Interreg Italia–Österreich

Co-funded by the European Union

CEDRIC

BEST PRACTICE 4

Campionamento e analisi degli essudati radicali

Autori: Libera Università di Bolzano e Università degli Studi di Udine

Gli essudati radicali sono una miscela complessa di composti organici e inorganici rilasciati attivamente dalle radici delle piante nell'ambiente circostante. Tali composti includono zuccheri, aminoacidi, acidi organici, fenoli, metaboliti secondari e molecole di segnalazione e svolgono un ruolo fondamentale nel plasmare le interazioni tra piante e microrganismi, nella mobilità dei nutrienti e nelle risposte allo stress.

La composizione qualitativa e quantitativa degli essudati radicali è altamente dinamica e dipende da numerosi fattori, quali la specie vegetale, lo stadio di sviluppo, lo stato nutrizionale, le condizioni ambientali e le interazioni biotiche. Per questo motivo, la raccolta e l'analisi degli essudati radicali richiedono metodologie accuratamente standardizzate, al fine di garantire la riproducibilità dei risultati e un'interpretazione biologica significativa.

I sistemi idroponici sono ampiamente utilizzati per gli studi sugli essudati radicali, in quanto consentono un elevato livello di controllo sulle condizioni di crescita e facilitano la raccolta degli essudati con un'interferenza minima da parte delle particelle del terreno. Tuttavia, la coltivazione idroponica presenta anche alcune limitazioni specifiche che devono essere prese in considerazione nell'interpretazione dei risultati.

In questa best practice viene descritto un protocollo perfezionato per il campionamento e l'analisi degli essudati radicali basato su esperimenti condotti nell'ambito del progetto CEDRIC. Il protocollo mira a fornire linee guida generali adattabili a diverse specie vegetali, obiettivi sperimentali e piattaforme analitiche, evidenziando al contempo le fasi critiche, le potenziali fonti di variabilità e i compromessi metodologici. Nel contesto del progetto CEDRIC, le piante di orzo sono state coltivate idroponicamente in condizioni controllate per alcune settimane. A metà delle piante sono state fornite quantità ottimali di nutrienti, mentre all'altra metà non è stato somministrato il micronutriente ferro. Ogni settimana sono stati raccolti gli essudati radicali delle piante di orzo con carenza di ferro e con un apporto sufficiente di ferro. La carenza di nutrienti è stata utilizzata in quanto induceva un rilascio molto maggiore di essudato. Gli essudati radicali sono stati analizzati mediante spettrometria di massa dopo separazione mediante cromatografia liquida. Sono stati condotti esperimenti per perfezionare la metodologia di raccolta, l'analisi chimica e l'analisi dei dati, che viene descritta in dettaglio di seguito a beneficio di chiunque fosse interessato.

Sebbene il protocollo sopra descritto si riferisca a piante di orzo coltivate in condizioni di suolo ricco o povero di ferro, l'approccio generale può essere applicato a un'ampia gamma di specie vegetali e di disegni sperimentali. La durata della crescita, la composizione dei nutrienti e le dimensioni dei vasi devono essere adeguate in base alla morfologia delle piante, al loro tasso di crescita e agli obiettivi dello studio.

La carenza di nutrienti o altri fattori di stress controllati (ad esempio, la limitazione di azoto o fosforo, la salinità o la variazione del pH) possono essere utilizzati per stimolare l'essudazione radicale, ma è necessario prestare attenzione e distinguere le risposte fisiologicamente rilevanti dagli artefatti indotti dallo stress. Quando si applicano carenze nutrizionali, si consiglia vivamente di utilizzare acqua deionizzata per evitare l'immissione incontrollata di ioni provenienti dall'acqua del rubinetto.

I parametri ambientali, quali temperatura, intensità luminosa, fotoperiodo e umidità relativa, devono essere mantenuti il più possibile costanti, in quanto le fluttuazioni possono influenzare in modo significativo il metabolismo delle piante e i modelli di essudazione. Se non è possibile mantenere condizioni ottimali, è necessario adeguare di conseguenza la durata della crescita delle piante e i tempi di campionamento.

