

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA



DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

## CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOLOGIA MARINA

Messa a punto di un metodo molecolare per la  
quantificazione dei tassi di ingestione algale nel copepode  
*Calanus helgolandicus*

### **Relatori**

Prof. Giovanni Casini

Dott.ssa Ylenia Carotenuto

### **Laureanda**

Claudia Esposito

*ANNO ACCADEMICO 2014-2015*

# *Riassunto analitico*

I copepodi costituiscono un 'link' diretto tra il fitoplancton (diatomee) e i consumatori superiori. La valutazione dei tassi di ingestione dei copepodi è un parametro fondamentale per determinare l'impatto delle fioriture algali su questi crostacei. I metodi basati sui conteggi cellulari dell'alga ingerita sono lunghi, soggetti ad errore e di difficile applicazione *in situ*. Nel presente lavoro di tesi è stato messo a punto un metodo molecolare per l'identificazione e quantificazione del DNA della diatomea *Skeletonema marinoi* nel copepode *Calanus helgolandicus*, utilizzando tecniche di estrazione e amplificazione del DNA ribosomiale 18S (rDNA) mediante real-time quantitative PCR (qPCR). La procedura sperimentale è stata suddivisa in una prima fase di selezione e ottimizzazione di 7 coppie di primer specifici per il rDNA 18S della *S. marinoi*, ed una seconda fase, in cui sono stati condotti esperimenti di alimentazione su femmine di *C. helgolandicus* incubate in *S. marinoi*. Con questo metodo è stato possibile calcolare il numero di cellule di *S. marinoi* ingerite dal *C. helgolandicus*, che risulta essere compreso tra 23-110 cell/cop/ora. In conclusione, questo studio preliminare permetterà di valutare i tassi di ingestione di *C. helgolandicus* durante una tipica fioritura primaverile di *S. marinoi* nel Nord Adriatico, per valutare l'effetto della diatomea sulla riproduzione del copepode *in situ*.

# Prefazione

Le diatomee rappresentano la componente dominante del fitoplancton marino e sono i principali produttori primari negli ecosistemi acquatici. I consumatori principali di queste microalghe sono i copepodi, crostacei planctonici erbivori, che costituiscono un 'link' diretto tra il fitoplancton e i consumatori superiori quali pesci e mammiferi. Studi recenti hanno dimostrato che le diatomee producono sostanze cito-tossiche che riducono i tassi di schiusa delle uova dei copepodi, inducendo la formazione di larve abnormali che non completano lo sviluppo, e riducendo così la crescita della popolazione. La valutazione dei tassi di ingestione algale dei copepodi è un parametro fondamentale per determinare l'impatto delle fioriture algali su questi crostacei. I metodi classici basati sui conteggi cellulari dell'alga ingerita sono lunghi e soggetti ad errore; inoltre, risultano di difficile applicazione per valutare i tassi di ingestione in un contesto naturale. Un metodo alternativo è basato sulla identificazione e quantificazione del DNA algale nel copepode, utilizzando tecniche di estrazione e amplificazione mediante qPCR. Lo scopo di questa tesi è la messa a punto di tale metodo molecolare nel copepode *Calanus helgolandicus* isolato dal Golfo di Napoli e alimentato con la diatomea *Skeletonema marinoi*, ampiamente studiata per la sua produzione di ossilipine e l'effetto deleterio sulla riproduzione del copepode. La procedura sperimentale è stata suddivisa in una prima fase di selezione e ottimizzazione di 7 coppie di primer specifici per il gene 18S della *S. marinoi*. La specificità dei primer è stata verificata mediante PCR e l'efficienza di amplificazione del prodotto valutata mediante real-time quantitative PCR (qPCR). In una seconda fase sperimentale, sono stati condotti esperimenti di alimentazione (feeding) su femmine di *C. helgolandicus* incubate in una concentrazione nota di *S. marinoi*. Al termine di ogni esperimento, il DNA dei copepodi e della coltura di *S. marinoi* è stato estratto e utilizzato in qPCR per quantificare i ng di DNA algale ingeriti dai copepodi. Infine, utilizzando la relazione lineare tra campioni di *S. marinoi* a concentrazione cellulare nota ed il contenuto in ng di DNA estratto, ricavata al termine di ciascun esperimento di feeding, si risale al numero di cellule algali ingerite dal *C. helgolandicus*. In conclusione, questo studio preliminare pone le basi per investigare i tassi di ingestione del *C. helgolandicus* durante la tipica fioritura primaverile di *S. marinoi* nel Nord Adriatico, correlandoli ai corrispondenti tassi riproduttivi *in situ* per valutare l'effetto tossico della dieta.

# Sommario

Riassunto analitico .....	1
Prefazione.....	3
Introduzione .....	5
1.1 <i>Biologia generale dei copepodi</i> .....	7
1.2 <i>Calanus helgolandicus</i> .....	9
1.3 <i>Le Diatomee</i> .....	11
1.4 <i>Skeletonema marinoi</i> .....	12
1.5 <i>Alimentazione</i> .....	13
1.6 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i> .....	14
1.7 <i>Real-time PCR (qPCR)</i> .....	15
Materiali e metodi .....	20
2.1 <i>Preparazione della coltura di Skeletonema marinoi</i> .....	20
2.2 <i>Estrazione del DNA di Skeletonema marinoi</i> .....	20
2.3 <i>Disegno di Primer specifici per 18S rDNA di Skeletonema marinoi</i> .....	22
2.4 <i>Verifica della specificità dei primer</i> .....	22
2.5 <i>Sequenziamento dei prodotti di PCR</i> .....	23
2.6 <i>Verifica dell'efficienza dei Primer in qRT-PCR</i> .....	23
2.7 <i>Campionamento e sorting dello zooplancton</i> .....	25
2.8 <i>Esperimenti di alimentazione</i> .....	25
2.9 <i>Estrazione del DNA dai copepodi</i> .....	26
2.10 <i>PCR di Skeletonema marinoi in Calanus helgolandicus</i> .....	27
2.11 <i>qPCR di Skeletonema marinoi in Calanus helgolandicus</i> .....	27
Risultati .....	28
3.1 <i>Estrazione del DNA di Skeletonema marinoi</i> .....	28
3.2 <i>Disegno e ottimizzazione di primer per rDNA 18S di Skeletonema marinoi</i> .....	29
3.3 <i>Efficienza dei primer in qRT-PCR</i> .....	31
3.4 <i>Estrazione del DNA di Calanus helgolandicus</i> .....	34
3.5 <i>PCR di Skeletonema marinoi in Calanus helgolandicus</i> .....	36
3.6 <i>qRT-PCR di Skeletonema marinoi in Calanus helgolandicus</i> .....	37
Discussione .....	43
Bibliografia .....	47

# Indice delle figure e tabelle

Figura 1. Stadi larvali (nauplii) normali (b, d) ed anormali (a, c) di copepodi esposti ad ossilipine .....	6
Figura 2. Illustrazione che mostra la diversità di forme dei copepodi .....	7
Figura 3. Anatomia di un tipico copepode calanoide femmina (visione laterale).....	8
Figura 4. Immagine confocale degli ultimi stadi di sviluppo della <i>Temora stylifera</i> . .....	9
Figura 5. Adulto femmina di <i>C. helgolandicus</i> .....	10
Figura 6. Varietà di forme di diatomee.....	11
Figura 7. Diatomea <i>Skeletonema marinoi</i> .....	12
Figura 8. Descrizione del meccanismo della PCR.....	15
Figura 9. Meccanismo di azione del SYBR green. ....	16
Figura 10. Andamento dell'amplificazione nella qPCR. ....	16
Figura 11. Esempio di curva standard in qPCR. ....	17
Figura 12. Esempio di curve di melting in qPCR. ....	18
Figura 13. Schema del protocollo di estrazione del DNA mediante Blood and Tissue Kit (Qiagen). ....	21
Figura 14. Nanodrop.....	21
Figura 15. Esempio di analisi di una piastra di qPCR. ....	25
Figura 16. Foto di gel di agarosio 0.5% del DNA di <i>S.marinoi</i> . ....	29
Figura 17. Foto del gel di agarosio 1.5% dei prodotti di PCR in <i>S. marinoi</i> .....	31
Figura 18. Curve standard per le coppie di primer. ....	32
Figura 19. Esempio di una curva di melting del primer Ske 99.....	34
Figura 20. Foto di gel di agarosio 0.5% del DNA di <i>C. helgolandicus</i> .....	35
Figura 21. Foto del gel di agarosio 1.5% dei prodotti di PCR in <i>C. helgolandicus</i> . ....	36
Figura 22. Relazione tra cellule e DNA estratto da <i>S. marinoi</i> . ....	37
Figura 23. Tasso di ingestione di <i>C. helgolandicus</i> ( $\pm$ SD) nei tre esperimenti. ....	41
Figura 24. Tasso medio di ingestione ( $\pm$ SD) di <i>Calanus helgolandicus</i> per ciascun amplicone. ....	42
.....	
Tabella 1. Condizioni di PCR utilizzate per ogni esperimento.....	23
Tabella 2. Condizioni di qPCR utilizzate per ogni esperimento.....	24
Tabella 3. Quantità e qualità del DNA estratto da pellet di <i>S. marinoi</i> .....	28
Tabella 4. Primer per il DNA ribosomiale 18S di <i>S. marinoi</i> .....	30
Tabella 5. Efficienze di amplificazione delle coppie di primer.....	33
Tabella 6. Quantità e qualità del DNA estratto da <i>C. helgolandicus</i> e <i>S. marinoi</i> .....	35
Tabella 7. Ingestione di <i>S. marinoi</i> relativa al primer 72bp.....	38
Tabella 8. Ingestione di <i>S. marinoi</i> relativa al primer 89bp.....	39
Tabella 9. Ingestione di <i>S. marinoi</i> relativa al primer 99bp.....	39
Tabella 10. Ingestione di <i>S. marinoi</i> relativa al primer 122bp.....	40
Tabella 11. Ingestione di <i>S. marinoi</i> relativa al primer 150bp.....	40

# Introduzione

Questo progetto di tesi rientra nella tematica generale del gruppo di ricerca in Ecologia Chimica del Plancton della Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli, iniziata circa 20 anni fa, la quale studia l'interazione chimica tra i copepodi e le microalghe del fitoplancton, in particolare le diatomee. Queste ultime, rappresentano la componente dominante del fitoplancton marino e sono i principali produttori primari negli ecosistemi acquatici. I consumatori principali di queste microalghe sono i copepodi, crostacei planctonici erbivori, che costituiscono un legame tra il fitoplancton e i consumatori superiori quali pesci e mammiferi.

Studi recenti hanno dimostrato che alcune diatomee producono sostanze cito-tossiche teratogene che non inducono sintomi tossici negli individui adulti che se ne cibano, ma hanno come bersaglio principale la progenie dei copepodi, provocando la formazione di larve anormali con tessuti apoptotici (Ianora et al. 2004, 2012) (Fig. 1).

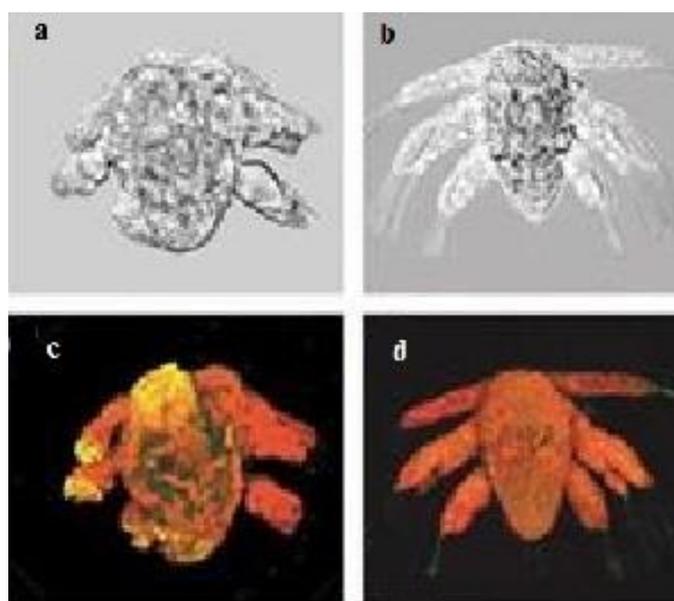


Figura 1. Stadi larvali (nauplii) normali (b, d) ed anormali (a, c) di copepodi esposti ad ossilipine

Si tratta di aldeidi poliinsature e altri derivati dell'ossidazione enzimatica dei lipidi e degli acidi grassi, appartenenti alla classe delle ossilipine, che vengono prodotte dalle diatomee in seguito alla rottura cellulare (Fontana et al. 2007), quindi in seguito alla masticazione da parte dei copepodi o alla lisi cellulare dovuta a carenza di nutrienti e stress. Le ossilipine non solo hanno un ruolo anti-predatorio verso i copepodi

consumatori (Ianora et al. 2004), ma agiscono anche da segnali intra- e inter-specifici per modulare la densità di popolazione delle diatomee stesse (Ribalet et al. 2009) o per segnalare la presenza di patogeni o competitori (Vardi et al. 2006). Tali molecole, quindi, possono avere funzioni multiple, nel senso che non solo sono utilizzate contro la predazione, ma hanno anche un effetto allelopatico, ovvero un effetto sulla crescita di altre cellule di fitoplancton, e dal momento che la massima produzione si ha durante la fase stazionaria, può avere effetto sulla stessa alga produttrice suggerendo un ruolo di segnalazione nel controllare la sua stessa crescita (Casotti et al. 2005). Inoltre, alcune ossilipine hanno un ruolo importante anche nella diversità della comunità batterica, ma l'effetto in questo caso può essere positivo o negativo a seconda della specie batterica, modellando così la struttura della comunità durante i massimi periodi di fioritura. Da un punto di vista fisiologico, la produzione delle ossilipine solo in seguito alla rottura delle cellule stesse, costituisce una difesa dall'autointossicazione da parte delle diatomee; inoltre tale meccanismo di difesa chimica che porta comunque alla morte della cellula, può essere spiegato con la selezione parentale. Con tale selezione le diatomee sacrificano una parte della popolazione algale per ridurre il successo di schiusa delle uova dei copepodi, portando quindi ad una riduzione futura del proprio predatore.

### 1.1 *Biologia generale dei copepodi*

I copepodi, principali costituenti del mesozooplankton, sono presenti in gran numero in tutti i mari, dalle zone artiche del nord Atlantico, fino alle regioni tropicali e subtropicali degli oceani, così come mostrato dalle tavole di distribuzione della specie di Van de Spoel e Heyman (1983) (Fig. 2).

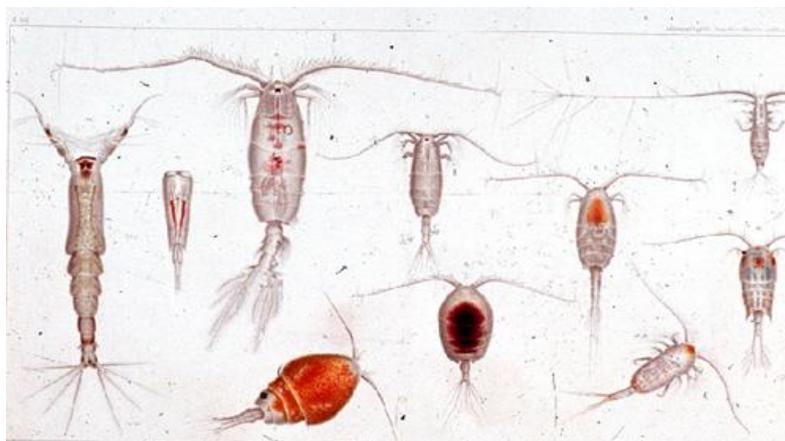


Figura 2. Illustrazione che mostra la diversità di forme dei copepodi

Grazie alla loro distribuzione cosmopolita, all'importanza che rivestono nelle reti trofiche marine ed alla loro facilità di campionamento e mantenimento, essi sono gli organismi più studiati dello zooplancton (Richardson 2008).

