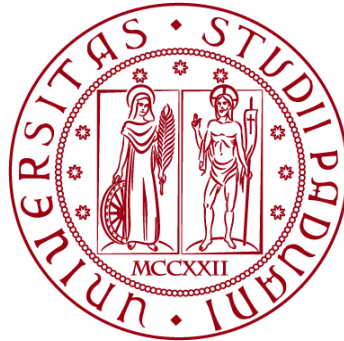


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biotecnologie**



**ELABORATO DI LAUREA**

**UTILIZZO DEL GENE REPORTER RUBY PER LA  
TRASFORMAZIONE DI *CANNABIS SATIVA***

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

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

**Laureanda: Sara Balcon**

**ANNO ACCADEMICO 2021/2022**



## ABSTRACT

Questo progetto si colloca all'interno di un lavoro più ampio volto a mettere a punto un sistema di trasformazione inducibile da utilizzare nelle cellule in coltura di *Cannabis sativa*, per stimolare in esse il differenziamento, e più nello specifico la formazione di tricomi. La buona riuscita di questa ricerca risulterebbe molto vantaggiosa per la produzione dei numerosissimi metaboliti secondari di questa pianta, dato che i tricomi in vivo fungono da bioreattori e siti di accumulo per i metaboliti stessi e inducendone la formazione in vitro si potrebbero usare le colture cellulari per la produzione di questi metaboliti all'interno di bioreattori industriali.

In particolare, in questa tesi ci si occupa delle valutazioni riguardanti il funzionamento del gene reporter RUBY se espresso costitutivamente in *C. sativa*, al fine di mettere a punto il sistema di trasformazione inducibile. Inoltre, ci si occupa anche dell'isolamento da *Solanum lycopersicum* e *Gossypium hirsutum* di alcuni geni coinvolti nel differenziamento dei tricomi e se ne valuta la clonazione nel plasmide di clonaggio.



# INDICE

ABSTRACT .....	iii
CAPITOLO 1: STATO DELL'ARTE.....	1
1.1 <i>Cannabis sativa</i> .....	1
1.2 La produzione delle molecole fitochimiche .....	2
1.2.1 Funzione e morfologia dei tricomi .....	2
1.2.2 I geni che regolano la formazione dei tricomi.....	3
1.3 Il gene reporter RUBY.....	4
CAPITOLO 2: APPROCCIO SPERIMENTALE .....	6
2.1 Mantenimento delle cellule in coltura.....	6
2.2 Trasformazione delle cellule mediante tecnica biolistica .....	6
2.3 Estrazione degli acidi nucleici da <i>Solanum lycopersicum</i> e <i>Gossypium</i> <i>hirsutum</i> .....	7
2.3.1 Estrazione dell'RNA, quantificazione e retrotrascrizione .....	8
2.3.2 Estrazione del DNA genomico .....	9
2.4 Clonaggio dei geni RUBY, SIMIXTA, SICD2, e GhMYB25 nel vettore pCR8 ..10	
2.4.1 Amplificazione dei geni tramite PCR .....	10
2.4.2 TA cloning .....	11
2.4.3 Trasformazione dei batteri e screening delle colonie.....	12
2.4.4 Controllo del DNA plasmidico tramite restrizione .....	13
CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONE .....	15
3.1 Trasformazione con il metodo biolistico.....	15
3.2 Estrazione degli acidi nucleici .....	15
3.3 Clonaggi.....	16
CAPITOLO 4: CONCLUSIONI.....	20
MATERIALE SUPPLEMENTARE.....	21
BIBLIOGRAFIA .....	22



# CAPITOLO 1: STATO DELL'ARTE

## 1.1 *Cannabis sativa*

*Cannabis sativa* è una pianta da fiore della famiglia delle *Cannabaceae*.

Nonostante nella cultura di massa sia associata ai suoi effetti psicotropi, è una pianta ad elevato interesse commerciale, sia per il settore manifatturiero in cui viene utilizzata per la produzione di fibre e anche per la produzione di oli vegetali ed oli essenziali da colture oleaginose, sia per il settore farmaceutico (Chandra et al., 2017). Infatti, *C. sativa* è una pianta dal profilo metabolico unico nel suo genere e produce una gran quantità di metaboliti secondari che possono essere impiegati in qualità di farmaci. Al suo interno sono state individuate già almeno 540 diverse molecole fitochimiche (Andre et al., 2016) appartenenti principalmente alle famiglie dei cannabinoidi, dei terpeni e dei composti fenolici, per cui rappresenta una fonte molto promettente per ampliare il numero di molecole bioattive usate in ambito farmaceutico.

Tra i metaboliti principali che questa pianta produce, vi sono ad esempio un gran numero di composti terpenici, responsabili del suo caratteristico profumo, ma anche due importanti composti appartenenti alla famiglia dei cannabinoidi: il THC ( $\Delta^9$ -Tetraidrocannabinolo), che le conferisce appunto gli effetti psicotropi, e il CBD (Cannabidiolo). Questi ultimi sono già utilizzati in ambito farmaceutico, in diverse formulazioni e combinazioni, ad esempio per trattare la nausea dovuta alla chemioterapia, per stimolare l'appetito in pazienti con deperimento dovuto all'AIDS, e anche per trattare i dolori neuropatici associati alla sclerosi multipla. (Chandra et al., 2017; National Institute on Drug Abuse, 2021).

L'utilizzo di colture cellulari di *C. sativa* per la produzione di metaboliti secondari da utilizzare poi per le preparazioni farmaceutiche è senza dubbio vantaggioso poiché queste ultime possono essere trasformate per migliorarne la produttività e cresciute in sospensione in bioreattori per la produzione in scala industriale.

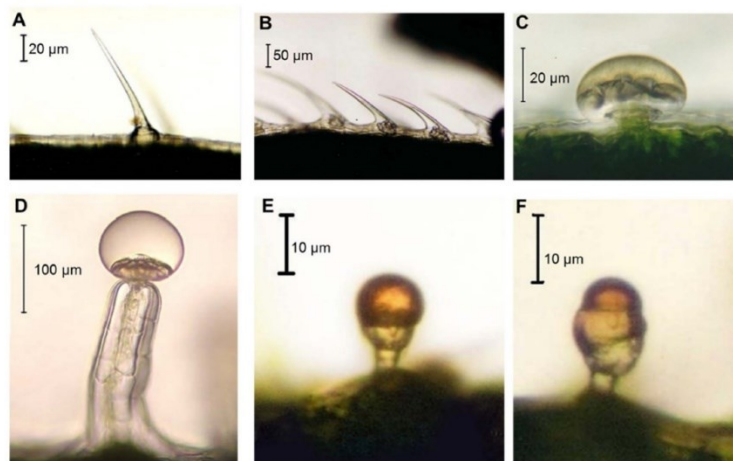
Nell'ambito della ricerca in cui si colloca questa tesi, si cerca infatti di mettere a punto un sistema inducibile per esprimere in modo forzato nelle cellule in coltura i fattori di trascrizione responsabili della formazione dei tricomi (le strutture specializzate che in vivo fungono da bioreattori per la sintesi e lo stoccaggio dei metaboliti secondari), come suggerito da Christelle M. Andre e colleghi (2016). La scelta di usare un sistema inducibile è dovuta principalmente al fatto che in questo modo il differenziamento può essere attivato al momento desiderato, ossia una volta che la coltura è giunta al termine della fase di crescita, ma è molto utile anche per limitare i possibili effetti citotossici dovuti all'accumulo eccessivo di questi metaboliti (Andre et al., 2016).

## 1.2 La produzione delle molecole fitochimiche

### 1.2.1 Funzione e morfologia dei tricomi

Come già accennato, le molecole fitochimiche sopra menzionate vengono prodotte e immagazzinate all'interno di strutture cellulari specializzate dette tricomi: delle protuberanze dell'epidermide che ricoprono le foglie, le brattee dei fiori e lo stelo della pianta. In generale, i tricomi sono classificati fra i tessuti secretori esterni, sono caratterizzati da cellule ricche di mitocondri a causa della loro attività metabolica particolarmente elevata, e producono sostanze importanti per le interazioni con l'ambiente esterno, ad esempio con gli organismi erbivori e impollinatori (Pasqua et al., 2015).

