



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

<b>DOMANDA NUMERO</b>	<b>102001900961459</b>
<b>Data Deposito</b>	<b>09/10/2001</b>
<b>Data Pubblicazione</b>	<b>09/04/2003</b>

<b>Priorità</b>	2000-310811
<b>Nazione Priorità</b>	JP
<b>Data Deposito Priorità</b>	

<b>Sezione</b>	<b>Classe</b>	<b>Sottoclasse</b>	<b>Gruppo</b>	<b>Sottogruppo</b>
A	01	G		

Titolo

METODO PER PIANTARE ALBERI E METODO PER CRESCERE PIANTE

TO 2001 A000954

DESCRIZIONE

del brevetto per Invenzione Industriale di  
NIWA KOZO, di nazionalità giapponese,  
domiciliato a KOCHI (GIAPPONE),  
4-4, ASAHIMACHI, TOSASHIMIZU-SHI

Inventori: NIWA Kozo, SASAKI Yoshinori

SFONDO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce ad una tecnica per far crescere piante come alberi e, più specificamente, ad una tecnica per far crescere selettivamente alberi giovani o simili che sono resistenti ai raggi ultravioletti affinché possa venire ottenuta in modo affidabile vegetazione, come una foresta, che è resistente ai raggi ultravioletti.

È stato recentemente discusso il problema dell'emissione dei raggi ultravioletti sulla terra. Poiché recentemente è stata in particolare distrutta l'ozonofera della stratosfera che circonda la terra, i raggi ultravioletti giungono sulla terra dall'esterno ed è stato confermato che hanno una influenza negativa sulla biologia della terra.

Per esempio, per il corpo umano, è stato riportato l'incremento di danni a causa dei raggi ultravioletti, ed è stato confermato che l'aumento dei casi di cancro della pelle è dovuto all'incre-

CERBARO Elena  
Iscrizione Albo nr. 426/BMI

mento dell'irradiazione mediante raggi ultravioletti. Si ritiene che i danni dovuti a raggi ultravioletti provochino la formazione di ossigeno attivo. Niwa, uno dei presenti inventori, ha studiato le loro proprietà farmacologiche e biochimiche su diversi danni causati da ossigeno attivo per lunghi anni.

#### SOMMARIO DELL'INVENZIONE

Le condizioni reali che danneggiano basate su raggi ultravioletti convenzionali, sono state ottenute principalmente studiando i loro effetti sul corpo umano come argomenti principali. Contrariamente a questo, i presenti inventori sono pervenuti alla conclusione che i raggi ultravioletti hanno causato anche grandi danni alle foreste.

Si descrive che la ragione principale del danneggiamento causato alle foreste è l'azione delle piogge acide. Per esempio, nel distretto di Schwarzwald in Germania, uno studio riguarda l'elevato danneggiamento di grandi aree coperte in cui molti alberi in piedi sono stati fatti seccare dalla pioggia acida. Gli ossidi acidi, come gli ossidi contenenti zolfo presenti nelle combustioni industriali, si disciolgono nelle gocce di pioggia e si ottiene la pioggia acida.

CERBARO Elena  
Iscrizione Albo nr 426/BMI

Lo studio sul danneggiamento è stato eseguito ripetutamente dai presenti inventori che hanno visitato le foreste nazionali danneggiate ed hanno ottenuto molti risultati.

I presenti inventori hanno osservato il danneggiamento delle foreste nazionali visitando ripetutamente diversi luoghi delle foreste danneggiate in diversi distretti. Dopo uno studio dettagliato riguardante le condizioni osservate, i presenti inventori hanno ritenuto che è possibile che fattori diversi dalla pioggia acida siano fortemente interessati con i fenomeni anormali di alberi secchi che si trovano largamente nelle foreste visitate. È possibile che i danni siano dovuti ai raggi ultravioletti che sono stati ritenuti il fattore principale relativo al danneggiamento delle foreste nei nostri ulteriori studi della ricerca.

In precedenza non erano stati fatti studi così approfonditi sui danni alle foreste apportati dai raggi ultravioletti. Siccome i presenti inventori hanno osservato il danno alle foreste dovuto ai raggi ultravioletti, è necessario intraprendere rapidamente una azione pratica per impedire tale danno alle foreste. A causa dell'impoverimento dell'ozonofera e dell'aumento dell'irradiazione ultra-

**CERBARO Elena**  
(Iscrizione Albo nr. 426/BM)

violetta su scala mondiale, occorre intraprendere con la massima urgenza una azione per impedire il danneggiamento causato da raggi ultravioletti tra i diversi fattori che danneggiano le foreste. Se i danni vengono trattati senza una linea d'azione, in futuro, gli alberi delle foreste seccheranno in tutto il mondo a causa dei raggi ultravioletti. Come previsione, le foreste scompariranno su scala globale.

Lo scopo della presente invenzione consiste nell'eliminare il danneggiamento delle foreste causato da raggi ultravioletti.

La foresta secondo la presente invenzione piantata dall'uomo è caratterizzata dal fatto che viene costituita piantando pianticelle che sono multiploidi (TASUSEI in giapponese). Il numero di cromosomi delle pianticelle è triploide o tetraploide. Le pianticelle sono conifere. Le pianticelle di una conifera sono pianticelle scelte dal gruppo costituito da cedro giapponese e cipresso giapponese. Il numero di cromosomi della pianticella viene ottenuto aumentando il numero di cromosomi mediante, per esempio, riproduzione controllata e mutazione.

Il metodo secondo la presente invenzione per

CERBARO Elena  
(iscrizione Albo nr 426/BM)

piantare alberi è caratterizzato dal fatto che comprende le fasi di: selezionare pianticelle aventi cromosomi multiploidi; e piantare le pianticelle selezionate. Il numero di cromosomi delle pianticelle è triploide o tetraploide. Le pianticelle sono conifere. Le pianticelle di una conifera sono pianticelle di cedro giapponese o cipresso giapponese. Il numero di cromosomi delle pianticelle viene ottenuto aumentando il numero di cromosomi mediante riproduzione controllata e mutazione. Il metodo di coltivazione delle piante secondo la presente invenzione è caratterizzato dal fatto che comprende la fase di formare artificialmente vegetazione che è significativamente resistente ai raggi ultravioletti rispetto alla vegetazione costituita da piante diploidi, facendo crescere selettivamente piante il cui numero di cromosomi eccede il numero di base intrinseco delle specie.

In questa descrizione, "multiploide" (TASUSEI in giapponese) indica quei cromosomi con più di 3 volte il cromosoma fondamentale moltiplicando il numero intero di cromosomi, e quei cromosomi, uno più, oltre il numero di base vengono acquisiti dalle specie. Inoltre, si noterà che aploide o diploide, che si osserva normalmente nelle piante, non è

CERBARO Elena  
Iscrizione Albo nr 426/BMI

compreso nel campo definito dal summenzionato "multiploide".

#### DESCRIZIONE DELLE FORME DI REALIZZAZIONE PREFERITE

Quanto segue descrive esempi e dettagli di realizzazione.

La pianticella usata nella foresta piantata dall'uomo, nel metodo per piantare alberi e nel metodo per crescere piante nella presente invenzione, è resistente ai raggi ultravioletti (comprendente in seguito l'abbreviazione "resistente a UV"). La forestazione avviene scegliendo pianticelle resistenti a UV e si ottiene una foresta piantata dall'uomo che ha proprietà di resistenza nei confronti dei raggi ultravioletti.

