene dai 35.000 ai 40.000 semi (Dempsey, 1975). I semi (Fig. 1.8) hanno una lunghezza di circa 6 mm ed una larghezza di circa 4 mm. Una volta impollinati, i semi richiedono ulteriori 60-90 giorni di freddo per poter germinare.

Circa il 20% del volume del seme di kenaf è pieno di olio, di composizione molto simile a quella di cotone. Di solito i semi di kenaf hanno una percentuale di germinazione di circa il 98%; tuttavia, a causa dell'alto contenuto di olio, essi perdono vitalità rapidamente (Dempsey, 1975).

Il kenaf ha un più ampio di adattamento alle condizioni climatiche nei confronti di altre piante da fibra vegetale coltivate per uso commerciale. In generale esso ha un'ampia adattabilità ecologica (Liu, 2003) ed è coltivata tra il 45° e 30° latitudine con una umidità relativa che varia tra 68 e 82% e non tollera il gelo. Le temperature medie ottimali di crescita variano tra 22°C e 30°C per quanto riguarda il giorno e tra

11 °C e 23 °C quelle della notte. Il fabbisogno idrico per la crescita è di circa 100-125 mm al mese per un totale che deve variare tra 500-625 millimetri per il periodo di 5 o 6 mesi di crescita (Dempsey, 1975).

Il Kenaf mostra una alta produzione di fibre su un ampia gamma di terreni, compresi quelli acidi, limosi-alluvionali, sabbiosi, argillosi, calcarei, salini desertici e molti altri a patto che essi posseggano un buon drenaggio, anche se la pianta tollera inondazioni nelle ultime fasi di crescita (Dempsey, 1975). Quindi il kenaf si adattata meglio della altre colture commerciali ai suoli poveri e può essere piantata su terreni marginali.

Il kenaf è sensibile al fotoperiodismo e la maggior parte delle varietà sono a "giorno corto" cioè manifestano induzione a fiore quando le ore di luce scendono al di sotto di un certo valore della durata del giorno. Indipendentemente dal momento della semina, la maggior parte delle varietà di kenaf rimanere allo stato vegetativo fino a quando il periodo di luce scende al di sotto di 12,5 ore, poi comincia la fioritura.

1.1.2 ORIGINE E STORIA DELLA SPECIE

È accettato dalla maggior parte degli autori che la pianta di kenaf ha il suo nucleo di origine nell'Africa subsahariana, dove si trovano diverse forme selvatiche di kenaf (Li, 1990; Cheng, 2004).

Sulla base di indagini è stato riportato che la pianta di kenaf è stata addomesticata circa 4000 a.c. nella regione del Sudan (Cheng *et al.*, 2004)

Per oltre 6000 anni il kenaf è stato prevalentemente usato per la produzione di corde e come mangime per il bestiame (Dempsey 1975) in Africa. Dopo tale periodo essa è stata introdotta inizialmente in India negli ultimi 200 anni mentre la Russia ha iniziato a coltivare kenaf nel 1902 e la Cina ha conosciuto il kenaf all'inizio del 1900 (Dempsey, 1975; Charles, 2002). Il processo di produzione ed il processo di trasformazione che prevede la separazione della lignina dalla cellulosa nelle fibre, detto processo di *retting*, del kenaf è rimasto sostanzialmente invariato per migliaia di anni.

Durante la prima metà del XX secolo, i ricercatori di molti paesi, tra cui i dipendenti dell'US Department of Agriculture (USDA) durante la Seconda Guerra Mondiale, hanno cercato di sviluppare programmi di miglioramento delle cultivar di kenaf, delle tecniche di raccolta, delle attrezzature, del processo del *retting* al fine di massimizzare la resa delle fibre del taglio del kenaf per renderle sufficienti a garantire le forniture domestiche di spago.

L'interesse per le fibre di Kenaf come coltura è proseguito durante la seconda guerra mondiale, ma con solo lieve considerazione per i suoi usi secondaria ed alternativi. La conclusione della seconda guerra mondiale ed il maggiore sviluppo dell'industria delle fibre sintetiche per le corde e per i sacchi ha reso minore l'interesse per le fibre di kenaf e quindi per la sua coltura negli Stati Uniti, sebbene l'interesse all'estero continuò. Infatti i paesi in via di sviluppo continuarono nell'uso domestico di kenaf come fonte per le corde e soprattutto per la produzione di sacchi (Dempsey 1975).

Nel 1950 sono state fatte ricerche per valutare più di 500 specie di piante da fibra per ottemperare alle ingenti e crescenti esigenze future di fibra negli Stati Uniti; tra esse il kenaf fu identificato come un ottima fonte di fibre di cellulosa per una vasta gamma di prodotti di carta (Nelson *et al.*, 1962). Si stabilì inoltre che la pasta di kenaf richiedeva meno energia e prodotti chimici per la sua lavorazione di quella che richiedeva il legno ricavato dalle colture standard (Nelson *et al.*, 1962; Wilson *et al.*, 1965).

Attualmente, molti Paesi prestano maggiore attenzione alla ricerca ed alla coltivazione di kenaf a causa della sua elevata efficienza biologica e della sua capacità di adattamento, motivo per il quale il kenaf è stato nominato "il futuro delle colture" (Mazumder, 2000; Cheng, 2001).

I recenti risultati di ricerca e sviluppo hanno ulteriormente messo in evidenza la diversità degli usi della pianta di kenaf dimostrando la sua idoneità nei materiali da costruzione quali pannelli di varie densità, spessore e resistenza per la bio-edilizia, segatura adsorbente, fibre tessili, mangimi per l'alimentazione del bestiame e l'uso delle bio-fibre per i materiali bio-compositi (Cheng, 2001).

Tra le tante domande, quella della produzione di carta è sicuramente di enorme attenzione e sembra essere la più promettente per il futuro (Clark, 1962; Kano, 1997).

Il kenaf è commercialmente coltivato in più di 20 paesi, in particolare In India, in Cina, Thailandia e Vietnam (FAO, 2003). Gran parte della ricerca fatta fin ora sul kenaf è stata volta alla produzione di gran numero di varietà che avevano come scopo la elevata produzione di fibra e la resistenza a malattie (Dempsey, 1975; Bitzer, 2000). Sebbene il kenaf abbia avuto il suo nucleo di origine in Africa, la sua produzione in Africa oggi è molto bassa. Infatti nel 2002, la produzione totale dell'Africa è stata di appena 2,9% della produzione mondiale (FAO, 2003).

1.1.3 VARIETÀ, GERMOPLASMA E CULTIVAR

Le risorse genetiche svolgono un ruolo molto importante nella riproduzione di varietà superiori di kenaf (Su *et al.*, 2004). La collezione di risorse genetiche ha rappresentato per anni la base per la ricerca ed il miglioramento genetico della specie. Edmonds (1991) ha riferito che nelle varietà selvatiche di kenaf ci sono ottimi geni di resistenza alle malattie, geni per la qualità della fibra, per la resistenza alla siccità, ecc, che possono essere trasferiti nelle cultivar commerciali di kenaf per il miglioramento delle stesse.

La maggior parte dei governi si è concentrata sulla raccolta del germoplasma di kenaf, e ha presentato strategie di sviluppo sostenibile e di utilizzazione della diversità genetica. La Cina oggi è la nazione con la più ampia varietà genetica di piante di kenaf, essa ha infatti una banca di germoplasma di 1800 specie di kenaf, il 69% delle quali proviene da 31 Paesi (Su *et al.*, 2004).

Sebbene il kenaf sia una brevidiurna, le diverse cultivar differiscono per la loro sensibilità e la risposta alla lunghezza al giorno (Charles, 2002). Le cultivar oggi in commercio possono essere divise in tre gruppi a seconda del tipo di maturazione: precoci, medie e tardive.

- **Precoci:** include le cultivar russe e coreane. Questo gruppo di cultivar è stato prodotto per la crescita a latitudini superiori a 37° che maturano in 70-100 giorni. Rispetto ad altri gruppi, queste cultivar hanno la produzione di semi più elevata, la minor altezza della pianta e la più bassa resa di fibra. Se queste cultivar sono coltivate a latitudini ancora più basse, esse fioriscono in tempi ancora minori e producono anche rese più basse di fibra.
- **Cultivar a maturazione media:** sono cultivar fotosensibili e la loro fioritura avviene quando la lunghezza del giorno scende sotto le 12,5 ore. Ideali per la produzione tra latitudini comprese tra 10° e 27°, la maggior parte delle cultivar degli USA e dell'India come "Cuba108", "Everglades 41", "71 Everglades" appartengono a questo gruppo (Scott, 1982). Hanno bisogno di 100-120 giorni

di tempo per fiorire e la loro altezza varia da 2,5 a 3,5 m e producono fibra da 1 a 4 tonnellate per ettaro.

- Cultivar tardive: queste sono cultivar non fotosensibili e per la maturazione richiedono 140 o più giorni di tempo. Esse crescono a latitudini comprese tra 10° N e 10° S. A causa del loro lungo periodo vegetativo, queste cultivar sono quelle con la più alta resa e qualità di fibra. La maggior parte di queste cultivar originano da incrocio di altre cultivar.

1.1.4 IMPORTANZA, PRODUZIONE ED USI DEL KENAF

Kenaf e Juta (*Corchorus capsularis* e *Corchorus olitorius* L), sono le importanti colture da fibra dopo il cotone. Il kenaf è coltivato in più di 20 Paesi del mondo (FAO, 1998) ed il novanta per cento della superficie seminata a kenaf, ed oltre il 95% della produzione totale, è in Cina, India e Thailandia (FAO, 2003).

Il kenaf oggi è anche una coltura commerciale della Russia, del Vietnam, del Mozambico, dell'Iran, di Taiwan, di El Salvador, del Guatemala, della Costa d'Avorio e della Nigeria (Dempsey, 1975).

Nel 1985, la produzione mondiale di kenaf ha raggiunto la quantità più elevata di tutti i tempi, 2,8 milioni di tonnellate. Dopo questo massimo storico, la produzione di kenaf ha mostrato una tendenza alla diminuzione. Ora la sua produzione è stabile intorno a circa 0,4 milioni di tonnellate (Liu, 2003).

Possiamo dividere gli usi del kenaf in due gruppi: usi tradizionali e usi moderni. Gli usi tradizionali del kenaf, come è stato già detto, sono due: produzione di corde e spaghi per uso domestico e uso nell'alimentazione.

- Produzione di corde, spaghi e sacchi: il kenaf è stata utilizzato principalmente per produrre spago, corde, tele e sacchi a causa della sua resistenza alla muffa. Oggi, uno dei principali usi del kenaf è quello di rendere una gamma di prodotti di carta e cartone come un sostituto per il legno. A causa di problemi ambientali (produzione di fibre artificiali, tempo lunghi, inquinamento ecc.), e un aumento dei consumi di carta, questa domanda fibra del kenaf ha attratto enorme attenzione nel mondo (Bert, 2002).
- uso alimentare: le foglie secche di kenaf hanno il 30% di proteine grezze e sono state mangiate dagli uomini come vegetali in alcuni paesi africani e asiatici per anni. Inoltre il kenaf è stato anche usato per l'alimentazione del bestiame (Zhang, 2003).

Per quanto concerne gli usi moderni del kenaf essi possono essere suddivisi in vari ambiti che sono i seguenti:

- Medicina: un polisaccaride è stato estratto e caratterizzato dai semi di kenaf da ricercatori giapponesi esso mescolato con cibo e somministrato a topi, ha ridotto significativamente il colesterolo di questi ultimi. Ulteriori ricerche per la sperimentazione sugli uomini sono state fatte recentemente in Giappone (Cheng, 2001).
- Additivo alimentare: Hosomi (2000) aggiungendo polvere di foglie essiccate di kenaf in nove tipi di alimenti ha riscontrato un significativo aumento di calcio e di fibra in essi senza alterarne il sapore mostrando così che il kenaf è un ideale additivo alimentare e le sue foglie possono anche essere utilizzati nella preparazione di tè.
- Substrato per la coltivazione di funghi: l'utilizzazione della polvere di kenaf come substrato per la produzione di funghi insieme al legno ha mostrato una

produzione doppia rispetto all'utilizzo del solo legno. Un uso tale della polvere del kenapulo viene fatto nelle coltivazioni di funghi in Giappone ed in Cina (Cheng, 2001). Substrati fatti di polvere sono ottimi sostituti della torba di muschio (Liu, 2003).

- Assorbente di oli industriali: la polvere di kenapulo del kenaf ha un forte potere assorbente e può essere usata per ripulire le fuoriuscite di petrolio e di altre sostanze chimiche. Per la sua bassa densità, una volta che l'olio è stato assorbito, il prodotto galleggia sulla superficie, il che ne rende più facile la raccolta. La polvere di kenapulo inoltre non è né tossica, né abrasiva ed è più efficace rispetto agli assorbenti classici come argilla e silice (Sameshima, 2000).
- Materiali bio-compositi: i materiali bio-compositi sono costituiti da fibre vegetali mescolate ad altri composti (plastiche, metalli, polimeri, etc.) per dare origine a prodotti di larghissimo impiego in molti settori industriali quali la bioedilizia (Fig. 1.9), l'industria aerospaziale e dell'hi tech (Fig. 1.10), l'industria automobilistica (Fig. 1.11) e per la produzione di tessuto non tessuto (Fig. 1.12). Negli ultimi anni l'utilizzo di questi materiali è cresciuto in maniera significativa grazie anche a diverse direttive dell'UE che vanno nella direzione del riciclaggio dei materiali e della ecocompatibilità. La fibra di kenaf naturale è molto leggera e quindi facile da utilizzare come parte biologica in questi bio-materiali. Essi potrebbero sostituire totalmente nel futuro prossimo il vetro rinforzato e le materie plastiche. I pannelli fatti con fibra di kenaf possiedono caratteristiche di resistenza meccanica superiore a quella del vetro e di molte materie plastiche. Allo stesso tempo, essi sono meno costosi e completamente riciclabili, in molti casi (Kano, 1997) essi possono essere utilizzati nel settore automobilistico, nella bioedilizia, e nel packaging dell'Industria alimentare (Zhang, 2003).
- Pulizia di ambienti: il kenaf è in grado di assorbire le emissioni di CO₂ e NO₂ 3-5 volte più velocemente di foreste, e le sue radici profonde sono in grado di migliorare il terreno (Lam, 2000). In alcune città giapponesi il kenaf è stato piantato dal governo per migliorare la qualità dell'aria.
- Lettiere per animali: lettiere di Kenaf assorbono di più delle tradizionali fatte da legno, segatura o carta triturrata e costano meno (Li, 2002) (Fig. 1.13).
- Produzione di carta: a causa del rapido aumento del consumo di carta, molti paesi mostrano un grande interesse per la ricerca e lo sviluppo del kenaf come materiale alternativo nell'industria della carta. La FAO ha dichiarato che tra il 1950 e il 1988, la domanda di carta nel mondo è cresciuta a un tasso medio annuo del 4,7%. Si calcola che la domanda di carta salirà a 620 milioni di tonnellate nel 2010 (Liu, 2003). Molti aziende che producono carta dalla polpa di kenaf sono oggi una realtà in molti paesi come gli Stati Uniti, la Cina ed il Giappone (Liu, 2000). Nel 1994, la produzione mondiale di polpa di carta prodotta da materiale non legnoso, compreso il kenaf, ha raggiunto 12,5 milioni di tonnellate. Inoltre per la produzione della carta dal kenaf si utilizzano meno inquinanti chimici e meno energia nei confronti della produzione classica fatta da legno. Tutto ciò perché il processo di *retting*, è più facilitato per il basso contenuto di lignina di questa specie nei confronti della altre. (Liu, 2003).
- Abbigliamento e tessuti: nel XXI secolo ci sarà una richiesta enorme di prodotti naturali anziché sintetici a causa della attenzione alla tutela ambientale e delle leggi che i governi emanano sempre più tenendo conto del

riciclaggio e della salvaguardia della salute umana e quindi la domanda delle fibre per l'abbigliamento è destinata a salire dagli attuali 60 milioni a 130 milioni di tonnellate entro il 2050 (Kozlowski, 1996). Il kenaf è una fibra naturale alternativa al cotone. I vestiti fatti di fibra di kenaf non sgualciscono facilmente ed inoltre le fibre di kenaf diffondono rapidamente il calore, così che essi danno un confort maggiore rispetto a quelli di cotone (Cheng, 2001).

1.1.5 QUALITÀ DELLE FIBRE

Le fibre naturali di kenaf si presentano come fasci lignocellulosici. Le dimensioni delle fibre dipendono dal numero di cellule in ogni "fascio". Le singole fibre di kenaf hanno una lunghezza di circa 1-7 mm e un diametro di 10-30µm. La lunghezza delle fibre di kenaf è minore alla base della pianta ed è più elevata all'apice. L'aumento della lunghezza dal basso verso l'alto è stato riscontrato non essere graduale (Rowell e Han, 1999).

La resa di fibra di kenaf è variabile tra 1-2 tonnellate per ettaro ma può raggiungere anche 3-3,5 tonnellate per ettaro in condizioni ideali.

Ramaswamy e Boyd (1994), hanno identificato le seguenti caratteristiche come criteri per determinare la qualità della fibra di kenaf:

- 1) lunghezza
- 2) resistenza dei fasci alla rottura
- 3) elasticità (resistenza alla stiratura)
- 4) Colore
- 5) Contenuto di gomme

Nelle piante di kenaf coltivate sono molti i fattori che influenzano la qualità delle fibre i principali sono la cultivar, le condizioni ambientali, il periodo di raccolta ed il processo di trasformazione (*retting*).

1.2 LA PARETE CELLULARE DELLE PIANTE.

1.2.1 I POLIMERI DELLA PARETE CELLULARE E GLI ENZIMI COINVOLTI NELLA LORO BIOSINTESI

La parete cellulare dei vegetali è la più grande fonte di biomassa sulla Terra ed è di grande importanza per la nutrizione sia umana che animale oltre ad essere la fonte primaria di fibre per differenti usi. Per queste ragioni gli studi sulla biosintesi della parete cellulare nei vegetali sono stati sempre considerati sia ricerca di base, per l'importanza della comprensione di meccanismi biochimici e fisiologici, sia ricerca applicata visto il largo uso industriale dei materiali che compongono la parete.

Fin dall'inizio degli studi sulla biosintesi della parete cellulare delle piante arboree e non fu chiaro che le modificazioni delle pareti cellulari delle cellule delle piante giocano un ruolo essenziale durante la crescita e lo sviluppo della pianta (Carpita *et al.*, 1993). La parete cellulare delle piante superiori si può dividere in parete primaria e parete secondaria. La parete cellulare primaria consta di una serie di polisaccaridi quali cellulosa, emicellulosa e pectine. La parete primaria delle dicotiledoni consta di una rete di macromolecole di cellulosa incorporate in una matrice di polisaccaridi complessi, dei quali xiloglucani e pectine sono i più abbondanti (Carpita e Gibeaut, 1993; McCann e Roberts, 1994).

La parete secondaria mostra sempre una struttura stratificata in cui sono visibili tre strati S1, S2 e S3. Lo strato S1 è a contatto con la parete primaria, quello S2 è al centro ed è di solito lo strato più ispessito mentre S3 è quello più interno, e molto più piccolo degli altri, che delimita il lume cellulare e può mancare nelle angiosperme.

Le Pareti delle monocotiledoni, compresi il frumento e l'orzo, sono organizzate allo stesso modo, anche se i glucuronarabinoxilani e gli (1,3; 1,4) β -glucani predominano nella matrice di queste specie, mentre i livelli di pectine di xiloglucani sono relativamente più bassi (Smith e Harris, 1999, Farrokhi *et al.*, 2006)

Le ultime due classi di polisaccaridi sono sintetizzate nelle cisterne del Golgi mentre la cellulosa è sintetizzata sulla membrana plasmatica (Farrokhi *et al.*, 2006). La parete secondaria viene depositata dopo la formazione della parete primaria e quindi dopo la crescita della cellula conferendo a questa stabilità meccanica. Nella parete secondaria delle cellule di tutte le tracheofite oltre ad essere presenti cellulosa ed emicellulosa, è presente la lignina.

Nella biosintesi della parete cellulare delle piante sono coinvolti parecchi enzimi quasi tutti facenti parte della categoria delle glicosil-transferasi (GT), un enorme gruppo di enzimi che possono a loro volta essere suddivisi, in base alle omologie di sequenza, in 70 famiglie.

Due grandi classi di GT possono essere distinte nella biosintesi della parete cellulare delle piante. La prima è quella dei polisaccaridi-sintetasi che include gli enzimi che catalizzano l'incorporazione di residui glicosidici, originariamente legati ad un nucleotide, in macromolecole che costituiscono i principali componenti della parete cellulare (Perrin *et al.*, 2001, Bonetta *et al.*, 2002). Questi enzimi sono tutte proteine con domini multipli transmembrana coinvolte nella biosintesi di omopolisaccaridi come la cellulosa (Richmond e Sommerville 2000) e alcune coinvolte anche nella biosintesi di alcuni eteropolisaccaridi come xiloglucani, arabinoxilani e glucomannani (Perrin 2001). Gli enzimi di questa prima classe sono codificati da geni appartenenti a due famiglie geniche denominate CeSA e CsL (vedi dopo).

La seconda classe di GT è denominata GlyT, i cui componenti sono proteine che possiedono un unico dominio transmembrana che attraversa la membrana e si

ancora ad essa, un breve dominio N-terminale citosolico ed una lunga catena che termina con un dominio C-terminale globulare catalitico dentro il lume del Golgi (Sterling *et al.*, 2001, Gibeaut 2000, Farrokhi *et al.*, 2006). Questi enzimi sono coinvolti per lo più per la sintesi delle pectine e degli xiloglucani.

1.2.2 LA BIOSINTESI DELLA CELLULOSA

La cellulosa è un polimero lineare del glucosio tenuto assieme da legami β 1-4 tra i residui con un grado di polimerizzazione che può variare dai 6000 nella parete primaria ai 14000 residui nella parete secondaria. Le catene polimeriche sono legate a formare microfibrille di circa 3 nm di diametro nella parete primaria e 5-10 nm nella secondaria (Jarvis 2003, Brown 1996); ogni microfibrilla consta di 36 catene polisaccaridiche (fig. 1.14) che sono legate da legami a idrogeno sia intra che intermolecolari e da forze di Van der Waals (French *et al.*, 1999, French *et al.*, 1993). Ogni anno vengono prodotte sulla terra circa 180 bilioni di tonnellate di cellulosa, per questo è il polimero più abbondante sul pianeta (Englehardt 1995).

I primi studi fatti sulla biosintesi della cellulosa negli anni 80 furono eseguiti sul batterio *A. xylinum* che tra i batteri è quello che produce la maggior quantità di cellulosa (Delmer 1999) e quindi fu preso in considerazione come organismo modello. Da esso fu clonato il primo gene responsabile della biosintesi della cellulosa al quale fu dato il nome di CeSA cioè Cellulosa Sintetasi A dove la A stava come iniziale di *A. xylinum*. Da allora tutti i geni della biosintesi della cellulosa isolati in altri organismi siano essi batteri, alghe o piante che avevano omologia con la subunità catalitica del gene isolato in *A. xylinum* presero questa nomenclatura (Delmer 1999). Nelle diverse piante superiori sono stati trovati diversi geni CeSA che codificano ognuno per una isoforma enzimatica che catalizza la formazione della cellulosa a partire da UDP-glucosio. Già nel 1996 Pear (Pear *et al.* 1996) aveva identificato 2 isoforme dell'enzima CeSA in cotone e ne aveva clonato i geni. Negli stessi anni Delmer trovò un gruppo di ben 36 geni CeSA in *A. thaliana*, poi furono trovati 12 geni CeSA in mais e 7 in pioppo (Holland *et al.*, 2000), e si notò che tutte le proteine da essi codificate possedevano dai tre ai sei domini transmembrana nella regione C-terminale e uno o due 2 domini transmembrana nella regione N-terminale (Delmer 1999). Questo rese chiaro che le proteine codificate dai geni CeSA erano proteine transmembrana, appartenenti alla prima classe delle GT, e che l'insieme dei geni CeSA formava una famiglia genica che per l'elevata quantità di componenti (geni) venne nominata super famiglia.

Le subunità catalitiche della cellulosa sintetasi, infatti, sono codificate nelle piante da i membri di una famiglia multigenica i cui membri codificano tutti per proteine transmembrana che sono simili alla proteina cellulosa sintase del batterio *A. xylinum* (Wong *et al.*, 1990) e alla proteina celA di *A. tumefaciens* (Matthysse *et al.*, 1995). Studi espressione hanno poi dimostrato che diversi geni CeSA sono espressi in tessuti differenti o in momenti differenti della crescita della pianta e della formazione della parete cellulare (Arioli *et al.*, 1998, Burn *et al.*, 2002).

Fu anche chiaro che il motivo amminoacidico D,D,D, QXXRW, presente anche nelle isoforme proteiche batteriche, era altamente conservato sia in pianta che in alghe anche se nelle diverse piante vi erano delle inserzioni di sequenze specie-specifiche che separano questi domini (Pear *et al.*, 1996).

Studi al microscopio elettronico mostrarono che la sintesi della cellulosa avviene in complesse strutture proteiche transmembrana che per la loro forma furono chiamate

“rosette” (fig.1.15). Esse consistono di sei unità pressoché esagonali che si trovano sulla membrana plasmatica (Williamson *et al.*, 2001). Ogni unità che forma la rosetta è a sua volta formata da sei catene polipeptidiche di β -D1-4-glicosil-sitetasi (CESA) (GT della prima classe), ognuna delle quali sintetizza una macromolecola di β -D1-4-glucosio a partire da molecole di UDP-glucosio (Scheible *et al.*, 2001, Perrin 2001). In questo scenario è facile comprendere che 36 macromolecole di β D1-4 glucosio vengono prodotte contemporaneamente da ogni rosetta ed emergono nell’apoplasto dove vengono assemblate in microfibrille di cellulosa (Fig. 1.16).

Con l’ausilio dei software informatici e con l’avvento delle banche dati proteiche è stato possibile ipotizzare la struttura tridimensionale delle catene polipeptidiche codificate dai geni CeSA. E’ opinione corrente oggi che gli otto domini transmembrana delle proteine CESA, sei al C-terminale e 2 al N-terminale, si dispongano per formare un canale centrale attraverso il quale viene secreta la molecola di cellulosa (Fig. 1.17). Questa ipotesi conformazionale è avvalorata dal fatto che una proteina che ha sequenza parzialmente omologa a quelle delle proteine CESA è un ATPasi di membrana, dipendente da ioni calcio, (Chadwick *et al.*, 1987) ed ha una conformazione simile. Le due proteine potrebbero provenire dallo stesso progenitore ancestrale.

Le porzioni N-terminali citosoliche delle proteine CESA mostrano avere un dominio simile ad un dominio proteico trovato negli animali che assolve alla funzione di interazione proteina-proteina (Sanchez-Garcia *et al.*, 1994).

Una proteina di membrana candidata all’interazione con le proteine CESA fu trovata e le fu dato il nome di SuSy (E.C. 2.4.1.13 saccarosio sintetasi) che catalizza la reazione che porta alla formazione del UDP-glucosio a partire dal saccarosio e dall’UDP (amor *et al.*, 1995). Fu subito ipotizzato che SuSy poteva interagire con le proteine CeSA fornendo loro l’UDP-glucosio (Robinson 1996).

Altri studi mostrarono che le proteine CESA nelle piante superiori non riescono a sintetizzare la cellulosa in assenza di altre proteine. Analisi di mutanti di *A. thaliana* mostrarono che alcuni di essi, mutanti per un gene che codifica un end-1-4- β -D-glucanasi, anche se in possesso di tutti i geni CeSA non riuscivano a sintetizzare la normale cellulosa e producevano in compenso un aumento di pectine nella parete cellulare (Sato *et al.*, 2001). Questi mutanti furono nominati KOR e su essi altri studi dimostrarono che la proteina KOR era implicata nella terminazione della catena della cellulosa o nella degradazione di catene non ben incorporate nelle microfibrille di cellulosa (Mølhøj *et al.*, 2001).

Dall’insieme degli studi citati, il corrente modello della biosintesi della cellulosa prevede quindi tre fasi: nella prima fase, la proteina SuSy, associata alla membrana plasmatica, a partire dal saccarosio e dall’UDP sintetizza l’UDP-glucosio e lo consegna al macchinario biosintetico formato dalle proteine CESA. Nella seconda fase le proteine CESA assemblate in rosetta polimerizzano i monomeri di glucosio in catene di cellulosa liberando UDP che è pronto per essere riutilizzato da SuSy. Nell’ultima fase una proteina di membrana KOR agisce come un controllo delle catene di cellulosa favorendone l’accorpamento in microfibrille e tagliando le catene difettose (Delmer & Haigler, 2002; Mølhøj *et al.*, 2001) (Fig. 1. 18). In questo modo , l’ interazione delle proteine CeSA, SUSY e KOR disciplinano la biosintesi della cellulosa nelle piante (Read & Bacic, 2002).

1.2.3 LA BIOSINTESI DELLA LIGNINA

Con il termine lignina si indica uno dei principali tipi di polimeri fenolici che, nonostante il nome, si ritrova come costituente più o meno abbondante delle pareti cellulari di tutte le piante vascolari, comprese la specie erbacee.

La lignina è il secondo componente della parete cellulare dopo la cellulosa per abbondanza e si pensa sia anche il secondo polimero terrestre per abbondanza contenendo in esso circa il 30% del carbonio presente nella biosfera. La lignina è presente nelle pareti cellulari in stretta associazione con la matrice cellulosica e con gli -OH fenolici legati covalentemente o tramite legami idrogeno ai carboidrati della parete.

Essa contribuisce alla forza compressiva della parete cellulare formando una fitta rete attraverso la matrice che lega fortemente le microfibrille cellulosiche. Questo processo è stato considerato un fattore decisivo nell'adattamento delle piante all'habitat terrestre, in quanto solo la lignificazione delle pareti rende possibile la formazione di strutture rigide di sostegno in piante legnose ed alberi nonché la formazione di tessuti conduttori per il trasporto di acqua e di altri nutrienti. Infine, va ricordato il ruolo della lignina nella protezione della parete dall'attacco di agenti fisici, chimici e biologici. (Goujon *et al.*, 2003)

La lignina si forma dalla polimerizzazione di tre alcool idrocinnamilici, detti anche monolignoli, che sono il p-cumarilico, il coniferilico ed il sinapilico. I monolignoli differiscono strutturalmente uno dall'altro per la presenza di uno, due o nessun gruppo metilico (Grima-Pettenati *et al.*, 1999).

La lignificazione è il processo di polimerizzazione dei tre monolignoli, ad opera di laccasi e perossidasi, e produce rispettivamente i residui idrossifenilici (H), guacilici (G), e siringilici (S) che sono le unità (monomeri) che si trovano nella lignina. I monomeri della lignina sono legati tra loro da differenti tipi di legame (Hatfield *et al.*, 2001). In figura 1.19 è riportata la struttura proposta da Nimz nel 1974 per la lignina di faggio sulla base di dati analitici, esperimenti modello e ricerche di natura sia biosintetica che degradativa.

I contenuti di lignina e la composizione della stessa variano tra le diverse specie, tra i diversi tessuti della stessa pianta e tra i tipi di cellule (Donaldson 2001). Sebbene esistono le dovute eccezioni, la lignina delle angiosperme dicotiledoni è fatta per lo più di subunità G ed S e tracce della subunità H mentre quella delle monocotiledoni oltre ad avere alti livelli di G ed S, simili tra loro, ha anche più residui H delle dicotiledoni, infine le gimnosperme hanno invece una lignina guaiacilica, fatta cioè per lo più da G e da bassi livelli di H (Baucher *et al.*, 1998). Sta diventando sempre più chiaro il fatto che le lignine derivano da più monomeri di quelli riconducibili alla polimerizzazione dei tre monolignoli principali, infatti in alcune piante sono state osservate lignine al cui interno vi erano monomeri diversi dai soliti (Ralph *et al.*, 2001). Si osservò in seguito che tali lignine erano prodotte anche da piante nelle quali alcuni geni della biosintesi dei monolignoli erano sottoespressi o addirittura spenti (Ralph *et al.*, 2001).

La biosintesi della lignina, teoricamente, si può suddividere in tre diverse fasi: la biosintesi dei monolignoli, il trasporto dei monomeri nella parete cellulare ed il processo di polimerizzazione.

La biosintesi dei monolignoli parte dalla deaminazione della fenilalanina, un amminoacido, e coinvolge successive idrossilazioni dell'anello aromatico seguite da riduzioni e conversioni della catena carbossilica in gruppi alcolici. In una prima parte, comune anche al metabolismo di altri fenil propanoidi, si va dalla fenilalanina agli

acidi idrossicinnamici grazie alle azioni degli enzimi fenilalaniniasi (PAL; E.C.4.3.1.5), Cinnamato-4-idrossilasi (C4H; E.C.1.14.13.1) e 4-cumarato-CoA-ligasi (4CL; E.C.6.2.1.12). La seconda parte invece più strettamente propria della biosintesi dei monolignoli parte dagli esteri degli acidi per trasformarli prima in aldeidi e poi in acidi (Fig. 1.20) coinvolgendo due enzimi, la Cinnamil-CoA-riduttasi (CCR; E.C.1.2.1.44) e la coniferil-alcool-deidrogenasi (CAD; E.C.1.1.1.195) NAD⁺ dipendente.

I tre monolignoli così formati nel citoplasma vengono trasformati nei rispettivi glucosidi (p-cumaril- β -glucoside, coniferina e siringina), in cui una molecola di glucosio si lega con un ponte etero all'-OH fenolico.

I derivati glucosidici dei monolignoli sono considerati la forma di trasporto delle unità monomeriche attraverso le membrane cellulari fino alla parete (Steeves *et al.*, 2001, Samuels *et al.*, 2002), il sito della lignificazione (polimerizzazione).

Nel processo di polimerizzazione (lignificazione) possono essere coinvolti due enzimi ossidativi: la laccasi e la perossidasi. La laccasi è una fenolossidasi, contenente rame, che catalizza la reazione in cui si produce un radicale, mentre il Cu⁺ del gruppo prostetico viene riossidato da ossigeno molecolare. Le perossidasi, localizzate all'interno della parete oppure legate alla parete con legami covalenti, producono anch'esse radicali polimerici ma necessitano di H₂O₂ per farlo (O nnerud *et al.*, 2002 Boerjan *et al.*, 2003).

La deposizione della lignina è lo stadio finale del differenziamento delle cellule dello xilema e principalmente avviene durante la formazione della parete cellulare secondaria (Donaldson 2001).

La deposizione della lignina procede in diverse fasi, ciascuna preceduta dalla deposizione di carboidrati, e inizia negli angoli dei confini tra le cellule dopo la formazione della parete primaria, quando è cominciata la formazione dello strato S1. Quando la formazione della matrice polisaccaridica dello strato S2 è stata completata, la lignificazione procede attraverso questo strato della parete. Una parte di lignina è anche depositata dopo che la cellulosa e l'emicellulosa sono state depositate nello strato S3. Generalmente, la concentrazione della lignina è superiore nella lamella mediana e nella parete primaria rispetto allo strato S2 della parete secondaria (Samuels *et al.*, 2002).

La natura chimica della matrice di carboidrati e la disposizione delle microfibrille di cellulosa influenzano la deposizione della lignina (Roussel *et al.*, 1995). Microradiografie hanno dimostrato che i tre monolignoli sono depositati in momenti diversi: le unità H vengono depositate per prima poi quelle G ed infine le S (Terashima *et al.*, 1993).

La lignina può essere sintetizzata anche in risposta a diversi fattori ambientali come gli stress meccanici e gli attacchi dei patogeni (Vance *et al.*, 1980, Boerjan *et al.*, 2003). Nelle specie arboree il contenuto di lignina varia tra il 15 ed il 36% del peso secco del legno, questo contenuto è molto diverso da specie a specie.

Considerando la grandezza dell'industria della carta si capisce che è di enorme interesse la modificazione genetica della biosintesi della lignina nelle specie arboree usate in questa filiera, infatti il grado di lignificazione nelle piante è uno dei maggiori ostacoli alla produzione della carta. La lignina inoltre crea anche problemi di digeribilità nei mangimi per gli animali, infatti essa diminuisce il valore nutrizionale del foraggio usato per l'alimentazione del bestiame (Jung *et al.*, 1993). Parecchi studi sono stati fatti, negli ultimi anni, per cercare di modificare la lignina delle piante usate per il foraggio dei ruminanti al fine di aumentarne la digeribilità e contemporaneamente aumentare l'efficienza del processo di produzione della carta.

(Guo *et al.*, 2001, Pilat *et al.*, 2002). Lignine con alti livelli di S sono più facilmente estraibili nel processo di produzione della carta (Chiang *et al.*, 1998)

D'altra parte però gli alti contenuti di lignina nel legno contribuiscono ad aumentare il valore calorico del legno ed è quindi desiderabile avere alti contenuti di lignina per i legni usati come fonti di energia (Baucher *et al.*, 1998).

Per quanto concerne, infine, la degradazione della lignina, esiste un ampio range di microrganismi capaci di degradare, parzialmente o completamente, questo polimero: da alcuni funghi del legno fino ad alcuni batteri ed attinomiceti, meno efficaci, però, dei funghi. Circa i meccanismi coinvolti nei processi degradativi, si ritiene che laccasi e le perossidasi (ligninasi o perossidasi della lignina), prodotte dal microrganismo, svolgano un ruolo molto importante in questo processo, anche se queste ipotesi non sono supportate da esperimenti condotti sulla lignina nativa.

1.3 SCOPO DELLA TESI

Nella pianta di kenaf normalmente il rapporto tra il taglio ed il kenapulo in base al peso secco è generalmente di 1:3 ma un rapporto più favorevole al primo sarebbe più confacente alle necessità industriali.

La variazione del rapporto quantitativo tra questi composti e l'esistenza di legami chimici resi più o meno forti dalla presenza di altri composti, modifica alcune caratteristiche delle fibre quali densità e filabilità, influenzando sulle caratteristiche reologiche del prodotto finale.

Le fibre di kenaf presentano una resa industriale e caratteristiche fisico-meccaniche di servizio ed utilizzabilità equivalenti alla materia prima ottenuta dal pioppo ma, per poter essere usate nella produzione dei bio-compositi, le fibre devono possedere delle specifiche proprietà tra cui possiamo citare consistenza fisica, morbidezza, sottigliezza, malleabilità (Zhou *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2002; Morrison *et al.*, 1999).

Negli ultimi anni, le molte ricerche attuate in campo agronomico sul kenaf per identificare le caratteristiche pedo-climatiche migliori per ciascun genotipo al fine di ottenere una fibra adatta alle esigenze industriali hanno condotto solo parzialmente ai risultati voluti. In generale, gli approcci agronomici non permettono di ottenere delle variazioni quanti-qualitative significative senza una parallela modifica del *background* genetico della pianta. A tale proposito, le conoscenze ottenute dallo studio della fisiologia e della genetica delle vie biosintetiche che portano alla formazione della lignina e della cellulosa possono essere utilizzate in campo biotecnologico per l'ottenimento di un prodotto con caratteristiche molto vicine a quelle richieste.

Le moderne tecniche di biotecnologia vegetale hanno dimostrato che variazioni nell'espressione dei geni della biosintesi della lignina e della cellulosa interferiscono con la qualità ed anche con la quantità dei due polimeri prodotti dalla pianta. Un esempio è il caso di piante di tabacco con una sottoregolazione del gene *ccr*, le quali mostravano una riduzione della lignina (Pincon *et al.*, 2001). Lo scopo della nostra ricerca è stato quello di identificare sequenze di geni coinvolti nella biosintesi della lignina e della cellulosa nello stelo della pianta di kenaf per successive modificazioni strutturali e fisiche delle fibre e di valutarne l'espressione temporale. Un altro obiettivo del progetto è quello di mettere a punto metodi sperimentali di differenziamento e trasformazione genetica di kenaf al fine di modificare l'espressione di tali geni.