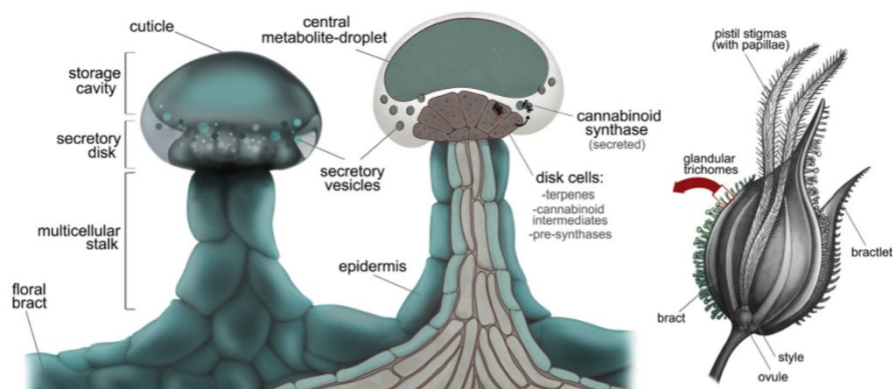
La canapa in particolare possiede due tipi di tricomi: quelli non ghiandolari e quelli ghiandolari. I primi si suddividono in unicellulari (Figura 1 A) e citosolici (Figura 1 B), mentre i secondi, che sono quelli deputati alla produzione dei metaboliti, si suddividono in capitati sessili (Figura 1 C), capitati pedunculati (Figura 1 D) e bulbosi, a loro volta suddivisi in semplici (Figura 1 E) e complessi (Figura 1 F).



**FIGURA 1:** I vari tipi di tricomi di canapa (da Andre et al., 2016)

I tricomi ghiandolari solitamente sono pluricellulari e si compongono di tre parti diverse: una base, uno stelo e una ghiandola. La base connette lo stelo con l'epidermide circostante; lo stelo sorregge la ghiandola, e la ghiandola è la parte responsabile della produzione, della secrezione e dello stoccaggio dei metaboliti. Solitamente i precursori per la produzione dei metaboliti sono secreti dalle cellule del disco in apposite vescicole secretorie insieme con gli enzimi per il loro processamento, e i metaboliti in esse prodotti sono stoccati in un'apposita cavità di stoccaggio, come illustrato nella Figura 2.





**FIGURA 2:** a destra, la morfologia di un fiore femminile, su cui è mostrata appunto l'abbondante presenza di tricomi ghiandolari; a sinistra, una rappresentazione schematica delle parti che caratterizzano i tricomi ghiandolari. (da Romero et al., 2020)

### 1.2.2 I geni che regolano la formazione dei tricomi

Lo sviluppo dei tricomi avviene in modo finemente regolato, e quando una cellula dell'epidermide riceve lo stimolo corretto va in contro a una serie di divisioni, ciascuna con una precisa orientazione, che terminano con la formazione della struttura. Le fasi di formazione sono comuni tra i tricomi non ghiandolari e ghiandolari, con la differenza che in questi ultimi alcune cellule si differenziano nelle cellule della ghiandola. Inoltre, nelle cellule che acquisiscono l'attività secretoria si può osservare un profondo cambiamento dell'attività metabolica (Chalvin et al., 2020), con l'attivazione delle vie metaboliche specifiche per la produzione dei metaboliti secondari, che sono assortiti in vario modo nei diversi tipi di tricomi.

I fattori di trascrizione implicati nell'attivazione della formazione dei tricomi sono stati molto studiati in altre specie vegetali, in particolare in *Artemisia annua*, ma anche in pomodoro (*Solanum lycopersicum*) e in cotone (*Gossypium hirsutum*). In queste specie sono stati identificati come regolatori positivi della formazione dei tricomi ghiandolari i fattori di trascrizione appartenenti alle due famiglie R2R3-MYB e HD-ZIP IV.

In particolare, in *A. annua* si è scoperto che geni della famiglia R2R3-MYB, come AaMYB1 e i geni della sottofamiglia MIXTA-like (come AaMIXTA1 e il suo probabile ortologo in pomodoro SIMX1), se sovraespressi causano un aumento della densità di tricomi ghiandolari (Chalvin et al., 2020; Shi et al., 2018).

Inoltre, si è scoperto anche che AaMIXTA1 forma un complesso con il fattore di trascrizione AaHD8 appartenente alla famiglia HD-ZIP IV: il complesso così formato agisce a monte del gene per il fattore di trascrizione AaHD1 stimolandone la produzione e dando il via alla cascata di segnali che origina infine la formazione dei tricomi (Chalvin et al., 2020).

In pomodoro questo complesso è formato probabilmente dai geni SIMX1 (o comunque da un altro gene MIXTA-like) e SICD2, l'ortologo di AaHD8. Infatti, i

mutanti *sticky peel*, caratterizzati da un numero molto ridotto di tricomi ghiandolari, devono il loro fenotipo a una mutazione che porta alla perdita di funzione del gene che codifica per il fattore di trascrizione SICD2. Un altro importante gene per la formazione dei tricomi nel pomodoro è il gene SIMIXTA-like, che codifica per il fattore di trascrizione MYB16, il quale, se sovraespresso, oltre ad aumentare appunto la formazione dei tricomi, va anche a potenziare il metabolismo, sia primario che secondario, incrementando la trascrizione dei geni chiave per le varie vie metaboliche (Ying et al., 2020).

In cotone invece è stato individuato il gene GhMYB25, appartenente alla sottofamiglia MIXTA-like: questo gene se viene silenziato causa una riduzione nel numero di tricomi sulle foglie e un accorciamento delle fibre; mentre se viene sovraespresso causa un aumento nel numero di fibre e di tricomi, che sono raggruppati in cluster e più corti rispetto a quelli degli individui wild type (Machado et al., 2009).

Anche in *Prunus persica* sono stati individuati alcuni geni della famiglia R2R3-MYB, responsabili della formazione dei tricomi nelle cellule dell'epidermide del frutto. Fra questi si sono rivelati particolarmente importanti quelli per i fattori di trascrizione PpMYB26 e PpMYB25 (Yang et al., 2022): una mutazione loss-of-function all'interno del terzo esone di quest'ultimo gene, generata dall'inserimento di un elemento retrotrasposonico, infatti, contraddistingue le pesche nettarine con fenotipo glabro da quelle comuni, che possedendo il gene funzionante presentano il fenotipo peloso (Vendramin et al., 2014).

Alla luce di queste conoscenze, per il lavoro all'interno di cui si colloca questa tesi è stato scelto di trasformare le colture cellulari di *C. sativa* con i geni di pomodoro SICD2 e SIMIXTA-like e con il gene di cotone GhMYB25, per poi valutare quale dei due sistemi offre i risultati migliori nello sviluppo di tricomi dalle cellule in coltura.

### 1.3 Il gene reporter RUBY

Per mettere a punto un sistema di trasformazione inducibile è necessario utilizzare un gene reporter che permetta di valutarne in modo semplice ed affidabile il funzionamento. In particolare, poiché può essere utilizzato in qualsiasi tipo di cellula, è facilmente visualizzabile e funziona senza il bisogno di fornire substrati esterni è stato scelto di utilizzare il costrutto RUBY.

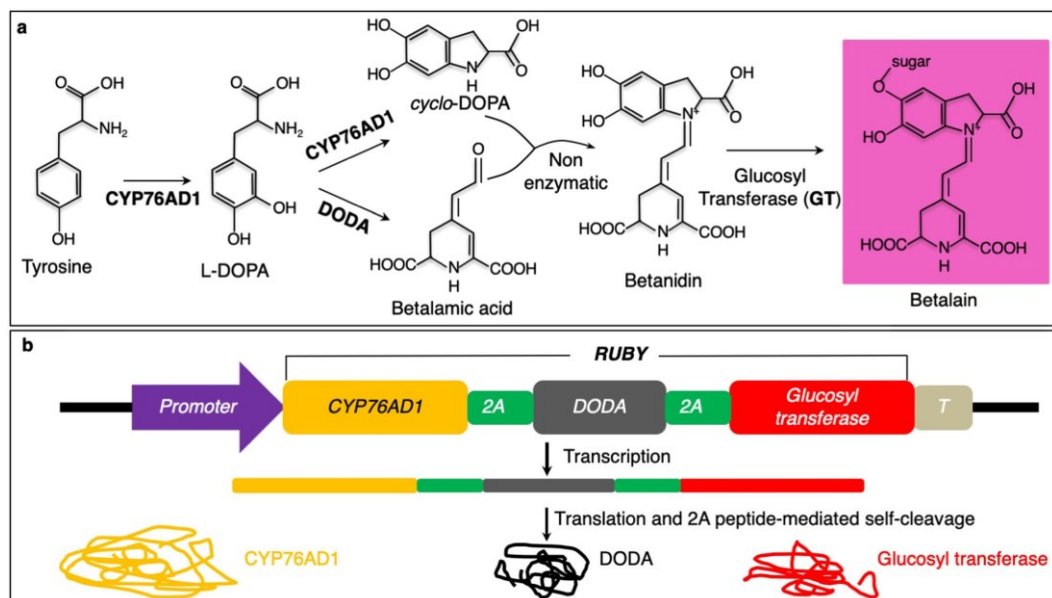
Questo reporter, ideato nel laboratorio del dottor Yunde Zhao (He et al., 2020), contiene al suo interno i tre geni codificanti per i tre enzimi necessari alla biosintesi di betalaina partendo dalla tirosina.

