

Istituzione ospitante: Department of Molecular Cell Biology, Botanical Institute, Karlsruhe Institute of Technology (KIT). Dr Peter Nick

Titolo del programma: Caratterizzazione genomica di specie leguminose affini alle piante coltivate

Obiettivi: Caratterizzazione genomica, attraverso diversi approcci di fingerprinting, di specie leguminose affini alle piante coltivate (Crop Wild Related species CWRs), preservate e propagate presso l'orto botanico del KIT, allo scopo di valorizzare la collezione esistente, attraverso un'autenticazione genetica a supporto di programmi di miglioramento genico e di utilizzo in ambito alimentare.

Attività svolta:

La collezione di CWRs presente presso l'Orto Botanico di Karlsruhe annovera 11 diversi generi afferenti alla famiglia delle Fabaceae, per un totale di 28 specie considerabili ai fini del presente studio. Il materiale, rigorosamente classificato e riprodotto, è scrupolosamente conservato presso le strutture dell'ente, in appositi contenitori, in condizioni di vuoto a -20° C, atti alla preservazione della sua integrità e vitalità. Su questo materiale è stata effettuata una valutazione della disponibilità, definendo un limite di accessibilità alla collezione fissato per 200mg, il che ha imposto di dover escludere dall'analisi una singola specie (TST, tabella 1) a causa della ridotta quantità di seme disponibile presso tale banca del seme. Tutto il materiale è provvisto di corredo informativo relativamente alla sua classificazione botanica mediante parametri morfologici e di distribuzione o propagazione sul punto di raccolta.

Tabella 1. Materiale vegetale (Crop Wild Related species CWRs) oggetto di studio

CODE	Genus	species	Family	KIT ref	CODE	Genus	species	Family	KIT ref
AVL	Anthyllis	vulneraria	Fabaceae	6 152	MLU	Medicago	lupulina	Fabaceae	1 74
ACC	Astragalus	cicer	Fabaceae	3 57	MAL	Melilotus	albus	Fabaceae	1 156
AGY	Astragalus	glycyphyllos	Fabaceae	3 412	MAT	Melilotus	altissimus	Fabaceae	6 171
CVR	Coronilla	varia	Fabaceae	3 416	MOF	Melilotus	officinalis	Fabaceae	1 123
CYS	Cytisus	scoparius	Fabaceae	6 14	TAR	Trifolium	arvense	Fabaceae	6 162
GTN	Genista	tinctoria	Fabaceae	6 109	TCA	Trifolium	campestre	Fabaceae	3 501
LLN	Lathyrus	linifolius	Fabaceae	6 141	TPR	Trifolium	pratense	Fabaceae	1 136
LPR	Lathyrus	pratensis	Fabaceae	3 290	TRE	Trifolium	repens	Fabaceae	6 12
LSL	Lathyrus	sylvestris	Fabaceae	5 300	TST	Trifolium	striatum	Fabaceae	nn nn
LTB	Lathyrus	tuberosus	Fabaceae	3 429	VAN	Vicia	angustifolia agg.	Fabaceae	3 491
LVR	Lathyrus	vernus	Fabaceae	6 138	VAC	Vicia	cracca	Fabaceae	3 298
LCO	Lotus	corniculatus	Fabaceae	6 69	VIR	Vicia	hirsuta	Fabaceae	3 490
LPE	Lotus	pedunculatus	Fabaceae	6 81	VEP	Vicia	sepium	Fabaceae	5 394
MFA	Medicago	falcata	Fabaceae	6 65	VEN	Vicia	tenuifolia	Fabaceae	5 423

Come riportato in Tabella 1 è stato stilato un elenco delle specie sottoposte ad analisi definendone un codice univoco di identificazione. Il campionamento è stato effettuato prelevando dalla banca del seme aliquote di 100 mg di seme integro per ciascuna specie.

Il successivo protocollo di estrazione del DNA genomico (gDNA) è stato ponderato in funzione della ridotta quantità di seme disponibile, valutandone diverse modifiche che consentissero di ottenere un buon risultato in termini di resa estrattiva e rappresentatività delle specie analizzata.

Al fine di evitare sprechi di prezioso materiale proveniente dalla banca del seme sono state selezionate due sole accessioni, LCO e MAT, abbastanza contrastanti in dimensione, tipologia e peso del seme, per effettuare le prove preliminari di settaggio dei protocolli di analisi.