2. MATERIALI E METODI

2.1 SUBSTRATI DI COLTURA

Per la preparazione di tutti i substrati è stata utilizzata acqua demineralizzata con deionizzatore Millipore ad osmosi inversa fino alla conducibilità elettrica di $18,2 \text{ Mohm} \times \text{cm}^{-1}$. La reazione finale dei vari substrati è stata portata a pH 5,8 con l'aggiunta di HCl 0,1N o KOH 0,1N. La sterilizzazione è stata condotta in autoclave ad una temperatura di 120°C ed alla pressione di 0,12 Mpa per 20 minuti. Tutte le operazioni in sterilità sono state eseguite sotto cappa a flusso laminare orizzontale per quanto concerne le piante e verticale per la manipolazione dei batteri, il cui interno è stato reso sterile prima dell'uso per azione di una lampada germicida a raggi UV tenuta accesa per almeno 20 minuti ed il cui piano di lavoro era stato preventivamente trattato con una soluzione di alcool etilico denaturato al 75%. Per la micropropagazione in vitro è stato utilizzato il substrato MS, basato sulla formulazione di Murashige e Skoog (1962) sia per i macroelementi ed i microelementi che per il complesso vitaminico, con l'aggiunta di saccarosio 30 g l^{-1} e Microagar (Duchefa) 8 g l^{-1} quale gelificante.

Tutti i composti termolabili da aggiungere ai substrati di crescita sono stati previamente filtrosterilizzati con filtri di nitrocellulosa con porosità $0,2 \mu\text{m}$ (Millipore) e poi aggiunti ai mezzi di coltura autoclavati quando questi hanno raggiunto la temperatura di 40°C circa.

Per quanto concerne i terreni di coltura per cellule batteriche, è stato usato il brodo di Luria (LB) per la crescita di *Escherichia coli* fatto con 1% Triptone, 0,5% estratto di lievito e 1% NaCl, portato a valore di pH 7,2, aggiungendo poche gocce di NaOH 10M. Per lo stesso terreno solido, si aggiunge Bactoagar (Difco) all'1,5%. Il substrato YEP contenente bactriptone all'1%, estratto di lievito all'1% e NaCl allo 0,5% con pH 7.5.

Quando è necessario al terreno di coltura viene aggiunto l'antibiotico opportuno.

2.2 CLONAGGIO DI SEQUENZE DI GENI DELLE BIOSINTESI DELLA CELLULOSA E DELLE LIGNINA

2.2.1 MATERIALE VEGETALE

Semi di piante di kenaf della cultivar Dowling sono stati fatti germinare in terreno sterile. Le piante sono state allevate in camera di crescita ad una temperatura giornaliera di 24°C e notturna di 20°C. Le piante sono state irrigate 2 volte a settimana con volumi costanti di acqua.

I tessuti fogliari delle piante, allevate come sopra riportato, sono stati usati come fonte di DNA, mentre dal taglio e dal kenapulo, separati manualmente l'uno dall'altro, è stato estratto l'RNA per i nostri esperimenti di espressione genica.

2.2.2 ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO

L'estrazione del DNA genomico è stata effettuata secondo il protocollo di Doyle e Doyle (1990) al quale sono state apportate alcune modifiche.

La polvere ottenuta è stata inserita in tubo da centrifuga sterile da 50 ml, per un totale di 5g. Al tessuto triturato sono stati aggiunti 20 ml di tampone di estrazione EBMA (Tris – HCl pH 8,00, 100 mM; EDTA 50 mM; NaOH 8,3 mM; SDS 1,25%; NaCl 500 mM e NaHSO₃ 3,8 mg ml⁻¹); il tutto è stato incubato a 65°C per 30 minuti e poi miscelato con 14 ml di cloroformio:alcol isoamilico (24:1 v:v) e centrifugati a 4000 rpm per 10 minuti. A seguito del trasferimento del surnatante in una nuova provetta, è stata aggiunta ad esso 10 µl di una soluzione di RNasi alla concentrazione di 100 ng µl⁻¹ ed il tutto è stato incubato a 37°C per 30 minuti per la degradazione dell'RNA.

In seguito, alla soluzione sono stati aggiunti 15 ml di una soluzione contenente cloroformio ed alcool isoaminico nel rapporto di 24:1; il tutto è stato centrifugato alle condizioni sopra descritte per 10 minuti.

Alla fase acquosa surnatante, trasferita in un nuovo tubo sterile, sono stati aggiunti, circa 2/3 del volume di isopropanolo freddo ed il tutto è stato incubato per una notte a 4°C.

Dopo una centrifugazione di 20 minuti a 4000 rpm e a 4°C, il pellet precipitato è stato sottoposto a un lavaggio mediante 1 ml di una soluzione di etanolo al 70% per due volte, e lasciato asciugare all'aria. Il DNA è stato risospeso in H₂O sterile e conservato a -20°C.

2.2.3 CORSA ELETTROFORETICA E QUANTIZZAZIONE DEL DNA ESTRATTO

Il DNA estratto è stato visualizzato e quantizzato mediante gel elettroforesi. Le corse elettroforetiche sono state effettuate su gel di agarosio all'1%. Per preparare i gel è necessario aggiungere il bromuro di etidio nella quantità di 1/20.000 e sciogliere l'agarosio in concentrazione 1% peso/volume in tampone TAE (40 mM tris, 25 mM sodioacetato, 0,5 mM EDTA, 0,1% di acido acetico glaciale). Il tutto deve essere riscaldato al microonde finché l'agarosio non si è sciolto completamente.

Il bromuro di etidio è un intercalante del DNA che lo rende fluorescente quando irradiato da luce U.V. permettendone la visualizzazione sul gel.

Ai campioni è stato aggiunto un buffer di caricamento, il 6X Loading Dye Buffer (Tris – HCl pH 7,6 10 mM, Orange G 0,15%, Xilene Cianolo 0,03%, Glicerolo 60%, EDTA 60 mM) per favorire il depositarsi dei campioni nel fondo dei pozzetti e per visualizzare le bande durante la corsa.

Per la quantizzazione del DNA estratto l'immagine della corsa elettroforetica , è stata acquisita all'analizzatore di immagini Typhoon 9200 (Amersham Biosciences) ed analizzata con il programma ImageQuant 5.2.

2.2.4 ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE E SINTESI DEI cDNA

L' RNA è stato estratto, sia dal taglio che dal kenapulo, utilizzando il kit di estrazione RNeasy Kit (Qiagen). Tutta la procedura di purificazione verte sull'impiego di una resina a scambio ionico che è in grado di legare in modo selettivo l'RNA. In questo modo vengono isolate le molecole di RNA di lunghezza superiore a 200 paia di basi; del momento che la maggior parte degli RNA di lunghezza inferiore a 200 bp sono RNA ribosomiali e transfer, ne deriva che grazie a questo kit si ottiene un arricchimento di RNA messaggero.

Le estrazioni sono state fatte sempre a partire da 400 mg di tessuto sia esso taglio che kenapulo prelevato da piante allevate in camere di crescita a temperatura diurna di 24°C e notturna di 20°C e con 14 ore di luce e 10 di buio.

La purezza dell'RNA totale, è stata controllata allo spettrofotometro. L'RNA estratto è stato usato solo se il rapporto tra le letture allo spettrofotometro a 260 nm ed a 280 nm era compreso tra 1.8 e 2.0, che denota una minima contaminazione da proteine cellulari.

L'elettroforesi per visualizzare l'RNA estratto è stata condotta su un gel di agarosio all'1% sciolto in tampone TBE (0,089M Tris; 0,089M Acido borico; 0,002M EDTA) per la preparazione del quale è stata usata acqua con l'aggiunta dello 0,1% di DEPC (dietilpirocarbonato).

5 µg di RNA totale estratto sono stati utilizzati per ottenere cDNA mediante una reazione di trascrizione inversa. Per tale reazione è stato usato l'enzima trascrittasi inversa della StrataScript® Reverse Transcriptase (Stratagene, USA) e la reazione è stata eseguita in base alle istruzioni fornite dal produttore.

Il kit StrataScript® Reverse Transcriptase (Stratagene, USA) è ottimizzato per sintetizzare il primo filamento di cDNA partendo da piccole quantità di RNApolyA+ o da RNA totale.

2.2.5 DISEGNO DEI PRIMER

I primer utilizzati in reazioni di analisi di amplificazione PCR su DNA genomico e in analisi di PCR quantitativa su cDNA, sono stati disegnati con un approccio bioinformatico. In banche dati di DNA esistono sequenze dei geni clonati da diverse specie vegetali. La Banca Dati del National Center for Bioinformaic Information, NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), è il più importante esempio di database per gli studi computazionali in biologia molecolare. Da tale banca dati sono stati presi i geni della biosintesi della cellulosa e della lignina già clonati in altre specie e grazie ad un programma gratuito (<http://www.es.embnet.org/Services/MolBio/t-coffee/>) sono stati allineati ed è stato possibile trovare le zone altamente omologhe presenti in essi. Su

tali zone sono stati disegnati i primer riportati in tabella 3.1 e usati nelle analisi molecolari.

Per quanto riguarda la via biosintetica della lignina l'attenzione è stata rivolta ai seguenti 4 geni: cinnamato 4-idrossilasi (*c4h*), 4-coumarato:CoA-ligasi (*4cl*), cinnamil-CoA ossidoreduttasi (*ccr*) e cinnamil-alcool- deidrogenasi (*cad*) i cui prodotti proteici sono enzimi che catalizzano modificazioni del gruppo carbossilico della fenilalanina, e molecole da essa derivate, portando alla formazione dei monolignoli, componenti monomerici della macromolecola della lignina (Fig.1.20). Per quanto concerne, invece, la via biosintetica della cellulosa, ci si è soffermati sullo studio della famiglia dei geni CeSA (cellulosa sintasi) i cui membri codificano per proteine transmembrana capaci di catalizzare reazioni che portano alla formazione catene di β 1-4 glucosio, a partire da monomeri di UDP-glucosio (Fig1.17).

2.2.6 ANALISI DI AMPLIFICAZIONE DI DNA GENOMICO MEDIANTE PCR (POLIMERASE CHAIN REACTION)

La tecnica di PCR (Polymerase Chain Reaction) permette di amplificare *in vitro* una regione specifica di DNA. Essa necessita di due oligonucleotidi, (corte sequenze di 15-25 basi) detti "primer", come inneschi complementari all'estremità 5' di ciascuno dei due filamenti del frammento da amplificare. Le estremità 3'OH degli oligonucleotidi servono da innesco per una DNA polimerasi che sintetizza i filamenti complementari. La polimerasi utilizzata è quella di *Thermus aquaticus* (Taq polimerasi) che è termostabile e, quindi, non degradabile nella tappa di denaturazione a 95 °C.

Nel nostro caso, come primer sono stati usati quelli riportati in tabella 3.1, disegnati con la procedura spiegata al paragrafo precedente.

Nella miscela di reazione oltre ad essere presenti i due primer specifici devono essere presenti: il DNA di kenaf che funge da stampo, una Taq polimerasi e il suo buffer specifico, l' $MgCl_2$ che attiva la Taq polimerasi e stabilizza le interazioni tra oligonucleotidi e stampo ed i dNTPs (deossiribonucleotidi fosfato) che costituiscono i precursori per la sintesi del DNA. Per cui l'amplificazione è stata effettuata utilizzando 1 μ l di ciascun primer alla concentrazione di 10 μ M, 1 μ l di dNTPs alla concentrazione di 10 mM, 2,5 μ l di tampone della taq polimerasi 10X (Invitrogen), 0,5 μ l di taq polimerasi (Invitrogen) alla concentrazione di 5U μ ⁻¹, 1 μ l di $MgCl_2$ alla concentrazione di 50 mM, 25 di ng DNA ed H₂O fino ad un volume totale di reazione pari a 25 μ l.

La reazione di PCR è stata effettuata in un termocicizzatore "Mastercycler Eppendorf ep gradient (Eppendorf USA)".

Le condizioni di reazioni sono state denaturazione iniziale di 5 minuti a 94 °C, seguita da 30 cicli ognuno dei quali è fatto da una denaturazione iniziale di 30 secondi a 92 °C, una fase di ibridazione tra DNA stampo e primer lunga 30 secondi la cui temperatura dipende dalla temperatura alla quale funzionano i primer (melting) ed in fine da una fase di estensione di 1,5 minuti a 72 °C

I trenta cicli sono stati seguiti da un ciclo di estensione finale di 10 minuti a 72 °C ed i campioni sono stati conservati a 4 °C

Nella maggior parte dei casi più cicli di PCR sono stati necessari per amplificare le sequenze geniche dei geni *ccr*, *cad*, *cesa*, *4cl*, *actina II* e *c4h* ed avere quantità adeguate di ampliconi per la successiva clonazione.

Per ogni reazione sono stati preparati corrispondenti controlli negativi (eliminando il DNA stampo) e positivi (usando un DNA stampo o degli oligonucleotidi già usati in precedenza).

Solitamente 1/10 dei prodotti di reazione vengono sottoposti a elettroforesi su gel di agarosio all'1% insieme ad un marcatore di lunghezza per stimare la dimensione del frammento amplificato e valutare la purezza, oltre che per valutare la specificità delle condizioni di reazione o eventuali contaminazioni dei reagenti (Fig. 3.7).

2.2.7 ANALISI DI AMPLIFICAZIONE DELLE SEQUENZE ESPRESSE MEDIANTE RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTASE POLIMERASE CHAIN REACTION)

Tale analisi è uguale a quella precedente con l'unica differenza che al posto del DNA come stampo viene usato il cDNA prodotto a partire dagli RNA estratti dal taglio e dal kenapulo con il procedimento spiegato alla sezione 2.2.4

2.2.8 PURIFICAZIONE DEL DNA DOPO REAZIONI DI PCR O RT-PCR

I prodotti della PCR e della RT-PCR sono stati isolati utilizzando il kit di purificazione fornito dalla Promega PCR (Wizard® SV Gel e PCR - Clean Up System). Esso si basa sulle proprietà di una resina a scambio ionico. In condizioni di elevata forza ionica il DNA si lega alla resina, mentre i contaminanti passano attraverso la colonna. Le impurità vengono efficientemente lavate via mentre il DNA purificato viene eluito in acqua o in tampone Tris. La composizione dei tamponi presenti nel kit è ottimizzata per un efficiente recupero del DNA e per la rimozione di contaminanti. Per la purificazione è stato seguito il protocollo fornito assieme al kit dalla casa produttrice.

La purezza dei frammenti amplificati è stata esaminata mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1% di un'aliquota di essi (Fig. 3.7).

Per la quantizzazione del DNA estratto l'immagine della corsa elettroforetica, è stata acquisita all'analizzatore di immagini Typhoon 9200 (Amersham Biosciences) ed analizzata con il programma ImageQuant 5.2.

2.2.9 CLONAGGIO DELLE SEQUENZE ISOLATE IN PLASMIDI

I frammenti amplificati e purificati sono stati clonati nel vettore di clonaggio pGEM-T Easy® (Promega) (Fig.2.1) e poi trasferiti nella specie batterica *Escherichia coli*.

Il clonaggio ha previsto le fasi di adenilazione degli amplificati, ligazione degli amplificati in vettori di clonaggio e inserimento dei vettori nelle cellule batteriche.

Nella fase di adenilazione degli amplificati, questi ultimi sono stati adenilati utilizzando una polimerasi che lega deossadenosina-monofosfato al 3'-OH indipendentemente dallo stampo. Per ogni frammento la quantità da adenilare, e quindi successivamente da ligare nel vettore di clonaggio, è stata calcolata in base alla relazione seguente:

$$\text{ng inserto} = \text{ng vettore} \times \left(\frac{\text{paia di basi dell'inserto}}{\text{paia di basi del vettore}} \right) \times 3$$
tenendo conto che i protocolli della ditta Promega consigliano di utilizzare 50 ng di vettore in ogni reazione di legazione.

La reazione è stata eseguita in un volume di 10 μl . Nella miscela di reazione oltre all'amplificato sono presenti i dATP alla concentrazione di 2,5 mM la Taq polimerasi (Promega) alla concentrazione di 5 U μl^{-1} ed il suo tampone alla concentrazione 1X (Promega) e l' MgCl_2 alla concentrazione di 5 mM

La miscela di reazione è stata posta a 70°C per 30 minuti nel termocicizzatore "Mastercycler Eppendorf ep gradient (Eppendorf USA)".

Alla fase di adenilazione ha fatto seguito quella di ligazione.

La reazione di ligazione consente di saldare le estremità di un plasmide a quelle di un frammento lineare di DNA grazie all'attività dell'enzima DNA ligasi, rendendo così possibile il clonaggio dei frammenti di DNA all'interno di vettori plasmidici.

Nel nostro caso ogni reazione di ligazione è stata allestita aggiungendo alla miscela di adenilazione i seguenti reagenti:

- 1 μl di T4 DNA ligasi (promega) 3 U μl^{-1}
- 2 μl T4 DNA Ligasi Buffer 10X
- 1 μl pGEM-T-Easy (Promega) 50ng μl^{-1}
- H_2O fino ad un volume finale di reazione pari a 20 μl

La miscela è stata incubata a 4°C per una notte.

Una miscela di reazione priva dell'inserito è stata inoltre utilizzata come controllo per valutare la capacità del vettore di richiudersi su se stesso.

L'ultima fase è stata quella di inserimento del plasmide ricombinante in cellule batteriche. Il plasmide ricombinante è stato trasferito in cellule competenti di *Escherichia coli*, ceppo DH5 α , preparate secondo il metodo del CaCl_2 descritto da Sambrook (Sambrook, *et al.*, 1989).

Per la trasformazione, 100 μl di cellule batteriche competenti sono state miscelate a 5 μl di DNA plasmidico. La miscela è stata posta in ghiaccio per 45 minuti, poi a 42°C per 90 secondi in un bagno termostato. Trascorso questo tempo è stata posta di nuovo in ghiaccio in per 10 minuti. Ad essa sono stati aggiunti 800 μl di LB sterile ed è stata posta in agitazione a 37°C per un' ora. La soluzione è stata centrifugata per 30 secondi alla velocità di 13.200 rotazioni per minuto in una centrifuga da banco; ciò ha consentito di eliminare gran parte del surnatante e risospendere il pellet nel surnatante residuo. La miscela è stata dispensata omogeneamente in capsule di Petri sterili su LB, gelificato con agar, contenente ampicillina alla concentrazione di 100 mg l^{-1} . Su tale mezzo erano stati previamente dispensati 10 μl di Isopropil- β -D-1-thiogalactopiranoside (IPTG) alla concentrazione di 200 ng μl^{-1} e 100 μl di 5-Br-4-Cl-3-indolo- β -galactopiranoside (X-Gal) alla concentrazione di 20 ng μl^{-1} . Le capsule Petri sono state incubate a 37°C per una notte.

La presenza di colonie sul mezzo LB, reso selettivo per la presenza dell'ampicillina, ha indicato che i batteri da cui tali colonie derivavano erano sopravvissuti grazie al gene marcatore presente nel plasmide.

La selezione delle colonie è stata eseguita con il metodo della distinzione blu-bianco: nel plasmide è infatti presente il gene lacZ che codifica per la β -galattosidasi, un enzima che scinde la molecola di X-Gal in due molecole di cui una è di colore blu. L' IPTG agisce sul promotore del gene inducendo la sintesi della β -galattosidasi.

Durante il clonaggio il frammento si inserisce nella regione lacZ impedendo la sintesi dell'enzima. Le cellule che contengono l'inserito non sono in grado di scindere X-Gal presente nel substrato, quindi saranno di colore bianco; mentre quelle prive dell'inserito metabolizzano X-gal colorandosi di blu. Le colonie bianche sono state inoculate in 1 ml di LB liquido contenente ampicillina alla concentrazione di 100 mg l^{-1} e lasciate crescere a 37°C per una notte in agitazione (Sambrook *et al.*, 1989).

E' stata eseguita una analisi di PCR su colonia, con primer specifici, per confermare la presenza dell'amplicone all'interno del plasmide contenuto dalla colonia.

2.2.10 SEQUENZIAMENTO ED INSERIMENTO DELLE SEQUENZE IN BANCA DATI

E' stato utilizzato il kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification System della Promega per purificare il DNA plasmidico delle colonie batteriche risultate positive all'amplificazione.

I plasmidi ricombinanti, contenenti quindi ognuno uno dei frammenti d'interesse, sono stati isolati dai batteri e impiegati per la reazione di sequenziamento dell'inserto. Il sequenziamento è stato affidato alla ditta GeneLab di Santa Maria di Galeria (Roma), alla quale sono stati inviati i campioni del DNA plasmidico e le sequenze dei primer utilizzati nella fase di amplificazione.

Gli elettroferogrammi ottenuti sono stati privati delle porzioni di sequenza del vettore fiancheggianti il sito di inserzione, ciò ha consentito di individuare la sequenza dell'inserto.

Le sequenze degli inserti sono state poi sottoposte ad analisi *in silico* utilizzando il programma Blast (<http://130.14.29.110/BLAST/>) che ha confrontato tali sequenze con tutte le sequenze nucleotidiche presenti nella banca dati GenBank del National Center for Biotechnological Information.

2.3 STUDIO DI ESPRESSIONE DI SEQUENZE GENICHE

2.3.1 DISEGNO DEI PRIMER PER LA PCR QUANTITATIVE (QPCR)

I Primer per la PCR quantitativa sono stati disegnati con l'ausilio del programma Primer Express® Software 2.0 (Applied Biosystem). Tale programma permette di stabilire una serie di parametri per la costruzione dei primer quali temperatura di melting, percentuale di GC, lunghezza del primer ecc..

Nel nostro caso sono stati scelti come parametri per la costruzione dei primer una temperatura di melting pari a 60°C, una lunghezza di 20 basi, ed una percentuale di GC pari al 80%. Sono stati scelti i primer, tra quelli proposti dal programma, che producevano ampliconi di 51 paia di basi di lunghezza. I primer usati nell'analisi di PCR quantitativa sono riportati in tab. 3.3

2.3.2 PCR QUANTITATIVA

La PCR real-time, denominata anche PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale (Real Time PCR), è un metodo che permette di amplificare e quantificare simultaneamente molecole di RNA e/o di cDNA di interesse.

Se la PCR tradizionale, infatti, permette di rilevare la presenza di una sequenza bersaglio oppure di quantificarla mediante il risultato finale della reazione, la Real Time PCR, permette di monitorare l'amplificazione mentre questa ha luogo usando il sistema SYBR Green, basato sulla presenza di una molecola fluorescente in grado di intercalarsi e legarsi durante la reazione di PCR all'interno del doppio filamento di DNA che si forma ad ogni ciclo di amplificazione. Gli strumenti richiesti per questo tipo di analisi sono un termociclatore collegato ad un rivelatore della fluorescenza e ad un computer con un programma in grado di analizzare queste variazioni.

La valutazione quantitativa dei livelli di mRNA (cDNA), è stata realizzata usando the Prism 7000 Sequence detection system (Applied Biosystems Inc., IJssel, The Netherlands).

Sono stati condotti esperimenti preliminari per stabilire l'efficienza di amplificazione per ciascuna delle coppie di "primer".

Una serie di diluizioni in acqua dei campioni di cDNA sono state saggiate per identificare le concentrazioni di cDNA che produce un CT tra i 25 e 35 cicli.

La CT (ciclo soglia) è il ciclo a partire dal quale la quantità di fluorescenza comincia ad aumentare velocemente, e le curve sigmoidi di amplificazione iniziano la loro fase lineare. Un confronto dei valori di Ct fra reazioni multiple permette di calcolare la concentrazione migliore dell'acido nucleico che si vuole quantificare.

Le migliori condizioni si sono avute usando per ogni reazione 12,5 µl di Platinum® SybrGreen qPCR SuperMix-UDG buffer 2X che contiene:

- la taq DNA polimerasi Platinum alla concentrazione di 60U ml⁻¹,
- il colorante SYBR Green I,
- il buffer contenente Tris-HCl alla concentrazione di 40mM (pH8.4) , KCl alla concentrazione di 100mM e MgCl₂ alla concentrazione di 6mM,
- 400µM dGTP,
- 400µM dATP,
- 400µM dCTP,
- 400µM dUTP,
- Uracilarabinoside DNA glycosylase (UDG) 40U ml⁻¹

- stabilizzanti,

ai quali è stato aggiunto $MgCl_2$ fino ad ottenere una concentrazione finale di esso pari a 5 mM , 0,5 μl di ogni primer alla concentrazione di 15pmol μl^{-1} , 2 μl di cDNA a concentrazione di 0,453 ng μl^{-1} e 0,5 μl di colorante ROX (Referece Dye to Platinum® Quantitative PCR superMlx-UDG) in un volume totale di reazione di 25 μl . Il programma di temperature utilizzato è stato il seguente: un primo step di 50 °C per 2 minuti è stato utilizzato per l'attivazione UDG seguito da una denaturazione di 2 minuti a 95 °C. A queste due fasi hanno fatto seguito 45 cicli fatti da una denaturazione a 95 °C per 15 secondi, una ibridazione (annealing) a 57 °C per 30 secondi ed una estensione a 72 °C per 30 secondi.

Sono state effettuate 4 repliche biologiche dell'esperimento, per ciascuna reazione di qPCR sono state effettuate 3 repliche sperimentali in ogni replica biologica, ed è stato considerato accettabile un massimo di 5 cicli differenza tra i CT delle repliche sperimentali di ogni campione.

Controlli negativi, in cui mancava il cDNA nella miscela di reazione, sono stati eseguiti per ogni coppia di "primer" in ogni replica biologica per controllare i livelli significativi di qualsiasi amplificazione non specifica (contaminante). In tutte le repliche biologiche, il gene dell'actina di kenaf è stato usato come controllo interno. I cDNA che hanno funto da stampo per gli esperimenti di PCR quantitativa sono stati prodotti mediante reazione di trascrizione inversa dagli RNA totali estratti da taglio e kanpulo di piante di kenaf, allevate in condizioni controllate, dopo 30, 60 e 90 giorni dalla semina, e la loro quantità è stata determinata per comparazione tra le loro intensità di fluorescenza e quella di marcatori di DNA a peso molecolare noto con l'ausilio del software ImageQuant 5.2. . I tessuti dai quali sono stati isolati gli RNA totali derivano sempre dalla stessa porzione di fusto della pianta.

2.3.3 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica dei livelli di espressione è stata effettuata mediante ANOVA. I confronti tra le espressioni dei vari geni stati condotti utilizzando LSD con una soglia di significatività per $P < 0.05$. Il programma utilizzato è SPSS 13.

2.4 ANALISI DEI CONTENUTI DI LIGNINA E DELLA CELLULOSA NEI TESSUTI DI KENAF

Le analisi per la determinazione del contenuto di lignina e di cellulosa nelle fibre del taglio e del kenapulo di kenaf sono state condotte su campioni dei due tessuti prelevati agli stessi giorni di distanza dalla semina ai quali furono prelevati per le analisi di espressione quantitativa dei geni.

Per tale analisi quantitativa è stata seguita la metodica indicata da Van Soest & Wine con le opportune modifiche (Van Soest & Wine, 1968).

Dopo aver separato manualmente il taglio dal kenapulo dei fusti delle piante, essi sono stati messi in stufa per 48 ore a 70°C al fine di poter eliminare l'acqua dai tessuti. In seguito sono stati triturati con mortaio e pestello in azoto liquido e poi messi per circa 30 minuti in polverizzatore ottenendo così una polvere fine su cui poter applicare la metodica di Van Soest & Wine.

Da tale polvere bisogna allontanare la componente acido-solubile, rappresentata da pectina, cere, lipidi, amido e, in fasi più avanzate di decomposizione, da chitina (ADF). A tal fine in una provetta (W2) da centrifuga sono state pesate 100 mg ($\pm 0,1$) di fibre secche polverizzate (W1) e sono stati aggiunti ad esse 10 ml di una soluzione di H₂SO₄ 0,1 N in cui sono stati sciolti 20 g di bromuro di cetil-trimetil-ammonio (CTAB). I campioni sono stati lasciati per 1 ora a 100°C. Dopo il raffreddamento i campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 4000 rpm. In seguito all'eliminazione del supernatante i campioni sono stati sottoposti a lavaggi consecutivi con 10 ml di acqua calda e con acetone (ogni lavaggio è stato seguito da centrifugazione ed eliminazione del supernatante). Successivamente i campioni sono stati posti in stufa per 12h a 75°C circa, raffreddati in essiccatore e poi pesati (W3).

La percentuale delle fibre è stata così calcolata:

$$\%ADF = (W3-W2)*100/W1$$

I campioni seccati e pesati (W3) vanno sospesi in 10 ml di tampone fatto dall'unione di un tampone permanganato (di KMnO₄ 50 g l⁻¹, di Ag₂SO₄ 0,05 g l⁻¹) con un tampone per la lignina (0,015 g l⁻¹ di AgNO₃, 500ml di acido acetico glaciale, 5 g l⁻¹ di acetato di potassio, 400 ml di 2-metilpropanolo) nel rapporto di 2 a 1, e lasciati a temperatura ambiente per 90 minuti per permettere l'ossidazione delle fibre.

A reazione avvenuta i campioni assumono colore rosso porpora. I campioni ossidati vanno centrifugati per 10 minuti a 4000 rpm, privati del supernatante e trattati per 15 minuti con 10 ml di una soluzione demineralizzante (50 g l⁻¹ di acido ossalico di-idrato 700 ml di etanolo 95%, 50 ml di HCl 37%).

I campioni opportunamente trattati assumono colore bianco. Dopo una ulteriore centrifugazione per 10 minuti a 4000 rpm, i campioni, privati del supernatante, sono stati sottoposti a due lavaggi con etanolo al 70% e ad uno con acetone per eliminare i residui di etanolo. Dopo essere stati seccati in stufa per 12h a 75°C, vanno raffreddati in essiccatore, pesati (W4) e poi bruciati in muffola per 1 ora a 550°C. Al termine del trattamento in muffola, i campioni vengono raffreddati in essiccatore e pesati (W5). Le percentuali di lignina e di cellulosa vengono così calcolate:

$$\% \text{ Lignina} = (W3-W4)*100/W1$$

$$\% \text{ Cellulosa} = (W4-W5)*100/W1$$

2.5 DIFFERENZIAMENTO *IN VITRO*, INDUZIONE DI GEMME MULTIPLE E TRASFORMAZIONE GENETICA

2.5.1 CEPPI BATTERICI UTILIZZATI

Le due specie batteriche utilizzate per questo lavoro di tesi sono state *Escherichia coli*, ceppo DH5 α , in cui sono stati inseriti i vettori ricombinanti contenenti le sequenze geniche clonate e *Agrobacterium tumefaciens*.

Per quanto concerne *Agrobacterium tumefaciens* sono stati utilizzati due ceppi Il ceppo C58C1 (Holsters *et al.*, 1980), contenente il plasmide helper pGV2260 ed ingegnerizzato con il vettore binario p35SGUS-INT (Van Canneyt *et al.*, 1990), a cui è stata data la sigla "AT8", ed il ceppo LBA4404 contenente sempre il plasmide p35SGUS-INT (Hoekema *et al.*, 1983) a cui è stata data la sigla "AT18".

Il vettore binario p35SGUS-INT, della grandezza di 13,0 Kb, è caratterizzato dalla presenza del gene reporter gus, codificante per la β -glucuronidasi, contenente il secondo introne (IV2) del gene ST-LS1 isolato da patata. Tale gene è posto sotto il controllo del promotore e del terminatore 35S del CaMV (Van Canneyt *et al.*, 1990). Inoltre il vettore presenta il gene nptII come marcatore, che codifica per l'enzima neomicina fosfotransferasi, che conferisce resistenza agli antibiotici del gruppo della neomicina. Tale gene è posto tra il promotore ed il terminatore del gene della nopalina sintetasi (nos) (Van Canneyt *et al.* 1990).

La β -glucuronidasi codificata dal gene GUS, anche detto uidA, è un enzima presente normalmente in tutti i vertebrati ed anche nella flora intestinale dell'uomo. Questo gene è un gene reporter che permette la facile identificazione delle piante transgeniche da quelle non trasformate poiché l'enzima da esso codificato catalizzando l'idrolisi dei glucuronidi permette la precipitazione dell'indolo, visibile in blu, ove questo è legato ad un glucuronide. Il ceppo di *Escherichia coli* è stato cresciuto nel terreno di coltura LB alla temperatura di 37 °C in agitazione alla velocità di 150 rotazione per minuto, mentre *Agrobacterium tumefaciens* è stato cresciuto nel mezzo di coltura YEP alla temperatura di 27 °C in agitazione alla velocità di 120 rpm. Le composizioni di entrambi i terreni sono riportate alla sezione 2.1.

2.5.2 CULTIVAR SAGGIATE

Le cultivar saggiate sono state due, la Dowling che è la cultivar con la più alta percentuale di fibre di taglio oggi in commercio e la SF459, importante per l'elevata produzione di fibra e per la grandezza del diametro dello stelo. Entrambe le cultivar sono state utilizzate sia come fonte di espianti per gli esperimenti di differenziamento *in vitro* e di massiva propagazione sia per esperimenti di trasformazione genetica con metodo diretto e indiretto.

2.5.3 SUBSTRATI PER LA PROPAGAZIONE ED IL DIFFERENZIAMENTO *IN VITRO*

La formulazione del substrato base impiegato negli esperimenti di coltura *in vitro* delle piante è quella standard di Murashige e Skoog (1962) per i macro- ed i micro-elementi (MS) con l'aggiunta di 30gl⁻¹ di saccarosio (siglato come MS). Questo

substrato è stato utilizzato per la propagazione per talea internodale di piante di kenaf.

Al substrato base di coltura sono stati aggiunti diversi ormoni, per lo più citochinine, auxine e giberelline, a differenti concentrazioni al fine di trovare la combinazione più efficiente per il differenziamento *in vitro* del kenaf.

Ai substrati così ottenuti è stato dato un nome; la tabella 2.1 riporta per ogni substrato gli ormoni presenti in esso e le concentrazioni degli stessi.

Gli ormoni utilizzati sono stati il 6-benzil-aminopurina (BAP), l'acido naftalenacetico (NAA), l'N-fenil-N(1,2,3)-thidiazol-5yl-urea commercialmente conosciuto come Thidiazuron (TDZ), la giberellina GA₃, la zeatina riboside ed il nitrato di argento. In un altro piano sperimentale è stato studiato l'effetto dell'acido 4-amino-3,5,6-tricloropiridin-2-carbossilico (picloram) sulle foglie cotiledonari e sugli ipocotili di kenaf della sola cultivar Dowling.

2.5.4 SUBSTRATI PER LA MASSIVA PROPAGAZIONE

Per la massiva propagazione si è fatto uso del solito substrato MS al quale è stato aggiunto l'ormone di sintesi TDZ a 3 differenti concentrazioni: 1, 5 e 10 µM tali terreni sono stati nominati rispettivamente TDZ1, TDZ5 e TDZ10.

Su tali terreni sono stati lasciati germinare semi di entrambe le cultivar oggetto di studio (vedi paragrafo 2.5.5) . Tali semi sono stati poi osservati dopo 14 e dopo 28 giorni dalla semina e sono state contate le gemme risultanti da ogni seme. Per ogni differente terreno sono stati sterilizzati e lasciati germinare 20 semi di ogni cultivar dei quali 10 sono stati monitorati dopo 14 giorni e 10 dopo 28 giorni dalla semina. Tutti i semi sono stati incubati a 24 °C per 48 ore al buio e poi posti in camera di crescita a 24 °C con un fotoperiodo di 14 ore di luce e 10 di buio.

2.5.5 STERILIZZAZIONE ED IMBIBIZIONE DEI SEMI

I semi sono stati sterilizzati secondo la seguente procedura:

- lavaggio preventivo con acqua distillata;
- trattamento per 2 minuti con alcool etilico al 70%;
- immersione per 15 minuti in una soluzione di ipoclorito di sodio commerciale (3% di cloro attivo). In tale fase i semi sono stati tenuti in agitazione continua;
- risciacquo con acqua distillata sterile per 4-5 volte.

Tutti i passaggi in sterilità sono stati effettuati sotto cappa a flusso laminare orizzontale. Tutti gli strumenti non sterili, sono stati sterilizzati alla fiamma di un becco Bunsen.

I semi sterilizzati ed imbibiti in acqua sterile per una notte

2.5.6 TRASFORMAZIONE GENETICA CON METODO BIOLISTICO

Gli esperimenti di trasformazione mediante bombardamento con microproiettili sono stati condotti con l'impiego di un cannone genetico a flusso di elio PDS-1000/He (Bio-Rad Laboratories Ltd., Hemel Hempstead, UK) (figura 2.2, pannello a) ed in alcuni esperimenti con l'aggiunta di un focalizzatore (figura 2.2, pannello b, c e d)

appositamente costruito su progetto sviluppato dal sottoscritto presso il laboratorio di svolgimento della tesi.

La procedura sperimentale utilizzata per la trasformazione genetica nucleare si basa sui principi di biolistica descritti da Klein (Klein *et. al.*, 1987). Le condizioni di sparo sono state le seguenti:

- pressione di rottura del diaframma pari a 1.100 psi;
- depressione della camera pari a -14,5 psi;
- distanza tra rupture disk e macrocarrier pari a 10 mm, tra macrocarrier e stopping screen pari a 10 mm e tra stopping screen e piastra contenente le cellule bersaglio pari a 12 cm.

Le parti interne del cannone genetico sono state sterilizzate con etanolo 75%; macrocarrier, stopping screen e focalizzatore sono stati sterilizzati in autoclave di 20 minuti, mentre flying e rupture disk sono stati sterilizzati per immersione rispettivamente in etanolo 75% e isopropanolo per 15 secondi.

La precipitazione del DNA sui microproiettili d'oro, del diametro di 1 μm , è stata realizzata secondo il metodo di Sanford *et al.* (1993).

Sei microlitri della soluzione composta da particelle d'oro e DNA in etanolo sono stati aggiunti su ogni macrocarrier e lasciati asciugare per 10 minuti, tempo necessario per permettere la vaporizzazione dell'etanolo stesso.

In ogni esperimento sono stati eseguiti dei controlli costituiti da espianti bombardati con microproiettili senza DNA precipitato e piastrati semplicemente su substrato (MS) solido addizionato (controllo negativo) o no (controllo positivo) con antibiotico.

2.5.7 STRATEGIE DI TRASFORMAZIONE GENETICA CON METODO BIOLISTICO

Sono state eseguite 2 strategie di sparo:

1. sparo con focalizzatore: in questa strategia gli spari sono eseguiti con il focalizzatore su espianti posizionati al centro di piastre di Petri da 40 mm di diametro in un cerchio di 2 cm di diametro. Per ogni piastra vengono stati effettuati due spari con una rotazione della stessa, tra il primo ed il secondo sparo, di 180°. Sono stati utilizzati 100 espianti per Dowling e 100 per SF459 per ogni sparo. I controlli negativi di tale metodica sono costituiti da semi tagliati, fatti crescere sullo stesso terreno di induzione se presente, e bombardati con proiettili su cui non è stato precipitato il DNA plasmidico.

