Interreg
Italia–Österreich

Co-funded by
the European Union

CEDRIC

BEST PRACTICE 1

Prelievo in campo dell'apparato radicale

Autori: ICGEB e ERSA

Nell'ambito del progetto CEDRIC, sono stati raccolti campioni di radici di orzo, dai quali è stata isolata la rizosfera utilizzata per successive analisi molecolari. Il campionamento sul campo ha rappresentato un'opportunità per applicare e perfezionare la metodologia di raccolta, che di seguito viene descritta dettagliatamente a beneficio di chiunque fosse interessato.

1) Preparazione del materiale

- Strumenti: pala sterilizzata, picchetti, pinzette, guanti sterili, sacchetti o contenitori sterili (es. tubi, sacchetti freezer), carta per pulizia, alcol denaturato, sacchetto raccolta rifiuti, contenitore refrigerato (con ghiaccio o ghiaccini) o azoto liquido (se richiesto).
- Etichettatura: preparare etichette resistenti, pennarelli indelebili, block notes per appunti
- Sterilità: tutti gli strumenti devono essere sterilizzati prima del campionamento (autoclavati o sterilizzati con etanolo al 70%).

2) Preparazione del sito

- Evitare di prelevare campioni lungo i margini o in aree che presentano caratteristiche atipiche, non rappresentative dell'intera superficie del campo in esame.
- Nel caso sia necessario raccogliere una grande quantità di materiale, delimitare l'area di campionamento mediante picchetti o altri marker visibili.
- Selezionare più punti di campionamento distribuiti in modo uniforme, in modo da coprire l'intera estensione del campo oggetto di studio.
- Determinare in anticipo la profondità corretta per la raccolta di radici e suolo, e mantenerla costante per tutti i campioni

Box 1. Il microbioma radicale: un ecosistema complesso da esplorare

Le **piante** non vivono isolate nel **suolo**, ma interagiscono costantemente con complesse **comunità microbiche** che comprendono **batteri**, **funghi**, **virus**, altri **micro- e macro-organismi**. Tutti loro possono esercitare un'influenza significativa sul suolo e sulla **fisiologia** e **salute** delle piante. Alcuni sono patogeni e causano malattie, altri invece sono benefici: favoriscono la crescita vegetale, migliorano l'assorbimento dei nutrienti e aumentano la tolleranza a stress ambientali. Accanto a questi estremi esistono anche batteri "commensali", che non esercitano effetti direttamente positivi o negativi evidenti sulla pianta, ma che possono comunque influenzare l'equilibrio e la dinamica della comunità microbica nel suolo e sulla superficie radicale.

Per queste ragioni, la **comunità scientifica** ha mostrato un crescente interesse nello studio del **microbioma** associato alle **radici**, in particolare nella **rizosfera** (la zona di suolo direttamente influenzata dalle **secrezioni radicali**) e nella **rizoplane**(la superficie delle radici stesse). Tuttavia, l'analisi di queste comunità microbiche è resa complessa dal fatto che una grande parte dei **microrganismi** presenti non è **coltivabile** in laboratorio con i metodi convenzionali. Le difficoltà derivano dalla loro **crescita lenta**, dalla necessità di **condizioni ambientali specifiche**, o dalla loro dipendenza da **interazioni** con altri microrganismi.

Per superare queste limitazioni, i ricercatori si avvalgono di **tecnologie di sequenziamento del DNA ad alta capacità**, che permettono l'**analisi diretta** delle comunità microbiche **in situ**, senza la necessità di coltivarle. Tali **approcci metagenomici** offrono una visione più **completa** e **accurata** della **diversità microbica** e delle **funzioni** potenzialmente svolte da questi organismi nel contesto dell'**ecosistema radicale**.

3) Estrazione, prima pulizia e preservazione del campione radicale

Durante la raccolta dei campioni è fondamentale adottare misure rigorose per evitare contaminazioni: indossare sempre guanti disinfettati con alcol denaturato e sostituirli tra un campione e l'altro. Sterilizzare tutti gli strumenti con alcool denaturato e pulirli accuratamente tra un campione e l'altro.

