



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	101999900750766
Data Deposito	09/04/1999
Data Pubblicazione	09/10/2000

Priorità	60/081,169
Nazione Priorità	US
Data Deposito Priorità	

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	01	H		

Titolo

METODO PER AUMENTARE IN MODO SELETTIVO I GLUCOSINOLATI ANTICANCEROGENI
IN BRASSICA SP.

09 APR. 1999

I0087738/GL

Titolare : PLANT BIOSCIENCE LIMITED

DESCRIZIONE

La presente invenzione è relativa a metodi per l'aumento selettivo di derivati anticancerogeni di glucosinolato in specie del genere *Brassica* e a specie di *Brassica* con livelli aumentati di derivati anticancerogeni di glucosinolato e in particolare a ortaggi commestibili del genere *Brassica* con livelli elevati dei derivati anticancerogeni di glucosinolato 4-metilsolfinilbutile isotiocianato e/o 3-metilsolfinilpropile isotiocianato. La presente invenzione mette anche a disposizione metodi per la selezione di combinazioni genetiche di broccoli che contengono livelli elevati di derivati anticancerogeni di glucosinolato e metodi per la valutazione delle proprietà anticancerogene di queste combinazioni genetiche. La presente invenzione riguarda inoltre composizioni di materia che comprendono ortaggi del genere *Brassica* con concentrazioni di glucosinolato di 4-metilsolfinilbutile e/o di glucosinolato di 3-metilsolfinilpropile comprese tra 10 e 100 $\mu\text{moli/g}$ di peso secco.

CONOSCENZE TECNICHE DI RIFERIMENTO

-----La presente invenzione mette a disposizione metodi per la produzione di ortaggi del genere *Brassica* con livelli elevati di specifici glucosinolati e loro

Dr. Giorgio LONG
N. 1547 ALBO 834 B
(in proprio e per gli altri)

derivati. In particolare la presente invenzione mette a disposizione metodi per la produzione e la selezione di ortaggi del genere *Brassica* con livelli elevati di glucosinolati di 3-metilsolfinilpropile e/o 4-metilsolfinilbutile. Questi glucosinolati vengono convertiti, grazie all'attività dell'enzima mirosinasi, in derivati di isotiocianato dei quali è stato dimostrato che sono potenti induttori di enzimi di detossificazione della fase II, una cui attività elevata è associata con una ridotta sensibilità agli effetti neoplastici dei cancerogeni. La presente invenzione mette a disposizione combinazioni genetiche che 1.) presentano livelli elevati di glucosinolato di 4-metilsolfinilbutile e/o di glucosinolato di 3-metilsolfinilpropile e 2.) presentano una bassa attività dell'allele *GSL-ALK* che codifica un'attività in grado di convertire questi glucosinolati nei derivati alchenilici, che non possiedono le proprietà anticancerogene dei derivati di tipo isotiocianato di questi glucosinolati, e 3.) attività mirosinasica adatta in grado di produrre derivati di tipo isotiocianato dei detti glucosinolati. Di conseguenza queste combinazioni genetiche forniscono livelli elevati di glucosinolati specifici, una ridotta produzione di derivati alchenilici di questi glucosinolati e una produzione favorita di derivati di tipo isotiocianato dei detti glucosinolati. La presente

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO 834 B
(in proprio e per gli altri)

invenzione riguarda inoltre l'uso di marcanti genetici per la selezione delle combinazioni genetiche descritte sopra.

E' noto che una dieta ad elevato tenore di ortaggi è associata ad una riduzione del rischio di certi tipi di cancro e di conseguenza è desiderabile includere una quantità significativa di ortaggi nella dieta umana. L'attività anticancerogena di ortaggi è stata associata con la presenza di varie classi di metaboliti secondari. Vi è una crescente evidenza che alcuni di questi metaboliti secondari sono implicati nella riduzione del rischio di certi tipi di cancro e di conseguenza sono considerati anticancerogeni. Di conseguenza un aumento del livello di metaboliti anticancerogeni fornisce una strategia utile per la riduzione del rischio di cancro a complemento del consiglio dietetico di aumentare il consumo di ortaggi.

Il meccanismo preciso per mezzo del quale gli ortaggi forniscono una riduzione del rischio di molti tipi di cancro non è noto con certezza, ma vi sono molte linee di dimostrazione che sostengono l'implicazione degli ortaggi nella prevenzione del cancro. In particolare, il ruolo degli ortaggi che appartengono alle crucifere nella prevenzione del cancro è ampiamente supportato da studi epidemiologici e più recentemente da studi biochimici. Una classe di metaboliti secondari che è implicata negli effetti benefici degli ortaggi appartenenti alle crucifere

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO 834 B
(in proprio e per gli altri)

è costituita dai derivati di tipo isotiocianato di certi glucosinolati. Quattro prove complementari fanno pensare che gli isotiocianati derivati dall'idrolisi dei glucosinolati di metilsolfinilalchile che si trovano nelle crucifere possano essere importanti nella dieta umana per ridurre il rischio di cancro. (1.) La fornitura dietetica di ortaggi appartenenti alle crucifere protegge i roditori dal cancro indotto per via chimica (Wattenberg, L. W. (1985) *Cancer Res.* 45, 1-8.). (2.) Gli isotiocianati di metilsolfinilalchile sono notoriamente potenti induttori degli enzimi di detossificazione della fase II nelle cellule Hepa 1c1c7 di epatoma di topo in coltura (Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C.-G., & Posner, G. H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2399-2403 e Tawfiq, N., Heaney, R. K., Plumb, J. A., Fenwick, G. R., Musk, S. R. R., & Williamson, G. (1995) *Carcinogenesis* 16, 1191-1194.), che sono associati con una ridotta sensibilità dei mammiferi e delle colture di cellule di mammifero agli effetti tossici e neoplastici dei cancerogeni. (3.) Il solforafano (isotiocianato di 4-metilsolfinilbutile) blocca la formazione di tumori mammari in ratti Sprague-Dawley trattati con 9,10-dimetil-1,2-benzantracene (Zhang, Y., T. W., Cho, C.-G., Posner, G. H., & Talalay, P. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3147-3150.). (4.) Studi epidemiologici mostrano che persone con elevati livelli di

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO 834 B
(in proprio e per gli altri)

ortaggi nella loro dieta sono meno sensibili al cancro (Block, G., Patterson, B., & Suber, A. (1992) Nutr. and Cancer 18, 1-19.). Di conseguenza gli effetti benefici di una dieta ad elevato tenore di certi glucosinolati possono includere una riduzione del rischio di cancro. Tuttavia sembra che solo certi glucosinolati e più accuratamente certi derivati di specifici glucosinolati possano essere responsabili in prima linea dell'effetto benefico.

Vi sono numerosi singoli glucosinolati nelle piante delle crucifere. I glucosinolati hanno un residuo gliconico comune e una catena laterale agliconica variabile. La struttura della catena laterale del glucosinolato varia come lunghezza e come composizione chimica.

I glucosinolati vengono formati per l'azione di un certo numero di enzimi codificati da un piccolo numero di alleli di biosintesi dei glucosinolati (alleli GSL). Nel percorso del glucosinolato, la metionina viene convertita in omometionina e diometionina per l'attività dell'allele GSL-ELONG. La omometionina viene alla fine convertita in glucosinolato di 3-metiltiopropile a cui segue la conversione in glucosinolato di 3-metilsolfinilpropile grazie all'attività dell'allele GSL-OXID e infine in glucosinolato di 2-propenile grazie all'attività dell'allele GSL-ALK. La diomo-metionina viene

Dr. Giorgio LONG
N. iscr. ALBO 834 B
(in proprio e per gli altri)

convertita in glucosinolato di 4-metiltiobutile, poi in glucosinolato di 4-metilsolfinilbutile grazie all'attività dell'allele GSL-OXID, poi in glucosinolato di 3-butenile per l'attività dell'allele GSL-ALK e infine viene convertita in glucosinolato di 2-idrossi-3-butenile grazie all'attività dell'allele GSL-OH.

In generale, i glucosinolati di 3-metilsolfinilpropile e i glucosinolati di 4-metiltiobutile producono isotiocianati non volatili e di conseguenza questi particolari glucosinolati forniscono uno scarso contributo all'aroma. Al contrario, i derivati alchenilici volatili possono fornire un contributo all'aroma, sia in senso positivo che in senso negativo a seconda della specie vegetale e del particolare derivato di glucosinolato.

In ortaggi della specie *B. oleracea*, i glucosinolati hanno una catena laterale di tre o quattro atomi di carbonio. I glucosinolati possono venire idrolizzati grazie all'azione della mirosinasi che è spesso indotta da danno tissutale. Molti ortaggi sono provvisti di glucosinolati di alchenile (2-propenile e 3-butenile) da cui consegue la produzione di prodotti volatili a seguito di idrolisi tramite l'azione della mirosinasi. Alcuni ortaggi contengono un glucosinolato di 2-idrossi-3-butenile detto progoitrina. Questo glucosinolato produce un isotiocianato instabile che ciclizza spontaneamente a

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO 834 B
(in proprio e per gli altri)

produrre ossazolidon-2-tioni che sono indesiderabili nelle diete a motivo delle loro proprietà gozzigene. Gli isotiocianati derivati da glucosinolati di alchenile e di idrossialchenile possono avere effetti sia positivi che negativi sul gusto.

I broccoli accumulano bassi livelli di glucosinolati con catene laterali di 4-metilsolfinilbutile e 3-metilsolfinilpropile poiché i broccoli hanno un'attività molto ridotta dell'allele GSL-ALK che è responsabile della conversione dei glucosinolati in derivati alchenilici. Si ritiene che la popolarità dei broccoli come ortaggio sia dovuta in parte al contributo relativamente modesto al sapore fornito dai derivati di glucosinolato di 4-metilsolfinilbutile e 3-metilsolfinilpropile al contrario del forte gusto impartito da altri glucosinolati, in particolare i derivati volatili di glucosinolati.

Di conseguenza metodi per aumentare la quantità dietetica di specifici derivati di tipo isotiocianato di certi glucosinolati possono fornire ortaggi con proprietà anticancerogene migliorate senza alterare il sapore e/o il gusto dell'ortaggio. Tuttavia, la tecnica non fornisce un mezzo per aumentare in modo conveniente i livelli degli specifici glucosinolati negli ortaggi appartenenti alle crucifere. Per di più la tecnica non fornisce un mezzo

Dr. Giorgio LONG
N. iscr. ALBO 834 B
(in proprio e per gli altri)

conveniente per assicurare che questi glucosinolati non vengano convertiti nei derivati alchenilici ma piuttosto nei derivati del tipo isotiocianato che sono dotati di proprietà anticancerogene. Dei numerosi glucosinolati che possono venire prodotti da ortaggi del genere *Brassica*, il glucosinolato di 4-metilsolfinilbutile e il glucosinolato di 3-metilsolfinilpropile sono stati identificati come precursori dei derivati anticancerogeni di tipo isotiocianato più potenti. La tecnica non fornisce un mezzo conveniente per aumentare questi glucosinolati specifici in un modo specifico impedendo però allo stesso tempo la formazione di altri glucosinolati o derivati di glucosinolato che possono avere caratteristiche di gusto indesiderabili.

