

RELAZIONE DEL 1° ANNO 2006/2007

PROGETTO FISR:

LAVORAZIONI ANCONA (18.10.2006, 18.06.07) e SARDEGNA (02.05.2007)

GRUPPO DR. PIETRAMELLARA
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE –
DIP. SCIENZA DEL SUOLO E NUTRIZIONE DELLA PIANTA
PIAZZALE DELLE CASCINE 28
TEL. 055 3288230

La prima fase del progetto ha previsto la messa a punto di un approccio molecolare per lo *screening* della microflora eubatterica nei vari suoli per valutare l'effetto di lavorazione e/o concimazione (ANCONA) e l'effetto della tipologia / copertura vegetale (SARDEGNA) di suolo sulla microflora a livello di comunità batteriche.

L'approccio molecolare elaborato a tale scopo era quello del 16S rDNA-PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gelectrophoresis) *fingerprinting* applicato su DNA totale direttamente estratto dal suolo.

MATERIALI E METODI

a) SITI DI CAMPIONAMENTO

Nel primo anno del progetto FISR (2006/2007) sono stati analizzati i seguenti campioni:

1) ANCONA (Agugliano) (Fig. 1):

a) 1° campionamento, 18.10.2006 (parte A: campo coltivato con frumento):

- Suolo lavorazione tradizionale T (ARATO)
- Suolo lavorazione diretta S (SODO)
- Suolo concimato (1; 90 unità azoto/ettaro)
- Suolo non concimato (0; 0 unità azoto/ettaro)

b) 2° campionamento, 18.06.2007 (parte A: campo coltivato con mais, e parte B: campo coltivato con frumento):

- Suolo lavorazione tradizionale T (ARATO)
- Suolo lavorazione diretta S (SODO)
- Suolo concimato (1; 90 unità azoto/ettaro)
- Suolo non concimato (0; 0 unità azoto/ettaro)

2) SARDEGNA: 1° campionamento, 02.05.07:

- Vigneto inerbito (VI)
- Sughereta (SU)
- Erbaio (ER)
- Pascolo (PA)
- Vigneto lavorato (VL)

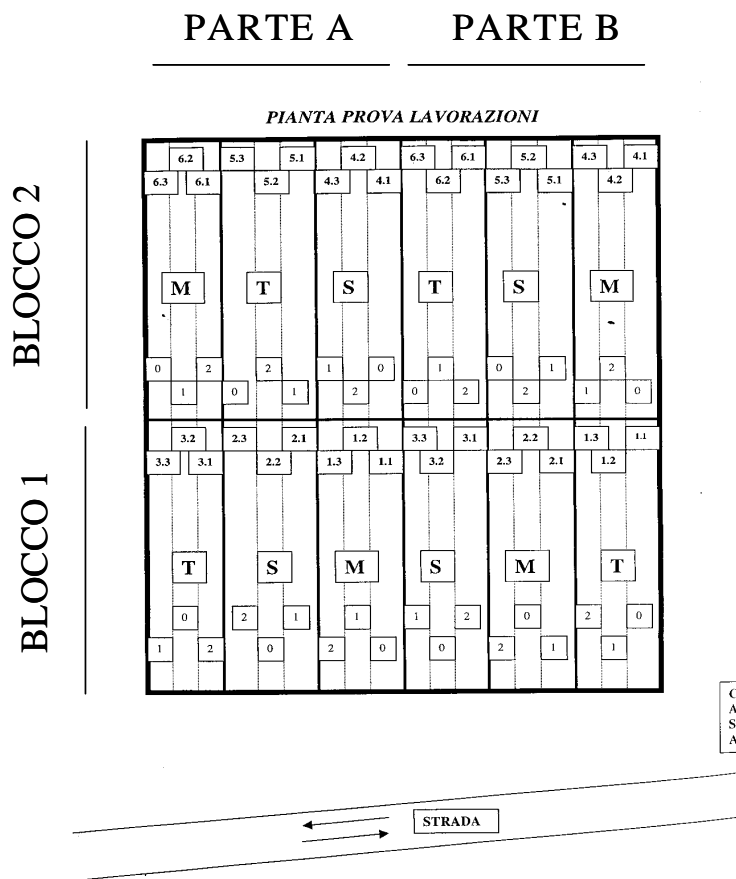


Fig. 1. Pianta lavorazioni del campo di Ancona (Abugliano)

