

# *Utilizzo di metodi molecolari per l'identificazione di specie microalgali*

*Rivolta d'Adda, 22 giugno 2017*

**Graziella Bongioni, Sabina Arabi e Rossana Capoferri**

**Istituto Spallanzani**

Progetto finanziato da:



**fondazione  
cariplo**

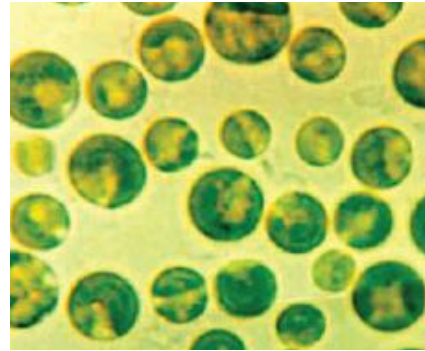
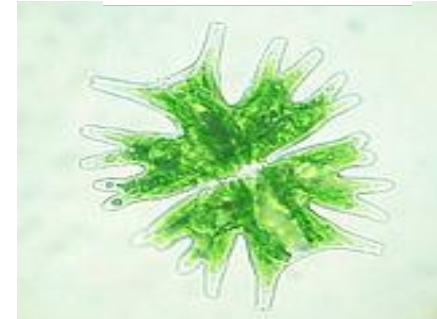
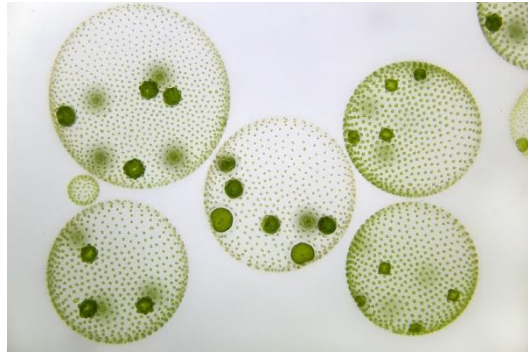
Sponsor dell'evento:



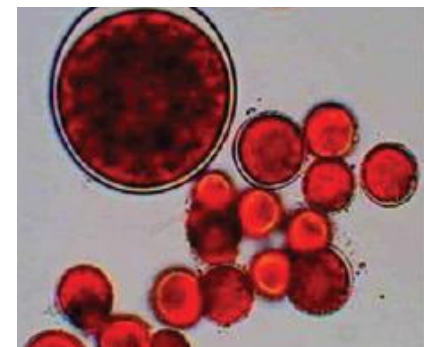
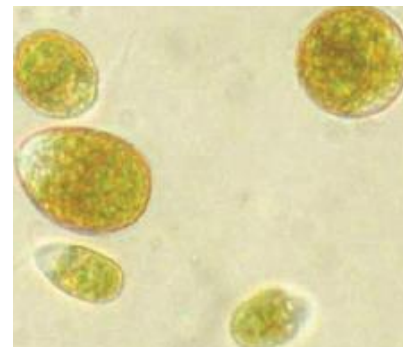
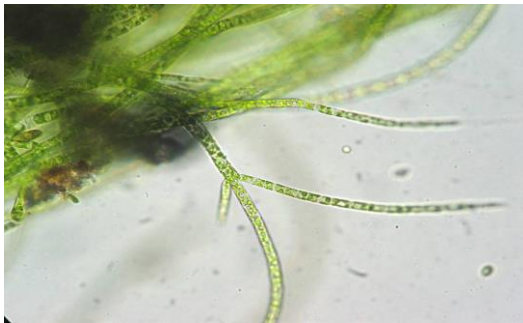
**LUMSON**  
Cosmetic Packaging Industries

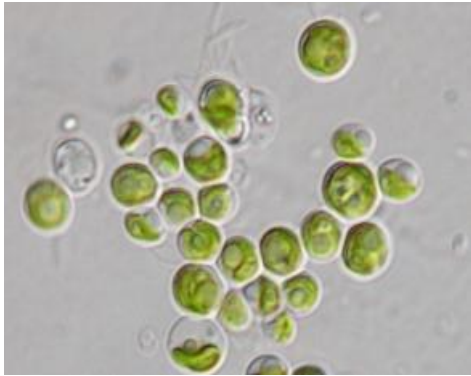
GRAFICHE CAM  
  
Pandino (CR)