1) Crescita delle piante

- **Materiali vegetali:** semi di colture/specie adeguate;

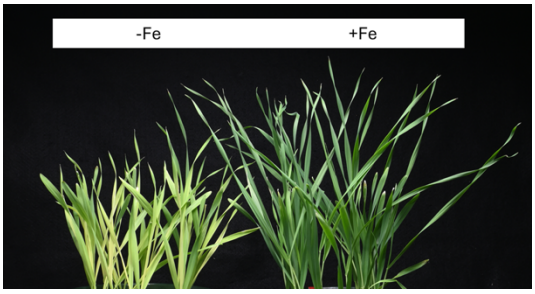
- **Strumenti:** carta assorbente, scatole (dimensioni minime 300x300x250 mm), zattere galleggianti per la coltura idroponica (dimensioni leggermente inferiori a quelle delle

scatole), bottiglie da 1 litro, recipienti in vetro o plastica per la preparazione delle soluzioni, misurini in vetro o plastica, bilancia di piccola portata (se si utilizzano sali), pHmetro, pompa ad aria per acquari (con portata minima di 600 L/h), serra (con illuminazione se necessario).

- Materiali di consumo: sali (o fertilizzanti in forma liquida);

Esempio di protocollo ottimale dettagliato per l'utilizzo di piante di orzo +Fe/-Fe. I semi di orzo (Hordeum vulgare L., cv. Bianca) vengono sciacquati con acqua e inseriti nella zattera galleggiante. Riempire la scatola fino a pochi centimetri dal bordo superiore con la soluzione nutritiva priva di Fe, precedentemente aerata con la pompa dell'acquario, e coltivare per 21 giorni nella scatola. La soluzione nutritiva priva di Fe contiene i seguenti nutrienti: $Ca(NO_3)_2$ 2 mM; $MgSO_4$ 0,5 mM; K_2SO_4 0,7 mM, KCl 0,1 mM, KH_2PO_4 0,1 mM, H_3BO_3 1 µM; $MnSO_4$ 0,5 µM; $CuSO_4$ 0,5 µM; $ZnSO_4$ 0,5 µM; $Na_2MoO_4 \cdot 0{,}01$ µM. Il pH deve essere di circa 6,5; in caso contrario, correggere con 0,1 M di NaOH o HCl. Le piante con sufficiente Fe vengono coltivate nella soluzione nutritiva sopra descritta, con l'aggiunta di 100 µM di Fe-EDTA. La soluzione nutritiva deve essere rinnovata due volte alla settimana. Le condizioni climatiche controllate devono essere le seguenti: fotoperiodo giorno/notte 16/8; intensità luminosa 220 µE $m^{-2}s^{-1}$; temperatura (giorno/notte) 25/20 °C; RH 70-80%.

- Le dimensioni della scatola, il tempo di crescita e il contenuto di nutrienti devono essere adattati a ciascuna specie vegetale;
- Preparare una soluzione madre per ciascun nutriente a una concentrazione di 100-1000x e aggiungerla a una scatola riempita per metà con acqua, mescolando costantemente. In alternativa, si possono usare soluzioni fertilizzanti liquide complete e seguire le istruzioni del produttore (in questo caso, però, è difficile, se non impossibile, indurre una carenza di nutrienti).
- Se si utilizzano soluzioni di crescita induttive carenti, l'acqua deve essere deionizzata e non di rubinetto;
- La soluzione ottimale sarebbe quella di tenere la pianta in una camera di coltura con tutti i parametri ambientali sotto controllo. In alternativa, si potrebbe utilizzare una piccola serra (la temperatura non dovrebbe superare i 28 °C né scendere sotto i 18 °C). È possibile utilizzare la luce naturale, se sufficiente, oppure un'illuminazione a LED con un timer per controllare il fotoperiodo. Se le condizioni ambientali non sono ottimali, è necessario regolare di conseguenza la durata della crescita della pianta.



2) Raccolta dell'essudato radicale

- **Strumenti:** almeno due scatole delle stesse dimensioni di quella utilizzata al punto 1; acqua deionizzata sterile; sistema di filtrazione a 0,2 µm; sacchetti o contenitori sterili (ad es. provette, sacchetti per congelatore); alcool denaturato; congelatore a -20 °C per la conservazione.
- **Etichettatura**: preparare etichette resistenti, pennarelli indelebili e un quaderno per gli appunti.
- **Sterilità**: tutti gli strumenti devono essere sterilizzati prima del campionamento (con etanolo al 70%).

Ogni settimana, riempire parzialmente delle scatole sterilizzate con acqua sterile per sciacquare le radici. Trasferire il supporto galleggiante con le piante nell'acqua per due minuti, muovendo le radici dentro e fuori dall'acqua alcune volte per facilitare il risciacquo. Ripetere l'intero processo tre volte. Riempire una scatola sterilizzata con una quantità minima di acqua deionizzata sterile, sufficiente a

immergere tutte le radici. Trasferire il supporto galleggiante con le radici risciacquate nella soluzione per 1-4 ore. Riporre le vaschette galleggianti con le piante nella scatola per continuare la loro crescita. La soluzione contenente gli essudati deve essere filtrata a 0,2 µm, trasferita in contenitori sterili etichettati e conservata a -20 °C fino a ulteriore lavorazione.