b) ESTRAZIONE DIRETTA DI DNA TOTALE DAL SUOLO

Il primo *step* dell'approccio molecolare prevedeva l'estrazione diretta del DNA totale dal suolo basatosi sulla lisi meccanica-chimica mediante *Fast DNA[®] Kit for soil* (BIO101, Inc.) da 500 mg (peso secco, vagliato a 2 mm) di suolo bulk (primi 15 cm) di tutti i campioni (Ancona 18.10.06: 5 repliche per trattamento (due per il blocco 1 e tre per il blocco 2); Ancona 18.06.07: 6 repliche per trattamento (tre per ciascun blocco); Sardegna 02.05.07: 5 repliche per tipologia di campo. L'estrazione è stata effettuata in doppio.

c) ANALISI QUALITATIVE E QUANTITATIVE DI DNA

Il DNA totale è stato caratterizzato qualitativamente in termini di peso molecolare e distribuzione dei frammenti di DNA su gel d'agarosio, e quantitativamente in termini di rese di DNA totale (totDNA) espresse in $\mu\text{g totDNA g}^{-1}$ suolo, mediante tecniche di gel elettroforetiche e fluorimetriche, rispettivamente. Le analisi sono state effettuate in doppio.

d) 16S rDNA-PCR-DGGE PER LO STUDIO DELLE COMUNITA' EUBATTERICHE

Per monitorare la composizione delle comunità batteriche nei campioni di suolo analizzati, è stato applicato il DGGE - *fingerprinting genetico*, basato sul 16S rDNA con *primers* universali, specifici per gli eubatteri (GC 968f/1401r; Felske et al., 1997), generando ampliconi da 473 bp contenenti una sequenza di GC (40mer; GC clamp) per la DGGE. Gli ampliconi, i prodotti di PCR, sono stati verificati su gel d'agarosio (TAE 1x; 0,8%) dopo una corsa elettroforetica a 100 V per 80 min., paragonandoli con frammenti di DNA a peso molecolare noto (DNA Marker; DNA Mass Ladder Mix, Fermentas, 10 kb-80 bp). La 16S rDNA-DGGE è stata eseguita su 100 ng di amplificati (GC 968f/1401r) mediante DCode System (Universal Mutation Detection System, Biorad). I campioni di DNA sono stati trattati con un colorante (loading dye, 2x; Biorad), costituito da blu di bromofenolo (BBF) e xilene cianolo e caricati su gel di poliacrilamide al 6% (Acrylamide/Bisacrylamide, 40%, 37.5:1, Biorad) con un gradiente denaturante di 46-56% parallelo alla direzione dell'elettroforesi formato da urea e formamide; un denaturante al 100 % contiene urea, 7 M e formamide al 40%. La durata della corsa elettroforetica è stata di 16 ore ad un voltaggio costante di 70 V ed una temperatura costante di 60°C in tampone TAE 1x. Al termine della corsa, il gel è stato colorato con SybrGreen I (diluito 1:10 000 con TAE 1x; Nucleic acid gel stain; FMC Bio Products, Rockland, ME USA) per 2 ore al buio. Il DGGE fingerprint è stato rivelato e fotografato (Polaroid Gel Cam,

Elect; Polaroid Type 667 Film ISO 3000; e con Gel Imaging System - GelDoc System, Biorad) su UV – transilluminatore.

e) ANALISI STATISTICA DEI PROFILI ELETTROFORETICI

Il DGGE fingerprint è stato analizzato mediante Software Quantity One® SW (Biorad).