La betalaina è un composto naturalmente prodotto da alcune specie vegetali, come ad esempio la bieta, la barbabietola e il frutto del drago, e conferisce ad esse un colore rosso brillante: dunque esprimendo in altri sistemi vegetali gli enzimi

coinvolti nella sua sintesi si possono distinguere facilmente gli individui in cui la trasformazione ha avuto successo grazie al colore conferito dalla betalaina stessa. Come già accennato e come illustrato nella Figura 3a, l'unico substrato di partenza per la produzione di betalaina è la tirosina, che viene fornita dal normale metabolismo cellulare, ed è processata grazie a tre enzimi diversi che agiscono in modo sequenziale:

- per prima cosa la tirosina viene idrossilata ad L-DOPA (L-3,4-diidrossifenilalanina) grazie all'enzima CYP76AD1;
- l'L-DOPA così prodotto va in contro a due destini diversi, può essere convertito in ciclo-DOPA grazie ancora una volta all'enzima CYP76AD1, oppure convertito in acido betalamico dall'enzima DODA (L-DOPA-4,5-diossigenasi);
- acido betalamico e ciclo-DOPA si condensano fra loro in una reazione non enzimatica e danno origine alla betanidina;
- la betanidina è glucosilata dall'enzima GT (Glucosil trasferasi) e forma la betalaina.

Per semplificare l'uso del reporter ed esprimere l'intera via biosintetica con un unico promotore e un unico terminatore il costrutto noto con il nome di RUBY racchiude quindi i tre geni in un'unica ORF: i primi due, CYP76AD1 e DODA, sono senza codone di stop e sono collegati al successivo tramite la sequenza che codifica per il peptide 2A, che essendo capace di self-cleavage libera poi le tre proteine a livello post traduzionale come mostrato nella Figura 3b.



**FIGURA 3:** a. le reazioni e gli enzimi coinvolti nella formazione di betalaina a partire dalla tirosina; b. rappresentazione schematica del costrutto e del suo processamento (la sequenza completa è riportata fra i materiali supplementari dell'articolo da cui sono state ottenute le informazioni su questo costrutto) (da He et al., 2020)

## CAPITOLO 2: APPROCCIO SPERIMENTALE

### 2.1 Mantenimento delle cellule in coltura

Per mantenere ed amplificare in coltura le cellule di *Cannabis sativa* utilizzate per gli esperimenti di trasformazione sono utilizzati dei mezzi di coltura specifici per le loro esigenze. Il terreno di coltura utilizzato, la cui composizione è riportata nella Tabella 1, è stato pensato proprio per garantire alle cellule il giusto apporto di macronutrienti, micronutrienti, vitamine e zuccheri.

	MS liquido		Ms solido	
	componente	quantità	componente	quantità
<b>Vitamine e sali</b>	MS senza vitamine Vit. Gamborg B5	4.3 g/L 1x	MS con vitamine	4.4 g/L
<b>Regolatori di crescita</b>	2,4 - D	2.2 µM	NAA TDZ	0.5 µM 1 µM
<b>Fonte di carbonio e macroelementi</b>	Saccarosio CaCl <sub>2</sub> KNO <sub>3</sub>	2 % (p/v) 0.150 g/L 2 g/L	Saccarosio	3 % (p/v)
<b>gelificante</b>	/	/	Agar	0.5 % (p/v)
<b>pH</b>	5.5		5.7	

**Tabella 1:** Terreni utilizzati per il mantenimento e l'amplificazione delle cellule di *C. sativa* in coltura. A sinistra il terreno usato per le colture in beute in sospensione, mentre a destra quello usato per la semina in capsule Petri.

Le colture vengono cresciute in sospensione, all'interno di beute da 500 mL. Le beute vengono tenute in agitazione, per evitare la formazione di aggregati di cellule e garantire l'ossigenazione, e all'interno di una cella climatica per mantenere costante la temperatura dell'ambiente. Per garantire una corretta ossigenazione, ogni beuta è riempita con il terreno soltanto per 1/10 del suo volume. Inoltre, poiché con il tempo il mezzo di coltura si impoverisce e si accumulano in esso i prodotti di scarto del metabolismo cellulare, è necessario procedere al cambio del terreno con cadenza settimanale, o ogni 10-12 giorni, a seconda della velocità di crescita della specifica coltura. A questo scopo, è sufficiente prelevare 2 mL di cellule impaccate e trasferirle in una nuova beuta con 48 mL di terreno fresco; in caso di necessità inoltre si può filtrare la coltura prima di procedere con il cambio.

### 2.2 Trasformazione delle cellule mediante tecnica biolistica

Per valutare il corretto funzionamento del gene reporter RUBY nelle cellule di *Cannabis sativa* è stato condotto un esperimento di trasformazione delle cellule mediante tecnica biolistica. Infatti, prima di utilizzare il gene all'interno di un sistema inducibile, è necessario testarne il corretto funzionamento nelle cellule di questa specie, tramite trasformazione stabile. Per la trasformazione è stato usato

il plasmide 35S:RUBY (He et al., 2020; distribuito da Addgene) in cui il costrutto RUBY si trova sotto il controllo del promotore 35S del virus del mosaico del cavolfiore: un promotore costitutivo forte.

### Protocollo di trasformazione

Al cambio di terreno che precede la trasformazione le cellule vengono filtrate, in modo da eliminare gli aggregati e selezionare poi più facilmente quelle trasformate, e sono lasciate in coltura in sospensione. Le cellule vengono prelevate per la trasformazione 10 giorni dopo, alla fine della fase di crescita esponenziale, e vengono risospese in terreno con mannitolo 0.25 M avendo cura di utilizzare un volume di terreno in rapporto 1:1 con il volume di cellule. Lasciando in incubazione per 3-4 ore le cellule vengono a trovarsi in un mezzo iperosmotico e perdono la pressione di turgore: in questo modo non scoppieranno in seguito all'impatto del DNA. Trascorso il tempo di incubazione si trasferisce 1 mL di sospensione (0.5 mL di cellule impaccate) su piastre Petri da 6 cm con un disco di carta e si lascia asciugare parzialmente sotto cappa.

In seguito si procede al coating delle particelle che verranno sparate sulle cellule. Per allestire una trasformazione composta di sei spari vengono utilizzati 15 µg di DNA plasmidico alla concentrazione di 1 µg/µL.

Per prima cosa 60 mg di particelle d'oro ( $\phi = 1 \mu\text{m}$ ) vengono risospesi in 1 mL di H<sub>2</sub>O. Poi i 15 µL di DNA sono aggiunti a 50 µL di sospensione di particelle d'oro (che contengono dunque 3 mg di particelle) in H<sub>2</sub>O e il DNA viene fatto precipitare sulle particelle usando 50 µL di CaCl<sub>2</sub> alla concentrazione di 2.5 mol/L, e 20 µL di spermidina alla concentrazione di 0.1 mol/L (le cui concentrazioni finali saranno dunque CaCl<sub>2</sub> 0.93 mol/L e spermidina 0.015 mol/L). I proiettili vengono poi lavati con etanolo 100% e risospesi in 180 µL di etanolo; infine vengono depositate aliquote di 30 µL sui filtri.

Lo sparo viene effettuato con i seguenti parametri: pressione dell'elio  $6 \times 10^5$  Pa; durata del getto d'elio 33 ms; intensità del vuoto 3,8 kPa.

Dopo lo sparo alle piastre Petri si aggiungono 3 mL di terreno (0.5 mL alla volta) e vengono lasciate in cella climatica per 48 ore. Le cellule sono poi spostate su delle nuove piastre Petri con terreno selettivo a diverse concentrazioni di igromicina. Queste nuove piastre con le cellule trasformate vengono lasciate in cella climatica e osservate ad intervalli di tempo regolari per monitorare l'espressione del transgene veicolato.