2. sparo senza focalizzatore: in questa strategia gli spari sono eseguiti senza il focalizzatore su espianti posizionati casualmente in tutta la piastra di Petri di 40 mm di diametro; sono stati utilizzati 100 espianti per Dowling e 100 per SF459. I controlli negativi sono costituiti alla stessa maniera della strategia precedente. Per ogni piastra sono vengono effettuati 4 spari accompagnati da una rotazione della piastra di 90° tra uno sparo ed il successivo.

Dopo il bombardamento le capsule Petri contenenti gli espianti vengono poste a 27°C per 48 ore al buio per poi essere messe a 14 ore di luce e 10 di buio ad una temperatura di 26°C in un mezzo contenete l'antibiotico Kanamicina ed il TDZ alla concentrazione di 10 μM per l'induzione alla formazione di gemme multiple.

Dopo tale periodo vengono trasferiti in MS contenete 300 mg l⁻¹ di kanamicina senza presenza di ormoni ed ogni 21 giorni vengono trasferiti sullo stesso terreno fresco.

2.5.8 TRASFORMAZIONE GENETICA MEDIANTE AGROBATTERIO

Il processo di trasformazione è stato eseguito utilizzando il seguente protocollo:

- i ceppi di *Agrobacterium tumefaciens* AT8 o AT18 sono stati inoculati in LB liquido addizionato con kanamicina 100 mg l^{-1} con l'aggiunta di acetosiringone alla concentrazione di $200 \text{ }\mu\text{M}$ due ore prima della co-coltura ed incubato a $28\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ in agitazione per 48 ore;
- la sospensione batterica ottenuta è stata poi centrifugata per 15 minuti a 4.000 rpm a $24\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ed il pellet risospeso in un volume di substrato MS liquido con l'aggiunta di acetosiringone alla concentrazione di $200 \text{ }\mu\text{M}$, tale da ottenere una soluzione avente densità ottica misurata allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 600 nm pari a 0.9-1;
- un aliquota di sospensione batterica è stata posta in una capsula petri nella quale poi sono stati immersi i tessuti oggetto di trasformazione genetica
- Gli espianti co-coltivati sono poi stati posti su piastre di Petri in cui era presente substrato TDZ10 (in alcuni esperimenti nelle substrato vi era anche acetosiringone alla concentrazione di $200 \text{ }\mu\text{M}$) e lasciati al buio per 48 ore a $27 \text{ }^\circ\text{C}$ per favorire l'azione dell'agrobatterio
- Dopo tale periodo gli espianti sono stati posti, con la parte del taglio rivolta verso il substrato, in piastre di Petri contenenti TDZ10 con l'aggiunta di kanamicina alla concentrazione di 300 mg l^{-1} e claforan alla concentrazione di 500 mg l^{-1} dove vengono lasciati per 7 giorni
- Dopo tale periodo vengono trasferiti su substrato MS con l'aggiunta di kanamicina alla concentrazione di 300 mg l^{-1} e claforan alla concentrazione di 250 mg l^{-1}
- Ogni 21 giorni vengono trasferiti in mezzo fresco uguale a quello del punto precedente

In ogni esperimento di trasformazione è stato eseguito un controllo negativo costituito da espianti non co-coltivati e trasferiti su TDZ10 con kanamicina alla concentrazione di 300 mg l^{-1} e claforan alla concentrazione di 500 mg l^{-1} . Inoltre In ogni esperimento di trasformazione è stato eseguito un controllo positivo costituito da espianti non co-coltivati e trasferiti su TDZ10 senza antibiotici.

2.5.9 TESSUTI DI KENAF UTILIZZATI PER LA TRASFORMAZIONE GENETICA

I tessuti della pianta utilizzati negli esperimenti di trasformazione genetica, sia con metodo diretto sia con metodo indiretto, sono stati embrioni di kenaf presenti nei semi.

I semi di kenaf, dopo essere stati sterilizzati ed imbibiti per una notte, sono tagliati in senso longitudinale in due parti pressoché uguali al fine di rendere i tessuti meristemati presenti negli embrioni più accessibili alla trasformazione sia essa mediata da agrobatterio sia essa eseguita con metodo biolistico.

In alcuni esperimenti, al fine di indurre i tessuti meristemati degli embrioni alla produzione di gemme multiple, essi sono stati messi a contatto con il substrato TDZ10 per 24 ore anche prima dell'evento di trasformazione. Nella Fig. 2.3 sono visibili semi di kenaf tagliati in due e messi in un soluzione in cui è presente l'agrobatterio.

2.5.10 SAGGIO ISTOCHIMICO GUS

Il saggio istochimico della β -glucuronidasi è stato condotto utilizzando una soluzione contenente tampone fosfato 50 mM a pH 7,0, Triton X-100 0,1% (v/v) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronide 0,5% (X-GLUC).

Espianti sottoposti a trasformazione con il vettore p35S-GUS-INT, sia mediante co-cultura che bombardamento di microproiettili, sono stati messi a contatto con 2 ml di soluzione X-GLUC e sottoposti ad una pressione negativa di 80 KPa per 10 minuti. Tutti i campioni sono stati incubati per almeno 16 ore al buio ad una temperatura di 37 °C ed osservati attraverso microscopia ottica.

Il saggio istochimico GUS è stato effettuato anche su dei controlli negativi costituiti da espanti non cocoltivati o bombardati con microproiettili sui quali non è stato precipitato il DNA.

L'espressione del transgene GUS si ravvisa mediante la presenza di spot blu che indicano la precipitazione dell'indolo che avviene nella reazione enzimatica catalizzata dall'enzima GUS(β -glucuronidasi) quando questo è in contatto con un substrato glucuronidico a cui è legato un indolo.

3. RISULTATI

3.1 DISEGNO DEI PRIMER, CLONAGGIO ED INSERIMENTO IN BACA DATI DI SEQUENZE GENICHE

3.1.1 DISEGNO DEI PRIMER

In questo lavoro di tesi, al fine di disegnare primer utilizzabili in reazioni di amplificazione di DNA genomico e di cDNA è stato usato un approccio bioinformatico.

Ci si è avvalsi infatti, in primis, della banca dati NCBI, poiché in tale banca dati sono presenti numerose sequenze geniche codificanti per enzimi che giocano ruoli chiave nelle vie biosintetiche che portano alla formazione della cellulosa e della lignina, ed in secondo luogo del sopra citato programma di allineamento di sequenze mediante il quale sé stato possibile allineare sequenze di interesse e studiarne le zone altamente conservate.

Dalla banca dati NCBI sono state prelevate le sequenze codificanti per i geni sopra riportati da diverse specie vegetali, sia monocotiledoni che dicotiledoni, afferenti a loro volta a diverse famiglie di piante. Tali sequenze sono state allineate grazie ai software T-Coffee(<http://www.es.emblnet.org/Services/MolBio/t-coffee/>) e/o clustal W (www.ebi.ac.uk/clustalw/). Tale procedura è stata eseguita per tutti i geni sopra riportati.

I risultati degli allineamenti sono visibili nelle figure 3.1,3.2,3.3,3.4 e 3.5

Dagli allineamenti fatti si evince la presenza di zone altamente conservate all'interno delle sequenze nucleotidiche; nelle figure 3.1,3.2,3.3,3.4 e 3.5 tali zone sono evidenziate dai riquadri gialli. Su tali zone sono stati progettati i primer da utilizzare in successive amplificazioni *in vitro*. Per molti dei geni si è proceduto al disegno di più di una coppia di primer. In tabella 3.1 sono riportati i primer che hanno dato risultati in esperimenti di amplificazione di DNA genomico e di cDNA.

Con lo stesso approccio bioinformatico e con la stessa procedura è stata disegnata anche una coppia di primer sulle zone altamente conservate del gene dell'actina 2 di varie specie vegetali. Anche questi primer, come i precedenti sono stati utilizzati per amplificazioni sia di DNA genomico che di cDNA.

La fig. 3.6 mostra l'allineamento nucleotidico relativo ai geni codificanti per l'actina 2 di diverse specie vegetali

3.1.2 AMPLIFICAZIONE DI DNA E CDNA DI KENAF ED INSERIMENTO DEGLI AMPLICONI IN VETTORI DI CLONAGGIO

Lo stampo utilizzato per l'ottenimento delle sequenze geniche attraverso analisi PCR è stato il DNA totale ottenuto da foglie di kenaf della cultivar Dowling.

Il cDNA, ottenuto per reazione di retrotrascrizione a partire dagli mRNA totali estratti da meristemi apicali di giovani piantine di kenaf, ha fatto invece da stampo per l'ottenimento di sequenze espresse mediante analisi di RT-PCR.

La fig. 3.7 riporta il risultato di amplificazione di PCR e RT-PCR per i geni delle vie biosintetiche della lignina e cellulosa studiati. Nella stessa figura (canale 1 e 2) è presente il risultato dell'analisi di amplificazione di DNA genomico e di cDNA di kenaf con l'uso della coppia di primer disegnati sull'allineamento dei geni codificanti per

l'actina 2 . Come è possibile notare in tutti i canali sono visibili i prodotti di amplificazione.

Successivamente alla quantizzazione, gli ampliconi sono stati adenilati e poi clonati in pGEM®-T Easy Vector System (promega)(Fig. 2.1).

I plasmidi ricombinanti sono stati inseriti in cellule competenti di *Escherichia coli*, ceppo DH5 α . La presenza dell' IPTG e dell'X-Gal nel terreno ha permesso la selezione delle cellule batteriche ricombinanti mediante colorazione. Dalle colonie bianche cresciute sul terreno selettivo sono stati estratti i plasmidi ricombinanti e la concentrazione di quest'ultimi è stata determinata, dopo taglio enzimatico di linearizzazione, allo stesso modo di quella degli ampliconi. Successivamente è stata eseguita un'analisi di amplificazione sui plasmidi estratti per confermare la presenza dell'inserito (dati non mostrati)

3.1.3 SEQUENZIAMENTO ED INSERIMENTO IN BANCA DATI DELLE SEQUENZE

Nel presente lavoro è stato utilizzato il programma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) che, grazie ad un algoritmo specifico, ottimizza l'operazione di allineamento di una sequenza con quelle presenti in banca dati.

Questo programma ha permesso di comparare le sequenze dei frammenti clonati con le sequenze presenti in banca dati e di poter capire la percentuale di identità con esse.

L'analisi comparativa delle sequenze nucleotidiche dei singoli geni ha mostrato un'alta percentuale d'identità con le sequenze degli stessi geni di altre specie, principalmente con quelli appartenenti alla famiglia delle Malvaceae, famiglia alla quale appartiene l'*Hibiscus cannabinus*. Tale alta identità conferma che la strategia seguita con l'approccio bioinformatico usato per disegnare i primer è risultata valida. In base questi risultati, le sequenze sono state depositate nella banca dati PubMed e sono state rese pubbliche. La tabella 3.2 mostra per ogni singola sequenza il codice di accesso, la lunghezza della sequenza sia in DNA che in cDNA e la percentuale di identità con la sequenza più simile ad essa presente in un'altra specie vegetale.

Il programma Transeq (www.ebi.ac.uk/emboss/transeq/) ha consentito una traduzione *in silico* delle sequenze nucleotidiche di cDNA clonate.

Nella fase successiva, mediante il programma Blast, è stato effettuato un confronto tra le sequenze amminoacidiche e quelle già sequenziate presenti in banca dati. Il risultato di tale confronto ha confermato l'alta percentuale di identità tra le sequenze amminoacidiche tradotte dalle sequenze clonate e quelle delle stesse proteine di altre specie, principalmente appartenenti alla famiglia delle Malvaceae.

Nella tabella, quindi, sono riportate per ogni gene anche la lunghezza amminoacidica della sequenza di cDNA tradotta *in silico* e la percentuale di identità con la sequenza più simile ad essa presente in un'altra specie vegetale.

3.2 ESPRESSIONE TEMPORALE DELLE SEQUENZE CLONATE

3.2.1 DISEGNO DEI PRIMER PER LE ANALISI DI PCR QUANTITATIVA

La conoscenza delle sequenze nucleotidiche dei geni sotto esame è stata utilizzata per la progettazione di specifici primer adatti ad una analisi di PCR quantitativa allo scopo di comprendere l'espressione di tali geni nei diversi stadi fenologici della pianta.

E' stato deciso di studiare l'espressione temporale di due geni della via biosintetica della lignina e di un gene della biosintesi della cellulosa. I due geni della biosintesi della lignina oggetto dello studio di espressione temporale sono stati il *c4h* ed il *cad* poiché posizionati, rispettivamente, all'inizio ed alla fine dell'ultima parte della via biosintetica (Fig 1.20), mentre per la cellulosa è stata studiata l'espressione temporale del gene CeSA clonato.

I primers utilizzati per la PCR quantitativa sono stati disegnati con l'ausilio del software Primer Express®Software 2.0. Diverse coppie di primer sono state saggiate per ogni gene in esperimenti preliminari al fine di selezionare i migliori parametri per l'analisi trascrittomica temporale. Le coppie di primer che hanno dato i migliori risultati negli esperimenti preliminari e sono state quindi utilizzate per le analisi successive, sono mostrate in tabella 3.3

3.2.2 ANALISI DI ESPRESSIONE TEMPORALE DEI GENI DELLA CELLULOSA E DELLA LIGNINA

L'espressione temporale dei tre geni studiati è stata esaminata a tre stadi fenologici diversi della pianta; dopo 30,60 e 90 giorni dalla semina. Per limitare al massimo le differenze di espressione imputabili a fattori esterni, le piante sulle quali è stata condotta l'analisi sono state allevate in camere di crescita *in vivo*. Tali camere consentono di regolare e mantenere costante la temperatura sia diurna che notturna e di stabilire le ore di luce e di buio.

Per ogni analisi di PCR quantitativa sono state fatte 4 repliche biologiche, ossia per ognuno dei due tessuti l'analisi è stata condotta, ai tre stadi fenologici, su 4 piante differenti cresciute alle stesse condizioni.

Per ogni gene all'interno di ogni singola analisi quantitativa sono state effettuate tre repliche sperimentali.

Al fine di comprendere le differenze significative tra i livelli di espressione, è stata fatta un'analisi statistica dei dati sperimentali con il software SPSS 13.

Tale programma effettua l'analisi statistica dei livelli di espressione facendo uso di un test ANOVA sui valori logaritmici delle quantificazioni relative. I confronti tra le medie sono stati condotti usando il test di LSD (minima differenza significativa) con una soglia di significatività per $P < 0.05$.

Le figure 3.8 e 3.9 mostrano le espressioni temporali dei tre geni oggetto di studio rispettivamente nel taglio e nel kenapulo. Le espressioni relative dei geni a 60 e 90 giorni dopo la semina sono riportate rispetto alla loro espressione a 30 giorni che per comodità di lettura è stata posta uguale a 100.

I risultati mostrano che nel taglio i geni della lignina aumentano loro espressione con il tempo stabilizzandosi tra 60 e 90 giorni, infatti non esistono differenze statisticamente significative tra l'espressione sia del *c4h* che del *cad* a 60 e 90 giorni dalla semina mentre l'espressione di tali geni tra 30 e 60 giorni aumenta di 10 volte. Il

gene CeSA mostra nel tilgio una espressione pressoché costante nel tempo anche se si è registrata una massima espressione a 60 giorni. Inoltre come è possibile osservare dalla figura 3.9 l'espressione a 90 giorni non è significativamente differente dalle espressioni a 30 e 60 giorni, infatti il suo valore medio è posizionato al centro delle due.

Nel kenapulo lo studio dell'espressione temporale dei geni, invece, ha mostrato per i geni della lignina in generale una diminuzione significativa nel tempo. L'espressione a 60 giorni del *c4h* mostra una diminuzione di un fattore 10 rispetto alla sua stessa espressione a 30 giorni per poi riavere a 90 giorni una espressione non significativamente differente da quella a 30 (fig. 3.10). Per il gene *cad* invece si è registrata la stessa diminuzione di un fattore 10 dell'espressione a 60 giorni rispetto a quella a 30 ma a 90 giorni tale espressione rimane sempre bassa e non significativamente differente da quella registrata a 60 giorni.

Per quanto riguarda l'andamento dell'espressione nel tempo del gene CeSA, si può notare (Fig. 3.9) che il gene ha un picco di espressione a 60 giorni dalla semina, che supera di 10 volte il livello di espressione registrato a 30 giorni, e poi una significativa diminuzione a 90 giorni dalla semina laddove si registra una espressione 100 volte inferiore a quella registrata a 30 giorni e ben 1000 volte inferiore a quella registrata a 60.

3.2.3 QUANTIFICAZIONE DELLA CELLULOSA E DELLA LIGNINA NEL TIGLIO E NEL KENAPULO.

Al fine di correlare le espressioni temporali dei geni studiati con le quantità di lignina e cellulosa realmente presenti nei due tessuti analizzati, sono state condotte analisi di quantificazione dei bio-polimeri in entrambi i tessuti.

La tabella 3.4 riporta le quantità medie di cellulosa e di lignina, espresse in mg g^{-1} di tessuto secco, sia nel tilgio che nel kenapulo a 30, 60 e 90 giorni dalla semina. Ogni quantificazione è stata ripetuta su tre piante ed anche in questo caso le piante sono state allevate in camera di crescita alle stesse condizioni.

3.3 MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLI PER DIFFERENZIAMENTO IN VITRO, MASSIVA PROPAGAZIONE E TRASFORMAZIONE GENETICA DEL KENAF.

3.3.1 DIFFERENZIAMENTO *IN VITRO* DI TESSUTI DI KENAF

In un primo esperimento foglie cotiledonari di kenaf prelevate a 10 giorni dalla semina sono state poste su piastre contenenti tre terreni di coltura rispettivamente denominati "R", "T" e "MN" differenti tra loro solo per i tipi di ormoni e le loro concentrazioni avendo tutti di base il substrato MS.

Per ogni terreno saggiato sono state monitorati il numero di germogli per espianto, la formazione di radici e di callo e la sopravvivenza degli espianti stessi. La raccolta dei dati è avvenuta sempre a 28, 56 e 84 giorni dall'inizio dell'esperimento, Tranne per il terreno MN per il quale si è fermata a 56 giorni per l'abbondanza di produzione di radici. Gli espianti sono stati posti su substrato fresco ogni 14 giorni fino al 42° giorno, per poi essere posti su mezzo MS senza ormoni il quale è stato cambiato ogni 21 giorni. Le tabelle 3.5, 3.6 e 3.7 mostrano i dati raccolti per ogni terreno saggiato sia sulle foglie cotiledonari sia della cultivar Dowling sia su quelle della cultivar SF459. Le figure 3.10, 3.11 e 3.12 mostrano i calli formati a seguito del trattamento con i tre differenti terreni.

Le foglie cotiledonari delle due cultivar sono state poste a contatto con i tre terreni analizzati per 42 giorni ed i terreni sono stati rinnovati ogni 14 giorni.

Altri due terreni nominati B e NT sono stati saggiati sia su foglie cotiledonari sia su ipocotili di kenaf prelevati a 10 giorni dalla semina di entrambe le cultivar Dowling e SF459. Le composizioni ormoniche dei due terreni sono sempre riportate in tabella 2.1. I risultati, monitorati a 28, 56 e 84 giorni, sono riportati nelle tabelle 3.8 e 3.9 per entrambi i tipi di espianti delle due cultivar. Anche in questo caso, gli espianti sono stati posti sui terreni per 42 giorni ed il terreno è stato cambiato ogni 14 giorni per poi essere posti su mezzo MS senza ormoni il quale è stato cambiato ogni 21 giorni.

Le figure 3.13 e 3.14 mostrano alcuni espianti risultanti da tali esperienze.

Il callo presente nei tessuti posti sui terreno NTA e B è di tipo verde e compatto

3.3.2 EFFETTO DEL PICLORAM (ACIDO 4-AMINO-3,5,6-TRICLOROPYRIDIN-2-CARBOSSILICO) SU IPOCOTILI E FOGLIE COTILEDONARI DI KENAF

Al fine di saggiare la capacità di dare embriogenesi somatica del Picloram sono state poste foglie cotiledonari ed ipocotili prelevati da piantine di 7 giorni di kenaf, cultivar Dowling, su tre terreni liquidi contenenti rispettivamente picloram alla concentrazione di, 1, 5 e 10 μ M, in aggiunta ai Sali MS e 30 g l⁻¹ di saccarosio. Tali terreni sono stati cambiati dopo 30 giorni e dopo 45 giorni sono stati raccolti i dati. La tab. 3.10 riporta tali dati. Espianti di cotiledoni e di ipocotili posti su terreno MS 30 hanno funto da controlli negativi.

A nessuna delle tre concentrazioni su nessun tipo di espianto è stato osservato differenziamento né per embriogenesi somatica né per morfogenesi.

3.3.3 MASSIVA PROPAGAZIONE IN KENAF

Sono stati condotti esperimenti per la produzione di gemme multiple in kenaf a partire da gemme preesistenti. Come agente di induzione alla proliferazione di gemme è stato usato il TDZ.

Semi delle cultivar Dowling e SF459 sono stati posti su terreni di MS e saccarosio contenenti Thidiazuron alla concentrazione di 1, 5 e 10 μM e sono stati lasciati per 14 o per 28 giorni. La tabella 3.11 mostra le medie e le deviazioni standard per ogni combinazione di TDZ, cultivar e numero di giorni nell'induzione delle gemme multiple. L'analisi statistica dei dati ha mostrato che non ci sono differenze significative né tra le due cultivar (Dowling e SF459) né tra i due tempi di esposizione (14 e 28 giorni), bensì l'unica differenza statisticamente significativa è rappresentata dalle diverse concentrazioni di TDZ. Infatti alla concentrazione più alta entrambe le cultivar producono più gemme per ogni seme.

Le figure 3.15 e 3.16 mostrano le gemme multiple prodotte da semi delle cultivar Dowling e SF459 su terreno contenente TDZ alla concentrazione di 10 μM dopo 28 giorni dalla semina.

A seguito di questi risultati gli esperimenti di trasformazione genetica in kenaf, sono stati eseguiti su gemme multiple.

3.3.4 TRASFORMAZIONE GENTICA DEL KENAF

3.3.4.1 PROVE DI RESISTENZA ALL'ANTIBIOTICO

Al fine di conoscere la concentrazione di kanamicina alla quale gli embrioni di kenaf non sopravvivono, i semi di kenaf, previamente sterilizzati in assenza di kanamicina sono stati fatti germinare, in terreno MS a concentrazioni crescenti di kanamicina. Le foto 3.17, 3.18.e 3.19 mostrano lo sviluppo dei germogli di kenaf a 7 giorni dalla semina rispettivamente a 100, 200 e 300 mg l^{-1} di kanamicina. Si rileva che la quantità di kanamicina alla quale i germogli non si sviluppano è di 300 mg l^{-1} , anche se a tutte le concentrazioni saggiate i semi sono comunque germinati.

3.3.4.2 ESPERIMENTI DI TRASFORMAZIONE GENETICA MEDIANTE CANNONE GENETICO

Sono state eseguite due tipologie di trasformazione genetica di kenaf mediante l'utilizzo del cannone genetico: la prima ha previsto lo sparo del plasmide P35SGUS-INT, su espianti di Kenaf ottenuti da germinazione di semi, previamente sterilizzati ed inibiti per una notte, tagliati a metà in senso longitudinale e fatti crescere per 24 ore su substrato TDZ10.

Sono state eseguite entrambe le strategie di sparo descritte nella sezione materiali e metodi

Dopo entrambe le strategie di sparo gli espianti sono stati lasciati per 24 ore in terreno TDZ10. Poi sono stati trasferiti su piastre contenenti lo stesso terreno ma con aggiunta di Kanamicina alla concentrazione di 300 mg l^{-1} . Dopo 21giorni tale terreno è stato sostituito da terreno MS fresco tale operazione è stata ripetuta dopo altri 21giorni.

E' stato eseguito, 14 giorni dopo lo sparo, un saggio istochimico GUS per stimare l'espressione del transgene . La tabella 3.12 mostra i risultati di tale esperimento La seconda tipologia ha previsto lo sparo del plasmide P35SGUS-INT, su embrioni di Kenaf presenti all'interno dei semi. 60 semi sono stati previamente sterilizzati ed imbibiti, poi tagliati a metà longitudinalmente in modo da avere 120 espianti per ognuna delle due cultivar e posizionati al centro delle piastre di Petri, in un cerchio di 2 cm di diametro, contenenti il substrato TDZ10. Su di essi è stata eseguita la trasformazione biolistica con la strategia del focalizzatore ma con la variante, rispetto al protocollo utilizzato in precedenza, di un solo sparo per piastra.

Dopo 14 giorni dalla sparo è stato eseguito un saggio istochimico GUS per saggiare la trasformazione avvenuta

La tabella 3.13 mostra i risultati, monitorati nel tempo, di tale esperimento ed i risultati del saggio gus.

I dati di entrambi i due esperimenti indicano che il metodo del cannone genetico non è efficace per una trasformazione del Kenaf.

3.3.4.3 *ESPERIMENTI DI TRASFORMAZIONE GENETICA MEDIANTE AGROBATTERIO*

E' stata effettuata una cocoltura su embrioni di Kenaf. 50 semi per ogni cultivar, dopo essere stati sterilizzati ed imbibiti, sono stagliati a metà longitudinalmente e dopo 20 minuti di immersione in agrobatterio ceppo AT8, sono stati trasferiti con il lato tagliato su substrato TDZ10 al buio per 48 ore a 27°C. L'agrobatterio usato è stato il ceppo AT8.

Un saggio istochimico GUS è stato effettuato su 5 semi per coltivar 14 giorni dopo la co-coltura . Le figure 3.20 e 3.21 mostrano il risultato del Saggio GUS

La tabella 3.14 riporta i dati raccolti per tale esperimento

3.3.4.4 *CO-COLTURA SU EMBRIONI DI KENAF CON AT8*

E' stata effettuata una nuova co-coltura su embrioni di kenaf utilizzando come ceppo di agrobatterio l'AT8 e utilizzando l'acetosiringone in concentrazione 200µM oltre che nel substrato di co-coltura anche nel substrato di germinazione per aumentare la capacità dell'agrobatterio di infettare la pianta. L'acetosiringone è stato aggiunto alla soluzione di MS liquido con l'AT8 2 ore prima di effettuare la co-coltura.

Gli espianti utilizzati sono stati 200 semi per Dowling e 200 semi per SF459. Come controllo negativo sono stati usati 10 semi per ogni cultivar cocoltivati con acqua sterile al posto della soluzione contenente l'agrobatterio e come controllo positivo sono state utilizzati 20 espianti di foglie di tabacco della cultivar Samsun cocoltivate con AT8 e poi messe in mezzo di differenziamento per il tabacco.

I semi dopo la co-coltura sono stati trasferiti in piastre contenenti il substrato TDZ10 ed acetosiringone alla concentrazione di 200µM e messi a 27°C ed al buio per 48 ore.

Dopo 7 giorni è stato effettuato un saggio GUS su 5 germogli per cultivar e tutti sono risultati positivi (Fig 3.21).

La tabella 3.15 mostra i risultati di tale co-coltura.

A tre mesi da questa co-coltura sono sopravvissuti 2 germogli per cultivar SF459 e 3 per la Dowling cresciuti in presenza di kanamicina 300mg l⁻¹. Su di essi è stato di

nuovo eseguito il saggio istochimico gus e sommo risultati positivi ad esso 3 germogli della cultivar Dwling ed 1 della SF459. Non è stato possibile studiare in seguito questi germogli poiché essi sono morti a causa di un inquinamento fungino.

3.3.4.5 CO-COLTURA SU EMBRIONI DI KENAF CON AGROBATTERIO AT18

È stata effettuata una co-coltura di embrioni utilizzando il ceppo di AT18. Sono stati 500 espianti per ognuna delle cultivar e come controllo negativo 20 espianti per cultivar.

Dopo 7 giorni è stato condotto un saggio istochimico GUS su 5 espianti per cultivar. La figura 3.22 mostrano i risultati di tale saggio. La tabella 3.16 riporta i dati di tale co-coltura.

A tre mesi da questa co-coltura sono sopravvissuti 0 germogli per cultivar SF459 e 8 per la Dowling cresciuti in presenza di kanamicina 300mg l^{-1} . Su di essi è stato di nuovo eseguito il saggio istochimico gus e solo uno di loro è risultato ancora positivo (Fig. 3.23). Tale germoglio, nominato TRS, è stato trasferito in vivo in serra. Dalle foglie di esso è stato estratto DNA genomico ed usato come stampo in una reazione di amplificazione di PCR con primer specifici per il gene gus. Il risultato di tale analisi è visibile in figura 3.24.

I cloni di questa pianta ottenuti per micropropagazione *in vitro* di talea internodale sono ora in crescita in serra affinché possano produrre seme per i futuri studi di segregazione del transgene.

4. DISCUSSIONE

4.1 CLONAGGIO E STUDIO D'ESPRESSIONE DEI GENI DELLA BIOSINTESI DELLA CELLULOSA E DELLA LIGNINA

Questa ricerca rappresenta il primo studio genomico e trascrittomico in kenaf che ha come fine quello di gettare le basi per individuare un approccio biotecnologico per il miglioramento genetico della qualità e della quantità delle fibre prodotte dalla pianta per poter, in un futuro, migliorarle rendendole più idonee a specifici usi industriali.

Fino ad oggi, infatti, per il miglioramento quali-quantitativo delle fibre di kenaf sono stati compiuti soltanto studi di stampo agronomico e biochimico.

Dapprima gli studi di tipo biochimico per la maggior parte volti a conoscere la struttura delle fibre di kenaf, siano esse del taglio che del kenapulo, si sono soffermati all'investigare le componenti molecolari tipiche di queste fibre. Ad esempio gli studi di Seca *et. al.* (1998) hanno determinato prima la composizione alifatica del taglio e del kenapulo e poi la caratterizzazione strutturale di 2 lignanammidi estratti dalle fibre del taglio di kenaf. Un altro studio nel quale fu ritrovato che la lignina del kenaf è molto diversa da quella delle altre dicotiledoni ha fatto crescere l'attenzione per le fibre di questa pianta (Ralph *et. al.*, 1996).

Infatti nella lignina di quasi tutte le dicotiledoni vi è un rapporto piuttosto uniforme tra la componente siringilica e quella guacilica mentre nella lignina estratta dalle fibre di kenaf tale rapporto è uguale a 6 (Ralph *et. al.*, 1996).

Approcci di tipo agronomico invece si sono soffermati a studiare l'influenza delle tecniche agronomiche sulla produzione e sulla qualità della fibre del kenaf. Studi fatti negli USA nella seconda metà degli anni novanta hanno messo in evidenza la correlazione tra la maturità delle piante e la qualità e la quantità di fibra prodotta durante la loro crescita mostrando che la produzione di fibra risulta massima tra i 60 ed i 120 giorni dalla semina (Webber, 2002). Altri studi hanno messo in correlazione la quantità e qualità di fibra prodotta con la densità di semina (Higgins, *et. al.*, 1969.) dimostrando che un optimum per la qualità della fibra si ottiene con una densità di impianto che varia tra le 185.000 e le 375.000 piante per ettaro. Ancora è stata studiata la qualità e la produzione di taglio in relazione ai regimi idrici ed al periodo di raccolta (Villar *et. al.*, 2001).

Tutti questi e altri studi di approccio agronomico hanno permesso di capire le esigenze pedoclimatiche della specie e quindi di poter coltivare tale pianta ricavando buone rese di fibra sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo.

Gli unici studi fatti per migliorare la produzione quali-quantitativa delle fibre con un approccio di miglioramento genetico classico furono quelli eseguiti tramite incroci che hanno prodotto, a partire dagli anni '60, nuove cultivar come Everglades41, Everglades71 che producevano sempre più massa nel fusto a discapito della parte fogliare (Wilson *et. al.*, 1965). Nella metà degli anni '90 si arrivò, sempre tramite tecniche di miglioramento genetico classico, alla produzione delle odierne cultivar come SF459, Tainung2 ecc. sempre con più alte rese di fibra per ettaro (Cook *et. al.*, 1995).

Altri studi su kenaf che hanno previsto un approccio con marcatori molecolari del DNA per il miglioramento genetico sono stati quelli di correlazione tra le differenze morfologiche e quelle genetiche delle varie cultivar fatti con marcatori molecolari AFLP (Cheng *et. al.*, 2004) e RAPD (Cheng *et. al.*, 2002) che hanno permesso di raggruppare in cluster le varie cultivar indicando le distanze genetiche esistenti tra

esse e di tracciare per ognuna un profilo elettroforetico che ne permette la distinzione dalla altre.

A tutt'oggi approcci biotecnologici volti al miglioramento della qualità e della quantità della fibra di kenaf non sono mai stati eseguiti. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di clonare sequenze geniche dei geni maggiormente coinvolti nella biosintesi della cellulosa e della lignina di kenaf, molecole coinvolte nella formazione delle fibre, per poi poterne studiare l'espressione temporale nel tiglio e nel kenapulo.

La via bio-sintetica della lignina è stata ampiamente studiata in diverse specie vegetali per la rilevanza economica che le conoscenze ricavate dai risultati di tali studi potrebbero avere sull'industria della carta. Infatti per la produzione di carta di alta qualità c'è bisogno di estrarre la lignina dalla polpa di legno (delignificazione), processo che richiede largo uso di agenti chimici pericolosi per l'ambiente e di energia e che quindi eleva i costi di produzione (O'Connell *et al.*, 2002).

Grazie agli studi eseguiti, in banca dati oggi esistono le sequenze nucleotidiche dei geni della biosintesi della lignina clonati in diverse specie. Lo studio dell'attività enzimatica degli enzimi codificati da tali geni clonati rende possibile un quadro abbastanza chiaro del ruolo giocato dai singoli enzimi coinvolti nella biosintesi di questa macromolecola.

Le banche dati rappresentano il materiale sperimentale della bioinformatica. Esse possono essere classificate in quattro grosse categorie: Banche Dati di biosequenze; Banche Dati genomiche; Banche Dati di espressione genica e Banche Dati di proteomica. La Banca Dati del National Center for Bioinformaic Information, comunemente chiamata NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), è il classico e più importante esempio di database per gli studi computazionali in biologia molecolare, in cui sono sviluppati programmi appositi per l'analisi delle sequenze genomiche in essa presenti.

Grazie alle sequenza nucleotidiche reperibili in banca dati è stato per noi possibile usare un approccio bio-informatico per disegnare primer utili all'isolamento di sequenze geniche dei geni della biosintesi della lignina e della cellulosa in kenaf.

Due software disponibili in rete il cui nome è T-coffee (<http://www.es.emblnet.org/Services/MolBio/t-coffee/>) e clustal W (www.ebi.ac.uk/clustalw/) permettono di allineare 2 o più sequenze fornendo un file in output che, anche grazie a una differente scala di colori, permette di identificare le zone altamente identiche tra le sequenze allineate. Con tali software si è proceduto ad allineare le sequenze dei geni della biosintesi della lignina e della cellulosa già clonati nelle altre specie vegetali reperibili dalla banca dati del NCBI. L'analisi *in silico* degli allineamenti ha mostrato che essi hanno delle zone nelle quali esiste un altissima identità di sequenza. Ipotizzando che tali zone siano quelle più conservate si è proceduto a disegnare su esse coppie di primer utilizzabili nelle future amplificazioni *in vitro* sia sul DNA sia su cDNA. Sono stati scelti, per la biosintesi della lignina, i geni codificanti per gli enzimi *c4h* (cinnamato 4-idrossilasi), *4cl* (4-coumarato:CoA-ligasi), *ccr* (cinnamil-CoA ossidoreduttasi) e *cad* (cinnamil-alcool-deidrogenasi). La scelta è caduta su questi geni perchè essi rappresentano nodi cruciali nella biosintesi dei monolignoli dalla cui polimerizzazione si forma la lignina. Infatti studi su piante transgeniche, o mutanti, per uno o più dei geni citati hanno mostrato anomalie sia nella quantità della lignina che nel tipo di lignina prodotta in differenti specie. La sottoespressione del gene *c4h* in tabacco (*Nicotiana tabacum*), ad esempio, ha mostrato un riduzione dei residui siringilici tra i fenilpropanoidi della lignina derivante dalla riduzione dell'alcol sinapilico (Dixon *et. al.*, 2001), mentre la sottoespressione del gene *4cl* provoca una diminuzione significativa della quantità di

lignina non solo in tabacco ma anche in *Arabidopsis* (Hu *et al.*, 1999). Lo stesso gene *4cl* se ipoespresso in piante di pioppo oltre a provocare una significativa diminuzione di lignina nei fusti provoca anche un aumento del 15% della cellulosa (Hu *et al.*, 1998). Inoltre altri studi dimostrano che la sottoespressione del gene *c4h* riduce sensibilmente la produzione di lignina in pino (Anterola *et al.*, 1999) mostrandosi un punto limitante nella produzione di lignina.

Studi eseguiti in tabacco mostrano che esiste una correlazione tra la repressione del gene *ccr* e l'aumento del rapporto tra l'unità siringilica e l'unità guacilica all'interno della lignina (rapporto S/G della lignina) dovuta ad una diminuzione della frazione guacilica (Piquemal *et al.*, 1998), mentre un mutante difettivo per lo stesso gene in *Arabidopsis* provoca una diminuzione del 50 % di lignina nel fusto della pianta (Jones *et al.*, 2001). La repressione del gene *cad* provoca, invece, l'incorporazione all'interno della lignina dei residui aldeidici (coniferaldeide e sinapilaldeide) al posto dei rispettivi alcoli cinnamoidici di cui sono precursori (coniferilico e sinapilico), non solo in tabacco ma anche in pioppo (Ralph *et al.*, 2001). Anche se la quantità di lignina rimane inalterata nei mutanti recessivi per il gene *cad* in alberi come pino o pioppo, la sostituzione degli alcoli con i residui aldeidici provoca una più facile delignificazione della polpa per cui si usano minori quantità di agenti chimici pericolosi e viene utilizzata una quantità di energia minore a parità di quantità di cellulosa estratta (Dimmel *et al.*, 2001).

Per ognuno dei 4 geni presi in esame sono state disegnate diverse coppie di primer poi utilizzate nelle analisi di amplificazione *in vitro* del DNA e del cDNA. Tali analisi di amplificazione hanno mostrato la presenza di ampliconi che sono stati successivamente clonati in vettori di clonaggio per poi essere sottoposti a reazione di sequenziamento. L'analisi *in silico* delle sequenze nucleotidiche degli ampliconi clonati ha mostrato, per ogni gene, una elevatissima identità con le sequenze degli stessi geni di altre specie, principalmente con quelli appartenenti alla famiglia delle Malvaceae confermando la validità dell'ipotesi dell'approccio bio-informatico usato per disegnare i primer. Con questa metodologia quindi siamo riusciti ad avere i parziali dei geni su citati.

Per quanto riguarda, invece, la via biosintetica della cellulosa, ci si è soffermati sullo studio della famiglia dei geni CeSA (cellulosa sintasi) i cui membri codificano per proteine transmembrana capaci di catalizzare reazioni che portano alla formazione catene di β 1-4 glucosio, a partire da monomeri di UDP-glucosio.

E' noto che di questi geni ce ne sono diverse isoforme nelle varie specie vegetali, ad esempio in *Arabidopsis* sono stati ritrovati più di 10 geni CeSA (Hollad *et al.*, 2000), 8 in mais (Appenzeller *et al.*, 2004) e 7 in pioppo (Joshi *et al.*, 2004), ed ogni isoforma è deputata ad una funzione precisa o più isoforme costituiscono gruppi che presiedono alla stessa funzione. Studi in *Arabidopsis*, la cui conoscenza del genoma rende più facili gli studi sui fenotipi alterati, mostrano che i mutanti difettivi per una isoforma (CeSA1) sono affetti da mortalità embrionale (Beekman *et al.*, 2002) questo a sottolineare l'importanza di alcuni geni della famiglia genica CeSA. Altri invece, forse meno importanti per la vitalità della pianta, se mutati (CeSA6) producono ipocotili poco elongati e scuri (Desnos *et al.*, 1996) ma questi fenotipi possono revertire per l'espressione di altri geni CeSA che viene indotta dalla mutazione stessa.

