

CIN-Lab



Sviluppo di marcatori molecolari ed analisi HRM in canapa

I marcatori molecolari, sequenze di DNA genomico associate ad un locus genico di interesse, rappresentano uno strumento indispensabile per:

- 1 promuovere l'innovazione varietale nel settore del miglioramento genetico della canapa così come è stato per le colture di interesse agrario
- 2 le esigenze di tipizzazione univoca di una varietà (*fingerprinting*) e la tutela dei diritti dei costitutori
- 3 il riconoscimento delle varietà da droga da quelle da fibra.

Una delle maggiori difficoltà nella messa a punto di questi *tool* in canapa risiede nell'elevata eterogeneità intra-varietale che è tipica di questa specie a comportamento allogamo. La disponibilità sempre crescente di dati di sequenziamento del genoma (piattaforme *NGS*) consente di individuare migliaia di polimorfismi (SNP, InDel) su tutto il genoma e di poter sfruttare questi siti variabili per la costituzione di marcatori molecolari *high throughput* la cui analisi sui materiali genetici può essere automatizzata.

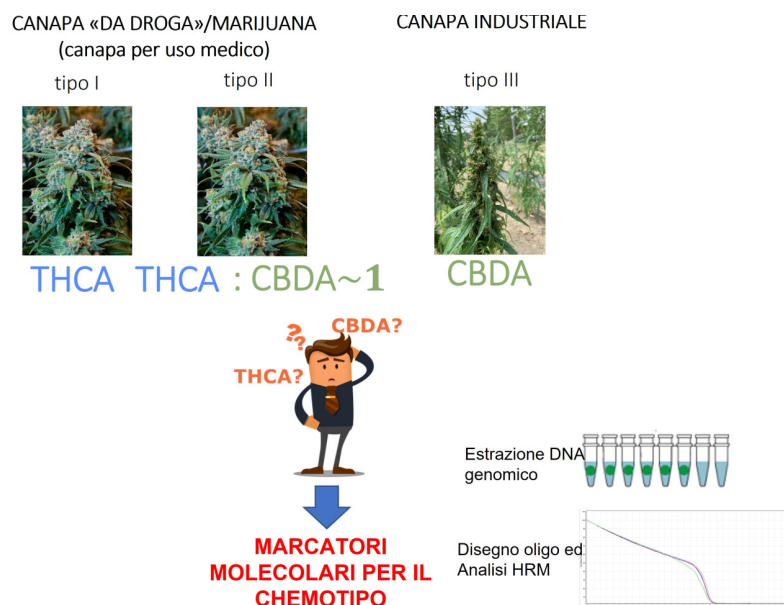
"Strumenti innovativi nel miglioramento genetico della Canapa"



Laboratorio	CINLab
Area di specializzazione	Agroalimentare, Salute e Benessere
Referenti	Laura Bassolino, Nicola Pecchioni, Laura Righetti
Keyword	cannabis sativa, marcatori molecolari, High Resolution Melt analisi, metaboliti secondari



Fig. 1: *Cannabis sativa* L.: un'officina naturale di biomolecole e prodotti derivati dalla coltivazione dai molteplici utilizzi



Descrizione

Nell'ambito del progetto UNIHEMP, si sono resi disponibili i dati di sequenziamento del genoma di 4 varietà di canapa su polimorfismi di tipo SNP ed InDel sia a livello intergenico che nelle regioni codificanti per geni coinvolti nella sintesi dei tre metabolismi di interesse (cannabinoidi, terpeni e flavonoidi).

E' stato quindi possibile sviluppare un protocollo per analisi High Resolution Melt (HRM) in canapa a partire dalla validazione dei polimorfismi individuati in geni già noti. L'HRM è una metodica di analisi *high throughput* post amplificazione PCR che permette di individuare/validare variazioni genetiche in una sequenza di DNA.