## 2.3 Estrazione degli acidi nucleici da *Solanum lycopersicum* e *Gossypium hirsutum*

Per ottenere i geni d'interesse da inserire nel vettore d'espressione con cui saranno trasformate le colture cellulari di *C. sativa* si parte dall'isolamento dei geni

stessi all'interno del genoma o del trascrittoma della pianta in cui sono stati individuati.

### 2.3.1 Estrazione dell'RNA, quantificazione e retrotrascrizione

Poiché le sequenze di DNA contengono anche gli introni, è sicuramente più vantaggioso utilizzare il cDNA ottenuto a partire dai trascritti maturi che essendo privi di introni sono più corti e più facili da utilizzare in vitro.

Per questo motivo, il primo passo per l'ottenimento dei geni da clonare è l'estrazione dell'RNA totale da foglie di *Solanum lycopersicum*, per i geni SIMIXTA-like e SICD2, e di *Gossypium hirsutum* per il gene GhMYB25.

Il protocollo di estrazione seguito, che è riportato in seguito, è la versione adattata all'uso nei frutti del protocollo descritto da Chang et al. (1993) per l'estrazione dell'RNA dagli aghi di pino, dunque da materiale difficile e ricco di contaminanti di varia natura. Il materiale vegetale di partenza è un frammento di foglia (all'incirca 1 g); il tampone di estrazione ha la seguente composizione: CTAB 2%, PVP 2%; tris-HCl 100 mmol/L (pH 8.0), EDTA 25 mmol/L, NaCl 2 mol/L, spermidina 0.5 g/L e  $\beta$ mercaptoetanolo 2% aggiunto fresco appena prima dell'uso.

Per evitare le contaminazioni da RNasi è importante anche prestare attenzione, durante tutti i procedimenti, ad utilizzare vetreria sterile, soluzioni appositamente trattate con DEPC e puntali con il filtro, oltre che guanti sempre puliti.

#### Protocollo di estrazione dell'RNA

Per prima cosa il materiale vegetale viene frantumato in presenza di N<sub>2</sub> liquido e addizionato a un tubo Falcon da 50 mL contenete 10 mL di tampone di estrazione caldo. Il tubo viene poi posto sull'agitatore fino alla completa dissoluzione della polvere.

In seguito si procede all'estrazione con una miscela 24:1 di cloroformio e alcool isoamilico: si aggiunge al tubo un uguale volume di cloroformio-isoamilalcol (10 mL), si mette sull'agitatore per 15 minuti, si centrifuga a 3700 RPM per 15-30 minuti a 4 °C e poi si preleva il surnatante spostandolo in un nuovo tubo e facendo attenzione a non prelevare i contaminanti rimasti all'interfase. I passaggi relativi all'estrazione sono ripetuti per tre volte.

Dopo la terza ripetizione al surnatante viene aggiunto 1/3 di volume di LiCl 8 mol/L (il volume del surnatante a questo punto è solitamente di circa 7-9 mL, dunque viene portato a 9 mL con H<sub>2</sub>O trattata DEPC per aggiungere poi 3 mL di LiCl) e si lascia in ghiaccio fino al giorno successivo.

Il mattino seguente i tubi vengono centrifugati a 4 °C, a 4000 RPM per 90 minuti, e in seguito il surnatante viene rimosso e il pellet lavato con 5 mL di etanolo 70%, lasciato asciugare e infine risospeso in 100  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O DEPC.

Al termine dell'estrazione, l'RNA viene quantificato allo spettrofotometro grazie all'assorbanza a 260 nm; e si valuta la presenza di contaminanti in base ai rapporti di assorbanza  $\frac{A_{260}}{A_{280}}$  per i contaminanti proteici e  $\frac{A_{260}}{A_{230}}$  per i contaminanti glucidici. Inoltre viene osservato tramite elettroforesi su gel d'agarosio all' 1.2% per valutare che sia integro e non danneggiato.

In seguito viene trattato con le DNasi utilizzando quelle fornite da Sigma Aldrich e seguendone le istruzioni d'uso, per assicurarsi che non vi sia DNA genomico. Viene poi retrotrascritto per ottenere il cDNA usando l'apposito kit fornito da Applied Biosystems e seguendone le istruzioni d'uso.

Nel cDNA così ottenuto viene poi controllata la presenza dei geni cercati, conducendo una PCR di controllo, utilizzando il Taq Mix Red (PCR Biosystems) e i primer specifici per i geni da amplificare. I codici d'accesso per le schede GenBank con le sequenze dei geni in questione, insieme alle sequenze dei primer utilizzati, sono riportate nella tabella supplementare 1.

### 2.3.2 Estrazione del DNA genomico

Per ottenere il gene GhMYB25, che non è stato individuato nel trascrittoma, si procede all'estrazione del DNA genomico da foglie di cotone.

Anche se, come già detto, utilizzare l'intero gene completo di introni non è l'alternativa migliore, è stato scelto di procedere comunque in questo modo poiché il gene è relativamente corto (all'incirca 1400 pb) e si è rivelato essere poco espresso nella foglia.

#### Protocollo di estrazione del DNA genomico

Per prima cosa si prepara il tampone di estrazione con 1 volume di buffer di estrazione, 1 volume di buffer per la lisi del nucleo, e 0.4 volumi di sarkosyl 5%.

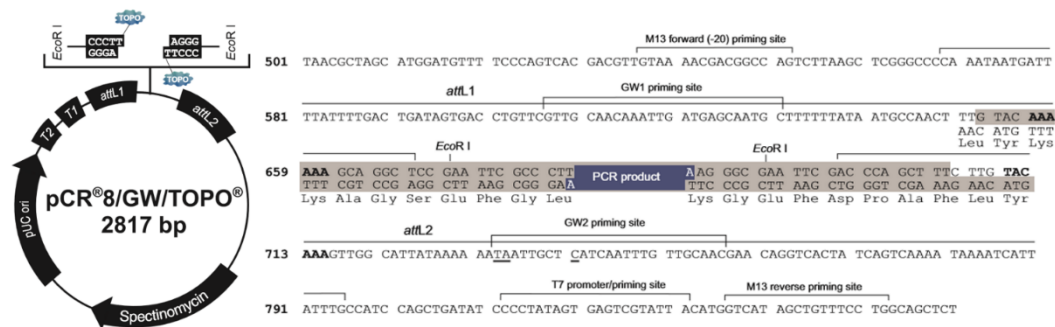
In una eppendorf vengono messi all'incirca 100 mg di tessuto fresco, a cui vengono aggiunti 250  $\mu$ L del tampone di estrazione, e il tessuto viene omogeneizzato con un apposito pestello di plastica. Vengono poi aggiunti altri 500  $\mu$ L di tampone di estrazione e il tutto viene lasciato ad incubare a 65 °C per un'ora. Viene poi aggiunto lo stesso volume (750  $\mu$ L) di una miscela 24:1 di cloroformio e alcol isoamilico, si agita con forza per 30 secondi e si procede poi a centrifugare per 10 minuti a velocità massima. In seguito si preleva il surnatante e lo si sposta in una nuova eppendorf, dove viene aggiunto lo stesso volume di isopropanolo che è mescolato per inversione per far precipitare il DNA. Si procede poi a centrifugare per 5 minuti a velocità massima, si elimina il surnatante e si lava il pellet con etanolo 70%. Una volta eliminato l'etanolo il pellet è lasciato asciugare e risospeso in 100  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O mq.

Anche il DNA, come l'RNA precedentemente estratto, è dunque quantificato allo spettrofotometro, dove si valuta anche la presenza di contaminanti, e osservato tramite elettroforesi su gel d'agarosio all' 1.2% per valutarne la qualità. In seguito viene anch'esso analizzato per PCR utilizzando il Taq Mix Red (PCRBio) e i primer relativi al gene GhMYB25 per confermarne la presenza prima di procedere con gli step successivi.

## 2.4 Clonaggio dei geni RUBY, SIMIXTA, SICD2, e GhMYB25 nel vettore pCR8

A questo punto i geni d'interesse possono venire clonati all'interno del vettore di clonaggio prescelto: il vettore pCR8.

Questo vettore è molto facile da utilizzare in quanto viene fornito linearizzato e attivato con l'enzima topoisomerasi legato covalentemente ad un residuo di timina sporgente al 3': di conseguenza è particolarmente adatto per l'inserimento con il metodo del TA cloning di prodotti amplificati tramite PCR effettuata con la Taq polimerasi. Inoltre questo vettore può essere usato poi per trasferire l'inserito in un altro vettore compatibile grazie alla tecnologia gateway: esso infatti possiede, ai lati del sito in cui si inserisce il DNA d'interesse, le due sequenze attL1 e attL2 necessarie per la ricombinazione sito-specifica. Come mostrato nella Figura 4, nella regione del vettore ai lati del sito d'inserzione sono presenti anche i siti di taglio per l'enzima EcoR1 (utile per le analisi effettuate con gli enzimi di restrizione) e i siti per i primer M13F e M13R e per i primer GW1 e GW2 (utili per i controlli per PCR e per il sequenziamento).