# Biodiversità algale

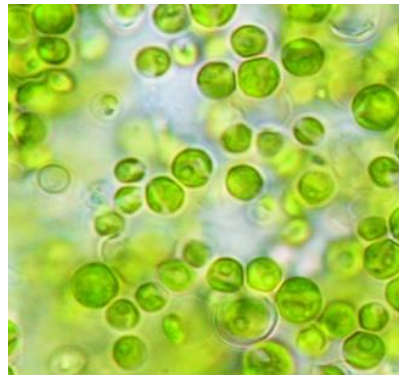


Grande varietà: sono decine di migliaia le specie microalgali note che si differenziano per forma, colore, dimensioni e aspetti metabolici.





*Chlorella vulgaris*



*Chlorella sorokiniana*

Un'identificazione basata sulla **morfologia** delle microalghe non sempre risulta facile da eseguire poiché specie molto vicine filogeneticamente possono presentare tratti fenotipici uguali o difficilmente differenziabili.

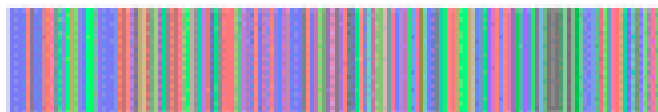
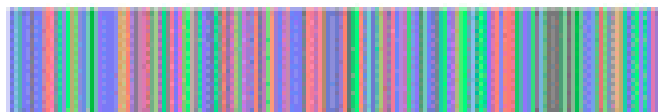
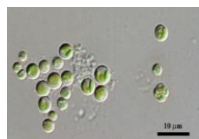
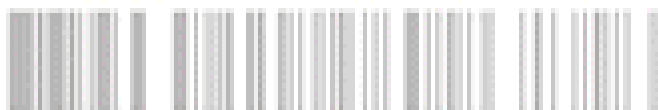
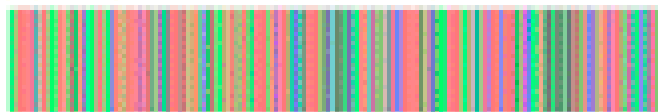
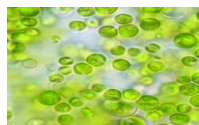
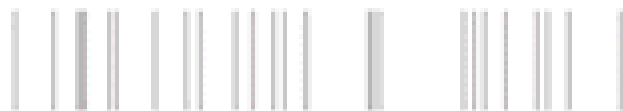
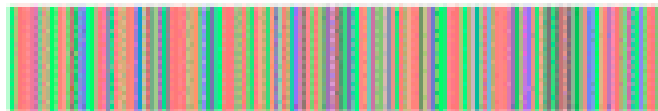
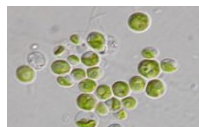
## La biodiversità si esprime a livello genetico...

Biodiversità genetica intra-specifica: il patrimonio genetico racchiuso nel DNA di tutti gli individui appartenenti ad una singola specie biologica

**Negli ultimi anni l'applicazione di tecniche molecolari, supportate da indagini morfologiche ed ultrastrutturali, ha permesso di risolvere problemi tassonomici di identificazione di organismi appartenenti a generi complessi, caratterizzati da un'elevata diversità di specie.**



## Il test del DNA per identificazione di specie

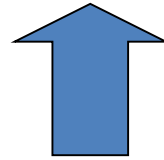
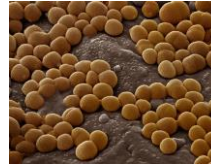


Il patrimonio genetico di specie differenti **presenta differenze** nella **SEQUENZA GENOMICA** in funzione della divergenza evolutiva tra le specie e consente di identificarle in modo non ambiguo.

Rappresenta quindi la **carta d'identità** della specie.