Le similarità tra comunità eubatteriche di campioni diversi possono essere determinate calcolando i coefficienti di similarità (Sørensen, 1948; Nakatsu et al., 2000) che si basano sul numero di bande in comune tra due campioni; due bande si considerano uguali quando mostrano le stesse caratteristiche elettroforetiche nel gel di poliacrilamide (Nakatsu et al., 2000). Per procedere al calcolo del coefficiente di similarità si conta il numero delle bande per ogni gel. Poi si confrontano gel di due diversi campioni considerando il numero di bande in comune (a), quelle presenti soltanto nel gel 1 (b) e quelle presenti solamente nel gel 2 (c). Come indice di similarità è stato scelto quello di Dice: $2a / 2a + b + c$. Le foto dei profili dei gel di ogni DGGE, sono state analizzate con il programma Quantity One® SW (Biorad) che permette di effettuare un'analisi statistica dei gel, consentendo di valutare le differenze tra i vari profili elettroforetici con formazione di un dendrogramma che tiene conto della similarità tra i diversi campioni. È stato in particolare usato l'UPGMA (Unweighted Pair Group Method Analysis), nella CLUSTER ANALYSIS, con opzione del programma che consente di valutare non solo la posizione delle bande nel gel, ma anche la loro intensità, ambedue usate come parametro per creare i cluster. Da un punto di vista concettuale il funzionamento del programma è basato sulle diverse sequenze: considerando n il loro numero, d_{ij} sono le distanze tra i e j raggruppate in grappoli. Un grappolo (cluster) contiene un certo numero di punti e la distanza tra due grappoli si definisce come la media delle distanze dei punti dei due grappoli. Cioè per due clusters A e B la distanza è data da:

$$D_{AB} = 1 / |A| |B| \cdot \sum_{i \in A, j \in B} d_{ij}$$

All'inizio abbiamo n clusters, ognuno costituito da un punto; il programma individua i due clusters più vicini (A e B) e quindi raggruppa A e B in un nuovo grappolo che quindi contiene A e B; quindi viene calcolata la distanza tra il nuovo cluster e gli altri clusters ed infine la procedura termina quando si rimane con un solo cluster. Si tratta quindi di un semplice algoritmo che valuta da un insieme di numeri le distanze tra tutti gli elementi del campione, ottenendo così un secondo insieme di numeri che può essere visualizzato usando un grafico a pettine (dendrogramma). L'aspetto positivo del dendrogramma è la sua semplice lettura ed interpretazione; infatti questo grafico è di

semplice leggibilità e permette di valutare visivamente il grado di similarità tra gruppi comunque selezionati secondo criteri di raggruppamento coerenti. Il grado di affinità delle repliche delle comunità batteriche dei profili di gel DGGE è determinato da un modello di regressione logica che oscilla dal 95% al 100%, ciò significa che il limite di tolleranza è pari al 5%. Le repliche che risultano essere < 95% sono da considerarsi diverse.

RISULTATI

a) ANALISI QUALITATIVE E QUANTITATIVE DI DNA

Il DNA direttamente estratto dai vari campioni di suolo si presenta con elevato peso molecolare (superiore a 10.000 bp) (**Fig. 2, 3**)

Per quanto riguarda i campioni di Ancona (18.10.06) le quantità (n = 2, repliche di estrazione) vanno da 4 ($\pm 0,9$) a 3 ($\pm 0,9$) $\mu\text{g g}^{-1}$ e da 4 ($\pm 1,42$) a 2,86 ($\pm 0,87$) $\mu\text{g g}^{-1}$ per i campioni SODO 0 e 90 rispettivamente, e da 3,45 ($\pm 1,37$) a 2,3 ($\pm 0,6$) $\mu\text{g g}^{-1}$ e da 3 ($\pm 0,7$) a 2 ($\pm 0,97$) $\mu\text{g g}^{-1}$ per i campioni ARATO 0 e 90 rispettivamente (**Fig. 4**). Tali valori come mostrato anche in fig. rivelano una differenza minima fra le quantità di DNA totale estratto dai campioni con e senza concimazione e una differenza maggiore tra i campioni a diversa lavorazione SODO e ARATO.