Il glucosinolato di 4-metilsolfinilbutile e il glucosinolato di 3-metilsolfinilpropile si trovano in parecchi ortaggi delle crucifere, ma sono presenti con la massima abbondanza nelle varietà di broccoli (sinonimo calabrese: *Brassica oleracea* L. var. *italica*) che mancano di un allele funzionale sul luogo GSL-ALK. La presenza di un allele GSL-ALK funzionale converte questi glucosinolati nei loro omologhi alchenilici che sono scadenti induttori degli enzimi della fase II (Tawfiq, N., Heaney, R. K., Plumb, J. A., Fenwick, G. R., Musk, S. R. R., & Williamson, G. (1995) *Carcinogenesis* 16 1191-1194.). Di conseguenza la

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO 834 B
(in proprio e per gli altri)

presenza di un allele GSL-ALK funzionale preclude la possibilità di produrre una varietà con livelli elevati di questi isotiocianati anticancerogeni perché i glucosinolati verranno convertiti in derivati alchenilici. In aggiunta, la produzione di isotiocianati a partire da glucosinolati richiede l'attività dell'enzima mirosinasi. Di conseguenza una produzione intensificata di questi isotiocianati specifici dipende sia dai livelli di precursori dei glucosinolati (che sono influenzati dall'attività codificata dall'allele GSL-ALK) che dai livelli o dall'attività della mirosinasi che produce derivati di tipo isotiocianato dei glucosinolati.

Di conseguenza, una combinazione genetica che specifichi la produzione di livelli elevati di glucosinolato di 4-metilsolfinilbutile e/o di glucosinolati di 3-metilsolfinilpropile è desiderabile, ma la produzione dei derivati anticancerogeni di tipo isotiocianato di questi glucosinolati richiede combinazioni genetiche addizionali. Di conseguenza metodi per ottenere queste composizioni genetiche forniscono nuove composizioni di materia che non si trovano attualmente in ortaggi delle crucifere coltivati commercialmente. La presente invenzione descrive metodi per ottenere queste combinazioni genetiche.

I livelli di glucosinolati in broccoli coltivati commercialmente sono relativamente bassi in confronto con

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO 834 B
(in proprio e per gli altri)

quelli che si trovano in insalate coltivate come la rucola (*Eruca sativa*), che accumula glucosinolato di 4-metiltiobutile, e il campione d'acqua (*Rorippa nasturtium-aquaticum*), che accumula il glucosinolato di fenetile (Fenwick, G. R., Heaney, R. K., & Mullin, W. J. (1983) *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 18, 123-201). L'esposizione a livelli aumentati di glucosinolato di 4-metilsolfinilbutile e/o di glucosinolato di 3-metilsolfinilpropile nei broccoli ci si aspetterebbe che aumentasse la potenza di induzione degli enzimi della fase II quando vengono ingeriti. Di conseguenza broccoli con livelli aumentati di isotiocianato di 4-metilsolfinilbutile e/o isotiocianato di 3-metilsolfinilpropile che sono anticancerogeni costituirebbero di conseguenza un'aggiunta di elevato valore ad una dieta che sia progettata per ridurre il rischio di cancro. Per di più, tali cambiamenti sarebbe improbabile che portassero ad un gusto ridotto perché i glucosinolati di metilsolfinilalchile non sono volatili e forniscono un contributo relativamente piccolo al gusto, al contrario della maggior parte degli altri isotiocianati che si trovano negli ortaggi e nelle insalate coltivate (Fenwick, G. R., Heaney, R. K., & Mullin, W. J. (1983) *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 18, 123-201). Di conseguenza alterando i livelli di questi glucosinolati specifici non si modificherebbe il sapore degli ortaggi appartenenti alle

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO 834 B
(in proprio e per gli altri)

crucifere che portano le combinazioni genetiche che codificano il carattere.

Molti componenti selvatici del complesso delle *Brassica oleracea* (numero di cromosomi $n = 9$) hanno i livelli elevati di singoli glucosinolati alifatici (Mithen, R., Lewis, B. G., & Fenwick, G. R. (1987) *Phytochemistry* 26, 1969-1973 e Giamoustaris, A. & Mithen, R. (1996) *Theor. Appl. Genet.* 93, 1006-1010.). Studi sulla genetica dei glucosinolati in questi taxa sono stati utili per chiarire il percorso genetico per la biosintesi dei glucosinolati. E' evidente che certe specie di questo taxa potrebbero essere di elevato valore in programmi di riproduzione controllata di *Brassica* progettati per aumentare specificamente il glucosinolato di 4-metilsolfinilbutile e/o il glucosinolato di 3-metilsolfinilpropile e, in questo modo, il potenziale anticancerogeno della pianta. Tuttavia la tecnica non fornisce alcun metodo per aumentare la concentrazione di glucosinolato di 4-metilsolfinilbutile e/o di glucosinolato di 3-metilsolfinilpropile tramite combinazioni genetiche e non fornisce nemmeno un mezzo conveniente mediante il quale sia possibile valutare le proprietà anticancerogene degli ortaggi che contengono dette combinazioni genetiche. La presente invenzione fornisce questi metodi e queste combinazioni genetiche.

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO 834 B
(in proprio e per gli altri)

In primo piano tra questi vi sono combinazioni genetiche che incorporano i geni che derivano da membri del complesso *B. villosa-rupestris* della Sicilia che possiedono un allele GSL-ALK non funzionale e che possono essere i progenitori selvatici dei broccoli coltivati. Di conseguenza la presente invenzione utilizza parenti e progenitori selvatici dei broccoli commerciali come fonte dei geni necessari per derivare una combinazione genetica in grado di produrre livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile e la combinazione genetica che favorisce la produzione di derivati di tipo isotiocianato di questi glucosinolati piuttosto che i derivati alchenilici.

L'isotiocianato di 4-metilsolfinilbutile (a cui si fa riferimento anche come solforafano), che deriva dal corrispondente glucosinolato che si trova in alcune specie di *Brassica*, è stato già identificato in passato come potente induttore degli enzimi di detossificazione della fase II (per esempio QR; chinone riduttasi [NADP(H):accettore di chinone] ossidoriduttasi) in cellule Hepa 1c1c7 dell'epatoma di topo. In modo simile, l'isotiocianato di 3-metilsolfinilpropile è un potente induttore di enzimi della fase II. La misura dell'induzione di QR in cellule Hepa 1c1c7 di epatoma del topo fornisce un indicatore rapido ed affidabile della

Dr. Giorgio LONG
 N. Iscr. ALBO 834 B
 (in proprio e per gli altri)

capacità di estratti vegetali di indurre enzimi della fase II in cellule di mammifero (Prochaska, H. J., Santamaria, A. B., & Talalay, P. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2394-2398.), e di conseguenza di una attività anticancerogena putativa. Questo saggio è stato utilizzato per valutare il potenziale di isotiocianati sintetici (Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C.-G., & Posner, G. H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2399-2403 e Talalay, P., De Long, M. J., & Prochaska, H. J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8261-8265.), estratti derivati da ortaggi delle crucifere (Tawfiq, N., Wanigatunga, S., Heaney, R. K., Musk, S. R. R., Williamson, G., & Fenwick, G. R., (1994) *Exp. J. Cancer Prev.* 3, 285-292.) e glucosinolati trattati con mirosinasi (Tawfiq, N., Heaney, R. K., Plumb, J. A., Fenwick, G. R., Musk, S. R. R., & Williamson, G. (1995) *Carcinogenesis* 16, 1191-1194). Tuttavia il contenuto di glucosinolato / isotiocianato degli estratti vegetali in generale non è stato riportato e non è stato riportato nemmeno il potenziale anticancerogeno relativo di vari ortaggi appartenenti alle crucifere.

Nella presente invenzione, questo saggio è stato utilizzato per determinare la relazione esistente tra la capacità di indurre attività di QR (potenziale anticancerogeno) e il contenuto di glucosinolati di tre membri selvatici del complesso di *B. oleracea* che hanno

Dr. Giorgio LONG
 N. Iscr. ALBO 844 B
 (in proprio e per gli altri)

livelli elevati di glucosinolati di 3-metiltiopropile (*B. drepanensis*) 3-metilsolfinilpropile (*B. villosa*) e 2-propenile (*B. atlantica*) rispettivamente quando vengono combinati con cultivar commerciali di broccoli attraverso incroci e ibridi convenzionali tra le accessioni selvatiche e una linea di riproduzione controllata di broccoli aploide doppia commerciale. Di conseguenza sono stati derivati metodi e composizioni che identificano le composizioni genetiche richieste per la produzione stabile di specifici glucosinolati (per esempio i glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile) e la produzione dei corrispondenti derivati di tipo isotiocianato. Queste combinazioni genetiche forniscono utili linee di riproduzione controllata per la produzione di varietà commerciali di broccoli e di altri ortaggi che appartengono alle crucifere che hanno livelli da 10 a 100 volte di questi composti anticancerogeni rispetto a quelli che si trovano attualmente nelle varietà coltivate commercialmente.

E' stato scoperto per esempio che un aumento di 10 volte nel livello di glucosinolato di 4-metilsolfinilbutile viene ottenuto mediante incrocio di cultivar di broccoli con taxa selvatici selezionati del complesso di *Brassica oleracea* (numero di cromosomi $n = 9$). In modo simile si osservano aumenti dei livelli di

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO 834 B
(in proprio e per gli altri)

glucosinolato di 3-metilsolfinilpropile. Tessuto derivato da questi ibridi presentava un aumento di 100 volte nella capacità di indurre la chinone riduttasi in cellule Hepa 1c1c7 rispetto a cultivar di broccoli coltivati commercialmente, a motivo sia di un aumento dei glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile che di un aumento della conversione del glucosinolato di 4-metilsolfinilbutile in solforafano. Di conseguenza la presente invenzione mette a disposizione metodi e composizioni genetiche per la produzione di ortaggi appartenenti alle crucifere di elevato valore commerciale che contengono livelli elevati di metaboliti secondari anticancerogeni. La presente invenzione riguarda inoltre lo sviluppo di linee di riproduzione controllata di broccoli con attività anticancerogena intensificata.