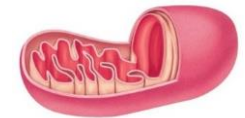
# Batteri

Regioni variabili V1-V9 del 16S rRNA o ITS

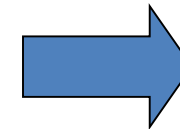


# Metazoi

Regione di 648  
paia di basi del  
mitocondrio:  
citocromo ossidasi  
subunità 1  
(*cox1*)

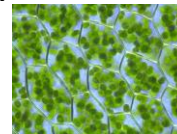


DNA barcoding  
**identificazione di specie biologiche  
tramite l'utilizzo di sequenze di DNA**



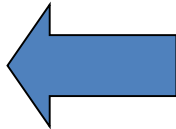
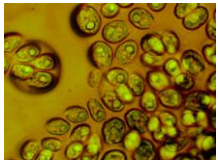
# Piante

Regioni del cloroplasto, **matK** e **rbcL**, sono risultati  
marcatori standard per le piante inferiori e  
superiori



# Microalghe

Marcatore  
nucleare ITS



## *Attività del laboratorio di Genetica Molecolare :*

**Identificazione genetica dei ceppi microalgali di interesse e in particolare delle varie specie di *Chlorella* e *Scenedesmus*.**



Individuazione di marcatori molecolari per distinguere i ceppi di interesse per il progetto MICROFLOWER

Sviluppo di saggi in real-time PCR a partire dalle sequenze individuate tramite approccio NGS

Validazione dei saggi su campioni in coltura presso il laboratorio di microalghe dell'Istituto

## Laboratorio microalghe

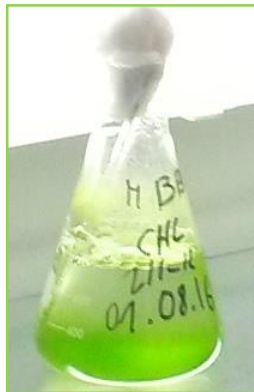


### Specie in esame:

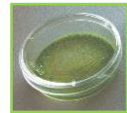
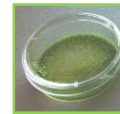
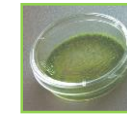
- 🌱 *Chlorella vulgaris* (ceppo 211-12)
- 🌱 *Chlorella sorokiniana* (ceppo 211-8k )
- 🌱 *Acutodesmus obliquus* (ceppo 276-20)
- 🌱 *Desmodesmus armatus* (ceppo 276-4d)
- 🌱 *Scenedesmus acuminatus* (ceppo 38-81)
- 🌱 *Chlamydomonas debaryana* (ceppo 11-1)



# Estrazione del DNA



Liofilizzatore da laboratorio ALPHA 1-4 D plus Christ



Grind, lyse, & precipitate

Centrifuge through QIAshredder

Add ethanol & bind DNA

Wash

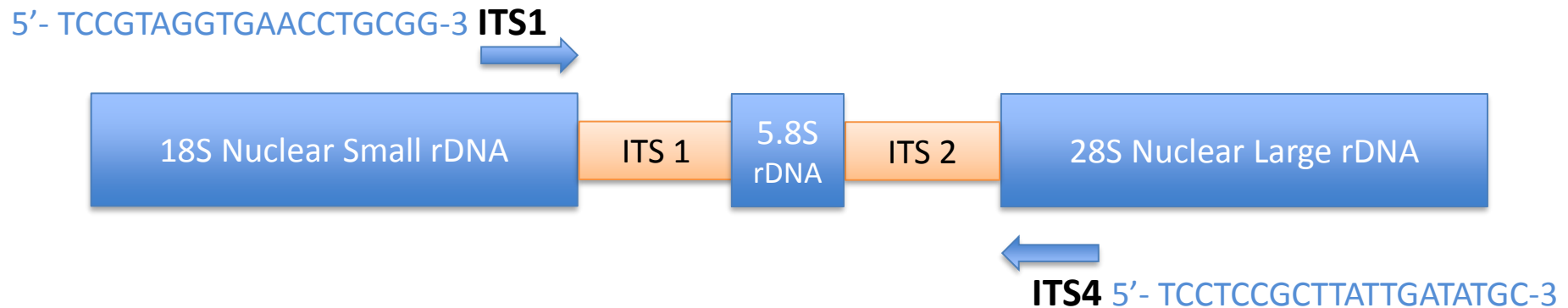
Elute

Ready-to-use DNA

Dneasy plant mini kit (Qiagen)