Per i campioni della Sardegna (02.05.07), le quantità medie di DNA (n=10, 5 repliche di campo in doppio) sono 5,4 ($\pm 0,87$), 9,7 (± 3), 7 ($\pm 1,7$), 5 ($\pm 0,7$), 4,5 (± 1) $\mu\text{g g}^{-1}$ per le tipologie di campo VI, SU, PA, ER, VL, rispettivamente (**Fig. 5**). Si nota come le quantità maggiori di DNA totale estratto si ha per Pascolo e Sughereta, la media va diminuendo per Vigneto Inerbito, Erbaio, Vigneto Lavorato.

Per i campioni di Ancona è stato già effettuato il secondo campionamento (18.06.07), le analisi su tali campioni sono in corso.

Il DNA totale estratto da tutti i suoli risulta sufficientemente puro per essere amplificato mediante PCR, come è possibile notare in **Fig. 6**, dove è riportato rappresentativamente per tutti i campioni l'aplicazione via PCR riguardante i campioni di Ancona (18.10.06).

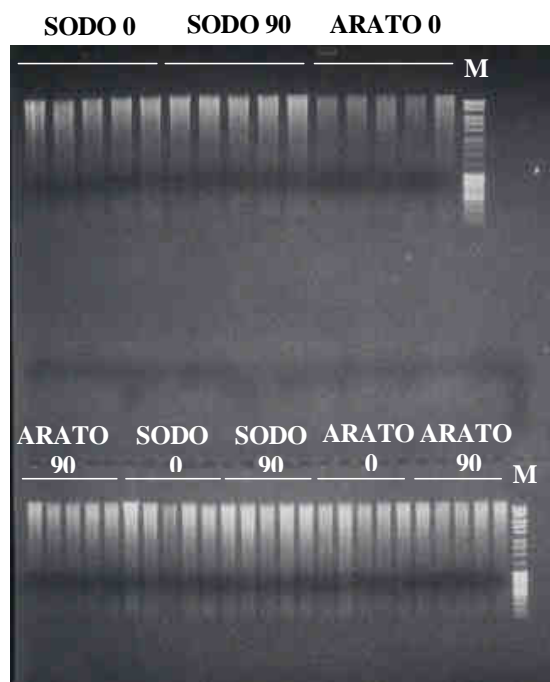


Fig. 2. DNA totale estratto dai campioni di suolo (5 repliche, in doppio) per ogni tipo di trattamento (sodo 0, 90, arato 0, 90) di Ancona (18.10.06). Il volume di DNA caricato su gel 0.8% agarosio è stato di 5 μ l con 1 μ l di BBF (6X). L'elettroforesi è stata condotta a 120 V per 50 minuti. M: MassRulerTM DNA Ladder, Mix (10kb-80 bp).

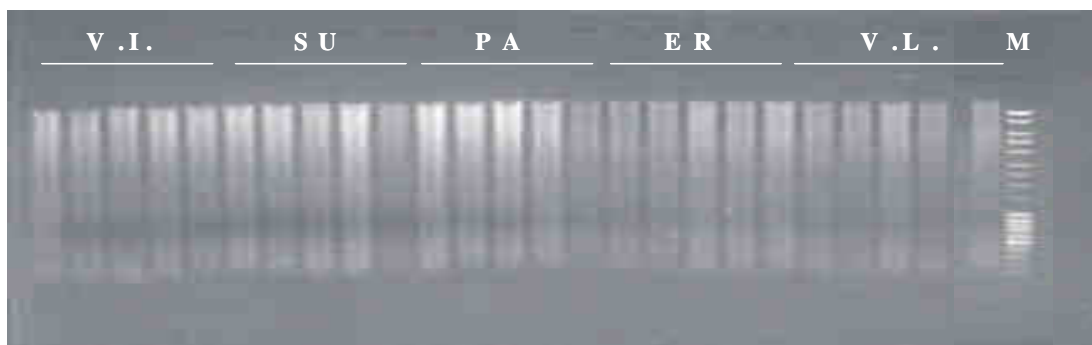


Fig. 3. DNA totale estratto dai campioni di suolo (cinque repliche) delle varie tipologie di campo (Vigneto Inerbito (VI), Sughereta (SU), Pascolo (PA), Erbaio (ER), Vigneto Lavorato (VL)) della Sardegna (02.05.07). Il volume di DNA caricato su gel 0.8% agarosio è stato di 5 μ l con 1 μ l di BBF (6X). L'elettroforesi è stata condotta a 120 V per 50 minuti. M: MassRulerTM DNA Ladder, Mix (10kb-80 bp)

