

Ministeri dell'Economia e delle Finanze, dell'Istruzione, Università e Ricerca, dell'Ambiente della Tutela del Territorio, delle Politiche Agricole e Forestali

Fondo Integrativo Speciale per la Ricerca

PROGRAMMA STRATEGICO: B) SVILUPPO SOSTENIBILE E CAMBIAMENTI CLIMATICI

Progetto-Obiettivo: 1) Simulazioni, Diagnosi e Previsioni del Cambiamento Climatico

Titolo del Progetto:

Cambiamenti Climatici e Sistemi Produttivi Agricoli e Forestali: Impatto sulle Riserve di Carbonio e sulla Diversità Microbica del Suolo.

Acronimo: SOILSINK

LINEA 3 Diversità genetica e funzionale dei microrganismi (Capofila Prof. Renato Fani)
UO 05: Ente CRA-ABP, Università di Firenze (DBE), Università dell'Aquila (DBBA) responsabile scientifico UO 05 Dr. Marcello Pagliai
Partecipanti alla ricerca: Ente CRA-ABP, Dr. Roberta Pastorelli, Dr. Silvia Landi, Dr. Marcello Pagliai; Università di Firenze (DBE), Dr. Emanuele Biondi, Dr. Alessio Mengoni, Prof. Marco Bazzicalupo.

Relazione sulle attività svolte nel 2° anno di attività (01/07/2007-30/06/2008)

L'attività dell'Unità Operativa 05 prevede il monitoraggio e lo studio della diversità della microflora batterica del suolo coinvolta in funzioni chiave nei cicli biogeochimici legati ai gas serra: il metabolismo degli acidi umici, del metano e dell'azoto. Nel periodo di progetto preso in considerazione dalla presente relazione, il gruppo del Centro di Agrobiologia e Pedologia (ex Istituto Sperimentale per lo Studio e la Difesa del Suolo) e del DBE hanno svolto le seguenti attività.

ii) Studio della biodiversità eubatterica attiva del suolo.

E' stata studiata la biodiversità mediante tecniche molecolari basate sull'amplificazione degli acidi nucleici. In particolare è stato messo a punto un metodo per lo studio della microflora funzionalmente attiva del suolo basato sulla retrotrascrizione ed amplificazione dell'rRNA 16S.

Dai campioni di suolo raccolti nell'anno 2007 (primavera ed autunno) nelle varie parcelle dei campi sperimentali delle Marche (Agugliano) e della Sardegna (Berchidda), è stato estratto RNA (sia ribosomale che messaggero).

Per l'amplificazione del rRNA 16S è stato utilizzato un protocollo RT-PCR con primer eubatterici universali (GC-UNI986f e UNI1401r). Le sequenze amplificate sono state successivamente separate con analisi DGGE. I pattern ottenuti hanno fornito un'impronta molecolare della struttura della comunità microbica attiva, in cui ciascuna banda rappresenta una singola specie o un gruppo di specie. I profili elettroforetici ottenuti sono stati analizzati mediante il software GelCompar II v. 4.6 (Applied Maths), a disposizione presso il CRA-ABP, per ricavarne gli indici di diversità (richness e indice di Shannon-Weiner) ed effettuare analisi cluster mediante UPGMA. Sui dati di diversità sono poi state effettuate analisi statistica di routine (*t*-Student) per il confronto tra i valori ottenuti dai diversi campioni.

In ambedue i siti di campionamento è emerso che il tipo di gestione del suolo e la stagione influenzano l'attività microbica.

- a) Berchidda. Ambienti più naturali quali la sughera accrescono la biodiversità della comunità batterica attiva e il progredire della stagione accresce la biodiversità all'interno delle singole gestioni. L'analisi cluster ha mostrato gruppi significativi in base al tipo di gestione del suolo, evidenziando una elevata omogeneità nei campioni provenienti dalla stessa parcella.
- b) Agugliano. Su coltivazione di frumento una più alta biodiversità è stata rilevata nelle parcelle non lavorate e non fertilizzate. L'analisi cluster ha mostrato gruppi significativi in base al tipo di lavorazione e fertilizzazione del suolo, evidenziando una elevata omogeneità nei campioni provenienti dalla stessa parcella.

iv) Studio dei geni funzionali

Sono state identificate sequenze specifiche di gruppi funzionali tra cui geni specifici presenti nei suoli delle Marche e della Sardegna, legati ai processi di denitrificazione ed ossidazione del metano. Inoltre l'utilizzazione di RNA retroscritto per queste analisi ha consentito di collegare le sequenze trovate con l'effettiva funzionalità della comunità batterica del suolo.