**Marcatore Genetico : Regioni Spaziatrici del DNA ribosomiale nucleare ITS**  
(Internal Transcribed Spacer )

**Tecnologia : Sequenziamento massivo parallelo tramite MiniSeq Illumina**

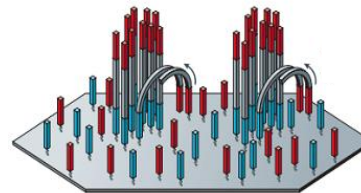
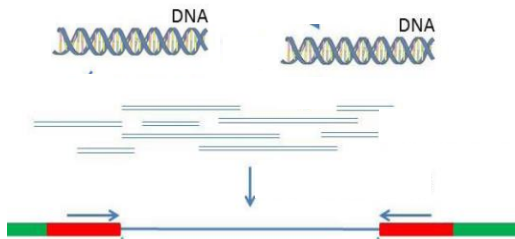


White *et al.* 1990

## Approccio basato sul sequenziamento dell'amplicone ITS (Amplicon-Seq based approach)

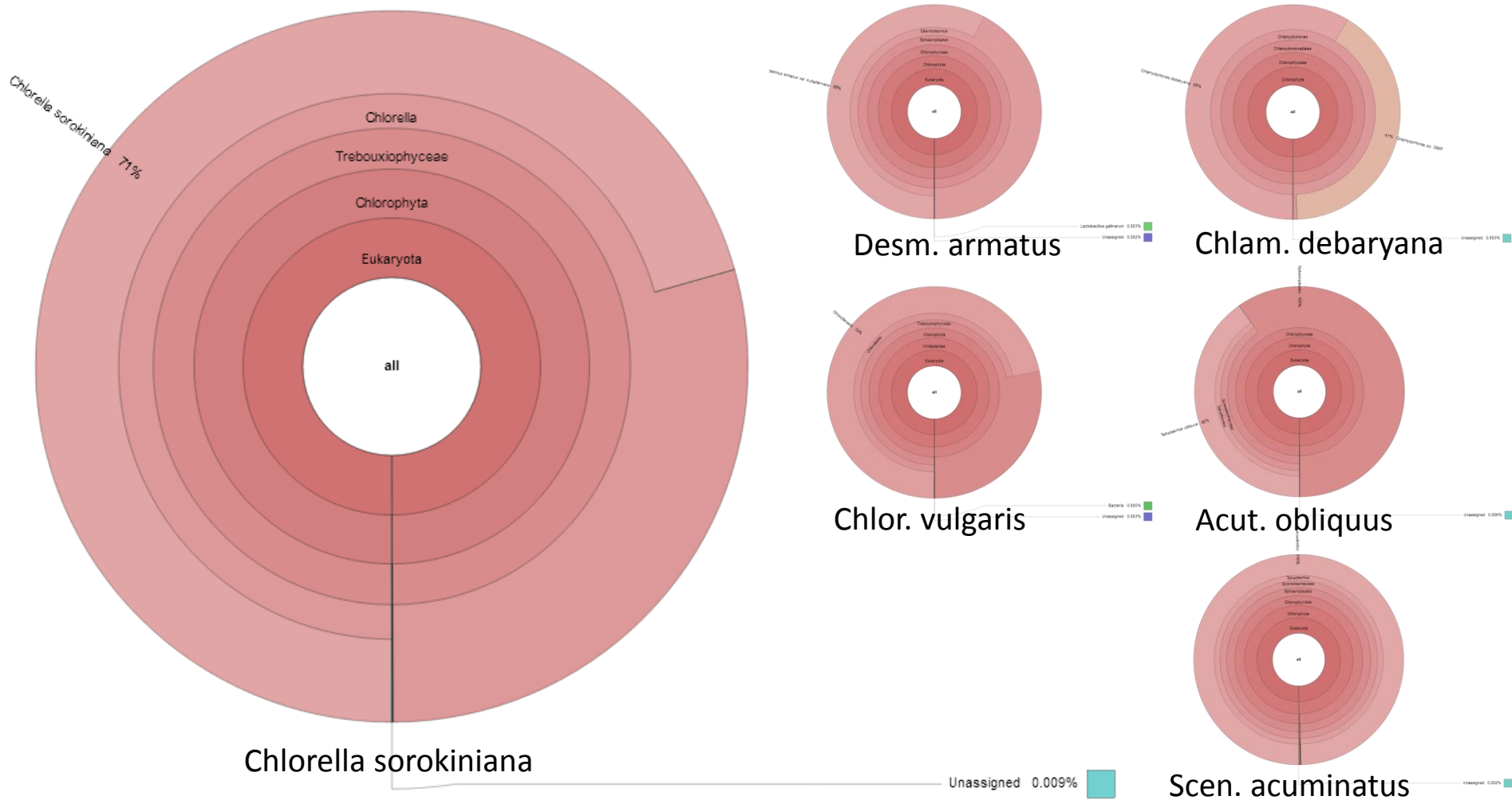
Allestimento di una library per  
il barcoding del ceppo  
microalgale di interesse