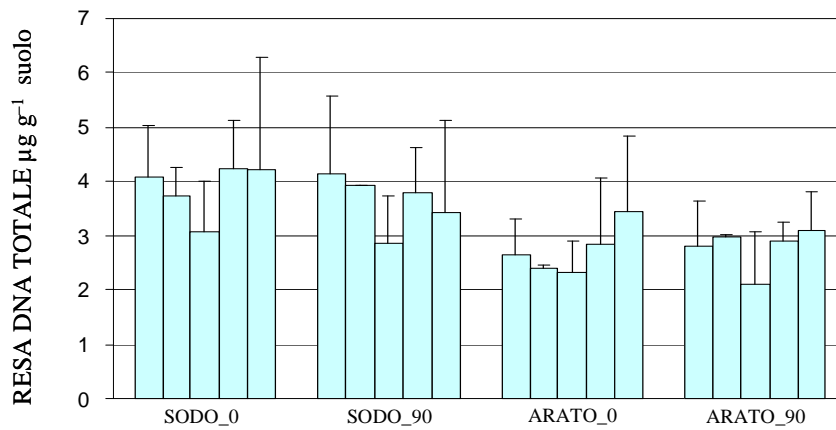


Fig. 4. Rese ($\mu\text{g g}^{-1}$ suolo) di DNA totale estratto dai campioni di suolo di Ancona (18.10.2006) in esame.

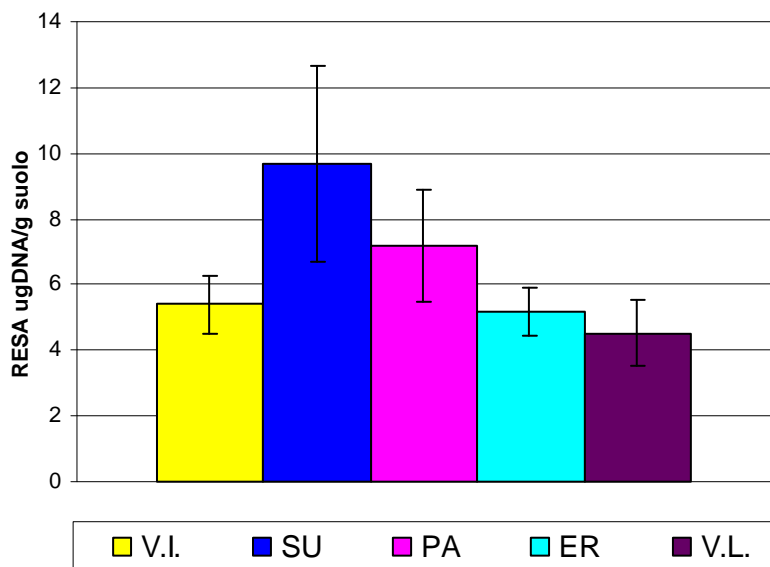


Fig. 5. Rese medie ($\mu\text{g g}^{-1}$ suolo) di DNA totale estratto dai campioni di suolo della Sardegna (02.05.2007): Vigneto Inerbito (VI), Sughereta (SU), Pascolo (PA), Erbaio (ER), Vigneto Lavorato (VL).