Dopo selezione delle pianticelle che possiedono proprietà di resistenza a UV, per la selezione si adotta uno standard di cromosomi multiploidi (TASUSEI) acquisito dalle pianticelle. Multiploide indicato in questa sede indica il caso in cui la pianticella ha più di tre cromosomi triploidi.

Tale standard è stato suggerito per la prima volta dai presenti inventori. Gli alberi che hanno cromosomi multiploidi possiedono resistenza nei confronti dei raggi ultravioletti rispetto a quella normalmente osservata negli alberi diploidi. Nella

CERBARO Elena  
iscrizione Albo nr. 426/BMI

foresta piantata dall'uomo formata piantando pianticelle resistenti a UV, verrà inibito in modo efficace il danneggiamento provocato da raggi ultravioletti che viene osservato in alberi aventi cromosomi diploidi. Il fenomeno anormale come l'essiccamento di alberi in piedi, colorazione delle foglie di sempreverdi, la caduta fuori stagione delle foglie di alberi decidui, si ritiene siano causati da raggi ultravioletti, e questo può venire impedito.

Per la descrizione di diversi tipi di albero e per accertare l'efficacia della presente invenzione negli esempi, vengono forniti la seguente esposizione e descrizione dettagliate.

(Esempio)

Nell'esempio, le foglie delle piante descritte alle voci (1)-(3) seguenti, sono state raccolte e sottoposte ad un esperimento di resistenza ai raggi ultravioletti (resistenza a UV).

(1) Riso

Per un confronto di campioni, è stata usata la foglia di riso. Il riso è una pianta monocotiledone ben nota per la sua resistenza ai raggi ultravioletti. I campioni di foglie di riso usati nell'esperimento sono stati fatti crescere nella città di

CERBARO Elena  
Iscrizione Albo nr. 426/BM

Tosashimizu, Prefettura di Kochi, Shikoku, Giappone. Le foglie di riso sono state raccolte da cinque luoghi nella città di Tosashimizu e sottoposte alla misurazione dell'attività enzimatica, ecc., mediante il metodo descritto in seguito.

(2) Felce florida

Foglie di felce florida che cresce spontaneamente a Tosashimizu, Giappone, sono state raccolte come oggetto dell'esperimento. È ben noto che l'evoluzione della pianta di felce florida, una felce, è più vecchia di altri alberi. Molti studi si riferiscono a casi in cui la felce florida possiede adattabilità alle condizioni ambientali acquisendo il ploide multiplo di cromosomi delle specie.

(3) Gimnosperme come Pinus Thunbergii, ecc.

Come pianta sensibile ai raggi ultravioletti, le foglie di gimnosperme sono state include negli scopi dell'esperimento. Nelle Tabella 1-4 di questo Esempio, per l'esperimento sono state usate foglie di KUROMATSU (nome inglese: pino nero giapponese), SUGI (nome inglese: cedro giapponese) e HINOKI (nome inglese: cipresso giapponese) che crescono spontaneamente sulle montagne del Giappone. Questi campioni di foglie degli alberi Pinus Thunbergii, ce-

dro e cipresso sono state raccolte dai luoghi e numerate come mostrato nelle Tabella 1-4.

Il *Pinus Thunbergii* (in seguito abbreviato come "Pinus thunbergii di controllo") è noto per essere sensibile ai raggi UV comuni e *Pinus Thunbergii* resistenti ai raggi UV (in seguito abbreviato come "Pinus thunbergii resistente a UV") sono descritti separatamente nella Tabella 1; sono stati eseguiti saggi per l'attività SOD, l'attività GSH-Px e dei livelli di perossido lipidico.

Inoltre, come dimostrato nelle Tabelle 5 e 6, sono anche state eseguite misurazioni per specie triploidi e specie tetraploidi derivanti da incrocio e mutazione.

CERBARO Elena  
Iscrizione Albo nr 426/BMI

[Tabella 1] Confronto dei livelli di perossido lipidico, delle attività SOD e glutatione perossido (GSH-Px) fra Pinus thunbergii giapponese resistente a UV e Pinus thunbergii giapponese sensibile a UV

	Nome campione	Attività SOD (unità/g)	Attività GSH-Px (unità/g)	Livelli perossido lipidico (nmoli/g)
Pinus thunbergii resistente a UV	<b>Nakamikata -79</b>	<b>391 ± 46</b>	<b>0.0215 ± 0.0032</b>	<b>18.0 ± 2.1</b>
	<b>Tosashimizu -63</b>	<b>225 ± 29</b>	<b>0.0171 ± 0.0021</b>	<b>16.7 ± 2.0</b>
	<b>Ooita -8</b>	<b>201 ± 28</b>	<b>0.0269 ± 0.0029</b>	<b>18.2 ± 2.3</b>
	<b>Ei -425</b>	<b>358 ± 46</b>	<b>0.0190 ± 0.0022</b>	<b>20.7 ± 2.8</b>
	<b>Tsuyasaki-50</b>	<b>461 ± 73</b>	<b>0.0236 ± 0.0035</b>	<b>22.2 ± 3.3</b>
	<b>Misaki -90</b>	<b>346 ± 41</b>	<b>0.0230 ± 0.0036</b>	<b>23.4 ± 3.0</b>
	<b>Namikata- 78</b>	<b>456 ± 59</b>	<b>0.0331 ± 0.0052</b>	<b>22.0 ± 3.7</b>
	<b>Tanabe -54</b>	<b>367 ± 44</b>	<b>0.0214 ± 0.0027</b>	<b>20.5 ± 2.8</b>
	<b>Yasu -87</b>	<b>195 ± 21</b>	<b>0.0236 ± 0.0033</b>	<b>18.4 ± 2.9</b>
	<b>Yoshida -2</b>	<b>817 ± 106</b>	<b>0.0246 ± 0.0039</b>	<b>23.5 ± 2.8</b>
	<b>Sendai -290</b>	<b>245 ± 31</b>	<b>0.0233 ± 0.0039</b>	<b>19.9 ± 2.7</b>
	<b>Mitoyo -108</b>	<b>896 ± 107</b>	<b>0.0276 ± 0.0030</b>	<b>24.1 ± 3.8</b>
	Media	<b>423 ± 56*</b>	<b>0.0237 ± 0.0035</b>	<b>20.6 ± 3.6</b>
Controllo: Pinus thunbergii sensibile a UV	<b>No.1</b>	<b>252 ± 30</b>	<b>0.0177 ± 0.0023</b>	<b>20.5 ± 3.2</b>
	<b>No.2</b>	<b>99 ± 11</b>	<b>0.0142 ± 0.0018</b>	<b>22.9 ± 4.1</b>
	<b>No.8</b>	<b>141 ± 18</b>	<b>0.0198 ± 0.0031</b>	<b>21.1 ± 2.9</b>
	<b>No.4</b>	<b>356 ± 46</b>	<b>0.0206 ± 0.0037</b>	<b>21.9 ± 3.5</b>
	<b>No.5</b>	<b>352 ± 42</b>	<b>0.0198 ± 0.0017</b>	<b>18.7 ± 2.4</b>
	Media	<b>240 ± 37*</b>	<b>0.00184 ± 0.0031</b>	<b>21.0 ± 3.8</b>

\*P < 0,01 fra alberi di Pinus thunbergii resistenti e sensibili a UV.