Anche per il clonaggio della sequenza genica del gene CeSA è stata utilizzata la stessa procedura seguita nel clonaggio delle sequenze geniche dei geni della biosintesi della lignina. L'analisi di sequenziamento ha mostrato un'elevata identità con una delle due isoforme del gene CeSA di *Gossypium hirsutum* specie

appartenete anch'essa alla famiglia delle malvacee. In cotone (*Gossypium hirsutum*) è nota l'esistenza di due isoforme di CeSA *GhCeSA1* e *GhCeSA2*, la sequenza da noi clonata è un'elevata identità con l'isoforma *GhCeSA1* che in cotone codifica per un enzima transmembrana che catalizza la formazione di catene di β -1-4-glucosio a partire da UDP-Glucosio (Dolbin *et al.*, 2002).

Avendo a disposizione, per ogni gene parzialmente clonato, sia la sequenza di DNA sia quella di cDNA è stato possibile capire l'eventuale presenza di introni in ognuno ed effettuare una traduzione *in silico* dei cDNA.

Nella fase successiva è stato effettuato l'allineamento amminoacidico tra le sequenze clonate e tradotte, e quelle già sequenziate in altre specie e presenti in banca dati. Il risultato di tale confronto, ha ribadito l'alta percentuale di identità tra le sequenze amminoacidiche derivanti dalla traduzione dei cDNA e le sequenze amminoacidiche delle stesse proteine di altre specie, principalmente appartenenti alla famiglia delle Malvaceae ribadendo di fatto la validità della nostra ipotesi.

Il passo successivo è stato quello di studiare l'espressione relativa delle sequenze geniche clonate all'interno dei due tessuti della pianta di interesse industriale, taglio e kenapulo. A tal fine sono stati disegnati sulla base delle sequenze nucleotidiche di ogni sequenza clonata coppie di primer utilizzabili nelle reazioni di PCR quantitativa. Lo studio di espressione relativa è stato ristretto a due sequenze appartenenti alla via biosintetica della lignina ed una a quella della cellulosa. Il controllo endogeno di questo studio è stato fatto da una isoforma di actina2 di kenaf che, grazie alla procedura sin qui descritta, è stata clonata, sequenziata e su di essa sono stati disegnati primer per la PCR quantitativa.

Per quanto concerne la via biosintetica della lignina si è scelto di studiare i geni *c4h* e *cad*, posti rispettivamente all'inizio ed alla fine della biosintesi dei monolignoli, poiché entrambi, anche se per motivi differenti, sono enzimi chiave di tale via biosintetica. Infatti, come mostrato in diversi studi, una strategia per ridurre il quantitativo di lignina nei fusti delle piante è stata la ipoespressione dei geni che potenzialmente codificano per enzimi che sono tappe limitanti della biosintesi dei monolignoli (Baucher *et al.*, 1998, Boerjan *et al.*, 2003).

La sottoespressione del gene *c4h*, del quale sono state osservate in diverse specie (erba medica, fagiolo, tabacco) solo due isoforme, con il meccanismo del RNA antisense ha portato ad una proporzionale diminuzione della lignina (Sewalt *et al.*, 1997) senza incidere significativamente sulla morfologia e sulla crescita delle piante quindi è considerato un punto limitante della via biosintetica della lignina.

Una tappa limitante nella via biosintetica della lignina è sicuramente anche definita dall'enzima fenilalanina liasi (PAL) la cui sottoespressione anch'essa ha mostrato una diminuzione nel contenuto di lignina, ma a differenza del *c4h* esso non è un enzima strettamente correlato alla biosintesi della lignina perché il suo prodotto è un precursore di un range di composti fenolici e quindi una manipolazione genetica della PAL ha mostrato effetti pleiotropici (Sewalt *et al.*, 1997) riducendo non solo il quantitativo di lignina ma provocando riduzione della crescita delle piante.

Per quanto concerne invece il gene *cad*, gli studi citati in precedenza hanno mostrato che una sottoespressione di esso provoca una differente tipologia di lignina la cui presenza nel legno della pianta rende più facile il processo di estrazione della cellulosa dalla polpa di legno (Ralph *et al.*, 2001).

Per la via biosintetica della cellulosa è stata studiata l'espressione temporale del gene CeSA.

Le analisi di espressione temporale per tutti e tre i geni sopra citati è stata eseguita sia nel taglio che nel kenapulo di piante a 30, 60 e 90 giorni dalla semina. I cDNA sono

stati prodotti per retrotrascrizione degli RNA totali estratti sempre dalla stessa porzione di fusto. In particolar modo si è scelto di prelevare i due tessuti tra il decimo ed il diciassettesimo centimetro del fusto di kenaf a partire dal colletto. In tal modo, essendo la crescita delle piante apicale, ai tre stadi fenologici individuati la porzione di fusto in esame dovrà essere sempre differente per composizione e differenziamento cellulare.

I risultati di tale studio mostrano andamenti diversi nel taglio e nel kenapulo. Nel taglio le espressioni dei tre geni mostrano un aumento nel tempo con una stabilizzazione a 60 giorni. Questi dati ci inducono a pensare che la lignina nel taglio aumenta con il passare del tempo, ciò è in accordo con precedenti studi (Lam *et al.* 2003), eseguiti per determinare la struttura delle pareti cellulari delle fibre del taglio e del kenapulo, nei quali è riportato che durante la maturazione della pianta la cellulosa e la lignina aumentano significativamente sia nel taglio che nel kenapulo. Non deve indurre in errore il risultato dell'espressione temporale del gene CeSA poiché anche se si può notare che esso ha un picco di trascrizione a 60 giorni, il livello di trascrizione del gene resta anche a 90 giorni pressoché uguale a quella registrata a 60 e 30 permettendo quindi di ipotizzare un accumulo e quindi un aumento anche di questo polimero nelle pareti cellulari costituenti del tessuto in esame. A supporto di tale ipotesi giungono i dati della quantizzazione della lignina e della cellulosa che nel taglio mostrano un aumento significativo della lignina con il procedere della maturazione della pianta, tutto ciò in accordo con i risultati dello studio di Lam (2003). La quantizzazione del contenuto della cellulosa eseguita da noi nello stesso tessuto, mostra però una relazione lineare tra la maturazione della pianta ed una significativa diminuzione della cellulosa: ciò non è in accordo sia gli studi riportati in letteratura (Lam *et al.*, 2003, Morrison *et al.*, 1999) sia con l'espressione registrata nel nostro studio che, come già esposto, indurrebbe a pensare ad un aumento del polimero all'interno del taglio.

Nel kenapulo, invece, i geni della lignina mostrano una diminuzione di espressione nel tempo mentre il gene CeSA ha lo stesso andamento del taglio ma la decrescita a 90 giorni è decisamente più marcata.

Le diminuzioni dell'espressione registrata per i due geni della biosintesi della lignina nel kenapulo sembrano in contrasto con le quantità medie di lignina estratte ai tre stadi fenologici, le quali indicano un aumento della quantità di tale polimero nel kenapulo con il passar del tempo. Tale aumento è in accordo con i dati riportati in letteratura (Lam *et al.*, 2003). Il fatto che ad un aumento della quantità di lignina nel tessuto non corrisponda un aumento dell'espressione dei geni coinvolti nel pathway di formazione dei monolignoli potrebbe sembrare un controsenso ma altri studi (Morrison *et al.*, 1999) hanno dimostrato che in kenaf c'è un aumento massimo della lignina nei primi 60 giorni dalla semina quindi è plausibile che l'espressione di tali geni sia massima nelle prime decine di giorni dopo la semina, per cui le espressioni degli stessi geni in altri periodi di vita della pianta se confrontate con quelle dei primi stadi risultino ovviamente inferiori.

Per quanto concerne l'andamento dell'espressione del gene CeSA, esso è in accordo con i dati della quantizzazione della cellulosa fatta nel kenapulo dai quali si evince che a 90 giorni c'è un calo significativo della quantità di cellulosa nella parete cellulare delle cellule del kenapulo, ma è in contrasto con i dati della letteratura che riportano un aumento della cellulosa nel tempo (Lam *et al.*, 2003).

Una peculiarità emerge da questo studio se si esaminano i dati delle analisi quantitative dei polimeri nei due tessuti. La cosa interessante è che nel kenapulo la quantità di cellulosa non ha differenze statistiche nei primi due stadi mentre

diminuisce significativamente nel terzo a vantaggio di un aumento della lignina che ha un andamento opposto mostrando una relativa similitudine tra i dati a 30 e 60 giorni e poi una un aumento più marcato a 90. Tale peculiarità potrebbe essere ricondotta alle condizioni di crescita a cui è stata sottoposta la pianta. Infatti mentre in tutti gli studi riportati sinora (Lam *et al.*, 2003, Morrison *et al.*, 1999, Nashimura *et al.*, 2002) le piante sono cresciute in campo nel nostro studio esse sono allevate in camera di crescita, e ciò ha potuto provocare un rallentamento della crescita delle stesse, poiché le camere sono a temperatura oscillante tra i 24 °C ed i 20 °C mentre l'optimum per lo sviluppo della pianta è intorno ai 27 °C, (Bitzer *et al.*, 2000) diminuendo di fatto la produzione di cellulosa.

Negli ultimi anni più studi sono stati fatti circa la composizione dello stelo del kenaf per e le modificazioni dei contenuti di cellulosa e di lignina durante la maturazione della pianta, uno studio mostra che con l'aumentare dell'altezza della pianta diminuisce il contenuto di lignina presente nello stelo e che la lignina contenuta nel taglio è sempre minore di quella contenuta nel kenapulo (Nashimura *et al.*, 2002) se i campioni vengono prelevati dalla stessa porzione di fusto. Anche con questo ultimo dato i risultati ottenuti da noi sono in contrasto, infatti nel nostro studio abbiamo dimostrato che in tutti e tre gli stadi fisiologici indagati il contenuto medio di lignina nel taglio è superiore nei confronti di quello del kenapulo. Questa differenza tra i risultati degli studi precedenti ed i nostri oltre a poter essere spiegata con la crescita della pianta in condizioni non ottimali che potrebbe indurre una lignificazione più spinta, potrebbe essere anche correlata con il genotipo stesso della pianta. Va ricordato infatti che la cultivar da noi studiata, la Dowling, non è stata mai oggetto degli studi riportati, ed essa è nota proprio per due caratteristiche fondamentali: l'elevata resa totale di fibra e la più alta percentuale di fibra nel taglio tra le cultivar in commercio. E' noto in letteratura che almeno nelle piante arboree la deposizione della cellulosa e della lignina nella parete cellulare può essere regolata dalla pianta in modo compensativo, come non accade nelle piante erbacee, (Hu *et al.*, 1999). La sottoespressione del gene *4cl* in pioppo tramite la tecnologia del RNA silencing ha portato a piante con una riduzione del 45 % di lignina ma anche con un aumento del 15 % di cellulosa. Un altro studio (Li *et al.* 2003) sempre in pioppo ha mostrato una riduzione del 40 % della lignina ed un aumento del 14 % della cellulosa quando veniva represso il gene *4cl*. In entrambi gli studi le piante non avevano fenotipi alterati e problemi di crescita. Questi risultati possono indurci a pensare che la bassa quantità di cellulosa può essere causata dall'elevata quantità di lignina che abbiamo registrato sia nel kenapulo sia nel taglio.

Concludendo possiamo dire che il periodo in cui c'è la massima espressione dei geni della lignina e della cellulosa nel taglio è quello che va dalla semina ai primi 60 giorni di vita della pianta, nel kenapulo invece la massima espressione dei geni della lignina avviene nei primi 30 giorni mentre quella dei geni della cellulosa tra 30 e 60 giorni dopo la semina.

Tali dati ci premettono di comprendere in quali stadi fenologici della vita della pianta si ha l'espressione dei geni della biosintesi dei polimeri costituenti le fibre, quindi questo studio può essere considerato come un punto di partenza sia per individuare in quali stadi si deve intervenire se si vuole modificare il rapporto cellulosa:lignina nella pianta sia per comprendere su quali geni bisogna intervenire per un approccio volto al miglioramento quali-quantitativo delle fibre.

4.2 DIFFERENZIAMENTO *IN VITRO*, MASSIVA PROPAGAZIONE E TRASFORMAZIONE GENETICA DEL KENAF

A fine di trovare un protocollo efficace ed efficiente per la trasformazione genetica in kenaf sono stati eseguiti studi volti a trovare un mezzo di differenziamento che a partire da un espianto, di un qualsiasi tessuto, della pianta possa produrre caulogenesi.

Il prerequisito per un protocollo efficiente ed efficace di trasformazione genetica di kenaf, come di tutte le angiosperme, è avere un efficiente terreno che induca caulogenesi a partire da espianti della pianta matura. Dalla letteratura sono noti differenti tentativi di trovare un efficiente terreno di differenziamento in kenaf a partire da diversi tessuti quali gemme apicali (Srivatanakul *et al.*, 2000), da internodi (Reichert *et al.*, 1996), da fusto di pianta adulta (McLean *et al.*, 1992), ma un efficiente protocollo di differenziamento rimane ancora oggi un obiettivo da raggiungere. In questo studio abbiamo esaminato la risposta di diversi tessuti della pianta di kenaf a differenti terreno che contenevano ormoni quali auxine, citochinine e gibereline in diverse concentrazioni ed abbinamenti. In un primo piano sperimentale, sono stati analizzati tre differenti mezzi per il differenziamento *in vitro* su tessuti di kenaf. In particolare l'attenzione è stata focalizzata nell'ottenere differenziamento a partire da ipocotili e foglie cotiledonari di kenaf.

Dalla letteratura è noto che le foglie cotiledonari ed i loro piccioli risultano essere molto inclini alla formazione di callo quando posti su terreni contenenti auxine e citochinine in differenti concentrazioni (Kathun *et al.*, 2003), da qui la scelta di usarli come espianti da saggiare in esperimenti di differenziamento *in vitro*. I dati raccolti in questo primo piano sperimentale non hanno mostrato la formazione di gemme e quindi la caulogenesi ma bensì la formazione di callo friabile o compatto con o senza radici.

Altri due terreni di coltura, nominati B ed NTA, sono stati saggiati per la loro capacità di produrre differenziamento. In questo secondo piano sperimentale oltre alle foglie cotiledonari sono stati saggiati anche ipocotili. È noto che i terreni B (Kathun *et al.* 2003) ed NTA (Reichert *et al.* 1999 patent n° 5,998,207) da noi usati hanno già prodotto organogenesi in differenti cultivar di kenaf come ad esempio: Cubano, Everglades 41, Evergladel 71, Tainung 2 e HC-2 a partire da foglie cotiledonari, piccioli e porzioni di fusti.

In particolare il terreno da noi siglato con la lettera B è quello che ha prodotto il più alto numero di gemme a partire da dischi di foglie cotiledonari di kenaf della cultivar HC-2 (Kathun *et al.*, 2003). Non va sottovalutato, però, che l'efficienza di differenziamento di un terreno è dipendente dalla cultivar utilizzata, motivo per il quale si è deciso di saggiare questi due mezzi sulle due cultivar da noi studiate che sono differenti da quelle sulle quali sono stati effettuati gli studi sopra citati.

Sia le foglie cotiledonari sia gli ipocotili sono stati prelevati da piantine di 10 giorni di entrambe le cultivar ed i dati furono raccolti fino all'ottantaseiesimo giorno dopo l'inizio dell'esperienza. Dopo tale periodo furono riscontrati solo 2 germogli provenienti rispettivamente da foglie cotiledonari di Dowling poste su terreno B e da foglie cotiledonari di SF459 poste su terreno NTA. Tale risultato, anche se positivo, mostra una bassa efficienza del protocollo sia per la minima percentuale di differenziamento sia per i tempi di caulogenesi oltremodo lunghi. Sia i tempi lunghi di caulogenesi sia la bassa percentuale di differenziamento non sono in accordo con gli studi fatti da Kathun *et al.*, (2003) nei quali però la cultivar saggiata è stata la HC-2. Ciò dimostra che il differenziamento in kenaf è influenzato dalla cultivar. Inoltre i due

germogli differenziati da callo, prodotto a partire da foglie cotiledonari, quando sono stati posti in terreno MS non mostrarono una facile radicazione (dati on mostrati). Questo risultato non è in accordo con gli studi di Srivatanakul *et al.* (2000) nei quali è riportato che la radicazione dei germogli di kenaf differenziati da callo non risultata difficile da raggiungere indipendentemente dagli ormoni utilizzati nell'induzione alla caulogenesi delle foglie cotiledonari.

In un terzo piano sperimentale sono stati studiati gli effetti del picloram, un erbicida impiegato in genere contro infestanti arbustive e legnose, sui tessuti di kenaf. Con questo esperimento oltre a l'induzione al differenziamento per morfogenesi si è voluto testare la possibilità di differenziamento per embriogenesi somatica. E' noto infatti in letteratura che il picloram produce embriogenesi somatica in molte specie vegetali a partire da differenti tessuti (Dineshkumar *et al.*, 1995, Valverde *et al.*, 1987, Caula *et al.*, 1983). Non esistono studi effettuati in kenaf in cui è riportato il differenziamento per embriogenesi somatica mentre tale fenomeno è riportato in altre *Malvaceae* in particolar modo in cotone, che risulta la specie più studiata in questa famiglia. Infatti l'embriogenesi somatica in cotone è stata riportata sin dagli anni ottanta (Davidonis e Hamilton 1983). Gli studi su tale tecnica sono stati poi approfonditi in studi più recenti superando alcune difficoltà come la bassa frequenza di embrioni, lo sviluppo anormale degli stessi e la mancanza di elongazione dei germogli (Kumria *et al.*, 2003, Wilkins *et al.*, 2000). Ad oggi, l'unico fattore limitante l'alta frequenza di differenziamento per embriogenesi somatica in cotone è il fatto che l'efficienza è dipendente dal genotipo utilizzato (Zhang *et al.*, 2001, Mishra *et al.*, 2003). In tutti gli studi citati però, il differenziamento per embriogenesi somatica è stato ottenuto con terreni nei quali non era presente il picloram ma bensì altri ormoni naturali o di sintesi. Studio in cui si è utilizzato il picloram nel terreno per indurre differenziamento per embriogenesi somatica in cotone (specie filogeneticamente vicina la kenaf) sono stati condotti da Ganesan (2004 e 2006). In tali studi è stato dimostrato che in diverse cultivar di cotone l'uso di picloram a basse concentrazioni (1.24 μM) produceva la massima proliferazione di embrioni somatici (Ganesan *et al.*, 2004) e l'accelerazione della crescita degli stessi (Ganesan *et al.*, 2006). I nostri dati non mostrano alcun evento di differenziamento sia su foglie cotiledonari sia su ipocotili della cultivar Dowling in nessuna delle tre concentrazioni saggiate di picloram dopo 30 e 45 giorni di induzione, mostrando una diversa risposta del kenaf rispetto al cotone anche per quanto concerne l'embriogenesi somatica.

Per quanto concerne la massiva propagazione, dalla letteratura è noto l'effetto combinato della benziladenina con la kinetina per l'ottenimento di gemme multiple a partire da gemme singole in diverse cultivar di kenaf (Herath *et al.*, 2004). Questa procedura pur fornendo dati confortanti sul numero di gemme prodotte a partire da una singola gemma ascellare mostra un tempo di ottenimento di circa 8 settimane. Va ricordato inoltre che concentrazioni anche non eccessivamente elevate (1mg l^{-1}) di benziladenina aggiunte ad un normale terreno contenete sali di MS, sia in presenza di acido naftalenacetico che non, non promuovono né la formazione di gemme né la radicazione delle stesse ma bensì favoriscono la formazione di callo (Zapata *et al.*, 1990). Questo molteplice effetto della benziladenina sulle gemme di kenaf la rende difficilmente utilizzabile per protocolli di massiva propagazione.

L'uso dell'ormone di sintesi Thidiazuron ha prodotto gemme multiple in differenti specie (Hu *et al.*, 1993, Huetteman *et al.*, 1993) mostrandosi efficiente per il relativo breve tempo di esposizione con il quale induce la formazione di gemme (Visser *et al.*, 1992). Gli studi di Srivatanakul (Srivatanakul *et al.*, 2000) hanno mostrato che tale ormone di sintesi a basse concentrazioni provoca l'induzione di gemme multiple

a partire da una gemma unica di kenaf messa in coltura senza la formazione di callo. E' stato anche provato che l'auxina 2,4 D non aumenta significativamente la produzione di gemme e che quindi il TDZ da solo induce la produzione di tali gemme (Srivatanakul *et al.*, 2000).

In questo studio è stato saggiato l'effetto del TDZ a diverse concentrazioni sugli embrioni presenti nei semi di kenaf.

E' stato dimostrato che semi posti su terreno con la presenza di TDZ alla concentrazione di 10 μ M, mostravano una proliferazione di gemme multiple significativamente superiore a quelli posti sui terreni a concentrazione di ormone più bassa. Tali gemme non hanno mostrato problemi di radicazione quando sono state trasferite in MS. in accordo con gli studi di Huetteman e Preece (1993) nei quali è riportato che il TDZ inibisce la produzione di radici in molte specie legnose ma non in kenaf.

Inoltre studi condotti da Srivatanakul *et al.*, (2000) su kenaf mostrano che questa pianta contiene alti livelli di auxine che facilitano la radicazione superando l'effetto di inibizione della radicazione provocato dal TDZ. Srivatanakul *et al.* (2000) hanno anche riportato che piante di kenaf esposte al TDZ mostrano alcune delle problematiche tipiche connesse alla presenza di questo ormone nel substrato. Infatti gemme multiple di kenaf derivanti dall'induzione di gemme singole con substrati contenenti elevati livelli di TDZ mostrano il fenomeno della vitrificazione e della formazione di germogli fasciati. Mentre in altre specie gli svantaggi di usare il TDZ includono, oltre ai due problemi citati, una diminuzione di allungamento ed una difficoltà di radicamento dei germogli (Huetteman e Preece 1993; Lu, 1993). Nel nostro studio nessuno dei problemi citati sia per il kenaf sia per le altre specie è stato riscontrato dimostrando così che l'induzione di tessuti meristemati presenti negli embrioni alla proliferazione di gemme multiple mediante TDZ supera anche i problemi che solitamente provoca tale ormone. Tutto ciò rende il protocollo efficiente in approcci di trasformazione genetica di kenaf.

Il passo successivo è l'utilizzo delle gemme multiple come materiale bersaglio per esperimenti di trasformazione genetica sia con metodi diretti sia con metodi indiretti.

La dimostrazione che il kenaf poteva essere trasformato mediante *Agrobacterium tumefaciens* fu data circa 15 anni fa (Banks *et al.*, 1993) con la trasformazione transeunte di callo proveniente da ipocotili. Eventi di trasformazione stabile non sono mai stati evidenziati negli studi riportati in letteratura nonostante i molti sforzi volti a trovare le migliori condizioni di trasformazione (Srivatanakul *et al.*, 2000, Srivatanakul *et al.*, 2001).

Il nostro protocollo di trasformazione si basa sui risultati avuti dall'utilizzo del TDZ sui semi di kenaf. I risultati degli esperimenti preliminari di trasformazione eseguiti, nei laboratori presso i quali è stato svolto questo progetto, sia con metodi diretti sia con metodi indiretti hanno indotto a focalizzare l'attenzione sull'uso dell'agrobatterio per la trasformazione dei tessuti meristemati presenti negli embrioni. Semi di entrambe le cultivar studiate dopo essere stati tagliati longitudinalmente per permettere all'agrobatterio di venire a contatto con i tessuti sono stati cocoltivati con due ceppi di agrobatterio il C58C1 ed il LBA4404 quest'ultimo già mostratosi più adatto alla trasformazione di gemme di kenaf in altri studi (Srivatanakul *et al.*, 2000). Sia nel mezzo di co-coltura che nel mezzo di trasferimento è stato usato l'acetosiringone la cui presenza, è stato dimostrato, aumenta l'efficienza dell'agrobatterio (Srivatanakul *et al.*, 2000). Si è scelto di non esporre gli espianti ad un periodo di precultura nel mezzo contenente il TDZ, poiché anche se è stato osservato che la precultura

aumenta l'espressione transiente del transgene inserito nella pianta tale aumento non è correlato ad un aumento della espressione stabile (Herat *et al.*, 2005).

I risultati hanno mostrato per il C58C1 una trasformazione dello 0.5% e per il LBA4404 dello 0.1%, degli espianti totali di entrambe le cultivar, saggiata a 90 giorni dalla co-coltura mostrando quindi un'efficienza migliore per il ceppo C58C1. Questo dato è in contrasto con gli studi di Srivatanakul *et al.* (2001) nei quali viene indicata una percentuale più alta di gemme trasformate con il ceppo LBA4404. Questa differenza può essere dovuta al fatto che nel nostro studio sono stati sottoposti a trasformazione mediante agrobatterio i tessuti meristematici degli embrioni presenti nei semi mentre nello studio citato l'agrobatterio è stato messo a contatto con le gemme apicali di piantine di 3-4 giorni. Il ceppo C58C1 non è stato mai utilizzato in esperimenti di trasformazione di kenaf.

Nello scorso decennio sono state fatte molte ricerche sulla trasformazione di cotone sia con metodo indiretto (Thomas *et al.*, 1995, Bayley *et al.*, 1992) sia con metodo diretto (Majeed *et al.*, 2000) ed i tentativi di trasformazione sono stati eseguiti su differenti tipi di espianti (Firoozabady *et al.*, 1987, Umbeck *et al.*, 1987) nell'intento di inserire in esso geni di resistenza a stress biotici e abiotici. Gli studi di Satyavathi *et al.*, (2002) hanno mostrato che le gemme danno una buona risposta alla trasformazione mediante agrobatterio dopo che altri studi avevano già messo in evidenza che la massiva propagazione da gemme singole in cotone risulta semplice (Saeed *et al.*, 1997).

Negli studi di trasformazione di gemme di cotone la percentuale di trasformazione varia tra 6,5% e 9,6% (Majeed *et al.*, 2000) molto più alta della percentuale di trasformanti trovata nel nostro studio su kenaf. Questa differenza è imputabile oltre alla diversità tra le specie, anche se entrambe appartenenti alla stessa famiglia, anche al fatto che nei nostri esperimenti sono cocoltivati gli embrioni mentre negli esperimenti citati su cotone ad essere cocoltivate sono state le gemme apicali prelevate da giovani piantine.

In studi fatti su *Hibiscus sbardiffa*, specie molto vicina al kenaf, embrioni trasformati con il ceppo LBA4404 contenente nel plasmide il gene gus hanno mostrato una percentuale di sopravvivenza del 60.46 % dopo 25 giorni dalla co-coltura (Gassama-Dia *et al.*, 2004) mentre gli embrioni di kenaf trasformati da noi con lo stesso ceppo hanno mostrato una percentuale di sopravvivenza di 29.28 % dopo 28 giorni dalla co-coltura. Questa differenza è imputabile oltre che alla differenza tra le specie anche alla concentrazione dell'antibiotico nel mezzo di selezione che nel nostro caso è 6 volte superiore. Nello stesso studio è stato trovato che il 68% degli espianti di *H. sbardiffa* saggiati dopo 10 giorni dalla co-coltura risultava positivo al saggio gus mentre nel nostro caso abbiamo avuto il 100% di positivi al saggio dopo 7 giorni dalla co-coltura per entrambe le cultivar, questo dato sembra mostrare che il nostro protocollo è valido per il kenaf anche se va migliorato al fine di renderlo efficiente almeno quanto lo sono quelli per il cotone.

Possiamo concludere affermando che in questo lavoro si è ottenuto un efficiente protocollo di massiva propagazione con l'utilizzo del TDZ sugli embrioni di kenaf e che tali tessuti sono buoni bersagli per la trasformazione genetica mediata da agrobatterio.

6. FIGURE



Fig. 1.1 Pianta di Kenaf in campo (Portici 2006)

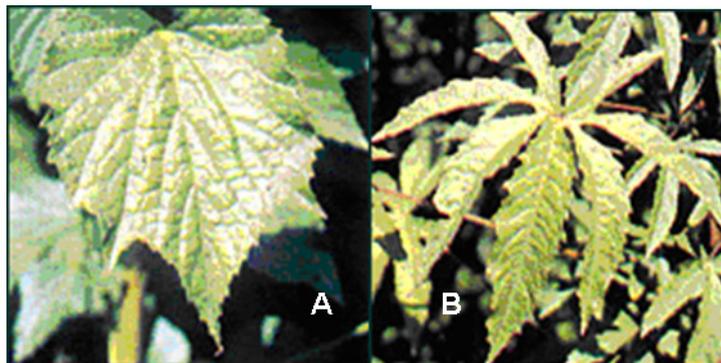


Fig. 1.2 Foglie di kenaf. A foglia settata. B foglia intera

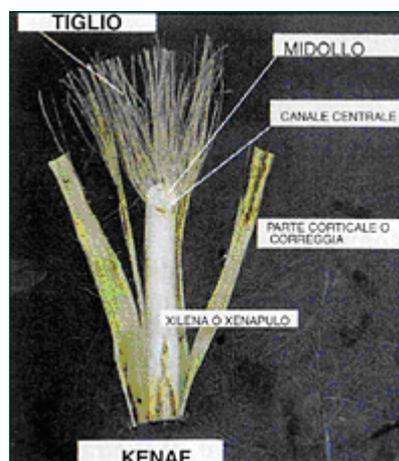


Fig. 1.3

Stelo di kenaf. sono visibili: la corteccia, le fibre del tiglio, il kenapulo ed il midollo.



Fig. 1.4 Tiglio



Fig. 1.5 Kenapulo



Fig. 1.6 Fiori di kenaf



Fig. 1.7 Frutti di kenaf

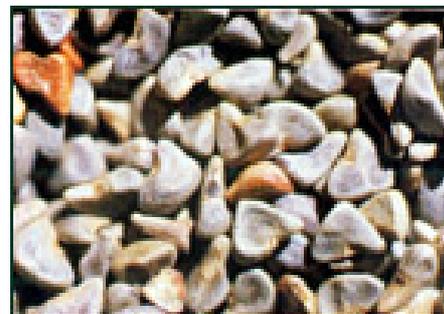


Fig. 1.8 Semi di kenaf



Fig. 1.9 Pannelli isolanti acustici e termici per la bio-edilizia fatti di kenapulo



Fig. 1.10 Esempi di materiali bio-compositifatti con fibre di kenaf nell'industria dell' hi tech

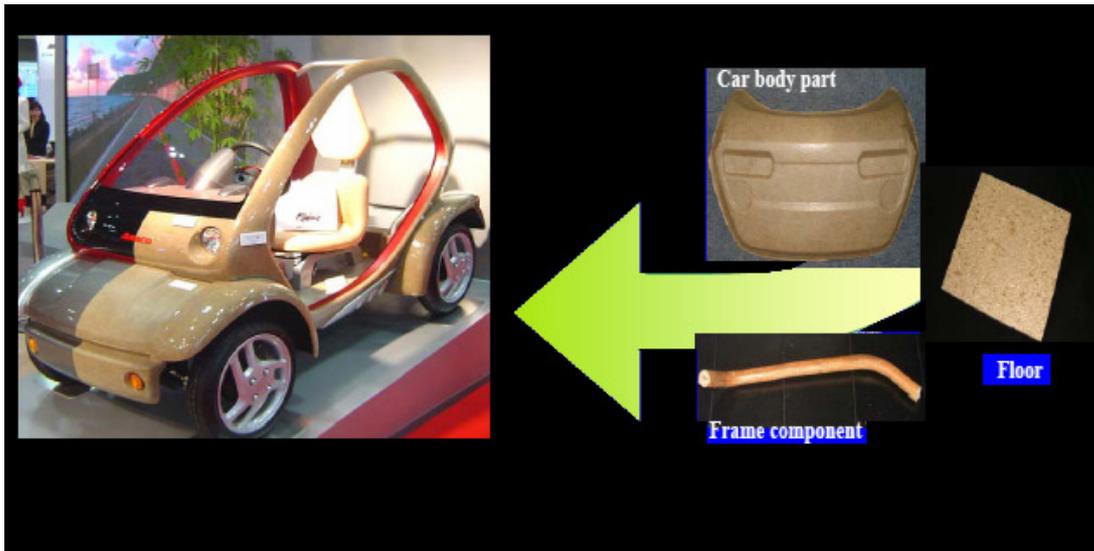


Fig. 1.11 Esempi di materiali bio-compositi fatti di fibre di kenaf nell'industria automobilistica. Dal 2015 una direttiva UE permetterà la sola messa in produzione di autoveicoli che siano fatti per il 95% di materiale riciclabile



Fig. 1.12 Tessuto fatto a partire da fibre di kenaf

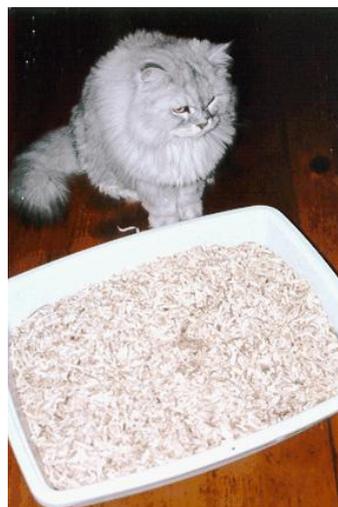


Fig. 1.13 Letteria in kenaf per gatti

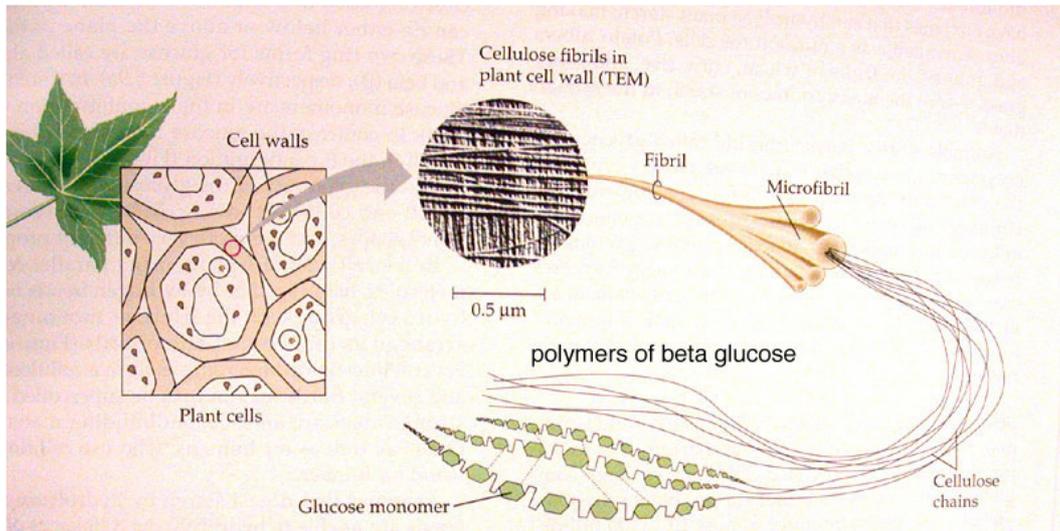


Fig. 1.14 La struttura della cellulosa.

Si nota come le microfibrille siano formate da catene di cellulosa che sono legate tra di loro da ponti idrogeno

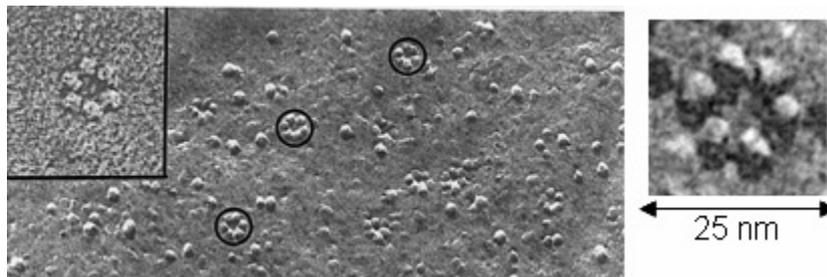


Fig. 1.15

Strutture transmembrana a simmetria esagonale chiamate "rosette" sede della sintesi della cellulosa. Visione al microscopio elettronico a trasmissione (TEM)

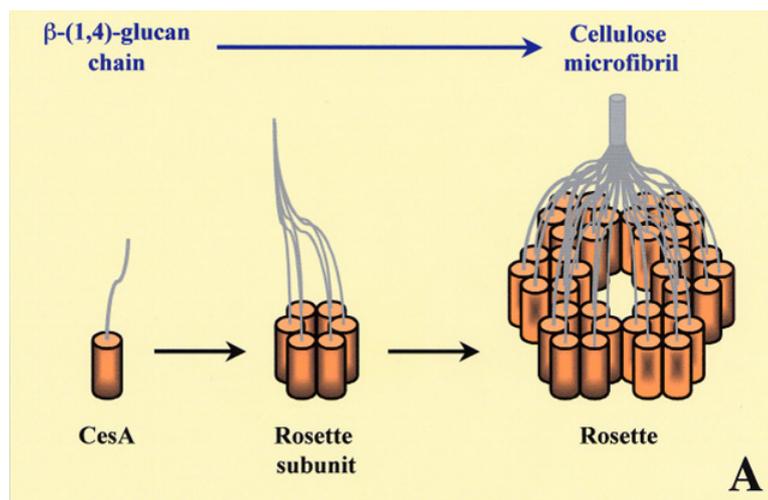


Fig. 1.16

Struttura della rosetta.

Ogni rosetta è formata da sei unità, a loro volta formate da sei enzimi CESA che polimerizzano, ognuno, una catena di cellulosa. Il risultato è una microfibrilla con 36 catene di cellulosa.

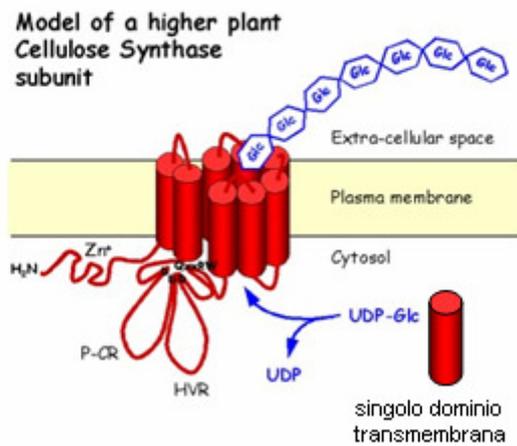


Fig. 1.17 Ipotetica struttura dell'enzima CESA. Sono visibili gli 8 domini transmembrana, 2 all'N-terminale e 6 al C-terminale

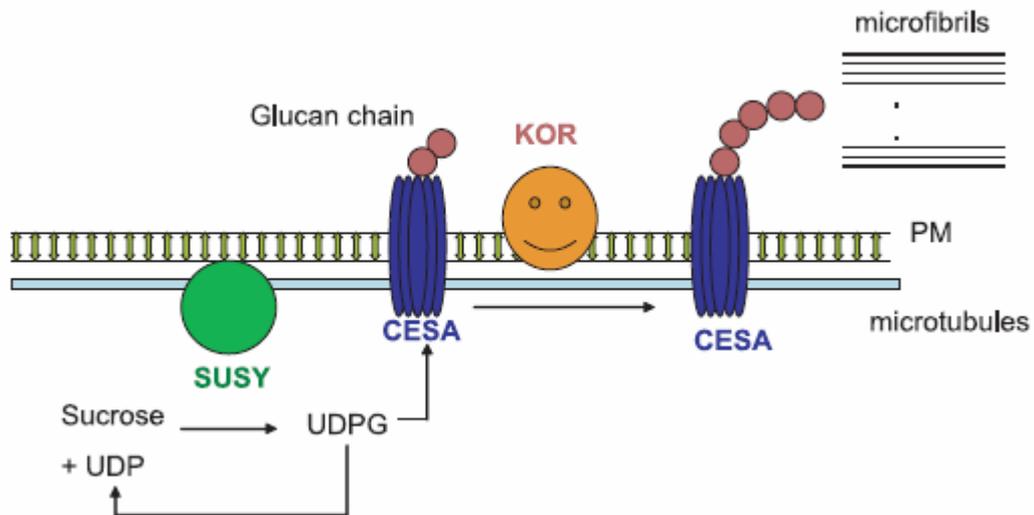


Fig. 1.18 Schema della biosintesi della cellulosa.