Sono stati valutati due protocolli di estrazione in forma di kit commerciale (Stratec Invisorb Spin Plant Mini Kit vs Qiagen DNeasy Plant Mini Kit), entrambi disponibili presso le strutture ospitanti, per l'isolamento di gDNA da tessuti vegetali, conducendo diverse prove al fine di ottimizzare due distinti obiettivi: ridurre la quantità di materiale di partenza (seme) utilizzato, ridurre la quantità di composti secondari co-precipitanti con il gDNA (Figura 1) preservando la resa estrattiva. Il seme integro è stato inizialmente distrutto meccanicamente a mano mediante l'uso di un martello e successivamente inserito in tubi della capacità di 2 ml, con chiusura di sicurezza e addizionati di 2 sfere in acciaio inox (4 mm in diametro) e polverizzato con l'ausilio di omogeneizzatore meccanico Qiagen TissueLyser II, applicando una forza di 23 Hz per 50 sec. I migliori risultati sono stati ottenuti applicando il protocollo di estrazione standard per Stratec Invisorb Spin Plant Mini Kit, con le seguenti modifiche: riducendo la quantità di materiale di partenza da 60 a 30 mg e inserendo uno step di centrifugazione del campione (condotto a 11000 x g per 2') dopo la fase di lisi, al fine di eliminare i detriti presenti. Il DNA genomico estratto è stato valutato qualitativamente e quantitativamente mediante lettura spettrofotometrica.

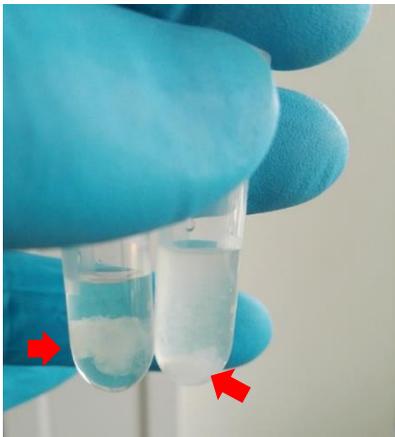


Figura 1: Grosse masse di polisaccaridi (agglomerati biancastri indicati dalle frecce rosse) co-precipitati con il gDNA sono visibili nel corso della fase di precipitazioni dell'estrazione, per entrambe le accessioni ma di diversa entità.

Nonostante il protocollo di estrazione del DNA adottato rappresentasse un buon compromesso tra resa estrattiva e qualità dell'estratto, esso ha necessitato di un'ulteriore fase di purificazione. Infatti, come mostrato in Figura 2, che mostra la lettura spettrofotometrica degli estratti ottenuti applicando entrambi i Kit per i medesimi campioni (LCO e MAT), è evidente come la quantità di DNA estratto (picco di assorbimento 260nm) con il kit Stratec Invisorb sia più elevata rispetto a quella estratta con Kit Qiagen. Questo però ha comportato la presenza di elevate quantità di composti indesiderati co-precipitati con il DNA, come testimoniato dalla presenza di un picco molto elevato a lunghezze 240-250nm. L'applicazione del protocollo di purificazione ha però consentito di eliminare buona parte

dei composti indesiderati, incrementando anche la concentrazione del DNA (vedi curve indicate in figura, corrispondenti ai medesimi estratti ottenuti kit Startec Invisorb e successivamente purificati)

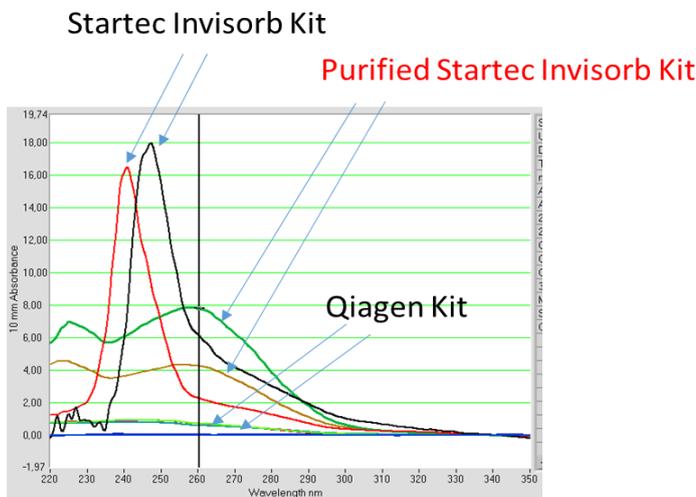


Figura 2: Analisi spettrofotometrica dei gDNA estratti da due campioni con i metodi testati (Startec e Qiagen) e dei relativi purificati per il solo kit Startec. La barra verticale indica la lunghezza d'onda corrispondente all'assorbanza del gDNA.