CERBARO Elena  
 (iscrizione Albo nr 426/BMI)

[Tabella 2] Confronto dei livelli di perossido lipidico e delle attività SOD e GSH-Px in cipresso giapponese triploide

		Nome campione	Poli-ploidia	Attività SOD (unità/g)	Attività GSH-Px (unità/g)	Livelli di perossido lipidico (nmoli/g)
Cipresso giapponese	Diploidi di controllo	B-4	2X	472±56	0.0180±0.0023	19.9±2.3
		B-11	2X	614±73	0.0155±0.0020	21.8±2.9
		B-13	2X	552±71	0.0019±0.0003	27.5±3.0
		D-4	2X	874±104	0.0107±0.0016	26.4±3.9
		D-9	2X	549±65	0.0028±0.0003	25.7±3.5
		D-12	2X	683±88	-	28.8±3.7
		D-14	2X	466±80	0.0077±0.0012	22.9±3.6
		Media		601±46 †	0.0094±0.0002	24.6±4.1
	Triploidi artificiali	A-8	3X	479±71	0.0123±0.0017	24.7±3.4
		A-13	3X	543±70	0.0119±0.0015	27.8±3.6
		A-24	3X	685±89	0.0014±0.0002	28.1±4.4
		A-54	3X	505±70	0.0058±0.0008	22.7±3.1
		A-58	3X	558±55	0.0079±0.0012	21.1±2.3
		A-72	3X	674±74	-	19.1±2.4
		A-77	3X	482±77	0.0065±0.0011	20.8±3.3
		C-6	3X	559±61	0.0100±0.0012	21.5±2.5
		C-22	3X	548±65	0.0126±0.0017	19.5±2.3
		C-37	3X	580±69	0.0055±0.0006	22.2±2.8
		C-50	3X	589±82	-	21.1±3.1
		C-55	3X	577±75	-	20.9±2.7
		C-60	3X	624±74	-	19.4±2.3
		C-140	3X	646±83	0.0026±0.0004	19.9±2.7
		C-225	3X	1005±120		21.1±2.1
		Media		606±51 †	0.0076±0.0018	22.0±3.9

CERBARO Elena  
 (Iscrizione Albo nr 426/BMI)

[Tabella 3] Confronto dei livelli di perossido lipidico e delle attività SOD e GSH-Px in alberi positivi di cipresso giapponese

		Nome campione	Ploidia	Attività SOD (unità/g)	GSH-Px (unità/g)	Livelli di perossido lipidico (nmoli/g)
Cipresso giapponese (alberi positivi)	Diploidi	Aso-7	2X	459 ± 55	0.0069 ± 0.0009	24.4 ± 2.9
		Saeki-17	2X	423 ± 54	0.0160 ± 0.0020	21.2 ± 2.7
		Hiji-4	2X	544 ± 76	0.0019 ± 0.0002	23.5 ± 2.5
		Kusu-6	2X	459 ± 59	0.0171 ± 0.0027	20.7 ± 2.4
		Taketa-8	2X	655 ± 85	0.0068 ± 0.0009	24.0 ± 2.6
		Media		508 ± 78 †	0.0097 ± 0.0018	22.7 ± 4.3
	Triploidi	Misoshi-4	3X	420 ± 46	0.0136 ± 0.0020	23.1 ± 2.3
		Fuji-2	3X	582 ± 75	0.0106 ± 0.0012	14.1 ± 1.5
		Media		† 501 ± 76	0.0121 ± 0.0026	18.6 ± 4.1
	Tetraploidi	Sanko-Hinoki	4X	1902 ± 190	0.0103 ± 0.0012	21.5 ± 3.4
		Kiso-4X	4X	905 ± 99	0.0058 ± 0.0007	16.2 ± 2.5
		Media		† 1403 ± 212	0.0081 ± 0.0013	18.8 ± 2.8

† P < 0,001 (fra tetraploidi di alberi positivi di cipresso giapponese e diploidi o triploidi di cipresso giapponese, fra tetraploidi di alberi positivi di cipresso giapponese e diploidi o triploidi di alberi positivi di cipresso giapponese).

CERBARO Elena  
 Iscrizione Albo nr 426/BMI

[Tabella 4] Confronto dei livelli di perossido lipidico, attività SOD e GSH-Px in alberi positivi di cedro giapponese, foglie di riso e felce florida

		Nome campione	Poli-polidia	Attività SOD (unità/g)	Attività GSH-Px (unità/g)	Livelli di perossido lipidico (nmoli/g)
Cedro giapponese (alberi positivi)	Diploidi	Naga-9	2X	12±1.4	0.0134±0.0021	4.6±0.5
		Akita-1	2X	37±4.4	0.0096±0.0015	5.0±0.6
		Saga-3	2X	21±2.5	0.0114±0.0018	3.1±0.5
		Saeki-10	2X	52±6.7	0.0104±0.0015	4.1±0.5
		Kunisaki-8	2X	26±2.8	0.0104±0.0017	4.5±0.7
		Nishikawa-2	2X	17±2.2	0.0093±0.0011	5.0±0.8
		Average		27 ± 3.8 §	0.0108±0.0019	4.3±0.6
	Triploidi	Ooi-5	3X	161±19	0.0141±0.0019	7.0±0.8
		Kuji-30	3X	41±5.3	0.0092±0.0014	8.7 ± 0.4
		Onta-2	3X	317±44	0.0150±0.0024	9.5 ± 1.1
		Kyurin-3X	3X	108±11	0.0182±0.0023	8.7 ± 1.1
		Fujitsu-28	3X	236±28	0.0168±0.0022	8.2 ± 1.2
		Miyoshi-10	3X	95±12	0.0109±0.0011	6.1 ± 0.8
		Kuga-1	3X	59±8.2	0.0115±0.0013	8.0 ± 1.2
		Media		145±23 †	0.0135±0.0021	7.8 ± 1.2
	Tetraploidi	Kanagawa-sugi	4X	3589±430	0.0176±0.0017	8.2 ± 0.9
		Cr-38	4X	2684±295	0.0128±0.0020	9.8 ± 1.2
		Media		3136±40 † §	0.0152±0.0025	8.7 ± 1.3
	Foglie di riso		Tosashimizu		2941±352	1.8841±0.1522
Felce florida		Tosashimisu		1394±181	0.0889±0.0115	51 ± 8.1

† P < 0,0001 fra tetraploidi e triploidi di alberi positivi di cedro giapponese.

CERBARO Elena  
 Iscrizione Albo nr 426/BM

$S P < 0,00001$  fra tetraploidi e diploidi di alberi positivi di cedro giapponese.

Come mostrato nella Tabella 1, il *Pinus thunbergii* resistente ai raggi ultravioletti (resistente a UV) viene confrontato con *Pinus thunbergii* sensibile ai raggi ultravioletti (come controllo) per quanto riguarda l'attività SOD, l'attività di glutatione perossidasi (GSH-Px) ed i livelli di perossido lipidico.

Nella Tabella 2, diploidi di cipresso giapponese vengono confrontati con triploidi per quanto riguarda i livello di perossido lipidico, attività SOD e attività GSH-Px.

Nella Tabella 3, triploidi e tetraploidi di alberi positivi di cipresso giapponese vengono confrontati per le singole attività SOD, attività GSH-Px e livelli di perossido lipidico.

Nella Tabella 4, sono riportati confronti dell'attività SOD, attività GSH-Px, livelli di perossido lipidico per diploidi, triploidi e tetraploidi di alberi positivi di cedro giapponese, foglie di riso e felce florida. Il confronto della Tabella 4 con le Tabelle 5 e 6 viene descritto in seguito.