La proteina SUSY catalizza la formazione dell'UDP-glucosio a partire da saccarosio e UDP e lo trasporta alle proteine CESA. Ogni CESA catalizza la polimerizzazione dei monomeri di glucosio in catene di cellulosa liberando UDP che è pronto per essere usato di nuovo da SUSY. La proteina KOR agisce come un controllo delle catene di cellulosa favorendone l'accorpamento in microfibrille ed tagliando le catene difettose.

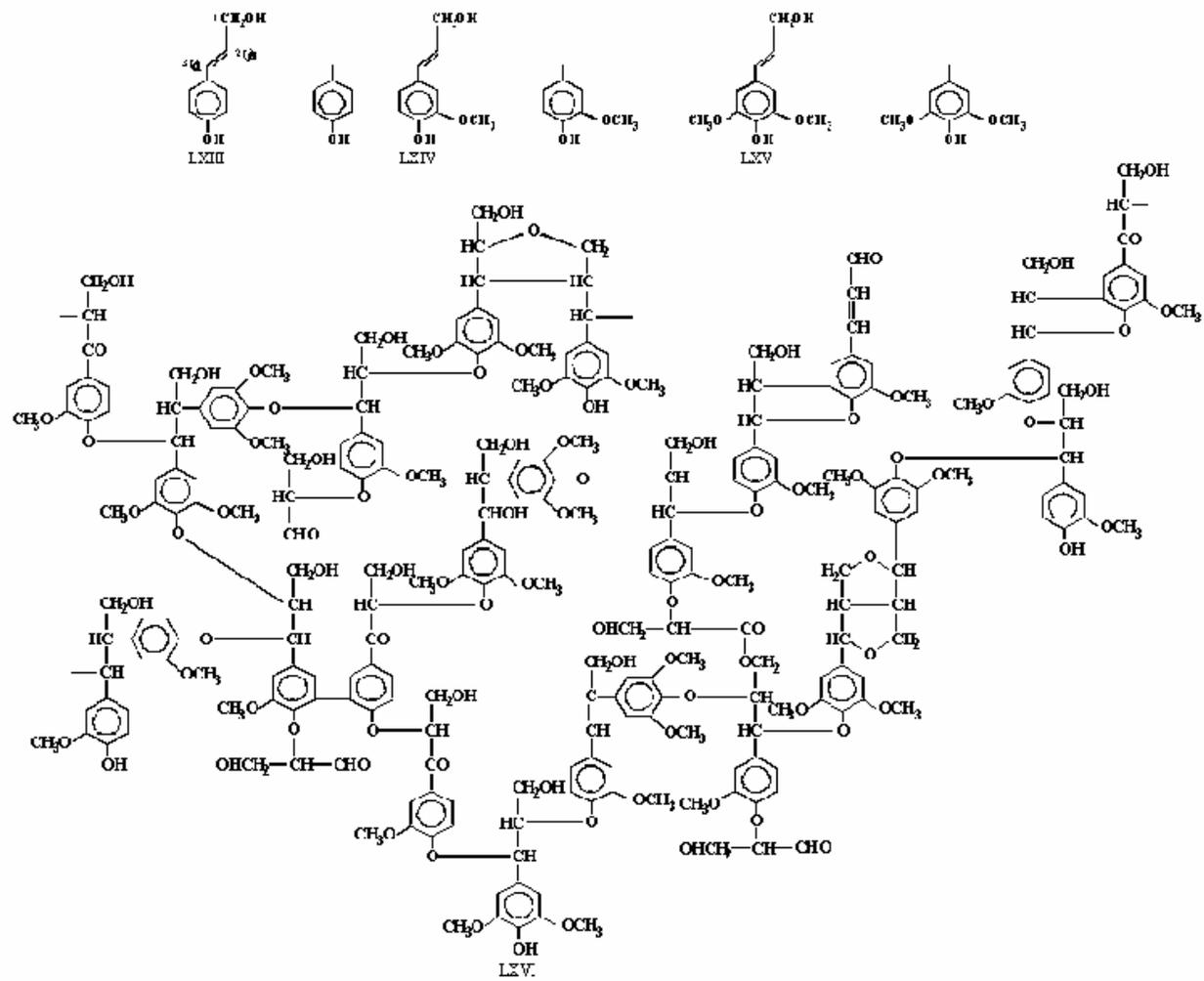


Fig. 1.19 Struttra della lingina

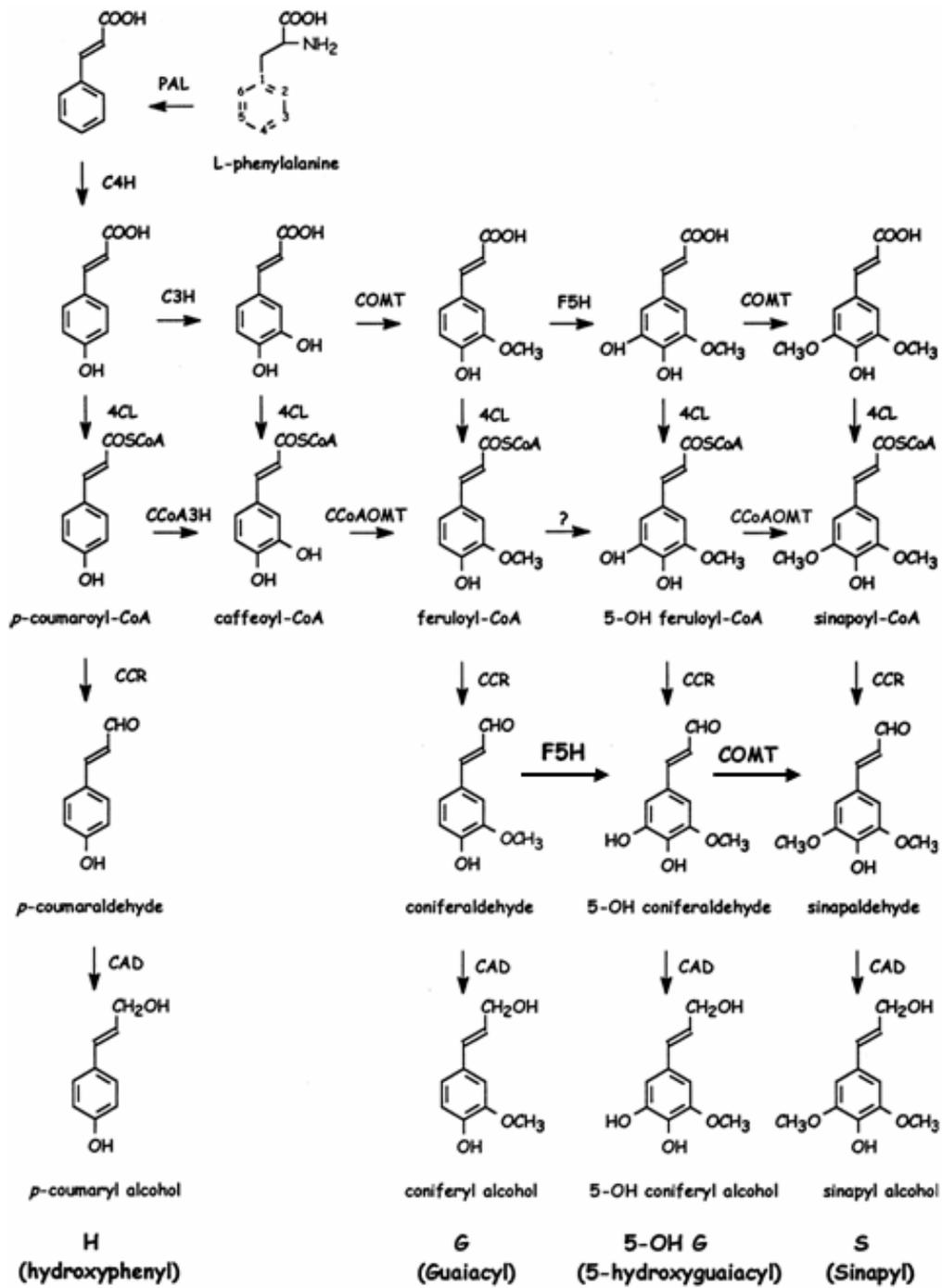


Fig. 1.20 Biosintesi dei monolignoli

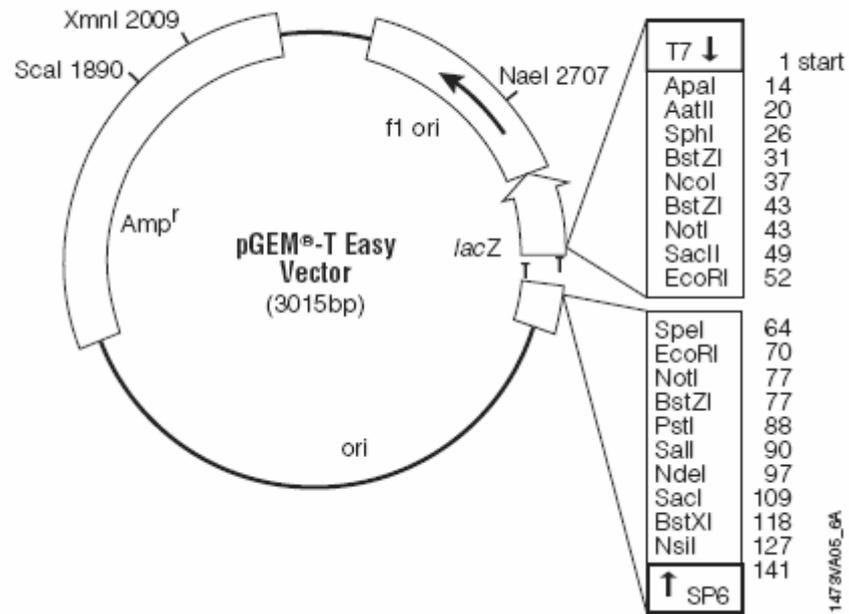


Fig. 2.1 Vettore di clonaggio pGEM-T Easy (Promega). I frammenti ottenuti dalle analisi di amplificazione del DNA e del cDNA , previamente adenilati, vengono inseriti nel sito di clonaggio tra i due residui di timina interrompendo il gene lac Z. Il contiene al suo interno un gene che conferisce resistenza all'antibiotico ampicillina.

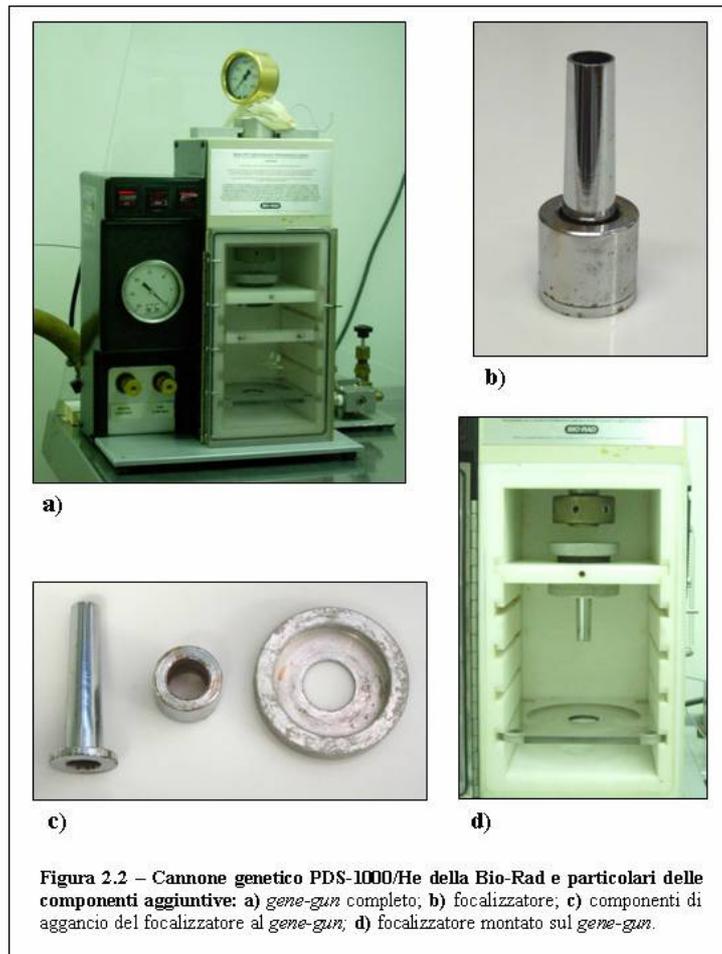


Fig. 2.3 Semi di kenaf tagliati e messi in una sospensione di *Agrobacterium tumefaciens*

G.max	-----ATGCC-----TGATGTGGAAGCAG-GAG 23	G.max	CCCGATGACGTGGTTCGATTCCTTATCTCCGGAGAACAGTGGTCTCCCAAGGGGAGTG 609	G.max	TTACCCAGAAACCAATCCGGTGAATTTGCATAGAGGGCCAGGATCATGAAGGTTAT 1209	
A.fruticosa	-----ATGCCATTTGGACAGAGAACCAAA 26	A.fruticosa	CTGTATGATGTGGTGGCACTCCCTATCTCGAGGACACAGGGTGGTCCCAAGGGGAGTG 588	A.fruticosa	TTCCAGCAAAACCCAGCTCCGGTGAATTTGCATAGAGGGCCAGGATCATGAAGGTTAT 1188	
P.tomentosa	-----ATGATACCAACAAG 14	P.tomentosa	CCCGATGATGTGTAGCATCTTATCTCAGGAGCACTAGGGTGGCAAAAGGGGAGTG 588	P.tomentosa	CTACCCAGCAACCCAGCTGGTGAATCTGCATCCGGGGTATCAGATCATGAAGGTTAT 1188	
S.tuberosum	-----ATGCCGATGGATCCGGAACAAACAGCATCAG 32	S.tuberosum	CCCGAGATGTGTAGCATCTTATCTCAGGAGCACTAGGGTGGCAAAAGGGGAGTG 606	S.tuberosum	CTACCCGGTAAACCAACCCGGTGAATTTGCATAGAGGGCCAGGATCATGAAGGTTAT 1206	
R.idaeus	-----ATGGSGTCCAAACACCTCAAC 22	R.idaeus	CCCGAGATGTGTGGTTCCTTATCTCAGGAGCACTAGGGTGGCAAAAGGGGAGTG 600	R.idaeus	TTCCGGCCCAACCCAGCTGGTGAATTTGCATCAGAGGGCCAGGATCATGAAGGTTAT 1200	
A.thaliana	ATGCCGCCAAGAACAGCAGGTTTCTCAGGTGATGAGAAGACAGCAACACAC 60	A.thaliana	CCCGAGATGTGTGGTTCCTTATCTCAGGAGCACTAGGGTGGCAAAAGGGGAGTG 600	A.thaliana	CTTCCAGGAAATCAACCCGGTGAATTTGCATCAGAGGGCCAGGATCATGAAGGTTAT 1200	
G.max	G--GAATGATATTCAGGTGAGGTTCCGGATATCTACATCCCAAAATATGCCCTC 81	G.max	ATGCTGAGCCACAGGGGCTGGAGCAGCATTTGCTGAGCAGGTTGACGGTGAATACCC 649	G.max	CTAAATGATGAGAGGCTACAGAGAGAACCATAGACAAAGATGGTGGTGGTCCACAGGT 1269	
A.fruticosa	G--GAATCACTTCAGTCAAATACAGAAATCCAAATCCCAAAACCTGCCCTT 84	A.fruticosa	ATGTTATCCAAAGAGGTTGGCCAGCAGATGACAGCAAAAGTTGATGGGGAARACCC 668	A.fruticosa	CTAAATGATCAGAGGCTACAGAGAGAACCATAGACAAAGAGGTTGGTGGTCCACAGGT 1248	
P.tomentosa	A--GAATCACTTCAGTCAAATACAGAAATCCAAATCCCAAAACCTGCCCTC 72	P.tomentosa	ATGTTAACCCAAAGGCTTAATACAGTGTGCTCAACAGTGTAGATGGAGCAATCT 648	P.tomentosa	CTTAATGACCTTGAGGCACTCAGAGCAATAGACAAATAGACAAATAGCAGCAGCC 1248	
S.tuberosum	A--GATTTATCTTTGATTAACCTCGTATTTACATCTCCCAAAACCTGCCCTT 90	S.tuberosum	ATGTTGACCCAAAGGCTGGAGAGGCTTCTCAGCAGAGTGGACGAGAAATCCG 660	S.tuberosum	TTGATGATCCCGAGCCACAGTATGAAABAGAGAGATGGTGGTCCACATCGC 1266	
R.idaeus	A--CAACTGCTTCAGCTCCAGCTCCCGACATCCATCCCAAAACCTGCCCTC 81	R.idaeus	ATGTTGACCCAAAGGCTGGAGAGGCTTCTCAGCAGAGTGGACGAGAAATCCG 660	R.idaeus	CTTAATGATCCCGAGCCACAGACCAACTAGACAGAGGTTGGTCCACAGCT 1260	
A.thaliana	AGTAGCTCATTTCCGATCAAGTTACCGGATATTTACATCCCAAAACCTGCCCTC 120	A.thaliana	ATGCTGACCAACAGGACTAGTCCAGAGGCTTCTCAGCAGAGTGGACGGGAGAACCCG 720	A.thaliana	CTCAAAATCCCGAGCCACTACAGAGACCATTTGATAAAGAGGTTGGTCCATCTGGA 1320	
G.max	CACCTTTATCTTCGGATTTGAGAGGTTGGTTCAGGCCCTTCCTGATCAAGCC 141	G.max	ARCCTTATACCACTCCGACAGGACTCTCTCTGCTGCCCTTCCTTCAATTTAC 729	G.max	GACATGGTGTATCATCGACGATGACGATGATTTATTCATCGTGGACGCTCAAGGAATG 1329	
A.fruticosa	CACCTTTATCTTCGGATTTGAGAGCTTCAGATTTGGGTCAGGCTCATCTGATCAAGTCC 144	A.fruticosa	ARCCTCTACTTCAAGTGGAGGACTCATTTCTGTGCTGCCCTTCCTTCAATTTAT 708	A.fruticosa	GACATGGCTCATCGACGATGACGATGATTTATTCATCGTGGACGCTCAAGGAATG 1308	
P.tomentosa	CATTCATACGTTTGAAGACTTCAGATTTCAACATTCACAAACCTTCGCTGATAAATGGG 132	P.tomentosa	AACCTGTATTTCAAGTGAAGATGATGATTTGTGTGCTCCATATGCTCATATCT 708	P.tomentosa	GATATGGCTCATTTGATGATGATGATGATTTTCAATCGTGGACGATGAAAGGATG 1308	
S.tuberosum	CATTCATACGTTTGAAGACTTCAGATTTCAACATTCAGAAACCTTCGCTGATAAATGGG 150	S.tuberosum	AATTTGATATGACAGCAGGATGATGATTTGTGTGCTCCATATGCTCATATCT 726	S.tuberosum	GATATGGATTTGATGATGATGATGATTTTCAATCGTGGACGATGAAAGGATG 1326	
R.idaeus	CATTCATACGTTTGAAGACTTCAGATTTCAACATTCAGAAACCTTCGCTGATAAATGGG 141	R.idaeus	AATTTGATGACAGCAGCAGCAGCTGCTGCTGCTGCTGCCCTTCCTTCAATTTAC 720	R.idaeus	GACATGGCTCATTTGATGACGATGAAAGGCTTCTCATTTGATGATTTAAAGGAGCTC 1320	
A.thaliana	CACGCTACATTTCCAAACACTCCGATTCGCCATTAAGCTTTCCTATCAAGCG 180	A.thaliana	AATTTTATTTCCAGCAGGATGAGCTCATCTGTTTGGCCAAAGTTTCAATCTAC 780	A.thaliana	GATTTGGATTTGCTGACGATGACGAGCTTTCATCGTGGATGATGAAAGGATCT 1380	
G.max	CCACGGGAGAGCTCTACAGTACAGAGGTTGAGCAGCCGCAAGAAAGTGGCGAGG 201	G.max	CTCTCAAACTCGTCTCTCTGTGGGTTGCGGAGGCTACCAATCTCCATCCGCC 789	G.max	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386	
A.fruticosa	CCACGGGAGAGCTGTACACCTACTATGAGTGGAACTCACCGCTAGAGAGTGGCTCT 192	A.fruticosa	GCTCTGAATTCATATCTGCTGTGTGGGTTGAGCAGCAAGGCTGATTTGCTGATGCC 768	A.fruticosa	CTCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386	
P.tomentosa	CGAAATGGAGACTTCTACACTTACAGTGGAGCTCAGCAGCAGAGAGTGGCTTCT 192	P.tomentosa	TCATCAATCTGCTGTTGCTGTGCTGCTGCTGCTGAGAACAGAGTACAGCTCCCT 828	P.tomentosa	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386	
S.tuberosum	CTACTGGCCAGACTCCACACTACCCAAATTAACACTCACCGCCGAAAGTGGCTCT 192	S.tuberosum	TCGCTGAACTGCTCTGCTATTCGGGTTAGAGGCTCCAGCTTCAATCTGATGACG 840	S.tuberosum	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386	
R.idaeus	CCACGGCCAGACTGTACACTTCCGACCTCCAGCTCCAGCTCCCGCCAAATCGCC 240	R.idaeus	AGTTGCGATTTAATCCCTGCTGCTGCTCTCATTCACAGAACAAAGTCACTTGGCCCT 849	R.idaeus	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386	
A.thaliana	CCACGGCCAGACTGTACACTTCCGACCTCCAGCTCCAGCTCCCGCCAAATCGCC 240	A.thaliana	A.fruticosa	AGTTGCGATTTAATCCCTGCTGCTGCTCTCATTCACAGAACAAAGTCACTTGGCCCT 849	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
G.max	GGGCTGAGAAAGAGGGGCTGGAACAGGGCCAGTTCATCATGCTCTCCCAATTCG 261	G.max	A.fruticosa	AGTTGCGATTTAATCCCTGCTGCTGCTCTCATTCACAGAACAAAGTCACTTGGCCCT 849	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
A.fruticosa	GGCTCTTACAGAGTGGTATTCACACAGGTCAGGCTCATGCTCTTCTACCAAGTTC 252	A.fruticosa	P.tomentosa	AGTTGCGATTTAATCCCTGCTGCTGCTCTCATTCACAGAACAAAGTCACTTGGCCCT 828	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
P.tomentosa	GGCTCTTACAGAGTGGTATTCACACAGGTCAGGCTCATGCTCTTCTACCAAGTTC 252	P.tomentosa	R.idaeus	AGTTGCGATTTAATCCCTGCTGCTGCTCTCATTCACAGAACAAAGTCACTTGGCCCT 846	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
S.tuberosum	GGCTCTTACAGAGTGGTATTCACACAGGTCAGGCTCATGCTCTTCTACCAAGTTC 270	S.tuberosum	R.idaeus	AGTTGCGATTTAATCCCTGCTGCTGCTCTCATTCACAGAACAAAGTCACTTGGCCCT 900	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
R.idaeus	GGCTCTTACAGAGTGGTATTCACACAGGTCAGGCTCATGCTCTTCTACCAAGTTC 261	R.idaeus	A.thaliana	GCTGCTCCCTCCATTTGCTGCCATTCACAAATCCAGCTTCCACAGTACAGACT 909	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
A.thaliana	AATTTTCCAAATCGGGTTAAACCAAAAGCGTGGCTGCTGCTTCCCTCCCAACTG 300	A.thaliana	A.fruticosa	ATTTGCCACACTGTGATGATGCTCAATGCTAAGCTCACTGATTTGACAGACTGAC 888	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
G.max	CCGAAATGGTTCCTGCTGTTTGGCGGATCCACCGGGGCTGCAATGCCATGCCCG 321	G.max	P.tomentosa	GTGTTGCCACACTGTGATGATGCTCAATGCTAAGCTCACTGATTTGACAGACTGAC 888	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
A.fruticosa	CCGAAATGGTTCCTGCTGTTTGGCGGATCCACCGGGGCTGCAATGCCATGCCCG 324	A.fruticosa	P.tomentosa	GTGTTGCCACACTGTGATGATGCTCAATGCTAAGCTCACTGATTTGACAGACTGAC 888	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
P.tomentosa	CCTGAATTCGTTCTGCTTTCAGCGGCTTCCACAGAGGTCCTATATCACTGCTGCC 312	P.tomentosa	R.idaeus	ATTTGCCACACTGTGATGATGCTCAATGCTAAGCTCACTGATTTGACAGACTGAC 906	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
S.tuberosum	CCTGAATTCGTTCTGCTTTCAGCGGCTTCCACAGAGGTCCTATATCACTGCTGCC 330	S.tuberosum	R.idaeus	ATTTGCCACACTGTGATGATGCTCAATGCTAAGCTCACTGATTTGACAGACTGAC 900	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
R.idaeus	TCCGATTCGTTCTGCTTTCAGCGGCTTCCACAGAGGTCCTATATCACTGCTGCC 312	R.idaeus	A.thaliana	ATGTTGCCCGGATTTGTTGGCAATTCGGAAGTTCGGAAGGAGGATGATATTG 960	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
A.thaliana	CCGAAATGGTTCCTGCTGTTTGGCGGATCCACCGGGGCTGCAATGCCATGCCCG 360	A.thaliana	G.max	TCTTCCATCAGAGTCTTGAAGTCCGGGGAGCCCTCGGTAAGAGCACTGAGACACT 969	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
G.max	AACCTTCTTCCACCCCGGAGGTTGAAAGCAAGCCATCCCTCCATGCAAGCTC 381	G.max	A.fruticosa	TCTTCCATCAGAGTCTTGAAGTCCGGGGAGCCCTCGGTAAGAGCACTGAGACACT 969	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
A.fruticosa	ARCCATTTCTCCACATCCGCTGAGATTCGAAACAGAGCCAAAGCTCCACACCAAGT 384	A.fruticosa	P.tomentosa	TCTTCTTGAAGTATGATATTCGAGGGGCTCTCTGGGCAAGAGCTGAGACACT 948	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
P.tomentosa	ATCTTCTTCTCCACCCGCGAGGTCGAAACAGAGCCAAAGCTCCACACCAAGT 372	P.tomentosa	S.tuberosum	TCATCAGTAAAGCAGTACTGCTGCTGCCACATTAAGAAAGAGGACTGAGACTG 966	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
S.tuberosum	AATCTTCTGTTTACACAGCAGGATGATGAAAGCAAGCCAAAGCTCAAGTGTAAAGT 390	S.tuberosum	R.idaeus	AGCTCCATAGAGTGTGGAATCTGGTCTGCTCCTCTTGTGAAGCACTGAGACTG 1020	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
R.idaeus	AACCTTCTTCTCCACCCGCGAGGATCCGAAACAGAGCCAAAGCTCCACACCAAGT 381	R.idaeus	A.thaliana	ATGTTGCCCGGATTTGTTGGCAATTCGGAAGTTCGGAAGGAGGATGATATTG 960	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
A.thaliana	ARCCCTTCTTCCACTCCGCGAGGATGCTAAACAGCCAAAGCTCCACACCAAGT 420	A.thaliana	G.max	TCTTCCATCAGAGTCTTGAAGTCCGGGGAGCCCTCGGTAAGAGCACTGAGACACT 969	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
G.max	CTCATCCAGCCGCTCTTACTACGCAAGTCAAGGACTCC-----GGCAGATC 432	G.max	A.fruticosa	CTCTCCATCAGAGTCTTGAAGTCCGGGGAGCCCTCGGTAAGAGCACTGAGACACT 969	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
A.fruticosa	CTTATAACACAGCTTCTTACTACGCAAGGTTAAGGATTTG-----GATGTC 432	A.fruticosa	P.tomentosa	GTAGGCGCTAAATCCCAAGGCAAACTTGCAGGATGACGAGTACGAGTACGAGCAGG 1008	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
P.tomentosa	CTGATAACACAGCTTCTTACTACGCAAGGTTAAGGATTTG-----GATGTC 432	P.tomentosa	R.idaeus	GTAGGCGCTAAATCCCAAGGCAAACTTGCAGGATGACGAGTACGAGTACGAGCAGG 1008	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
S.tuberosum	GTATACCAACAGCTTGTGTCGGGAAAGTGAAGGCTACCGCAATGAAATGATTTG 450	S.tuberosum	R.idaeus	GTAGGCGCTAAATCCCAAGGCAAACTTGCAGGATGACGAGTACGAGTACGAGCAGG 1026	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
R.idaeus	ATCATCACTTCCGCTTCTTACTACGCAAGTAAAA-----GACTATCATG-----CGAAGGTC 438	R.idaeus	A.thaliana	GTAGGCGCTAAATTTCCCAATGTCACACTCGTCCAGGATGATGAAAGTACAGAGCAGG 1020	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
A.thaliana	ATATCCAGAGGCTGCTTACTCCGCAAAATCAACCTTCCAAACAGCAGCGAGTGA 480	A.thaliana	G.max	GTATATCCAGGATTTGCTTATGCTGCAATCCGCTGAGGATGACGAGTACGAGTACG 1080	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
G.max	AACTCGTATTCGTCGACTTGTGCCCTCATACAGAGGAAAGCAGCATCTCCACTT 492	G.max	A.fruticosa	CCCTGCTAAACATGCTTTAGCTTTTCTGAAGAGGATAGACTAGACTGAAACAGGTCGA 1089	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
A.fruticosa	AACTCGTATTCGTCGACTTGTGCCCTCATACAGAGGAAAGCAGCATCTCCACTT 477	A.fruticosa	P.tomentosa	CCAGTCTTAAACATGCTTTAGCTTTTCTGAAGAGGATAGACTGAAACAGGTCGA 1068	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
P.tomentosa	AACTCGTATTCGTCGACTTGTGCCCTCATACAGAGGAAAGCAGCATCTCCACTT 477	P.tomentosa	S.tuberosum	CCTGCTGGGATGTGTTTGGCATTTCCGAAAGAGGCTTTGATATTTAAATTTAAAT 1086	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
S.tuberosum	AACTCGTATTCGTCGACTTGTGCCCTCATACAGAGGAAAGCAGCATCTCCACTT 495	S.tuberosum	R.idaeus	CCGGTGTGACATGCTTGGCATTTCCAAAGAGCCCTTCGAGGTAAGCAGGCTGG 1140	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
R.idaeus	AACTCGTATTCGTCGACTTGTGCCCTCATACAGAGGAAAGCAGCATCTCCACTT 489	R.idaeus	A.thaliana	CCAGTCTTAAACATGCTTTAGCTTTTCTGAAGAGGATAGACTGAAACAGGTCGA 1140	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
A.thaliana	AGTTGATGTCGATGAC-----TCCGCGCAGCTGAGCTGCTGCTTCACTT 449	A.thaliana	G.max	TTGATGATGCTTGGATGAGATGACGATGATGCTGATCTGACAGGCTGATCT 1149	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
G.max	TCACATCTGCTGAGGTAAGCGTACG-----CTGATGTTGATGTTGAT-----GTTGATACAG 549	G.max	A.fruticosa	TTGGAACCGTTTGAAGATGACGATGATGATGCTGATCTGACAGGCTGATCT 1128	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
A.fruticosa	TCACATCTGCTGAGGTAAGCGTACG-----GATGAGA-----GTGACAGC 528	A.fruticosa	P.tomentosa	TTGGAACCGTTTGAAGATGACGATGATGATGCTGATCTGACAGGCTGATCT 1149	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
P.tomentosa	TCACATCTGCTGAGGTAAGCGC-----GACGAAAC-----ATGAGG 528	P.tomentosa	R.idaeus	TTGGAACCGTTTGAAGATGACGATGATGATGCTGATCTGACAGGCTGATCT 1128	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
S.tuberosum	TCCGAATGTTCAATCC-----GACGAAAC-----GCTGAT-----GTGAAATCCG 546	S.tuberosum	R.idaeus	TTGGAACCGTTTGAAGATGACGATGATGATGCTGATCTGACAGGCTGATCT 1146	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
R.idaeus	TCCGACTGCTGACTGCT-----AGACAGAA-----ACGAGCTGCGGAT-----GTGCAATCCG 540	R.idaeus	A.thaliana	TTGGAACCGTTTGAAGATGACGATGATGATGCTGATCTGACAGGCTGATCT 1140	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386
A.thaliana	ACCGATTTGACTGCTGCAACCCGGGATCCGAGTCTGACTGCTGGGAGTTTCA 600	A.thaliana	G.max	TTGGAACCGTTTGAAGATGACGATGATGATGCTGATCTGACAGGCTGATCT 1200	A.thaliana	ATCAAAATCCAGAGGTTCAAGTGGCCCTGCCAGCTTGAAGCTTCTTCAATCCAC 1386

Fig.3.2

Allineamento di sequenze nucleotidiche di diverse specie vegetali codificanti per il gene *4cl* (4-coumarato:CoA-ligasi). In giallo sono evidenziate le zone altamente conservate sulle quali sono stati disegnati i primer per le reazioni di amplificazione di DNA e cDNA.