**Figura 4:** a sinistra la mappa del vettore pCR8 che mostra l'origine di replicazione pUC che consente di mantenere un elevato numero di copie all'interno dei batteri trasformati, la cassetta di resistenza per la spettinomicina e il sito di clonaggio; a destra la sequenza fiancheggiante il sito di clonaggio con evidenziate i siti di restrizione, le sequenze dei primer e le sequenze attL1 e attL2 necessarie per la tecnologia gateway.

### 2.4.1 Amplificazione dei geni tramite PCR

Il primo passaggio necessario per il clonaggio è l'amplificazione del gene da clonare. Per quanto riguarda i geni SIMIXTA-like e SICD2, vengono amplificati a partire dal cDNA; GhMYB25 viene amplificato invece a partire dal DNA genomico



e il gene reporter RUBY invece viene amplificato a partire dal plasmide all'interno del quale viene venduto. Da questo punto in poi si procede lavorando separatamente ma in parallelo con tutti e quattro i geni d'interesse. Per tutti e quattro i geni l'amplificazione viene condotta utilizzando una Taq polimerasi ad alta fedeltà, ottimizzata per minimizzare il numero di errori introdotti durante la polimerizzazione in modo che il prodotto sia con maggior probabilità identico allo stampo. Si usa dunque la HiFi Polimerasi (PCRBio), e poiché polimerizza 1 kb in circa 30 s sono necessari tempi di allungamento diversi per ogni gene.

Poiché i geni SIMIXTA-like e SICD2 erano stati individuati nel cDNA solo dopo 40 cicli di PCR perché poco espressi nel tessuto di partenza, si sceglie anche in questo caso di effettuare 40 cicli, nonostante le indicazioni per il clonaggio siano di amplificare il gene con un massimo di 25-35 cicli per limitare la possibilità di introdurre errori nella sequenza. In seguito dunque sarà necessario sequenziare un numero maggiore di cloni per accertarsi della correttezza della sequenza. Per GhMYB25 invece si conduce la reazione di PCR rispettando i 35 cicli consigliati poiché sufficienti a un buon livello di amplificazione partendo dal DNA genomico; e infine per RUBY, poiché molto lungo, si preferisce limitare la reazione a 30 cicli dato che sono comunque sufficienti amplificandolo da un plasmide.

Al termine della reazione, si controlla in elettroforesi su gel d'agarosio all'1.2% la presenza dell'amplificato.

#### 2.4.2 TA cloning

Una volta amplificati i geni d'interesse, il prodotto dell'amplificazione viene purificato tramite colonnina di affinità, utilizzando il kit fornito da Invitrogen e seguendo le istruzioni di quest'ultimo.

In seguito, poiché la HiFi Polimerasi usata per la PCR possiede attività esonucleasica 3'→5' (attività di correzione di bozze) e dunque non lascia i residui di adenina sporgenti tipici dei prodotti di PCR ottenuti con la Taq polimerasi, l'amplificato viene lasciato incubare per 10 minuti a 72 °C con la Taq polimerasi, che aggiunge questi residui sporgenti essenziali per la reazione di TA cloning nel vettore.

La reazione infatti si basa proprio sul presupposto che i prodotti di PCR possiedono questa adenina sporgente lasciata dalla Taq polimerasi, e dunque si appaiano al vettore quando quest'ultimo presenta una timina sporgente, come pCR8.

In seguito si procede al clonaggio vero e proprio dei geni all'interno del vettore seguendo le istruzioni fornite con il kit: si mettono in una eppendorf 4 µL di prodotto di PCR purificato e trattato per aggiungere le adenine, 1 µL di vettore pCR8 e 1 µL di soluzione salina, e il tutto è mescolato e lasciato incubare per 30 minuti a 35 °C.

A questo punto dovrebbero essere stati ottenuti con successo i vettori di clonaggio, che verranno usati prima per trasformare i batteri competenti in modo da selezionare i vettori costruiti nel modo giusto, e poi, una volta condotte le analisi necessarie, per spostare il gene nel vettore di espressione che sarà usato per la trasformazione delle colture cellulari.

### 2.4.3 Trasformazione dei batteri e screening delle colonie

A questo punto si può procedere a trasformare delle colture cellulari di *E. coli* competenti con il vettore appena ottenuto.

I primi tentativi di trasformazione tramite elettroporazione hanno dato risultati molto scarsi e in alcuni casi addirittura nulli, originando colonie batteriche che non crescevano nel modo corretto e che una volta analizzate tramite PCR e restrizione si sono rivelate non contenenti il vettore. Il motivo di questo insuccesso potrebbe essere l'età avanzata delle cellule elettrocompetenti, che essendo state scongelate e ricongelate molte volte non rispondono più bene alla trasformazione. Un altro dettaglio che può aver contribuito alla cattiva riuscita della trasformazione sono le cuvette, anch'esse vecchie e riutilizzate molte volte. Dunque si procede utilizzando le cellule chemio-competenti fornite insieme al kit di pCR8, e si seguono le loro istruzioni per la trasformazione con shock termico. In seguito sono piastrate diverse aliquote su terreno LB agar (peptone 10 g/L, estratto di lievito 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.0) addizionato con spectinomycin e le piastre sono lasciate in incubazione a 37 °C overnight.

Il giorno seguente si procede allo screening delle colonie tramite PCR. Le singole colonie vengono prelevate e disciolte in 50 µL di H<sub>2</sub>O mq, da cui viene poi prelevata un'aliquota per la reazione di PCR allestita in questo modo: 10 µL di Buffer, 0.8 µL di primer M13F, 0.8 µL di primer M13R e 8.4 µL di H<sub>2</sub>O mq con i batteri disciolti. Per lisare le cellule batteriche e liberare in soluzione gli acidi nucleici si inizia la procedura con 2 minuti aggiuntivi a 92 °C e si procede poi come una normale PCR. Questa volta si utilizza un enzima diverso poiché non è necessaria la massima fedeltà della HiFi Polimerasi usata in precedenza: si usa dunque il Taq Mix Red (PCRBio) che contiene già al suo interno una Taq polimerasi. Poiché questo enzima polimerizza 1 kb in 20 s le reazioni sono condotte con tempi di allungamento diversi in base alla lunghezza del gene clonato.

In seguito si valuta, osservando i prodotti in elettroforesi su gel d'agarosio all'1.2%, se le colonie presentano il vettore richiuso, e dunque una banda a circa 300 pb, oppure l'inserito.

A questo punto si selezionano le colonie in cui è stata confermata la presenza dell'inserito e si trasferiscono in coltura liquida, in terreno LB addizionato con spectinomycin come quello solido usato in precedenza, e si lasciano le nuove colture in incubazione a 37 °C e in agitazione fino al giorno seguente.

In alternativa si può scegliere di saltare il passaggio di screening per PCR e procedere subito con la preparazione di una coltura liquida diluendo la colonia prelevata dalla piastra in 50 µL di terreno LB liquido con spectinomina e lasciando in incubazione a 37 °C e in agitazione fino al giorno seguente. In questo caso per valutare la presenza dell'inserito si procederà a un'analisi per restrizione usando l'enzima EcoRI, che trova un sito di taglio proprio ai lati del sito in cui il DNA da clonare si inserisce nel vettore.

#### 2.4.4 Controllo del DNA plasmidico tramite restrizione

A questo punto si procede con l'estrazione del DNA plasmidico dalle colonie batteriche cresciute in coltura liquida per poter analizzare il plasmide tramite restrizione e poi mediante sequenziamento.

##### Protocollo di estrazione del DNA plasmidico

Per prima cosa viene riempita una eppendorf con 1.5 µL della coltura liquida, e viene centrifugata per 5 minuti a velocità massima per ottenere un pellet di cellule. Il terreno viene eliminato e si risospende il pellet in 200 µL di soluzione di risospensione (tris-HCl 10 mmol/L (pH8), EDTA 10 mmol/L, Rnasi 10 mg/mL). Poi si aggiungono 200 µL di soluzione di lisi (SDS 1%, NaOH 0.2 mol/L), si mescola per inversione e dopo qualche secondo si aggiungono 200 µL di soluzione di neutralizzazione (potassio acetato 3 mol/L) mescolando ancora una volta per inversione. In seguito si procede a centrifugare nuovamente per 5 minuti a velocità massima, e il surnatante è trasferito in un uguale volume (600 µL) di una miscela 24:1 di cloroformio e alcool isoamilico. Dopo aver mescolato utilizzando il vortex e centrifugato ancora una volta, si ripete questo passaggio, si mescola e si centrifuga nuovamente.

