

Approccio molecolare nelle indagini forensi su *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae)

GESUALDO SINISCALCO GIGLIANO, ALESSANDRA DI FINIZIO

Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Napoli "Federico II", Via Foria 223, 80139 Napoli, Italy.

Abstract. Authors report preliminary data on a molecular investigation carried out on five different accessions of *Cannabis sativa* L., originating from different geographic areas, plus one accession of *Humulus lupulus* L., which belongs to the only other genus of family Cannabaceae. ITS1 and ITS2 regions of the nuclear ribosomal DNA (rDNA) and the *trnL* intron of the chloroplast DNA (cpDNA) were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The results obtained show that the ITS1 length in the five different accessions of *Cannabis* and in *Humulus* is homogeneous (230 bp), whereas the ITS2 length is identical among the five *Cannabis* samples (220 bp) but different in *Humulus* (230 bp). Also the *trnL* intron is homogeneous in *Cannabis* (420 bp) and different in *Humulus* (520 bp).

Riassunto. Vengono riportati i dati preliminari di una indagine molecolare condotta su cinque ceppi di *Cannabis sativa* L. provenienti da diverse aree geografiche e su *Humulus lupulus* L. quale rappresentante dell'altro genere della famiglia delle Cannabaceae. Sono state amplificate, mediante reazione di polimerizzazione a catena (PCR), le regioni ITS1 ed ITS2 del DNA ribosomale (rDNA) e la regione intronica del *trnL* del DNA plastidiale (cpDNA). I risultati ottenuti hanno messo in evidenza omogeneità di lunghezza dell'ITS1 (230 bp) tra i cinque ceppi di *Cannabis* ed *Humulus*, mentre l'ITS2 è risultato omogeneo in *Cannabis* (220 bp) ma diverso da *Humulus* (230 bp). Anche l'introne del *trnL*, come l'ITS2, è risultato omogeneo in *Cannabis* (420 bp) ma diverso da *Humulus* (520 bp).

Key words: *Cannabis*, DNA, *Humulus*, ITS1, ITS2, *trnL* intron.

INTRODUZIONE

Cannabis sativa L. è una specie erbacea, dioica ed annuale, originaria probabilmente dell'oriente. Attualmente viene coltivata in molti paesi sia per la fibra sia come fonte di materiale stupefacente, il cui principio attivo è rappresentato dal tetraidrocannabinolo (THC) (HANEY & BAZZAZ, 1970).

Dalle colture di *C. sativa* sono state selezionate, per la fibra,

numerose forme che alcuni autori hanno ritenuto specie botaniche indicandole con epiteti specifici.

Tra i vari binomi attribuiti a queste forme, i più comuni sono: *C. chinensis* Delile, *C. erratica* Siev., *C. foetens* Gilib e *C. gigantea* Crevost. Il binomio più noto è senza dubbio *C. indica* Lam.

Per molti anni è stato utilizzato il binomio *C. sativa* per indicare ceppi di canapa coltivati per la fibra e quello di *C. indica* per indicare ceppi coltivati per la produzione di sostanza stupefacente.

Oggi, però, è universalmente accettato che *Cannabis* è un genere monospecifico e quindi tutti i binomi precedentemente citati sono da ritenersi sinonimi di *C. sativa* (SCHULTES, 1970). Inoltre è stato accertato che ogni cultivar è sempre più o meno ricca, oltre che di fibra tessile, anche di sostanza stupefacente.

Nonostante il lavoro di revisione di SCHULTES (1970), però, molti autori hanno mantenuto la distinzione tra *C. sativa* e *C. indica*; inoltre la legislazione attuale sulla disciplina delle sostanze stupefacenti e delle piante da cui si possono ricavare tali principi attivi, identifica la "canapa da droga" con il binomio *C. indica* vietandone la coltivazione.