L. esculentum	-----ATGC--CGTCAGTCTCCGGTCGGGTC	24	L. esculentum	GCACGCTGGGATGAGGCGAGGGAGAAAGGAGTTGATTAGTCGGCATAAATCCAGTGTG	558
S. tuberosum	-----ATGC--CATCAGAAATCCGGCAAAGTT	24	S. tuberosum	ACAGCATGGGATGAGGCAAGGAAAAAGGAGTGGATTGGTGGTATCAATCCAGTGTG	558
P. tremuloides	-----ATGCCTGTGATGCTTCATCACTTTCAAGCCAAAGGC	36	P. tremuloides	GCTGCAATGGGATATGGCTAAGGAGAAAGGGGTGGACCTAGTGTGGTTAACCAGTGTG	573
A. thaliana	-----ATGCCTGTGATGCTTCATCACTTTCAAGCCAAAGGC	36	A. thaliana	GCCTGTGGGAGACGAAAGGAGAAAGGTTGACTTGGTGGTGTGAATCCGGTGGT	570
E. globules	-----ATGCCTGTGATGCTTCATCACTTTCAAGCCAAAGGC	36	E. globules	GCCTGTGGGAGACGAAAGGAGAAAGGTTGACTTGGTGGTGTGAATCCGGTGGT	568
L. perenne	ATGACTGTGTCACACCCG-----TCGGCAGCAACTGCTGGCCATGGGACAGC	51	L. perenne	CTGCTGTGGGAGCAGCCAGAAAGCGTGGCATCGACTCGTTGTGTGAACCTGTGCT	588
H. vulgare	ATGACCTGTGTCACACCCGCGCCGCGCTGCGCAGAGAGTCTGGGATGTC	60	H. vulgare	CGCCGTGGGAGAAAGGCGAGGCGCGCGCTGGACCTGGTGGTGGTGAACCCGGTGGT	597

L. esculentum	---GTCTGTGTACCGTGCCGGAGGCTTCATCGCCTTGTGGCTGTTAAACTTCTTTTG	81	L. esculentum	GTGCTGTGACCATTGCTACAAAATACTGTGAATGCTAGTGTCTTCATATCTCAAAGTAC	618
S. tuberosum	---GTTTGTGTACCGGCGCCGAGGTTTCACTGGCTTGTGGCTGTTAAACTTCTTTA	81	S. tuberosum	GTGCTGTGACCATTGCTTCAACCAACAGTGAATGCTAGTGTCTTCATATCTCAAAGTAC	618
P. tremuloides	CAAACCTGTGTACCGGCGCTGGTGGTTTCACTGGCTTGTGGATGTTAAACTTCTTTA	96	P. tremuloides	GTGCTGGACCAATTGTCCAGCCACTGCAATGCTAGCATCGTTCACATCTCAAAGTAC	633
A. thaliana	---GCTTGGCTCACCGGAGCTGGTGGATACATCGCTTCTGGATTGTTAAGATACTTCTC	93	A. thaliana	GTTCCTGGACCGCCATTACAGCCAACGATCAACGCCAGTCTTACCACGTCTCAAAGTAC	630
E. globules	---GCTTGGCTCACCGGCGCCGCGGCTTCATCGCCTTGTGGATTGTCAAAGCTGCTCTC	92	E. globules	GTGCTGTGACCCTTTCAGTGCAGATCAATCGGAGCATCATCCACATCTCAAAGTAC	628
L. perenne	---GTGTGTGTACCGGCGCTGCGGATACATCGCCTTGTGGCTGCTCAAAGCTGCTCTC	108	L. perenne	GTGCTGGGCGCTGCTGACGCGAGCGTGAACGCCAGCGCCGACATCTCAAAGTAC	648
H. vulgare	---GTGTGTGTACCGGCGCCGCGGATACATCGCCTTGTGGCTGCTCAAAGCTGCTCTC	117	H. vulgare	GTGCTGGGCGCTGCTGACGCGAGCGTGAACGCCAGCGCCGACATCTCAAAGTAC	657

L. esculentum	GAAAAAGGCTACATGTTAGGGAACCTGAAGAAATCCGTATGATCCAAAAGATTGTCA	141	L. esculentum	CTTACTGGCTCAGCTAAAACATATGCTAATTCAGTTCACAGTATGTACATGTTAAGGAT	678
S. tuberosum	GAAAAAGGCTACATGTTAGGGAACCTGAAGAAATCCGTATGATCCAAAAGATTGTCA	141	S. tuberosum	CTAATGGCTCTGCTAAAACATATGCTAATTCAGGCGTATGTTCAATGTTAAGGAT	678
P. tremuloides	GATAAAGGTTACATGTTAGGGAACCTGCGAAGAACCTGATGATCCAAAATTAATCTAC	156	P. tremuloides	CTACCGGCTCAGCCAAAGCTTATGCTAATCTGTTCAAGCTATGTGATGTTAAGGAT	693
A. thaliana	GAGAGAGTTACACAGTAAAGAAACCGTACGGAATCCAGATGTCACGAAGAACACAT	153	A. thaliana	CTAACCGGCTCGGTAAGACTTATGCTAATTTGACTCAAGCTATGTGGATGTTCCGGAT	690
E. globules	GAGGAGGTTACACCGTGGCAGGAACCTGTCAGGAACCCAGCAGCCGGAAGATGGGAT	152	E. globules	TGATGTGCTCAGCCAAAGCTTACGCCAATCGGTCAGGCGCTGCTGACAGTCAAGGAC	688
L. perenne	GAGAGAGTTACACCGTGAAGGCAACAGTGAAGAACCCAGATGATCCAAAAGACGCTCAC	168	L. perenne	CTCAGCGCTCGGCCAAGAAAGTATGCCAACCGCTGACGTCATACGTGGACCTCGGAT	708
H. vulgare	GAGAGGCTCACCGTGAAGGCAACAGTGAAGAACCCAGATGATCCAAAAGACGCTCAC	177	H. vulgare	CTCAGCGCTCGGCCAAGAAAGTATGCCAACCGCTGACGCTGACGTGACGTGCGGAC	717

L. esculentum	TTGAGAGAACTGAAGGAGCAAAAGAGAGGTTAACTATGCAAGAGGTGATCTTCTTGT	201	L. esculentum	GTGGCTTAGCTCACAATCTTCTTATGAAACTCTTCAAGCTCAGGACCTTACCTCTGT	738
S. tuberosum	TTGAGAGAACTGAAGGAGCAAAAGAGAGGTTAACTATGCAAGAGGTGATCTTCTTGT	201	S. tuberosum	GTGGCCTAGCCACATCTTCTTATGAACTCTTCAAGCTCAGGACCTTACCTCTGT	738
P. tremuloides	TTGAGAGAACTGAAGGAGCAAAAGAGAGGTTAACTATGCAAGAGGTGATCTTCTTGT	216	P. tremuloides	GTGGCCTAGCCACATCTTATGCTTGTGAGCGCTTCCGCTCGGCGCTTACCTTTG	753
A. thaliana	TTGAGAGAACTGAAGGAGCAAAAGAGAGGTTAACTATGCAAGAGGTGATCTTCTTGT	213	A. thaliana	GTGCGCTGGCTATGTTGTGCTATGAGGCGCTTCCGCGCTCGGACCTTATCTCTG	750
E. globules	CTGAGAGACTTGAAGAGCCAGCAGAGGCTGACGCTGTACAGGCTGATCTGTGAGC	212	E. globules	GTGCGCTTGGCCACGCTCTTGTCTTGGAGCCCACTAGGCGCTTATTTGCTG	748
L. perenne	CTGAGGCGTGGACGGCGCGTGGAGGCTGATCTCTGCAAGGCCAGCTCTCTGAC	228	L. perenne	GTAGCGGACGGCCATCCGCTGTTGAGGCGCGCGAGGCGCTCGGCGGCTTACCTG	768
H. vulgare	CTGAGGCGTGGACGGCGCGCGAGGCTGGTCTCTGCAAGGCCAGCTCTCTGAC	237	H. vulgare	GTGCGCGCGCGCCATCCGCTTTCGAGGCGCGCGAGGCGCTCGGCGCTTACCTG	777

L. esculentum	TATCAGAGTTGCGTGAAGCAATCAATGGCTGTGCGGAGTTTCCACACAGCTTACCA	261	L. esculentum	GCTGAGAGTGTGCTTCACTCGGG	798
S. tuberosum	TATCAGAGTTGAGAGAAAGCAATTAATGGCTGTGCGGAGTTTCCACACAGCTTACCA	261	S. tuberosum	GCTGAGAGCTTCTTCACTCGGG	813
P. tremuloides	TATGAGTCTTAAAGAGGTAATCAAGGTTGATGTTTCCACACTGCTTCTCTCC	276	P. tremuloides	TCTGAGAGGTTTCTCACTCGGG	798
A. thaliana	TACGAGGCTTAAAGGCGGATTTGATGGTGTGCGAGCGGCTTTCACACAGCTTCTCTC	273	A. thaliana	GCCGAGAGTGTGCTTCACTCGGG	810
E. globules	TACGAGGCTTGAAGAGAAAGCAATCAAGGTTGTCGACGCGCTTTCACACAGCTTCTC	272	E. globules	GCCGAGAGCTTCTTCACTCGGG	808
L. perenne	TATGATGCTATGCGCCCGCGAGGCTGCTGCTGCTTCCACACTGCTTCTCTCC	288	L. perenne	GCCGAGGCTTCTTCACTCGGG	828
H. vulgare	TACGAGGCTTCTGCGGCGGCTGAGGCTTCCACAGCTTTCACACAGCTTCTCTCC	297	H. vulgare	GCCGAGGCTTCTTCACTCGGG	837

L. esculentum	GTACTGATGATCCGAAACAAATGGTGGAGCCAGCG	321	L. esculentum	TATCCATCCCCACAAGTGTTCGGATGTGACGAGCCAAAGGTTAAACCATACAAATTC	858
S. tuberosum	GTCACGTATGATCCGAAACAAATGGTGGAGCCAGCG	321	S. tuberosum	TATCCAACTACCTACCAAGTGTTCGGATGAAACGAGCCAAAGGCAAAACCTGCAAAATTC	858
P. tremuloides	GTCACAGATGATCCGAAACAAATGGTGGAGCCAGCG	336	P. tremuloides	TACCCATCCCTACCAAGTGTTCAGATGAGAAGAACCAAGAAACACCTTACAAATTC	873
A. thaliana	GTCACAGATGATCCGAAACAAATGGTGGAGCCAGCG	333	A. thaliana	TATCCTCTTCGACCAAGTGCAGGAGCAGAAAGAACCTTAGAGCCAAAGCCATACAAATTC	870
E. globules	GTCACAGATGATCCGAAACAAATGGTGGAGCCAGCG	332	E. globules	TATAAAGTACCCACAAGTGTCTGATGAGGTGAACCAAGGTTAAACCATACAAATTC	868
L. perenne	GTCACAGATGATCCGAAACAAATGGTGGAGCCAGCG	348	L. perenne	TACCTGTGCCACAAGTGTCTGACGAAAGTGAACCAAGGAGCAGCTTACAAATTC	888
H. vulgare	GTCACAGATGATCCGAAACAAATGGTGGAGCCAGCG	357	H. vulgare	TACCCGCTCCACAAGTGTCTGACGAGGTGAACCAAGGAGCAGCTTACAAATTC	897

L. esculentum	ACAGCAGCAGCAGAGCCAA--TGTAAAGCGGTTGTGTTACTTCCCTAATTTGAGGCT	378	L. esculentum	TCAAACCAAAATTTGAGGATTTGGGATGAAATTTACACCACTGAACAAATGCTTAT	918
S. tuberosum	ACAGCAGCAGCAGAGCCAA--AGTGGAGAGTGTGTTACTTCCCTAATTTGAGGCT	378	S. tuberosum	ACCAACCAAAAGTAAAGGACTTGGGTTGGGTTTACCCCACTGAACAGTGTCTTAT	918
P. tremuloides	ATTGCGCGGCTGAGGCCAA--AGTCCAGCAGATGTTGTTACTTCCCTAATTTGAGGCT	393	P. tremuloides	TCAAACCAAAAGTAAAGGACTTGGGTTGGGTTTACCCCACTGAACAGTGTCTTAT	933
A. thaliana	AATGCTGCGGCTGAGGCCAA--GTTCAAGCGGTTGTTCATCCTCTTCAATTTGAGGCT	390	A. thaliana	ACTAACCAAGATTAAGGACTTAGGCTTAGGTTCACTCCCAAGCAAGCAGCTCTAC	930
E. globules	GTCGACAGCGGAGAGCCAA--GTTCCGCGGTTGTGTTACTTCCCTAATTTGAGGCT	389	E. globules	TCAAACCAAGTAAAGGACTTGGGTTGGGTTTACCCCACTGAACAGTGTCTTAT	928
L. perenne	AACGACGCGGAGTGCAGAACGGTGCAGCGGTTGTGTTACTTCCCTAATTTGAGGCT	408	L. perenne	TCAAACCAAGTAAAGGACTTGGGTTGGGTTTACCCCACTGAACAGTGTCTTAT	948
H. vulgare	GACGCGCGGAGAGCCGAGCCAGTGCAGCGGTTGTGTTACTTCCCTAATTTGAGGCT	417	H. vulgare	TCAAACCAAGTAAAGGACTTGGGTTGGGTTTACCCCACTGAACAGTGTCTTAT	957

L. esculentum	GTGTACATGGACCCAGCAGAGCCCTGAAAAAGTGGTGGAGAGACTTGTGGAGGAT	438	L. esculentum	GAGACAGTGAAGAGTCTACAAGAAAGGTCACCTT-----CCAATTTCAACTCAA	969
S. tuberosum	GTATACATGGACCCAAACCGGCGCCGGATAAAGTTGGAGAGACTTGTGGAGGAT	438	S. tuberosum	GAGACAGTGAAGAGTCTGACAGGAGAAAGGTCACCTT-----CCAATTTCAACTCAA	969
P. tremuloides	GTGTACATGGACCCAAACCGGCGCCGGATAAAGTTGGAGAGACTTGTGGAGGAT	453	P. tremuloides	GAAACTTTAAGAGCTTGCAGGAAAGGAGTACCTT-----CCAATTTCAACTCAA	984
A. thaliana	GTGTACATGGACCCAAACCGGCGCCGGATAAAGTTGGAGAGACTTGTGGAGGAT	450	A. thaliana	GACACGCTCAAGAGCTTACAGGAGAAAGGTCACCTT-----CGGCTCTCCCTTCA	990
E. globules	GTACCAATGGACCCAAACCGGCGCCGGATAAAGTTGGAGAGACTTGTGGAGGAT	449	E. globules	GAAACTTTAAGAGCTTGCAGGAGAAAGGTCACCTA-----CGGCTCTCCCTC	979
L. perenne	GTCACCAATGGACCCAAACCGGCGCCGGATAAAGTTGGAGAGACTTGTGGAGGAT	468	L. perenne	GAGACGCTCAAGAGCTTCCAGGAGAAAGGTCACCTC-----CTAGTACCAACCAA	999
H. vulgare	GTCACCAATGGACCCAAACCGGCGCCGGATAAAGTTGGAGAGACTTGTGGAGGAT	477	H. vulgare	GAGACGCTCAAGAGCTTCCAGGAGAAAGGTCACCTC-----CGGCTCTCCCTC	1008

L. esculentum	CTGTGATTTTGAAGAACTAAGAATTTGGTATTGTTATGGAAGTGGTGGCAGAAACA	498	L. esculentum	AAGG--ACGAAATTTGCAATTCAGACTTAG-----999	999
S. tuberosum	CTGTGATTTTGAAGAACTAAGAATTTGGTATTGTTATGGAAGTGGTGGCAGAAACA	498	S. tuberosum	AATG--ATGAACTTAAATTTCACTCTTAA-----999	999
P. tremuloides	CTGTGATTTTGAAGAACTAAGAATTTGGTATTGTTATGGAAGTGGTGGCAGAAACA	513	P. tremuloides	GCTGAGAAAGTCTGTGAAATTTCAATA-----1014	1014
A. thaliana	CTGTGATTTTGAAGAACTAAGAATTTGGTATTGTTATGGAAGTGGTGGCAGAAACA	510	A. thaliana	GCATCGCAAGAACTCGGAAATGGCAATTAAGATCGGCTTGA	1035
E. globules	CTCGAATTTTGAAGAACTAAGAATTTGGTATTGTTATGGAAGTGGTGGCAGAAACA	508	E. globules	CCGG--AAGATTCGGTGGTATTCAGGATGA-----1009	1009
L. perenne	CTCGAATTTTGAAGAACTAAGAATTTGGTATTGTTATGGAAGTGGTGGCAGAAACA	528	L. perenne	AATATC--CAGAGGATGAAACGGTGAACCGCATGA-----1035	1035
H. vulgare	CTGTGATTTTGAAGAACTAAGAATTTGGTATTGTTATGGAAGTGGTGGCAGAAACA	537	H. vulgare	GATATCTTCGACCAAGCTGGACGGTGAACCGGTA-----1047	1047

Fig. 3.3 Allineamento di sequenze nucleotidiche di diverse specie vegetali codificanti per il gene *ccr* (cinnamil-CoA ossidoreduttasi). In giallo sono evidenziate le zone altamente conservate sulle quali sono stati disegnati i primer per le reazioni di amplificazione di DNA e cDNA.

```

O.sativa          ATGGGCAGCCTCGCCGCGGAGAACCCGTACCAGGTTGGGCGCCGAGGAGCGCTCCGGC 60
L.usitatissimum -----
A.thaliana       ATGGGAATAATGGAGGCGAGAGGAAAACAACAGCGCTGGCGTCCAGAGACCCATCTGGG 60
C.capsularis     -TGGCAGCTCTGAAACTGAAAGAAAGATTGTGGGATGGGCGCGGACCGATTCTACAGCG 59
P.abies          ATGGGAAGCTTGGAACTGAAAAAACTGTTACAGGATATGCAGCTGGGACTCCAGTGGC 60

O.sativa          CACCTCACCCCTACAACCTACACCTCAGGAAGACTGGGCGCTGAAGATGTGGTGGTGAAG 120
L.usitatissimum -----CTCAGAAACCTGAGAACTGAGGATCTGTTCAATAA 35
A.thaliana       ATCCCTCTCCCTTACACTTACACTCTTAGAGACACTGGACAGAGACTGTGAACATAAGA 120
C.capsularis     ACCCTTGCCTCTTACACTTATTCATTAAAGACACAGCTCCGAGGATGTGATATCAA 119
P.abies          CATTGTCCCTTACACTTACACTCTCAGGAACAAAGACTGTAGGATGCTCATAGTAAG 120

O.sativa          GTTTGTATTGTGGTATCTGCACATACTGACATCCACCAGGCAAGAACCCTTGGTGCT 180
L.usitatissimum -----ATCATGAGGAGGAGGATCTGTTCAATAA 35
A.thaliana       ATCATTGTGTGGAACTGCACACCCGATCTTCAATCAAATAAAATGATGCTTTGGCATG 180
C.capsularis     GTGATAAGTTGTGGGATGCCATACGGATATTCACCAATAAAGAAAGACTTGGGCTG 179
P.abies          GTCAATTACTGTGGAACTGCACACTGACTTGTGTTAGTAAACAGAAATGGTAAG 180

O.sativa          TCCAAGTACCCCATGGTCCCTGGCCATGAGGTTGGTGGGAGGTTGGAGTTCGGGCG 240
L.usitatissimum -----TCTCGTACCCCATGGTTCCTGGGCAATGAAATGGTTGGGAGGCAATGGAAGTGGGCTG 156
A.thaliana       TCTAATTACCCCATGGTTCCTGGGCAATGAAAGTGGTAGGGGAATAGTGGAGTGGGATCA 240
C.capsularis     TCTCAATACCCCATGGTTCCTGGGCAATGAAAGTGGTAGGGAGGTTGGGAGTTCGGCT 239
P.abies          TCTAATTACCCCATGGTTCCTGGGCAATGAAAGTGGTAGGGAGTGGTAAACAGAGATTGGTAAG 240

O.sativa          GAGGTGACCAAGTACAGCGCCGGCAGCTCGTCGGCGTCCGGCTCATCGTCCGCTCTG 300
L.usitatissimum -----GAGGTGACCAAGTTCAAAACCGGAGACATAGTCGGGCTCGGACTCCTTGTCCGATGCTGC 216
A.thaliana       GATGTGACCAAGTTCACCCGTAGGGGACATAGTGGGATGGTTCGCTCGTGGATGTGC 300
C.capsularis     GATGTGACTAAAATTCACCGTGGGATGTTTCGGGTTGGGGTTCATCGTGGATG--- 296
P.abies          GAGGTGAAAGAAATTCAAAAGTGGGAGACATGTAGGGGTTGGTTCGATGTTGGGCTGCT 300

O.sativa          CGCAGTGCCATCCGTGCAAGCCAAATGTGAGACAGTACTGCAACAAGAGGATTTGGTCC 360
L.usitatissimum -----CGGAGCTGCCCGCATGTGATGCTGACATCGAGCACTACTGCAACAAGAAATCTGGTCC 276
A.thaliana       GGAGTGTGAGCCCTCGCAGAGAGATCTGGAACAGTATTGTCCAAAGAAATTTGGAGC 360
C.capsularis     AAGAATGTGACCCCTTGAAGATGAAATGAGCAATATTGTAACAAGAAATTTGGTCT 356
P.abies          CGCAGTGCAGTAACTGCAATGGCAGCATGGAACAATACTGCAGCAAGAGGATTTGGACC 360

O.sativa          TACAACGACGCTACACCGACGGCGGCAACCCAGGGCGGCTTCGCTCCGCGCATGGTC 420
L.usitatissimum -----TACAACGACGCTACACCGACGGGAAACCAACTCAAGGAGGCTTCGCGGATCGATGGTT 336
A.thaliana       TACAATGATGTTTACATCAATGGTCAACTACACAAGGGCGGCTTCGCTAAAGCCACCTC 420
C.capsularis     TACAGTGATGCTACACTGATGGCAACCCACTCAAGGTTGGCTTTGCTGCCTCCATGZGTC 416
P.abies          TACAATGATGAAACATGACGGCACCCCTACTCAAGGAGGATTTGCCAGCAGTATGGTG 420

O.sativa          GTCGACCAGAAGTTTGTGGTGAAGATCCCGCGCGGCTAGCAGCGGAGCAGGCGGCGCG 480
L.usitatissimum -----GTCGACCAGAAGTTTGTAGTGAAGATCCCAAGAGGATGTGCCCCGAGCAAGCAGCTCT 396
A.thaliana       GTTCACAAAAGTTTGTGGTCAAGATTCCAGAAGGAAATGGCGGTGAGCAGGCTGCGCGC 480
C.capsularis     GTCGATCAAAGTTTGTGGTGAAGATCCCTGATGGAATGGCAGCAGAAAGAGTGGCTCCA 476
P.abies          GTTGTATCAGATGTTTGTGGTTCGAATCCCGGAGAATCTACTCTGGAACAAGCAGCCCT 480

O.sativa          CTGCTGTGCGCGGGCTGACGGTGTACAGCCCACTGAAGCACTTCGGGCTGATGTGCCA 540
L.usitatissimum -----TTGCTATGCGCAGGGGTGACGGTTTACAGTCCCGTGAACCACTTCGGGCTGAAGAAGT 456
A.thaliana       CTACTGTGCGCTGGTGTACTGTGTACAGTCCACTGAGCCCTTTGGTCTGAACAAACA 540
C.capsularis     CTCTTGTGCTGGTGTGACACTTTACAGCCCACTGAAACACTTTGGTCTAATGGAGAGT 536
P.abies          CTGTTATGTGACGGGTTACAGTTTACAGCCCAATGAACATTTCCGCAATGACAGGCT 540

O.sativa          GGTCTCCGCGGCGGCTCTGGGCTCGGCGGCTGGGCGACATGGGCGTGAAGGTGGCC 600
L.usitatissimum -----GGTCTGAAAAGGAGCGATCTTGGGCTAGGAGGCTTGGGCGACATGGGAGTGAAGATTCC 516
A.thaliana       GGCCTAAGAGGAGGTACTAGGGTTAGTGGATCGGCTCACATGGGTGTGAAAATAGCC 600
C.capsularis     GGGTTAAGAGGAGGGATTTGGGCTTGGAGGATAGGTCACATGGGTGTGAAGATGCA 596
P.abies          GGAAGAAATGTGGGATATTGGGTTAGGAGGCTGGGCGACATGGGTGTCAAGATTGCC 600

O.sativa          AATCGATGGGCGACCACTGACGGTGTACAGTCTGTCGGCGGAGGAAAGCGCGCAGGCC 660
L.usitatissimum -----AAAGCAATGGGACCACTGTGACTGTAATAGCTCCTCTGTAAGAAAAGGTTGAAGCA 576
A.thaliana       AAAGCAATGGGTCACCACTGTGACTGTCAAGCTCATCAACAAGAAAGAGAGAGAGGCA 660
C.capsularis     AAGGCTATGGGTCAC---GTGACTGTCAATAGCAGTAGCATAAAAAGAGAGAGAGGCA 653
P.abies          AAAGCCTTTGGGCTCACGTGACAGTCAAGCTGCTGTAAGAAAGAAAGAAAGGCC 660

```

Fig. 3.4 Allineamento di sequenze nucleotidiche di diverse specie vegetali codificanti per il gene *cad* (cinnamil-alcool-deidrogenasi). In giallo sono evidenziate le zone altamente conservate sulle quali sono stati disegnati i primer per le reazioni di amplificazione di DNA e cDNA

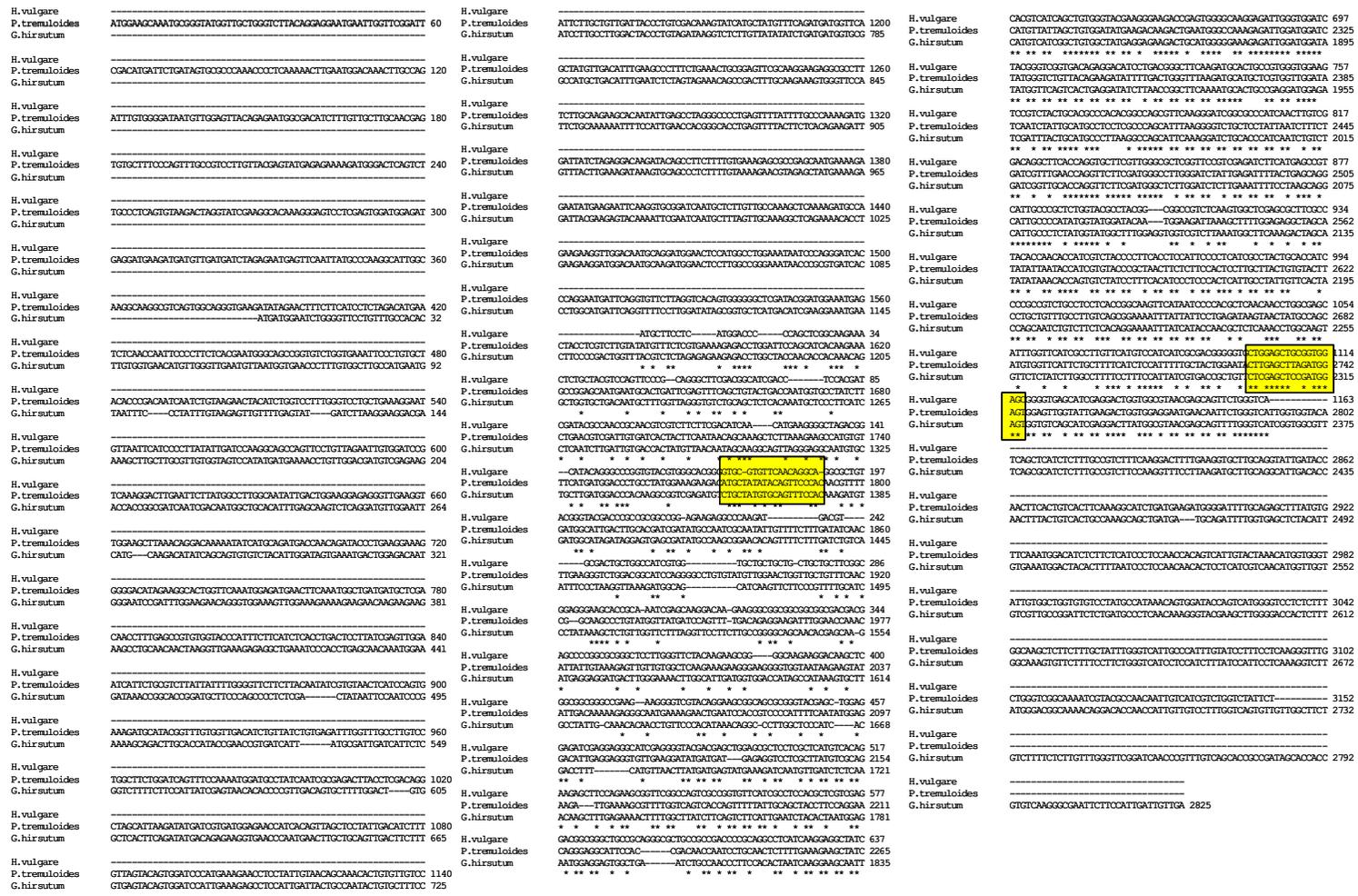


Fig. 3.5

Allineamento di sequenze nucleotidiche di diverse specie vegetali codificanti per il gene *CeSA* (cellulosa sintasi). In giallo sono evidenziate le zone altamente conservate sulle quali sono stati disegnati i primer per le reazioni di amplificazione di DNA e cDNA

G.hirsutum ATGGCCGACGCTGAGGATATTCACCCCTCGTCTGTGATAATGGAACCTGGATGGTGAAG 60
 T.pratense ATGCTCGATCGTAGGATATTCACCCCTGTTTGTGACAAATGGAACCTGGATGGTGAAG 60
 S.asiatica ATGGCAGGACGAGGATATTCACCCCTGTTTGTGACAAATGGAACCTGGATGGTGAAG 60
 A.thaliana ATGGCTGAGGCTGATATTCACCCCTGTTTGTGACAAATGGAACCTGGATGGTGAAG 60
 Phalaenopsis ATGGCGGACGCTGATATTCACCCCTGTTTGTGACAAATGGAACCTGGATGGTGAAG 60
 H.vulgare ATGGCGGACGCTGATATTCACCCCTGTTTGTGACAAATGGAACCTGGATGGTGAAG 60
 N.tabacum ATGGCGGACGCTGATATTCACCCCTGTTTGTGACAAATGGAACCTGGATGGTGAAG 60
 A.phyllitidis ATGGCGGACGCTGATATTCACCCCTGTTTGTGACAAATGGAACCTGGATGGTGAAG 60
 * * * * *

G.hirsutum GCCGGTTTGTGATGATGCTCCAGGCGAGTTTCCAGATGCTGGTGGTCC 120
 T.pratense GCCGGATTGCTGATGATGCTCCAGGCGAGTTTCCAGATGCTGGTGGTCC 120
 S.asiatica GCTGATTGCTGATGATGCTCCAGGCGAGTTTCCAGATGCTGGTGGTCC 120
 A.thaliana GCTGATTGCTGATGATGCTCCAGGCGAGTTTCCAGATGCTGGTGGTCC 120
 Phalaenopsis GCTGATTGCTGATGATGCTCCAGGCGAGTTTCCAGATGCTGGTGGTCC 120
 H.vulgare GCTGATTGCTGATGATGCTCCAGGCGAGTTTCCAGATGCTGGTGGTCC 120
 N.tabacum GCTGATTGCTGATGATGCTCCAGGCGAGTTTCCAGATGCTGGTGGTCC 120
 A.phyllitidis GCTGATTGCTGATGATGCTCCAGGCGAGTTTCCAGATGCTGGTGGTCC 120
 * * * * *

G.hirsutum CGGCACACTGGTGTATGTTGGATGGGTCGAAAGGATGCCTATGTAGGAGATGAAGCA 180
 T.pratense CGCTCAACCGTGTATGTTGGATGGGTCGAAAGGATGCCTATGTAGGAGATGAAGCA 180
 S.asiatica CGACACACTGGTGTATGTTGGATGGGTCGAAAGGATGCCTATGTAGGAGATGAAGCA 180
 A.thaliana AGCATCATGGTGTATGTTGGATGGGTCGAAAGGATGCATATGTTGGATGAAGCA 180
 Phalaenopsis CGTCACACTGGTGTATGTTGGATGGGTCGAAAGGATGCCTATGTAGGAGATGAAGCA 180
 H.vulgare CGGCACACTGGTGTATGTTGGATGGGTCGAAAGGATGCCTATGTAGGAGATGAAGCA 180
 N.tabacum CGACACACTGGTGTATGTTGGATGGGTCGAAAGGATGCATATGTTGGATGAAGCA 180
 A.phyllitidis CGCATACTGGTGTATGTTGGATGGGTCGAAAGGATGCATATGTTGGATGAAGCA 180
 * * * * *

G.hirsutum CAATCTAAAAGAGGTATCTTCACTTGAATATCTCATGACGATGATTCAGCAC 240
 T.pratense CAATCAAAAAGAGGTATCTTCACTTCAAGTACCCCAATGAGCATGATTCAGCAC 240
 S.asiatica CAATCAAAAAGAGGTATCTTCACTTCAAGTACCCCAATGAGCATGATTCAGCAC 240
 A.thaliana CAATCAAAAAGAGGTATCTTCACTTGAATATCTCATGACGATGATTCAGCAC 240
 Phalaenopsis CAATCTAAAAGAGGTATCTTCACTTGAATATCTCATGACGATGATTCAGCAC 240
 H.vulgare CAGTCCAAAAGAGGTATCTTCACTTGAATATCTCATGACGATGATTCAGCAC 240
 N.tabacum CAGTCCAAAAGAGGTATCTTCACTTGAATATCTCATGACGATGATTCAGCAC 240
 A.phyllitidis CAATCAAAAAGAGGTATCTTCACTTGAATATCTCATGACGATGATTCAGCAC 240
 * * * * *

G.hirsutum TGGGATGATATGAAAGATGCGCATACATCTTACAAAGCAATCGCTGTGCTCT 300
 T.pratense TGGGATGATATGAAAGATGCGCATACATCTTACAAAGCAATCGCTGTGCTCT 300
 S.asiatica TGGGATGATATGAAAGATGCGCATACATCTTACAAAGCAATCGCTGTGCTCT 300
 A.thaliana TGGGATGATATGAAAGATGCGCATACATCTTACAAAGCAATCGCTGTGCTCT 300
 Phalaenopsis TGGGATGATATGAAAGATGCGCATACATCTTACAAAGCAATCGCTGTGCTCT 300
 H.vulgare TGGGATGATATGAAAGATGCGCATACATCTTACAAAGCAATCGCTGTGCTCT 300
 N.tabacum TGGGATGATATGAAAGATGCGCATACATCTTACAAAGCAATCGCTGTGCTCT 300
 A.phyllitidis TGGGATGATATGAAAGATGCGCATACATCTTACAAAGCAATCGCTGTGCTCT 300
 * * * * *

G.hirsutum GAGGACACCCCTGTCTTCCGAGACAGCTCTCAAGCCCAAGGCCAATGAGAGAA 360
 T.pratense GAGGACACCCCTGTCTTCCGAGACAGCTCTCAAGCCCAAGGCCAATGAGAGAA 360
 S.asiatica GAGGACACCCCAATCTGTCTGAGACAGCTCTTCAATCCCAAGGCCAATGAGAGAA 360
 A.thaliana GAGGACACCCCTGTCTTCCGAGACAGCTCTTCAATCCCAAGGCCAATGAGAGAA 360
 Phalaenopsis GAGGACACCCCTGTCTTCACTGAGGCCCTTCAATCCCAAGGCCAATGAGAGAA 360
 H.vulgare GAGGACACCCCTGTCTTCACTGAGGCCCTTCAATCCCAAGGCCAATGAGAGAA 360
 N.tabacum GAGGACACCCCTGTCTTCACTGAGGCCCTTCAATCCCAAGGCCAATGAGAGAA 360
 A.phyllitidis GAGGACACCCCTGTCTTCACTGAGGCCCTTCAATCCCAAGGCCAATGAGAGAA 360
 * * * * *

G.hirsutum ATGACTCAGATATGTTGAGACCTCAATGACTGATGATGTTGGCATCAAGCC 420
 T.pratense ATGACCAAAATGTTGAGACCTTAAATGCGCTGCGATGATGTTGGCATCAAGCC 420
 S.asiatica ATGACTCAAAATGTTGAGACCTCAATGACTGATGATGTTGGCATCAAGCC 420
 A.thaliana ATGACTCAAAATGTTGAGACCTTAAATGCGCTGCGATGATGTTGGCATCAAGCC 420
 Phalaenopsis ATGACCAAAATGTTGAGACCTTCAATGACTGATGATGTTGGCATCAAGCC 420
 H.vulgare ATGACCAAAATGTTGAGACCTTCAATGACTGATGATGTTGGCATCAAGCC 420
 N.tabacum ATGACCAAAATGTTGAGACCTTCAATGACTGATGATGTTGGCATCAAGCC 420
 A.phyllitidis ATGACCAAAATGTTGAGACCTTCAATGACTGATGATGTTGGCATCAAGCC 420
 * * * * *

G.hirsutum GTCCCTCTTGTATGCCAGTGGTGCATACAGGATTTGCTGGATTCGGTATGGT 480
 T.pratense GTCCCTCCCTTATGCAAGTGGTGCATACAGGATTTGCTGGATTCGGTATGGT 480
 S.asiatica GTCTCTCCCTTATGCCAGTGGTGCATACAGGATTTGCTGGATTCGGTATGGT 480
 A.thaliana GTCTCTCCCTTATGCCAGTGGTGCATACAGGATTTGCTGGATTCGGTATGGT 480
 Phalaenopsis GTCTCTCCCTTATGCCAGTGGTGCATACAGGATTTGCTGGATTCGGTATGGT 480
 H.vulgare GTCTCTCCCTTATGCCAGTGGTGCATACAGGATTTGCTGGATTCGGTATGGT 480
 N.tabacum GTCTCTCCCTTATGCCAGTGGTGCATACAGGATTTGCTGGATTCGGTATGGT 480
 A.phyllitidis GTCTCTCCCTTATGCCAGTGGTGCATACAGGATTTGCTGGATTCGGTATGGT 480
 * * * * *

G.hirsutum GTTCTCACACCTGCCAATCTAAGAGGATAGCCCTCCACATGCCATCCCTGCTT 540
 T.pratense GTGAGTCACACTGTGCCAATCTAAGAGGATAGCCCTCCACATGCCATCCCTGCTT 540
 S.asiatica GTGAGTCACACTGTGCCAATCTAAGAGGATAGCCCTCCACATGCCATCCCTGCTT 540
 A.thaliana GTCTCTCACACCTGCCAATCTAAGAGGATAGCCCTCCACATGCCATCCCTGCTT 540
 Phalaenopsis GTCTCTCACACCTGCCAATCTAAGAGGATAGCCCTCCACATGCCATCCCTGCTT 540
 H.vulgare GTCTCTCACACCTGCCAATCTAAGAGGATAGCCCTCCACATGCCATCCCTGCTT 540
 N.tabacum GTCTCTCACACCTGCCAATCTAAGAGGATAGCCCTCCACATGCCATCCCTGCTT 540
 A.phyllitidis GTCTCTCACACCTGCCAATCTAAGAGGATAGCCCTCCACATGCCATCCCTGCTT 540
 * * * * *

G.hirsutum GACCTTCAGGCTGTGATCTACCCGATGCCCTTGAAGAGTCTTCCACGAGAGGTTAC 600
 T.pratense GACCTTCAGGCTGTGATCTACCCGATGCCCTTGAAGAGTCTTCCACGAGAGGTTAC 600
 S.asiatica GACCTTCAGGCTGTGATCTACCCGATGCCCTTGAAGAGTCTTCCACGAGAGGTTAC 600
 A.thaliana GACCTTCAGGCTGTGATCTACCCGATGCCCTTGAAGAGTCTTCCACGAGAGGTTAC 600
 Phalaenopsis GACCTTCAGGCTGTGATCTACCCGATGCCCTTGAAGAGTCTTCCACGAGAGGTTAC 600
 H.vulgare GACCTTCAGGCTGTGATCTACCCGATGCCCTTGAAGAGTCTTCCACGAGAGGTTAC 600
 N.tabacum GACCTTCAGGCTGTGATCTACCCGATGCCCTTGAAGAGTCTTCCACGAGAGGTTAC 600
 A.phyllitidis GACCTTCAGGCTGTGATCTACCCGATGCCCTTGAAGAGTCTTCCACGAGAGGTTAC 600
 * * * * *

G.hirsutum ATGTCCACACCTGCTGAGGCGGAAATGCTGCTGATCAAGAGAGGCTTCTT 660
 T.pratense ATGTCCACACCTGCTGAGGCGGAAATGCTGCTGATCAAGAGAGGCTTCTT 660
 S.asiatica ATGTCCACACCTGCTGAGGCGGAAATGCTGCTGATCAAGAGAGGCTTCTT 660
 A.thaliana ATGTCCACACCTGCTGAGGCGGAAATGCTGCTGATCAAGAGAGGCTTCTT 660
 Phalaenopsis ATGTCCACACCTGCTGAGGCGGAAATGCTGCTGATCAAGAGAGGCTTCTT 660
 H.vulgare ATGTCCACACCTGCTGAGGCGGAAATGCTGCTGATCAAGAGAGGCTTCTT 660
 N.tabacum ATGTCCACACCTGCTGAGGCGGAAATGCTGCTGATCAAGAGAGGCTTCTT 660
 A.phyllitidis ATGTCCACACCTGCTGAGGCGGAAATGCTGCTGATCAAGAGAGGCTTCTT 660
 * * * * *

G.hirsutum GTTGCCCTGATATGAGGAGAACTGGAGACTGCCAAGGAGGCTCATCTGTGAGAG 720
 T.pratense GTTGTGTGATATGAGGAGAACTGGAGACTGCCAAGGAGGCTCATCTGTGAGAG 720
 S.asiatica ATTTGCCCTGATATGAGGAGAACTGGAGACTGCCAAGGAGGCTCATCTGTGAGAG 720
 A.thaliana GTTGTGTGATATGAGGAGAACTGGAGACTGCCAAGGAGGCTCATCTGTGAGAG 720
 Phalaenopsis GTTGTGTGATATGAGGAGAACTGGAGACTGCCAAGGAGGCTCATCTGTGAGAG 720
 H.vulgare GTTGTGTGATATGAGGAGAACTGGAGACTGCCAAGGAGGCTCATCTGTGAGAG 720
 N.tabacum GTTGTGTGATATGAGGAGAACTGGAGACTGCCAAGGAGGCTCATCTGTGAGAG 720
 A.phyllitidis GTTGTGTGATATGAGGAGAACTGGAGACTGCCAAGGAGGCTCATCTGTGAGAG 720
 * * * * *

G.hirsutum AACTATGAGTGGCTGACGAGCAAGTCAATCTATGAGGACTGAGAGATCCGTTGCC 780
 T.pratense AACTATGAGTGGCTGACGAGCAAGTCAATCTATGAGGACTGAGAGATCCGTTGCC 780
 S.asiatica AACTATGAGTGGCTGACGAGCAAGTCAATCTATGAGGACTGAGAGATCCGTTGCC 780
 A.thaliana AACTATGAGTGGCTGACGAGCAAGTCAATCTATGAGGACTGAGAGATCCGTTGCC 780
 Phalaenopsis AACTATGAGTGGCTGACGAGCAAGTCAATCTATGAGGACTGAGAGATCCGTTGCC 780
 H.vulgare AACTATGAGTGGCTGACGAGCAAGTCAATCTATGAGGACTGAGAGATCCGTTGCC 780
 N.tabacum AACTATGAGTGGCTGACGAGCAAGTCAATCTATGAGGACTGAGAGATCCGTTGCC 780
 A.phyllitidis AACTATGAGTGGCTGACGAGCAAGTCAATCTATGAGGACTGAGAGATCCGTTGCC 780
 * * * * *

G.hirsutum GAAGTCTCTCCAGCCACTCTTATGCGGATGGAAGCTGCTGAAATCCATGAAATACC 840
 T.pratense GAAGTCTCTCCAGCCACTCTTATGCGGATGGAAGCTGCTGAAATCCATGAAATACC 840
 S.asiatica GAAGTCTCTCCAGCCACTCTTATGCGGATGGAAGCTGCTGAAATCCATGAAATACC 840
 A.thaliana GAAGTCTCTCCAGCCACTCTTATGCGGATGGAAGCTGCTGAAATCCATGAAATACC 840
 Phalaenopsis GAAGTCTCTCCAGCCACTCTTATGCGGATGGAAGCTGCTGAAATCCATGAAATACC 840
 H.vulgare GAAGTCTCTCCAGCCACTCTTATGCGGATGGAAGCTGCTGAAATCCATGAAATACC 840
 N.tabacum GAAGTCTCTCCAGCCACTCTTATGCGGATGGAAGCTGCTGAAATCCATGAAATACC 840
 A.phyllitidis GAAGTCTCTCCAGCCACTCTTATGCGGATGGAAGCTGCTGAAATCCATGAAATACC 840
 * * * * *