Box 2. Profondità di campionamento: una scelta guidata dagli obiettivi dello studio

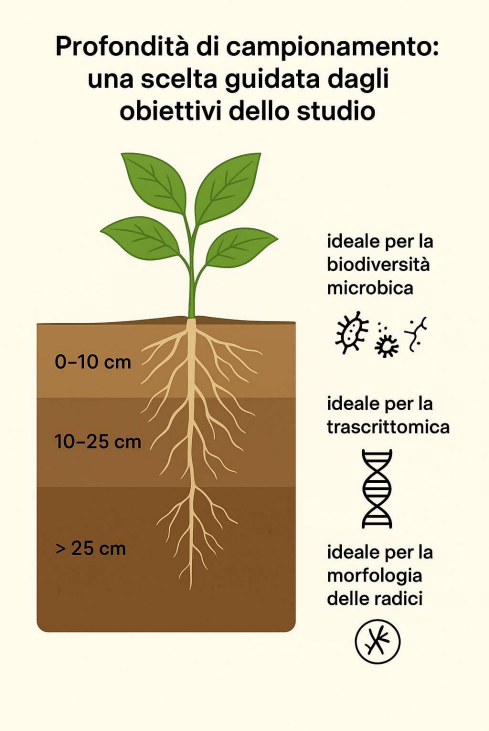
La **profondità di campionamento** deve essere adattata in funzione degli **obiettivi specifici dello studio**, quali ad esempio, lo studio della **morfologia radicale**, la **metagenomica**, la **trascrittomica**, l'**isolamento di nuovi microorganismi** o altre ricerche.

Nel caso di **studi morfologici**, la profondità dipenderà dalla **specie vegetale** considerata e dalla struttura del suo **apparato radicale**.

Per indagini sulla **biodiversità microbica**, invece, si consiglia di focalizzarsi su una profondità compresa tra **0 e 25 cm**, dove generalmente si concentra la maggior parte dell'**attività microbica** associata alle **radici**.

Per studi di **fisiologia** e **trascrittomica vegetale**, invece, è preferibile campionare la zona con il maggior sviluppo di **radici fini**, poiché queste ultime presentano un'**elevata attività metabolica** e rappresentano il principale **sito di interazione** con il **microbiota**.

- Utilizzando guanti puliti e una pala sterilizzata, scavare con attenzione intorno alla pianta e estrarre il materiale da campionare
- Rimuovere il terreno in eccesso scuotendo delicatamente il campione, mantenendo circa 2 mm di suolo aderente alle radici. Se necessario, si può applicare un leggero colpo alla base della pianta con un martello di gomma per favorire la caduta del terreno in eccesso. Qualora lo strato di suolo residuo risultasse significativamente più spesso o più sottile rispetto ai 2 mm indicati, è importante annotarne lo spessore.
- Il campione raccolto deve essere posto in sacchetti puliti (ad esempio sacchetti per alimenti o per congelatore) o in tubi di capacità adeguata (2, 10, 15 o 50 ml). Ogni campione deve essere etichettato con un codice univoco che ne garantisca l'identificazione.



Box 3. Quanto campionare? Strategie per ottenere materiale radicale rappresentativo

Se il campionamento è **conservativo** e la pianta deve sopravvivere, prelevare la **minima quantità di apparato radicale** necessaria per le analisi, cercando di raccogliere il materiale da **più punti attorno alla pianta**, includendo anche le **radici fini**, che sono metabolicamente più attive.

Per lo studio **morfologico o architettonico delle radici**, estrarre l'intero **pane radicale** utilizzando una pala e avendo cura di preservare l'integrità del sistema radicale. Iniziare lo scavo a una distanza adeguata dal colletto per evitare danni alle radici principali. Rimuovere il terreno gradualmente, a strati, esponendo il sistema radicale in modo da **non spezzare né deformare** le radici. L'estrazione deve essere

effettuata **lentamente e con grande attenzione**, evitando scuotimenti bruschi che potrebbero danneggiare le radici fini. Se possibile, raccogliere l'intero apparato radicale e **rimandare la pulizia al laboratorio**, dove può essere eseguita in condizioni più controllate.