Da quanto sopra esposto, risulta chiaramente come sia difficoltoso, nelle indagini forensi, procedere ad una corretta attribuzione botanica di piante di canapa, detenute per fini illeciti e sequestrate dalle autorità preposte ai controlli. Infatti, in base alla revisione botanica operata da SCHULTES (1970), tutte le piante di canapa sequestrate e sottoposte a perizia non dovrebbero ricadere nel divieto imposto dalla legge 685 del 22-12-75 poiché quest'ultima vieta la coltivazione di una specie citata come *C. indica*, per cui il perito incaricato dell'accertamento, rispondendo esclusivamente al quesito botanico, classificando il reperto come *C. sativa*, ne scagionerebbe il detentore "legalizzando", anche se indirettamente, coltivazioni impiantate per fini illeciti. In tali accertamenti è quindi utile procedere parallelamente anche ad una indagine fitochimica per la quantizzazione del principio attivo ad azione stupefacente (THC).

Infatti, in base alla tabella II del D.M. 186 del 12-7-90, il limite quantitativo massimo di foglie ed infiorescenze di "*C. indica*" detenibili (con THC al 2%) per le dosi medie giornaliere è di 2,5 grammi, corrispondenti a 50 mg di THC.

In letteratura esistono molti lavori di tipo fitochimico su

Cannabis, mentre non sono state mai condotte, se non marginalmente, ricerche di biologia molecolare. Questo campo di indagine, se notevolmente approfondito, potrà fornire utili elementi soprattutto nelle indagini forensi. Infatti il compito del perito incaricato delle indagini è spesso arduo poiché si ritrova a dover operare su materiale vegetale privo di elementi distintivi, già parzialmente trattato (essiccato o macerato) oppure addirittura su frammenti di foglie, non sempre in quantità sufficienti per una estrazione e dosaggio del principio attivo (THC). Dovendo operare in tali condizioni estreme, sarebbe più corretto ed inequivocabile una indagine molecolare.

La struttura molecolare dei geni codificanti per gli RNA ribosomali è stata largamente caratterizzata in un numero considerevole di specie eucariote. Nelle piante in cui sono stati studiati sono presenti, all'interno del nucleo, da poche centinaia ad oltre 10.000 copie di rDNA disposte sul cromosoma come unità ripetute in tandem (APPELS & HONEYCUT, 1986). Ciascuna unità completa può variare da 8 a 12 Kb e consiste di una regione non codificante detta IGS (Inter Genic Spacer) di lunghezza variabile e di una regione codificante costituita dai geni per gli RNA ribosomali 18S, 5.8S e 25S. La regione che codifica per l'rRNA 5.8S è fiancheggiata, ad entrambi i lati, da due piccole sequenze trascritte (Internal Transcribed Sequences) denominate ITS1 ed ITS2.

Le sequenze codificanti della famiglia dei geni ribosomali sono piuttosto conservate mentre, la regione corrispondente all'IGS è altamente variabile sia in sequenza che in lunghezza. Le variazioni di lunghezza di tale regione derivano generalmente da cambiamenti nel numero di copie di piccole sub-ripetizioni che si susseguono in tandem e si ritrovano anche a livello intraspecifico.

Il pattern di eredità e la struttura molecolare dei geni ribosomali li rende particolarmente adatti sia a studi molecolari, sia alla costruzione di relazioni filogenetiche tra gli organismi (ZIMMER et al., 1988; D'OVIDIO et al., 1990; 1991; KIM & JANSEN, 1994).

Oltre allo studio dell'ITS1 ed ITS2, anche una indagine della regione intronica del *trnL* (UAA) del DNA plastidiale (cpDNA) si è rivelata molto utile per stabilire, in una preliminare indagine,

relazioni tassonomiche a livello intergenerico ed intragenerico. Infatti, delezioni o inserzioni sembrano ricorrere con minor frequenza nelle regioni introniche rispetto agli spaziatori intergenici (KUHSEL et al., 1990; TABERLET et al., 1991).

In Fig. 1 e Fig. 2 sono riportati, rispettivamente, uno schema di organizzazione dei geni ribosomali e dell'introne del *trnL*.