G.hirsutum CTCAAGTCTATCAATGAAGTGGATGATACAGGAGATCTCTATGTAACTTTGG 900
 T.pratense TACAACCTATAATGAAGTGGATGATACAGGAGATCTCTATGTAACTTTGG 900
 S.asiatica TACAATCCATCAATGAAGTGGATGATACAGGAGATCTCTATGTAACTTTGG 900
 A.thaliana TATAACTCAATCAATGAAGTGGATGATACAGGAGATCTCTATGTAACTTTGG 900
 Phalaenopsis TACAACCTCAATCAATGAAGTGGATGATACAGGAGATCTCTATGTAACTTTGG 900
 H.vulgare TACAACCTCAATCAATGAAGTGGATGATACAGGAGATCTCTATGTAACTTTGG 900
 N.tabacum TATAACTCAATCAATGAAGTGGATGATACAGGAGATCTCTATGTAACTTTGG 900
 A.phyllitidis TATAACTCAATCAATGAAGTGGATGATACAGGAGATCTCTATGTAACTTTGG 900
 * * * * *

G.hirsutum CTCAGTGGGGTTCAACTATGTTCCCTGGTATTGGCAGCCGATGAGCAAGGATCACT 960
 T.pratense CTCAGTGGGGTTCAACTATGTTCCCTGGTATTGGCAGCCGATGAGCAAGGATCACT 960
 S.asiatica CTCAGTGGGGTTCAACTATGTTCCCTGGTATTGGCAGCCGATGAGCAAGGATCACT 960
 A.thaliana CTCAGTGGGGTTCAACTATGTTCCCTGGTATTGGCAGCCGATGAGCAAGGATCACT 960
 Phalaenopsis CTCAGTGGGGTTCAACTATGTTCCCTGGTATTGGCAGCCGATGAGCAAGGATCACT 960
 H.vulgare CTCAGTGGGGTTCAACTATGTTCCCTGGTATTGGCAGCCGATGAGCAAGGATCACT 960
 N.tabacum CTCAGTGGGGTTCAACTATGTTCCCTGGTATTGGCAGCCGATGAGCAAGGATCACT 960
 A.phyllitidis CTCAGTGGGGTTCAACTATGTTCCCTGGTATTGGCAGCCGATGAGCAAGGATCACT 960
 * * * * *

G.hirsutum GCTCTTGTCCACGAGCATGAAGATTAAGGTTGTTGGCCACCAGAGAAAGTACAGT 1020
 T.pratense GCTCTTGTCCACGAGCATGAAGATTAAGGTTGTTGGCCACCAGAGAAAGTACAGT 1020
 S.asiatica GCTCTTGTCCACGAGCATGAAGATTAAGGTTGTTGGCCACCAGAGAAAGTACAGT 1020
 A.thaliana GCACTTGTCCACGAGCATGAAGATTAAGGTTGTTGGCCACCAGAGAAAGTACAGT 1020
 Phalaenopsis GCGCTTGTCCACGAGCATGAAGATTAAGGTTGTTGGCCACCAGAGAAAGTACAGT 1020
 H.vulgare GCGCTTGTCCACGAGCATGAAGATTAAGGTTGTTGGCCACCAGAGAAAGTACAGT 1020
 N.tabacum GCTCTTGTCCACGAGCATGAAGATTAAGGTTGTTGGCCACCAGAGAAAGTACAGT 1020
 A.phyllitidis GCTCTTGTCCACGAGCATGAAGATTAAGGTTGTTGGCCACCAGAGAAAGTACAGT 1020
 * * * * *

G.hirsutum GTCTGGATTGGAGGATCTATCTTGGCATCACTCAGCAGCTTCCAGAGATGTGATTTC 1080
 T.pratense GTCTGGATTGGAGGATCTATCTTGGCATCACTCAGCAGCTTCCAGAGATGTGATTTC 1080
 S.asiatica GTCTGGATTGGAGGATCTATCTTGGCATCTCAGCAGCTTCCAGAGATGTGATTTC 1080
 A.thaliana GTCTGGATTGGAGGATCTATCTTGGCATCTCAGCAGCTTCCAGAGATGTGATTTC 1080
 Phalaenopsis GTCTGGATTGGAGGATCTATCTTGGCATCTCAGCAGCTTCCAGAGATGTGATTTC 1080
 H.vulgare GTCTGGATTGGAGGATCTATCTTGGCATCTCAGCAGCTTCCAGAGATGTGATTTC 1080
 N.tabacum GTCTGGATTGGAGGATCTATCTTGGCATCTCAGCAGCTTCCAGAGATGTGATTTC 1080
 A.phyllitidis GTCTGGATTGGAGGATCTATCTTGGCATCTCAGCAGCTTCCAGAGATGTGATTTC 1080
 * * * * *

G.hirsutum AAGGTGAGTATGATGAGTCGGTCCATCCATGTTCCACAGGAAGTCTCTTAA 1134
 T.pratense AAGGTGAGTATGATGAGTCGGTCCATCCATGTTCCACAGGAAGTCTCTTAA 1134
 S.asiatica AAGGTGAGTATGATGAGTCGGTCCATCCATGTTCCACAGGAAGTCTCTTAA 1134
 A.thaliana AAGGTGAGTATGATGAGTCGGTCCATCCATGTTCCACAGGAAGTCTCTTAA 1134
 Phalaenopsis AAGGTGAGTATGATGAGTCGGTCCATCCATGTTCCACAGGAAGTCTCTTAA 1134
 H.vulgare AAGGTGAGTATGATGAGTCGGTCCATCCATGTTCCACAGGAAGTCTCTTAA 1134
 N.tabacum AAGGTGAGTATGATGAGTCGGTCCATCCATGTTCCACAGGAAGTCTCTTAA 1134
 A.phyllitidis AAGGTGAGTATGATGAGTCGGTCCATCCATGTTCCACAGGAAGTCTCTTAA 1134
 * * * * *

Fig. 3.6 allineamento di sequenze nucleotidiche di diverse specie vegetali codificanti per il gene *Act 11* (astina 2). In giallo sono evidenziate le sequenze altamente conservate sulle quali sono state disegnati i primer per le reazioni di amplificazione di DNA e cDNA

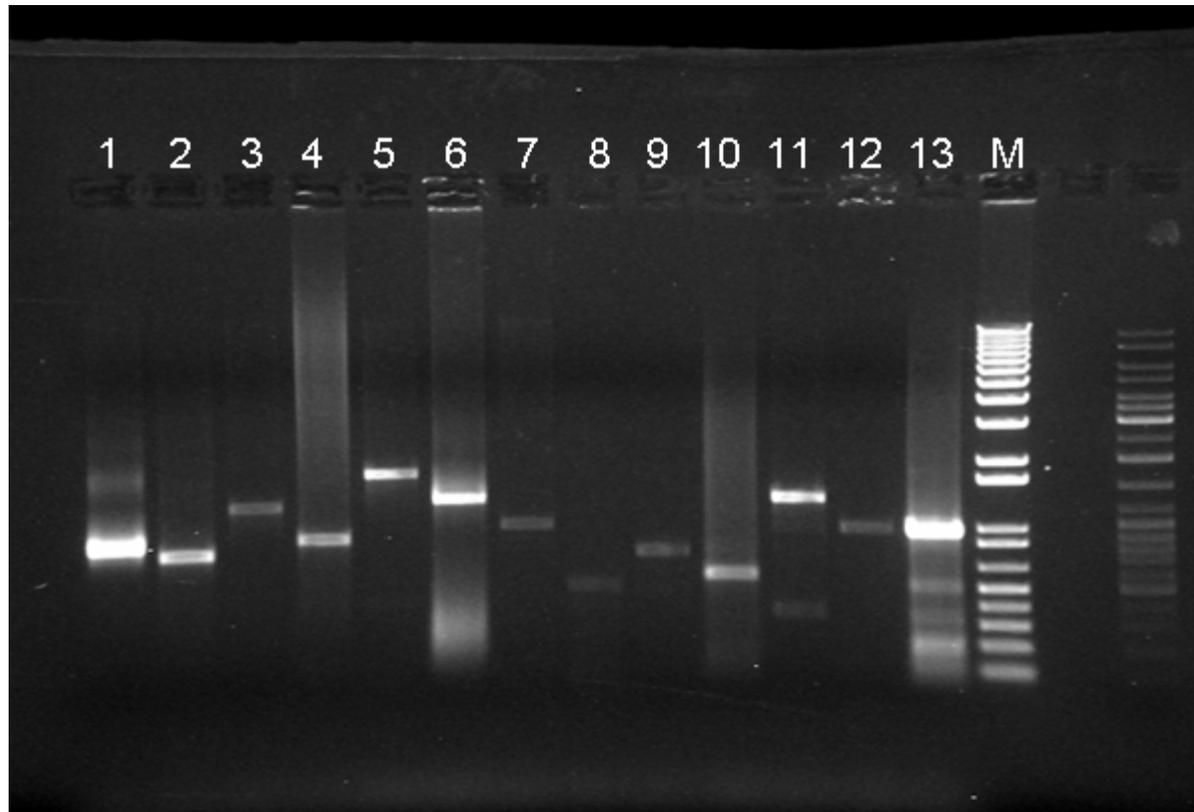


Fig. 3.7

Amplificazioni di DNA e cDNA di kenaf

Amplificazioni di DNA genomico di kenaf e di cDNA di kenaf mediante analisi PCR e RT-PCR rispettivamente.

1.PCR con prime per actina; 2.RT-PCR con primer per actina;3. PCR con prime per 4CL; 4.RT-PCR con prime per 4CL; 5= PCR con prime per C4H; 6.RT-PCR con prime per C4H; 7.PCR con prime per CCR; 8. RT-PCR con prime per CCR; 9.PCR con prime per CAD;10. RT-PCR con primer per CAD;11. PCR con primer per CeSA; 12. RT-PCR con primer per CeSA13.RT-PCR con primer per CeSA; M. marcatore di peso molecolare noto.

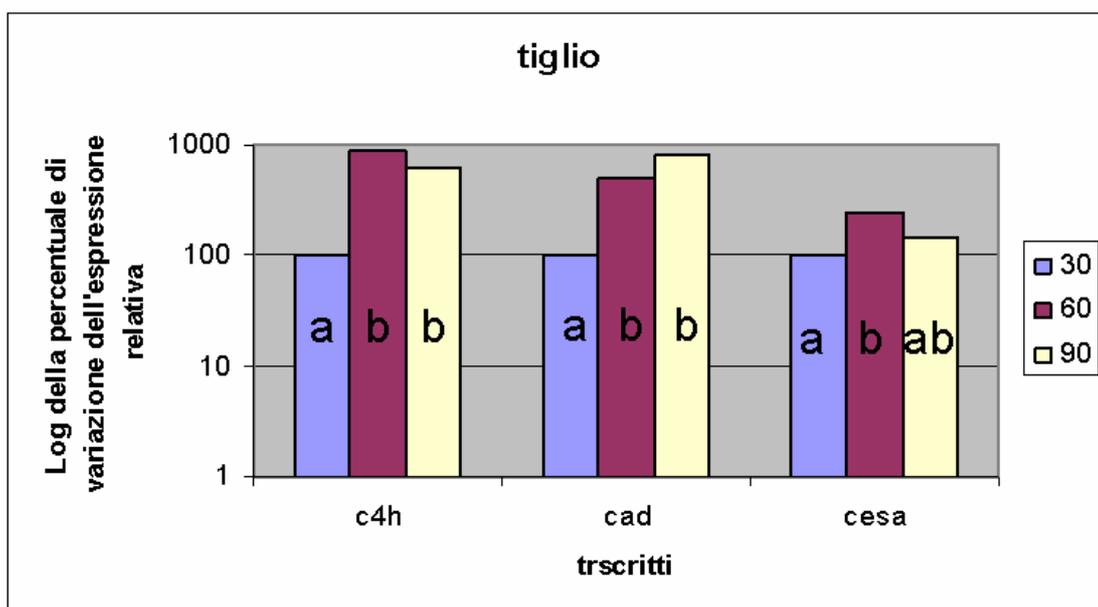


Fig. 3.8 Espressione temporale dei geni c4h, cad e CeSA nel tiglio di kenaf a 30, 60 e 90 giorni dalla semina. Le differenti lettere, indicano per ogni gene le differenze significative at $p < 0.05$.

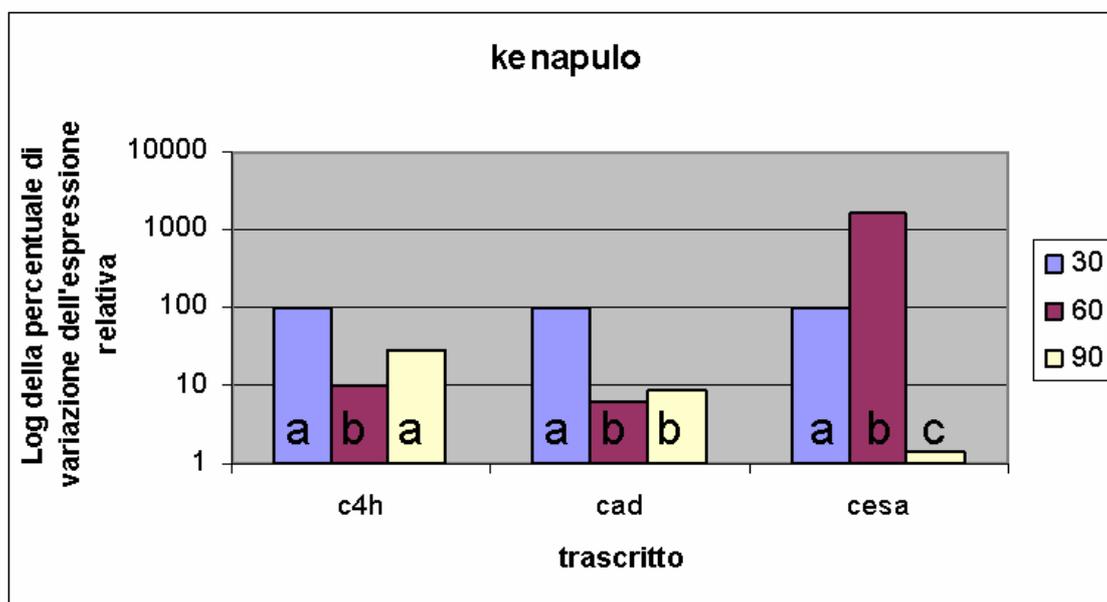


Fig. 3.9 Espressione temporale dei geni c4h, cad e CeSA nel kenapulo di kenaf a 30, 60 e 90 giorni dalla semina. Le differenti lettere, indicano per ogni gene le differenze significative at $p < 0.05$.



Fig. 3.10 La foto mostra espianti di foglie cotiledinari posti su terreno R per 42 giorni e poi trasferiti su terreno MS per altri 42 giorni (84° giorno)



Fig. 3.11 La foto mostra espianti di foglie cotiledinari posti su terreno T per 42 giorni e poi trasferiti su terreno MS per altri 42 giorni (21° giorno)



Fig. 3.12 La foto mostra espianti di foglie cotiledinari posti su terreno MN per 42 giorni e poi trasferiti su terreno MS per altri 42 giorni (42° giorno)



Fig. 3.13 Foglie cotiledonari poste su terreno B dopo 42 giorni



Fig. 3.14 Foglie cotiledonari poste su terreno NTA dopo 42 giorni



Fig. 3.15 Germogli di kenaf della cultivar Dowling sviluppati su terreno MS con aggiunta di TDZ alla concentrazione di $10\mu\text{M}$ dopo 28 giorni dalla semina



Fig. 3.16 Germogli di kenaf della cultivar SF459 su terreno MS con aggiunta di TDZ alla concentrazione di 10μM dopo 28 giorni dalla semina.



Fig. 3.17 Semi di kenaf su MS e kanamicina 100mg l⁻¹



Fig. 3.18 Semi di kenaf su MS e kanamicina 200mg l⁻¹



Fig. 3.19 Semi di kenaf su MS e kanamicina 300 mg l⁻¹

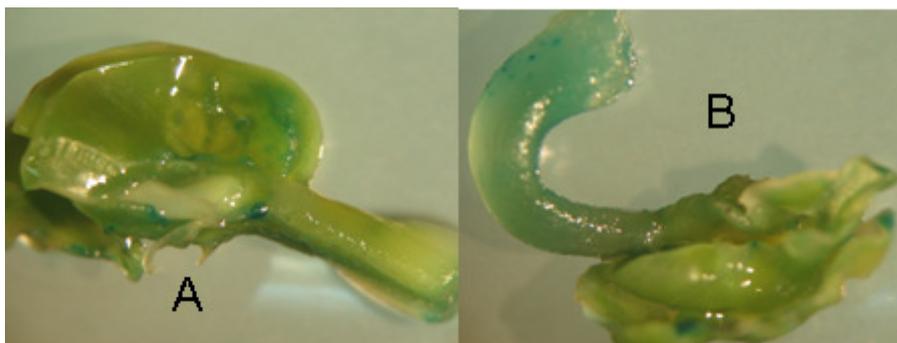


Fig. 3.20 Germoglio di Dowling (A) e di SF459 (B) sottoposti a saggio gus 7giorni dopo co-coltura con AT8 contenete P35SGUS-INT

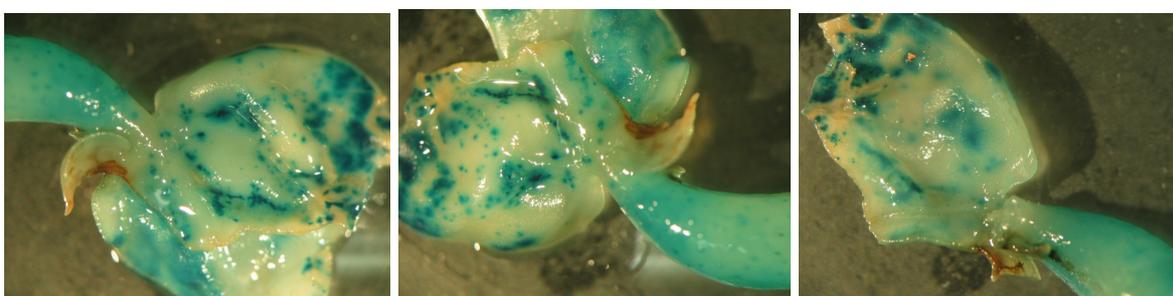


Fig. 3.21 Saggio GUS di espianti di kenaf



Fig. 3.22 Saggio GUS su semi di kenaf dopo 7 giorni dalla co-coltura con agrobatterio LBA4404.

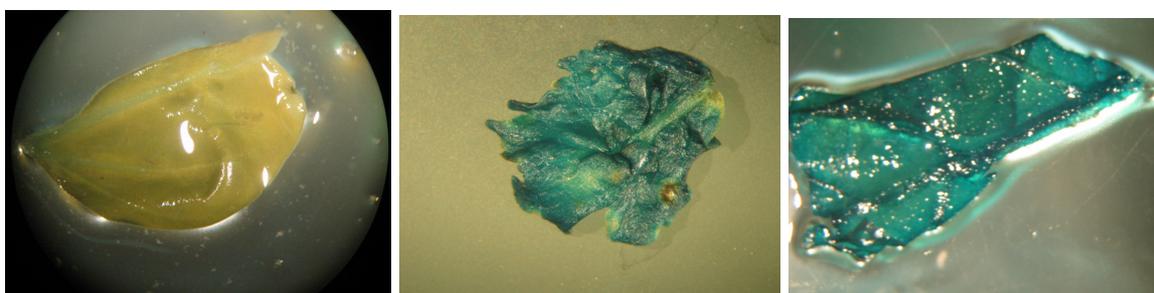


Fig. 3.23 Saggio GUS putativa pianta transgenica di kenaf (c- =controllo negativo; c+ = controllo positivo(Nicotiana tabacum GUS+) TRS= putativa transgenica

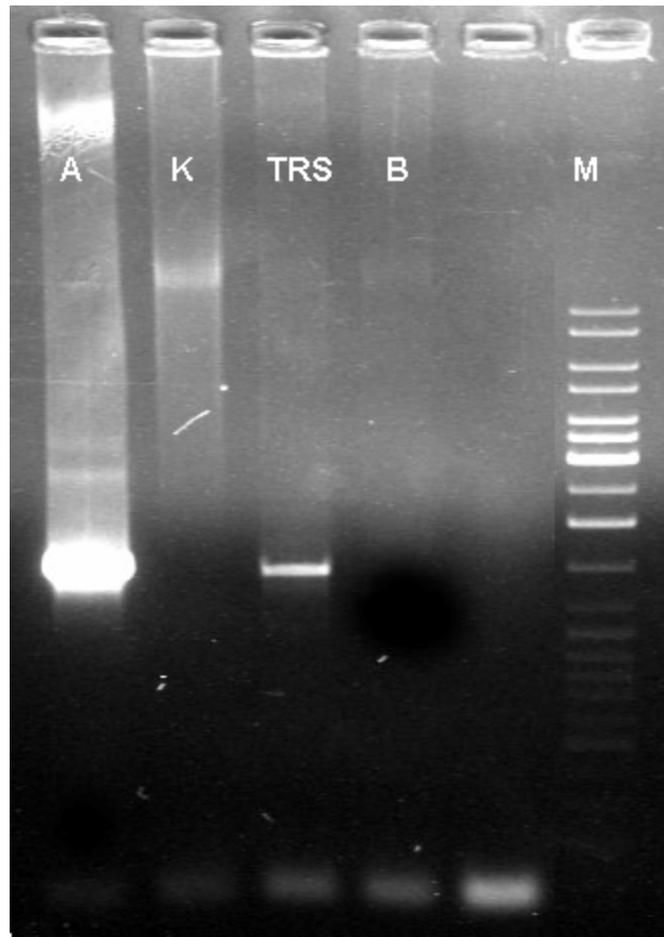


Fig. 3.24 PCR su DNA pianta di kenaf trasformata.
A= p35GUS-INT; K= kenaf non trasformata; TRS= kenaf trasformata B=
bianco; M= marcatore di peso molecolare.

7. TABELLE

Tab. 2.1 Terreni utilizzati per il difeenziamento in vitro di kenaf. Tutti i terreni hanno come formulazione base quella standard MS

Nome terreno	Ormoni (mg/l)						
	zeatina riboside	GA3	IAA	NAA	TDZ	BAP	AgNO₃
R	0.8	2	-	-	-	-	-
T	3	1	2	-	-	-	-
MN	5	-	-	0.1	-	-	-
B	-	-	0.5	-	-	5	-
NTA	-	-	-	0.1	0.35	-	10.2

Tab. 3.1 Primer disegnati sulle zone altamente conservate delle sequenze codificanti, già presenti in banca dati, di geni della biosintesi della lignina e cellulosa di monocotiledoni e dicotiledoni. Analisi di PCR e RT-PCR condotte con tali primer hanno prodotto frammenti di amplificazione.

Codice identificativo primer	sequenza
Cads	ttaccccatggtcctgggc
Cadas	gtattagctgtggcacggac
4CLs	cccttctcatcaggaactac
4clas	ccacaaatgcaacaggaacc
C4hs	aaactggcttcaagtcggcg
C4has	ctgaactgtccaccttctc
Acts	aagcaactgggatgatatgg
Actas	gacctaatcttcatgctgc
Ccrf3	gaacaaatggtggagccagc
Ccrr3	ccacggtggagaacactctc
Cs4s	ctgctatgtgcagttccac
Cs4as	ccactccatcggagctcgag

Tab. 3.2 Sequenze clonate

per ogni sequenza genica clonata è riportato; il numero di accessione registrato nella Banca Dati del National Center for Bioinformatic Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) e la percentuale di identità con le sequenze degli stessi geni di altre specie già presenti nella banca dati. Nelle ultime 3 colonne sono riportate per ogni sequenza la lunghezza amminoacidica delle sequenza e la loro percentuale di identità con la proteina più simile ad essa già presente in banca dati.

Codice di accessione	Nome della sequenza	Lunghezza (pb)		% di identità nucleotidica	specie con più alta identità nucleotidica	Lunghezza (aa)	% Identità proteica	specie con più alta identità proteica
		DNA	cDNA					
DQ675603	<i>H. cannabinus</i> CAD partial genome sequence	751	574	80%	<i>Linum album</i>	191	83%	<i>Linum album</i>
DQ399839	<i>H. cannabinus</i> CeSA1 mRNA, partial cds		981	92%	<i>Gossypium hirsutum</i>	326	96%	<i>Gossypium hirsutum</i>
EU041624	<i>H. cannabinus</i> cellulose synthase (CeSA1) gene, partial cds	1356		95%	<i>Gossypium hirsutum</i>	326	96%	<i>Gossypium hirsutum</i>
DQ399840	<i>H. cannabinus</i> c4h mRNA, partial cds	1335		88%	<i>Gossypium arboreum</i>	444	95%	<i>Gossypium arboreum</i>
DQ866836	<i>H. cannabinus</i> ACT mRNA, partial cds.		760	94%	<i>Gossypium hirsutum</i>	253	100%	<i>Gossypium hirsutum</i>
EU048368	<i>H. cannabinus</i> actin gene, partial cds.	922		95%	<i>Gossypium hirsutum</i>	253	100%	<i>Gossypium hirsutum</i>
DQ840569	<i>H. cannabinus</i> 4CL partial genome sequence	1257	886	83%	<i>Nicotiana tabacum</i>	295	82 %	<i>Populus balsamifera</i>
EF031545	<i>H. cannabinus</i> CCR gene, partial cds.	1020	485	83%	<i>Populus balsamifera</i>	161	91%	<i>Populus trichocarpa</i>

Tab. 3.3

Primer utilizzati er la PCR quantitativa.

I primer sono stati disegnati con l'ausilio del software Primer Express®Software 2.0. tale software, grazie ad un algoritmo identifica i primer sulla sequenza inserita in esso in base alle caratteristiche richieste

codice identificativo primer	sequenza
qact3s	aggtcctcttccagccatca
qact3as	catggattccagctgcttc
qcad2s	ctgttgatggtgcggga
qcad2as	ctgctcacggctctgtttgc
qCs1s	caatctgtctgatcggttgc
qCs1as	acagatccaagagcccatct
qC4hs	gtgtcgaattcggttccag
qC4has	cggtgaagatgtcaaagacg

Tab 3.4

Quantità di lignina e cellulosa in tiglio e kenapulo di fusti di kenaf.

Le quantità sono espresse in mg g⁻¹. Le differenti lettere, all'interno dello stesso tessuto per entrambi i bio-polimeri, indicano differenze significative at p < 0.05.

* media su due campioni

giorni dalla semina	Tiglio			Kenapulo		
	30	60	90	30	60	90
Lignina	8,17 a	11,38 b *	18,62 c	7,77 a	8,47 b	13.31 c
Celulosa	18,61 a	13,63 b *	8,29 c *	11.65 a *	10.78 a *	8,64 b

Tab. 3.5 Dati raccolti per gli espianti posti su terreno R. I dati sono stati raccolti ogni 28 giorni fino all'ottantaquattresimo giorno. Sia per la cultivar Dowling (3.5 A) che per la SF459 (3.5 B). E' possibile notare che nessun espianto ha prodotto germogli nonostante la formazione di callo e di radici.

3.5 A FOGLIE COTILEDONARI cultivar *Dowling*

N° espianti di Partenza	N° espianti formanti Callo	N° espianti formanti Callo + Radice	N° espianti con solo Radici	N° Germogli	N° espianti che non mostrano differenziamento	N° espianti Morti	Raccolta dati
50	17	13	0	0	4	16	28 giorni
	9	20	0	0	0	21	56 giorni
	0	26	0	0	0	24	84 giorni

3.5 B FOGLIE COTILEDONARI cultivar *SF459*

<i>N° espianti di Partenza</i>	<i>N° espianti formanti Callo</i>	<i>N° espianti formanti Callo + Radice</i>	<i>N° espianti con solo Radici</i>	<i>N° Germogli</i>	<i>N° espianti che non mostrano differenziamento</i>	<i>N° espianti Morti</i>	<i>Raccolta dati</i>
50	36	6	0	0	6	2	28 giorni
	22	18	0	0	5	5	56 giorni
	16	23	0	0	3	8	84 giorni

Tab. 3.6 Dati raccolti per gli espianti posti su terreno T. I dati sono stati raccolti ogni 28 giorni fino all'ottantaquattresimo giorno. Sia per la cultivar Dowling (3.6 A) che per la SF459 (3.6 B). E' possibile notare che nessun espianto ha prodotto germogli nonostante la formazione di callo e di radici.

3.6 A FOGLIE COTILEDONARI cultivar *Dowling*

<i>N° espianti di Partenza</i>	<i>N° espianti formanti Callo</i>	<i>N° espianti formanti Callo + Radice</i>	<i>N° espianti con solo Radici</i>	<i>N° Germogli</i>	<i>N° espianti che non mostrano differenziamento</i>	<i>N° espianti Morti</i>	<i>Raccolta dati</i>
50	16	16	0	0	0	18	28 giorni
	8	24	0	0	0	18	56 giorni
	1	24	0	0	0	25	84 giorni

3.6 B FOGLIE COTILEDONARI cultivar *SF459*

<i>N° espianti di Partenza</i>	<i>N° espianti formanti Callo</i>	<i>N° espianti formanti Callo + Radice</i>	<i>N° espianti con solo Radici</i>	<i>N° Germogli</i>	<i>N° espianti che non mostrano differenziamento</i>	<i>N° espianti Morti</i>	<i>Raccolta dati</i>
50	35	15	0	0	0	0	28 giorni
	21	29	0	0	0	0	56 giorni
	11	39	0	0	0	0	84 giorni

Tab. 3.7 Dati raccolti per gli espianti posti su terreno MN. I dati sono stati raccolti ogni 28 giorni fino al cinquantaseiesimo giorno. Sia per la cultivar Dowling (3.7 A) che per la SF459 (3.7 B). La formazione di radici sui tutti calli induce a pensare che il mix di ormoni usati produca un effetto radicante per le piante di kenaf in coltura *in vitro*

3.7 A FOGLIE COTILEDONARI cultivar *Dowling*

<i>N° espianti di Partenza</i>	<i>N° espianti formanti Callo</i>	<i>N° espianti formanti Callo + Radice</i>	<i>N° espianti con solo Radici</i>	<i>N° Germogli</i>	<i>N° espianti che non mostrano differenziamento</i>	<i>N° espianti Morti</i>	<i>Raccolta dati</i>
50	0	0	50	0	0	0	28 giorni
	0	0	50	0	0	0	56 giorni

3.5 B FOGLIE COTILEDONARI cultivar *SF459*

<i>N° espianti di Partenza</i>	<i>N° espianti formanti Callo</i>	<i>N° espianti formanti Callo + Radice</i>	<i>N° espianti con solo Radici</i>	<i>N° Germogli</i>	<i>N° espianti che non mostrano differenziamento</i>	<i>N° espianti Morti</i>	<i>Raccolta dati</i>
50	0	0	50	0	0	0	28 giorni
	0	0	50	0	0	0	56 giorni

Tab. 3.8 Dati raccolti per gli espianti posti su terreno B. I dati sono stati raccolti ogni 28 giorni fino all'ottantaquattresimo giorno. Sia per la cultivar Dowling (3.8 A) che per la SF459 (3.8 B). Per entrambe le cultivar sono stati saggiati per l'induzione al differenziamento sia ipocotili che foglie cotiledonari. E' possibile notare che nessun espianto ha prodotto germogli in percentuali ritenute idonee per un eventuale protocollo di trasformazione genetica.

3.8 A FOGLIE COTILEDONARI cultivar Dowling

<i>n° espianti di partenza</i>	<i>N° espianti formanti Callo</i>	<i>N° espianti formanti Callo + Radice</i>	<i>N° espianti con solo Radici</i>	<i>N° espianti che non mostrano differenziamento</i>	<i>N° espianti Morti</i>	<i>N° Germogli</i>	<i>Raccolta dati</i>
50	43	0	0	7	0	0	28giorni
	41	2	0	7	0	0	56 giorni
	29	19	0	2	0	1	84 giorni

3.8 A IPOCOTILI cultivar Dowling

<i>n° espianti di partenza</i>	<i>N° espianti formanti Callo</i>	<i>N° espianti formanti Callo + Radice</i>	<i>N° espianti con solo Radici</i>	<i>N° espianti che non mostrano differenziamento</i>	<i>N° espianti Morti</i>	<i>N° Germogli</i>	<i>Raccolta dati</i>
50	47	1	0	2	0	0	28giorni
	44	6	0	0	0	0	56 giorni
	36	14	0	0	0	0	84 giorni

3.8 B FOGLIE COTILEDONARI cultivar SF459

<i>n° espianti di partenza</i>	<i>N° espianti formanti Callo</i>	<i>N° espianti formanti Callo + Radice</i>	<i>N° espianti con solo Radici</i>	<i>N° espianti che non mostrano differenziamento</i>	<i>N° espianti Morti</i>	<i>N° Germogli</i>	<i>Raccolta dati</i>
50	44	2	1	3	0	0	28giorni
	38	12	0	0	0	0	56 giorni
	24	26	0	0	0	0	84 giorni

3.8 B IPOCOTILI cultivar SF459

<i>n° espianti di partenza</i>	<i>N° espianti formanti Callo</i>	<i>N° espianti formanti Callo + Radice</i>	<i>N° espianti con solo Radici</i>	<i>N° espianti che non mostrano differenziamento</i>	<i>N° espianti Morti</i>	<i>N° Germogli</i>	<i>Raccolta dati</i>
50	49	0	0	0	0	1	28giorni
	49	0	0	0	0	1	56 giorni
	23	26	0	0	0	0	84 giorni

Tab. 3.9 Dati raccolti per gli espianti posti su terreno NTA. I dati sono stati raccolti ogni 28 giorni fino all'ottantaquattresimo giorno. Sia per la cultivar Dowling (3.9 A) che per la SF459 (3.9 B). Per entrambe le cultivar sono stati saggiati per l'induzione al differenziamento sia ipocotili che foglie cotiledonari. E' possibile notare che nessun espianto ha prodotto germogli in percentuali ritenute idonee per un eventuale protocollo di trasformazione genetica.

3.9 A FOGLIE COTILEDONARI cultivar Dowling

<i>n° espianti di partenza</i>	<i>N° espianti formanti i Callo</i>	<i>N° espianti formanti Callo + Radice</i>	<i>N° espianti con solo Radici</i>	<i>N° espianti che non mostrano differenziamento</i>	<i>N° espianti Morti</i>	<i>N° Germogli</i>	<i>Raccolta dati</i>
50	49	0	0	0	0	1	28giorni
	48	1	0	0	1	1	56 giorni
	33	16	0	0	1	0	84 giorni

3.9 A IPOCOTILI cultivar Dowling

<i>n° espianti di partenza</i>	<i>N° espianti formanti Callo</i>	<i>N° espianti formanti Callo + Radice</i>	<i>N° espianti con solo Radici</i>	<i>N° espianti che non mostrano differenziamento</i>	<i>N° espianti Morti</i>	<i>N° Germogli</i>	<i>Raccolta dati</i>
50	50	0	0	0	0	0	28giorni
	50	0	0	0	0	0	56 giorni
	50	0	0	0	0	0	84 giorni

3.9 B FOGLIE COTILEDONARI cultivar SF459

<i>n° espianti di partenza</i>	<i>N° espianti formanti Callo</i>	<i>N° espianti formanti Callo + Radice</i>	<i>N° espianti con solo Radici</i>	<i>N° espianti che non mostrano differenziamento</i>	<i>N° espianti Morti</i>	<i>N° Germogli</i>	<i>Raccolta dati</i>
50	49	0	0	0	0	1	28giorni
	50	0	0	0	0	1	56 giorni
	46	4	0	0	0	1	84 giorni

3.9 B IPOCOTILI cultivar SF459

<i>n° espianti di partenza</i>	<i>N° espianti formanti Callo</i>	<i>N° espianti formanti Callo + Radice</i>	<i>N° espianti con solo Radici</i>	<i>N° espianti che non mostrano differenziamento</i>	<i>N° espianti Morti</i>	<i>N° Germogli</i>	<i>Raccolta dati</i>
50	50	0	0	0	0	0	28giorni
	50	0	0	0	0	0	56 giorni
	50	0	0	0	0	0	84 giorni

Tab. 3.10 Effetti del Picloram su ipocotili e foglie cotiledonari di Dowling dopo 45 giorni dall'esposizione

<i>Picloram</i>	<i>tipo espianto</i>	<i>n° espianti partenza</i>	<i>% soprav</i>	<i>% radicati</i>	<i>% callo+radici</i>	<i>% callo</i>	<i>% embrioni</i>
1µM	foglie cot.	50	100%	24%	16%	60%	0%
	ipocotili	50	100%	0%	8%	92%	0%
5µM	foglie cot.	50	100%	0%	4%	96%	0%
	ipocotili	50	100%	0%	2%	98%	0%
10µM	foglie cot.	50	100%	0%	0%	100%	0%
	ipocotili	50	100%	0%	0%	100%	0%
controlli	foglie cot.	10	100%	100%	0%	0%	0%
	ipocotili	10	100%	100%	0%	0%	0%

Tab. 3.11 Media e deviazione standard di gemme multiple prodotte da semi delle cultivar Dowling e SF459 esposti a tre differenti concentrazioni di TDZ per due differenti tempi di esposizione

cultivar <i>TDZ</i>	Dowling						SF459					
	<i>1µM</i>		<i>5µM</i>		<i>10µM</i>		<i>1µM</i>		<i>5µM</i>		<i>10µM</i>	
<i>Tempo</i>	<i>14gg</i>	<i>28gg</i>										
media	1,8	2,5	3,1	2,3	3,3	3,8	2,1	2,7	2,8	2,9	3,6	3,8
Dv. St.	0,63	0,85	0,57	0,48	0,53	0,63	0,88	1,06	0,59	0,88	1,26	0,79

Tab. 3.12 Percentuali di espianti germinati e sopravvissuti dopo i vari cambi di substrato e percentuale di espianti positivi a saggio GUS

<i>strategia</i>	<i>Cultivar</i>	<i>N° Espianti</i>	<i>% espianti Germinati</i>	<i>% espianti Sopravvissuti MS30, TDZ 10 µM, Kan 300mg/L</i>	<i>% espianti Sopravvissuti MS30, Kan 300mg/L</i>	<i>% Germogli Trasformati saggio GUS</i>
Focaliz	Dowling	100	91%	48%	6,25%	0%
	SF459	100	89%	39%	5,1%	0%
Rosata	Dowling	100	90%	34%	5,8%	0%
	SF459	100	91%	35%	8,5%	0%

Tab. 3.13 Percentuali di espianti germinati e sopravvissuti dopo i vari cambi di substrato e percentuale di espianti positivi a saggio GUS

<i>Cultivar</i>	<i>N. Espianti</i>	<i>% espianti Germinati</i>	<i>% espianti Sopravv. MS30, TDZ 10 µM, Kan 300mg/</i>	<i>%espianti Soprav. MS30, Kan 300mg/L</i>	<i>% germogli positivi a saggio GUS</i>
Dowling	120	99,5%	46,66%	8,92%	0%
SF459	120	99,6%	52,5%	12,5%	0%

Tab. 3.14 Co-cultura di embrioni di kenaf provenienti da semi sterilizzati, tagliati longitudinalmente e lasciati germinare per 24 ore in terreno contenente TDZ 10 μ M con agrobatterio contenente il plasmide p35GUS-INT. Per entrambe le cultivar saggate gli espianti sottoposti a saggio gus dopo 14 giorni si è registrata la presenza di spot blu sui tessuti.