A questo punto si trasferisce il surnatante in 1 mL di etanolo 100% per precipitare il DNA e si lascia per 15 minuti a -20 °C. Successivamente si centrifuga a 4 °C per 15 minuti a velocità massima, si elimina il surnatante e si lava il pellet con 500 µL di etanolo 70%. Poi si lascia asciugare il pellet e si risospende il 50 µL di H<sub>2</sub>O mq.

Una volta estratto, il DNA plasmidico è pronto per essere digerito con gli enzimi di restrizione, sequenziato oppure conservato per gli utilizzi futuri.

##### Digestioni con enzimi di restrizione

Per valutare la presenza dell'inserito, nel caso la colonia batterica da cui è stato estratto il plasmide non fosse stata controllata per PCR, si procede a digerire un'aliquota del DNA estratto con l'enzima EcoRI.

Come già accennato in precedenza, questo enzima possiede due siti di taglio ai lati del sito in cui si inserisce il DNA d'interesse: in questo modo, osservando il risultato della restrizione tramite elettroforesi su gel d'agarosio, nel caso in cui il vettore

contenga l'inserto saranno visibili la doppia banda del vettore (a circa 2800 pb) e dell'inserto; mentre se il vettore è richiuso si vedrà soltanto la banda relativa al vettore.

Per valutare la direzionalità dell'inserto invece si procede a digerire un'aliquota del DNA estratto con due enzimi che taglino uno nel vettore, vicino al sito di inserzione del DNA d'interesse e l'altro all'interno del DNA clonato ma in modo asimmetrico. Osservando le mappe dei vettori ottenuti con i diversi geni clonati all'interno si scelgono i seguenti enzimi di restrizione:

- i vettori con i geni RUBY e SIMIXTA-like vengono digeriti con gli enzimi XbaI e BglII;
- il vettore con il gene GhMYB25 viene digerito con gli enzimi XbaI e DraI;
- il vettore con il gene SICD2 viene digerito con gli enzimi HpaI e PmlI.

In questo modo, le bande visualizzate in elettroforesi su gel d'agarosio permetteranno di distinguere i vettori in cui l'inserto si è inserito nella direzione corretta da quelli in cui si è inserito al contrario. Infatti, tutte le digestioni, nel caso in cui il gene sia inserito nel modo corretto, mostreranno una banda fra le 400 pb e le 500 pb, eccetto il caso del vettore contenente il gene GhMYB25 in cui la banda a circa 400 pb indica che il gene è inserito al contrario, mentre nel caso in cui si inserisca nella direzione corretta ci sarà una banda a circa 1200 pb.

Per le digestioni sono stati usati gli enzimi e i buffer venduti da New England Biolabs, allestendo ogni reazione con 2 unità di ciascun enzima, 5 µL del DNA da digerire, 1 µL del buffer adatto per gli enzimi in questione e 3.2 µL di H<sub>2</sub>O mq per arrivare a un volume totale di 10 µL. Le reazioni sono state lasciate incubare per 60-90 minuti a 37 °C e poi osservate tramite elettroforesi su gel d'agarosio all'1.2%.

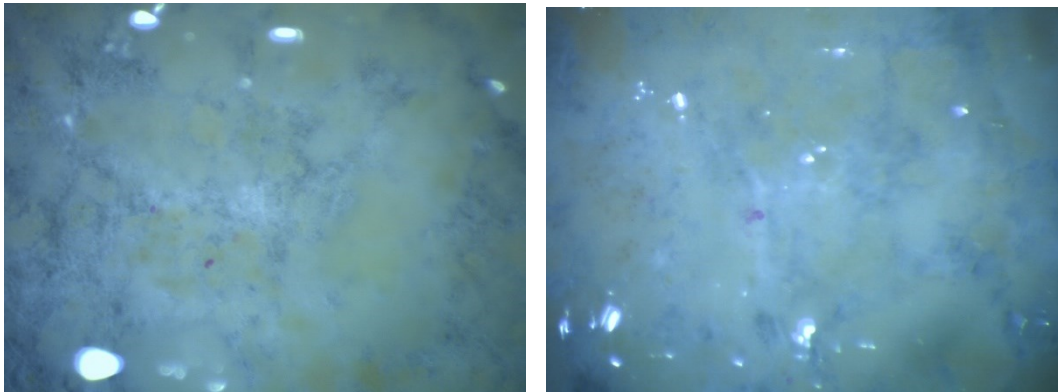
In seguito, alcuni dei vettori analizzati saranno anche sequenziati per stabilire con certezza che la sequenza dei geni inseriti sia corretta e che non siano state inserite in fase di amplificazione delle mutazioni in grado di causare la perdita di funzione dei prodotti proteici. Solo dopo questo ulteriore controllo si potrà procedere con la ricerca e spostare i geni nel vettore d'espressione prescelto utilizzando la tecnologia gateway.

## CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONE

### 3.1 Trasformazione con il metodo biolistico

Come si può vedere dalla Figura 5, la trasformazione delle cellule di *C. sativa* con il metodo biolistico ha avuto successo. Dopo 48 ore dalla trasformazione, infatti si vedono chiaramente alcune cellule di colore rosso che esprimono i geni per la sintesi di betalaina portati dal costrutto RUBY.

L'efficienza di trasformazione non è particolarmente elevata, ma ciò non costituisce un problema poiché l'unico scopo di questo esperimento era quello di valutare il funzionamento del costrutto RUBY all'interno delle cellule di *Cannabis sativa*.



**Figura 5:** alcune delle piastre Petri con le cellule di *C. sativa* trasformate mediante tecnica biolistica con il costrutto 35S:RUBY, osservate 48 ore dopo la trasformazione prima di piastrarle su terreno selettivo. Si può vedere il colore rosso brillante delle cellule trasformate, caratteristico della betalaina prodotta grazie al gene inserito.

Osservando le piastre Petri con continuità nei due mesi seguenti alla trasformazione si è potuto notare che le cellule non proliferano e non mantengono l'espressione del gene, perdendo il colore rosso brillante. Ciò potrebbe essere dovuto all'affaticamento metabolico causato dall'espressione dei tre geni per la nuova via biosintetica, oppure più probabilmente all'età avanzata delle colture cellulari, che avendo più di sei mesi non crescono più in modo ottimale.

In ogni caso, l'espressione transiente del gene RUBY è più che sufficiente a confermare il corretto funzionamento del gene all'interno di questo tipo di cellule, e dunque sarà possibile utilizzare questo reporter per la messa a punto del sistema inducibile oggetto del lavoro in cui si colloca questa tesi.

### 3.2 Estrazione degli acidi nucleici

Sia nel caso del DNA che in quello dell'RNA le estrazioni sono state condotte con successo e hanno portato una buona quantità di materiale per i procedimenti successivi. Le analisi allo spettrofotometro hanno confermato una discreta

purezza dell'estratto e anche la corsa elettroforetica su gel d'agarosio ha confermato la buona qualità dell'estratto mostrando nel caso del DNA un'unica banda di elevato peso molecolare mentre nel caso dell'RNA le due bande degli RNA 28S e 18S di intensità una doppia dell'altra e la debole banda dell'RNA 5S; inoltre in entrambi i casi era ben visibile l'assenza dello smear tipico del materiale genetico degradato.