In precedenti ricerche (SINISCALCO GIGLIANO, 1984; BALDUZZI & SINISCALCO GIGLIANO, 1985) è stato condotto uno studio su *C. sativa* al fine di chiarire alcuni aspetti di ordine sia legale che fitochimico. Nel presente lavoro vengono riportati i dati preliminari di uno studio molecolare condotto su alcuni ceppi di *C. sativa* nonché su *Humulus lupulus* L., che rappresenta l'altro genere della famiglia delle Cannabaceae.

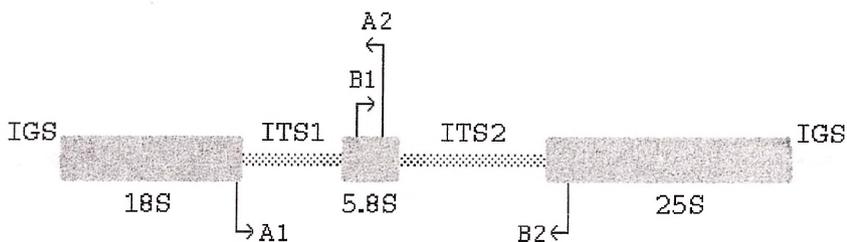


Fig. 1 - Schema di organizzazione dei geni ribosomali. A1-A2 e B1-B2 indicano le regioni di appaiamento dei primer per amplificare rispettivamente l'ITS1 e l'ITS2.

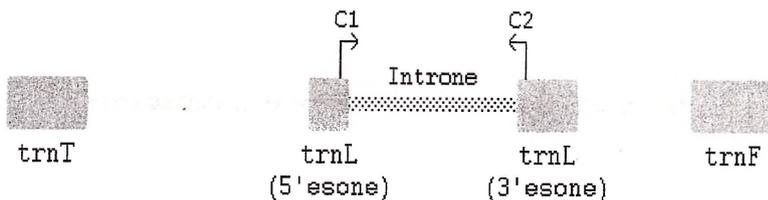


Fig. 2 - Schema di organizzazione della regione intronica del *trnL*. C1 e C2 indicano le regioni di appaiamento dei primer per amplificare l'introne del *trnL*.

MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati esemplari di *Cannabis* (5 ceppi) provenienti da diverse aree geografiche ed *Humulus lupulus*, che rappresenta l'altro genere della famiglia delle Cannabaceae.

I ceppi di *Cannabis*, provenienti da diverse aree geografiche, sono stati ottenuti da seme e coltivati nell'Orto Botanico di Napoli.

La lista dei campioni utilizzati è riportata in Tab. 1.

Tab. 1 - Lista degli esemplari di *Cannabis* ed *Humulus* utilizzati.

Taxa	Numero di accesso*	Origine geografica
<i>Cannabis sativa</i> var. <i>indica</i>	CJBN 716/85	Francia
<i>Cannabis indica</i>	CPRO-dlo 883271	Afganistan
<i>Cannabis</i>	CPRO-dlo 891191	Nepal
<i>Cannabis</i>	SS 241	Paesi Bassi
<i>Cannabis sativa</i>	OBN 0148-F	Italia
<i>Humulus lupulus</i>	OBN 2801-F	Italia

*CJBN = Conservatoire et Jardins Botaniques de Nancy, Francia. CPRO-dl = Centre for Plant Breeding and Reproduction Research, Wageningen, The Netherlands. SS = Sensi Seeds, Rotterdam, The Netherlands. OBN = Orto Botanico, Università di Napoli, Italia.

Estrazione del DNA

Il DNA totale è stato estratto utilizzando il protocollo di CAPUTO et al., (1991) opportunamente modificato. Le condizioni sono state ottimizzate mettendo a punto un metodo per estrazioni anche da frammenti di foglie.

Le foglie fresche (0,05 - 1 g) o secche (0,1 - 1) sono state pestate in mortaio con azoto liquido. Il materiale polverizzato è stato trasferito in microprovette da 1,5 ml. Immediatamente dopo l'evaporazione dell'azoto, sono stati aggiunti al tessuto polverizzato 800 µl del tampone di estrazione [50mM Tris-HCl pH 8; 20mM EDTA pH 8; 0,2% albumina di siero bovino (BSA); 1% polivinilpirrolidone (PVP); 0,1% β-mercaptoetanol]. Le cellule sono state poi lisate per 15 min a 67 °C mediante aggiunta, al tampone di estrazione, di sodio dodecil solfato (SDS) e sodio N-lauroilsarcosinato, entrambi alla concentrazione finale del 2%.

