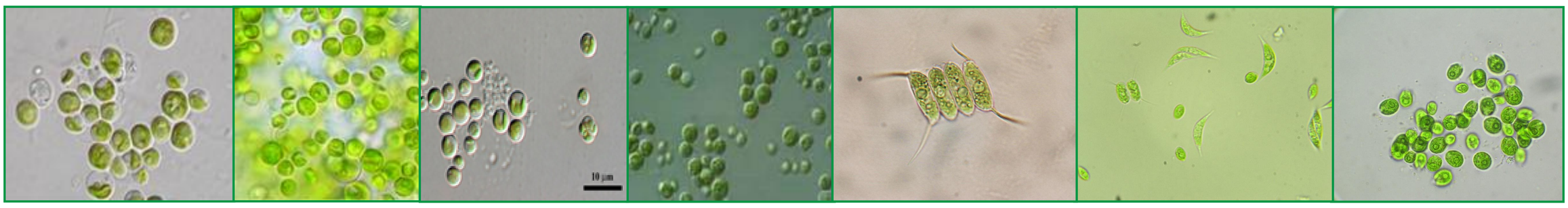
# APPROCCIO METAGENOMICO PER LA CARATTERIZZAZIONE DI SPECIE MICROALGALI PER IL SETTORE NUTRACEUTICO E MANGIMISTICO

**Katia Parati, Rossana Capoferri, Sabina Arabi, Federico Castillo Cascino, Graziella Bongioni**

*Istituto Sperimentale Italiano "Lazzaro Spallanzani" - Via per la Tamburina - Loc. "La Quercia", 26027 Rivolta d'Adda (CR)*
*katia.parati@istitutospallanzani.it*

## INTRODUZIONE

Le microalghe sono microrganismi fotosintetici unicellulari in grado di produrre composti di grande interesse applicativo in numerosi settori, tra i quali quello alimentare e mangimistico, tanto da considerare questi organismi delle "biofabbriche verdi". Tra i vari microrganismi, vi sono alcune specie che risultano particolarmente interessanti rispetto ad altre e pertanto, risulta estremamente interessante poterle distinguere. L'identificazione basata sulla morfologia non sempre risulta di facile applicazione poiché specie molto vicine filogeneticamente possono presentare tratti fenotipici uguali o difficilmente differenziabili. L'applicazione di tecniche molecolari può risolvere problemi tassonomici di identificazione di generi caratterizzati da un'elevata diversità di specie.



## SCOPO DEL LAVORO

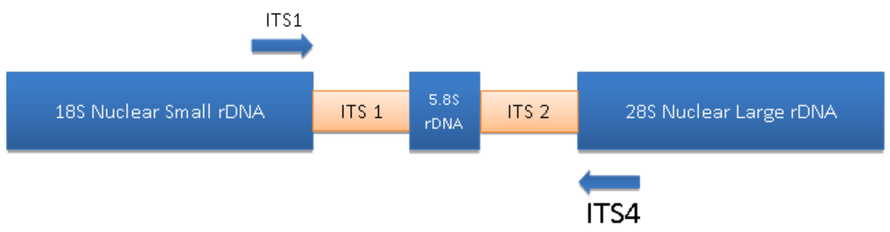
Messa a punto di un protocollo genetico per l'identificazione di alcune specie appartenenti ai generi *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Chlamydomonas* al fine di poterle distinguere all'interno di una coltura per verificarne la purezza.

## MATERIALI E METODI

Estrazione di DNA da colture pure delle seguenti specie algali:

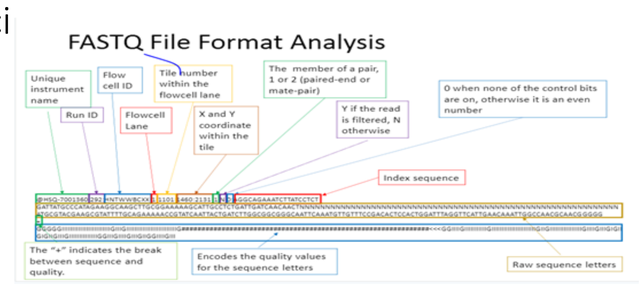
- *Chlorella vulgaris;*
- *Chlorella sorokiniana;*
- *Acutodesmus obliquus;*
- *Desmodesmus armatus;*
- *Scenedesmus acuminatus;*
- *Chlamydomonas debaryana.*

Caratterizzazione delle microalghe tramite analisi della sequenza della regione spaziatrice ITS (Internal Transcribed Spacer) su piattaforma Illumina MiSeq, tramite approccio basato sul sequenziamento dell'amplicone ITS1 e ITS4 con una profondità di lettura pari a 200.000 reads/campione, con reads da 300 pb.



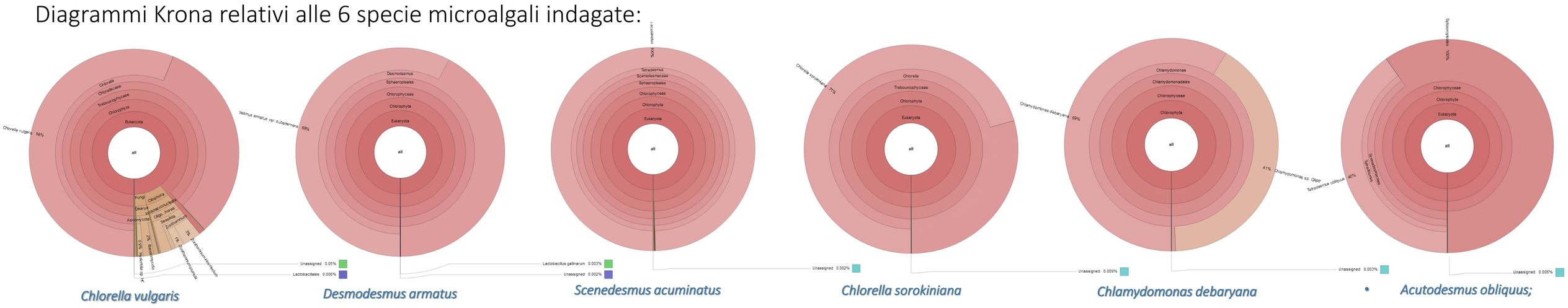

Analisi bioinformatica:

- Indicizzazione delle sequenze prodotte (lettura di frammenti di 2×300 bp ciascuno);
- Generazione di file FASTQ;
- Allineamento e classificazione diversi livelli tassonomici




## RISULTATI

Diagrammi Krona relativi alle 6 specie microalgali indagate:




| Nome | Seq. di riferimento (Accession number) | N° Varianti |
|---|---|---|
| *Chlorella vulgaris* | IFR865660.1 | 10 |
| *Desmodesmus armatus* | AB917135.1 | 4 |
| *Scenedesmus acuminatus* | JQ082312.1 | 9 |
| *Chlorella sorokiniana* | FM205834.1 | 14 |
| *Chlamydomonas debaryana* | KJ210856.1 | 6 |
| *Acutodesmus obliquus* | FR865721.1 | 28 (3 delezioni) |

Dei 71 SNP individuati, 5 sono stati scelti per sviluppare saggi in Real-Time PCR con chimica TaqMan MGB per studi di genotipizzazione finalizzati all'identificazione dei ceppi. Per ciascun saggio sono stati quindi disegnati una coppia di primer e le 2 sonde specifiche per la mutazione (VIC allele 1 e FAM allele 2). Tali saggi sono attualmente in fase di validazione

**RINGRAZIAMENTI:** progetto finanziato da Fondazione Cariplo (Microflower, Project Grant: 2014-0601)