Dal punto di vista morfologico, i copepodi hanno una dimensione corporea media compresa tra 0.5 e 5 mm di lunghezza. Presentano un capo, sul quale sono presenti le prime e le seconde antenne, le mandibole, le maxille e le maxillule, che hanno funzioni chemorecettrici e meccanorecettrici e sono coinvolte nel nuoto e nell'alimentazione; un torace o metasoma dal quale dipartono le cinque paia di appendici natatorie. L'addome o urosoma costituito anch'esso da cinque segmenti, forma il corpo posteriore e termina con una biforcazione (forca caudale) (Fig.3).

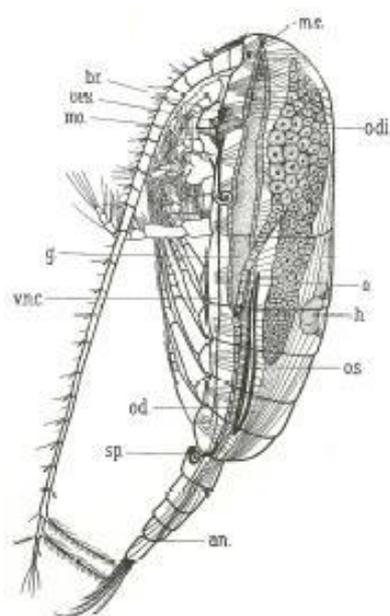


Figura 3. Anatomia di un tipico copepode calanoide femmina (visione laterale). an: ano; b.r.: ganglio ventrale; h: cuore; g: intestino; m.e.: occhio mediano; mo: bocca; o: ovario; od: ovidotto; o.di.: diverticolo ovarico; oes: esofago; os: goccia lipidica; sp: spermateca; v.n.c.: sistema nervoso ventrale (da Marshall & Orr 1955).

Presentano dimorfismo sessuale e la fecondazione avviene tramite copula, durante la quale il maschio trattiene la femmina mediante l'antenna prensile modificata a forma di uncino e pone un sacco contenente gli spermatozoi, detto spermatofora, in prossimità dei pori genitali femminili localizzati sull'urosoma. Le uova sono fecondate durante il passaggio attraverso i pori genitali prima di essere rilasciate in mare o deposte in sacchi ovigeri che restano attaccati alla femmina fino alla schiusa, secondo la specie, e pertanto

la loro fecondazione è interna. Il ciclo vitale del copepode è costituito da 6 stadi naupliari (da NI ad NVI) e 5 stadi copepodite (da CI a CV), che dopo l'uovo precedono lo stadio finale di adulto (Fig. 1.4). In media, il ciclo vitale è compreso tra i 21-30 giorni dalla schiusa allo stadio adulto (Mauchline 1998).

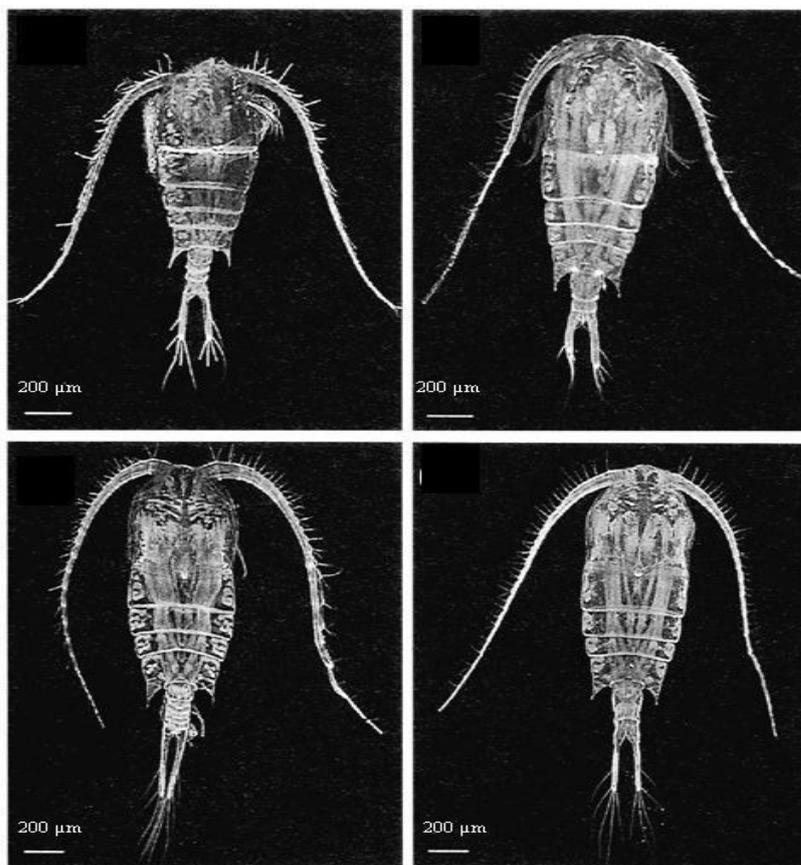


Figura 4. Immagine confocale degli ultimi stadi di sviluppo della *Temora stylifera*, in cui si distinguono morfologicamente adulti maschi da adulti femmine (rispettivamente, in basso a sinistra ed in basso a destra) (Carotenuto 1999).

## 1.2 *Calanus helgolandicus*

Il copepode *Calanus helgolandicus* (Fig. 5) è una specie epipelagica e rappresenta una delle specie chiave nelle acque europee; contribuisce alla biomassa del mesozooplankton fino al 93% (Bonnet et al. 2005). Questi copepodi hanno un ruolo critico come predatori del microplankton e come componenti nella dieta di larve, giovani e adulti di importanti specie ittiche, come lo sgombro, aringa e merluzzo (Runge 1988; Kaartvedt 2000).

*C. helgolandicus* è distribuito su una vasta gamma di habitat, dagli oceani aperti agli ambienti costieri (Bonnet et al. 2005) ed è molto abbondante nell' Oceano Atlantico, nel Mare del Nord e nel bacino del Mediterraneo, dove raggiunge abbondanze più alte nel Mare Adriatico. Tuttavia, in conseguenza al riscaldamento delle acque, la distribuzione del *Calanus* è andata man mano ampliandosi (Mazzocchi et al. 2011; Yebra et al. 2011; Bonnet et al. 2005). Nel Mar Mediterraneo, il genere *Calanus* lo ritroviamo sia nel bacino occidentale (Mar Tirreno), che nel bacino orientale (Mar Adriatico), ma con caratteristiche genetiche differenti (Yebra et al. 2011). Nel Mar Adriatico, *C. helgolandicus* è uno dei taxa di copepodi dominanti, si trova nella parte centrale e settentrionale del bacino da marzo a settembre, con il massimo dell' abbondanza in primavera (Bonnet et al. 2005). Nel Mar Tirreno, la specie mostra una distribuzione bimodale nel mese di febbraio e aprile, con una popolazione di superficie (0-200 m) e una nelle acque più profonde (600-800 m).

Nel Golfo di Napoli, in particolare, i picchi maggiori della popolazione di *C. helgolandicus* sono stati riscontrati all'inizio della primavera e in estate.

*C. helgolandicus* è una specie ampiamente studiata, per gli effetti negativi delle ossilipine derivate dalle diatomee sulla sua riproduzione, il successo cova, lo sviluppo dei nauplii; questi esperimenti sono stati condotti sia in laboratorio che sul campo (Ianora & Miralto 2010). Recentemente, è stata utilizzata come specie modello per indagare le risposte allo stress dei copepodi alimentati con diatomee, utilizzando come metodo molecolare la qPCR (Lauritano et al. 2011) e le librerie EST (Carotenuto et al. 2014).



Figura 5. Adulto femmina di *C. helgolandicus*

### 1.3 Le Diatomee

Le diatomee sono alghe unicellulari con uno scheletro siliceo, la cui forma può variare a seconda della specie (Fig.6). Nelle cellule sono contenute gocce lipidiche che permettono il galleggiamento della microalga. Il citoplasma è delimitato da una capsula silicea detta frustulo composta di due valve: la valva superiore, detta epiteca, si incastra in quella inferiore, detta ipoteca, andando così a formare una scatola.



Figura 6. Varietà di forme di diatomee

La riproduzione avviene normalmente per divisione cellulare, in cui ogni cellula figlia formerà una nuova valva che si andrà a legare alla valva proveniente dalla cellula madre. Durante questo processo, si generano due cellule figlie di dimensioni non identiche, in cui una sarà sempre più piccola della cellula madre. A causa di questa progressiva riduzione di taglia di una delle due cellule figlie, durante i ripetuti cicli di divisione cellulare, la popolazione va incontro a riproduzione sessuata. Solitamente, due cellule vicine si circondano di un comune involucro mucillaginoso e, mentre le loro valve si vanno aprendo, subiscono ciascuna la meiosi. Dei quattro nuclei aploidi che si formano in ogni cellula, solitamente due degenerano; avviene quindi la divisione cellulare, o citodieresi, con formazione di due gameti di dimensioni leggermente diverse. I quattro gameti risultanti dalle divisioni delle due cellule iniziali si fondono dando origine a due zigoti che inizieranno un processo di accrescimento, chiamato auxosporulazione. Ciascun zigote aumenta di volume e raggiunge una taglia ottimale: si forma così l'auxospora, una cellula di grandi dimensioni con una parete più o meno

silicizzata, all'interno della quale si formerà la cellula iniziale, che formerà le nuove teche. In alcune specie, le cellule figlie ottenute per divisione cellulare si separano completamente, mentre in altre rimangono attaccate formando lunghe catene, come nel caso di *Skeletonema marinoi*.

#### 1.4 *Skeletonema marinoi*

La *S. marinoi* è una diatomea centrica cosmopolita di circa 10-12  $\mu\text{m}$  di diametro, che forma catene ed appartiene alla Classe delle *Coscinodiscophyceae* (Fig. 7).

È una specie diffusa in ambienti marini costieri dell'Oceano Atlantico nord orientale e del Mar Mediterraneo (Kooistra et al. 2008), dove forma dense fioriture. Nel Mediterraneo, *S. marinoi* forma fioriture ricorrenti in inverno-primavera nel Mare Adriatico, con massima abbondanza durante febbraio-marzo (Aubry et al. 2004). In questi stessi periodi, sono stati riscontrati tassi di riproduzione dei copepodi estremamente bassi, associati alla produzione delle aldeidi poliinsature (PUA) prodotte dalla *S. marinoi*, e che interferiscono con il normale sviluppo delle uova. *S. marinoi*, infatti, è un produttore di PUAs ed altre ossilipine tra cui ossiacidi, idrossiacidi e alcoli epossidici (Fontana et al. 2007), ed è stata frequentemente utilizzata in numerosi esperimenti per valutare l'effetto delle ossilipine sulla riproduzione dei copepodi. In particolare, tali studi sono stati condotti in laboratorio e *in situ* nel Nord Adriatico, utilizzando come specie modello il *C. helgolandicus* (Ianora et al. 2004), che domina lo zooplancton del Nord Adriatico in inverno-primavera, in coincidenza con le fioriture di *S. marinoi*.

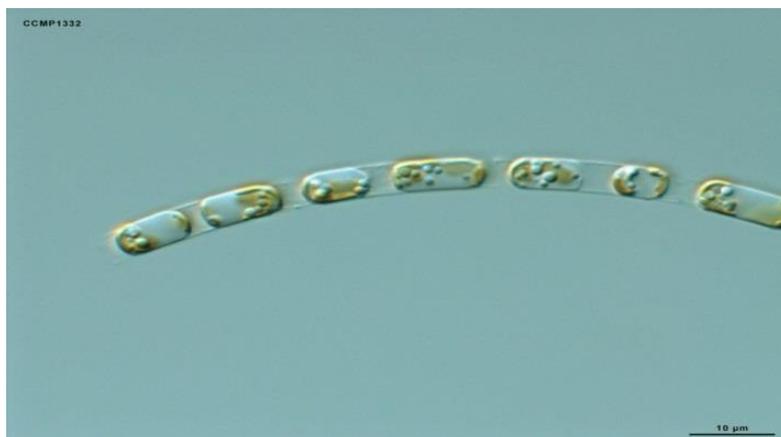


Figura 7. Diatomea *Skeletonema marinoi* appartenente alla classe delle *Coscinodiscophyceae*.

## 1.5 Alimentazione

L'alimentazione è la principale via per il trasferimento di energia da un livello trofico più basso ad uno più alto, rappresentando, quindi, un fattore chiave negli studi sulle interazioni trofiche. Lo zooplancton può essere classificato in carnivoro, onnivoro o erbivoro, in base alla preferenza della dieta per organismi autotrofi o eterotrofi. L'alimentazione dello zooplancton viene generalmente espresso in termini di tassi di filtrazione e tassi di ingestione. Il tasso di filtrazione viene definito come il volume di acqua filtrata dall'individuo nell'unità di tempo. Ciò corrisponde al volume di acqua processata se assumiamo il 100% di efficienza di cattura e una concentrazione di cibo omogenea. Il tasso di ingestione, invece, rappresenta il numero di particelle di cibo (cellule algali) ingerite dall'individuo nell'unità di tempo, e può essere convertito in unità di massa conoscendo il contenuto cellulare di carbonio delle alghe. La determinazione di questi tassi comporta l'incubazione dello zooplancton in bottiglie con una concentrazione algale nota e per un tempo stabilito. La misura della diminuzione del numero di cellule algali nella bottiglia viene poi confrontata con il numero di cellule presenti in una bottiglia di controllo, dove non sono stati incubati animali (Frost 1972). Questo approccio è il metodo diretto più semplice ed uno dei più utilizzati per lo zooplancton, che però può essere influenzato da alcuni fattori, quali lo stress da cattura, la presenza di un numero eccessivo di individui nelle bottiglie sperimentali, e le interazioni con le pareti del contenitore. Tali effetti, nel complesso, sono conosciuti con il nome di "effetto bottiglia" (Roman e Rublee 1980). Nel calcolo dei tassi di ingestione si assume che la crescita algale sia identica nella bottiglia di controllo e in quella dove sono presenti gli animali. Talvolta, però, l'escrezione di ammonio o altri cataboliti da parte dello zooplancton, può stimolare la crescita del fitoplancton, generando, così, dei tassi di ingestione negativi. Nonostante questi svantaggi, tale metodo è comunque il più utilizzato per la quantificazione dei tassi di ingestione dello zooplancton in laboratorio. Dam et al. (2003), per esempio, utilizza tale metodo per valutare il tasso di ingestione del copepode calanoide *Temora longicornis* in presenza di differenti diete. Recentemente, questo protocollo sperimentale è stato utilizzato anche da Alajimi et al. (2015) per confrontare il comportamento di popolazioni selvatiche o addomesticate in laboratorio da utilizzare in acquacoltura. Questo metodo è stato anche utilizzato per testare l'effetto delle ossilipine sul tasso di ingestione di *T. stylifera* (Kâ et al. 2013). Una limitazione del metodo classico definito 'food removal' (Frost 1972), è il fatto che non permette di quantificare il cibo ingerito *in situ* dai copepodi in maniera precisa. Per

questo motivo, sono stati proposti recentemente altri metodi alternativi basati sull'identificazione e quantificazione del DNA algale nei copepodi, utilizzando tecniche di amplificazione come la Polymerase Chain Reaction (PCR) e la real-time PCR, denominata anche PCR quantitativa (qPCR) (Nejstgaard et al. 2008; Simonelli et al. 2009).