Gli estratti ottenuti dalle foglie di diploi-

di, triploidi e tetraploidi di cedro giapponese e cipresso giapponese, sono confrontati nelle Tabelle 5 e 6 come descritto in seguito. Come mostrato nella Tabella 5, nella colonna del campione aggiunto, come simbolo per la descrizione, la dimensione del campione con 0,6 g/ml viene indicata "x1" e quindi 3,0 g/ml "x2", 6,0 g/ml "x10". Nella Tabella 6, sono compresi i dati delle foglie di riso per confronto.

Sono state valutate le singole attività enzimatiche ed i livelli di perossido lipidico per le piante descritte alle voci (1)-(3). Le voci di valutazione per la misurazione dell'attività enzimatica sono: attività SOD, attività di glutatione perossido (GSH-Px) e attività di catalasi. I risultati ottenuti sono mostrati nelle Tabelle 1-4. I numeri sono indicati come media  $\pm$  scostamento standard. D'altra parte, l'attività di catalasi per piante diverse dalle foglie di riso è evidentemente non rivelabile e i suoi risultati non sono mostrati nelle Tabelle 1-4.

Per quanto riguarda l'analisi quantitativa del livello di perossido lipidico, il suo livello viene misurato usando il metodo di reazione TBA di conversione dell'acido docoesanoico in sostanza reat-

CERBARO Elena  
fiscrizione Albo nr 426/BMI

tiva a TBA.

Omogeneizzati di foglie ottenuti dalle singole piante suddescritte vengono preparati nel modo seguente ed usati come campioni. Le foglie raccolte vengono raccolte dalle piante (1)-(3). Le foglie raccolte vengono polverizzate in un mulino. Gli omogeneizzati di foglie ottenute dalle singole piante suddescritte vengono usati come campioni. Il procedimento per la preparazione di questi omogeneizzati di foglie è il seguente. Questa polvere viene sospesa in soluzione di etanolo al 95% per la prova di formazione del perossido lipidico oppure in soluzione fisiologica per quelle prove diverse dalla prova di formazione del perossido lipidico. In entrambi i casi la concentrazione è di 60 mg/ml. La soluzione di sospensione viene esposta a trattamento con ultrasuoni (a 15 W per 15 secondi).

Dopo il trattamento con ultrasuoni, la soluzione viene centrifugata (a 1300 g). Si procede come mostrato nella Figura 1 e i supernatanti, dopo centrifugazione, vengono suddivisi in due parti. Una parte serve per la preparazione di un campione per la determinazione del livello di perossido lipidico. L'altra viene filtrata attraverso un filtro da 45  $\mu$ m. Una porzione del filtrato viene usata co-

me campione per il saggio dell'attività SOD ed i filtrati rimanenti vengono usati come campioni per i saggi delle attività di catalasi e di GSH-Px.

(Analisi quantitativa SOD)

Si aggiunge la miscela preparata come suddescritto a 0,2 ml della miscela di saggio contenente xantina-xantina ossidasi che produce  $O_2^-$ , e la quantità di  $O_2^-$  risultante viene determinata dalla quantità di riduzione di ferricitocromo c (tipo III) mediante assorbanza ottica a 550 nm misurata con uno spettrofotometro (Beckman).

La quantità di SOD contenuta nel campione viene definita come quantità di riduzione del citocromo c al 50% e 1 unità di SOD viene espressa come unità/mg di proteina. In questa analisi, il campione stesso non solo inibisce la reazione sul citocromo c senza la mediazione di  $O_2^-$ , ma una piccola quantità di citocromo c può venire ridotta direttamente.

Con questi fattori, la quantità di SOD reale viene calcolata mediante la formula:

$$\text{unità} = \{a - (b - c)\} / (a/2)$$

in cui:

a: assorbanza ottenute mediante l'aggiunta di sola xantina ossidasi.

b: assorbanza ottenuta mediante omogeneizzati di foglie in presenza di xantina ossidasi.

c: assorbanza ottenuta mediante l'aggiunta di omogeneizzato di foglie da solo prima dell'aggiunta di xantina ossidasi.

(Saggio dell'attività di catalasi)

L'attività di catalasi viene determinata sulla velocità di riduzione del perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ). La velocità di riduzione viene misurata per 12-30 secondi in presenza di campioni di omogeneizzato di foglie usando uno spettrofotometro a 240 nm. L'attività viene espressa con la formula mostrata in seguito.

$$K = (2,3/18) \times \log (A1/A2)$$

A1: assorbanza misurata per 12 secondi a 240 nm per la miscela di saggio con volume totale di 3,1 ml costituita da 10 mmoli/l di  $H_2O_2$  disciolte in 3 ml di soluzione tampone di fosfato di potassio 50 mmoli/l e 0,1 ml di omogeneizzato di foglie.

A2: assorbanza misurata per 30 secondi a 240 nm per la miscela di saggio precedente.

In questo saggio, il perossido di idrogeno usato come substrato può essere instabile e quindi il substrato, perossido di idrogeno, viene sostituito

tuito con perborato di sodio. In questo caso, 0,002-0,05 ml di soluzione di campione di foglie vengono sospesi in 2,8 ml di soluzione tampone di fosfato di potassio 0,05 mmoli/l (pH 7,4) e la miscela viene preincubata a 30°C per 5 minuti. In seguito, alla miscela preincubata si aggiunge soluzione 0,2 N di perborato di sodio in una cuvette e si inizia la reazione. I dati vengono registrati per 2-3 minuti a 220 nm.

(Saggio dell'attività GSH-Px)

Per la misurazione di GSH-Px, si usa il metodo di Lawrence e Burk, collegato all'ossidazione di NADPH con glutatione riduttasi. La potenza di ossidazione per NADPH viene misurata a 37°C con uno spettrofotometro con lunghezza d'onda di 340 nm.

La miscela di saggio è costituita da soluzione tampone di fosfato di potassio 50 mmoli/l (pH 7,0), acido etilendiamminotetraacetico 1 mmoli/l,  $\text{NaN}_3$  1 mmole/l, NADPH 0,2 mmoli/l, glutatione 1 mmole/l, 2 unità di glutatione riduttasi e soluzioni di idroperossido di cumene 1,5 mmoli/l oppure perossido di terz-butile 10 mmoli/l.

Alla miscela precedente si aggiunge l'omogeneizzato di foglie per portare a 1,0 ml il volume della soluzione risultante. L'attività enzimatica

CERBARO Elena  
Iscrizione Albo nr 426/BMI

misurata mediante questo metodo viene quindi mostrata come quantità di NADPH ossidato per minuto. L'attività è mostrata in unità/mg di proteina secondo il metodo di Lowry.

(Saggio del perossido lipidico)

L'acido grasso poliinsaturo 4,7,10,13,16,19-docosaesanoico viene diluito a 200 volte in etanolo al 94%. Alla provetta di prova, in cui precedentemente si è versato questo substrato, si aggiungono quindi varie concentrazioni di omogeneizzato e si sottopone ad irradiazione con raggi ultravioletti. Nell'esperimento, si provano omogeneizzati con concentrazione di 0,6, 3,0 e 6,0 mg/ml. Dopo l'irradiazione, la soluzione viene analizzata mediante fluorospettrometria per misurare la quantità di TBA (acido tiobarbiturico). Si imposta una lunghezza d'onda di 515 nm per l'eccitazione e di 553 nm per l'emissione in un fluorospettrometro Hitachi F-2000.