Sequenziamento con  
Illumina MiSeq

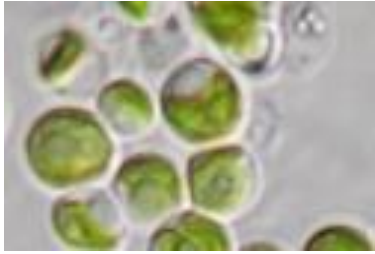




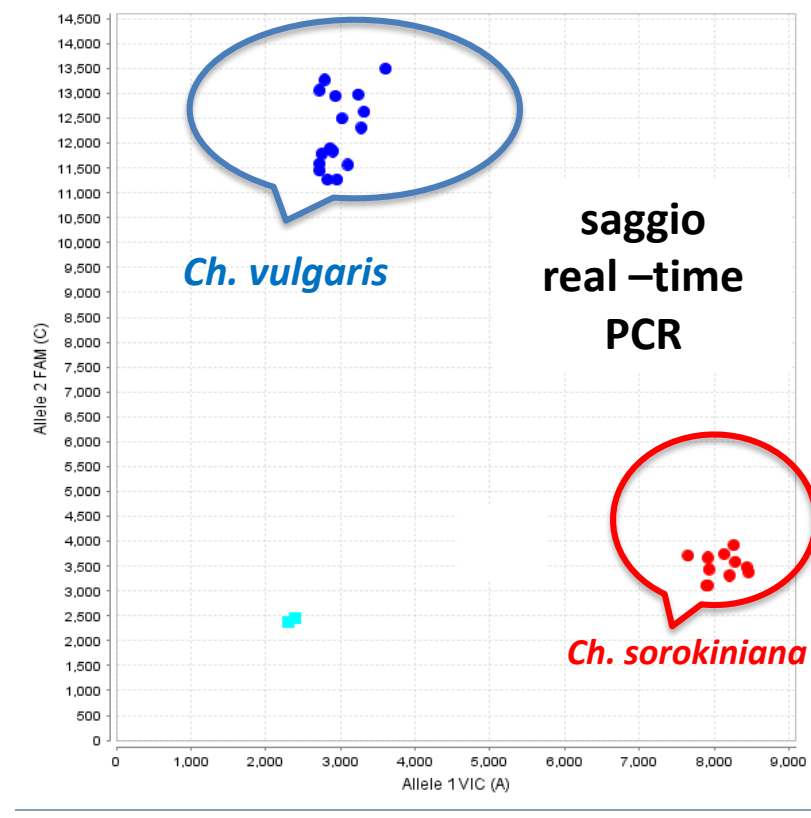
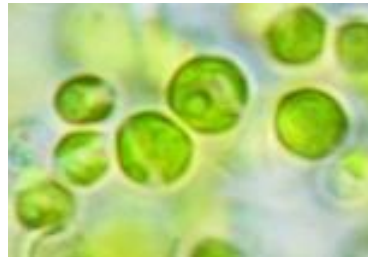
Numero di  
Read totali: 136738