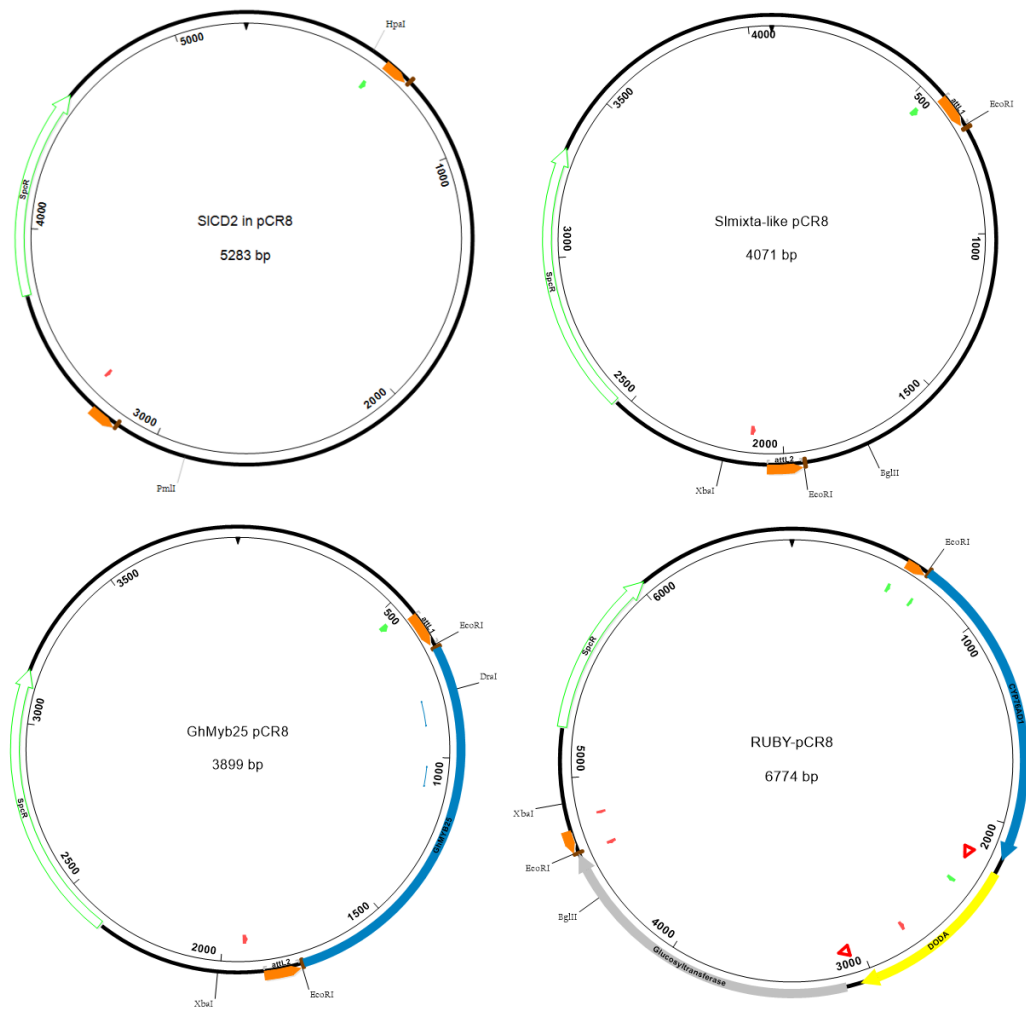
Il controllo della presenza dei geni da clonare nel cDNA ha rivelato che solo i due geni isolati da pomodoro si confermano presenti nel trascrittoma della foglia, anche se non sono fra i trascritti più espressi: infatti è stato possibile amplificarli soltanto dopo alcuni tentativi, una volta individuata la temperatura migliore di annealing dei primer (55 °C), e conducendo una PCR a 40 cicli con 3 µL di cDNA come materiale di partenza, nonostante le indicazioni fossero di utilizzarne soltanto 100 ng, cioè 1.3 µL.

Il gene di cotone invece non è stato individuato nel trascrittoma neppure in queste condizioni, e si è ipotizzato dunque che sia espresso a un livello minimo nella foglia. Dato che il DNA genomico non è influenzato dai livelli di espressione come il trascrittoma il gene viene invece amplificato al primo tentativo all'interno del DNA genomico, dopo aver individuato anche in questo caso la temperatura migliore di annealing dei primer (60 °C). Poiché, come già detto in precedenza, il gene in questione non è particolarmente lungo, non ci sono stati problemi con il suo isolamento, né successivamente con la clonazione, tuttavia, poiché sarebbe sempre meglio utilizzare il cDNA, un'alternativa avrebbe potuto essere quella di scegliere un tessuto diverso per l'estrazione dell'RNA nella speranza di individuarne uno con livelli d'espressione del gene GhMYB25 maggiori, da cui fosse possibile dunque procedere con i successivi step di amplificazione.

### 3.3 Clonaggi

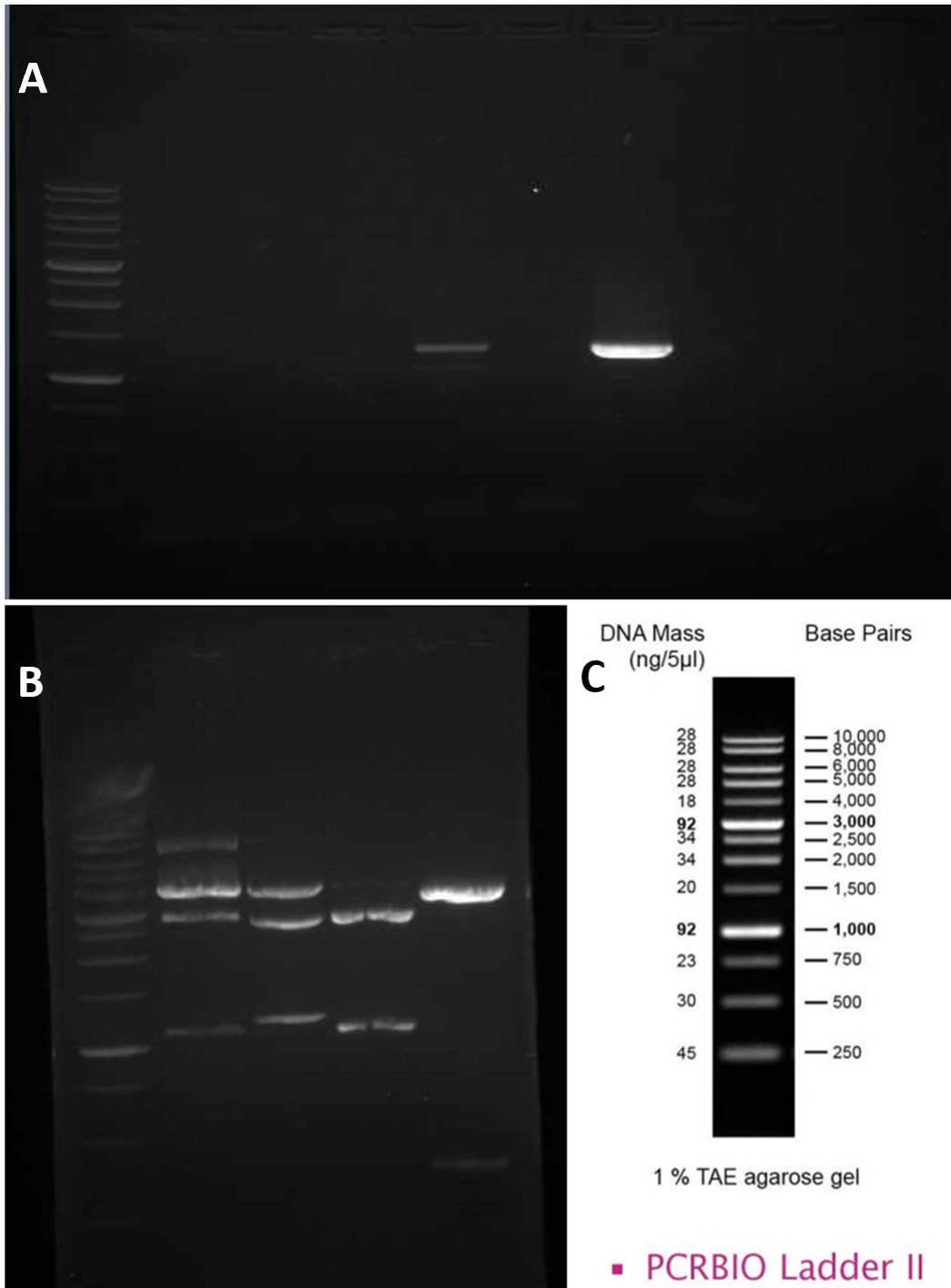
Nonostante la lunghezza notevole di due dei quattro geni utilizzati, non ci sono stati problemi nella fase iniziale di amplificazione per PCR, forse anche perché erano già state individuate le temperature di annealing migliori dei vari primer.

Anche la fase successiva di trasformazione di *E. Coli*, dopo i problemi iniziali durante i tentativi di trasformazione per elettroporazione dovuti probabilmente all'età avanzata delle cellule usate, è stata condotta senza difficoltà e ha portato buoni risultati. Infatti una volta piastrate le cellule si è potuto osservare un numero abbastanza elevato di colonie su ogni piastra, molte delle quali, dopo screening per PCR o analisi per restrizione con EcoRI, si sono rivelate contenere effettivamente il vettore non richiuso e con al suo interno il gene d'interesse.