La selezione di linee di riproduzione controllata con livelli elevati di composti anticancerogeni è ulteriormente facilitata dall'uso di marcanti molecolari per stabilire la posizione cromosomica dei geni di biosintesi del glucosinolato e per aiutare nella selezione di linee di reincrocio che contengono la composizione genetica di massima utilità ai fini di aumentare i livelli di composti anticancerogeni nei broccoli.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione mette a disposizione

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO 884 B
(in proprio e per gli altri)

metodi per aumentare i livelli di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile in ortaggi del genere *Brassica* mediante mezzi genetici. Questi mezzi includono l'incrocio di specie selvatiche di *Brassica* con specie di broccoli, la selezione di linee con elevato contenuto di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile e la valutazione delle proprietà anticancerogene di dette combinazioni genetiche mediante il fatto di misurare la potenza di estratti delle cellule vegetali nell'indurre gli enzimi della fase II. Si possono utilizzare marcanti RFLP per selezionare le linee in incroci che hanno una produzione elevata di sottofondo genetico di broccoli e stabilire la posizione dei geni rilevanti per la biosintesi dei glucosinolati sulla mappa del genoma di *Brassica*.

Ibridi tra cultivar commerciali di broccoli e le due specie selvatiche *B. villosa* e *B. drepanensis* sono di piena fertilità e vengono prodotte popolazioni di reincrocio. Linee di broccoli con livelli aumentati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile e dell'attività anticancerogena associata vengono sviluppate da queste popolazioni. L'efficienza dello sviluppo di queste linee risulta considerevolmente aumentata grazie alla disponibilità di marcanti molecolari per la selezione sia del contenuto di

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO 434/B
(in proprio e per gli altri)

glucosinolati che del sottofondo genetico desiderato.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

Fig. 1. Modello genetico della biosintesi di glucosinolato alifatico in *Brassica*.

Fig. 2. Induzione dell'attività di QR (enzimi della fase II) in cellule Hepa 1c1c7 di epatoma del topo con l'utilizzo di estratti derivati dalla cultivar Marathon e di solforafano sintetico (isotiocianato di 4-metilsolfinilbutile).

Fig. 3. Effetto di estratti di *B. drepanensis*; *B. villosa*; e *B. atlantica* sull'induzione di QR (enzimi della fase II) in cellule Hepa 1c1c7 di epatoma del topo.

Fig. 4. L'effetto di estratti della cultivar GD DH e degli ibridi recuperati da incroci con specie selvatiche [GD DH x *B. drepanensis*]; [GD DH x *B. villosa*]; e [GD DH x *B. atlantica*]; sull'induzione di QR (enzimi della fase II) in cellule Hepa 1c1c7 dell'epatoma di topo.

Fig. 5. Profilo al gascromatografo dei glucosinolati ottenuti da un estratto derivato da un ibrido [GD DH x *B. drepanensis*].

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Un obiettivo della presente invenzione è quello di mettere a disposizione un ortaggio commestibile delle crucifere con livelli elevati di composti anticancerogeni, per la precisione di isotiocianato di 4-metilsolfinilbutile

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO 884 B
(in proprio e per gli altri)

e/o isotiocianato di 3-metilsolfinilpropile.

Un altro obiettivo della presente invenzione è quello di mettere a disposizione metodi per l'aumento selettivo dei derivati anticancerogeni di glucosinolato in specie del genere *Brassica* e di mettere a disposizione specie di *Brassica* con livelli aumentati di derivati anticancerogeni di glucosinolato e in particolare ortaggi commestibili del genere *Brassica* con livelli elevati dei derivati anticancerogeni di glucosinolato isotiocianato di 4-metilsolfinilbutile e/o isotiocianato di 3-metilsolfinilpropile.

Ancora un altro obiettivo della presente invenzione è quello di mettere a disposizione metodi per la selezione di combinazioni genetiche di broccoli che contengono livelli elevati di derivati anticancerogeni di glucosinolato e metodi per la valutazione delle proprietà anticancerogene di queste combinazioni genetiche.

Ancora un altro obiettivo della presente invenzione è quello di mettere a disposizione composizioni di materia che comprendono ortaggi del genere *Brassica* con concentrazioni di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile comprese tra 10 e 100 $\mu\text{moli/g}$ di peso secco.

Questi e altri obiettivi della presente invenzione vengono forniti da una o più delle forme di

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO 884 B
(In proprio e per gli altri)

realizzazione descritte nel seguito.

La selezione di broccoli con livelli elevati di glucosinolati anticancerogeni non è possibile nel sottofondo genetico commerciale attuale utilizzato per sviluppare le cultivar commerciali di broccoli. Sulla base del modello genetico di biosintesi dei glucosinolati mostrato in Figura 1, la produzione di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile dipende da un certo numero di fattori genetici. Questi includono una bassa attività dell'allele GSL-ALK e livelli appropriati di attività codificata dagli alleli GSL-OXID e da altri alleli responsabili della produzione di precursori di glucosinato. Si ritiene che il gusto relativamente delicato dei broccoli sia associato con livelli relativamente bassi di glucosinolati in generale e in particolare con livelli bassi di glucosinolati volatili. Questo è evidente quando si confronti il profilo dei glucosinolati totali di broccoli commerciali con i loro parenti selvatici.

Di conseguenza metodi per l'ottenimento di broccoli con caratteristiche di gusto desiderabili e livelli elevati di glucosinolati anticancerogeni devono comprendere la selezione di linee con la combinazione genetica corretta che non producono glucosinolati alchenilici di gusto intenso. E' anche desiderabile

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO 834 B.
(in proprio e per gli altri)

mantenere livelli bassi di altri glucosinolati allo scopo di evitare la produzione di gusti sgradevoli. Di conseguenza metodi per ottenere l'aumento specifico dei glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile non devono portare ad una produzione complessiva di glucosinolati o ad una produzione di glucosinolati alchenilici. La presente invenzione mette a disposizione metodi per realizzare questi obiettivi.

Nelle normali condizioni di campo, si ritiene che la *B. oleracea* di tipo selvatico abbia poche probabilità di dare una fertilizzazione incrociata con *B. oleracea* coltivata. Si ritiene che i caratteri di compatibilità vengano spenti quando le cultivar fioriscono.

La presente invenzione prevede anche l'uso di marcanti genetici per facilitare la selezione di linee che contengono la combinazione genetica desiderata. L'uso di marcanti RFLP o di sonde di DNA che si segregano con caratteri specifici è ben noto nel mestiere, tuttavia la presente invenzione descrive sonde di DNA specifiche delle quali è stato mostrato che sono utili per la selezione di combinazioni genetiche che portano a livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile in *Brassica oleracea*. Per di più, l'analisi di RFLP fornisce un mezzo utile per valutare la porzione del genoma di una pianta ibrida che deriva da

Dr. Giorgio LONG
N. iscr. ALBO 834 B
(in proprio e per gli altri)

broccoli o da specie selvatiche. Di conseguenza l'uso di RFLP o di sonde di DNA trova utilità nella selezione rapida di piante che contengono la proporzione desiderata di genomi della specie selvatica e di broccoli. Così la selezione di broccoli con livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile che comprendono una percentuale elevata del genoma commerciale desiderato risulta notevolmente facilitata grazie all'uso di marcanti di DNA per analizzare piante ibride dopo l'incrocio di broccoli con specie selvatiche.

La presente invenzione descrive anche metodi per la valutazione delle proprietà anticancerogene di broccoli che contengono livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile attraverso saggi per l'induzione di enzimi della fase II. Anche se gli effetti anticancerogeni a lungo termine di specifici derivati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile non possono venire determinati in modo preciso e dipenderanno ulteriormente da molti fattori addizionali, dietetici e di altro genere, l'uso del saggio di induzione fornisce una prova convincente degli effetti anticancerogeni dei derivati di tipo isotiocianato degli specifici glucosinolati.

Di conseguenza la presente invenzione descrive metodi che permettono la selezione di *Brassica sp.* con

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. AlBO/834 B
(in proprio e per gli altri)

livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile, metodi per la valutazione degli effetti anticancerogeni di dette specie vegetali e metodi e composizioni che permettono la derivazione di linee di broccoli con proprietà anticancerogene.

In una forma di realizzazione della presente invenzione, si utilizza per la selezione di linee di broccoli con livelli elevati di glucosinolati specifici un metodo che comprende le operazioni di:

I.) Incrocio di specie selvatiche con linee di riproduzione controllata di broccoli doppiamente aploidi;

II.) Analisi di ibridi F1, selezione degli ibridi con i livelli più elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile e loro reincrocio con linee di riproduzione controllata di broccoli;

III.) Analisi dei glucosinolati in singole piante della generazione B1 (reincrocio 1);

IV.) Uno o due cicli ulteriori di reincrocio (B2, B3) con selezioni di piante con i livelli più elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile, screening (vagliatura) delle caratteristiche anticancerogene di individui selezionati mediante induzione di enzimi della fase II;

V.) Analisi della popolazione B3 (reincrocio 3)

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. A/BO/834 B
(in proprio e per gli altri)

con la selezione di piante con i livelli massimi di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile, vagliatura delle caratteristiche anticancerogene di individui selezionati mediante l'induzione di enzimi della fase II;

VI.) Selezione di una linea di broccoli con livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile che porta il carattere anticancerogeno capace di provocare una forte induzione di enzimi della fase II.

Di conseguenza il metodo consente la selezione di linee di broccoli con livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile. I livelli elevati di questi specifici glucosinolati vengono correlati con le proprietà anticancerogene mediante la valutazione dell'induzione di enzimi della fase II. Mediante l'impiego del reincrocio, vengono derivate delle combinazioni genetiche che comprendono il carattere anticancerogeno in un sottofondo genetico che si trova nei broccoli commerciali. Di conseguenza viene realizzata la produzione di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile in cultivar commerciali di broccoli dando origine ad una composizione di broccoli nuova e di elevato valore.

In un'altra forma di realizzazione della presente

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO/834 B
(in proprio e per gli altri)

invenzione, le capacità anticancerogene della linea vengono combinate ulteriormente con alleli specifici per la autoincompatibilità che sono utili in strategie di produzione del seme. E' noto che certe specie di crucifere portano vari alleli per la autoincompatibilità e questi alleli vengono spesso impiegati per la produzione di seme ibrido. Pertanto si possono produrre broccoli ibridi che portano la combinazione genetica che produce livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile. Un altro obiettivo della presente invenzione è quello di selezionare linee di broccoli con livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile e una specifica combinazione di alleli di autoincompatibilità - self-incompatibility (SI). In alcuni casi può essere possibile utilizzare una sonda molecolare per l'identificazione di alleli SI, come per esempio la sonda pW150 (ottenibile dal Dr. Tom Osborne, Department of Agronomy, University of Wisconsin, Madison, WI, 53706 e descritta in Toroser et al., Theoretical and Applied Genetics, 91:802-808.1995), oppure l'analisi dell'effettiva proteina SI può fornire la selezione dell'allele SI desiderato.