### 1.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)

La PCR, o reazione a catena della polimerasi, è un metodo che viene utilizzato per amplificare particolari porzioni di DNA mediante l'uso di sonde specifiche. La PCR ricostruisce *in vitro* un passaggio della duplicazione del DNA: la sintesi di un filamento nuovo a partire da un filamento stampo. Questo processo è mediato dall'enzima DNA polimerasi, che sintetizza il DNA in direzione 5'→3' aggiungendo deossinucleotidi trifosfati (dNTP) all'estremità 3'. La DNA polimerasi utilizzata per la PCR è una polimerasi termostabile, chiamata Taq polimerasi, che viene estratta dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*. La peculiarità della PCR è la possibilità di realizzare più cicli di sintesi in sequenza, in ciascuno dei quali viene duplicato anche il DNA sintetizzato nelle fasi precedenti.

Il primo passaggio della PCR è la denaturazione del DNA a temperature molto alte, in genere intorno ai 95 °C; al DNA denaturato si associano sonde specifiche (primer), complementari all'estremità della sequenza da amplificare (annealing). La Taq polimerasi copia lo stampo a partire dai primer inserendo i dNTP (extension). Nel ciclo successivo, il DNA viene nuovamente denaturato, legato dai primer ed utilizzato per un nuovo ciclo di sintesi (Fig. 8). Importante per la reazione di PCR è lo ione  $Mg^{++}$  contenuto nel buffer, che influenza l'attività dell'enzima e condiziona l'attacco delle sonde (primer) al DNA stesso.

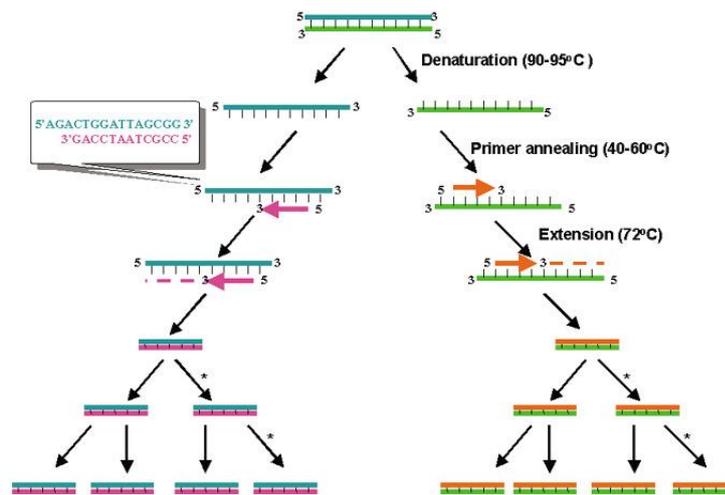


Figura 8. Descrizione del meccanismo della reazione a catena della polimerasi (PCR).

I cicli possono essere ripetuti anche fino a 60 volte, portando all'amplificazione esponenziale del DNA bersaglio secondo la formula:

$$N = (1 + e)^n \quad \text{dove,}$$

N = numero di copie amplificate al termine della reazione;

e = efficienza dell'amplificazione, dove e ha un valore spesso compreso tra 0,7 e 0,8;

n = numero di cicli di amplificazione.

### 1.7 Real-time PCR (qPCR)

La PCR real-time, denominata anche PCR quantitativa (qPCR), è una delle tecniche più utilizzate per misurare l'amplificazione di un prodotto in tempo reale durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza di amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione. Il metodo, quindi, associa amplificazione e quantificazione in una sola reazione. Le linee guida per lo svolgimento di un corretto esperimento di qPCR sono riassunte in Bustin et al. (2009).

Per valutare la quantificazione in tempo reale si utilizza un colorante fluorescente intercalante il DNA, il SYBR Green, il quale si lega preferenzialmente al DNA a doppio filamento (dsDNA) (Fig. 9).

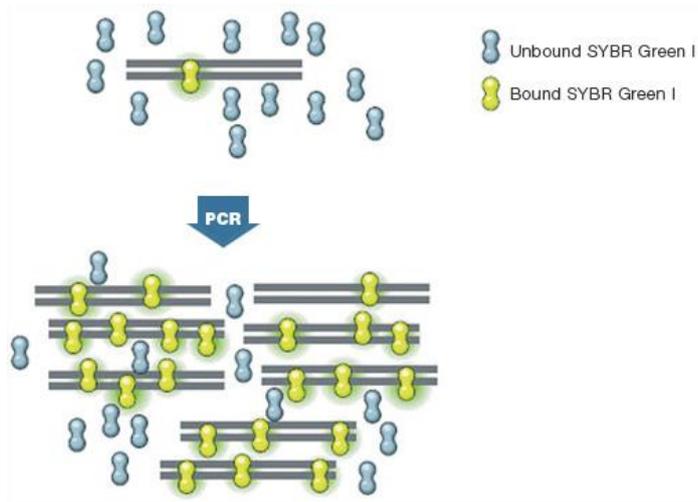


Figura 9. Meccanismo di azione del SYBR green che lega il dsDNA.

L'amplificazione del DNA template in qPCR si può dividere in due fasi: una fase esponenziale, in cui i prodotti di PCR raddoppiano approssimativamente ad ogni ciclo, ed una fase non esponenziale o fase di plateau, in cui i componenti della reazione diventano limitanti, in genere dopo il 28° ciclo. La risultante curva ha un andamento sigmoide (Fig.10).

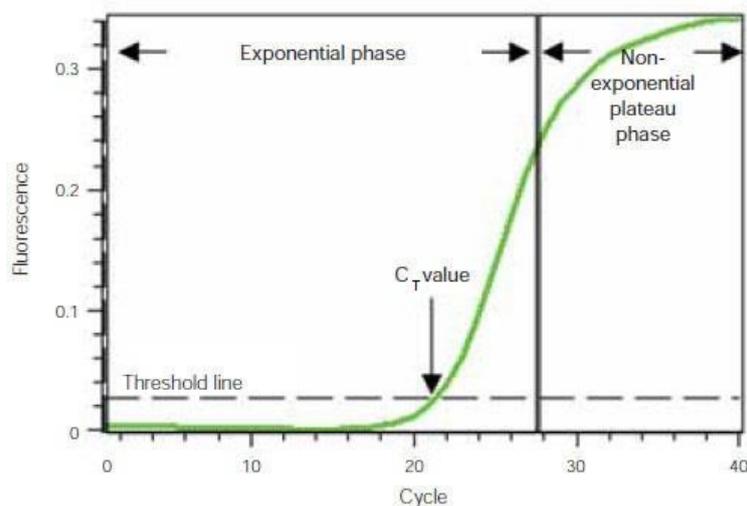


Figura 10. Andamento dell'amplificazione nella qPCR.

Il numero del ciclo al quale il prodotto amplificato è abbastanza rilevante per produrre un segnale fluorescente è chiamato "threshold cycle" ( $C_t$ ), e viene calcolato automaticamente dal software di analisi della qPCR. Si avrà un  $C_t$  piccolo nel caso in cui la quantità di prodotto iniziale (template) è elevata e sono necessari pochi cicli di

amplificazione. Questa relazione tra la quantità di prodotto iniziale ed il valore  $C_t$  ottenuto durante l'amplificazione, è alla base dell'aspetto quantitativo della qPCR. Per un'accurata e riproducibile quantificazione di un campione mediante qPCR, è prima necessario ottimizzare il saggio mediante l'analisi di diluizioni seriali del campione stesso. Sarà quindi possibile generare una curva standard tra i Log dei fattori di diluizione del campione ed i  $C_t$  ottenuti durante l'amplificazione di ogni diluizione (Fig. 11). L'equazione della regressione lineare ed il coefficiente di determinazione della retta ( $R^2$ ), saranno utilizzati per valutare se il saggio di qPCR è ottimizzato.

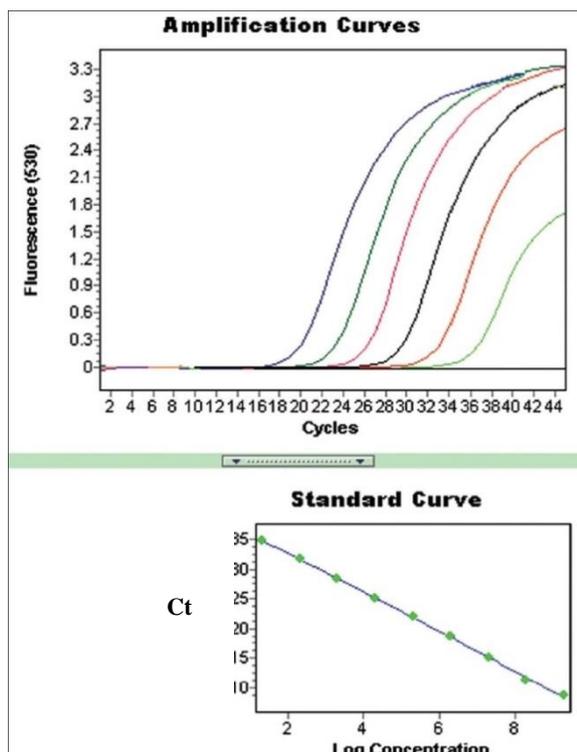


Figura 11. Esempio di curva standard tra i Log dei fattori di diluizione del campione ed i  $C_t$  ottenuti durante l'amplificazione di ogni diluizione.

In particolare,  $R^2$  dovrà essere approssimativamente uguale ad 1, mentre la pendenza della retta verrà utilizzata per calcolare l'efficienza (E) di amplificazione del saggio di qPCR, secondo la formula:

$$E = 10^{-1/\text{pendenza}}$$

Poiché l'efficienza è spesso rappresentata in termini di percentuale, la formula diventa:

$$\% \text{ Efficienza} = (E-1) \times 100$$

Un saggio di qPCR deve avere, di norma, un'efficienza di amplificazione compresa tra 90% e 120%.

Un altro importante parametro che ci indica la specificità dell'amplificazione mediante qPCR è la curva di melting, la quale è generata al termine della reazione di amplificazione, monitorando la fluorescenza all'aumentare della temperatura. La curva di melting è importante per assicurarsi che non ci siano prodotti aspecifici generati durante l'amplificazione, e deve raffigurare un singolo picco corrispondente alla temperatura di melting dell'amplicone  $T_m$  (Fig. 12). La  $T_m$  è definita come la T alla quale il 50% delle basi del dsDNA sono separate.

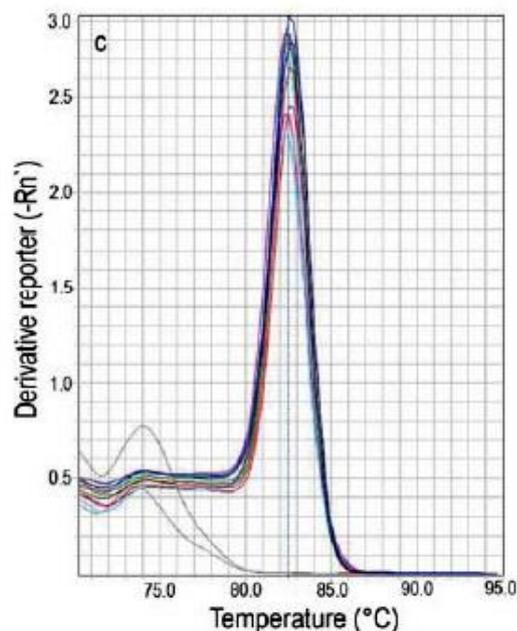


Figura 12. Esempio di curve di melting ottimali, in cui è visibile un solo picco, corrispondente alla  $T_m$  dell'amplicone.

Come detto in precedenza, la qPCR permette di determinare la quantità assoluta di acidi nucleici, in termini di numero di copie del gene amplificato o di ng di DNA, presenti in una data quantità di campione (template) espressa in termini di numero di cellule o volume. La quantificazione assoluta di un campione incognito, in particolare, viene ottenuta per comparazione dei valori di  $C_t$  dei campioni test su una curva standard, costruita in questo caso tra i Log delle concentrazioni note del campione diluito in modo seriale ( $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ ) ed i corrispondenti  $C_t$  ottenuti durante l'amplificazione di ogni diluizione. E' fondamentale che sia i campioni a concentrazione nota che quelli incogniti, siano amplificati in parallelo nella stessa corsa di qPCR.

Grazie alla sua sensibilità, precisione ed efficienza, la tecnica della qPCR è stata utilizzata con successo in alcuni studi volti a quantificare il tasso di ingestione algale nei copepodi. In particolare, Nejstgaard et al. (2008) è stato il primo ad utilizzare la qPCR

per valutare l'ingestione da parte dei copepodi *T. longicornis* e *Acartia clausi* durante una fioritura algale di *Phaeocystis globosa* nel Mare del Nord. Successivamente, Simonelli et al. (2009) ha condotto un'accurata analisi comparativa dei protocolli di conservazione dei campioni animali ed algali e di estrazione del materiale genomico, per definire una procedura sperimentale ottimale negli studi molecolari dei tassi di ingestione dei copepodi. Recentemente, Barofsky et al. (2010) ha determinato la preferenza alimentare di *Calanus* spp. per *S. marinoi* in diverse fasi di crescita, sia in laboratorio che durante esperimenti condotti in mesocosmi. Infine, Durbin et al. (2012) ha quantificato il DNA ribosomiale 18S specifico per la diatomea *Thalassiosira weissflogii* nel copepode *Acartia tonsa* in esperimenti di laboratorio. Purtroppo, non esistono studi analoghi su specie di copepodi e microalghe coesistenti nel Mediterraneo. In considerazione della rilevanza ecologica del copepode *C. helgolandicus* e della diatomea *S. marinoi* per la dinamica del plancton del Mar Mediterraneo, e della capacità di *S. marinoi* di produrre metaboliti secondari (ossilipine) ad azione antiproliferativa verso i consumatori, sarebbe estremamente utile conoscere i tassi di ingestione *in situ* di *C. helgolandicus* durante una tipica fioritura algale di *S. marinoi*. A tale scopo, l'obiettivo di questa tesi è la messa a punto di un metodo molecolare basato sulla qPCR, per quantificare l'ingestione di *C. helgolandicus* su *S. marinoi*.

# Materiali e metodi

## *2.1 Preparazione della coltura di *Skeletonema marinoi**

La *Skeletonema marinoi* è stata coltivata in terreno di coltura f2, contenente sali inorganici quali fosfati, nitrati e silicati, necessari alla formazione dello scheletro siliceo, oltre al ferro e alle vitamine . Il mezzo di coltura è stato preparato con acqua di mare prelevata dal Golfo di Napoli dal Servizio Pesca della Stazione Zoologica e successivamente filtrata su 0.22 µm per allontanare le specie algali e batteriche presenti. Il terreno di coltura è stato poi sterilizzato in autoclave ad una temperatura di 120°C, alla pressione di 1 atm, per 60 minuti circa, ed infine sono state aggiunte quantità note di vitamine.

La coltura è stata allestita in bottiglie di vetro coniche da 1L incubate in camera termostatica alla temperatura di 20°C ed un ciclo luce:buio di 12 ore. Ogni settimana, la coltura è stata rinnovata mediante aggiunta di nuovo terreno f2, in modo da generare una coltura semicontinua sempre in fase esponenziale.

Questa coltura di *S. marinoi* è stata, quindi, utilizzata per ottenere i pellet algali per l'estrazione del DNA. Un volume di 500 ml di coltura è stato ripartito in 10 tubi falcon da 50 ml e centrifugato a 5000 rcf per 30 minuti. Dopo l'eliminazione del surnatante, il pellet è stato risospeso con 2 ml di acqua di mare filtrata (0.22 µm), trasferito in tubi eppendorf da 2 ml e centrifugato a 12000 rpm per 15 minuti. Il surnatante è stato eliminato ed il pellet congelato a -80° C.