La tecnologia sfrutta la dissociazione del dsDNA all'aumentare della temperatura (curva di melting o di dissociazione). Il saggio HRM è stato messo a punto su due strumenti e relativi software di analisi: QS3 Real-Time PCR System e Rotor-Gene 6000. Il primo passaggio ha previsto un'attenta progettazione del set di primers da utilizzare dal momento che la lunghezza degli ampliconi incide sulla sensibilità e specificità dell'analisi HRM in misura inversamente proporzionale per cui maggiore è la dimensione degli ampliconi e minore sarà la capacità discriminante del saggio.

Per ragioni riservatezza dei dati non ancora oggetto di pubblicazione, non si rendono note le sequenze dei marcatori sviluppati con questa tecnologia. Per informazioni si prega di inviare una mail a laura.bassolino@crea.gov.it e roberta.paris@crea.gov.it



Fig. 2: Sviluppo di marcatori molecolari per la tipizzazione varietale in canapa

Aspetti innovativi

Ad oggi non risultano lavori scientifici pubblicati sulla tecnologia HRM in canapa, sebbene è pensabile che le aziende floro-vivaistiche siano già in possesso della tecnologia per le finalità del breeding per lo sviluppo di nuove varietà, pertanto l'innovazione tecnologica proposta dal CINLab può da un lato colmare un *gap* scientifico nel settore del miglioramento genetico in questa specie e dall'altro offrire uno strumento ai costitutori per tipizzare le varietà loro prodotte e quindi tutelarle sul mercato.

Applicazioni

La metodica di analisi HRM ha diversi ambiti di applicazione che vanno dalla genotipizzazione basata su marcatori molecolari al miglioramento genetico all'identificazione di contaminanti a livello di sementi.

I marcatori sviluppati dal CINLab su sequenze SNPs ed InDels consentono di discriminare le varietà per chemotipo e a seguito di ulteriore sviluppo e validazione di distinguere varietà diversamente pigmentate.

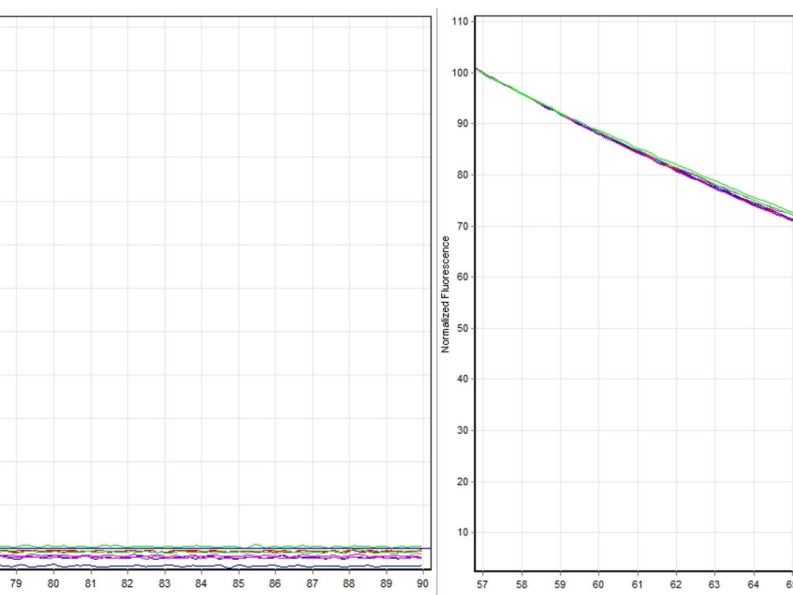


Fig. 3: Esempio di un profilo di melting per un marcatore tipo InDel che consente di discriminare tre diversi genotipi

Esempio di applicazione

L'innovazione tecnologica proposta ha diversi ambiti di applicazione, tra questi:

1. Breeding assistito da marcatori (MAS)
2. Fingerprinting varietale
3. Finalità forensi: identificazione varietà da droga

Il CINLab ha sviluppato nell'ambito delle risorse del progetto UNIHEMP dei marcatori molecolari basati su polimorfismi di tipo SNP e InDel su sequenze geniche codificanti per enzimi noti per i pathways metabolici deputati alla sintesi di metaboliti secondari di interesse in canapa per le loro diverse applicazioni industriali quali cannabinoidi, terpeni e flavonoidi.