Dopo la lisi i campioni venivano raffreddati in ghiaccio e si precipitavano le proteine con aggiunta di 0,3 vol di potassio acetato 5M. Successivamente venivano tenuti in ghiaccio per 20 min e poi centrifugati a 14.000 x g per 20 min a 4 °C.

Il sovranatante veniva estratto due o tre volte con una miscela di cloroformio-alcool isoamilico (24:1) ed il DNA precipitato mediante aggiunta di 2 volumi di etanolo e 0,1 volumi di sodio acetato 3M.

I campioni venivano velocemente raffreddati a -80 °C e successivamente centrifugati per 15 min alle stesse condizioni precedenti.

Il pellet ottenuto veniva risospeso in circa 500 µl di acqua bidistillata. Il DNA veniva riprecipitato con 1/9 del volume di NaCl 5M ed ugual volume di glicol polietilenico 20% (PEG-8000). I campioni venivano, quindi, congelati in azoto liquido e tenuti a -80 °C per 30 min. Infine il DNA precipitato veniva raccolto centrifugando a 14.000 x g per 15 min a 4 °C, lavato con etanolo 70%, asciugato all'aria e risospeso in acqua bidistillata.

Amplificazione del DNA

ITS1, ITS2 ed introne del *trnL* sono stati amplificati mediante reazione di polimerizzazione a catena (PCR) utilizzando un apparecchio thermal cycler Cetus 9600 (Perkin Elmer). Ciascuna reazione è stata condotta per 30 cicli.

La miscela per le reazioni di PCR (volume finale 100 μ l) era così formata: 2-10 ng di DNA; 10 μ l di tampone (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9, 1% Triton X-100, 25 mM MgCl₂); 1 μ l di primer (0,25 μ M); 0,2 mM di ciascuno dei quattro dNTP; 2,5 unità di *Taq* polimerasi.

Le condizioni iniziali furono: 1 min di denaturazione a 94 °C; 1 min di appaiamento dei primer a 55 °C; 45 sec di estensione a 72 °C.

I campioni furono denaturati per 5 min a 94 °C prima dell'inizio del primo ciclo; il tempo di estensione veniva incrementato di 3 sec/ciclo e prolungato per 7 min alla fine dell'ultimo ciclo.

L'ITS1 è stato amplificato utilizzando i due seguenti primer: il primo (A1) si appaia con la regione finale della subunità 18S (5'-GGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCG-3'); il secondo (A2) si appaia con la regione iniziale della subunità 5.8S (5'-ATCCTGCAATTCACACCAAGTATCG-3') (Fig. 1).

L'ITS2 è stato amplificato utilizzando i due seguenti primer: il primo (B1) si appaia con la regione finale della subunità 5.8S (5'-TTGCAGAATCCCGTGAACCATCG-3'); il secondo (B2) si appaia con la regione iniziale della subunità 25S (5'-CCAAACAACCCGACTCGTAGACAGC-3') (Fig. 1).

L'introne del *trnL* è stato amplificato utilizzando i due seguenti primer:

il primo (C1) si appaia con la regione finale del *trnL* 5'esone (5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3');

il secondo (C2) si appaia con la regione iniziale del *trnL* 3'esone (5'-GGGGATAGAGGACTTGAAC-3') (Fig. 2).

Elettroforesi su gel di agarosio

I prodotti di amplificazione di ciascun campione furono caricati su un gel di agarosio al 2% (Boehringer type MP) preparato in TEB 1X (0,09 M Tris-borato, 0,002 M EDTA pH 8) contenente bromuro di etidio (50 ng/ml) e sottoposti ad elettroforesi a 9 V/cm. Sul gel fu anche caricato un marker da 100 bp (Promega) utilizzato per stimare la grandezza dei frammenti amplificati.