Per studi finalizzati all'analisi della **biodiversità microbica associata alle radici** o a indagini **trascrittomiche**, si consiglia di raccogliere **almeno 500 mg di radici fresche**, preferibilmente comprendendo le porzioni più attive e colonizzate (come le radici fini).

Per l'isolamento di microrganismi, generalmente si considerano adeguati 3-10 grammi di suolo/rizosfera per campione. Dopo un'accurata omogeneizzazione, il campione può essere sottoposto a diluizioni seriali e piastratura. È inoltre consigliabile prelevare campioni da più siti di raccolta, poiché, nel caso di specie microbiche simili, questo riduce la probabilità di isolare più copie dello stesso ceppo.

- È fondamentale mantenere il campione umido: a tal fine, è possibile aggiungere alcuni millilitri di soluzione fisiologica, PBS (NaCl 0,137 M, KCl 0,0027 M, Na_2HPO_4 0,01 M, KH_2PO_4 0,0018 M) o altro nel riporlo.
- Per i campioni destinati ad analisi molecolari, è consigliabile congelare immediatamente il materiale in ghiaccio secco o azoto liquido, utilizzando esclusivamente tubi idonei a resistere a quelle condizioni. Qualora questa procedura non fosse praticabile in campo, si può ricorrere a una conservazione temporanea in un contenitore refrigerato o in una scatola di polistirolo con ghiaccio o ghiaccini, che rappresentano un'alternativa efficace per mantenere la qualità del campione. Puo' essere utile in questo caso usare anche una *Soil Preservation Solution* per prevenire la degradazione e preservare lo stato biologico e molecolare in situ del campione.
- Per i campioni destinati all'isolamento di microrganismi o a studi morfologici e architettonici delle radici, un contenitore refrigerato o una scatola di polistirolo con ghiaccio o ghiaccini, è sufficiente. In questo caso è importante che il materiale refrigerante non venga posto a stretto contatto con il campione, ma sia sufficientemente isolato per evitarne danni da congelamento o eccessivo raffreddamento diretto.
- Il numero di campioni da prelevare varia in base agli obiettivi del campionamento:
  - Per studi molecolari, come metagenomica e trascrittomica, un minimo di 3-5 repliche biologiche provenienti da piante diverse per ciascun trattamento o condizione è essenziale. Tuttavia, un numero compreso tra 5 e 10 repliche biologiche assicura una validità statistica più solida.
  - Nel caso di studi sulla morfologia e architettura radicale, un numero di repliche biologiche tra 5 e 10 radici garantisce una buona rappresentatività della popolazione o del trattamento in esame. Un campionamento superiore a 20 radici conferisce una maggiore robustezza ai dati raccolti.

- I campioni raccolti in campo e mantenuti a temperatura refrigerata fino all'arrivo in laboratorio possono essere processati immediatamente dopo la fase di pulizia.
  Il grado di pulizia richiesto dipende dagli obiettivi specifici dello studio:

  - Per studi sull'architettura e la morfologia radicale, i campioni possono essere accuratamente ripuliti utilizzando acqua sterile, al fine di rimuovere i residui di terra senza danneggiare le strutture.
  - Per studi sull'endosfera, è necessaria una pulizia meticolosa seguita da una sterilizzazione superficiale per eliminare contaminazioni esterne.
  - Lo stesso approccio si applica ai campioni destinati ad analisi fisiologiche o trascrittomiche, per i quali è fondamentale ridurre al minimo la presenza di contaminanti esogeni.
  - Per studi sulla rizosfera, i campioni devono essere trattati in modo da permettere il recupero del compartimento rizosferico, senza eliminarlo durante la pulizia.