Così in un'altra forma di realizzazione della presente invenzione si utilizza un metodo per la selezione di linee di broccoli con livelli elevati di specifici

Dr. Giorgio LONG
N. iscr. ALBO 834 B
(In proprio e per gli altri)

glucosinolati e alleli SI che comprende le operazioni di:

I.) Incrociare specie selvatiche con linee di riproduzione controllata di broccoli doppiamente aploidi che contengono alleli SI specifici;

II.) Analizzare ibridi F1, selezionare gli ibridi con il livello più alto di glucosinolati di 4-metilsolfetilbutile e/o 3-metilsolfetilpropile e reincrociare con linee di riproduzione controllata di broccoli, selezionare alleli SI con marcanti RFLP, selezionare individui con la combinazione desiderata di alleli SI contrastanti;

III.) Analizzare i glucosinolati in singole piante della generazione B1 (reincrocio 1).

IV.) Uno o due cicli ulteriori di reincrocio con selezione di piante con il livello più alto di glucosinolati di 4-metilsolfetilbutile e/o 3-metilsolfetilpropile, selezione di alleli SI opportuni con marcanti RFLP, vagliatura in base alle proprietà anticancerogene di individui selezionati mediante induzione di enzimi della fase II;

V.) Analizzare la popolazione B3 (reincrocio 3) con la selezione di piante con i livelli massimi di glucosinolati di 4-metilsolfetilbutile e/o 3-metilsolfetilpropile, vagliatura delle caratteristiche anticancerogene di individui selezionati mediante

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBZ 834 B
(in proprio e per gli altri)

l'induzione di enzimi della fase II;

VI.) Selezionare una linea di broccoli con livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile e allele SI opportuni che porta il carattere anticancerogeno in grado di provocare una forte induzione di enzimi della fase II.

Così vengono derivate linee di broccoli che portano alleli SI specifici utili per l'incrocio in uno schema di produzione di seme ibrido. In accordo a ciò si possono produrre semi di broccoli che portano la combinazione genetica per livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile mediante incrocio con il progenitore appropriato. Il detto seme è di elevato valore perché il broccolo ibrido porta anche molte combinazioni genetiche importanti per le prestazioni agronomiche.

Come altra forma di realizzazione della presente invenzione, viene descritto un metodo in cui si impiega l'utilizzo di marcanti di DNA che si segregano con profili di glucosinolati specifici. In questo metodo, si utilizzano marcanti di DNA, o più specificamente marcanti noti come QTL (quantitative trait loci - luoghi di carattere quantitativo) per selezionare la combinazione genetica in broccoli che porta a livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile. In

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO 234-B
(in proprio e per gli altri)

particolare è descritto l'utilizzo di marcanti noti come pW176, pW207 e pW141 posizionati sul cromosoma 2 e dei marcanti noti come pW224, pW114, pW145, pW123, pW138, pW197, pW228, pW106 posizionati sul cromosoma 5 (ottenibili dal Dr. Tom Osborne, Department of Agronomy, University of Wisconsin, Madison, WI, 53706 e descritta in Toroser et al., Theoretical and Applied Genetics, 91:802-808, 1995), e descritti in Ferreira et al., Theoretical and Applied Genetics 89:615-621, 1994.)

Si è scoperto che due regioni del genoma (che si trovano sui cromosomi 2 e 5) di *Brassica oleracea* selvatica sono necessari per l'espressione di livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile. L'uso dei marcanti facilita notevolmente la selezione di linee da ibridi e reintroci tra boccoli e specie selvatiche che contengono la combinazione genetica responsabile della produzione dei livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile. Per di più si è scoperto che il QTL posizionato sul cromosoma 5 regola specificamente i livelli di glucosinato di 3-metilsolfinilpropile e ha uno scarso effetto sui livelli di glucosinato di 4-metilsolfinilbutile. Di conseguenza è possibile manipolare i livelli di glucosinato di 3-metilsolfinilpropile e di glucosinato di 4-metilsolfinilbutile in modo

indipendente per mezzo dell'uso di sonde molecolari in aggiunta alla semplice selezione di linee.

In conformità a ciò, in questa forma di realizzazione della presente invenzione viene descritto un metodo per la produzione di broccoli con livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile che comprende le operazioni di:

I.) Incrociare specie selvatiche con linee di riproduzione controllata di broccoli doppiamente aploidi;

II.) Analizzare ibridi F1 e selezionare gli ibridi con i livelli più elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile mediante vagliatura con sonde RFLP associate con la produzione di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile e reincrociare linee selezionate con linee di riproduzione controllata di broccoli;

III.) Analizzare i glucosinolati in singole piante della generazione B1 (reincrocio 1);

IV.) Uno o due cicli ulteriori di reincrocio con selezioni di piante con il livello più elevato di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile mediante vagliatura con sonde RFLP associate con la produzione di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile, vagliatura delle proprietà anticancerogene di individui selezionati

mediante induzione di enzimi della fase II;

V.) Analizzare la popolazione B3 (reincrocio 3) con la selezione di piante con il livello più elevato di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile mediante vagliatura con sonde RFLP associate con la produzione di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile e analisi dei profili di glucosinato, vagliatura in base alle proprietà anticancerogene di individui selezionati mediante l'induzione di enzimi della fase II;

VI.) Selezionare una linea di broccoli con livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile che porta il carattere anticancerogeno in grado di provocare una forte induzione di enzimi della fase II.

In questo modo l'utilizzo di sonde RFLP per l'identificazione di regioni specifiche del genoma di *Brassica oleracea* selvatica (per esempio i cosiddetti QTL) responsabili della produzione di livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile facilita notevolmente la produzione di broccoli commestibili con proprietà anticancerogene.

Le forme di realizzazione di cui sopra permettono la selezione di linee di broccoli con elevati livelli di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO 124 B
(in proprio e per gli altri)

metilsolfinilpropile, preferibilmente broccoli con una composizione che comprende concentrazioni di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile comprese tra 10 e 100 $\mu\text{moli/g}$ di peso secco. Per di più, le forme di realizzazione di cui sopra consentono la selezione di linee di broccoli con livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile e/o 3-metilsolfinilpropile in grado di provocare un aumento da 10 a 100 volte nell'induzione di enzimi della fase II in confronto con cultivar di broccoli che si trovano comunemente in commercio.

Il tecnico del ramo può prevedere che i metodi qui descritti vengano applicati anche all'ottenimento di ortaggi della crucifera *B. oleracea* diversi dai broccoli, includenti cavoli come cavolo bianco, cavolo verde come per esempio il cavolo cappuccio, cavolfiore, cavoletti di Bruxelles, cavolo navone, cavolo rapa e simili. E' inoltre previsto che rutabaga (*B. napus*) e rape (*B. rapa*) possono pure venire manipolati secondo il metodo e le combinazioni genetiche della presente invenzione.

Gli esempi che seguono illustrano il metodo ma non limitano in alcun modo l'ambito dell'invenzione.

Esempio 1. Metodi per la misura del contenuto di glucosinolati in specie selvatiche e commerciali di *Brassica* e loro ibridi.

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO 834 B
(in proprio e per gli altri)

Una linea di riproduzione controllata di broccoli doppiamente aploidi derivata dalla cultivar Green Duke (a cui si fa riferimento come GD DH, Bouhuon, E. J. R., Keith, D. J., Parkin, I. A. P., Sharpe, A. G., & Lydiate, D. J. (1996) *Theor. Appl. Genet.* 93, 833-839.), tre cultivar commerciali (Trixie, Green Comet and Marathon) e tre specie selvatiche di *Brassica*: *B. drepanensis* Caruel (Sin. *B. villosa* Biv. subsp. *drepanensis*), *B. villosa* Biv. e *B. atlantica* (Coss.) O. E. Schultz, sono stati coltivati in serre in condizioni standard come descritto in precedenza (Magrath, R., Herron, C., Giamoustaris, A., & Mithen, R. (1993) *Plant Breed.* 111, 55-72). Ciascuna delle specie selvatiche è stata incrociata con la linea di riproduzione controllata GD DH, sono stati ottenuti semi F_1 che sono stati coltivati in condizioni standard. Un deposito dei semi del derivato di cultivar di GD DH è stato effettuato l'11 febbraio 1999 presso la National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB) di Aberdeen, Scozia, e le è stato assegnato il numero di deposito NCIMB 41008. Infiorescenze sono state raccolte dalle cultivar dopo da 8 a 12 settimane e dagli ibridi dopo 12-16 settimane, congelate immediatamente in azoto liquido e crioessiccate. Solforafano sintetico è stato gentilmente fornito dal Professor P. Talalay, The John Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD.

Dr. Giorgio LONG
N. Isc. ALBO 834 B
(in proprio e per gli altri)

I glucosinolati sono stati estratti dal materiale crioessiccato, convertiti in desolfoglucosinolati e analizzati mediante HPLC come descritto in precedenza (Magrath, m R., Herron, C., Giamoustaris, A., & Mithen, R. (1993) *Plant Breed.* 111, 55-72) con l'utilizzo di glucosinolato di benzile come standard interno.

Estratti ottenuti dal materiale crioessiccato sono stati sottoposti alla valutazione della loro attività di induzione in cellule Hepa 1c1c7 di epatoma di topo. Circa 0,1 g di materiale crioessiccato macinato sono stati inumiditi mediante l'aggiunta di acqua (2 ml), omogeneizzati e lasciati a temperatura ambiente per 1 ora con miscelazione occasionale. Metanolo caldo 70% (v/v) (3 ml) è stato aggiunto e miscelato accuratamente prima dell'incubazione per 15 minuti a +70°C. Gli omogeneizzati sono stati raffreddati a temperatura ambiente e centrifugati per 5 minuti a 3000 giri al minuto. I surnatanti sono stati rimossi e il volume è stato ridotto in una centrifuga sotto vuoto a circa un quinto del volume iniziale. I concentrati risultanti sono stati filtrati attraverso filtri sterili apirogeni (0,22 µm) e conservati a -70°C prima di eseguire le prove. Le concentrazioni di ciascun estratto sono state espresse come peso secco di materiale originale su ogni ml di terreno di coltura.

L'induzione è stata misurata secondo metodi

Dr. Giorgio LONG
N. iscr. ALBO 834-B
(in proprio e per gli altri)

pubblicati (Tawfiq, N., Heaney, R. K., Plumb, J. A., Fenwick, G. R., Musk S. R. R., & Williamson, G. (1995) *Carcinogenesis* 16, 1191-1194., Prochaska, H. J., & Santamaria, A. B. (1988) *Anal. Biochem.* 169, 328-336., Williamson, G., Plumb, G. W., Udaq, Y., Price, K. R., & Rhodes, M. J. C. (1966) *Carcinogenesis* 17, 2385-2387.) con le seguenti modifiche. Ciascun campione è stato analizzato a otto concentrazioni con l'uso di quattro repliche per ciascuna concentrazione. b-Naftoflavone è stato utilizzato come controllo positivo ad una concentrazione pari a 0,2 mM. Questo ha prodotto specificamente un'induzione di tre volte (CD; 0,02 mM) ed era paragonabile a precedenti determinazioni. Ciascun cultivar / ibrido è stato estratto in tre occasioni e analizzato separatamente.