I frammenti di DNA amplificati furono visualizzati utilizzando un transilluminatore a luce UV (254 nm) e fotografati con pellicole Polaroid 667.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I frammenti di DNA amplificati mediante PCR sono di seguito riportati in Fig. 3, Fig. 4 e Fig. 5. La lunghezza di ciascun frammento ottenuto è stata stimata calibrando il gel.

La Fig. 3 mostra i frammenti ITS1 di luppolo e dei cinque ceppi di canapa che risultano omogenei tra loro essendo tutti lunghi circa 360 bp.

In Fig. 4 si osserva omogeneità di lunghezza di tutti i frammenti ITS2 dei cinque ceppi di canapa esaminati (circa 600 bp) che risultano, invece, diversi da luppolo mostrando quest'ultimo una maggiore lunghezza (circa 620 bp).

La Fig. 5, invece, evidenzia i frammenti relativi all'introne del *trnL* che, come per l'ITS2, sono omogenei tra loro in canapa (circa 490 bp) ma diversi da luppolo che risulta di circa 590 bp.

Poiché sono stati utilizzati dei primer esterni alla regione da amplificare, risulta che il prodotto di amplificazione dell'ITS1 comprende anche una piccola regione terminale (50 bp) della subunità 18S ed una iniziale (85 bp) di quella 5.8S (rispettivamente a monte ed a valle). L'ITS2 comprende, a monte, la parte terminale (88 bp) della subunità 5.8S ed a valle la parte iniziale (279 bp) del 25S (Fig. 1).

L'introne del *trnL*, invece, è incluso tra la regione terminale del *trnL* 5'esone (25 bp) e la porzione iniziale (49 bp) del *trnL* 3'esone (Fig. 2).

Giacchè le regioni 18S, 5.8S, 25S ed introne *trnL* sono sequenze molto conservate e note in letteratura, sono state consultate mediante accesso ad un database (GENBANK) ed allineate con le sequenze dei primer utilizzati. Ciò ha permesso di sottrarre da ciascuna regione amplificata i frammenti a monte ed a valle, che non ne fanno parte, ottenendo la reale lunghezza dell'ITS1, ITS2 ed introne *trnL*. I valori ottenuti sono riportati in Tab. 2.

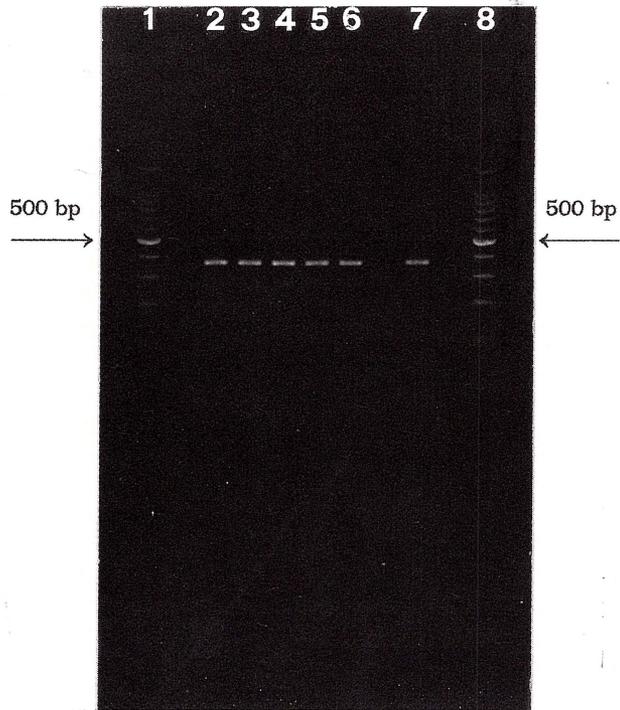


Fig. 3 - ITS1 di *Cannabis* ed *Humulus* amplificati mediante PCR.
Da 2 a 6, *Cannabis*; 7, *Humulus*; 1 e 8, DNA marker da 100 bp.