La successiva fase di amplificazione del DNA mediante applicazione del protocollo TBP®, così come sviluppato e brevettato presso i laboratori IBBA-CNR, ha previsto la valutazione dell'enzima polimerasico da utilizzare (Taq polimerasi), scelto tra quelli disponibili presso la struttura ospitante, e della quantità di template (DNA) fornito alla reazione. Come mostrato in Figura 3 sono state valutate due tipologie diverse di enzima polimerasico, amplificando da 3 a 30 ng di DNA genomico per ciascuna accessione di prova. Dalla figura si evince come la diversa attività dell'enzima si rifletta sulla qualità e quantità di prodotto PCR originato.

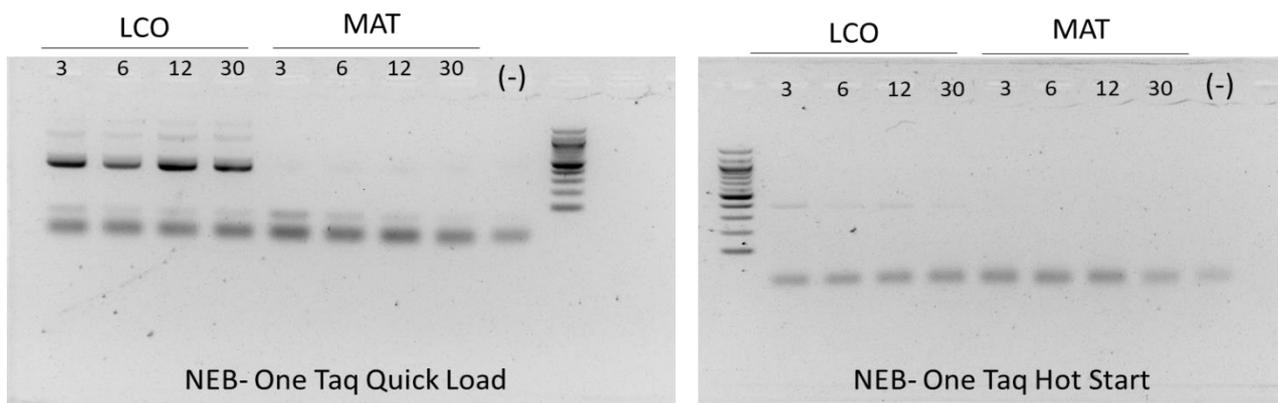


Figura 3: Gel di agarosio al 2% in TBE buffer 0.5X, ottenuto mediante il caricamento dei prodotti TBP originati amplificando, con due diverse tipologie di Taq polimerasi, da 3 a 30 ng di DNA genomico per entrambe le accessioni di prova (LCO e MAT).

Definito NEB- One Taq Quick Load come l'enzima più idoneo per l'ottenimento di buoni prodotti TBP è stata effettuata un'ulteriore valutazione della quantità del template fornito. Questo per valutare

l'esistenza di eventuali inibenti forniti alla reazione insieme al DNA genomico, in grado di influire sull'attività della polimerasi, e nel contempo per garantire un corretto quantitativo di DNA alla reazione. Come mostrato in Figura 4, amplificando 5 e 50 ng di DNA per entrambe le accessioni di prova sono stati ottenuti risultati contrastanti valutando gDNA purificato o non purificato. I campioni quando amplificati da DNA non purificato e fornendo alla reazione 50 ng di esso, manifestano una chiara inibizione sull'attività dell'enzima che si riduce per il campione MAT limitandosi ai prodotti di più basso peso molecolare, mentre si annulla completamente per il campione LCO. Fornendo però alla reazione il medesimo DNA ma purificato, l'effetto inibitorio scompare e l'amplificazione di 50ng per entrambe le accessioni risulta decisamente di migliore qualità.