I componenti non volatili e volatili dei prodotti di decomposizione idrolitica delle cultivar, delle specie selvatiche e degli ibridi sono stati analizzati mediante GC-MS utilizzando un apparecchio HP Chemstation GP800A equipaggiato con una colonna da 30 m x 0,25 mm HP1 di metilsilano reticolato (Hewlett Packard Co. Palo Alto, CA. USA). Tipicamente la colonna veniva riscaldata ad una temperatura da +60°C a +250°C a 20°C/min e gli spettri di massa sono stati sottoposti a scansione da 35 a 250 m/z. Approssimativamente a 0,1 g di materiale criossiccato sono stati inumiditi con acqua, miscelati accuratamente e

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO 334 B
(in proprio e per gli altri)

incubati per 1 ora con miscelazione occasionale. I prodotti idrolitici non volatili sono stati estratti dai campioni con cloruro di metilene e filtrati prima dell'analisi. Allo scopo di analizzare i prodotti volatili, materiale crioessiccato (0,1 g) è stato inumidito con acqua (0,5 ml), il flacone di vetro è stato immediatamente sigillato e i prodotti volatili sono stati raccolti dallo spazio di testa del flacone con una sonda di estrazione su matrice in fase solida - solid phase matrix extraction (SPME) - (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA).

Esempio 2. Contenuto di glucosinolato delle linee di *Brassica*.

La Tabella 1 che segue mostra il contenuto di glucosinolato di cultivar commerciali di broccoli Green Comet, Marathon and Trixie, specie selvatiche di *B. oleracea* e ibridi tra una linea doppiamente aploide della cultivar commerciale Green Duke e specie selvatiche di *Brassica*.

Dr. Giorgio LONG
N. iscr. ALBO 834 B
(in proprio e per gli altri)

TABELLA 1

Contenuto singolo e totale di glucosinolati alifatici ($\mu\text{moli/g}$ di peso secco ± 1 di errore standard) di cultivar di broccoli, specie selvatiche di Brassica e ibridi prodotti da incroci tra GD DH e le specie selvatiche di Brassica

	MSP*	MSB	PROP	BUT	MTP	OH-BUT	TOTALE
Green Comet	0.1 \pm 0.1	0.8 \pm 0.5	0.2 \pm 0.1	0.0	2.7 \pm 0.5	0.5 \pm 0.3	4.3 \pm 0.5
GD DH	0.2 \pm 0.2	4.6 \pm 1.1	0.0	0.0	2.3 \pm 0.6	0.0	7.1 \pm 1.1
Marathon	1.0 \pm 0.3	5.4 \pm 1.1	0.2 \pm 0.1	0.0	4.1 \pm 0.7	0.0	10.7 \pm 1.8
Trixie	0.4 \pm 0.2	11.1 \pm 2.1	0.2 \pm 0.1	0.0	4.9 \pm 1.2	0.0	16.6 \pm 2.6
B. atlantica	0.9 \pm 0.7	0.0	92.8 \pm 25.4	0.5 \pm 0.3	1.1 \pm 1.0	0.0	95.3 \pm 26.6
B. drepanensis	11.0 \pm 1.7	0.0	0.0	0.0	51.6 \pm 9.3	0.0	62.6 \pm 10.9
B. villosa	119 \pm 18	1.4 \pm 0.2	0.0	0.1 \pm 0.1	3.4 \pm 0.9	0.1 \pm 0.1	124 \pm 19
GD† x B. atlantica	2.2 \pm 0.8	5.3 \pm 1.4	76.9 \pm 20.8	23.6 \pm 6.3	2.0 \pm 0.7	43.7 \pm 6.7	154 \pm 30
GD x B. drepanensis	26.2 \pm 2.9	76.5 \pm 8.9	0.0	0.0	1.9 \pm 0.4	0.0	105 \pm 12
GD x B. villosa	26.4 \pm 2.7	81.8 \pm 5.0	0.0	0.0	1.0 \pm 0.3	0.0	109 \pm 7

*MSP: 3-metilsolfetilpropile, MSB: 4-metilsolfetilbutile, PROP: 2-propenile, BUT: 3-butenile,

MTP: 3-metiltiopropile, OH-BUT: 2-idrossi-3-butenile. † GD:GD DH.

Dr. Giorgio LONG
 N. Iscr. ALBO 834 B
 (in proprio e per gli altri)

Il livello di glucosinolato di 4-metilsolfinilbutile nelle cultivar di broccoli era simile a quelli riportati in precedenza (Carlson, D. G., Daxebichler, N. E., van Etten, C. H., Kwolek, W. F., & Williams, P. H. (1987) *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112, 173-178.). Le specie selvatiche avevano un livello approssimativamente dieci volte maggiore di glucosinolati alifatici totali rispetto alle cultivar. *B. villosa*, *B. drepanensis* e *B. atlantica* avevano predominantemente glucosinolati di 3-metilsolfinilpropile, 3-metiltiopropile e 2-propenile. Le differenze dei profili di glucosinolato sono state attribuite a differenze negli alleli sui luoghi GSL-OXID e GSL-ALK (Giamoustaris, A. & Mithen, R. (1996) *Theor. Appl. Genet.* 93, 1006-1010.). Negli ibridi di [GD DH x *B. drepanensis*] e [GD DH x *B. villosa*], il 4-metilsolfinilbutile era il glucosinolato più abbondante a motivo della natura dominante degli alleli GSL-ELONG e GSL-OXID che si trovano in GD DH e al valore nullo degli alleli GSL-ALK in tutti e due i progenitori. Nell'ibrido [GD DH x *B. atlantica*], il glucosinolato di 3-butenile era il glucosinolato predominante. Era presente anche glucosinolato di 2-idrossi-3-butenile a motivo dell'azione di un allele GSL-OH funzionale nella linea GD DH (dati non pubblicati), che di solito non è evidente a motivo dell'allele GSL-ALK nullo che impedisce la biosintesi del

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO 934/B
(in proprio e per gli altri)

glucosinolato di 3-butenile.

Esempio 3. Induzione di enzimi della fase II

E' stato utilizzato solforafano sintetico come controllo positivo per quantificare l'induzione di QR in cellule Hepa 1c1c7. Esso era un induttore potente e ha prodotto un'induzione di tre volte a 1,6 mM (CD; 0,4 mM), paragonabile a precedenti determinazioni. Non è stata osservata alcuna citotossicità per nessun campione a nessuna delle concentrazioni provate. Estratti ricavati da tutte le cultivar erano induttori scadenti nel campo di concentrazioni da 0,001 mg/ml a 0,125 mg/ml. Tuttavia, l'induzione era minore di quanto atteso se il 100% dei glucosinolati fosse stato convertito in isotiocianati, e non in altri prodotti come derivati di tipo tiocianato o nitrile (Fenwick, G. R., Heaney, R. K., & Mullin, W. J. (1983) *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 18, 123-201).

Per esempio, il Marathon conteneva 5,4 mmoli di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile per grammo di peso secco (Tabella 1). Di conseguenza, un estratto contenente 75 mg/ml di Marathon ci si sarebbe atteso che avesse una concentrazione di isotiocianato di 4-metilsolfinilbutile pari a 0,4 mM da cui risulterebbe un'induzione doppia. Tuttavia, non è stata osservata alcuna induzione significativa a questa concentrazione. Di fatto erano necessari 2,5 mg/ml di estratto di Marathon per una

Dr. Giorgio LONG
N. iscr. ALBO 334/B
(in proprio e per gli altri)

induzione al doppio, che se il 100% del glucosinolato venisse convertito in isotiocianato sarebbe equivalente a isotiocianato di 4-metilsolfinilbutile 13,5 mM. Di conseguenza, o una piccola proporzione del glucosinolato era stata convertita in isotiocianato di 4-metilsolfinilbutile, oppure l'induzione dell'attività di QR veniva ridotta da altri componenti presenti nell'estratto vegetale.

Per controllare la presenza di un inibitore, estratto di Marathon (0,125 mg/ml) è stato tracciato con solforafano sintetico prima dell'applicazione alle cellule Hepa 1c1c7. L'induzione osservata era simile a quella del solforafano puro da solo (Fig. 2), il che ha dimostrato che non si era avuto alcun effetto inibitorio da parte di altri componenti negli estratti. In Figura 2, è mostrata l'induzione di QR in cellule Hepa 1c1c7 con l'utilizzo di solforafano (Δ); estratto di Marathon (0,125 mg/ml) con l'aggiunta di solforafano (\blacksquare) o estratto di Marathon (da 0,001 mg/ml a 0,125 mg/ml), (O). La concentrazione stimata di isotiocianato dell'estratto di Marathon era stata basata sulla supposizione che il 100% del glucosinolato del progenitore venisse convertito in isotiocianato. Pertanto l'estratto di Marathon (1 mg/ml) è equivalente a isotiocianato di 4-metilsolfinilbutile 5,4 μ M. I risultati ottenuti per il Marathon (0,125 mg/ml) con l'aggiunta di

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO 844 B
(in proprio e per gli altri)

solforafano sono stati riportati in tracciato rispetto alla concentrazione di solforafano sintetico aggiunto da sola, perché l'estratto di Marathon da solo non aveva alcun effetto significativo sull'attività di induzione. Di conseguenza è possibile in Marathon (e anche in altre cultivar) che solo una parte del glucosinolato sia stata convertita in isotiocianato.

Estratti di *B. villosa* e *B. drepanensis* erano potenti induttori dell'attività di QR. Al contrario, estratti di *B. atlantica* non hanno indotto attività di QR nonostante l'elevato contenuto di glucosinolato (Fig. 3). In figura 3, sono mostrati gli effetti degli estratti di: *B. drepanensis* (■); *B. villosa* (◆); e *B. atlantica* (□) sull'induzione di QR in cellule Hepa 1c1c7 dell'epatoma di topo. Se si suppone che il 100% del glucosinolato in questi taxa sia stato convertito nell'isotiocianato e non in altri possibili prodotti di decomposizione idrolitica (derivati di tipo tiocianato e nitrile), i valori apparenti di CD per l'isotiocianato di 3-metiltiopropile e per l'isotiocianato di 3-metilsolfetilpropile sono rispettivamente 1,6 mM e 0,5 mM. Questi valori sono tutti e due più bassi rispetto a quelli riportati per gli isotiocianati sintetici, che sono pari a 3,5 mM e 2,4 mM, come è illustrato in Tabella 2. Di fatto, se una quantità minore dei glucosinolati fosse stata convertita in

Dr. Giorgio LONG
N. iscr. ALBO 134 B
(in proprio e per gli altri)

isotiocianati i valori apparenti di CD sarebbero ancora più bassi. La Tabella 2 che segue illustra l'induzione di attività di QR (enzimi della fase II) in cellule Hepa 1c1c7 da parte di estratti di ortaggi.



Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO 834 B
(in proprio e per gli altri)

TABELLA 2

Potenza di induzione di QR in cellule Hepa 1c1c7 di topo da parte di estratti vegetali.

	Isotiocianato predominante	Valore apparente di CD* (µM)	Valore di CD per l' isotiocianato sintetico (µM) (si veda Zhang (2))
<i>B. drepanensis</i>	3-metiltiopropile	1,6†	3,5
<i>B. villosa</i>	3-metilsolfinilpropile	0,5†	2,4
GD† x <i>B. drepanensis</i>	4-metilsolfinilbutile	0,3†	0,4-0,8
GD x <i>B. villosa</i>	4-metilsolfinilbutile	0,3†	0,4-0,8
solforafano sintetico	4-metilsolfinilbutile	0,3	0,4-0,8 ^s

* valore di CD: concentrazione del glucosinolato progenitore richiesta per raddoppiare l'attività di induzione di QR.

† I valori citati sono stati calcolati supponendo una conversione del 100% dei glucosinolati dei progenitori nel

corrispondente isotiocianato: † GD: GD DH. †Altri studi hanno riportato un valore di CD pari a 0,2 µM. Si veda

Prochaska (10).


Dr. Giorgio LONG
 N. Isc. ALBO 834 B
 (in proprie e per gli altri)

La differenza di potenza potrebbe essere dovuta o a differenze chimiche tra gli isotiocianati naturali e sintetici (per esempio natura degli stereoisomeri) o ad altri fattori presenti negli estratti vegetali che possono includere effetti sinergici di bassi livelli di altri isotiocianati. La mancanza di attività degli estratti ricavati da *B. atlantica* mette in evidenza l'importanza della struttura della catena laterale del glucosinolato.

Estratti ottenuti da [GD DH x *B. villosa*] e [GD DH x *B. drepanensis*] erano ambedue potenti induttori dell'attività di QR (Fig. 4). In Figura 4, è mostrato l'effetto di estratti delle cultivar GD DH (●); e degli incroci ibridi [GD DH x *B. drepanensis*] (■); [GD DH x *B. villosa*] (◇); e [GD DH x *B. atlantica*] (Δ); sull'induzione di QR in cellule Hepa 1c1c7 dell'epatoma di topo. Sulla base di una conversione al 100% dei glucosinolati in isotiocianati, i valori apparenti di CD di tutti e due gli estratti erano 0,3 mM (equivalente in glucosinolato di 4-metilsolfinilbutile), che è simile a quello del solforafano puro (vedi sopra) e a quello riportato in studi precedenti. Pertanto, anche se si è avuto un aumento approssimativamente di dieci volte nei livelli di glucosinolato di 4-metilsolfinilbutile in [GD DH x *B. villosa*] e [GD DH x *B. drepanensis*] in confronto con Marathon e GD DH, si aveva una differenza di oltre 100

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. AlBO 834.B
(in proprio e per gli altri)


volte nella capacità di indurre attività di QR (cioè è necessaria una quantità di tessuto di Marathon almeno pari a 100 volte per indurre un'attività di QR equivalente in confronto con gli ibridi GD DH).

Allo scopo di esaminare la composizione e la natura dei prodotti di idrolisi, gli estratti sono stati analizzati per mezzo della GC-MS (Fig. 5). In Figura 5, è mostrato il profilo gascromatografico di un estratto ottenuto da [GD DH x *B. drepanensis*]. La spettrometria di massa ha confermato i picchi come (1), 3-metilsolfinilpropil nitrile; (2), 4-metilsolfinilbutil nitrile; (3), 3-metilsolfinilpropile isotiocianato; (4), 4-metilsolfinilbutile isotiocianato. L'idratazione di foglie crioessiccate di *B. drepanensis* e *B. atlantica* ha portato alla produzione di grandi quantità di isotiocianati volatili di 3-metiltiopropile e di 2-propenile. L'isotiocianato di 3-metilsolfinilpropile è stato rivelato in estratti in cloruro di metilene ricavati da *B. villosa*, fatto questo che era coerente con i profili di glucosinolato. Negli estratti di [GD DH x *B. villosa*] e [GD DH x *B. drepanensis*], l'isotiocianato dominante era l'isotiocianato di 4-metilsolfinilbutile come previsto.

Sono stati individuati anche livelli relativamente bassi di isotiocianato di 3-metilsolfinilpropile e di derivati nitrilici. Al contrario, sono state individuate quantità

Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ARBO 234 B
(in proprio e per gli altri)

solo dell'ordine delle tracce di isotiocianato di 4-metilsolfinilbutile nelle cultivar. Questo ha indicato che la differenza di 100 volte nella capacità di indurre attività di QR tra i due ibridi e le cultivar è dovuta sia all'aumento del glucosinolato di 4-metilsolfinilbutile che ad una maggiore conversione nell'isotiocianato.


Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO 834 B
(in proprio e per gli altri)



RIVENDICAZIONI

1. Metodo per la produzione di *Brassica oleracea* con livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile o di glucosinolati di 3-metilsolfinilpropile, o di tutti e due, che comprende le operazioni di:

(a) incrociare specie selvatiche di *Brassica oleracea* scelte dal gruppo consistente in *B. villosa* e *B. drepanensis* con linee di riproduzione controllata di *Brassica oleracea* per produrre piante ibride; e

(b) selezionare le piante ibride della fase (a) con livelli di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile o glucosinolati di 3-metilsolfinilpropile o tutti e due, elevati al di sopra rispetto a quello che si trova inizialmente nelle linee di riproduzione controllata di *Brassica oleracea*.

2. Metodo per la produzione di *Brassica oleracea* con livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile o di glucosinolati di 3-metilsolfinilpropile o di tutti e due, elevati al di sopra di quelli trovati inizialmente in linee di riproduzione di *Brassica oleracea*, che comprende le operazioni di

(a) incrociare specie selvatiche di *Brassica oleracea* scelte dal gruppo consistente in *B. villosa* e *B. drepanensis* con linee di riproduzione controllata di

broccoli per produrre piante ibride;

(b) selezionare le piante ibride della fase (a) con livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile o glucosinolati di 3-metilsolfinilpropile o tutti e due;

(c) reincronciare con linee di riproduzione controllata di broccoli per produrre piante reincrociate; e

(d) selezionare le piante reincrociate della fase (c) con livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile o di glucosinolati di 3-metilsolfinilpropile o di tutti e due.

3. Metodo secondo la rivendicazione 2 che comprende aggiuntivamente l'operazione di:

(e) selezionare una linea di broccoli con livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile o di glucosinolati di 3-metilsolfinilpropile o di tutti e due in grado di provocare una forte induzione di enzimi della fase II.

4. Metodo per la produzione di *Brassica oleracea* con livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile o di glucosinolati di 3-metilsolfinilpropile, o di tutti e due, elevati al di sopra di quelli trovati inizialmente in linee di riproduzione di *Brassica oleracea*, e comprendente alleli SI specifici, la cui presenza in *Brassica oleracea* risulta in

autoincompatibilità della *Brassica oleracea*, il metodo comprende le operazioni di:

(a) incrociare specie selvatiche di *Brassica* scelte dal gruppo consistente in *B. villosa* e *B. drepanensis* con linee di riproduzione controllata di broccoli doppiamente aploidi che contengono alleli SI specifici per produrre piante ibride:

(b) selezionare le piante ibride della fase (a) con livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile o di glucosinolati di 3-metilsolfinilpropile o di tutti e due; e

(c) effettuare una vagliatura delle piante ibride della fase (b) alla ricerca di alleli SI specifici con marcanti RFLP per identificare le piante ibride comprendenti gli alleli SI; e

(d) selezionare le piante ibride identificate nella fase (c).

5. Metodo secondo la rivendicazione 4 che comprende in aggiunta le operazioni di:

(b1) reincrociare con la linea di riproduzione di broccoli per produrre piante reincrociate;

(b2) selezionare le piante reincrociate della fase (b1) con livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile o di glucosinolati di 3-metilsolfinilpropile o di tutti e due; e

(e) selezionare una linea di broccoli con livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile o di glucosinolati di 3-metilsolfinilpropile o di tutti e due e alleli SI appropriati che sia in grado di provocare una forte induzione di enzimi della fase II.

6. Metodo per la produzione di *Brassica oleracea* con livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile o di glucosinolati di 3-metilsolfinilpropile, o di tutti e due, elevati al di sopra di quelli trovati inizialmente in linee di riproduzione di *Brassica oleracea*, che comprende le operazioni di:

(a) incrociare specie selvatiche di *Brassica* scelte dal gruppo consistente in *B. villosa* e *B. drepanensis* con linee di riproduzione controllata di broccoli doppiamente aploidi per produrre piante ibride;

(b) utilizzare sonde di DNA per selezionare le piante ibride della fase (a) con una combinazione genetica che codifica l'espressione di livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile o di glucosinolati di 3-metilsolfinilpropile o di tutti e due;

(c) reincrociare con la linea di riproduzione controllata di broccoli doppiamente aploidi per produrre piante reincrociate;

(d) selezionare le piante reincrociate della fase (c) con la combinazione genetica che codifica l'espressione

di livelli elevati di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile o di glucosinolati di 3-metilsolfinilpropile o di tutti; e

(e) selezionare una linea di broccoli con elevati livelli di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile o di glucosinolati di 3-metilsolfinilpropile o di tutti e due in grado di provocare una forte induzione di enzimi della fase II.

7. Metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 6 nel quale è elevato solo il glucosinolato di 4-metilsolfinilbutile.

8. Metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 6 nel quale è elevato solo il glucosinolato di 3-metilsolfinilpropile.

9. Pianta commestibile del genere *Brassica* prodotta secondo il metodo di una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 6.

10. Porzione commestibile di una pianta di broccoli prodotta secondo il metodo di una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 6.

11. Semente di una pianta di broccoli prodotta secondo il metodo di una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 6.

12. Metodo secondo la rivendicazione 6 nel quale le sonde di DNA utilizzate vengono scelte all'interno del

gruppo comprendente: pW176, pW141, pW207, pW224, pW114, pW145, pW123, pW138, pW197, pW228 e pW106.

13. Pianta di broccoli avente livelli elevati di glucosinolati di 3-metilsolfinilpropile o di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile o di tutti e due, elevati al di sopra di quelli trovati inizialmente in linee di riproduzione di *Brassica oleracea*, in cui la pianta di broccoli è una pianta ibrida prodotta incrociando una linea di riproduzione di broccoli con una specie selvatica di *Brassica* scelta dal gruppo consistente in *B. drepanensis* e *B. villosa*.