## *2.2 Estrazione del DNA di *Skeletonema marinoi**

Per estrarre il DNA dal pellet di *S. marinoi* è stato utilizzato il Blood and Tissue Kit (Qiagen), seguendo le istruzioni riportate dal produttore. In breve, il pellet è stato lisato mediante aggiunta di buffer incluso nel kit, ad una T di 56°C per 30 minuti ed il DNA algale adsorbito specificamente su mini colonna inclusa nel kit. Infine, è stato poi eluito con 200 µl di buffer AE incluso nel kit (Fig.13).

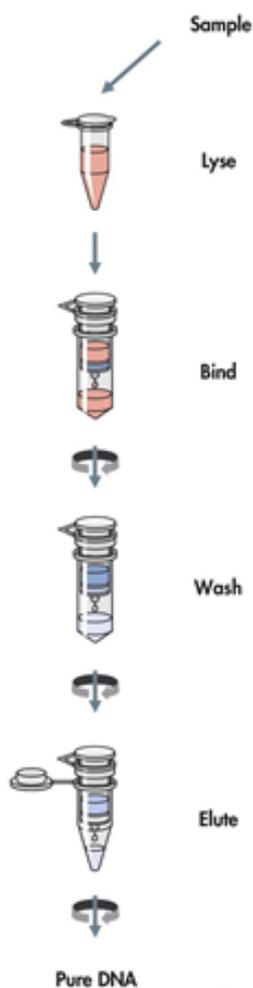


Figura 13. Schema del protocollo di estrazione del DNA di *Skeletonema marinoi* mediante Blood and Tissue Kit (Qiagen).

Il DNA risultante è stato quantificato al Nanodrop ( figura 14) alla lunghezza d'onda di 260 nm e visualizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio (0,5%), in presenza di Bromuro di Etidio come agente intercalante. Come marcatore dimensionale del DNA è stato utilizzato il Lambda2. Ci aspettiamo una banda di DNA in corrispondenza di 50 kilo basi (kb).



Figura 14. Nanodrop

### 2.3 Disegno di Primer specifici per 18S rDNA di *Skeletonema marinoi*

Per disegnare i primer specifici per il gene ribosomiale 18S di *S. marinoi*, i domini conservati delle sequenze di rDNA 18S depositate nel database genico Genbank corrispondenti a vari strain di *S. marinoi*, sono stati allineati mediante i software Clustal W Multiple Alignment Tool e BioEdit Sequence Alignment Editor. La sequenza consenso così generata è stato poi utilizzata come riferimento per disegnare coppie di primers utilizzando il programma Primer3, applicando condizioni predefinite quali: temperatura di 'melting' ( $T_m$ ) di 60 °C, lunghezza del primer di 18-24 bp, %GC di 40-60, bassa probabilità di formare strutture secondarie interne. Sono state, infine, scelte coppie di primer che amplificano prodotti di diversa lunghezza, per valutare se esiste una relazione tra il tasso di ingestione algale di *C. helgolandicus*, stimato mediante qRT-PCR, e la dimensione dell'amplicone.

### 2.4 Verifica della specificità dei primer

La specificità dei primer nei confronti della sequenza di rDNA 18S di *S. marinoi*, è stata verificata mediante PCR. Per ogni coppia di primer, è stata preparata una miscela contenente il DNA estratto di *S. marinoi* (1  $\mu$ l), PCR Buffer contenente Mg (2  $\mu$ l), dNTP (2  $\mu$ l), primer specifico forward (F) alla concentrazione di 20 picomol  $\cdot \mu$ l<sup>-1</sup> (1  $\mu$ l), primer specifico reverse (R) alla concentrazione di 20 picomol  $\cdot \mu$ l<sup>-1</sup> (1  $\mu$ l), enzima Taq (0.5  $\mu$ l), acqua distillata (BDW) (12,5  $\mu$ l), fino ad ottenere un volume finale di 20  $\mu$ l. Per ogni reazione di PCR sono stati inclusi controlli negativi in assenza di DNA. Le condizioni di PCR utilizzate nello strumento T100 Thermal Cycler (Biorad) sono mostrate in tabella 1.

Tabella 1. Condizioni di PCR utilizzate per ogni esperimento.

Fase 1: attivazione Taq	95°C	3 min
Fase 2: denaturazione	95°C	30 sec
Fase 3: annealing	60 °C	1 min
Fase 4: sintesi	72°C	30 sec
Ripetere da Fase 2 a 4		40 volte
Fase 6: estensione	72°C	7 min

I prodotti di PCR sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio (1,5%), in presenza di Bromuro di Etidio come agente intercalante, ed utilizzando come marcatore dimensionale il ladder 100bp.

### *2.5 Sequenziamento dei prodotti di PCR*

Le bande corrispondenti ai prodotti di amplificazione della lunghezza attesa sono state tagliate dal gel di agarosio e sottoposte alla procedura di purificazione mediante il GenElute Gel Extraction Kit (SIGMA), per estrarre il DNA amplificato e sequenziarlo. In breve, il gel è stato solubilizzato mediante buffer incluso nel kit, alla T di 55°C per 10 minuti, seguendo il protocollo descritto dal produttore ed adsorbito specificamente su mini colonna inclusa nel kit. Infine, è stato poi eluito con 30 µl di buffer.

I prodotti di PCR così purificati sono poi stati sequenziati presso il servizio di Biologia Molecolare della Stazione Zoologica, a partire da una concentrazione finale di DNA di 300 femtomoli. Le sequenze ottenute sono poi state allineate, mediante il programma BLAST, con la sequenza utilizzata per disegnare i primer, per confermare la specificità del prodotto amplificato.

### *2.6 Verifica dell'efficienza dei Primer in qRT-PCR*

Per poter effettuare la successiva analisi quantitativa dei prodotti di amplificazione mediante Real Time quantitative PCR (RT-qPCR), è stata determinata l'efficienza di amplificazione per ciascuna coppia di primer, mediante la costruzione di una retta standard tra il logaritmo (Log) dei fattori di diluizione del campione di DNA ed i  $C_t$

ottenuti durante l'amplificazione di ogni diluizione. Il DNA iniziale è stato diluito in modo seriale con BDW, preparando diluizioni di 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000 ed 1:100.000, in cui ogni diluizione è preparata a partire da quella precedente. Le condizioni di qPCR utilizzate sullo strumento Viia7 Real Time PCR System (Applied Biosystem), sono riportate in tabella 2.2.

Tabella 2. Condizioni di qPCR utilizzate per ogni esperimento.

Fase 1: attivazione Taq+denaturazione	95°C	10 min.
Fase 2: annealing	95°C	1 sec.
Fase 3: sintesi	60 °C	20 sec.
Ripetere dalla fase 2 alla 3		39 volte
Fase 4	Curve di melting	

Dalla pendenza della retta standard, è stata poi calcolata l'efficienza di amplificazione dei primer (E). La piastra di reazione di qPCR da 384 pozzetti (MicroAmp Optical 384-well reaction plate, Applied Biosystem), è stata preparata allestendo una miscela in cui è presente Fast Start SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem) (5µl), i primer specifici forward e reverse alla concentrazione di 0,7 picomol · µl<sup>-1</sup> (4µl); 1 µl di DNA alle varie diluizioni. Per ciascuna coppia di primer e ciascuna diluizione di DNA, sono stati preparati tre replicati tecnici. Infine, per confermare la specificità di amplificazione di ciascuna coppia di primer, è stata verificata l'assenza di eventuali altri prodotti dall'esame delle curve di melting della qPCR (figura 15).

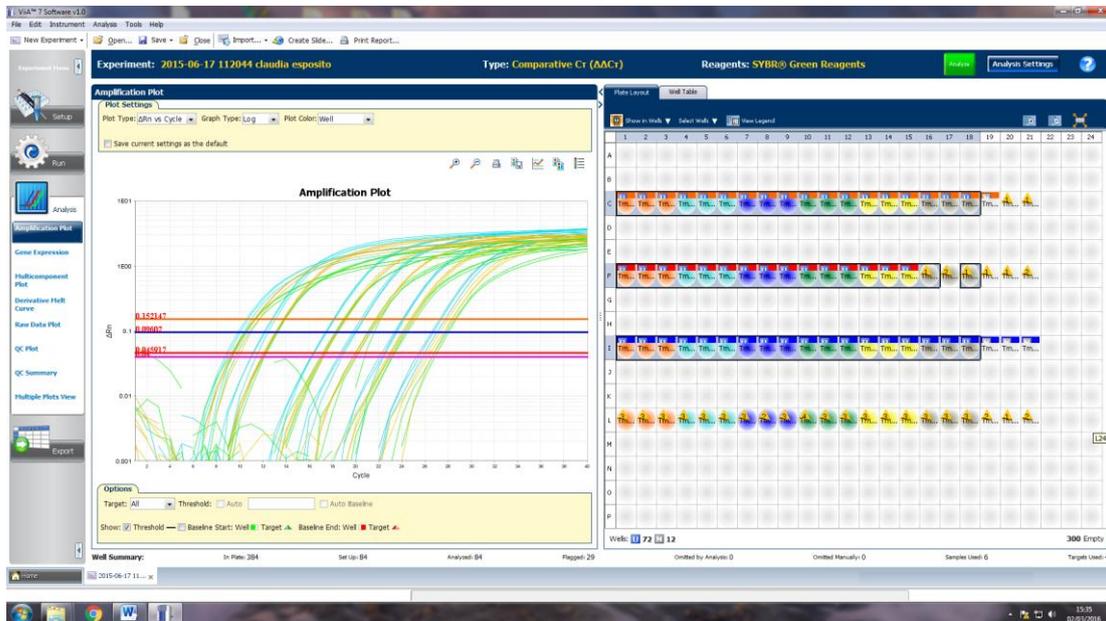


Figura 15. Esempio di analisi di una piastra di qPCR.

## 2.7 Campionamento e sorting dello zooplancton

Il campionamento dello zooplancton è stato effettuato dal Servizio Pesca della SZN nel golfo di Napoli nel periodo aprile-giugno 2015, mediante un retino di tipo Nansen, che presenta un'apertura del diametro di 1 metro ed una maglia da 250  $\mu\text{m}$ . Il campione è stato poi conservato in contenitori di 10 L e trasportato in laboratorio in un frigo box. In laboratorio, è stato effettuato un "sorting", ovvero la selezione di femmine del copepode *C. helgolandicus*, mediante stereo-microscopio. I copepodi ( $N = 30-40$ ) sono stati trasferiti in bottiglie da 1L contenenti acqua di mare filtrata su 50  $\mu\text{m}$  ed alimentati quindi con il fitoplancton naturale presente nell'acqua, ed incubati per alcuni giorni alla T di 20°C e un ciclo luce:buio di 12 ore.

## 2.8 Esperimenti di alimentazione

Per quantificare l'ingestione di *S. marinoi* da parte di *C. helgolandicus*, le femmine ( $N = 30-40$ ) sono state prima incubate overnight in bottiglie da 1L contenenti acqua di mare filtrata 0.22  $\mu\text{m}$  (FSW), per consentire l'eliminazione del cibo ingerito in precedenza. Dopo 24h, alcuni individui sono stati posti in eppendorf senza acqua e congelati immediatamente in azoto liquido ( $t=0$ , controllo, due replicati da 8 individui); i restanti individui sono stati incubati per 30 min ( $t=30$ , due replicati da 8 individui) in una bottiglia da 500 ml contenete FSW e *S. marinoi* (50.000 cell· ml<sup>-1</sup>). Complessivamente,

sono stati condotti tre esperimenti indipendenti di alimentazione con individui raccolti durante campionamenti diversi. Trascorsi i 30 minuti, i copepodi sono stati lavati con FSW, ripartiti in 2 tubi eppendorf e congelati in azoto liquido. Le eppendorf sono poi state conservate a -80°C fino alla successiva estrazione del DNA. Al termine di ciascuno esperimento, tre aliquote di 1 ml, 2ml e 5ml, della sospensione di *S. marinoi* in cui erano incubati gli animali, sono state filtrate su filtri SUPOR di polietersulfone (PES) da 0.22µm, ed il DNA estratto mediante il kit Blood & Tissue e quantificato al Nanodrop. Queste aliquote sono state utilizzate per ricavare una relazione lineare tra il numero di cellule algali e la quantità di DNA (ng) contenuto in esse. Tale relazione verrà utilizzata al termine dell'esperimento di qPCR per convertire i ng di DNA ingeriti dai copepodi in cellule algali. Infine, tutta la coltura di *S. marinoi* utilizzata per ciascun esperimento di alimentazione, è stata ripartita in tubi falcon da 50 ml e centrifugata a 5000 rcf per 30 minuti. Dopo l'eliminazione del surnatante, il pellet è stato risospeso con 2 ml di FSW, trasferito in tubi eppendorf da 2 ml e centrifugato a 12000 rpm per 15 minuti. Il surnatante è stato eliminato ed il pellet congelato a -80° C. Il DNA algale estratto da questi pellet sarà utilizzato come controllo positivo nelle PCR condotte su *C. helgolandicus*, per valutare la specificità di amplificazione dei primer nei copepodi.

## 2.9 Estrazione del DNA dai copepodi

Per estrarre il DNA dai *C. helgolandicus* è stato utilizzato il Blood and Tissue Kit (Qiagen), seguendo le istruzioni riportate dal produttore. L'estrazione comprende ogni eppendorf di uno stesso esperimento comprendente sia copepodi di controllo, sia copepodi alimentati e sia il pellet dell'alga corrispondente. In breve, i copepodi sono stati lisati mediante aggiunta di buffer incluso nel kit, ad una T di 56°C per tutta la notte. La mattina seguente, per circa trenta minuti è stato incubato anche il pellet algale in seguito all'aggiunta del buffer di lisi. Il DNA è stato fatto adsorbire specificamente su mini colonna inclusa nel kit, ed eluito con di 100µl di buffer AE incluso nel kit. Il DNA risultante è stato quantificato al Nanodrop alla lunghezza d'onda di 260 nm e visualizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio (0,5%), in presenza di Bromuro di Etidio come agente intercalante. Il marcatore di peso molecolare è il Lamda2. I rapporti che vengono indicati al Nanodrop (260/280- 260/230) indicano la qualità del DNA, e dovranno essere compresi tra 1.8 e 2.2, per indicare che nel campione non ci siano proteine o contaminanti organici.

## 2.10 PCR di *Skeletonema marinoi* in *Calanus helgolandicus*

Prima di procedere con l'analisi di qPCR, è stata verificata la qualità del DNA estratto mediante PCR. Per ogni coppia di primer, è stata preparata una miscela contenente il DNA dei copepodi o dell'alga, estratti in ciascun esperimento di feeding (1 $\mu$ l), PCR Buffer contenente Mg (2 $\mu$ l), dNTP (2  $\mu$ l), primer specifico forward (F) alla concentrazione di 20 picomol  $\cdot$   $\mu$ l<sup>-1</sup> (0.5 $\mu$ l), primer specifico reverse (R) alla concentrazione di 20 picomol  $\cdot$   $\mu$ l<sup>-1</sup> (0.5 $\mu$ l), enzima Taq (0.5  $\mu$ l), acqua distillata (13,5  $\mu$ l), fino ad ottenere un volume finale di 20 $\mu$ l. In questa reazione è stata utilizzata metà della quantità dei primer specifici, rispetto alla sola reazione contenete l'alga. Per ogni reazione di PCR sono stati inclusi controlli negativi in assenza di DNA. Le condizioni di PCR sono le stesse impiegate precedentemente (tabella 2.1). I prodotti di PCR sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio (1,5%), in presenza di Bromuro di Etidio come agente intercalante, ed utilizzando come marcatore dimensionale il ladder 100bp.