- Dopo la pulizia, i campioni possono essere processati immediatamente, oppure

  - Conservati umidi a 4°C per analisi morfologiche e architettoniche delle radici.

- congelati in azoto liquido e conservati a -80°C per le analisi di tipo molecolare
- combinati con glicerolo (concentrazione finale del 21%) e conservati a -80°C se da per utilizzare per l'isolamento di microrganismi (batteri) o a 4°C per l'isolamento di funghi che sara' da effettuare comunque entro 48–72 hours.

Box 4. Quante repliche servono? Biologiche vs Tecniche

Per ottenere dati con valore statistico significativo, è fondamentale effettuare un **numero adeguato di repliche**. La quantità di repliche necessarie varia in base a diversi aspetti, come la naturale variabilità del sistema studiato, gli obiettivi della ricerca, il tipo di analisi statistica da utilizzare e le risorse a disposizione. Le repliche che conferiscono significatività ai risultati sono principalmente le repliche biologiche.

Le repliche biologiche rappresentano campioni indipendenti provenienti da diverse unità biologiche, come piante, animali o individui distinti. Il loro scopo è quello di cogliere la variabilità biologica naturale che può esistere tra soggetti differenti o tra condizioni sperimentali diverse. Ad esempio, in uno studio sul microbioma delle radici, le repliche biologiche corrispondono a radici raccolte da piante differenti, cresciute in condizioni simili o diverse a seconda del disegno sperimentale. Queste repliche sono essenziali perché consentono di estendere i risultati all'intera popolazione e di effettuare analisi statistiche affidabili per valutare l'impatto di trattamenti o condizioni biologiche reali.

Le repliche tecniche, invece, consistono in ripetizioni effettuate sullo stesso campione biologico. Servono a misurare la variabilità introdotta dai processi sperimentali o di laboratorio, come l'estrazione di DNA o RNA, la PCR, la preparazione delle librerie per il sequenziamento o le misurazioni strumentali. Per esempio, in studi sul microbioma, si possono ripetere più volte l'estrazione del DNA da una singola radice oppure eseguire più reazioni di PCR sullo stesso estratto. Le repliche tecniche sono importanti per assicurare l'affidabilità e la riproducibilità dei dati tecnici, ma non aumentano la rappresentatività biologica dell'indagine.

Metadata e carotaggio

Durante i campionamenti in campo, la raccolta accurata dei metadati è fondamentale per garantire la tracciabilità, l'affidabilità e la validità scientifica dei risultati.

La prima operazione da svolgere è la raccolta di una quantità sufficiente di terreno, che servirà per eseguire, in laboratorio o presso un ente specializzato, un'analisi chimico-fisica del campione.
Il terreno può essere prelevato mediante carotaggio o con l'uso di una pala, rispettando la profondità di scavo utilizzata per il campionamento delle radici.

Successivamente, è necessario raccogliere i metadati, ovvero tutte quelle informazioni che descrivono chi, cosa, dove, quando, come e le particolarità del campionamento.
È quindi importante registrare:

- il nome dell'operatore,
- la specie vegetale campionata,
- le coordinate geografiche del campo,
- le condizioni del suolo (secco, umido, allagato, ecc.),
- la stagione e le condizioni meteorologiche attuali e recenti,
- le pratiche agricole applicate (es. lavorazioni, irrigazioni),
- gli ultimi trattamenti effettuati (es. fertilizzanti, fitofarmaci) con relativa data,
- e qualsiasi altra osservazione rilevante che possa risultare utile per gli obiettivi del progetto.

More information:

Simmons, T., Caddell, D.F., Deng, S., Coleman-Derr, D. Exploring the Root Microbiome: Extracting Bacterial Community Data from the
Soil, Rhizosphere, and Root Endosphere. J. Vis. Exp. (135), e57561, doi:10.3791/57561 (2018).

Roey Angel 2020. Field sampling of root-associated microbes for DNA/RNA extraction. protocols.io https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.vd5e286