Analisi dei geni funzionali basata sul DNA.

Sui geni funzionali selezionati sono state messe a punto delle tecniche per l'analisi della loro variabilità in termini di sequenza di DNA (contenuto allelico) all'interno della comunità batterica dei suoli in esame. Tali analisi hanno lo scopo di valutare se alcuni alleli (cioè gruppi microbici tassonomicamente correlati) risultino particolarmente influenzati dai trattamenti colturali. In particolare è stata messa a punto la tecnica T-RFLP sul gene *nosZ*, codificante la ossido nitroso reductasi e sul gene *pmoA*, codificante la metano monossigenasi.

Per lo studio della diversità genetica si è utilizzato il DNA totale estratto dai campioni di suolo sul quale sono stati sviluppati protocolli di indagine originali mediante Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP). Le metodiche sono state ottimizzate ed applicate ai campioni in esame. I prodotti T-RFLP sono stati separati mediante elettroforesi capillare sul sequenziatore automatico ABI310 (Applied Biosystems) presente presso il DBE. I profili di diversità ottenuti sono stati analizzati mediante il software GelCompar II v. 3.0, a disposizione presso il DBE, per ottenere delle matrici binarie di presenza/assenza di bande corrispondenti alle diverse forme alleliche del gene di interesse presenti nella comunità batterica del campione di suolo in esame. Le matrici binarie sono state successivamente analizzate statisticamente con il software NTSYS-pc ver 2.02, per ricavarne gli indici di diversità ed effettuare analisi cluster mediante UPGMA. Sui dati di diversità allelica sono poi state effettuate analisi statistica di routine (1-way ANOVA e Kruskal-Wallis) per il confronto tra i valori ottenuti dai diversi campioni.

I risultati più significativi ottenuti dall'analisi del DNA dei geni funzionali *nosZ* e *pmoA* sono riportati di seguito:

- 1) *pmoA*.
 - a) Berchidda. Il gene risulta amplificato in tutti in campioni in esame. I campioni provenienti dalle parcelle a vigneto (sia inerbito che lavorato) hanno fatto riscontrare i più alti livelli di diversità allelica, mentre i campioni a sughera e a pascolo i valori più bassi. L'analisi cluster non ha mostrato gruppi significativi, evidenziando una elevata eterogeneità anche nei campioni provenienti dalla stessa parcella.
 - b) Agugliano. Il gene risulta amplificato in tutti in campioni in esame. Non vi sono differenze significative nei valori di diversità allelica a seguito dei trattamenti di lavorazione e di fertilizzazione delle parcelle di suolo. L'analisi cluster ha mostrato

una identità per quasi tutti i campioni provenienti dalle parcelle non lavorate. Non vi sono cluster significativi per quanto riguarda invece la fertilizzazione.

2) *nosZ*.

- a) Berchidda. Il gene risulta amplificato in tutti in campioni in esame. I campioni di suolo provenienti dalla sughera presentano la maggiore diversità allelica. Non si riscontrano differenze statisticamente significative nella diversità allelica tra vigneto lavorato e vigneto inerbito. L'analisi cluster ha mostrato una relativa omogeneità dei campioni provenienti dal vigneto lavorato, mentre i campioni provenienti da suoli a pascolo e ad erbaio sono risultati i più disomogenei. In generale, comunque, c'è una discreta clusterizzazione dei campioni sulla base della loro provenienza.
- b) Agugliano. Il gene risulta amplificato in tutti in campioni in esame. I campioni di suolo provenienti dalle parcelle non lavorate hanno una maggiore diversità allelica rispetto a quelli delle parcelle lavorate. Non vi sono differenze significative sulla base dei livelli di fertilizzazione. L'analisi cluster mostra una certa omogeneità nei soli campioni delle parcelle non lavorate (circa 85% di similarità).

Analisi dei geni funzionali basata sul mRNA.