## 2.11 qPCR di *Skeletonema marinoi* in *Calanus helgolandicus*

Per allestire la piastra di reazione di qPCR, è stata preparata una miscela composta da SYBR Green (5 $\mu$ l), primer specifici forward e reverse alla concentrazione di 0,7 picomol  $\cdot$   $\mu$ l<sup>-1</sup> (4 $\mu$ l), e DNA template (1 $\mu$ l) alle varie diluizioni. Per ciascuna coppia di primer e ciascuna diluizione di DNA, sono stati preparati tre replicati tecnici. Le condizioni utilizzate per la qPCR sono riportate in tabella 2.2.

Su ciascuna piastra è stato caricato sia il DNA estratto dalla coltura di *S. marinoi* utilizzata in ciascun esperimento di feeding, diluito serialmente 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000 ed 1:100.000, sia il DNA estratto dai copepodi (t=0 e t=30). Si genera così una curva standard tra i logaritmi (Log) delle concentrazioni note del DNA di *S. marinoi* (ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>), ed i corrispondenti C<sub>t</sub>. Dai rispettivi C<sub>t</sub> dei copepodi ed utilizzando l'equazione della retta standard, si determina la quantità di DNA algale ingerita dai copepodi (ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>). I ng di DNA ingeriti da ciascun individuo, sono, infine, convertiti in numero di cellule di *S. marinoi*, utilizzando la relazione lineare ottenuta al termine di ciascun esperimento, tra il numero di cellule di *S. marinoi* estratte e i corrispondenti ng di DNA.

# Risultati

## 3.1 Estrazione del DNA di *Skeletonema marinoi*

Ai fini dell'estrazione del DNA di *S. marinoi*, sono stati processati complessivamente 8 campioni di pellet algali della coltura allestita in laboratorio. In media, la concentrazione dei pellet è compresa tra  $4 \cdot 10^6$  e  $3 \cdot 10^7$  cellule. Il DNA totale di *S. marinoi* estratto da ciascun pellet mediante il Blood and Tissue Kit, ha una concentrazione compresa tra 28.5 e 59.4 ng/ $\mu$ l, con rapporti 260/280 di 1.7-2.0 e 260/230 di 1.17-2.59, indicando pertanto mancanza di contaminazione da proteine e solventi organici, rispettivamente (Tab. 3.1). In figura 16 è mostrata la foto esemplificativa di un gel di agarosio 0.5% su cui sono evidenti le bande di DNA totale estratto da due pellet algali di *S. marinoi*. Come atteso, la banda corrispondente al DNA genomico mostra una dimensione di circa 20 kb. Il DNA totale estratto dai campioni denominati Ske1 e Ske2, avente la migliore combinazione di quantità/qualità, è stato utilizzato come stampo per tutte le successive fasi sperimentali volte a determinare la specificità e l'efficienza di amplificazione dei primer di *S. marinoi* sulle sequenze di rDNA 18S.

Tabella 3. Quantità e qualità del DNA estratto da pellet di *S. marinoi*.

	<b>Concentrazione(ng/<math>\mu</math>l)</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
Ske1	59.4	1.79	2.32
Ske2	48.6	1.88	1.47
Ske3	53.6	1.79	1.79
Ske4	48.1	1.92	2.59
Ske5	41.7	2.01	1.55
Ske6	35.8	1.80	1.80
Ske7	38.5	1.77	1.43
Ske8	28.5	1.70	1.17

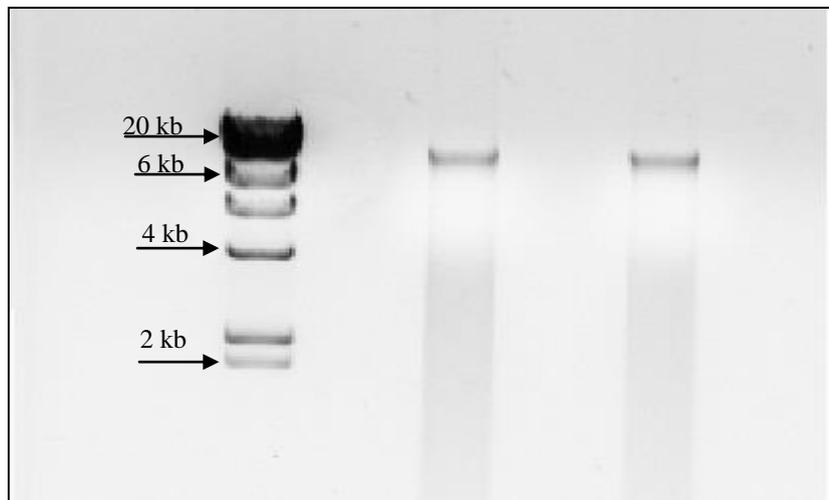


Figura 16. Foto di gel di agarosio 0.5% del DNA totale estratto da due pellet algali di *S.marinoi*. Il marcatore dimensionale è il Lambda2.

### 3.2 Disegno e ottimizzazione di primer per rDNA 18S di *Skeletonema marinoi*

Alla data di inizio del presente lavoro di tesi sperimentali (Marzo 2015), sono presenti in GenBank 33 sequenze geniche parziali o totali di RNA ribosomiale 18S (18S rDNA) di *S. marinoi*, di cui 5 sequenze relative a strains provenienti dal Nord Adriatico, isolati e depositati presso la collezione algale della Stazione Zoologica Anton Dohrn (SZN). L'allineamento dei domini conservati di queste 33 sequenze utilizzando Clustal W Multiple Alignment Tool e BioEdit Sequence Alignment Editor, ha permesso di generare la sequenza consenso sulla quale disegnare i primer specifici per il 18S rDNA. Tale sequenza consenso ha una lunghezza di 1798 bp ed è quasi identica (99%) alle 5 sequenze degli strain depositati presso la SZN, denominati 118, 119, 120, 121 e 146 (numeri di accesso GenBank: AJ632214, AJ632215, AJ632216, AJ632212, AJ632213). Tra le coppie di primer generate dal programma Primer3 sulla sequenza consenso, sulla base di condizioni predefinite di lunghezza e Tm del primer, sono state scelte le seguenti 7 coppie, considerando diverse lunghezze dell'amplicone compresa tra 70 e 206 bp (Tab. 4). Tale intervallo dimensionale è stato scelto per valutare se esiste una relazione tra il tasso di ingestione algale di *C. helgolandicus*, stimato mediante qRT-PCR, e la dimensione dell'amplicone. La coppia di primer Ske70F/Ske70R è simile a quella utilizzata in Barofsky et al. (2010) per amplificare il 18S rDNA di *S. marinoi*, e se ne differenzia per la maggiore lunghezza del primer Reverse (22bp rispetto a 19bp), così modificato per aumentarne la Tm e permettere un'amplificazione ottimale alle condizioni predefinite di PCR.

Tabella 4. Coppie di primer specifici per il DNA ribosomiale 18S di *S. marinoi*. Per ciascuna coppia, sono indicati il nome e la sequenza del primer forward (F) e Reverse (R) e la lunghezza dell'amplicone.

<b>Primer</b>	<b>SEQUENZE 5'=&gt;3'</b>	<b>Lunghezza dell'amplicone</b>
1 Ske 70 F	ACCGCCGTGTTTATTAGTA	70
2 Ske 70 R	TCGAAAGGTTATTATGACTCAC	
3 Ske 72 F	AAAGCGGAACTCTCGGGA	72
4 Ske 72 R	ACTCACCAAATCAACTCCGA	
5 Ske 89 F	GACTCAGGATTGGCGGTT	89
6 Ske 89 R	CCTTGC GACCATACTCCC	
7 Ske 99 F	TATGCCGACTCAGGATTGGC	99
8 Ske 99 R	TCAGCCTTGC GACCATACTC	
9 Ske 122 F	ATCAAAGCGGAACTCTCGG	122
10 Ske 122 R	ATGATCCATTGCCGACACG	
11 Ske 150 F	GCCGTTCTTAGTTGGTGGA	150
12 Ske 150 R	TTGCCGCCATCTTCCTTC	
13 Ske 206 F	AAAGTCTTTGGGTTCCGGG	206
14 Ske 206 R	TCCACCAACTAAGAACGGC	

Ciascuna coppia di primer è stata testata sul DNA di *S. marinoi* estratto precedentemente (Ske1 e Ske2), utilizzando le condizioni di PCR descritte nella sezione Materiali e Metodi. La PCR ha amplificato con successo il gene ribosomiale 18S di *S. marinoi* generando prodotti della lunghezza desiderata per ciascuna coppia di primer. I gel di agarosio sono mostrati in figura 17 Per ciascun amplicone si osserva una singola banda specifica di amplificazione, in corrispondenza della dimensione attesa (compresa tra 70bp e 206bp). Per ogni prodotto di amplificazione, inoltre, è visualizzato il corrispondente controllo negativo in assenza di DNA stampo. Tali controlli negativi mostrano una banda, più o meno definita, di dimensioni inferiori rispetto all'amplicone che deriva dalla polimerizzazione dei primer nella miscela di reazione della PCR in assenza di DNA.

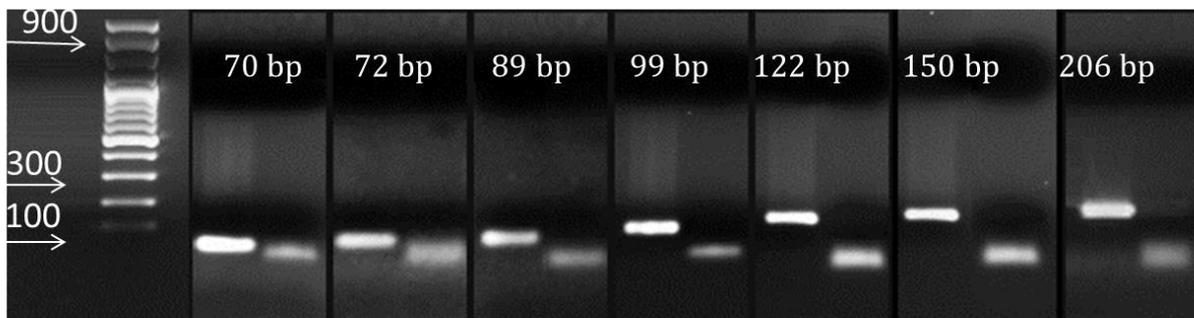


Figura 17 Foto del gel di agarosio 1.5% dei prodotti di PCR. Per ciascuna coppia di primer (Ske 70, Ske 72, Ske 89, Ske 99, Ske 122, Ske 150, Ske 206), sono evidenti le bande corrispondenti alla dimensione attesa con i corrispondenti controlli negativi.

Le bande corrispondenti ai prodotti di amplificazione sono state successivamente tagliate ed il DNA purificato come indicato nei Materiali e Metodi per il successivo sequenziamento. Le sequenze degli ampliconi generate presso il Servizio di Biologia Molecolare e Bioinformatica della SZN sono state, infine, allineate con la sequenza consenso del rDNA 18S di *S. marinoi* utilizzata per disegnare i primer. L'allineamento degli ampliconi di 89 bp, 99 bp, 122 bp, 150 bp, 206 bp, ha confermato la specificità dei prodotti amplificati. Per gli ampliconi di 70 bp e 72 bp, invece, non è stato possibile ottenere le sequenze in quanto la loro dimensione era al di sotto della dimensione minima di analisi dello strumento.

### 3.3 Efficienza dei primer in qRT-PCR

L'efficienza di amplificazione dei primer specifici per il DNA ribosomiale 18S di *S. marinoi* è stata valutata in qRT-PCR mediante la costruzione di una retta standard tra il logaritmo (Log) dei fattori di diluizione del campione di DNA algale ed i  $C_t$  ottenuti durante l'amplificazione di ogni diluizione. Dall'analisi della piastra di qRT-PCR sono state costruite le curve standard per ogni coppia di primer, che mostrano un andamento lineare con un elevato coefficiente di determinazione  $R^2$ , compreso tra 0.98 e 0.99 (figura 18).

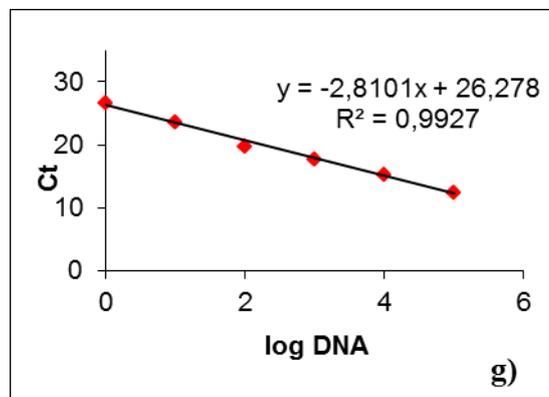
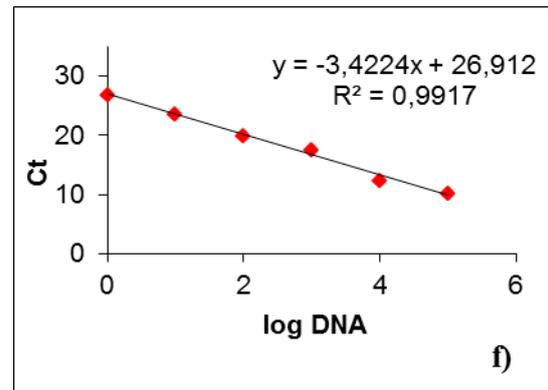
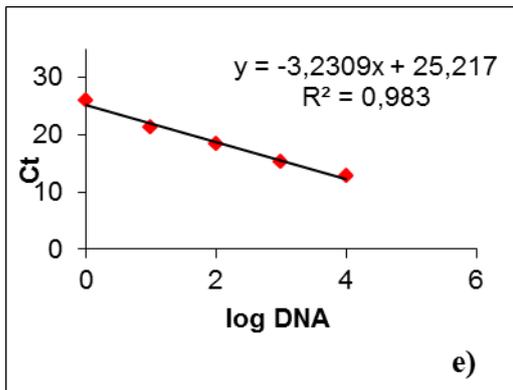
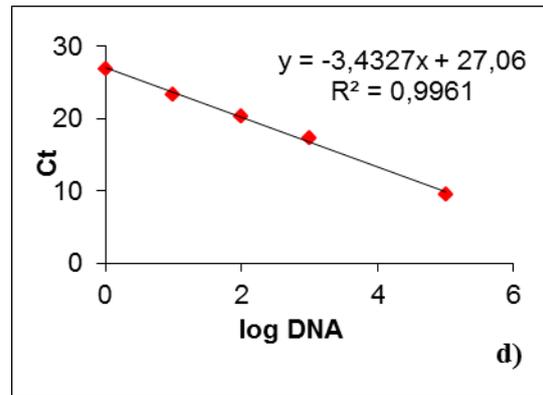
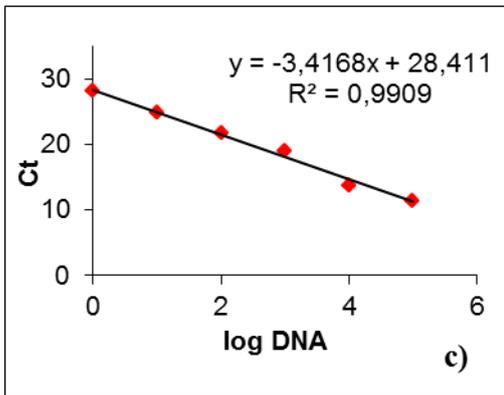
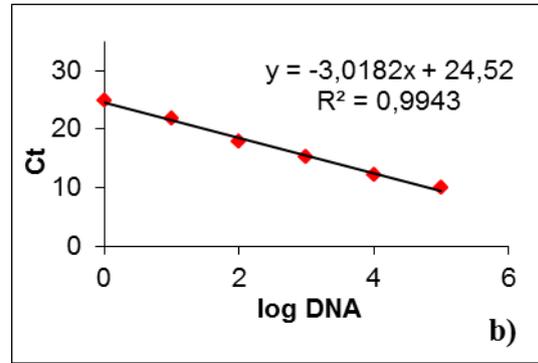
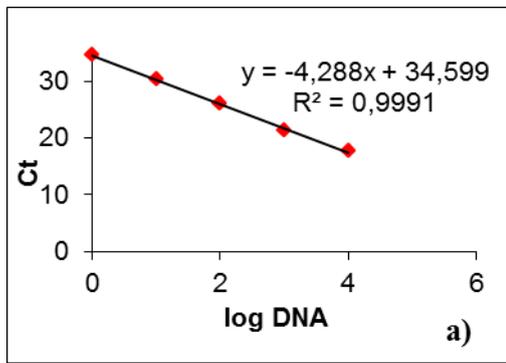


Figura 18. Curve standard per ogni coppia di primer a) Ske 70; b) Ske 72; c) Ske 89; d) Ske 99; e) Ske 122; f) Ske 150; g) Ske 206 con il corrispondente coefficiente di determinazione  $R^2$ .