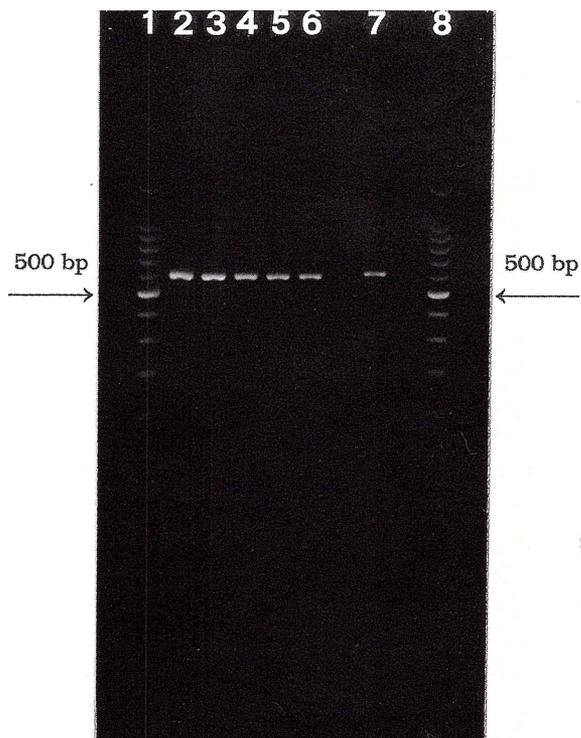


Fig. 4 - ITS2 di *Cannabis* ed *Humulus* amplificati mediante PCR.
Da 2 a 6, *Cannabis*; 7, *Humulus*; 1 e 8, DNA marker da 100 bp.

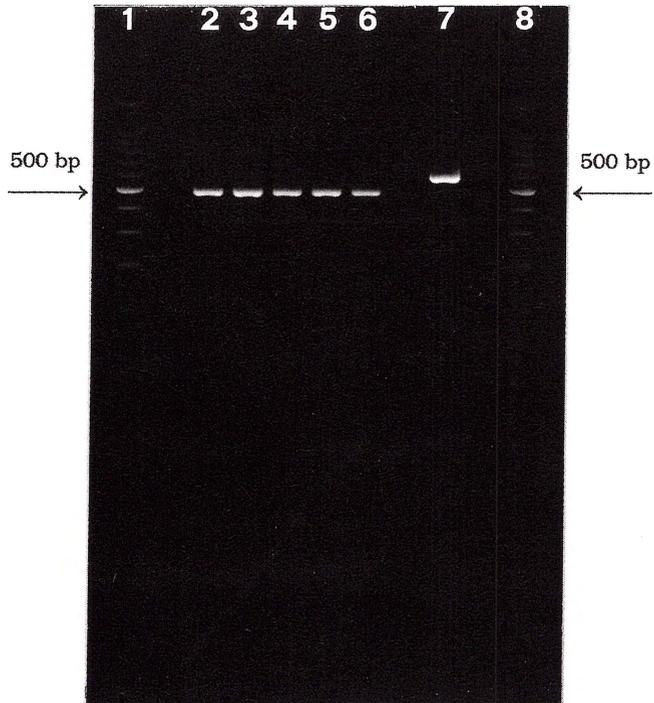


Fig. 5 - Introne del *trnL* di *Cannabis* ed *Humulus* amplificati mediante PCR.
Da 2 a 6, *Cannabis*; 7, *Humulus*; 1 e 8, DNA marker da 100 bp.

Tab. 2 - Lunghezze effettive dell'ITS1, ITS2 ed introne del *trnL*.

Taxa	Origine geografica	ITS1 (bp)	ITS2 (bp)	Introne <i>trnL</i> (bp)
<i>Cannabis sativa</i> var. <i>indica</i>	Francia	230	220	420
<i>Cannabis indica</i>	Afganistan	230	220	420
<i>Cannabis</i>	Nepal	230	220	420
<i>Cannabis</i>	Paesi Bassi	230	220	420
<i>Cannabis sativa</i>	Italia	230	220	420
<i>Humulus lupulus</i>	Italia	230	230	520

I dati ottenuti mostrano omogeneità di lunghezza per i frammenti ITS1, ITS2 ed introne *trnL* per tutti i cinque ceppi di canapa esaminati.