Fig. 6. DNA totale estratto dai campioni in esame di Ancona (18.10.06) amplificato mediante 16S rDNA-PCR (5 repliche). Il volume di DNA caricato su gel 0.8% agarosio è stato di 10 μl con 1 μl di BBF (6X). L'elettroforesi è stata condotta a 120 V per 50 minuti. M: MassRuler™ DNA Ladder, Mix (10kb-80 bp).

b) 16S rDNA-PCR-DGGE PER LO STUDIO DELLE COMUNITA' EUBATTERICHE

Il DGGE fingerprinting (16S rDNA-DGGE) delle comunità eubatteriche ha generato patterns complessi e caratteristici per ogni suolo oggetto di studio

Il primo *screening* della microflora batterica per i suoli di Ancona (18.10.06), a livello di comunità, non ha rivelato grandi differenze nella composizione delle comunità attribuibili alla concimazione o alla lavorazione del suolo. Nonostante *fingerprint* simili per tutti i suoli analizzati, il suolo non lavorato ma concimato (SODO 90) ha mostrato dei DGGE *pattern* più ricchi, cioè un numero di popolazioni dominanti maggiore rispetto al suolo non lavorato e non concimato (SODO 0) e rispetto ai suoli lavorati con e senza concimazione (ARATO 90, ARATO 0) (**Fig. 7**).

Lo *screening* delle comunità eubatteriche per i suoli della Sardegna (02.05.07), ha rivelato una microflora batterica specifica per ogni tipologia di campo (Vigneto Inerbato (VI), Sughereta (SU), Pascolo (PA), Erbaio (ER), Vigneto Lavorato (VL)) (**Fig. 8**) probabilmente attribuibile all'effetto selettivo della copertura vegetale. Il fingerprinting ha inoltre evidenziato l'eterogeneità della microflora fra i vari punti (cinque) campionati all'interno di ogni tipologia di campo, fenomeno noto e ampiamente documentato in letteratura, attribuibile all'eterogeneità del suolo.

Per approfondire le similarità genetiche fra comunità batteriche sia all'interno di ogni campo sia tra di loro, sono attualmente in corso analisi statistiche dei DGGE fingerprints, mediante software Quantity One (BioRad), applicando l'UPGMA basato sull'indice di similarità Dice. Tale analisi è stata fin' ora applicata al campo della Sughereta (**Fig. 9**).

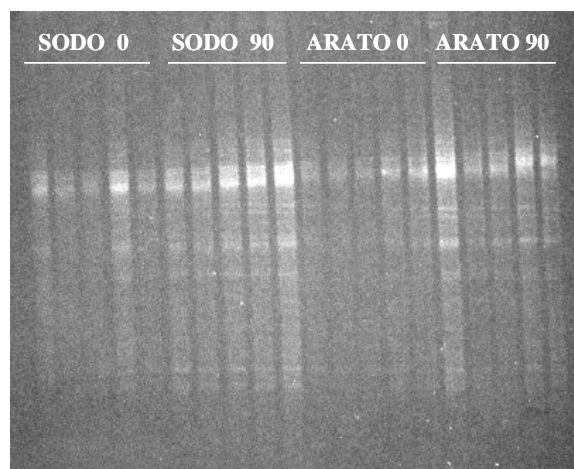


Fig. 7 Screening della microflora batterica nei suoli di Ancona (18.10.06) di trattamenti diversi (Sodo 0, 90; Arato) mediante fingerprinting genetico (16S rDNA-PCR-DGGE) delle comunità eubatteriche. La DGGE è stata condotta su campioni di DNA totale estratti da 5 repliche di ogni campo.