Le corrispondenti efficienze di amplificazione (E) di ciascuna coppia di primer, calcolate dalla pendenza delle rispettive rette, risultano comprese tra 71% e 127% (Tab.5). Coppie di primer con valori di E inferiori al 90% e superiori al 120% sono considerati non ottimali; pertanto, le coppie di primer Ske 70 e Ske 206 sono state escluse dalla successiva analisi di qPCR sui copepodi.

Tabella 5. Efficienze di amplificazione (E) e corrispondenti percentuali delle coppie di primer testate in qPCR.

<b>Primer</b>	<b>Efficienza</b>	<b>%</b>
Ske 70	1.71	71
Ske 72	2.14	114
Ske 89	1.96	96
Ske 99	1.92	92
Ske 122	2.04	104
Ske 150	1.96	96
Ske 206	2.27	127

L'analisi delle curve di melting relative a ciascuna coppia di primer, ottenute al termine della reazione di qPCR, mostra la presenza di un unico prodotto di amplificazione, caratterizzato da un picco alla corrispondente temperatura di melting dell'amplicone (Tm). In figura 19 è mostrato un esempio di curva di melting relativa all'amplicone Ske 99, in cui è evidente l'assenza di altri prodotti di amplificazione. In conclusione, le coppie di primer Ske 72, 89 bp, 99 bp, 122 bp, 150 bp, che hanno mostrato efficienza di amplificazione ottimale, sono state utilizzate come marcatori molecolari nei successivi esperimenti di alimentazione tra *C. helgolandicus* e *S. marinoi*.

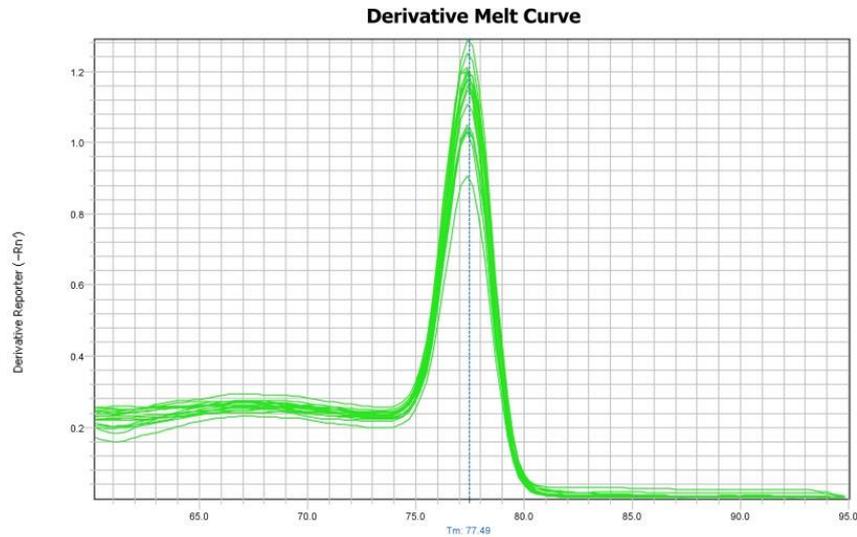


Figura 19. Esempio di una curva di melting del primer Ske 99.

### 3.4 Estrazione del DNA di *Calanus helgolandicus*

La sopravvivenza dei *C. helgolandicus* dopo 24h di incubazione in FSW è stata in media del 90%, a supporto del fatto che gli individui impiegati per il successivo esperimento di alimentazione erano in condizioni ottimali. Sono stati processati complessivamente 3-4 campioni di *C. helgolandicus* per ogni esperimento di alimentazione, di cui 1-2 di controllo senza alimentazione (t=0) e 2 dopo 30 minuti di alimentazione con *S. marinoi* (t=30). In media, la concentrazione del DNA estratto mediante il Blood and Tissue Kit da ciascun replicato di controllo (t=0) e sperimentale (t=30), è compresa tra 9.3 e 25.4 ng/μl, con rapporti 260/280 compresi tra 1.81 e 2.34 e 260/230 compresi tra 0.78 e 2.24, che confermano l'estrazione di un DNA di elevata qualità (Tab. 3.4). Per uniformare i valori tra i singoli replicati, è stata calcolata la concentrazione di DNA estratto da ciascun copepode, tenendo conto del volume di eluizione del DNA (100 μl) e del numero di individui in ciascun replicato. I valori risultanti sono compresi tra 186 e 352 ng di DNA/copepode. Contestualmente all'estrazione dei campioni di *C. helgolandicus*, per ciascun esperimento è stato estratto il pellet algale di *S. marinoi*, che è stato utilizzato come controllo positivo nelle successive PCR, per valutare la specificità di amplificazione dei primer in *C. helgolandicus*. Il DNA estratto da *S. marinoi* ha una concentrazione compresa tra 18.7 e 21.4 ng/μl, con rapporti 260/280 e 260/230 ottimali (Tab. 6).

Tabella 6. Quantità e qualità del DNA estratto da *C. helgolandicus* e *S. marinoi*.

Esperimento	n° Copepodi	Concentrazione (ng/μl)		260/280	260/230	DNA (ng) per copepode
1	6	t=0	21.1	1.81	1.89	352
	11	t=30	30.8	1.89	1.37	280
	10	t=30	27.0	1.87	1.15	270
	Ske		19.7	1.92	1.76	
2	5	t=0	10.8	2.34	0.79	216
	8	t=30	27.5	2.09	1.68	344
	8	t=30	23.3	2.11	1.05	291
	Ske		18.7	2.05	1.21	
3	5	t=0	9.3	2.15	0.78	186
	8	t=30	21.8	2.28	2.24	272
	9	t=30	25.8	2.14	0.82	287
	Ske		21.4	2.03	1.08	

Per verificare ulteriormente la qualità del DNA estratto è stato preparato un gel di agarosio (0.5%), in presenza di Bromuro di Etidio come agente intercalante. Il marcatore di peso molecolare è il Lambda2 come mostrato al lato di ogni gel. La figura 20 mostra la foto esemplificativa di un gel di agarosio relativo all'esperienza 2, in cui sono evidenti le bande di DNA estratto dal campione di controllo (t=0), dai due campioni sperimentali (t=30) e dal campione di *S. marinoi* (Ske); le bande si trovano alla dimensione attesa di 20 kb.

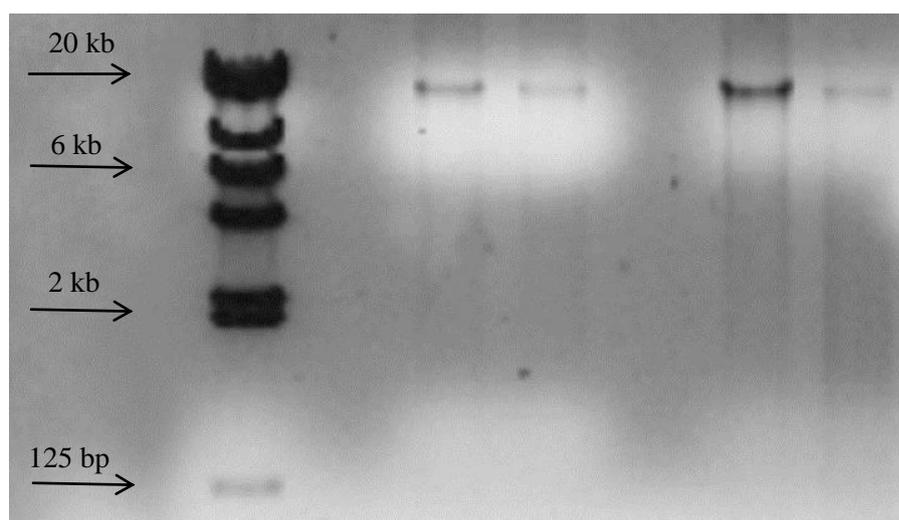


Figura 20. Foto di gel di agarosio 0.5% del DNA totale estratto da *C. helgolandicus* (t=0 e t=30) e da *S. marinoi* relativo all'esperienza 2.

### 3.5 PCR di *Skeletonema marinoi* in *Calanus helgolandicus*

Il DNA estratto dai *C. helgolandicus* alimentati con *S. marinoi*, è stato utilizzato nelle successive PCR per verificare la presenza del rDNA 18S di *S. marinoi*, utilizzando le coppie di primer Ske 72, Ske 89, Ske 99, Ske 122 e Ske 150 e le condizioni di amplificazione riportate in Materiali e Metodi. I prodotti di PCR sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio (1,5%), in presenza di Bromuro di Etidio come agente intercalante, ed utilizzando come marcatore dimensionale il ladder 100bp. In figura 21 è mostrata la foto del gel relativo all'esperimento 1, in cui sono evidenti le bande di 18S rDNA di *S. marinoi* della lunghezza attesa. Si può notare che la banda relativa al campione di *S. marinoi* è più intensa e rispetto alle bande relative ai copepodi, a riprova del fatto che la quantità di DNA all'interno dei copepodi è inferiore rispetto alla quantità presente nel campione algale utilizzato per gli esperimenti di alimentazione. La presenza di una duplice banda nei campioni relativi ai copepodi è dovuta alla presenza in eccesso di primer, i quali hanno effettuato polimerizzazione. I gel relativi agli esperimenti 2 e 3 non sono mostrati in quanto hanno dato risultati identici all'esperimento 1.

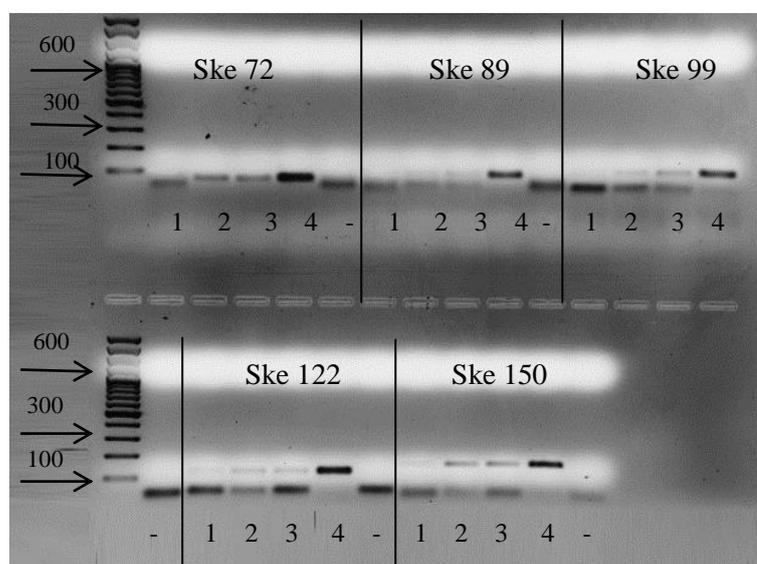


Figura 21. Foto del gel di agarosio 1.5% dei prodotti di PCR relativi all'esperimento 1. Per ciascuna coppia di primer (Ske 72, Ske 89, Ske 99, Ske 122, Ske 150), sono evidenti le bande corrispondenti alla dimensione attesa, relative ai campioni t=0 (1); t=30 replicati 1-2, (2) e (3); Ske (4); negativo (-).

### 3.6 qRT-PCR di *Skeletonema marinoi* in *Calanus helgolandicus*

La quantificazione del DNA di *S. marinoi* ingerito dai *C. helgolandicus* è stata ottenuta mediante qPCR secondo il protocollo descritto nella sezione Materiali e Metodi. Per ciascun esperimento di alimentazione e per ciascuna coppia di primer, è stata generata una curva standard tra i Log delle diluizioni seriali del DNA di *S. marinoi* ( $x$ ), di concentrazione nota (ng/ $\mu$ l), ed i corrispondenti  $C_t$  ottenuti durante l'amplificazione di ogni diluizione ( $y$ ). L'equazione lineare di ciascuna curva è stata, quindi, utilizzata per ricavare l'incognita  $x$  di DNA algale ingerito, considerando come valori  $y$  i  $C_t$  dei copepodi ottenuti durante la qPCR. Tali valori sono poi stati convertiti in ng ingeriti di DNA algale/copepode/ora, tenendo conto del volume con cui è stato eluito il DNA dei copepodi (100  $\mu$ l), del numero di individui presenti in ciascun campione estratto (Tab. 6), e della durata dell'esperimento di alimentazione (30 min). Ai valori di ciascun replicato sperimentale ( $t=30$ ), infine, sono stati sottratti i ng calcolati per i corrispondenti campioni di controllo ( $t=0$ ), allo scopo di eliminare eventuali segnali aspecifici di fondo. Tali segnali sono stati sempre estremamente bassi, intorno a 0.01 ng. In ultimo, dai ng di DNA algale ingeriti si è poi risaliti per interpolazione al numero di cellule di *S. marinoi* utilizzando la relazione lineare ricavata al termine di ogni esperimento di alimentazione, tra il numero di cellule presenti in campioni di *S. marinoi* a concentrazione nota e la corrispondente quantità di DNA estratto (ng). A titolo esemplificativo, in figura 22 è mostrata la relazione lineare calcolata al termine dell'esperimento 1.

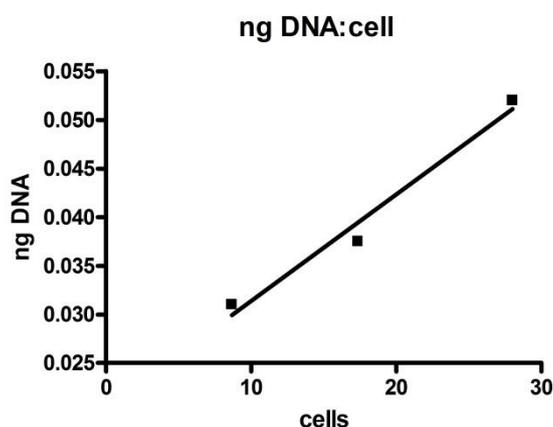


Figura 22. Grafico della relazione lineare tra il numero di cellule di *S. marinoi* e la corrispondente quantità di DNA estratto (ng), relativo all'esperimento 1.

Per il primer che corrisponde all'amplicone da 72bp, le equazioni delle curve standard sono:  $y = -2.72x + 15.99$ ,  $y = -3.23x + 14.87$ ,  $y = -3.13x + 14.63$ , rispettivamente per l'esperimento 1, 2, 3. Nella tab 3.5 sono riportati i ng di DNA (ng DNA/cop/ora) e il numero di cellule (cell/cop/ora) ingerite in ciascun esperimento e replicato sperimentale (t=30), unitamente alla media e deviazione standard di ciascun esperimento. I risultati mostrano che in entrambi i replicati degli esperimenti 1 e 3, il numero di cellule ingerite è pari a zero. Nell'esperimento 2, invece, sono state ingerite in media 72.5 cell/cop/ora. L'ingestione media ( $\pm$ SD) di *C. helgolandicus* considerando tutti i replicati e i tre esperimenti è di  $24.2 \pm 40.6$  cellule di *S. marinoi*/cop/ora.