Le fasi di risciacquo eseguite prima della raccolta dell'essudato sono essenziali per ridurre il trasferimento di soluzione nutritiva residua e di microrganismi vagamente associati. Tuttavia, va notato che non è possibile ottenere una sterilità completa e che durante il periodo di raccolta può comunque verificarsi un'attività microbica.

L'acqua deionizzata sterile è comunemente utilizzata come mezzo di raccolta, in quanto riduce al minimo i segnali di fondo durante l'analisi chimica; tuttavia, l'assenza di nutrienti può indurre risposte di stress a breve termine nelle piante. La durata della raccolta dell'essudato rappresenta quindi un compromesso tra la massimizzazione del recupero dei composti e la minimizzazione della degradazione microbica o degli artefatti indotti dallo stress.

Il momento della raccolta deve essere scelto con cura in base all'obiettivo sperimentale e l'uniformità tra i campioni è fondamentale per garantire confronti affidabili.

- La tarda mattinata/il mezzogiorno è generalmente il momento migliore della giornata per la raccolta degli essudati radicali, poiché la quantità rilasciata è maggiore.
- È difficile stabilire la durata della raccolta degli essudati radicali. Una raccolta più lunga comporterà una maggiore quantità di essudati rilasciati, ma aumenterà anche il rischio di degradazione degli stessi. È importante tenere presente che, nonostante tutti gli strumenti siano sterilizzati e le radici siano state accuratamente risciacquate, alcuni microrganismi saranno sempre presenti e potrebbero quindi consumare gli essudati radicali. Se l'obiettivo è ridurre al minimo l'effetto dei microrganismi, è sufficiente un'ora. Se la quantità di essudato radicale recuperato è cruciale, sono necessarie da due a quattro ore.

Box 1. Condizioni di crescita delle piante e loro impatto sull'essudazione radicale

Le condizioni di crescita delle piante hanno un forte impatto sia sulla quantità che sulla composizione degli essudati radicali. L'intensità luminosa e il fotoperiodo influenzano l'assimilazione del carbonio e la sua allocazione alle radici, mentre la temperatura e l'umidità influenzano i tassi metabolici e la traspirazione. La disponibilità di nutrienti non solo altera la fisiologia delle piante, ma ne influenza direttamente anche il profilo qualitativo degli essudati.

Per garantire la comparabilità degli esperimenti, è consigliabile documentare accuratamente le condizioni di crescita, inclusi fotoperiodo, intensità luminosa, temperatura, umidità, composizione dei nutrienti e durata della crescita. Anche piccole variazioni di questi parametri possono determinare differenze significative nei profili degli essudati, compromettendo potenzialmente l'interpretazione biologica.

Quando gli esperimenti vengono condotti al di fuori di camere di crescita controllate, è necessario prevedere un'ulteriore variabilità e tenerne esplicitamente conto durante l'analisi dei dati.

3) Analisi dell'essudato radicale

L'analisi dell'essudato radicale viene comunemente eseguita mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LC-MS), che consente di rilevare un'ampia gamma di composti organici con elevata sensibilità. A seconda della configurazione

analitica, è possibile adottare approcci mirati o non mirati.

A causa della bassa concentrazione tipica dei composti essudati, è necessario prestare particolare attenzione alla concentrazione del campione, alla contaminazione di fondo e alla normalizzazione del segnale. Ove possibile, è opportuno includere standard interni per valutare la variabilità analitica e migliorare l'affidabilità quantitativa. Si consiglia vivamente di normalizzare i dati in base alla biomassa radicale, alla lunghezza delle radici o al tempo di raccolta, al fine di consentire confronti significativi tra i campioni.

- **Strumenti:** sistema di cromatografia liquida dotato di colonna e rilevatore per molecole organiche.

Box 2. Problematiche relative alla raccolta degli essudati radicali: coltivazione idroponica vs coltivazione in terreno

La raccolta degli essudati radicali può essere effettuata utilizzando sistemi idroponici o piante coltivate in terreno; entrambi i metodi presentano vantaggi e limiti specifici. La coltivazione idroponica consente un elevato grado di controllo sperimentale e facilita il recupero diretto dei composti essudati, riducendo al minimo l'interferenza delle particelle del terreno e della materia organica. Ciò rende l'idroponica particolarmente adatta alle analisi chimiche qualitative e quantitative.

