

Ottimizzazione di un protocollo per la micropropagazione di varietà italiane di *Cannabis sativa* per uso medico.

Roberta Paris¹, Flavia Fulvio¹, Irma Terracciano¹, Anna Moschella¹, Andrea Villani², Ilaria Alberti², Cristina Baldin²
¹ CREA- Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture industriali, Bologna; ² CREA- Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture industriali, Rovigo



INTRODUZIONE

Il termine "Cannabis medicinale" fa riferimento all'impiego in medicina di infiorescenze femminili mature essicate di *C. sativa*, ricche di metaboliti bioattivi. Tra i cannabinoidi, biomolecole uniche del genere *Cannabis*, i principali composti sono il Δ⁹-tetraidrocannabinolo (Δ⁹-THC, con proprietà psicoattive) e il cannabidiolo (CBD), la cui proporzione definisce il chemiotipo della pianta. In Italia, la produzione di farmaci a base di *Cannabis* è iniziata nel 2016 presso un'officina farmaceutica (Stabilimento Chimico Farmaceutico Militare, Firenze) e prevede la coltivazione standardizzata di cloni vegetali derivati da piante madri e la lavorazione farmaceutica delle infiorescenze femminili. La commercializzazione avviene in preparazioni galeniche affidate ai farmacisti su prescrizione medica.

Sono disponibili due preparazioni, FM1 e FM2, a base di infiorescenze di due varietà italiane di Cannabis medicinale, CINBOL e CINRO, sviluppate presso il CREA-Centro di Ricerca per le Colture Cerealicole e Industriali (CREA-Cl) di Rovigo, dove vengono mantenute e propagate clonalmente per talea.

Nell'ambito della crescente necessità in Italia di farmaci a base di *Cannabis*, di implementare il panorama delle varietà attraverso attività di breeding e del mantenimento del germplesma esistente, presso il CREA-Cl di Bologna è stato ottimizzato un protocollo di micropropagazione di CINBOL e CINRO, relativo alle diverse fasi di propagazione in vitro.

MATERIALI E METODI

Materiale vegetale: varietà di *Cannabis medica* CINRO (chemiotipo II) e CINBOL (chemiotipo I).

Sterilizzazione: disinfezione previa immersione degli espianti (circa 5 cm) in una soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5% (p/v) e tensioattivo allo 0,1% (Tween 20) per 15 minuti con agitazione manuale intermittente, seguita da risciacquo in acqua distillata sterile [1].

Inizio della coltura: Terreno Murashige e Skoog a base di sali e vitamine (terreno MS), integrato con 3% di saccarosio e 500 mg/L di carbone attivo (pH 5,7);

Moltiplicazione: Terreno MS con diverse combinazioni di fitomoni: 0,5 μM TDZ; 2 μM Meta-Topolina [2].

Allungamento dei germogli: Terreno MS con 0,5 μM TDZ + 0,7 μM GA3 [3].

Induzione delle radici: terreno MS standard; MS con una concentrazione di sali e vitamine dimezzata, addizionato con IBA 2,5 μM.

Condizioni di coltivazione: 25°C con ciclo di 18 ore di luce/6 ore di buio, in luce fluorescente.

Acclimatazione: in tamponi di lana di roccia o in vasi con substrato di coltivazione a base di torba, compost, hummus e perlite.

Verifica del chemiotipo: analisi GC-FID di foglie giovani e infiorescenze mature; analisi molecolare tramite sistema di marcatori primer multiplex B1080/B1192 [4].

RISULTATI



1) Espianti di partenza: porzioni apicali di giovani germogli (5 cm circa) di piante madri in fase di crescita vegetativa.



2) Sterilizzazione: lavaggi in NaClO 0,5% e 0,1% Tween20 per circa 15 min in agitazione. Risciacqui con acqua sterile, in condizioni aseptiche.



3) Coltivazione e mantenimento degli espianti in terreno MS sterile con carbone attivo.



4) Moltiplicazione: Migliori risultati con TDZ 0,5 μM (8 germogli/espianto)



5) Allungamento dei germogli: terreno basale addizionato con 0,5 μM TDZ + 0,7 μM GA3.



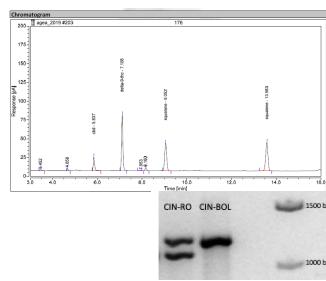
6) Radicazione su terreno basale



7) Acclimatazione ex-vitro su cubi sterili di lana di roccia



8) Acclimatazione in camera di crescita



9) Verifica del chemiotipo tramite GC-FID e PCR multiplex B1080/B1192



10) Mantenimento in camera di crescita per moltiplicazione e fornitura di talee a SCFM



11) Prodotti di utilizzo finale

CONCLUSIONI

La coltura *in vitro* permette di mantenere le piante madri di *Cannabis* medicinale, garantendo la sanità del materiale vegetale e permettendo, attraverso la micropropagazione, la clonazione rapida, in spazi ridotti e in modo indipendente dalla stagione. Il mantenimento delle piante madri viene fatto su terreno standard addizionato di carbone attivo. I miglior tasso di moltiplicazione è stato ottenuto effettuando con una sub-coltura di 2-3 settimane su terreno MS, addizionato con TDZ e GA3. La radicazione avviene sul terreno standard con percentuali superiori al 70%. Il chemiotipo delle due varietà è stato verificato mediante analisi GC-FID e marcatori molecolari in diverse fasi della micropropagazione e dell'acclimatazione.

Finanziato da: CAMED – *Cannabis medica* nazionale: innovazione e potenziamento della produzione di materiale vegetale di *Cannabis* terapeutica per il fabbisogno nazionale e ricerca per la costituzione di nuove varietà ad uso farmaceutico. Accordo di collaborazione ex art. 15 della Legge 241/90), MIPAAF-2021-0181330. (17/06/2021 - 16/06/2023)