Tabella 7. Ingestione di *S. marinoi* (ng DNA/cop/ora, cell/cop/ora) relativa al primer 72bp. Sono riportati i valori di ciascun replicato e le corrispondenti Media e SD.

<b>Primer 72bp</b>			
ng DNA/cop/ora	cell/cop/ora	Media	SD
0.017	0	0.00	0.00
0.014	0		
0.127	97.15	72.55	34.80
0.073	47.94		
0.015	0	0.000	0.00
0.005	0		

Per il primer che corrisponde all'amplicone da 89bp, le equazioni delle curve standard sono:  $y = -3.31x + 15.46$ ,  $y = -3.02x + 16.78$ ,  $y = -2.72x + 15.69$ , rispettivamente dell'esperimento 1, 2, 3. Di seguito è riportata la tabella (Tab.8) in cui sono indicati i ng di DNA (ng DNA/cop/ora) e il numero di cellule (cell/cop/ora) ingerite in ciascun esperimento e replicato sperimentale (t=30), unitamente alla media e deviazione standard di ciascun esperimento. Come per il primer 72bp, il numero di cellule ingerite dagli individui dell'esperimento 1 è pari a zero. Mentre per gli esperimenti 2 e 3, sono state ingerite, in media, 39.7 e 29.7 cell/cop/ora. L'ingestione media ( $\pm$ SD) di *C. helgolandicus* considerando tutti i replicati e i tre esperimenti è di  $23.1 \pm 22.9$  cellule di *S. marinoi*/cop/ora.

Tabella 8. Ingestione di *S. marinoi* (ng DNA/cop/ora, cell/cop/ora) relativa al primer 89bp. Sono riportati i valori di ciascun replicato e le corrispondenti Media e SD.

<b>Primer 89bp</b>			
ng DNA/cop/ora	cell/cop/ora	Media	SD
0.02	0.00	0.00	0.00
0.014	0.00		
0.052	28.80	39.74	15.47
0.076	50.67		
0.073	47.94	29.71	25.78
0.033	11.48		

Per il primer da 99bp, le equazioni sono:  $y = -3.28x + 14.64$ ,  $y = -3.07x + 14.85$ ,  $y = -2.93x + 15.50$  rispettivamente dell'esperimento 1, 2, 3. Di seguito è riportata la tabella (Tab.9) in cui sono indicati i ng di DNA (ng DNA/cop/ora) e il numero di cellule (cell/cop/ora) ingerite in ciascun esperimento e replicato sperimentale ( $t=30$ ), unitamente alla media e deviazione standard di ciascun esperimento. In media, sono state ingerite, 58.0, 132.7 e 140.0 cell/cop/ora, rispettivamente negli esperimenti 1, 2 e 3. L'ingestione media ( $\pm$ SD) di *C. helgolandicus* considerando tutti i replicati e i tre esperimenti è di  $110.2 \pm 56.1$  cellule di *S. marinoi*/cop/ora.

Tabella 9. Ingestione di *S. marinoi* (ng DNA/cop/ora, cell/cop/ora) relativa al primer 99bp. Sono riportati i valori di ciascun replicato e le corrispondenti Media e SD.

<b>Primer 99bp</b>			
ng DNA/cop/ora	cell/cop/ora	Media	SD
0.120	90.77	57.96	46.40
0.048	25.15		
0.174	139.99	132.70	10.31
0.158	125.41		
0.230	191.03	139.99	72.18
0.118	88.95		

Per il primer da 122bp, le equazioni sono  $y = -3.29x + 15.49$ ,  $y = -2.80x + 15.94$ ,  $y = -3.04x + 15.26$  rispettivamente dell'esperimento 1, 2, 3. Di seguito è riportata la tabella (Tab. 10) in cui sono indicati i ng di DNA (ng DNA/cop/ora) e il numero di cellule (cell/cop/ora) ingerite in ciascun esperimento e replicato sperimentale ( $t=30$ ), unitamente alla media e deviazione standard di ciascun esperimento. In media, sono state ingerite, 22.9, 30.2 e 19.7 cell/cop/ora, rispettivamente negli esperimenti 1, 2 e 3. L'ingestione media ( $\pm$ SD) di *C. helgolandicus* considerando tutti i replicati e i tre esperimenti è di  $24.2 \pm 15.0$  cellule di *S. marinoi*/cop/ora.

Tabella 10. Ingestione di *S. marinoi* (ng DNA/cop/ora, cell/cop/ora) relativa al primer 122bp. Sono riportati i valori di ciascun replicato e le corrispondenti Media e SD.

<b>Primer 122bp</b>			
ng DNA/cop/ora	cell/cop/ora	Media	SD
0.067	42.47	22.87	27.71
0.024	3.28		
0.064	39.74	30.17	13.53
0.043	20.60		
0.048	25.15	19.68	7.73
0.036	14.22		

Per il primer da 150 bp, le equazioni sono  $y = -3.29x + 15.28$ ,  $y = -2.60x + 15.99$ ,  $y = -2.98x + 15.77$  rispettivamente dell'esperimento 1, 2, 3. Di seguito è riportata la tabella (Tab. 11) in cui sono indicati i ng di DNA (ng DNA/cop/ora) e il numero di cellule (cell/cop/ora) ingerite in ciascun esperimento e replicato sperimentale ( $t=30$ ), unitamente alla media e deviazione standard di ciascuno esperimento. In media, sono state ingerite, 17.9, 60.7 e 20.6 cell/cop/ora, rispettivamente negli esperimenti 1, 2 e 3. L'ingestione media ( $\pm$ SD) di *C. helgolandicus* considerando tutti i replicati e i tre esperimenti è di  $33.0 \pm 25.4$  cellule di *S. marinoi*/cop/ora.

Tabella 11. Ingestione di *S. marinoi* (ng DNA/cop/ora, cell/cop/ora) relativa al primer 150bp. Sono riportati i valori di ciascun replicato e le corrispondenti Media e SD.

<b>Primer 150bp</b>			
ng DNA/cop/ora	cell/cop/ora	Media	SD
0.054	30.62	17.86	18.05
0.026	5.10		
0.069	44.29	60.70	23.20
0.105	77.10		
0.049	26.06	20.60	7.73
0.037	15.13		

In figura 23 sono riportati i valori medi del numero di cellule di *S. marinoi* ingerite da *C. helgolandicus* ( $\pm$ SD) durante i tre esperimenti di alimentazione, calcolati per ciascun amplicone del 18S rDNA. Si osserva un'elevata variabilità nei valori ottenuti tra gli esperimenti e tra gli ampliconi, con tassi di ingestione compresi tra circa 0 e 140 cellule/cop/ora. Si nota che i valori più alti di ingestione per tutti gli esperimenti sono stati ottenuti con l'amplicone 99bp. Per valutare se il tipo di amplicone ed i singoli esperimenti hanno influenzato in modo indipendente il tasso di ingestione di *C.*

*helgolandicus*, è stata condotta l'analisi statistica Two Way Analysis Of Variance (Two-way ANOVA). I risultati indicano, innanzitutto, che non c'è interazione tra i due fattori di variabilità (lunghezza dell'amplicone ed esperimento di alimentazione) (12.5% della varianza totale,  $p>0.05$ ), e che i diversi esperimenti hanno contribuito per il 17.3% della varianza totale dei risultati ( $p<0.05$ ), mentre il tipo di amplicone ha contribuito al 52.6% della varianza ( $p<0.001$ ). Pertanto, l'effetto della dimensione del primer è risultato più significativo rispetto all'effetto legato alla variabilità tra gli esperimenti.

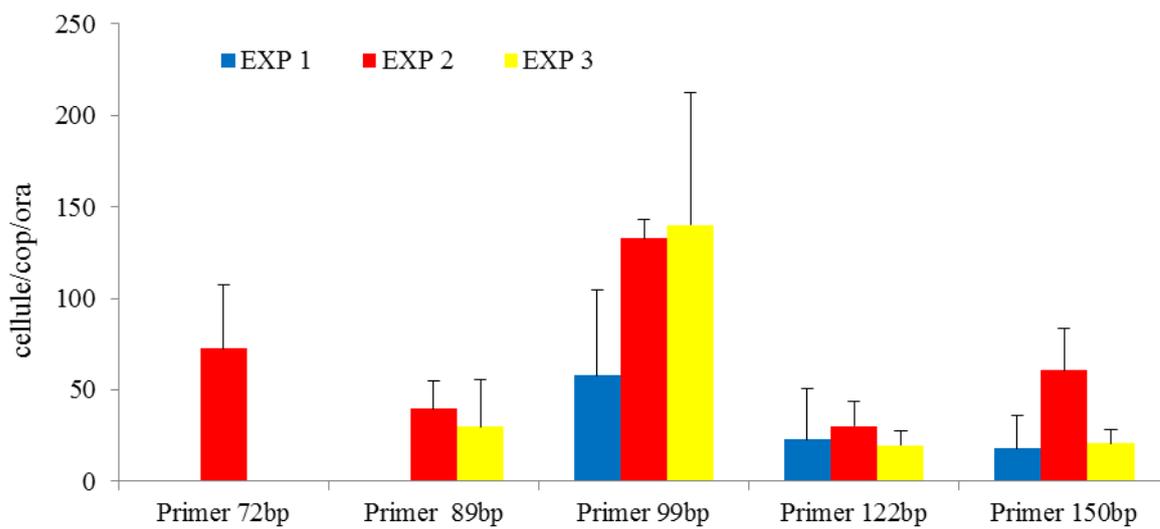


Figura 23. Istogramma raffigurante i valori medi del numero di cellule di *S. marinoi* ingerite da *C. helgolandicus* ( $\pm$ SD) durante i tre esperimenti di alimentazione.

Infine, considerando i valori medi di ingestione tra gli esperimenti per ciascun amplicone, l'analisi della varianza mostra che esiste una differenza statisticamente significativa tra questi valori (One way Analysis Of Variance, ANOVA,  $F_{4,10} = 4.4$ ,  $p<0.05$ ); in particolare, il valore ottenuto per l'amplicone 99bp risulta significativamente più elevato rispetto agli altri (140.0 cellule/cop/ora) (figura 24).

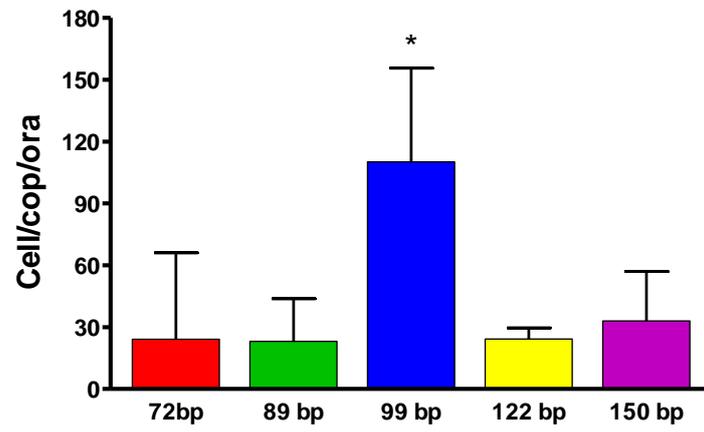


Figura 24. Grafico dei valori medi di ingestione ( $\pm$ SD) di *Calanus helgolandicus* (cellule *S. marinoi*/cop/ora) per ciascun amplicone. (ANOVA \*  $p < 0.05$ ).

# Discussione

Nel presente lavoro di tesi sperimentale, è stato messo a punto un metodo molecolare per l'identificazione e quantificazione del DNA di *Skeletonema marinoi* nel copepode *Calanus helgolandicus*, utilizzando tecniche di estrazione e amplificazione del 18S rDNA mediante qPCR. Il DNA estratto è risultato di buona qualità ed è stato amplificato con successo mediante qPCR utilizzando primer specifici per il 18S rDNA di *S. marinoi* disegnati e ottimizzati nel corso di questo studio. Con questo metodo è stato possibile calcolare il numero di cellule di *S. marinoi* ingerite dal *C. helgolandicus* durante esperimenti di alimentazione allestiti nel corso della tesi. Questo metodo basato sulla qPCR è stato per la prima volta utilizzato da Nejstgaard et al. (2008) per determinare i tassi di ingestione in laboratorio di *Calanus finmarchicus* in presenza di *Rhodomonas marina* ed *Emiliania huxleyi* e di *Temora longicornis* e *Acartia clausi* *in situ* durante un bloom di *Phaeocystis globosa*, comparandolo con il metodo classico di incubazione nelle bottiglie. I risultati mostrano una relazione lineare tra i tassi di ingestione algale determinati con i due metodi, supportando l'uso di questa metodica per la valutazione quantitativa dell'ingestione algale dei copepodi *in situ*.

Nella prima fase di questa tesi è stato estratto con successo il DNA genomico dalla diatomea *S. marinoi* e dai copepodi *C. helgolandicus*, utilizzando il Blood and Tissue Kit (Qiagen). In particolare, sono stati isolati fino a circa 60 ng/μl di DNA algale di ottima qualità a partire da circa  $1 \cdot 10^7$  cellule/ml di coltura, per un totale di circa 6 μg di DNA. Dai copepodi, invece, sono stati estratti fino ad un massimo di 25 ng/μl di DNA genomico, pari ad un totale di 0.35 μg DNA per individuo. Questi risultati sono in accordo con quelli riportati nello studio di Simonelli et al. (2009) condotto su *C. finmarchicus*, *C. helgolandicus* e *R. marina*, in cui sono stati confrontati una serie di protocolli di conservazione dei copepodi e di estrazione del DNA, per definire una procedura sperimentale ottimale negli studi molecolari dei tassi di ingestione. Lo studio conclude che il migliore protocollo per la conservazione dei copepodi e l'estrazione del DNA dai copepodi e dalle alghe è il Blood and Tissue Kit (Qiagen).