Il risultato è indicato come media  $\pm$  scostamento standard. La quantità di TBA viene adottata come quantità di perossido lipidico. Inoltre, una analisi della differenza significativa viene eseguita mediante il test t di Student. Il risultato del test t dimostra la differenza signifi-

CERBARO Elena  
(iscrizione Albo nr. 426/BM)

ficativa fra i due gruppi.

(Identificazione di ploidie di cromosomi)

La poliploidia degli alberi precedentemente descritti è stata determinata mediante analisi citologica usando cellule terminali della radice o analisi a citometria di flusso usando cellule delle foglie.

La descrizione delle Tabelle 1-6 viene eseguita come segue. Come mostrato nelle Tabelle 1-4, foglie di riso e di felce florida (vedi Tabella 49) hanno mostrato una attività SOD apparentemente elevata rispetto alle gimnosperme come Pinus thunbergii, cedro giapponese, cipresso giapponese. Specialmente la GHS-Px delle foglie di riso è di 1,384 unità/g e l'attività SOD è molto alta a 2941 unità/g.

Come si può vedere dalla Tabella 4, l'attività SOD per le foglie di riso è maggiore di quella delle singole piante provate (tranne il cedro giapponese, una pianta tetraploide) e, in alcuni casi, l'attività SOD più elevata ha mostrato una attività di 100 volte rispetto a quella di un singolo albero ordinario provato. Nella Tabella 4, anche le foglie di felce florida hanno mostrato attività SOD elevata di 1394 unità/g.

CERBARO Elena  
(iscrizione Albo nr 426/BM)

Le gimnosperme come soggetto di prova, come mostrato nella Tabella 1 ( $P < 0,01$ ), il *Pinus thunbergii*, possiedono proprietà di resistenza all'ultravioletto, e la loro attività SOD è apparentemente maggiore di quella del *Pinus thunbergii* ordinario. Per esempio, l'attività SOD del *Pinus thunbergii* che possiede proprietà di resistenza all'ultravioletto è di  $413 \pm 56$  unità/g in media, ed è molto maggiore di  $240 \pm 37$  unità/g in media del *Pinus thunbergii* ordinario.

Dai risultati precedenti, si è accertato che nel caso l'albero possieda proprietà di resistenza all'ultravioletto, l'albero ha attività SOD elevata. Questo può suggerire che l'attività SOD svolge un ruolo per proteggerle dal danneggiamento derivante dai raggi ultravioletti.

Quando si confronta l'attività SOD di alberi di specie triploidi e alberi di specie tetraploidi, come mostrato nelle Tabella 2-3, specialmente negli alberi singoli, le specie tetraploidi mostrano una attività SOD maggiore rispetto agli alberi delle specie triploidi. I vari alberi di cedro giapponese (nome del campione cedro Kamikawa, Cr-38c), come mostrato nella Tabella 4, mostrano una attività SOD molto elevata rispetto a quella degli alberi ordi-

CERBARO Elena  
Iscrizione Albo nr 426/BM

nari. In tale cedro giapponese, l'aumento evidente dell'attività SOD è stato riscontrato in alberi che possiedono un cromosoma triploide. Al contrario, gli alberi diploidi e triploidi non hanno mostrato un aumento evidente dell'attività SOD.

In secondo luogo, come per il livello del perossido lipidico, è stato dimostrato che quei cedri con una piccola quantità di resina hanno una capacità di formazione del perossido lipidico molto scarsa rispetto agli altri alberi.

Non è stata riscontrata differenza di attività GSH-Px fra il *Pinus thunbergii* resistente ai raggi ultravioletti ed il *Pinus thunbergii* ordinario sensibile ai raggi ultravioletti come controllo nella Tabella (fare riferimento alla Tabella 1,  $P > 0,05$ ). Questo può suggerire che non vi è relazione degli enzimi GSH-Px con la resistenza ai raggi ultravioletti.

CERBARO Elena  
(iscrizione Albo nr 426/BMI)

[Tabella 5] Confronto dell'attività SOD e dell'effetto di perossidazione del lipide mediante estratto di foglie fra gli alberi giapponesi 2X, 3X e 4X.

Campioni	Poliploidia	Attività SOD (unità/g)	Perossidazione del lipide	
			Media	
			UV(-) controllo 45	
			UV(-) controllo 260	
		Campione aggiunto	% controllo	
S-20	2X	133±15	x1*(0.6mg/ml)	124.6±14.9
			x5*(3.0mg/ml)	73.8±9.5
			x10*(6.0mg/ml)	33.8±4.7
S-22	2X	149±17	x1	115.8±13.3
			x5	71.4±9.2
			x10	31.5±4.4
S-28	2X	421±54	x1	221.5±24.3
			x5	137.9±17.9
			x10	60.8±7.2
S-25	3X	629±81	x1	174.6±18.2
			x5	112.5±14.6
			x10	63.9±10.2
S-26	3X	2173±260	x1	82.7±10.7
			x5	62.1±9.9
			x10	43.6±5.2
S-28	3X	309±33	x1	150.6±24.0
			x5	89.2±13.3
			x10	41.9±6.7
S-30	4X	1382±193	x1	84.2±10.9
			x5	62.3±8.7
			x10	42.7±4.6
S-31	4X	1447±231	x1	79.4±10.3
			x5	57.3±9.1
			x10	37.1±5.1
S-32	4X	1096±164	x1	72.6±9.4
			x5	61.4±7.9
			x10	51.9±8.3
S-33	4X	1237±160	x1	71.6±12.1
			x5	49.3±6.4
			x10	38.4±6.1
S-34	4X	1645±213	x1	86.0±11.1
			x5	64.1±9.6
			x10	44.1±7.0
S-36	4X	1105±154	x1	140.1±15.4
			x5	94.3±15.1
			x10	53.7±6.9
S-38	4X	1046±135	x1	136.6±19.1
			x5	111.6±15.6
			x10	66.0±10.6

\* x1 indica 0,6 g/ml come unità e la colonna "campione aggiunto" mostra il multiplo dell'unità.

CERBARO Elena  
 (Iscrizione Albo nr. 426/BM)

[Tabella 6] Confronto dell'attività SOD e dell'effetto di perossidazione del lipide mediante estratto di foglie fra gli alberi giapponesi 2X, 3X e 4X.

Campioni	Poliploidia	Attività SOD (unità/g)	Perossidazione del lipide	
			Media	
			UV(-) controllo 45	
			UV(-) controllo 260	
			Campione aggiunto	% controllo
H-1	2X	160±19	x1*(0.6mgr/ml)	168.0±17.9
			x5*(3.0mgr/ml)	98.2±11.7
			x10*(6.0mgr/ml)	58.5±7.6
H-2	2X	352±45	x1	151.8±21.2
			x5	103.4±11.3
			x10	56.8±6.2
H-5	3X	578±80	x1	170.0±22.1
			x5	114.8±17.1
			x10	60.8±7.2
H-6	3X	1066±138	x1	95.2±13.3
			x5	53.1±6.3
			x10	45.2±5.8
H-7	8X	742±89	x1	189.1±15.3
			x5	87.6±10.5
			x10	40.4±4.4
H-8	3X	821±106	x1	128.6±14.8
			x5	78.4±9.4
			x10	88.1±4.9
H-9	3X	1280±140	x1	92.5±12.9
			x5	62.3±6.9
			x10	38.0±4.6
H-10	4X	1778±265	x1	52.6±6.8
			x5	37.8±6.0
			x10	25.3±3.5
H-11	4X	1282±172	x1	90.8±12.7
			x5	61.4±7.9
			x10	32.3±4.8
Foglie di riso		2941±352	x1	455.2±54.6
			x5	298.3±38.7
			x10	165.0±21.4

\* x1 indica 0,6 g/ml come unità e la colonna "campione aggiunto" mostra il multiplo dell'unità.