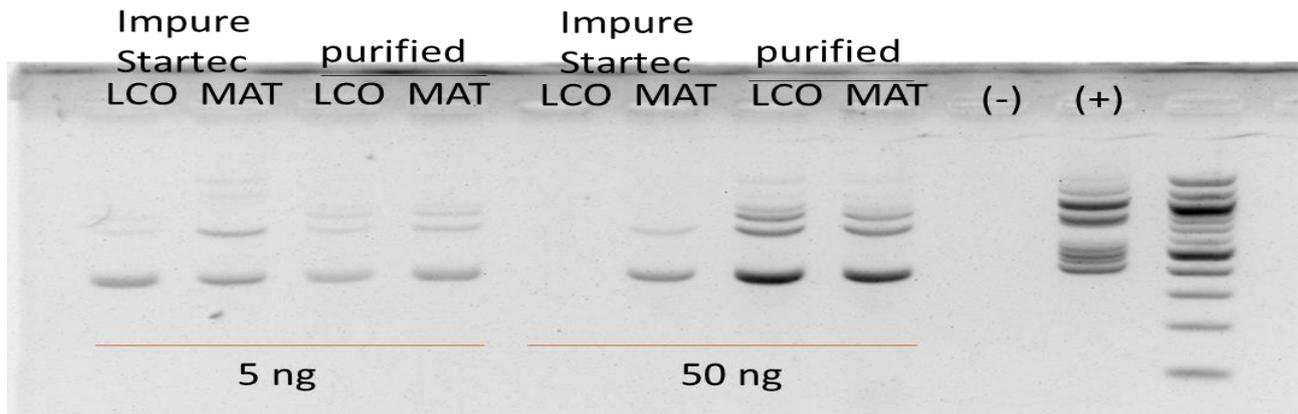


Figura 4: Gel di agarosio al 2% in TBE buffer 0.5X, ottenuto mediante il caricamento dei prodotti TBP originati amplificando 5 e 50 ng di gDNA, per le due accessioni di prova estratte con kit Startec, quando purificato (purified) e quando no (impure). Un effetto inibente sull'attività dell'enzima è evidente sugli amplificati originati da DNA non purificato.

Prima di procedere con l'estrazione del DNA, purificazione e successiva amplificazione TBP, limitatamente al I introne dei geni delle β -tubuline, per tutte le specie oggetto di studio, si è convenuto con la struttura ospitante, di eseguire le reazioni TBP senza nessuna marcatura fluorescente. A causa infatti dell'indisponibilità presso la struttura ospitante di qualunque apparato di elettroforesi capillare, in grado di poter garantire la separazione e visualizzazione dei prodotti fluorescenti ottenuti, si è deciso di effettuare solamente amplificazione non marcate su tutti i DNA genomici estratti, valutarne la qualità ed eseguire solo successivamente, nei laboratori IBBA-CNR, le amplificazioni marcate in fluorescenza. Sono state valutate anche due alternative: affidarsi ad altre strutture in contatto con il gruppo di ricerca ospitante, per eseguire le corse in elettroforesi capillare, oppure trasportare i prodotti marcati in fluorescenza ed eseguire solo successivamente presso IBBA-CNR le corse elettroforetiche. Di comune accordo con il gruppo ospitante entrambe le alternative sono state scartate perchè la prima impraticabile e la seconda non in grado di garantire una completa esenzione da ripercussioni sulla resa finale del prodotto.

Tabella 2 riporta i valori registrati dalla quantificazione spettrofotometrica dei DNA estratti da tutte le accessioni elencate in Tabella 1, secondo il protocollo sopra descritto e successivamente purificati.

Tabella 2: Concentrazione (ng/ul) stimata mediante lettura spettrofotometrica del gDNA estratto dai campioni oggetto di studio e successivamente purificato.