In questa indagine preliminare sul possibile utilizzo di tali regioni geniche per un approccio molecolare nelle indagini forensi su piante di canapa sottoposte a perizia, sono stati anche esaminati dei campioni trattati in modo da alterarne sia le caratteristiche botaniche sia lo stato di conservazione. Infatti, tali campioni sono stati frammentati, essiccati e chiusi in contenitori di plastica per un periodo di circa due mesi. Da tutti i campioni, in vario modo trattati, è stato possibile estrarre il DNA ed amplificare l'ITS1, ITS2 ed introne del *trnL*.

I dati preliminari ottenuti mostrano che le regioni geniche esaminate, se ulteriormente indagate, possono essere di grande aiuto nelle indagini forensi. A tale riguardo, abbiamo già in corso ricerche sullo studio dei polimorfismi di restrizione (RFLPs) e la determinazione della sequenza di tali regioni, nella speranza di fornire uno strumento di indagine per poter classificare in modo inequivocabile come *C. sativa* un campione sconosciuto non identificabile né dal punto di vista botanico per mancanza di caratteri distintivi, né tantomeno per via fitochimica poiché i cannabinoli, specialmente se i reperti hanno subito dei

trattamenti, sono soggetti a fenomeni di ossidazione con conseguente alterazione del principio attivo (THC).

BIBLIOGRAFIA

- APPELS R. & HONEYCUT R. L. 1986. rDNA: evolution over a billion years. In: DUTTA S.K. (Ed.). DNA systematics, Vol. II. Plants CRC Press, Boca Raton, FL., p. 81-135.
- BALDUZZI A. & SINISCALCO GIGLIANO G. 1985. Influenza dell'intensità luminosa sull'accumulo di cannabinoli in *Cannabis sativa* L. Atti Ist. Bot. e Lab. Critt., 4: 89-92.
- CAPUTO P., STEVENSON D. W. & WURIZEL E. T. 1991. A phylogenetic analysis of American Zamiaceae (Cycadales) using chloroplast DNA restriction fragment length polymorphisms. Brittonia, 73: 135-145.
- D'OVIDIO R., SCARASCIA MUGNOZZA G. & TANZARELLA O. A. 1990. Ribosomal RNA genes structure in some *Populus* spp. (Salicaceae) and their hybrids. Plant Syst. Evol., 173: 187-196.
- D'OVIDIO R., SCARASCIA MUGNOZZA G. & TANZARELLA O. A. 1991. rDNA cloning and rapid hybrid identification in *Populus* spp. (Salicaceae). Plant Syst. Evol., 177: 165-174.
- HANEY A. & BAZZAZ F. A. 1970. Some ecological implications of the distribution of hemp (*Cannabis sativa* L.) in the United States of America. In: JOYLE C.R.B. & CURRY S.H. (Eds.). The botany and chemistry of *Cannabis*. Churchill, London, p. 39-48.
- KIM K. J. & JANSEN R. K. 1994. Comparisons of phylogenetic hypotheses among different data sets in dwarf Dandelions (*Krigia*, Asteraceae): additional information from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. Plant Syst. Evol., 190: 157-185.
- KUHSEL M. G., STRICKLAND R. & PALMER J. D. 1990. An ancient group intron shared by Eubacteria and chloroplasts. Science, 250: 1570-1573.
- SCHULTES R. E. 1970. Random thoughts and queries on the botany of *Cannabis*. In: JOYLE C.R.B. & CURRY S.H. (Eds.). The botany and chemistry of *Cannabis*. Churchill, London, p. 11-38.

- SINISCALCO GIGLIANO G. 1984. I cannabinoli in *Cannabis sativa* L. a diverse condizioni colturali. Boll. Chim. Farm., 123: 352-356.
- TABERLET P., GIELLY L., PAUTOU G. & BOUVET J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Mol. Biol., 17: 1105-1109.
- ZIMMER E. A., JUPE E. R. & WALBOT V. 1988. Ribosomal genes structure, variation and inheritance in maize and its ancestors. Genetics, 120: 1125-1136.

Finito di stampare nel settembre 1997.