CERBARO   
 (iscrizione Albo nr 426/RM)

La formazione del perossido lipidico viene aumentata a bassa concentrazione di omogeneizzato (per esempio 0,6 mg/ml) e l'elevata concentrazione di omogeneizzato inibisce la formazione del perossido lipidico. Questo è mostrato chiaramente nelle Tabelle 5 e 6.

Come mostrato nelle Tabelle 5 e 6, quando campioni di foglie di albero tetraploide vengono confrontati l'uno con l'altro, è evidente che nei campioni con elevata attività SOD l'effetto di inibizione è forte in presenza di bassa concentrazione del campione. Questo può suggerire che l'attività SOD svolge un ruolo nella formazione dell'inibizione del perossido lipidico come ruolo citotossico. Questo significa che più è elevata l'attività SOD, più è estesa l'inibizione della formazione del perossido lipidico.

Per esempio, i campioni di cedro giapponese n. S-26, -30, -32, -34, -36, -38 nella Tabella 5 ed i campioni di cipresso giapponese n. H-6, -9, -10, -11 nella Tabella 6 hanno attività SOD maggiore di 1.000 unità/g. Fra di questi, nove casi, i campioni n. S-26, -30, -32, -34; H-6, -9, -10, mostrano una minore formazione del perossido lipidico (indicata nella colonna di x1 della Tabella 5) con l'aggiunta

CERBARO Elena  
iscrizione Albo nr 426/BMI

di una concentrazione di campione minore rispetto ai controlli.

Nel caso del campione di foglie di riso, la formazione di perossido lipidico viene inibita indipendentemente dalla bassa concentrazione di omogeneizzato (vedi "colonna x1" della Tabella 5) oppure elevata concentrazione vedi "colonna x10" della Tabella 5). Quindi, l'attività SOD dimostra una elevata attività come l'attività GSH-Px e l'attività di catalasi. Fra i campioni di foglie provati, la foglia di riso ha mostrato il livello maggiore per la formazione di perossido lipidico. Per i campioni diversi dalla foglia di riso la loro attività di catalasi non è rivelabile e quindi i dati non sono inclusi nelle Tabelle.

D'altra parte, è noto che maggiore è l'attività SOD, più forti sono gli effetti anti-ossidazione. SOD svolge un ruolo importante di rimozione dell'ossigeno attivo.

Dopo considerazione dei fattori relativi alla formazione di ossigeno attivo, l'esistenza di raggi ultravioletti non viene trascurata. In anni recenti, la distruzione dell'ozonosfera è implicata nell'irradiazione ultravioletta verso la terra. In base a questa evidenza, è stato identificato

**CERBARO Elena**  
Iscrizione Albo nr 426/BMI

l'evidente aumento del radicale ossigeno. Come gli esseri umani, gli alberi avvizziscono in piedi quando esposti a raggi ultravioletti e successivamente ad una elevata concentrazione di radicale ossigeno.

Tuttavia, secondo i risultati sperimentali poiché le attività SOD sono elevate, come ottenute dai presenti inventori per quegli alberi che possiedono resistenza all'ultravioletto, si ritiene che svolgano la funzione di proteggerli dal danneggiamento esercitato dall'ambiente usando gli agenti antiossidanti come SOD contenuto nelle loro foglie. Finora, non vi erano studi riguardanti l'auto-protezione degli alberi contro il danneggiamento ambientale usando un agente antiossidazione presente negli alberi. Questa è una nuova scoperta dei presenti inventori.

La capacità antiossidazione del pino resistente ai raggi ultravioletti (in seguito abbreviato come "resistenza a UV") è stata confrontata con quella del pino ordinario. Normalmente, sono disponibili studi sull'induzione dell'attività GSH-Px in risposta al radicale ossigeno. Tuttavia, negli esperimenti eseguiti dai presenti inventori, non è stato stabilito un cambiamento evidente dell'atti-

CERBARO Elena  
[iscrizione Albo nr 426/BMI]

vità GHS-Px in parallelo all'attività SOD.

Per quanto riguarda la catalasi, vi è uno studio riguardante il verificarsi della catalasi indotta dai radicali ossigeno nell'albero. Tuttavia, nel presente esperimento si è trovato che non si verifica catalasi tranne nelle foglie di riso. Si può considerare che i terpeni, ecc., nell'omogeneizzato inibiscano l'attivazione.

È ben noto che gli enzimi come superossidasi, le sostanze a basso peso molecolare per esempio la vitamina C come agente ossidante, svolgono un ruolo principale nelle piante. Con l'esperimento nella presente invenzione, lo studio sulla funzione antiossidazione di un composto a basso peso molecolare non è stato eseguito, ma è stato eseguito quello sull'attività SOD. Si è concluso che SOD, un forte enzima antiossidante è presente nelle foglie delle piante per proteggerle nei confronti dei radicali ossigeno in eccesso.

Dopo le descrizioni precedenti, quando si considera la relazione fra l'attività SOD ed i cromosomi delle piante, i presenti inventori hanno trovato per la prima volta che quelle piante che possiedono triploidi e tetraploidi, specialmente piante tetraploidi, hanno elevata attività SOD. Non vi

CERDARO Elena  
ISCRIZIONE N. 126/RAM

è altra descrizione relativa alla relazione fra l'entità dell'attività SOD e la ploidia di un albero, i summenzionati risultati ottenuti dai presenti inventori vanno oltre le previsioni.

Quando si considera la relazione dell'attività SOD e la multiploidia di un cromosoma, un aumento del locus del cromosoma che codifica SOD, questo porta ad un aumento della quantità di SOD esistente. Questa considerazione può venire confermata con riferimento all'evidenza, per esempio, nell'uomo affetto da la sindrome di Down in cui si è trovato che vi sono tre cromosomi (trisomia) contenenti i loci Cu, Sn-SOD e questo porta ad un aumento del 50% della quantità di SOD.

Nonostante l'aumento dell'attività SOD riscontrato singolarmente in alberi triploidi e tetraploidi, negli esperimenti eseguiti dai presenti inventori non è stato confermato un livello che favorisce SOD. Questo significa che vi deve essere un'altra spiegazione, tuttavia, si è concluso che non si è trovato che il locus del cromosoma SOD aumenti nei singoli campioni provati.

Sebbene le foglie di riso vengano considerate resistenti alla luce ultravioletta, si è trovato che la loro attività SOD è elevata solo come quella

CERBARO Elena  
Iscrizione Albo nr. 426/BMI

del cedro giapponese, del *Pinus thunbergii* e vari alberi di cipresso giapponese, ma mostrano anche attività GSH-Px maggiore di quella degli alberi. Inoltre, la catalasi è fortemente rivelabile negli alberi, le foglie di riso hanno mostrato un livello rivelabile.