Nella seconda fase sperimentale del presente lavoro di tesi, è stato amplificato con successo il gene corrispondente al RNA ribosomiale 18S per la *S. marinoi*, utilizzando primer specifici per ampliconi di diversa lunghezza. Delle sette coppie di primer selezionate, cinque primer compresi tra 72-150 bp hanno mostrato efficienze di amplificazione ottimali (92-114%). La scelta di testare coppie di primer che amplificano

prodotti di lunghezza crescente è motivata dai risultati presentati in Simonelli et al. (2009) e Troedsson et al. (2008), in cui è dimostrato che la stima dei tassi di ingestione dei copepodi diminuisce al crescere della lunghezza dell'amplicone. In entrambi gli studi, infatti, la quantificazione è stata massima impiegando ampliconi specifici per il DNA ribosomiale 18S da 74 bp (75-103 cell/cop/ora), rispetto ad ampliconi di maggiori dimensioni (142 bp, 56 cell/cop/ora). I nostri risultati differiscono dai loro, in quanto i tassi di ingestione ottenuti non sono correlati alla dimensione dell'amplicone. Infatti, sono risultati simili per gli ampliconi 72, 89, 122 e 150 bp, con valori di 24.2, 23.1, 24.2, 33.0 cell/cop/ora, rispettivamente. È interessante notare che il valore massimo di ingestione ottenuto utilizzando l'amplicone 99 bp (110.2 cell/cop/ora), è simile ai valori riportati da Simonelli et al. (2009) e Troedsson et al. (2008). In seguito, Barofsky et al. (2010) ha utilizzato questo metodo molecolare per investigare la preferenza alimentare di *Calanus* spp. (*C. finmarchicus* e *C. helgolandicus*) nelle varie fasi di crescita dell'alga *S. marinoi*, utilizzando ampliconi da 70 bp specifici per il DNA ribosomiale 18S, e dimostrando la preferenza per l'alga nella fase stazionaria con tassi di ingestione comparabili a quelli riportati in questa tesi (60 cellule/cop/ora). I primer utilizzati da Barofsky et al. (2010) sono stati testati nel corso di questo studio, ma non hanno generato alcun prodotto di amplificazione in qPCR, in quanto la loro  $T_m$  (55°C) era inferiore a quella standard utilizzata dallo strumento (60°C). Per tale motivo, sono state aggiunte tre basi (CAC) all'estremità 3' del primer Reverse di Barofsky et al. (2010), generando così la coppia di primer Ske 70 F e Ske 70 R utilizzata nel presente lavoro di tesi. Nonostante ciò, tale coppia non è stata impiegata per la valutazione dei tassi di ingestione, in quanto l'efficienza dei primer è risultata al di sotto del valore ottimale (90%). I nostri risultati sono anche in accordo con quelli riportati da Durbin et al. (2012) relativi al tasso di ingestione della diatomea *Thalassiosira weissflogii* nel copepode *Acartia tonsa*. In particolare, utilizzando coppie di primer specifiche per il DNA ribosomiale 18S, gli autori stimano un tasso di ingestione di circa 30 cellule/cop/ora. Per confrontare i dati ottenuti nella presente tesi con quelli riportati in altri lavori che hanno utilizzato il metodo classico, cosiddetto 'food removal', è necessario convertire il numero di cellule ingerite in unità di carbonio algale. Considerato che il contenuto di carbonio di *S. marinoi* è di 21 pg C/cell (Carotenuto et al. 2002), possiamo calcolare che la quantità di carbonio di *S. marinoi* ingerito dai *C. helgolandicus* nel presente studio è di 0.51, 0.49, 0.51, 0.69 ng C/cop/ora, rispettivamente per gli ampliconi 72, 89, 122 e 150 bp e di circa 2.4 ng C/cop/ora per l'amplicone da 99 bp. Convertendo questo ultimo valore in unità di tempo riferite al giorno, avremo 57.6 ng C ingeriti dal C.

*helgolandicus*/giorno. Tale valore di ingestione risulta essere di un ordine di grandezza inferiore a quello riportato da altri studi che utilizzano metodi classici. Nejstgaard et al. (2001), per esempio, conducendo esperimenti di alimentazione con l'alga *Rodomonas baltica* in condizioni semi-naturali (mesocosmi), calcola un tasso di ingestione di *C. helgolandicus* di 2.4 µg C/cop/giorno. Analogamente, Meyer et al. (2002), stima tassi di ingestione di *C. helgolandicus* di circa 5 µg C/cop/giorno utilizzando una dieta mista di quattro specie algali. Utilizzando sempre il metodo classico, infine, Rey-Rassat et al. (2002), ha condotto esperimenti in laboratorio alimentando femmine adulte di *C. helgolandicus* con il dinoflagellato *Prorocentrum micans*, stimando tassi di ingestione compresi tra 22.7-54.3 µg C/cop/giorno. Tale discrepanza di valori ottenuti impiegando i due metodi, è emersa già in studi condotti precedentemente. Nejstgaard et al. (2008), ad esempio, esegue esperimenti di alimentazione in laboratorio confrontando i due metodi. Il suo studio ha dimostrato che il tasso di ingestione basato sull'amplificazione del DNA algale in qPCR, è circa il 2-32% dei tassi di ingestione derivati dagli esperimenti di incubazione classici. Tra i più probabili motivi alla base della discrepanza sono da considerare una serie di fattori, tra i quali: la rapida digestione del 18S rDNA dell'alga nell'intestino dei copepodi (Durbin et al. 2012), l'interferenza del DNA del copepode, presente in maggiori quantità, rispetto al DNA algale ingerito dall'individuo, e il congelamento e lo scongelamento dei campioni (Nejstgaard et al. 2008). Per tali ragioni, il metodo molecolare è considerato un metodo semi-quantitativo. Nonostante tali limitazioni, il metodo molecolare ha dimostrato comunque di avere prospettive future per determinare i tassi di ingestione algale dei copepodi *in situ*. Nejstgaard et al. (2008), ad esempio, conducendo esperimenti *in situ* stima che i tassi d'ingestione calcolati con il metodo molecolare sono circa 11-20% rispetto ai tassi d'ingestioni calcolati con il metodo classico. Allo stesso modo, Durbin et al. (2014) confronta i tassi d'ingestione di *Calanus glacialis* calcolati *in situ* con metodo classico e con il metodo molecolare, riscontrando una relazione lineare tra i due metodi con valori assoluti aventi lo stesso ordine di grandezza. Questi risultati sono incoraggianti e indicano che il metodo molecolare potrà essere applicato *in situ* per determinare i tassi d'ingestione. Anche se entrambi i metodi ci forniscono stime dei tassi d'ingestione dei copepodi, il metodo classico è un metodo con tempistiche più lunghe, in quanto prevede che gli animali siano incubati per almeno 24 ore, mentre il metodo molecolare facilita efficacemente il monitoraggio dei tassi di ingestione con tempistiche più brevi, ovviando agli errori nei quali si incorre con il metodo classico.

In conclusione, i risultati di questo studio preliminare permetteranno di applicare il metodo molecolare agli studi di ingestione condotti su *C. helgolandicus* durante la tipica fioritura primaverile di *S. marinoi* nel Nord Adriatico, per la valutazione dell'effetto deleterio di questa diatomea sulla riproduzione dei copepodi (Ianora et al. 2004). Recentemente, è stato dimostrato che esiste un'elevata variabilità nella composizione del bloom primaverile del Nord Adriatico da un anno all'altro, con conseguente differente impatto sulla riproduzione dei copepodi (Ianora et al. 2015). Studi futuri che affiancano la determinazione dei tassi di riproduzione dei copepodi durante il bloom, alla quantificazione dei tassi di ingestione algale con metodo molecolare, pertanto, permetteranno di correlare in modo più preciso l'impatto osservato sulla riproduzione con la reale quantità di alga ingerita *in situ*.

# Bibliografia

- Alajimi, F., Zeng, C., Jerry, D. R., 2015. Domestication as a novel approach for improving the cultivation of Calanoid Copepods: A Case Study with *Parvocalanus crassirostris*. PLoS ONE 10(7): e0133269. doi:10.1371/journal.pone.0133269
- Aubry, F.B., Berton, A., Bastianini, M., Socal, G., Acri, F., 2004. Phytoplankton succession in a coastal area of the NW Adriatic, over a 10-year sampling period (1990-1999). Continental Shelf Research 24(1), 97-115.
- Barofsky, A., Simonelli, P., Vidoudez, C., Troedsson, C., Nejstgaard, J. C., Jakobsen, H. H. & Pohnert, G. 2010. Growth phase of the diatom *Skeletonema marinoi* influences the metabolic profile of the cells and the selective feeding of the copepod *Calanus* spp. J. Plankton Res., 32, 263-272.
- Bonnet, D., Richardson, A., Harris, R., Hirst, A., Beaugrand, G., Edwards, M., Ceballos, S., Diekman, R., Lopez-Urrutia, A., Valdes, L., Carlotti, F., Molinero, J.C., Weikert, H., Greve, W., Lucic, D., Albaina, A., Yahia, N.D., Umani, S.F., Miranda, A., dos Santos, A., Cook, K., Robinson, S., de Puellas, M.L.F., 2005. "An Overview of *Calanus Helgolandicus* Ecology in European Waters". Progress in Oceanography 65, 1-53
- Broglio, E., Jónasdóttir, S. H., Calbet, A., Jakobsen, H. H., Saiz, E., 2003. Effect of heterotrophic versus autotrophic food on feeding and reproduction of the calanoid copepod *Acartia tonsa*: relationship with prey fatty acid composition. Aquatic Microbial Ecology Vol. 31: 267–278.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., and Wittwer, C. T., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clinical Chemistry 55:4 611–622
- Carotenuto, Y. 1999. Morphological analysis of larval stages of *Temora stylifera* (Copepoda, Calanoida) from the Mediterranean Sea. Journal of Plankton Research, 21, 1613-1632.
- Carotenuto, Y., Dattolo, E., Lauritano, C., Pisano, F., Sangers, R., Miralto, A. & Procaccini, G. 2014. Insights into the transcriptome of the marine copepod *Calanus helgolandicus* feeding on the oxylipin-producing diatom *Skeletonema marinoi*. Harmful Algae, 31, 153-162.

- Carotenuto, Y., Ianora, A., Buttino, I., Romano, G. & Miralto, A. 2002. Is postembryonic development in the copepod *Temora stylifera* negatively affected by diatom diets? *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 276, 49-66.
- Casotti, R., Mazza, S., Brunet, C., Vantrepotte, V., Ianora, A., Miralto, A., 2005. Growth inhibition and toxicity of the diatom aldehyde 2-trans, 4-trans-decadial on *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 41, 7-20.
- Dam, H. G. & Lopes, R. M. 2003. Omnivory in the calanoid copepod *Temora longicornis*: feeding, egg production and egg, hatching rates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 292, 119-137.
- Durbin, E. G., Casas, M. C. & Rynearson, T. A. 2012. Copepod feeding and digestion rates using prey DNA and qPCR. *Journal of Plankton Research*, 34, 72-82.
- Durbin E. G., Casas, M. C. 2014. Early reproduction by *Calanus glacialis* in the Northern Bering Sea: the role of ice algae as revealed by molecular analysis. *Journal of Plankton Research*. 36(2): 523
- Fontana, A., d'Ippolito, G., Cutignano, A., Romano, G., Lamari, N., Gallucci, A.M., Cimino, G., Miralto, A., Ianora, A., 2007. "Lox-Induced Lipid Peroxidation Mechanism Responsible for the Detrimental Effect of Marine Diatoms on Zooplankton Grazers". *Chembiochem* 8, 1810-1818.
- Frost, B. 1972. Effects of size and concentration of food particles on the feeding behavior of the marine planktonic copepod *Calanus pacificus*. *Limnology & Oceanography*, 17, 805-815.
- Ianora, A. & Miralto, A. 2010. Toxigenic effects of diatoms on grazers, phytoplankton and other microbes: a review. *Ecotoxicology*, 19, 493-511.
- Ianora, A., Miralto, A. & Romano, G. 2012. Antipredatory Defensive Role of Planktonic Marine Natural Products. In: E. Fattorusso, W. H. Gerwick & Tagliatela-Scafati, O. (eds.) *Handbook of Marine Natural Products*. Springer-Verlag.

- Ianora, A., Miralto, A., Poulet, S. A., Carotenuto, Y., Buttino, I., Romano, G., Casotti, R., Pohnert, G., Wichard, T., Colucci-D'amato, L., Terrazzano, G. & Smetacek, V. 2004. Aldehyde suppression of copepod recruitment in blooms of a ubiquitous planktonic diatom. *Nature*, 429, 403-407.
- Ianora, A., Bastianini, M., Carotenuto, Y., Casotti, R., Roncalli, V., Miralto, A., Romano, G., Gerech, A., Fontana, A. & Turner, J. T. 2015. Non-volatile oxylipins can render some diatom blooms more toxic for copepod reproduction. *Harmful Algae*, 44, 1-7.
- Kâ, S., Carotenuto, Y., Romano, G., Hwang, J. S., Buttino, I. & Ianora, A. 2014. Impact of the diatom-derived polyunsaturated aldehyde 2-trans,4-trans decadienal on the feeding, survivorship and reproductive success of the calanoid copepod *Temora stylifera*. *Marine Environmental Research*, 93, 31-37.
- Kaartvedt, S. 2000. Life history of *Calanus finmarchicus* in the Norwegian Sea in relation to planktivorous fish. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* 57, 1819-1824
- Kooistra, W.H.C.F., Sarno, D., Balzano, S., Gu, H., Andersen, R.A., Zingone, A., 2008. Global Diversity and Biogeography of Skeletonema Species (Bacillariophyta). *Protist* 159(2), 177-193.
- Lauritano, C., Borra, M., Carotenuto, Y., Biffali, E., Miralto, A., Procaccini, G. & Ianora, A. 2011. First molecular evidence of diatom effects in the copepod *Calanus helgolandicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 404, 79-86.
- Marshall, S. M. & Orr, A. P. (eds.) 1955. *The Biology of a Marine Copepod, Calanus finmarchicus* (Gunnerus), London: Oliver & Boyd.
- Mauchline, J. 1998. The biology of Calanoid Copepods. In: Blaxter, J. H. S., Southward, A. J. & Tyler, P. A. (eds.) *Advances in Marine Biology*. USA: Academic Press. Mazzocchi et al. 2011;
- Meyer, B., Irigoien, X., Graeve, M., Head, R.N., Harris, R.P. 2002. Feeding rates and selectivity among nauplii, copepodites and adult females of *Calanus finmarchicus* and *Calanus helgolandicus*. *Helgol Mar Res* 56:169–176

- Nejstgaard, J. C., Hygum B. H., Naustvoll L. J., Båmstedt U. 2001. Zooplankton growth, diet and reproductive success compared in simultaneous diatom- and flagellate-microzooplankton- dominated plankton blooms. *Marine Ecology Progress Series* Vol. 221: 77–91.
- Nejstgaard, J. C., Frisher, M., Simonelli, P., Troedsson, C., Brakel, M., Adiyaman, F., Sazhin, A. F. & Artigas, L. F. 2008. Quantitative PCR to estimate copepod feeding. *Marine Biology*, 153, 565-577.
- Rey-Rassat, C., Irigoien, X., , Harris, R., Head, R., Carlotti, F. 2002. Growth and development of *Calanus helgolandicus* reared in the laboratory. *Marine Ecology Progress Series*. Vol. 238: 125–138.
- Ribalet, F., Vidoudez, C., Cassin, D., Pohnert, G., Ianora, A., Miralto, A., Casotti, R., 2009. High plasticity in the production of diatom derived polyunsaturated aldehydes under nutrient limitation: physiological and ecological implications. *Protist* 160, 444-451)
- Richardson, A.J., 2008. "In Hot Water: Zooplankton and Climate Change". *Ices Journal of Marine Science* 65, 279-295.
- Roman, M. R. and Rublee, P. A., 1980. Containment effect in copepod grazing experiments: A plea to end the black box approach. *Limnol. Oceanogr.*, 25(6): 982-990.
- Runge, J. A., La Fontaine, Y.D. 1996. Characterization of the pelagic ecosystem in surface water of the northern Gulf of St. Lawrence in early summer : the larval redfish-Calanus-microplankton interaction. *Fisheries Oceanography* 5, 21-37.
- Simonelli, P., Troedsson, C., Nejstgaard, J. C., Zech, K., Larsen, J. B. & Frischer, M. E. 2009. Evaluation of DNA extraction and handling procedures for PCR-based copepod feeding studies. *Journal of Plankton Research*, 31, 1465-1474.
- Troedsson, C., Simonelli, P., Nagele, V., Nejstgaard, J. & Frischer, M. 2009. Quantification of copepod gut content by differential length amplification quantitative PCR (dla-qPCR). *Marine Biology*, 156, 253-259.

- Van De Spoel, S., Heyman, R.P., 1983. "A Comparative Atlas of Zooplankton". Springer Verlag, Berlin.
- Vardi, A., Formiggini, F., Casotti, R., De Martino, A., Ribalet, F., Miralto, A., Bowler, C., 2006. A stress surveillance system based on calcium and nitric oxide in marine diatoms. Public Online Science-Biology 4(3), 1-9).
- Yebra, L., Bonnet, D., Harris, R. P., Lindeque, P. K. & Peijnenburg, K. T. C. A. 2011. Barriers in the pelagic: population structuring of *Calanus helgolandicus* and *C. euxinus* in European waters. Marine Ecology Progress Series, 428, 135-149.