ID campione	Nome	Sequenza di riferimento (Accession number)	N° Varianti
1	<i>Chlorella vulgaris</i>	IFR865660.1	10
5	<i>Desmodesmus armatus</i>	AB917135.1	4
6	<i>Scenedesmus acuminatus</i>	JQ082312.1	9
7	<i>Chlorella sorokiniana</i>	FM205834.1	14
12	<i>Chlamydomonas debaryana</i>	KJ210856.1	6
13	<i>Acutodesmus obliquus</i>	FR865721.1	28 3 delezioni

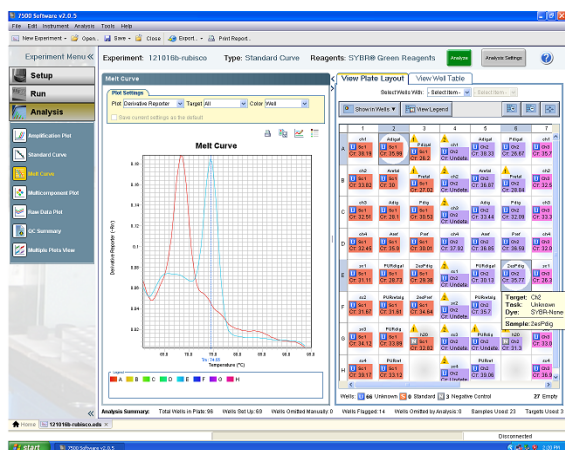
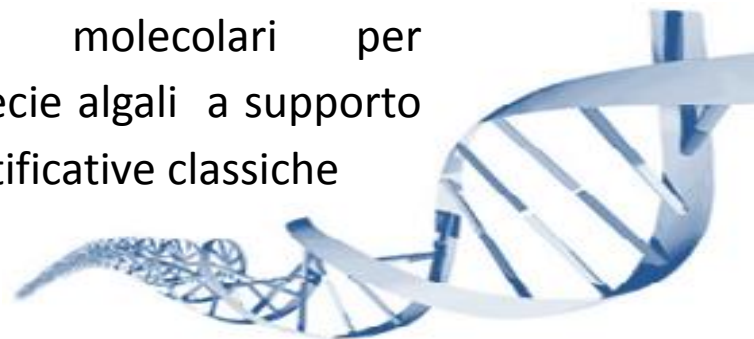


Saggi real-time PCR disegnati sulle **varianti individuate** in NGS per l'identificazione dei ceppi algali



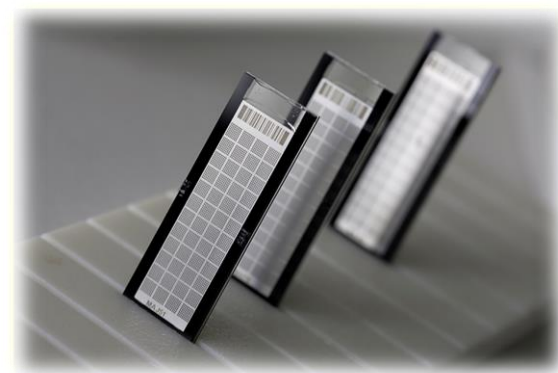
## Prospettive future

- utilizzo di saggi molecolari per l'identificazione di specie algali a supporto delle metodiche identificative classiche



- possibilità di verificare la purezza di monoculture microalgali

- definizione di un protocollo per lo sviluppo di test analitici estensibili ad altre specie algali di interesse (bio-remediation, cosmesi, nutraceutica,..)







# Grazie dell'attenzione!

[graziella.bongioni@istitutospallanzani.it](mailto:graziella.bongioni@istitutospallanzani.it)

Progetto finanziato da:



**fondazione**  
**cariplo**

Sponsor dell'evento:



**LUMSON**  
Cosmetic Packaging Industries

GRAFICHE CAM  
  
Pandino (CR)