**Figura 6:** Mappe dei quattro vettori ottenuti clonando i geni SIMIXTA-like, SICD2, GhMYB25 e RUBY nel vettore pCR8. Nelle mappe sono evidenziati anche i siti di taglio relativi agli enzimi di restrizione usati per i controlli di presenza e direzionalità degli inserti nei vettori.

I controlli per restrizione (come ad esempio quello raffigurato nella Figura 7B) invece hanno evidenziato come la direzionalità dell'inserto fosse casuale, dato che la tecnologia del TA cloning non permette il clonaggio direzionale. Infatti, per tutti i geni inseriti sono state individuate sia colonie con il gene direzionato nel modo corretto nel vettore, sia colonie con il gene al contrario.



**Figura 7:** **A.** visualizzazione su gel d'agarosio 1.2% della PCR di screening su colonie contenenti il gene GhMYB25 in pCR8. **B.** visualizzazione su gel d'agarosio 1.2% del DNA plasmidico estratto dalle colonie 4 e 6 del gel a e digerito. Il secondo e il terzo pozzetto mostrano rispettivamente le colonie 4 e 6 digerite con EcoRI: sono visibili due bande più alte relative al DNA circolare ma non superavvolto (solo nel secondo pozzetto) e al DNA linearizzato (a circa 4000 pb), si vede poi la banda relativa al vettore (2799 pb) e quella relativa all'inserto (1100 pb). Il quarto e il quinto pozzetto mostrano rispettivamente le colonie 4 e 6 digerite con DraI+XbaI: il clone 4 presenta le bande attese per l'inserto dritto a 2700 pb e 1199 pb; il clone 6 presenta invece le bande attese per l'inserto storto a 3528 pb e 371 pb. **C.** ingrandimento del marker utilizzato nei gel a e b.



Per migliorare l'efficienza nell'ottenimento di vettori utili, quindi con l'inserimento nella direzione corretta, si potrebbe utilizzare un qualsiasi metodo per il clonaggio direzionale, anche scegliendo un plasmide diverso o digerendolo con degli enzimi di restrizione, avendo cura poi di aggiungere le estremità corrette per l'appaiamento nei prodotti di PCR. Tuttavia l'estrema semplicità di utilizzo del plasmide pCR8, insieme anche alla notevole utilità del sistema Gateway per lo spostamento dei geni nei vettori di espressione la rende forse preferibile, poiché in ogni caso la direzionalità dell'inserimento viene controllata per restrizione prima dell'utilizzo del vettore.

## CAPITOLO 4: CONCLUSIONI

*Cannabis sativa* è una pianta dal crescente interesse biotecnologico in campo farmaceutico e nutraceutico. In questo studio infatti si pongono le basi per lo sviluppo di un lavoro più ampio volto a mettere a punto un sistema inducibile per la produzione dei metaboliti secondari da cellule in coltura.

In particolare, si è testata la funzionalità del gene reporter RUBY in cellule in coltura di *C. sativa*. A seguito degli esperimenti di trasformazione effettuati utilizzando il metodo biolistico, durante i quali è stato possibile ottenere con successo la trasformazione transiente delle cellule, è stato possibile confermare il corretto funzionamento del gene reporter in cellule di questa specie. Sarà dunque possibile utilizzare il costrutto RUBY sotto il controllo di un promotore inducibile per tutti gli esperimenti successivi.

Inoltre, sono stati ottenuti con successo quattro diversi plasmidi di clonaggio compatibili con il sistema Gateway, uno contenente il gene reporter e gli altri tre contenenti ognuno un gene tra i prescelti per indurre il differenziamento, e quindi la formazione di tricomi, nelle cellule in coltura: i geni di pomodoro SIMIXTA-Like e SICD2 e il gene di cotone GhMYB25. A questo punto i geni che sono stati scelti per essere usati all'interno del sistema inducibile sopra menzionato sono disponibili per essere spostati nel plasmide d'espressione e utilizzati per gli esperimenti di trasformazione delle cellule di *C. sativa*.

## MATERIALE SUPPLEMENTARE

---

Gene: SIMIXTA-like (GenBank AC: XM\_004232164.3)

Forward primer: **ATGGGTCGATCTCCGTGTT**

Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Plus	19	1	19	58.41	52.63

Reverse primer: **TTAGAACATAGATGAATCAGATGGA**

Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Minus	25	1254	1230	55.38	32.00

Lunghezza prodotto: 1254 pb

---

Gene: SICD2 (GenBank AC: NM\_001247728.2)

Forward primer: **ATGAATTTGGGGGTTTTCTTGA**

Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Plus	23	1	23	57.10	34.78

Reverse primer: **TTAGCTTTCGCATTGAAGTGCAG**

Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Minus	23	2466	2444	60.37	43.48

Lunghezza prodotto: 2466 pb

---

Gene: GhMYB25 (Genebank AC: XM\_016867389.2)

Forward primer: **ATGGGGAGGTCACCATGT**

Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Plus	18	1	18	57.39	55.56

Reverse primer: **TCATAAACCATTAAATCCAAACAAC**

Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Minus	25	930	906	54.82	28.00

Lunghezza prodotto: 930 pb (1082 se amplificato da DNA genomico)

---

**Tabella supplementare 1:** sono riportati in ordine i codici d'accesso alle schede GenBank relative ai geni utilizzati all'interno di questo lavoro, e le sequenze dei primer disegnati su questi geni utilizzando lo strumento PrimerBlast.

## BIBLIOGRAFIA

- Andre, C. M., Hausman, J.-F., & Guerriero, G. (2016). Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00019>
- Chalvin, C., Drevensek, S., Dron, M., Bendahmane, A., & Boualem, A. (2020). Genetic Control of Glandular Trichome Development. *Trends in Plant Science*, 25(5), 477–487. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.12.025>
- Chandra, S., Lata, H., & ElSohly, M. A. (A cura di). (2017). *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6>
- Chang, S., Puryear, J., & Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11(2), 113–116. <https://doi.org/10.1007/BF02670468>
- He, Y., Zhang, T., Sun, H., Zhan, H., & Zhao, Y. (2020). A reporter for noninvasively monitoring gene expression and plant transformation. *Horticulture Research*, 7(1), 152. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00390-1>
- Machado, A., Wu, Y., Yang, Y., Llewellyn, D. J., & Dennis, E. S. (2009). The MYB transcription factor GhMYB25 regulates early fibre and trichome development. *The Plant Journal*, 59(1), 52–62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03847.x>
- National Institute on Drug Abuse. (2021). *Is marijuana safe and effective as medicine?* <https://nida.nih.gov/publications/research-reports/marijuana/marijuana-safe-effective-medicine>
- Pasqua, G., Abbate, G., & Forni, C. (2015). *Botanica generale e diversità vegetale*. Piccin Editore.
- Romero, P., Peris, A., Vergara, K., & Matus, J. T. (2020). Comprehending and improving cannabis specialized metabolism in the systems biology era. *Plant Science*, 298, 110571. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110571>
- Shi, P., Fu, X., Shen, Q., Liu, M., Pan, Q., Tang, Y., Jiang, W., Lv, Z., Yan, T., Ma, Y., Chen, M., Hao, X., Liu, P., Li, L., Sun, X., & Tang, K. (2018). The roles of *AaMIXTA1* in regulating the initiation of glandular trichomes and cuticle biosynthesis in *Artemisia annua*. *New Phytologist*, 217(1), 261–276. <https://doi.org/10.1111/nph.14789>
- Vendramin, E., Pea, G., Dondini, L., Pacheco, I., Dettori, M. T., Gazza, L., Scalabrin, S., Strozzi, F., Tartarini, S., Bassi, D., Verde, I., & Rossini, L. (2014). A Unique Mutation in a MYB Gene Cosegregates with the Nectarine Phenotype in Peach. *PLoS ONE*, 9(3), e90574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090574>
- Yang, Q., Yang, X., Wang, L., Zheng, B., Cai, Y., Ogutu, C. O., Zhao, L., Peng, Q., Liao, L., Zhao, Y., Zhou, H., & Han, Y. (2022). Two R2R3-MYB genes cooperatively control trichome development and cuticular wax biosynthesis in *Prunus persica*. *New Phytologist*, 234(1), 179–196. <https://doi.org/10.1111/nph.17965>
- Ying, S., Su, M., Wu, Y., Zhou, L., Fu, R., Li, Y., Guo, H., Luo, J., Wang, S., & Zhang, Y. (2020). Trichome regulator SIMIXTA-like directly manipulates primary metabolism in tomato fruit. *Plant Biotechnology Journal*, 18(2), 354–363. <https://doi.org/10.1111/pbi.13202>