Precisamente, con la capacità della forte attività enzimatica posseduta dall'albero in risposta al radicale ossigeno ambientale ed ai raggi ultravioletti, le piante monocotiledoni possono acquisire una elevata adattabilità nei confronti dei raggi ultravioletti ambientali. Per esempio, la felce è una pianta più primitiva rispetto alle gimnosperme ed alle angiosperme, ed è ben noto che la felce acquisisce l'elevata adattabilità moltiplicando il numero dei propri cromosomi ad un multiploide. Il fatto di migliorare l'adattabilità nei confronti della perturbazione ambientale acquisendo multiploidia è stato recentemente riportato anche per i batteri.

Inoltre, dagli esperimenti suddescritti, si è dimostrato che il cedro giapponese e il cipresso giapponese che possiedono proprietà di resistenza ai raggi ultravioletti hanno triploidi e tetraploidi di cromosomi. Anche le gimnosperme sensibili ai

raggi ultravioletti, irrobustiscono la loro attività SOD moltiplicando la loro ploidia di cromosomi per proteggersi in risposta ad un maggiore tempo di esposizione ai raggi ultravioletti ed al radicale ossigeno. Questo per affermare che le specie hanno una adattabilità considerevole.

D'altra parte, è notevole il fatto che il *Pinus thunbergii* resistente a UV aumenti SOD per proteggersi senza la relazione di multiploidia del cromosoma al contrario del *Pinus thunbergii* ordinario. Si ritiene anche che il *Pinus thunbergii* resistente a UV non adotti la misura per moltiplicare i propri cromosomi in multiploidi. Come considerazione generale, la maggiore radiazione UV-B (raggi ultravioletti nella regione B distribuita fra 280 nm e 320 nm) è nota per non essere correlata al danneggiamento da ossidazione ai corpi quali piante, ecc. Quindi, il caso del *Pinus thunbergii* corrisponde a questa ipotesi.

Vi sono due tipi di acquisizione della multiploidia da parte delle piante: un tipo è in incrocio naturale o artificiale, l'altro è una mutazione naturale come il cambiamento del tipo di ramificazione oppure la mutazione artificiale mediante trattamento con colchicine.

La felce florida, una felce, rispetto alle gimnosperme ed alle angiosperme, è uno dei molti tipi di felce che hanno già acquisito multiploidia. È ben noto che le piante monocotiledoni come il riso, ecc., possiedono resistenza all'ultravioletto rispetto a Pinus thunbergii, cedri giapponese e cipresso giapponese. Gli esperimenti eseguiti dai presenti inventori indicano che la felce florida e le foglie di riso mostrato attività SOD più forte rispetto ad altre piante. Le gimnosperme come Pinus thunbergii, cedri giapponese e cipresso giapponese, ecc., possono dimostrare la loro azione in risposta all'ambiente reale moltiplicando i propri cromosomi aventi il gene SOD, come hanno osservato i presenti inventori.

Da osservazioni di riferimenti in campo agricolo e del giardinaggio, è stato confermato che nel campo del miglioramento del tipo di pianta come tè verde, melo, banano, tulipano, orchidea, ecc., in molti casi viene usata la poliploidia. Tuttavia, nel cedro giapponese, cipresso giapponese, ecc. convenzionali, si è trovato che le specie multiploidi non crescono così bene come le specie diploidi ordinarie. Questo valore delle specie multiploidi non è stato notato affatto dall'industria

CERBARO Elena  
(iscrizione Albo nr 426/BM)

forestale.

Negli alberi positivi di cedro giapponese e cipresso giapponese, i presenti inventori hanno trovato le specie triploidi naturali fra le specie sterili mediante ricerche di biologia cellulare. Gli studi insieme con i risultati ottenuti dai presenti inventori hanno rivelato che solo 41 cloni di cedro giapponese e due cloni di vari alberi di cipresso giapponese sono rispettivamente specie triploidi. Nella presente "albero positivo" indica alberi che mostrano un buon carattere di crescita.

I presenti inventori hanno fatto uno sforzo per generare specie triploidi usando tecnologia di incrocio artificiale. Lo sforzo è stato eseguito mediante incrocio, rispettivamente, fra specie diploidi e tetraploidi di cedro giapponese e cipresso giapponese. È stato confermato dai presenti inventori che le specie triploidi artificiali generate così ottenute mediante incrocio artificiale, crescono meglio rispetto alle specie diploidi.

Precisamente, è stata confermata una migliore crescita di specie triploidi incrociate artificiali rispetto a quelle triploidi convenzionali. Con questo si può concludere che è possibile e vantaggioso usare la multiploidia per generare cedri giapponesi

CERBARO Elena  
(iscrizione Albo nr. 426/BM)

e cipressi giapponesi.

Inoltre, nel saggio del perossido lipidico, l'omogeneizzato di foglie di tetraploide contenente una elevata attività SOD, apparentemente inibisce la formazione del perossido lipidico. Questa evidenza può suggerire che l'albero si protegge nei confronti del danneggiamento da parte dei radicali ossigeno introdotti mediante i raggi ultravioletti moltiplicando il proprio numero di cromosomi.

I cedri giapponesi, tranne il cedro tetraploide, contenenti comparativamente poca resina rispetto ad altri alberi, hanno mostrato un basso livello di perossido lipidico e una bassa attività SOD. Tali risultati sono identificati nelle Tabelle 2-4. Poiché questo cedro giapponese contiene poca resina, è evidente che si può stimare che il perossido lipidico formato è scarso. Questo significa che per il trattamento con scarsa formazione di perossido lipidico viene considerata sufficiente una bassa attività SOD.

Quindi, si ritiene che il cedro giapponese non debba usare una elevata attività SOD per trattare lo scarso perossido lipidico poiché il cedro non produce la quantità di perossido lipidico.

Secondo la ricerca dei presenti inventori, è

CERBARO Elena  
licenzia Al. n. 426/BMI

stato confermato che gli alberi mostrano una eccellente adattabilità nei confronti di un aumento di radicali ossigeno dannosi che si verifica a causa della recente accelerazione della tendenza al danneggiamento dell'ozonosfera. La felce, una pianta evolutiva più primitiva rispetto alle gimnosperme ed alle angiosperme, acquisisce multiploidia come propria adattabilità nei confronti dello svantaggio delle perturbazioni ambientali moltiplicando il numero di cromosomi.

Anche in quelle piante con foglie aghiformi come il cedro giapponese ed il cipresso giapponese, si è trovato che le pianticelle acquisiscono proprietà di resistenza all'ultravioletto moltiplicando il loro numero di cromosomi rispetto alle specie resistenti all'ultravioletto con le specie non resistenti all'ultravioletto. Si è trovato che soprattutto gli alberi triploidi e tetraploidi hanno questa tendenza.

D'altra parte, sebbene alcune specie con incrocio naturale non crescano bene o diventino sterili, è stato confermato che alcune specie ottengono buone caratteristiche di crescita mediante incrocio artificiale.

Precisamente, si è trovato che per il cedro

CERBARO Elena  
Iscrizione Albo n. 175/RMI

giapponese, il cipresso giapponese, ecc., si può acquisire adattabilità moltiplicando il ploide in multiploide. Si può affermare che questa produzione di discendenti multiploidi mediante incrocio artificiale, ecc., è un metodo efficace per proteggere le piante dalla tendenza ad aumentare dei radicali ossigeno indotti dai raggi ultravioletti.

La presente invenzione non è necessariamente limitata alla forma degli esempi precedenti, tutti gli esempi, se non sono separati dallo scopo della presente invenzione, rientrano nel campo della presente invenzione.