Sample ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
ACC	29.11.2017	11:13	25,68	0,514	0,316	1,63	0,2
AGY	29.11.2017	11:14	27,32	0,546	0,268	2,04	0,86
AVL	29.11.2017	11:15	54,88	1,098	0,627	1,75	2,08
CYS	29.11.2017	11:16	158,56	3,171	1,517	2,09	0,3
CVR	29.11.2017	11:17	32,93	0,659	0,41	1,61	0,06
GTN	29.11.2017	11:17	42,52	0,85	0,437	1,95	0,27
LCO	22.11.2017	10:57	68,69	1,374	0,822	1,67	1,21
LLN	29.11.2017	11:18	39,55	0,791	0,51	1,55	0,14
LPE	29.11.2017	11:18	46,41	0,928	0,53	1,75	0,11
LPR	29.11.2017	11:19	58	1,16	0,695	1,67	0,23
LSL	29.11.2017	11:19	84,13	1,683	1,066	1,58	0,12
LTB	29.11.2017	11:19	29,81	0,596	0,359	1,66	0,11
LVR	29.11.2017	11:20	81,72	1,634	0,874	1,87	0,42
MAL	29.11.2017	17:39	21,78	0,436	0,252	1,73	0,87
MAT	29.11.2017	10:57	27,8	0,556	0,328	1,7	1,79
MFA	29.11.2017	17:41	35,8	0,716	0,352	2,03	3,97
MLU	29.11.2017	17:39	17,93	0,359	0,208	1,73	2,75
MOF	29.11.2017	17:42	32,92	0,658	0,379	1,74	2,26
TAR	29.11.2017	17:37	43,05	0,861	0,438	1,97	1,82
TCA	29.11.2017	17:41	56,91	1,138	0,598	1,9	2,39
TPR	29.11.2017	17:38	89,44	1,789	0,908	1,97	2,54
TRE	29.11.2017	17:38	36,62	0,732	0,403	1,82	1,74
VAC	29.11.2017	17:40	7,58	0,152	0,091	1,66	1,69
VAM	29.11.2017	17:42	23,08	0,462	0,305	1,51	1,16
VEN	29.11.2017	17:40	12,45	0,249	0,159	1,57	3,85
VEP	29.11.2017	17:40	22,46	0,449	0,298	1,51	1,26
VIR	29.11.2017	17:37	32,35	0,647	0,384	1,68	2,51

Il protocollo TBP, limitatamente alla regione del I introne, è stato quindi applicato a tutte le 27 accessioni oggetto del presente studio. **Figura 5** raccoglie i profili più rappresentativi degli 11 generi analizzati (una sola specie per genere). La visualizzazione di tali prodotti su gel di agarosio non rappresenta infatti la condizione ottimale per lo screening degli amplificati ottenuti. Dall'immagine si evince però come ogni genere sia chiaramente caratterizzato da un suo specifico e distintivo profilo TBP. L'analisi dei polimorfismi in lunghezza delle sequenze bersaglio (introni dei geni β -tubuline) qui facilmente identificabili, saranno registrati ed analizzati mediante corsa in elettroforesi capillare dei medesimi prodotti marcati in fluorescenza, restituendo un dato maggiormente riproducibile affidabile a facilmente analizzabile.

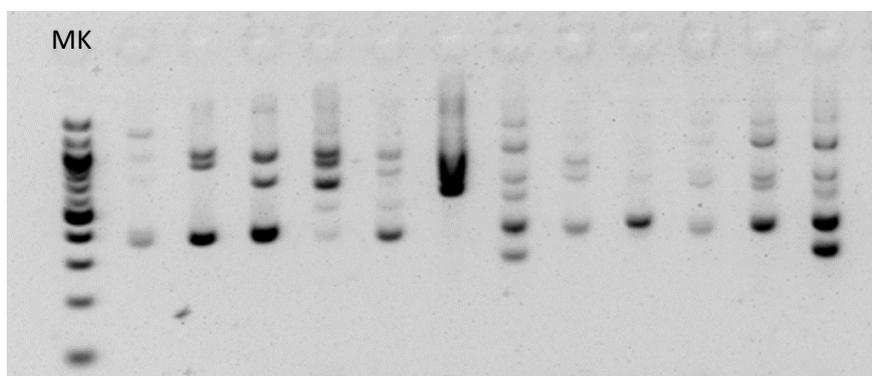


Figura 5: Gel di agarosio al 2% in TBE buffer 0.5X, ottenuto mediante il caricamento dei prodotti TBP originati dall'amplificazione delle accessioni AVL, ACC, CVR, CYS, GTN, LLN, LCO, MFA, MAT, TAR, VAN. MK, marcatore di peso molecolare.

Gli obiettivi prefissati dal progetto su esposto sono stati pienamente perseguiti e raggiunti nelle modalità e nei tempi prefissati. Tutte le variazioni metodologiche, sono state sempre valutate con il gruppo di ricerca ospitate. L'approccio di fingerprinting adottato (metodo TBP®) di 27 specie leguminose affini alle piante coltivate (CWRs), preservate e propagate presso la struttura ospitante, si è rivelato un valido strumento, efficace e facilmente trasferibile, per la caratterizzazione genomica di specie inesplorate e la loro successiva valorizzazione mediante programmi di miglioramento genico e/o di utilizzo in ambito alimentare.

Milano 03 Gennaio 2018

Il fruitore del programma STM

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Luca Brage", with a long horizontal flourish extending to the right.