<i>Cultivar</i>	<i>N° espianti</i>	<i>Substrato cocultura</i>	<i>Substrato crescita (21 giorni)</i>	<i>Substrato elongazione (21 giorni)</i>	<i>N° espianti elongati %</i>	<i>N° espianti saggiati GUS</i>	<i>N° positivi a saggio GUS</i>	<i>Zona con presenza di spot blu</i>
dowling	100	MS30 liquido	MS30, TDZ 10 μ M, Kan 300mg/L, Claf 500mg/L	P0C + K 300mg/L + Claf 250mg/L	0%	5	4	foglie e stelo
SF359	100	MS30 liquido	MS30, TDZ 10 μ M, Kan 300mg/L, Claf 500mg/L	P0C + K 300mg/L + Claf 250mg/L	0%	5	5	foglie e stelo

Tab. 3.15 Co-coltura di embrioni con AT8 e acetosiringone 200µM. Gli embrioni di kenaf provenienti da semi sterilizzati, tagliati longitudinalmente sono stati co-coltivati con agrobatterio contenete il plasmide p35GUS-INT. Per entrambe le cultivar saggate gli espianti sottoposti a saggio gus dopo 7 giorni si è registrata la presenza di spot blu sui tessuti.

<i>cultivar</i>	<i>N° espianti</i>	<i>% germinati dopo 48 ore</i>	<i>% sopraviss uti dopo 7 giorni</i>	<i>% sopravissuti dopo 28 giorni</i>	<i>N° espianti saggiati GUS</i>	<i>% positivi saggio GUS</i>	<i>zona</i>
dowling	400	76,25	93.77%	28.67	5	100	foglie e fusto
SF359	400	84,52	92.83%	29.90	5	100	foglie e fusto

Tab. 3.16 Co-coltura su embrioni di kenaf con agrobatterio AT18. Gli embrioni di kenaf provenienti da semi sterilizzati, tagliati longitudinalmente sono stati co-coltivati con agrobatterio contenete il plasmide p35GUS-INT. Per entrambe le cultivar saggate su tutti gli espianti sottoposti a saggio gus dopo 7 giorni si è registrata la presenza di spot blu sui tessuti.

<i>cultivar</i>	<i>N espianti</i>	<i>% germinati</i>	<i>% Sopravissuti dopo 7 giorni</i>	<i>% sopravissuti dopo 28 giorni</i>	<i>N espianti saggiati GUS</i>	<i>% positivi a saggio GUS dopo 7 giorni</i>	<i>zona</i>
dowling	500	96%	90,80%	14,30%	5	100%	foglie e stelo
SF459	500	98,20%	86%	15,00%	5	100%	foglie e stelo

7. BIBLIOGRAFIA

- Amor Y, Haigler CH, Johnson S, Wainscott M, Delmer DP. A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9353–57 (1995).
- Anterola, A.M., van Rensburg, H., van Heerden, P.S., Davin, L.B., Lewis, N.G., Multi-site modulation of flux during monolignol formation in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 261, 652–657 (1999).
- Anterola A.M., Lewis N. G., Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry* 61: 221–294 (2002).
- Appenzeller L., Dolbin M., Barreiro R., Wang H.Y., Niu X.M. cellulose synthesis in maize: isolation and expression analysis of the cellulose synthase (CeSA) gene family. *Cellulose* 11 287-299 (2004)
- Arioli T. Peng L.C., Betzner A.S. Burn j., Wittke W., molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science* 279: 717-720 (1998)
- Banks S.W., Gossett D.R., Lucas C., Milhollon E.P., LaCelle M. G., *Agrobacterium*-mediated transformation of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) With the β -glucuronidase (GUS) gene. *Plant Molecular Biology Reporter*. 11: 101-104 (1993)
- Baucher M., Monties B., Montagu M., Boerjan W., Biosynthesis and genetic engineering of lignin, *Crit. Rev. Plant Sci.* 17:125–197(1998)
- Bayley C., Trolinder N., Ray C., Morgan M., Quisenberry J.E., Ow D.W. Engineering 2,4-D resistance into cotton, *Theor. Appl. Genet.* 83: 645–662 (1992).
- Beekman T., Przemek GkH., Stamatiou G., Lau R., Terry N. Genetic complexity of cellulose synthase A gene function in *Arabidopsis* embryogenesis. *Plant Physiologist*. 130: 1883-1893 (2002).
- Bert, N., Kenaf fibers. *Presentation of the 5th annual conference of the America kenaf society*. November 7-9, 2002, Memphis, TN. (2002).
- Bitzer, M.J., The development of kenaf varieties in United States. *In: Proceedings of the International Kenaf Symposium*. Hiroshima, Japan, pp. 91-94. (2000).
- Boerjan W.,alph J., aucher M. Lignin Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:519–46 (2003)
- Bonetta, D., Facette, M., Raab, T. and Somerville, C. Genetic dissection of plant cell-wall biosynthesis. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 298–301. (2002)
- Brown, R. Jr The biosynthesis of cellulose. *J. Macromol. Sci.* 10, 1345–1373. (1996)
- Burn j, Hocart C.H., Birch R.J., Cork A.C., Williamson R.E. Functional analysis of the cellulose synthase genes *CesA1*, *CesA2*, and *CesA3* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129: 797-807 (2002)
- Carpita NC, Gibeaut DM: Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal* 3:1-30. (1993)

- Carpita, N. and Gibeaut, D. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3, 1–30. (1993)
- Caula A. B., Govind C. S. Picloram induced somatic embryogenesis in *Gasteria* and *Haworthia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 2: 123-132. (1983).
- Chadwick CC, Goormaghtigh E, Scarborough GA.. A hexameric form of the *Neurospora crassa* plasma membrane HC-ATPases. *Arch. Biochem. Biophys.* 252:348–56 (1987)
- Charles, L., Trends in New Crops and New Use, ASHS Press, Alexandria, VA (2002).
- Chen, Y-Y., Lin, L-H., Wu, J-M., Qi, J-M. and Zhou, R-Y., Genetic effect analysis of some field and quality traits of kenaf hybrid and parents. *Plant fibers and products* 26:261-266. (2004).
- Cheng Z., Lu B., Baldwin B.S., Sameshima K. E Chen J. Comparative studies of genetic diversity in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) varieties based on analysis of agronomic and RAPD data. *Hereditas* 136 : 231–239. (2002)
- Cheng Z., Lu B., Sameshima K., Fu D. E Chen J., Identification and genetic relationships of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) germplasm revealed by AFLP analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51: 393–401, (2004)
- Cheng, Z., Kenaf research, products and applications in Japan. *Plant Fibers and products* 23(3): 16-24. (2001).
- Chiang V.L., Puumala R.J., Takeuchi H., Eckert R.E., Comparison of softwood and hardwood kraft pulping, *Tappi J.* 71 173–176 (1988).
- Clark, T.F., A research of new fiber crops, Part V. Pulping study on kenaf. *Tappi J.* 45(10): 780-786. (1962).
- Cook, C.G. e. Scott A.W.Jr.. Plant populations effects on kenaf seed production. *Proc. Int. Kenaf Assn. Conf. Irving, TX.* 7:153–158. (1995)
- Davidonis GH, Hamilton RH. Plant regeneration from callus tissue of *Gossypium hirsutum* L. *Plant Sci Lett* 32:89–93 (1983)
- Delmer D. P. CELLULOSE BIOSYNTHESIS: Exciting Times for A Difficult Field of Study. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:245–76 (1999)
- Delmer D.P, Haigler CH. The regulation of metabolic flux to cellulose, a major sink for carbon in plants. *Metabolic Engineering* 4: 22–28. (2002).
- Dempsey, J.M., Fiber Crops. Rose Printing Company, Tallahassee, FL (1975).
- Desnos T., Orbovic V., Bellini C., Kronenberg J., Caboche M. procuste 1 mutants identify two distinct genetic pathways controlling hypocotyl cell elongation, respectively in dark and light-grow *Arabidopsis* seedling. *Development* 122: 683-693 (1996)
- Dimmel D.R., MacKay J.J., Althen E.M., Parks C. and Sederoff R.R. Pulping and bleaching of CAD-deficient wood. *J. Wood Chem. Technol.* 21: 1–17. (2001).
- Dineshkumar V., Kirti P.B., Sachan J.K.S., Chopra V.L., Picloram induced somatic embryogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Science*, 109:2 207-213(7) (1995).
- Dixon RA, Chen F, Guo D, Parvathi K. The biosynthesis of monolignols: a “metabolic grid,” or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? *Phytochemistry* 57:1069–84 (2001).

- Doblin M. S., Kurek I., Jacob-Wilk D., Delmer D. P., Cellulose Biosynthesis in Plants: from Genes to Rosettes. *Plant Cell Physiol.* 43 (12): 1407–1420 (2002).
- Donaldson D.A., Lignification and lignin topochemistry—an ultrastructural view, *Phytochemistry* 57 859–873 (2001).
- Edmonds, J. M., The distribution of *Hibiscus* L. section *Furcaria* in tropical East Africa, *Systematical and ecogeographical studies on crop gene pools* 6, Rome: IBPGR/IJO, (1991).
- Englehardt J. Sources, industrial derivatives, and commercial applications of cellulose. *Carbohydr. Eur.* 12:5– 14 (1995).
- Farrokhi N., Burton R.A., Brownfield L., Hrmova M., Wilson S.M., Bacic A., Geoffrey B. F. Plant cell wall biosynthesis: genetic, biochemical and functional genomics approaches to the identification of key genes. *Plant Biotechnology Journal.* 4:145–167 (2006).
- Firoozabady E., DeBoer D., Merlo D., Halk E., Amerson L., Rashka K.E., Murray E.E. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants, *Plant Mol. Biol.* 10: 105–116 (1987).
- French AD, DelmerDP.. The structure and mechanism of biosynthesis of cellulose. In *The Discoveries in Plant Biology Series*, Vol. 3, (1999).
- French AD, Miller DP, Aabloo A. Miniature crystal models of cellulose polymorphs and other carbohydrates. *Int. J. Biol Macromol.* 15:30–36 (1993).
- Ganesan M., Jayabalan N. Evaluation of haemoglobin (erythrogen): for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2). *Plant Cell Rep* 23:181–187 (2004).
- Ganesan M., Jayabalan N., Carbon source dependent somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton, *Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR2 through suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* (87) 3: 273-284 (2006).
- Gassama-Dia K.Y., Sène D., Ndoeye M. Direct genetic transformation of *Hibiscus sardiffa*. *African Journal of biotechnology.* 3: (4) 226-228 (2004)
- Gibeaut, D. Nucleotide sugars and glycosyltransferases for synthesis of cell wall matrix polysaccharides. *Plant Physiol. Biochem.* 38, 69–80. (2000)
- Goujon T., Sibout R., Eudes A., MacKay J., Jouanin L. Genes involved in the biosynthesis of lignin precursors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41 677–687(2003)
- Grima-Pettenati J., Goffner D. Lignin genetic engineering revisited. *Plant Science* 145 51–65(1999).
- Guo, D., Chen, F., Wheeler, J., Winder, J., Selman, S., Peterson, M. and Dixon, R.A. Improvement of in-rumen digestibility of alfalfa forage by genetic manipulation of lignin O-methyltransferases. *Transgenic Research* 10: 457-464. (2001).
- Hatfield R., Vermerris W., Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity, *Plant Physiol.* 126:1351–1357 (2001)
- Herath S.P., Suzuki T., Hattori K. Multiple shoot regeneration from young shoots of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 49–53. (2004)

- Herath S. P., Suzuki T., Hattori K. Factors influencing *Agrobacterium* mediated genetic transformation of kenaf. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82: 201–206 (2005)
- Higgins, J.J. and G.A. White.. Effects of plant populations and harvest date on stem yield and growth components of kenaf in Maryland. *TAPPI* 52:667–668. (1969)
- Hoekema A., *et al* A binary plant vector strategy based on separation of vir and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303, 179-180 (1983)
- Holland N, Holland D., Helantjaris T., Dhugga K.S., Xoconostle-Cazares B., Delmer DP. A comparative analysis of the plant cellulose synthase (CeSA) gene family. *Plant physiologist* 123:1313-1323 (2000)
- Holsters M., Silva B., Van Vliet F., Genetello C., De Block M., Dhaese P., Depicker A., Inzè D., Engler G., Villaroel R., Van Montagu M., Scell J. The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* pTiC58. *Plasmid*, 3:212-230. (1980).
- Hosomi, K., Utilization of dried kenaf-leaves to the meals. Proceedings of the 2000 international kenaf symposium, Hiroshima, Japan, Oct. 13-14, pp.171-176. (2000)
- Hu W.-J., Lung, J. Popko J.L., Harding S.A., Kawaoka A., Kao Y.-Y., Hideki S., Stokke D.D., Rinaldi P.L., Tsai C.-J., Chiang V.L. Reduced lignin quality, increased cellulose content, and enhanced growth in transgenic aspen trees. *The 8th Meeting of the Conifer Biotechnology working group*, June 7–11, Rutgers University, USA. (1998)
- Hu W.J.,. Harding S.A., Lung J.,. Popko J.L., Ralph J., Stokke D.D., Tsai C.J., e Chiang V.L. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nature Biotechnology* 17: 808-812 (1999)
- Huetteman C.A., Preece J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 33:105–119 (1993).
- Jarvis, M. Chemistry: cellulose stacks up. *Nature*, 426, 611– 612 (2003).
- Jones, M.D., Puentes, C. and Suarze, R., Isolation of kenaf for seed increase. *Agronomy Journal* 47: 256-257 (1955).
- Jones L., Ennos A.R. and Turner S.R. Cloning and characterization of irregular xylem4 (*irx4*): a severely lignin-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Plant J.* 26: 205–216 (2001).
- Joshi C.P., Bhandari S., Ranjan P., Kalluri U.C., Liang X. genomics of cellulose biosynthesis in poplars. *New phytologist.* 164: 53-61 (2004).
- Jung H.G., Deetz D.A., Cell wall lignification and degradability, in: J.H. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield, J. Ralph (Eds.), Forage cell wall structure and digestibility, American Society of Agronomy, Madison, WI, 315–340. (1993).
- Kano, T., Development and prospect of kenaf board. *Reference No.47 of the kenaf society of Kochi and economic reports of Ehime.* 25(44): (1997).
- Khatun A., Zabun Naher, Shirin Mahboob, Chandan Kumar Saha and Shana Bilkis An Efficient Protocol for Plant Regeneration from the Cotyledons of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) *Biotechnology* 2: (2) 86-93, (2003).
- Klein TM, Wolf ED, Wu R and Sanford JC High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327: 70-73. (1987)

- Kozłowski, R. Bast fibrous plants as a source of raw materials for diversified areas of application. *Fiber crops* 21(3): 51-55. (1996).
- Kumria R, Sunnichan VG, Das DK, Gupta SK, Reddy VS, Bhatnagar RK, Leelavathi S. High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress. *Plant Cell Rep* 21:635–639 (2003).
- Lam T. B. T. Structural details of kenaf cell walls and fixation of carbon dioxide. *Proceedings of the 2000 international kenaf symposium, Hiroshima, Japan*, OCT. 13-14, pp.81-90. (2000).
- Lam T.B.T, Hori K., Iiyama K., structural characteristics of cell walls of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) and fixation of carbon dioxide. *Journal of wood science* 49 255-261 (2003).
- Li L., Zhou Y., Cheng X., Sun J., Marita J.M., Ralph J. e Chiang V. L. Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. *P.N.A.S.* 100: 8 4939–4944 (2003).
- Li, A.Q., Report of the germplasm collecting for jute & kenaf in Kenya. *Plant Fibers and Products* 1: 16-21 (1990).
- Li, D. Kenaf production, research and development in China. International kenaf symposium. T.N. USA. (2002).
- Lin, P., Lin, L., Wu, J. and Lin, N., Breeding of FuHong4, a kenaf variety with high-yielding and resistance. *Plant fiber and products* 26: 1-4 (2004).
- Liu, A.M., World production and potential utilization of jute, kenaf and allied fibers. In: *Proceedings of the 2000 international kenaf symposium*. Hiroshiam, Japan, pp. 30-35. (2000).
- Liu, A.M., Making pulp and paper from Kenaf <http://www.chinaconsultinginc.com/paperpulp.htm> (2003).
- Lu C The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cell Dev Biol* 29:92–96 (1993).
- Majeed A., Husnain T., Riazuddin S., Transformation of virus resistant genotype of *Gossypium hirsutum* L. with pesticidal gene. *Plant Biotechnol.* 17 105–110 (2000).
- Matthyse AG, Thomas DL, White AR: Mechanism of cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol.* 177:1076-1081 (1995).
- Mazumder, B. B., A combination treatment of kenaf bast fiber for high viscosity pulp. *Journal of Wood Science* 46: 364-370. (2000).
- McCann, M. and Roberts, K. Changes in cell wall architecture during cell elongation. *J. Exp. Bot.* 45, 1683–1691. (1994).
- McLean K.S., Lawrence g.W., Reichter N.A., Callus induction and adventitious organogenesis in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Plant Cell Report* 11: 532-534 (1992).
- Mishra R, Wang HY, Yadav NR, Wilkins TA. Development of a highly regenerable elite Acala cotton (*Gossypium hirsutum* cv. Maxxa)—a step toward genotype-independent regeneration. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 73:21–35 (2003).
- Mølhøj M, Ulvskov P, Dal Degan F: Characterization of a functional soluble form of a Brassica napus membrane-anchored endo-1,4-β-glucanase heterologously expressed in *Pichia pastoris*. *Plant Physiol* 127:674-684. (2001).

- Morrison III W. H., Akin D.E, Archibald D.D., Dodd R.B., Raymer P. L., Chemical and instrumental characterization of maturing kenaf core and bast. *Industrial Crops and Products* 10: 21–34 (1999).
- Nelson, G.H., Nieschlag H. J. and Wolff, I.A., A research for new fiber crops, V. Pulping studies on kenaf. *TAPPI* 45(10): 780-786. (1962).
- Nishimura N., Izumi A., Kuroda K., Structural caratterizzation of kenaf lignin: differences among kenaf varieties. *Industrial crop and products* 15 115-122 (2002).
- O nnerud H, Zhang L, Gellerstedt G, Henriksson G. Polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation: a new model in lignin biosynthesis. I. *Plant Cell* 14:1953–62 (2002).
- O’Connell A, Holt K, Piquemal J, Grima-Pettenati J, Boudet A. Improved paper pulp from plants with suppressed cinnamoyl-CoA reductase or cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Transgenic Res.* 11:495–503 (2002).
- Pear JR, Kawagoe Y, Schreckengost WE, Delmer DP, Stalker DM Higher plants contain homologs of the bacterial celA genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase. *Proc Natl Acad Sci* 93: 12637–12642 (1996).
- Perrin RM: How many cellulose synthases to make a plant? *Curr Biol* 11:R213-R216 (2001).
- Pilat, G., Guiney, E., Holt, K., Petit-Conil, M., Lapierre, C., Leple´ , J.- C., Pollet, B., Mila, I., Webster, E., Marstorp, H.G., Hopkins, D.W., Jouanin, L., Boerjan, W., Schuch, W., Cornu, D., Halpin, C., Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. *Nature Biotechnology* 20, 607–612. (2002).
- Piquemal J, Lapierre C, Myton K, O’Connell A, Schuch W, *et al.* Down-regulation in cinnamoyl-CoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants. *Plant J.* 13:71–83 (1998).
- Ralph J., An unusual lignin from kenaf. *Journal of natural products.* 59:(4) (1996).
- Ralph J, Lapierre C, Marita JM, Kim H, Lu F, *et al.* Elucidation of new structures in lignins of CAD- and COMT-deficient plants by NMR. *Phytochemistry* 57:993–1003 (2001).
- Ramaswamy, G.N. and Boyd, C.R., Kenaf as a Textile Fiber: Processing, Fiber Quality, and Product Development. In: Goforth, C.E. and Fuller, M.J. (eds.). A summary of kenaf production and product development research. *Mississippi State University Bulletin*, 1011, pp. 31-33. (1994).
- Read SM, Bacic T. Prime time for cellulose. *Science* 295: 59–60. (2002).
- Reichert, N.A. and B.S. Baldwin, Potential for kenaf improvement via somaclonal variation. *Progress in new crops.* pp: 408-411. (1996).
- Richmond T.A., Somerville C.R., The Cellulose Synthase Superfamily. *Plant Physiology.* Vol. 124 (2000).
- Robinson D. SuSy ergo GluSy: new developments in the field of cellulose biosynthesis. *Bot. Acta* 109:261–63 (1996).
- Roussel MR, Lim C. Dynamicmodel of lignin growing in restricted spaces. *Macromolecules* 28:370–76 (1995).
- Rowell, R. M. and Han, J.S., Changes in kenaf properties and chemistry as a function of growing time. In: Kenaf properties, processing and products. Mississippi State University. Mississippi State, MS., pp.32-57 (1999).

- Saeed N.A., Zafar Y., Malik K.A. A simple procedure of *Gossypium* meristem shoot tip culture, *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 51: 201–207 (1997).
- Sambrook, J., Fritsch E. F. e Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2a edizione*, Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. (1989).
- Sameshima, K., Improvement of kenaf core oil absorption property by heat treatment at 200-500°C. Proceedings of 3rd annual America kenaf society conference, Corpus Christi, TX, February, pp. 64-72. (2000).
- Samuels AL, Rensing K, Douglas CJ, Mansfield S, Dharmawardhana P, Ellis B.. Cellular machinery of wood production: differentiation of secondary xylem in *Pinus contorta* var. *latifolia*. *Planta* 216:72–82 (2002).
- Sanchez-Garcia I, Rabbitts TH. The LIM domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins. *Trends Genet.* 10:315–20(1994).
- Sanford *et al.* optimizing the biolistic process for different biological application. *Methods in Enzymology* 217, pp 482-509. (1993).
- Sato S, Kato T, Kakegawa K, Ishii T, Liu Y-G, Awano T, Takabe K, Nishiyama Y, Kuga S. Role of the putative membranebound endo-1,4-β-glucanase KORRIGAN in cell elongation and cellulose synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 42:251-263 (2001).
- Satyavathi V.V., Prasad V., Gita Lakshmi B., Lakshmi Sita G. High efficiency transformation protocol for three Indian cotton varieties via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 162 215–223 (2002).
- Scheible W-R, Eshed R, Richmond T, Delmer D, Somerville C: Modifications of cellulose synthase confer resistance to isoxaben and thiazolidinone herbicides in *Arabidopsis* *ixr1* mutants. *Proc Natl Acad Sci* 98:10079-10084. (2001).
- Scott, A., Kenaf seed production: 1981-82. Rio Farms, Inc. *Biennial Report for 1980-1981*. Monte Alto, TX, pp. 60-63. (1982).
- Seca, A.M.L., Cvaleiro, J.A.S., Domingues, F.M.J., Silvestre, A.J.D., Evtuguin, D., Neto, C.P.,. Structural characterization of the bark and core lignins from kenaf (*Hibiscus cannabinus*). *J. Agric. Food Chem.* 46: 3100–3108. (1998).
- Sewalt, V.J.H., Ni, W., Blount, J.W., Jung, H.G., Masoud, S.A., Howles, P.A., Lamb C., Dixon, R.A., Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco downregulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiology* 115, 41–50. (1997).
- Srivatanakul M, Park SH, Sanders JR, Salas MG & Smith RH Multiple shoot regeneration of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) from a shoot apex culture system. *Plant Cell. Rep.* 19: 1165–1167 (2000).
- Srivatanakul M, Park SH, Salas MG & Smith RH. Transformation parameters enhancing T-DNA expression in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) *J. Plant Physiol.* 158: 255–260 (2001).
- Steeves C, Forster H, Pommer U, Savidge R. Coniferyl alcohol metabolism in conifers. I. Glucosidic turnover of cinnamyl aldehydes by UDPG: coniferyl alcohol glucosyltransferase from pine cambium. *Phytochemistry* 57:1085–93 (2001).
- Sterling, J., Quigley, H., Orellana, A. and Mohnen, D. The catalytic site of the pectin biosynthetic enzyme alpha-1,4- galacturonosyltransferase is located in the lumen of the Golgi. *Plant Physiol.* 127, 360–371. (2001)

- Su, J., Chen, A. and Lin, J. Genetic diversity, evaluation and utilization of kenaf germplasm in china. *Plant fiber and products* 26(1): 5-9. (2004).
- Terashima N, Fukushima K, He LF, Takabe K. Comprehensive model of the lignified plant cell wall. In *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*, ed. HG Jung, DR Buxton, RD Hatfield, J Ralph, pp. 247–70. Madison: ASACSSA SSSA. 794 pp. (1993).
- Thomas J.C., Adams D.G., Keppenne V.D., Wasmann C.C., Brown J.K., Kanost M.R., Bohnert H.J., Protease inhibitors of *Maduca sexta* expressed in transgenic cotton, *Plant Cell Rep.* 14: 758–762 (1995).
- Umbeck P., Johnson G., Barton K., Swain W. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Biotechnology* 5: 235–266 (1987).
- Valverde R., Arias O., Thorpe T. A., Picloram-induced somatic embryogenesis in pejobaye palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 10:2 149-156 (1987).
- Van Canneyt G., Schimdt R., O' Connor-Sanchez A., Willmitzer L., Rocha-Sosa M. Construction of an intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium* mediated plant transformation. *Mol.Gen.Genet.*, 220: 245-250. (1990).
- Van Soest P.J., Wine R.H. Determination of lignin and cellulose in Acid-Detergent Fibre with permanganate. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, 51: 780-785 (1968)
- Vance C.P., Kirk T.K., Sherwood R.T., Lignification as a mechanism of disease resistance, *Ann. Rev. Phytopathol.* 18 259–288 (1980).
- Villar J. C., Pveda P., Tagle J.L. comparative study of kenaf varieties and growing condition and their effect on kraft pulp quality. *Wood science and technology*, 34 543-552 (2001).
- Visser C, Qureshi JA, Gill R, Saxena PK Morphoregulatory role of thidiazuron. Substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures. *Plant Physiol* 99:1704–1707 (1992).
- Webber C. L., III e Bledsoe V.K. Kenaf Yield Components and Plant Composition. *Trends in new crops and new uses.* (2002).
- Wilkins TA, Rajasekaran K, Anderson D. Cotton biotechnology. *Crit Rev Plant Sci* 15:511–550 (2000).
- Williamson RE, Burn JE, Hocart CH: Cellulose synthesis: mutational analysis and genomic perspectives using *Arabidopsis thaliana*. *Cell Mol Life Sci* 58:1475-1490 (2001).
- Wilson, F.D., Summers T.E., Joyner J.F., Fishler D.W, e Seale C.C. Everglades 41' and 'Everglades71', two new cultivars of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) for the fiber and seed. *Florida Agr. Expt. Sta. Cir.* S-168. (1965).
- Wilson, F.D.. Kenaf history and botany. <http://www.kenafsociety.org/KENAFbotany.htm> (2003)
- Wong HC, Fear AL, Calhoon RD, Eichinger GH, Mayer R, Amikam D, Benziman M, Gelfand DH, Meade JH, Emerick AW *et al.* Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:8130-8134 (1990).

- Zapata C., Srivatanakul M., Park S.H., Lee B.M., Salas M. G., Smith R. H., Improvements in shoot apex regeneration of two fiber crops: cotton and kenaf. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 185–191 (1990).
- Zhang BH, Feng R, Liu F, Wang Q. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety. *Bot Bull Acad Sin* 42:9–16 (2001).
- Zhang T. Improvement of kenaf yarn for apparel application. Master thesis of Louisiana State University, US. (2003).
- Zhou C., Lu B., Sameshima K., Fu D., Chen j. Identification and genetic relationships of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) germplasm revealed by AFLP analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51: 393–401. (2004).

PUBBLICAZIONI

- Poster: **G. RUOTOLO**, P. CHIAIESE, C. GALANTE, E. FILIPPONE Cloning of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) lignin and cellulose biosynthesis genes. Proceedings of the XLIX Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress Potenza, Italy – 12/15 September, 2005
- Poster: **G. RUOTOLO**, P. CHIAIESE, E. FILIPPONE. Cloning of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) lignin and cellulose major biosynthesis genes sequences. Plant-Gems Annual Congress September 2006 Venice-Italy
- Poster: **G. RUOTOLO**, A. DI MATTEO, P. CHIAIESE. Isolamento e caratterizzazione di sequenze di geni della biosintesi di lignina e cellulosa in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). Giornate Scientifiche del polo delle Scienze e delle Tecnologie per la vita. Università degli Studi di Napoli "Federico II", Settembre 2007.
- Poster: **RUOTOLO G.**, DI MATTEO A., CHIAIESE P., FILIPPONE E. Cloning of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) major lignin and cellulose biosynthesis gene sequences and their expression analysis during plant development. Proceedings of the LI Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress Riva del Garda, Italy – 23/26 September, 2007

CLONING OF KENAF (*HIBISCUS CANNABINUS* L.) MAJOR LIGNIN AND CELLULOSE BIOSYNTHESIS GENE SEQUENCES AND THEIR EXPRESSION ANALYSIS DURING PLANT DEVELOPMENT

RUOTOLO G.*, DI MATTEO A.**, CHIAIESE P.*, FILIPPONE E.*

University of Naples - Department of Soil, Plant, Environmental and Animal Production Sciences,

(*) School of Biotechnology; (**) School of Agriculture

kenaf, lignin, cellulose, gene cloning, qPCR

Lignin and cellulose are the high abundant biopolymers in plant cell wall. In the recent years, the demand of vegetable fibers has increased steadily, due to their good mechanical and biodegradability proprieties and due to the increase of biocomposite material production. However, biocomposite industry requires vegetable fibers with features that are closely at the industrial requirements. Since the rheological properties of biocomposite materials deal with the total content and quality of lignin and cellulose-composing fibers, biosynthesis knowledge of those two important biopolymers is an essential phase in biotechnologically-oriented plant breeding. Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) is an important herbaceous plant cultivated mainly as source of the two above-mentioned fibers. In particular, lignin fibers are mainly present in the stem corticalexternal part (bark); the internal part (core) furnishes light and absorbent wood due to its highcontent of cellulose.

The final goal of our research group is to modify quantity and quality of kenaf fibers for specific industrial uses. This genetic approach, however, needs the basic scientific knowledge of the time-course expression of the major genes involved in lignin and cellulose biosynthesis pathways and the related final compound biosynthesis quantity during the plant growth. We focused our research on four lignin biosynthesis genes (*cad*, cinnamyl alcohol dehydrogenase; *ccr*, cinnamoyl-CoA oxidoreductase; *c4h*, cinnamate 4-hydroxylase; *4-cl*, 4-coumarate:CoA ligase) and on one ofthe cellulose synthase gene family (*CeSA1*).

As reported previously (Ruotolo *et al.*, Proc. SIGA Congress, B.48, 2005) a bioinformatics approach was applied to design primers on highly conserved coding sequences. Partial sequences of the above mentioned genes were cloned and nucleotide sequences obtained from genomic DNA and cDNAs. Comparison sequences analysis, based on nucleotide or amino acid residues, for each single gene has shown high identity percentage to other plant genes, mainly with other Malvaceae species like cotton (*Gossypium* spp.). Following a similar approach, a sequence of a kenaf actin

gene was isolated and cloned, in order to have a reference for the further gene expression analysis. Kenaf cv. Dowling plants were grown under environmental controlled conditions in a growth chamber. Analyses of *c4h*, *cad* and *CeSA1* gene expression were carried out on mRNAs extracted from bark and core from 30, 60 and 90 days after sowing. mRNA from the kenaf actin gene was used as internal control. qPCR analysis has shown the variation of each gene expression both during plant growth and between core and bark.

ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI SEQUENZE DI GENI DELLA BIOSINTESI DI LIGNINA E CELLULOSA IN KENAF (*HIBISCUS CANNABINUS* L.)

G. Ruotolo¹, A. Di Matteo², P. Chiaiese¹

Dipartimento di Scienze del Suolo della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali

1) Facoltà di Scienze Biotecnologiche; 2) Facoltà di Agraria

La pianta di kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) è un'erba annuale coltivata essenzialmente per la produzione di fibre vegetali. Queste stanno assumendo sempre maggiore interesse in campo

tecnologico per la produzione di materiali biocompositi che presentano, oltre a caratteristiche di buone proprietà meccaniche, anche quella della biodegradabilità. Tali materiali sono oggi particolarmente apprezzati, anche a seguito di specifiche direttive della UE, nel campo della bioedilizia e della componentistica ad alta biodegradabilità impiegata nell'industria automobilistica. L'industria dei materiali biocompositi richiede fibre vegetali con caratteristiche che sempre più si adattino al processo di lavorazione ed agli usi finali. La modifica delle caratteristiche reologiche dei materiali passa anche attraverso l'ottenimento di fibre con adeguati contenuti di cellulosa e lignina e, quindi, particolare importanza rivestono ricerche tese a delucidare i processi di biosintesi di questi importanti polimeri vegetali.

Il nostro gruppo ha iniziato una ricerca allo scopo di isolare e caratterizzare i principali geni coinvolti nella biosintesi della lignina e della cellulosa nella pianta di kenaf. Per quanto concerne la via biosintetica della lignina, i geni studiati sono stati: *c4h* (cinnamato-4-idrossilasi); *cad* (cinnamilalcol-deidrogenasi); *ccr* (cinnamil-CoA-ossidoreduttasi) e *4cl* (4-cumarato-CoA-ligasi). Per la via biosintetica della cellulosa è stato studiato un gene della famiglia genica CeSA (cellulosa-sintetasi).

Per isolare sequenze geniche putativamente riferite ai geni sopra citati è stato scelto un approccio bioinformatico. Zone altamente conservate per ogni singolo gene sono state identificate a seguito di allineamento di tutte le sequenze EST di pianta presenti in banca dati ed i primer disegnati sulla base delle sequenze mostranti la più alta identità. Le reazioni di amplificazione sono state condotte su DNA genomico e su cDNA isolati da piante della cv Dowling allevate in camera di crescita. Tale cultivar è stata scelta in quanto rappresenta quella che fornisce la più alta quantità di fibre tra quelle in commercio. Gli ampliconi ottenuti sono stati clonati e sequenziati. L'analisi comparativa delle sequenze nucleotidiche dei singoli geni ha mostrato un'alta percentuale d'identità con le sequenze degli stessi geni di altre specie, principalmente con quelli appartenenti alla famiglia delle Malvaceae. Tali sequenze sono state poi depositate in banca dati e rese pubbliche. Inoltre è stata valutata l'espressione dei geni *c4h*, *cad* e CeSA dopo 30, 60 e 90 giorni dalla semina, mediante analisi qPCR. Essa è stata eseguita su mRNA isolati dal tessuto epidermico e da quello del midollo di piante allevate in condizioni controllate. I risultati mostrano l'espressione differenziale di questi geni nei tessuti e durante lo sviluppo della pianta.

CLONING OF KENAF (*HIBISCUS CANNABINUS* L.) LIGNIN AND CELLULOSE MAJOR BIOSYNTHESIS GENES SEQUENCES

G. Ruotolo, P. Chiaiese, E. Filippone

Department of Soil, Plant and Environmental Sciences, School of Biotechnology, University of Naples "Federico II" - filippone@unina.it

kenaf, *Hibiscus cannabinus*, cellulose, lignin, gene isolation

Kenaf (*Hibiscus cannabinus*) belongs to the Malvaceae family. It is an annual herbaceous fibre crop, native to tropical regions of Asia and Africa. The cortical external part and the core are particularly amenable to be used in bio-composite materials, mainly for automotive and house building industries; furthermore, bio-composite materials are highly biodegradable and their uses reduce the environmental pollution. In order to study lignin and cellulose biosynthesis major genes expression time course in this species, we have begun a project to isolate them, on the basis of biological information already available from other plant species. Preliminary, we have focused our interest on the following lignin biosynthesis genes: cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD); cinnamoyl-CoA oxidoreductase (CCR); cinnamate 4-hydroxylase (C4H); 4-coumarate:CoA ligase (4CL); and cellulose synthase genes (CeSA). A bio-informatics approach was followed to design primers for PCR of the above-listed genes. Primers were designed on highly conserved coding sequences of these genes already isolated and sequenced from other plant species. RT-PCR analysis carried out on mRNA isolated from young stems and petioles showed some amplified fragments; they were cloned and sequenced. All expressed sequences were found to have high identity with related sequences of the above-mentioned lignin and cellulose biosynthesis genes from other plant species, mainly with the Malvaceae ones. Q-PCR experiments are now in course to study the time course expression of these genes during kenaf development in controlled environmental conditions.

CLONING OF KENAF (*HIBISCUS CANNABINUS* L.) LIGNIN AND CELLULOSE BIOSYNTHESIS GENES

G. RUOTOLO, P. CHIAIESE, C. GALANTE, E. FILIPPONE

Department of Soil, Plant and Environmental Sciences, School of Biotechnology, University of Naples "Federico II" - filippone@unina.it

kenaf, Hibiscus cannabinus, cellulose, lignin, gene isolation

Kenaf (*Hibiscus cannabinus*) is an annual herbaceous plant, native to tropical regions of Asia and Africa. It has a rapid growth and erect stem and it is grown for obtaining cellulose and lignin. Kenaf's stem is formed mainly of two parts: a cortical external part (called "bark") that gives long fibres (2-6 mm) and accounting up to 35-40% of the total stem weight; a woody inside part (called "core") that furnishes light and absorbent wood. The core shows short fibres (0.6 mm) and represents 60-65% of the total stem weight.

Nowadays, kenaf is having an increasing interest as industrial crop due to high quality cellulose for paper production. Furthermore, the core and bark are particularly amenable to be used in bio-composite materials, mainly for automotive and house building industries. Kenaf-based bio-composite materials are highly biodegradable and, hence, their uses are suggested to reduce the environmental pollution and wastes. In recent years, the enforced EU policy deals with the reduction of woody plants as source of cellulose, replacing them with annual herbaceous plants; therefore, kenaf could be one of the best candidates as source of cellulose.

In order to modify the quantity and the quality of kenaf fibres for specific industrial uses by using up-to-date breeding strategies and techniques, there is a need to enlighten kenaf cellulose and lignin biosynthetic pathways. Recently, we have carried out some investigation on kenaf cellulose and lignin biosynthetic pathways, in a frame of a collaboration with the AgriKenaf Volturno, an industry interested in to improve this species in our country. As first step in our breeding programme, we are going to clone and sequence as many genes as possible involved into cellulose and lignin's biosynthesis. We have focused our interest on the following eleven genes: (a) lignin's biosynthesis genes: CAD, cinnamyl alcohol dehydrogenase; CCR, cinnamoyl-CoA oxidoreductase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumarate:CoA ligase; (b) cellulose synthase gene family: from CeSA1 to CeSA7.

Two cultivars have been used as source of DNA: Everglades 41, a historical variety for commercial kenaf growers; Dowling, a cultivar with higher bast fibres percentage. Plants were grown in a growth chamber, under controlled conditions.

In order to design primers for PCR of the above-listed genes, we did a bio-informatics approach; primers were designed on highly conserved coding sequences of these genes already isolated and sequenced from several monocots and dycots species. PCR analysis showed some amplified fragments. Regarding genes related with lignin's biosynthesis, C4H and CAD primers gave some amplification products. Regarding genes related with cellulose biosynthesis, some amplification products were obtained from PCR reactions with primers designed to amplify CeSA4, CeSA5 and CeSA7 genes.

One of the CAD amplified fragments has been sequenced in our laboratory, and the resultant sequence appeared to be homologous to the sequence of the *Nicotiana tabacum* CAD14. We are now sequencing the other amplified fragment and modifying the other primers that did not give any amplification results.