Tuttavia, i sistemi idroponici non riproducono completamente la complessità fisica, chimica e biologica degli ambienti del suolo. Nelle piante coltivate in terreno, invece, una parte consistente degli essudati radicali può essere rapidamente assorbita dalle particelle del suolo, metabolizzata dai microrganismi o trasformata attraverso reazioni abiotiche, rendendo più difficile la raccolta diretta. Allo stesso tempo, i sistemi basati sul suolo forniscono una rappresentazione più realistica delle interazioni tra piante, suolo e microrganismi.

La scelta tra l'approccio idroponico e quello basato sul suolo dovrebbe quindi essere guidata dagli obiettivi specifici dello studio. L'idroponica è consigliata quando la caratterizzazione chimica precisa e la riproducibilità sono prioritarie, mentre i sistemi basati sul suolo sono più appropriati quando l'attenzione è rivolta principalmente alla rilevanza ecologica e alle dinamiche di interazione.

4) Analisi dei dati

L'analisi dei dati relativi ai profili degli essudati radicali richiede un'attenta valutazione della variabilità biologica, del rumore analitico e delle strategie di normalizzazione. I dati grezzi della cromatografia e della spettrometria di massa devono essere elaborati con un software specifico per il rilevamento dei picchi, l'allineamento e l'annotazione dei composti.

Per consentire confronti significativi tra i campioni, i segnali degli essudati devono essere normalizzati utilizzando parametri biologicamente rilevanti, quali il peso fresco o secco delle radici, la lunghezza delle radici, il numero di piante per campione o il tempo di raccolta. È essenziale includere controlli in bianco (ad esempio acqua sterile sottoposta alle stesse procedure di raccolta e filtrazione) per identificare contaminanti e artefatti di fondo.

Quando possibile, è preferibile utilizzare repliche biologiche rispetto a quelle tecniche, in quanto catturano la variabilità naturale tra le piante. Le analisi statistiche devono essere selezionate in base al disegno sperimentale e alla distribuzione dei dati e gli approcci multivariati possono rivelarsi particolarmente utili per individuare modelli di essudazione specifici del trattamento.

Box 3. Difficoltà nell'analisi della qualità e della quantità delle molecole organiche in una soluzione

L'analisi degli essudati radicali presenta diverse sfide tecniche a causa della bassa concentrazione e dell'elevata diversità chimica dei composti rilasciati. Molti metaboliti sono presenti in tracce e possono scendere al di sotto del limite di rilevabilità degli strumenti analitici. Inoltre, alcuni composti sono chimicamente instabili e possono degradarsi durante la raccolta, la conservazione o la preparazione dei campioni.

Gli effetti della matrice, come la presenza di sali o di contaminanti residui, possono interferire con l'efficienza di ionizzazione durante la spettrometria di massa, compromettendo l'accuratezza quantitativa. Inoltre, l'adsorbimento dei metaboliti sulle superfici di plastica o vetro può ridurre ulteriormente il recupero, in particolare per i composti idrofobici.

Per mitigare questi problemi, si consiglia vivamente di selezionare con attenzione i materiali, di elaborare rapidamente i campioni, di conservarli in condizioni adeguate e di utilizzare standard interni**.**

Box 4. Soluzione di raccolta e tempi di campionamento: impatto sui profili degli essudati radicali

La scelta della soluzione di raccolta e la durata del campionamento degli essudati radicali possono influenzare in modo significativo sia la quantità che la composizione dei composti recuperati. L'acqua deionizzata sterile è comunemente utilizzata per ridurre al minimo le interferenze di fondo durante le analisi chimiche, ma l'esposizione prolungata a condizioni prive di nutrienti può indurre risposte di essudazione legate allo stress.

Tempi di raccolta brevi (ad esempio 1 ora) riducono l'impatto della degradazione microbica e delle risposte allo stress, ma possono comportare un basso recupero dei metaboliti. Periodi di raccolta più lunghi (2-4 ore) aumentano la quantità di essudato raccolta, ma aumentano anche il rischio di degradazione dei composti e di consumo microbico.

I ricercatori devono quindi bilanciare attentamente la durata della raccolta e i requisiti analitici, mantenendo l'uniformità tra i campioni e riportando chiaramente questi parametri nei metadati sperimentali.

Maggiori informazioni:

Williams et al. (2021). doi: 10.1016/j.soilbio.2021.108391

Oburger and Jones (2018). Doi: https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.06.004