14. Pianta di broccoli secondo la rivendicazione 13 nella quale la concentrazione di 3-metilsolfinilpropile o di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile o di tutti e due è compresa tra 10 e 100 μ moli per grammo di peso secco.

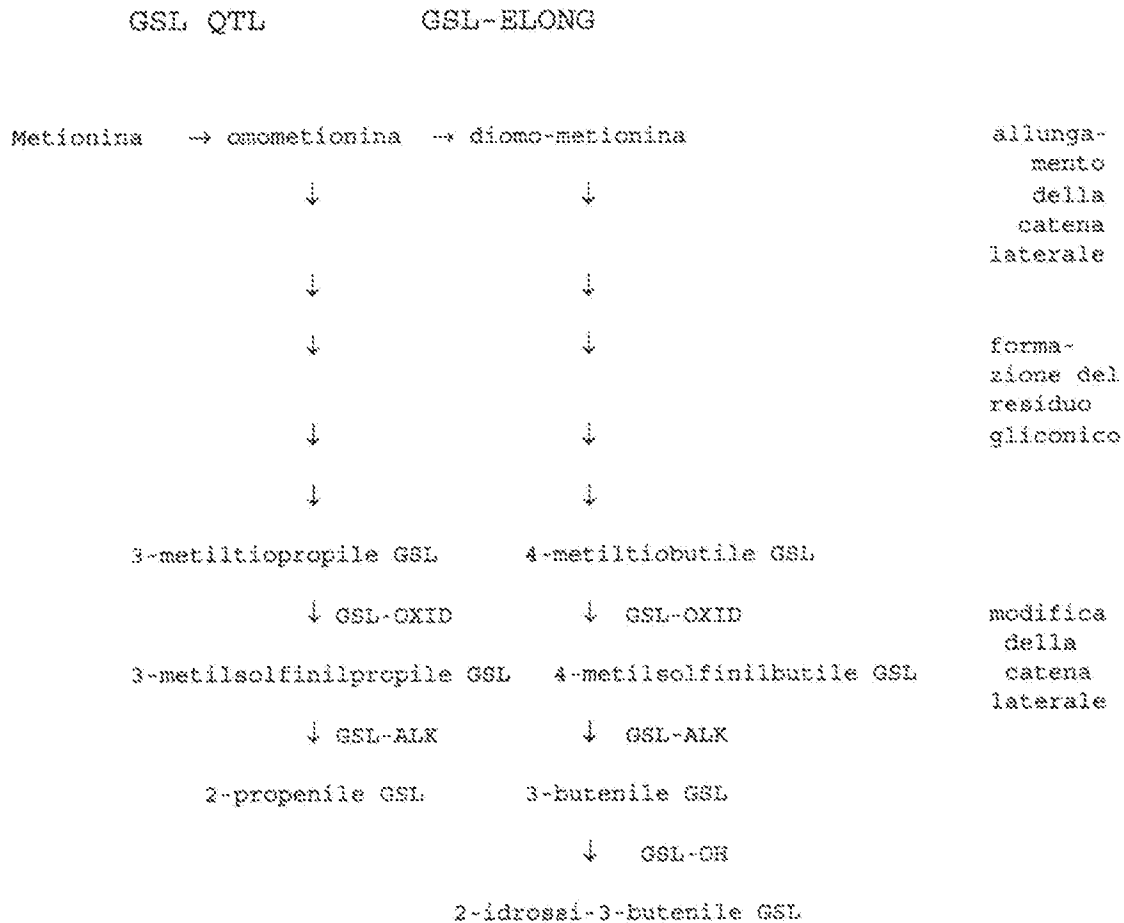
15. Infiorescenza di broccoli avente livelli elevati di glucosinolati di 3-metilsolfinilpropile o di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile o di tutti e due, elevati al di sopra di quelli trovati inizialmente in linee di riproduzione di *Brassica oleracea*, in cui l'infiorescenza di broccoli è ottenuta da una pianta ibrida prodotta incrociando una linea di riproduzione di broccoli con una specie selvatica di *Brassica* scelta dal gruppo consistente in *B. drepanensis* e *B. villosa*.

16. Infiorescenza di broccoli secondo la rivendicazione 15 nella quale la concentrazione di 3-metilsolfinilpropile o di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile o di tutti e due è compresa tra 10 e 100 μ moli per grammo di peso secco.

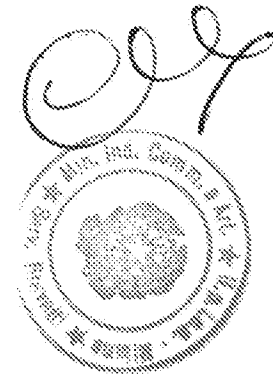
17. Cellula vegetale di *Brassica* avente livelli elevati di glucosinolati di 3-metilsolfinilpropile o di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile o di tutti e due, elevati al di sopra di quelli trovati inizialmente in linee di riproduzione di *Brassica oleracea*, in cui la cellula è una cellula di una pianta ibrida prodotta incrociando una linea di riproduzione di broccoli con una specie selvatica di *Brassica* scelta dal gruppo consistente in *B. drepanensis* e *B. villosa*.

18. Cellula vegetale secondo la rivendicazione 17 nella quale la cellula è una cellula di infiorescenza.

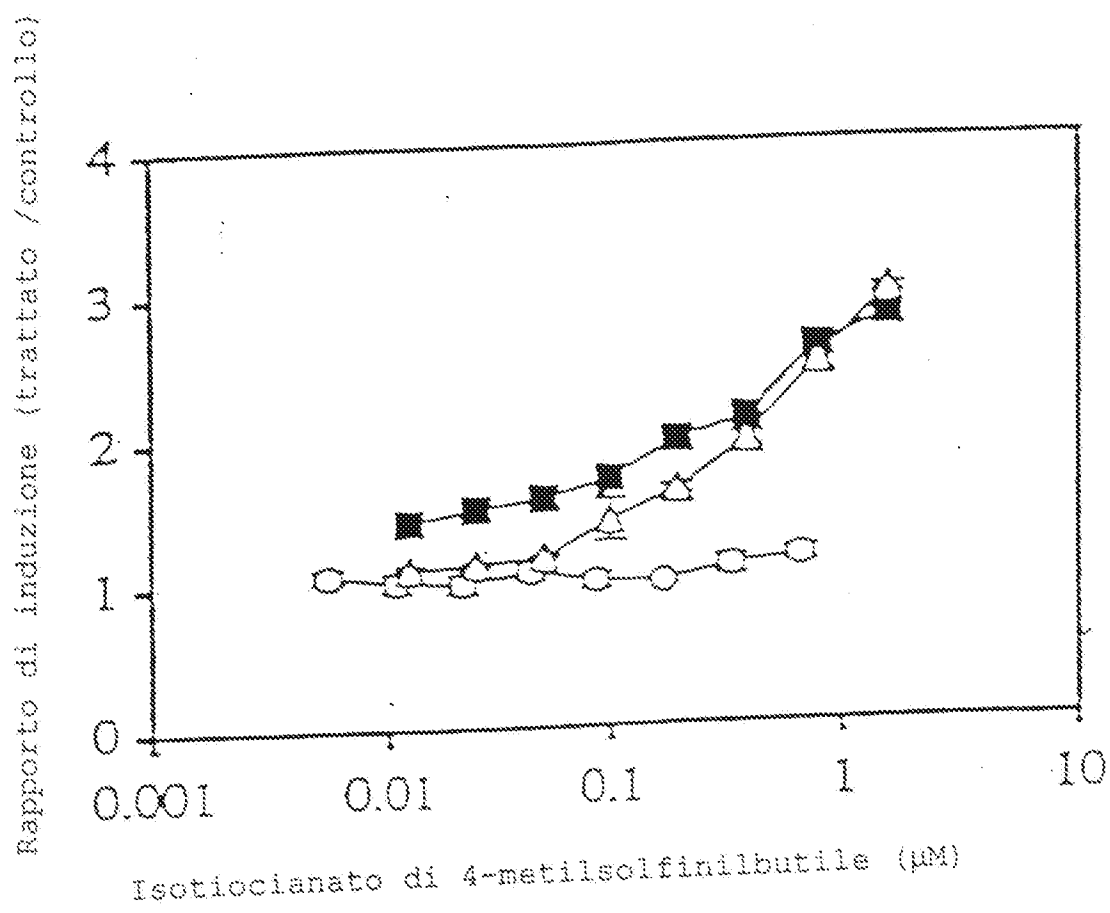
19. Cellula vegetale secondo la rivendicazione 17, nella quale la concentrazione di glucosinolati di 3-metilsolfinilpropile o di glucosinolati di 4-metilsolfinilbutile o di tutti e due, è compresa tra 10 e 100 μ moli per grammo di peso secco.



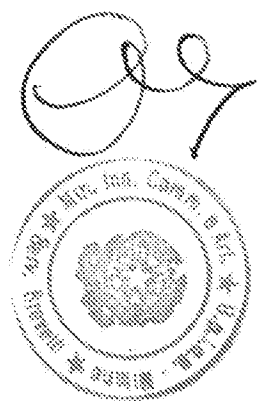
M199 A 000732



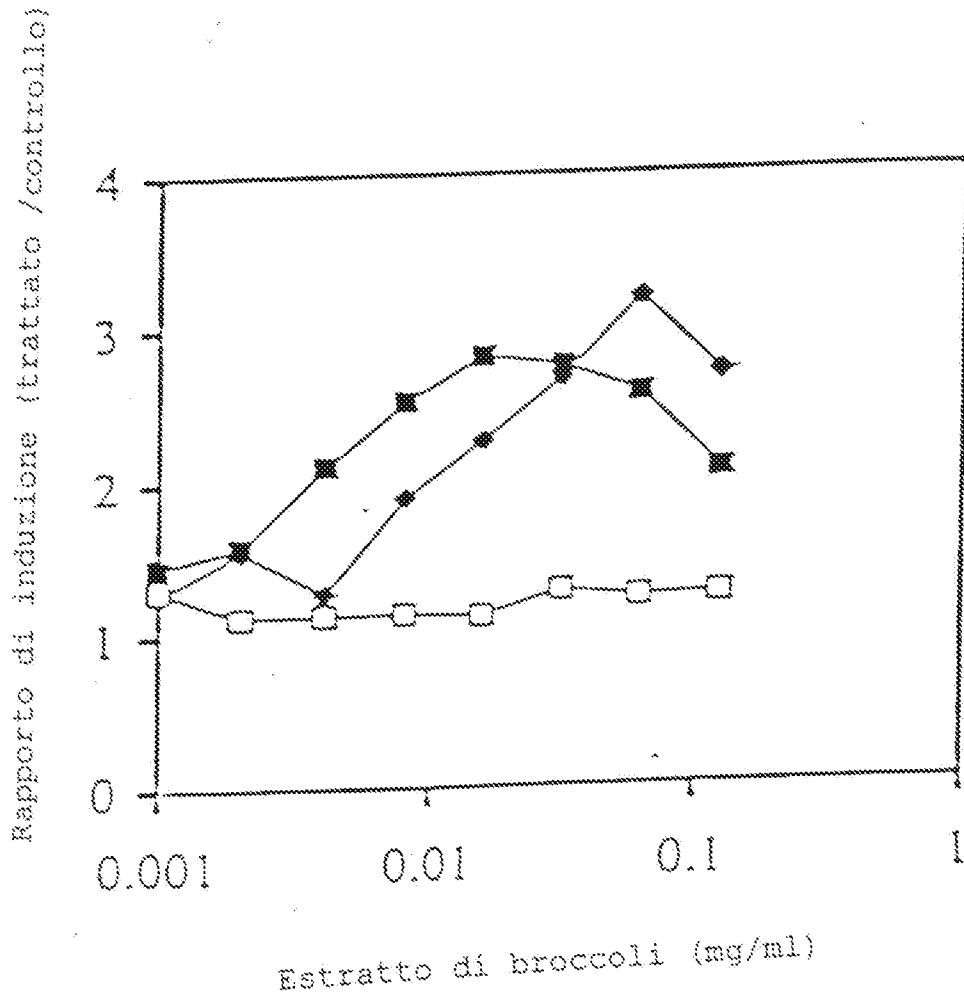
G.L.
 Dr. Giorgio LONGO
 N. 834 ALBO 834 B
 (in proprio e per gli altri)