Per lo studio dell'espressione genica è stato applicato, su l'RNA totale estratto dai campioni di suolo, un protocollo RT-nested-PCR utilizzando le coppie di primer specifiche per i geni in esame, selezionate nella messa a punto del sistema durante il primo anno di attività. In particolare sono stati amplificati i geni *narG* e *napA* per la nitrato riduttasi, i geni *nirK* e *nirS* per la nitrito riduttasi, *qnorB* per la ossido nitrico riduttasi, *nosZ* per la ossido nitroso riduttasi e *pmoA* per la metano monossigenasi.

Le miscele di frammenti amplificati di *nirK*, *nirS* e *nosZ* sono state successivamente separate mediante elettroforesi su gel con gradiente di denaturazione (DGGE) ed i profili ottenuti sono stati analizzati statisticamente mediante l'uso del programma Gel Compare II Software v4.6.

I risultati più significativi ottenuti dall'analisi del mRNA dei geni funzionali sopra menzionati sono riportati di seguito:

1. *narG* e *napA*.

- a) Berchidda. Il trascritto risulta amplificato solo in alcuni campioni esaminati.

2. *nirK* e *nirS*.

- a) Berchidda. Il trascritto di *nirK* risulta amplificato in quasi tutti i campioni esaminati, mentre *nirS* è presente solo in una parte dei campioni. L'espressione dei geni *nir* è stata superiore nel periodo primaverile. Non sono state riscontrate differenze significative in base al tipo di gestione del suolo. Solo la sughera in Sardegna forma un gruppo ben definito sia per biodiversità che per richness nell'espressione di *nirK*.
- b) Agugliano. I trascritti di *nirK* e *nirS* risultano amplificati in quasi tutti i campioni esaminati. Non sono state riscontrate differenze significative in base al tipo di lavorazione e fertilizzazione del suolo e alla stagione. L'analisi cluster non ha mostrato gruppi significativi, evidenziando una elevata eterogeneità anche nei campioni provenienti dalla stessa parcella.

3. *qnorB*.

- a) Berchidda. Il trascritto di *qnorB* risulta amplificato in quasi tutti i campioni esaminati. L'analisi DGGE è attualmente in corso.

4. *nosZ*.

- a) Berchidda. Il trascritto di *nosZ* risulta amplificato solo in alcuni campioni esaminati. Non sono state riscontrate differenze significative in base al tipo di gestione del suolo e della stagione. L'analisi cluster non ha mostrato gruppi significativi.
- b) Agugliano. Il trascritto di *nosZ* risulta amplificato in numerosi campioni esaminati. Non sono state riscontrate differenze significative in base al tipo di lavorazione e fertilizzazione del suolo e alla stagione. L'analisi cluster non ha mostrato gruppi significativi.

5. *pmoA*.

- a) Berchidda. Il trascritto risulta amplificato solo in un campione di suolo prelevato in primavera.

Analisi del polimorfismo genetico delle Rhizobiaceae.

Si è inoltre valutato il polimorfismo genetico della famiglia *Rhizobiaceae*, un gruppo tassonomico funzionalmente implicato nell'azotofissazione simbiotica e strettamente associato alle piante attraverso T-RFLP su 16S rDNA amplificato con primer specifici per la famiglia.

- a) Berchidda. Il gene del 16SrDNA delle *Rhizobiaceae* risulta amplificato in tutti in campioni in esame. I campioni provenienti dalle parcelle ad erbaio hanno fatto riscontrare i più alti livelli di diversità allelica, mentre i campioni a pascolo i valori più bassi. L'analisi cluster non ha mostrato gruppi significativi, evidenziando una elevata eterogeneità anche nei campioni provenienti dalla stessa parcella.
- b) Agugliano. Il gene del 16SrDNA delle *Rhizobiaceae* risulta amplificato in tutti in campioni in esame. Non vi sono differenze significative nei livelli di diversità genetica tra i campioni. L'analisi cluster non ha mostrato gruppi significativi, evidenziando una elevata eterogeneità anche nei campioni provenienti dalla stessa parcella.

v) Valutazione quantitativa dei dati ottenuti

E' stato raccolto materiale bibliografico per la messa a punto di PCR *real time* che consentirà durante il terzo anno di progetto di dare anche una valutazione quantitativa ai dati ottenuti.

vi) Microarray

Sono state allestite delle librerie geniche degli amplificati del gene *nosZ* per i suoli di Berchidda e di Agugliano che verranno analizzate nel corso dei prossimi mesi al fine di ottenere i dati di sequenza nucleotidica necessari alla progettazione delle sonde per i DNA microarray.