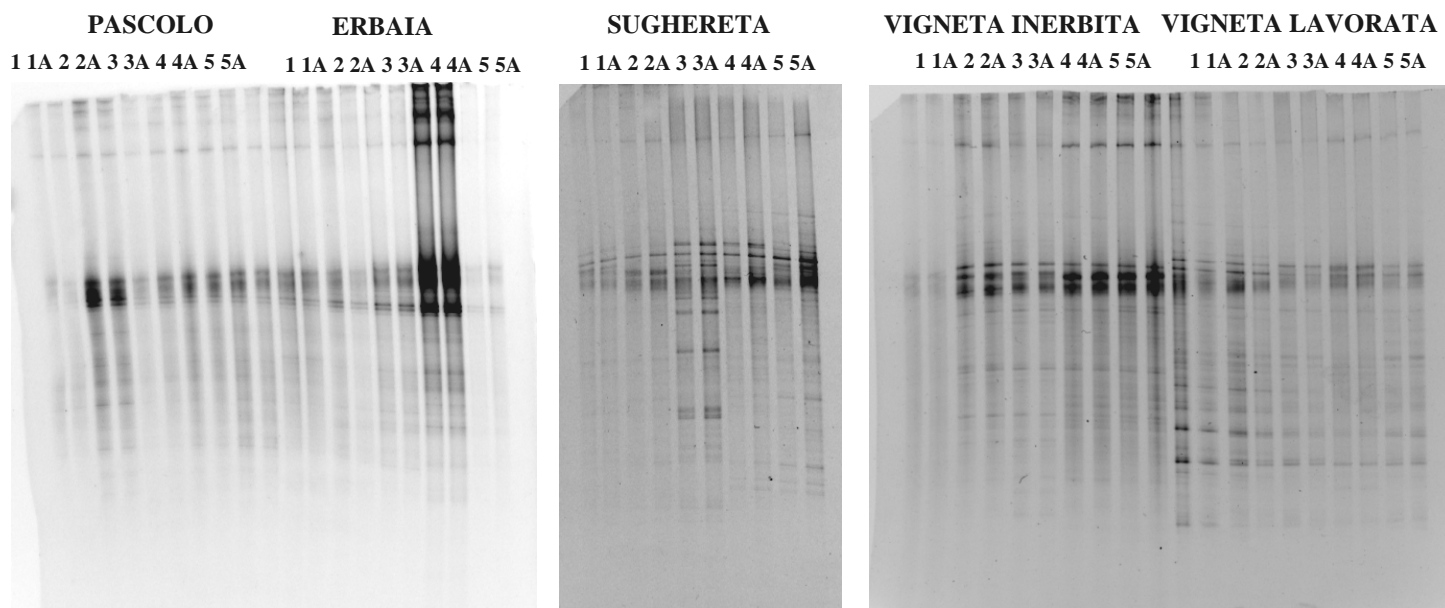


Fig. 8 Screening della microflora batterica nei suoli della Sardegna (02.05.2007) di tipologia diversa (Pascolo, Erbaia, Sughereta, Vigneta inerbita, Vigneta lavorata) mediante fingerprinting genetico (16S rDNA-PCR-DGGE) delle comunità eubatteriche. La DGGE è stata condotta su campioni di DNA totale estratti da 5 repliche di campo (1-5) in doppio (1A –5A).

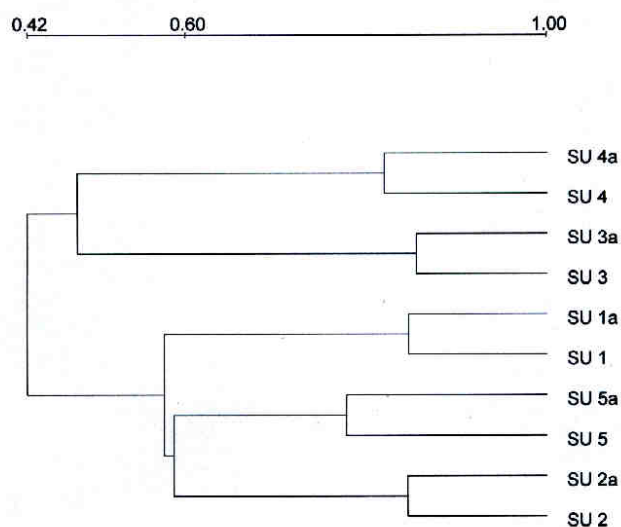


Fig. 9. Similarità genetiche fra le comunità eubatteriche dei vari punti di campionamento (1-5) nella Sughereta (SU) rilevate mediante 16S rDNA-PCR-DGGE e definite graficamente mediante dendrogramma (phylogenetic tree) con il metodo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) basato sul Dice-Indice di similarità.