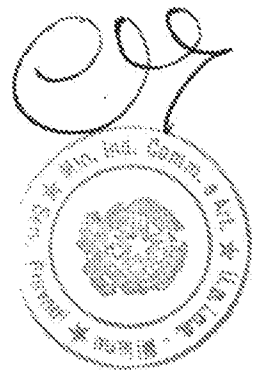
MISS A 0007 32



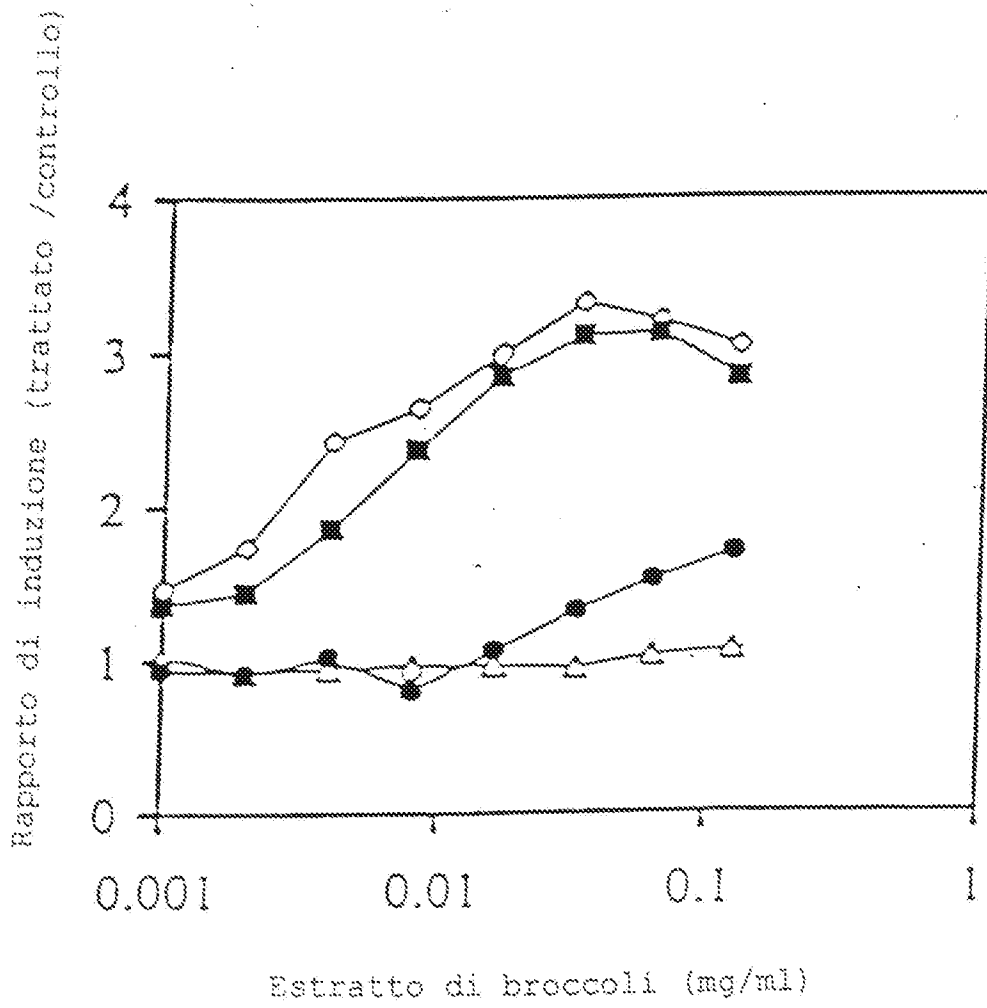
Giorgio Longo
Dr. Giorgio LONGO
Isoc. ALBO 634 B
(in proprio e per gli altri)



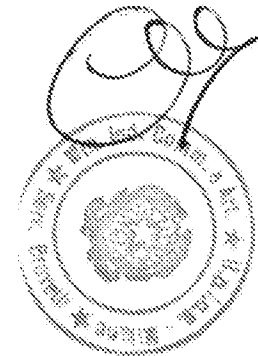
MI99 A 0007 32



Giorgio Long
Dr. Giorgio LONG
N. iscr. ALBO 834 B
(in proprio e per gli altri)



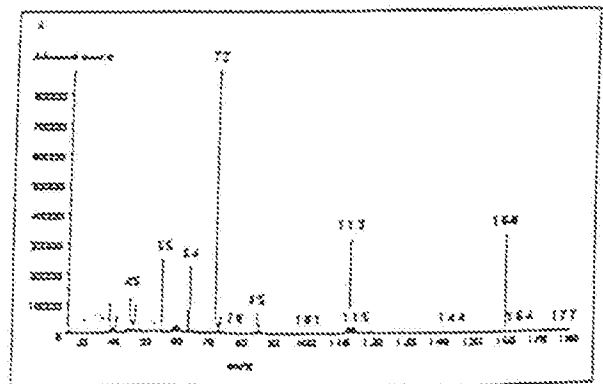
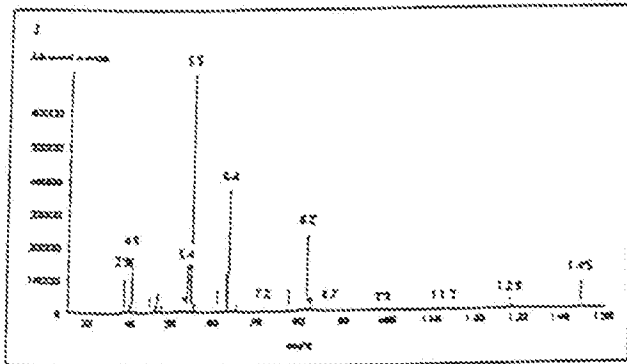
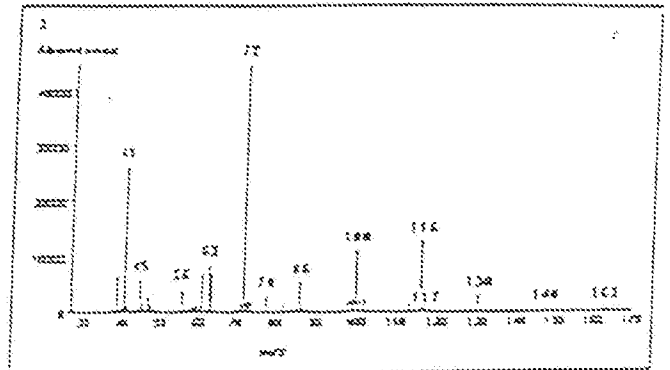
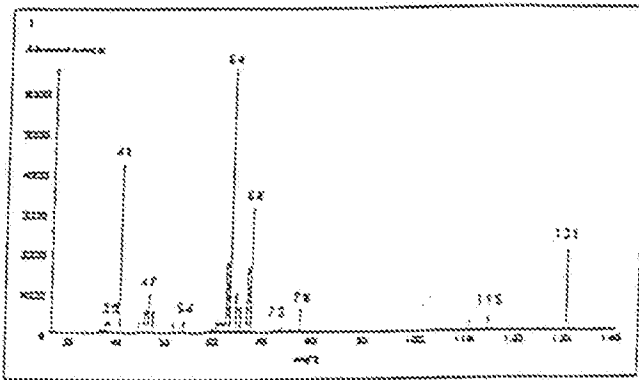
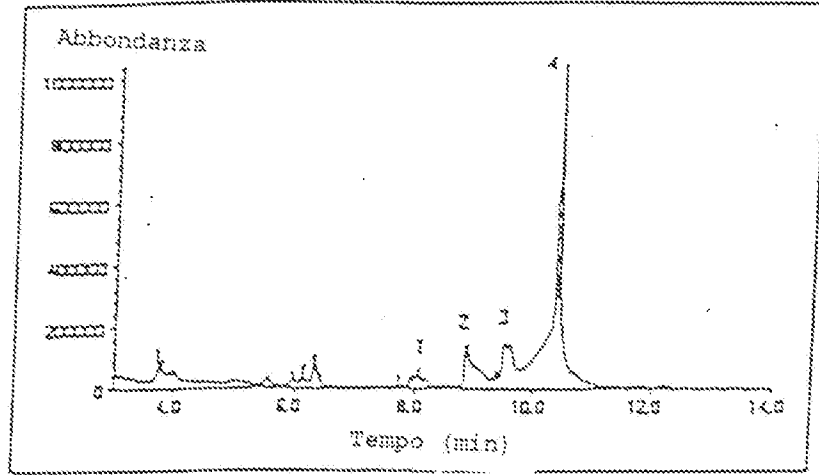
M199 A 0007 32



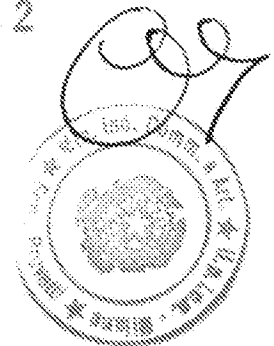
Giorgio Long
Dr. Giorgio LONG

p.i.: PLANT BIOSCIENCE LIMITED

N. Iscr. ALBO 894 B
 (in proprio e per gli altri)



M199 A0007 32



p.i.: PLANT BIOSCIENCE LIMITED

CSPE, Long
Dr. Giorgio LONG
N. Iscr. ALBO 834 B
(in proprio e per gli altri)