Per esempio, verranno spiegati i summenzionati alberi con foglia aghiforme come il cedro giapponese ed il cipresso giapponese, e questo verrà considerato adatto anche per gli alberi a foglia larga. Questo deve anche venire considerato adatto per gli alberi sempreverdi e per gli alberi decidui. D'altra parte, per il fatto che l'albero acquisisce la resistenza ai raggi ultravioletti moltiplicando il proprio numero di cromosomi, sebbene questo esperimento non sia stato eseguito per il *Pinus thunbergii*, vi possono essere naturalmente alcune specie di *Pinus thunbergii* che acquisiscono resistenza ai raggi ultravioletti ottenendo mezzi mul-

CERBARO Elena  
Iscrizione Albo nr 426/BM

tiploidi, poiché vi sono molti tipi di pino.

Si ritiene che piante forti con resistenza all'ultravioletto possano venire selezionate dallo standard di ploidie di cromosomi. Poiché le piante selezionate vengono piantate in un'area in piena luce del sole per mantenere la forte resistenza ai raggi ultravioletti della pianta, questi mezzi vengono considerati una protezione positiva dell'ambiente ecologico della pianta nell'area.

Sebbene la spiegazione precedente sia basata su triploidi e tetraploidi, gli stessi risultati potranno venire ottenuti con alberi multiploidi come con cromosomi pentaploidi ed esaploidi.

Nella foresta secondo la presente invenzione piantata dall'uomo, i danneggiamenti, come la morte degli alberi a causa dei raggi ultravioletti, vengono impediti in modo significativo. Per conseguenza, se la quantità di radiazione ultravioletta sulla terra aumenta a causa del progredire della distruzione dell'ozonosfera, la foresta secondo la presente invenzione piantata dall'uomo resisterà in modo affidabile. Impiegando il metodo secondo la presente invenzione per piantare le piante, si può formare una foresta piantata dall'uomo avente tale resistenza all'ultravioletto.

CERBARO Elena  
(iscrizione Albo nr. 426/BMI)

## RIVENDICAZIONI

1. Foresta piantata dall'uomo, che viene formata piantando pianticelle il cui ploide di cromosomi è una specie multiploide.

2. Foresta piantata dall'uomo secondo la rivendicazione 1, in cui il numero di cromosomi della pianticella è multiploide, come triploide o tetraploide.

3. Foresta piantata dall'uomo secondo la rivendicazione 2, in cui le pianticelle sono conifere.

4. Foresta piantata dall'uomo secondo la rivendicazione 3, in cui la pianticella delle conifere è un cedro o un cipresso.

5. Foresta piantata dall'uomo secondo la rivendicazione 4, in cui il numero di cromosomi delle pianticelle viene ottenuto aumentando il numero di cromosomi di base mediante selezione e mutazione.

6. Foresta piantata dall'uomo secondo la rivendicazione 1, in cui le pianticelle sono conifere.

7. Foresta piantata dall'uomo secondo la rivendicazione 1, in cui la pianticella delle conifere è un cedro o un cipresso.

8. Metodo per piantare piante, che comprende

CERBARO Elena  
Rivendicazioni 4/80 n. 426/BMI

le fasi di selezionare pianticelle che sono multiploidi; e piantare le pianticelle selezionate.

9. Metodo per piantare piante secondo la rivendicazione 8, in cui il numero di cromosomi delle pianticelle è multiploide, come triploide e tetraploide.

10. Metodo per piantare piante secondo la rivendicazione 9, in cui le pianticelle sono conifere.

11. Metodo per piantare piante secondo la rivendicazione 10, in cui le pianticelle delle conifere sono un cedro o un cipresso.

12. Metodo per piantare piante secondo la rivendicazione 11, in cui il numero di cromosomi delle pianticelle viene ottenuto aumentando il numero di cromosomi di base mediante selezione e mutazione.

13. Metodo per piantare piante secondo la rivendicazione 8, in cui in cui le pianticelle sono conifere.

14. Metodo per piantare piante secondo la rivendicazione 8, in cui in cui le pianticelle delle conifere sono un cedro o un cipresso.

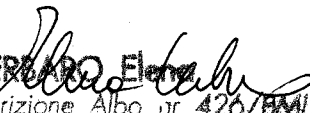
15. Metodo per fare crescere piante che comprende la fase di formare artificialmente vegeta-

CERBARO Elena  
Iscrizione Albo nr. 426/BMI

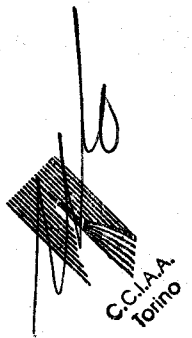


zione che è significativamente resistente ai raggi ultravioletti, rispetto alla vegetazione costituita da piante diploidi, crescendo piante selettivamente il cui numero di cromosomi eccede il numero di base della specie.

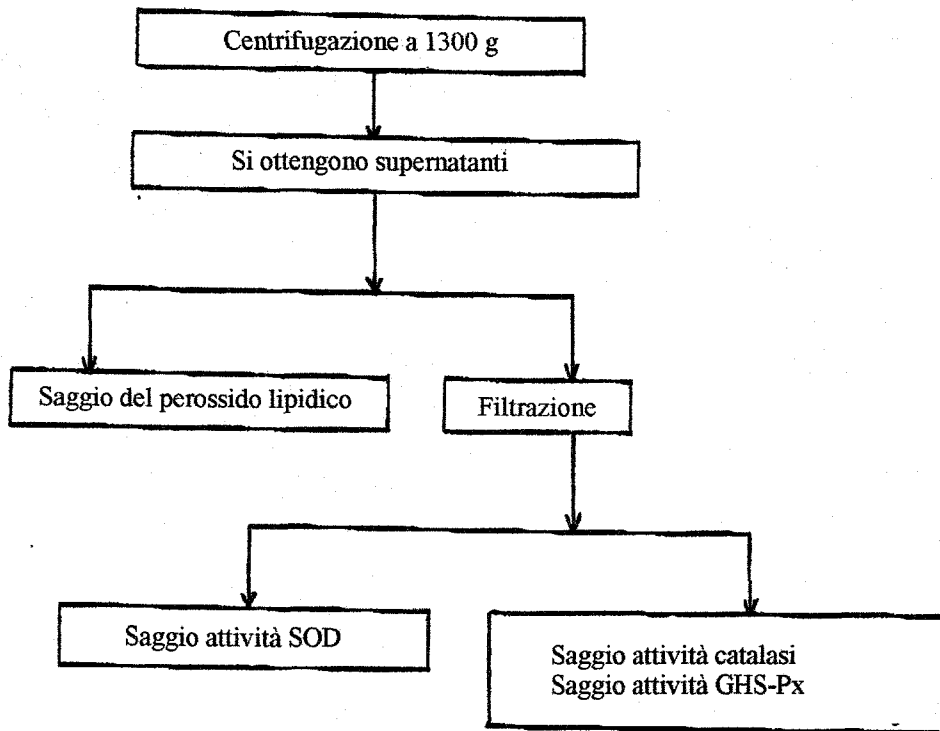
p.i.: NIWA KOZO

  
CERBARO Elena  
Iscrizione Albo nr 426/BMI

CERBARO Elena  
Iscrizione Albo nr 426/BMI

  
C.C.I.A.A.  
Torino

*Fig. 1*



p.i.: NIWA KOZO

*Flavia Elena*  
CERBARO Elena  
Iscrizione Albo nr 426/BAW

*[Signature]*  
S.C.I.A.A.  
F. 11/11/19