I marcatori molecolari sono stati sviluppati per analisi di High Resolution Melting (HRM) ed il saggio messo a punto su strumenti quali QS3 Real-Time PCR System e Rotor-Gene 6000 e relativi software di analisi dei dati.

Per motivi di riservatezza in attesa di pubblicazione, le sequenze nonché l'indicazione della posizione dei polimorfismi sul genoma non viene resa nota in questa fase.

La tecnologia è già stata validata in laboratorio (TRL 4) sebbene su un numero limitato di genotipi, pertanto, un'ulteriore fase di ottimizzazione è richiesta nei prossimi mesi con l'obiettivo di sviluppare un numero sempre maggiore di marcatori molecolari per le finalità del breeding e della tutela varietale.

Partner coinvolti

Prof. Enrico Francia, Laboratorio BIOGEST accreditato alla rete. La collaborazione si è sviluppata nell'ambito del progetto PON ARS01_00668 UNIHEMP "Utilizzo di biomassa da canapa industriale per la produzione di energia e nuovi biochemicals" (Prot. n. 2016 del 27/07/2018)

Tempi di realizzazione

12 mesi/persona

Livello di maturità tecnologica

TRL 4 - tecnologia validata in laboratorio

Valorizzazione applicazione

La tecnologia è stata validata su alcuni genotipi di canapa già sequenziati ed è in fase di validazione su un numero più ampio di materiali al fine di testare l'effettiva robustezza dei marcatori.

I dati non sono stati ancora rilasciati come report scientifici (pubblicazioni, atti convegno) ma questi sono in preparazione e, completata la fase di validazione, verranno rilasciati.



CIN-Lab



CINLab

Centro di ricerca Cerealicoltura e colture Industriali

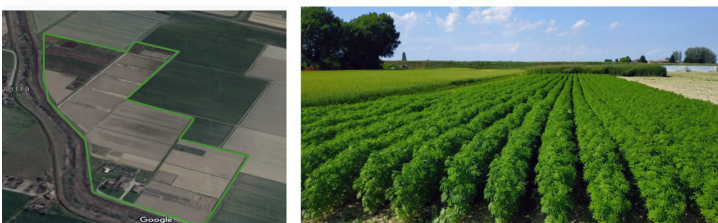
Il CINLab, CREA-Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali di Bologna (<https://www.crea.gov.it/web/cerealicoltura-e-culture-industriali>), è organizzato in quattro Unità Operative che declinano le macroaree di attività di ricerca sperimentale ed applicata: Biochimica, Caratterizzazione Biomasse, Genomica Applicata e Azienda Agraria Sperimentale "Cà Rossa Paltrone" di Anzola dell'Emilia (BO) per studi agronomici e prove varietali in pieno campo. Il CINLab nell'ambito delle attività del CREA-CI, si occupa di valorizzare l'intera filiera agrifood delle colture a destinazione industriale prevalentemente canapa ed altre piante tessili, patata, oleaginose, leguminose da granella, e brassicacee, preservandone la biodiversità con approccio multidisciplinare dal campo al prodotto per finalità d'impiego food (umano e animale) e non food. In sinergia con la strategia del Green Deal, è impegnato nella ricerca/ideazione di filiere agro-industriali capaci di sfruttare molecole bioattive derivanti da biomasse vegetali in un'ottica di economia circolare, sviluppando sistemi di bioraffineria per la produzione di prodotti biobased da impiegare in ambito nutraceutico, farmacologico, ed in agricoltura.



• CREA-CI Sede di Bologna
Via di Corticella, 133



• CREA-CI Azienda Ca' Rossa Anzola Emilia



Sito web <https://www.crea.gov.it/web/cerealicoltura-e-culture-industriali>

Direttore Nicola Pecchioni

Data pubblicazione 13/12/2022

