

PROGETTO DI RICERCA FIRS “SOIL-SINK”: Linea 3 Diversità genetica e funzionale dei microrganismi- (U.O.-06 Diversità genetica e funzionale dei funghi simbiotici- Capofila : Paola Bonfante)

Linea 3 Attività 3

Scopo dell'attività 3 è la caratterizzazione dei funghi micorrizici arbuscolari (AM) presenti nei due siti di Ancona e di Sassari, usando come criteri di analisi i caratteri morfologici delle spore e il loro numero per grammo di suolo, allo scopo di identificare le specie e valutare la consistenza numerica dei propaguli. La comunità dei funghi AM presente nel sito marchigiano durante il ciclo vegetativo del mais (giugno 2007), è risultata composta dalle medesime specie già rinvenute nel mese di Novembre 2006 (*G. clarum*, *G. mosseae*, *G. geosporum*, *G. luteum*, *G. etunicatum*, *G. versiforme*, *G. deserticola*). Tali specie sono presenti sia nelle parcelle lavorate e non, sia in quelle concimate e non. La densità delle spore è risultata invece influenzata dalla lavorazione del suolo e dalla concimazione. Infatti, le parcelle lavorate possiedono una dotazione di propaguli nel suolo più alta rispetto a quelle non lavorate (con valori compresi tra 106 e 127 spore per 50 g di suolo). Analogamente si osserva nelle parcelle concimate rispetto a quelle non concimate. Tuttavia, le parcelle non presentano differenze statisticamente significative per ciò che riguarda l'indice di Ricchezza di Margalef, l'Indice della dominanza ecologica e l'Indice di diversità ecologica di Shannon Wiener (H').

La comunità di funghi AM presente nei vigneti sardi (campionamento maggio 2007) risulta composta dalle seguenti specie: *G. clarum*, *G. mosseae*, *G. geosporum*, *G. luteum*, *G. etunicatum*, *G. deserticola*. Le specie sono presenti sia nelle parcelle lavorate che in quelle inerbite. La densità fungina risulta tuttavia essere influenzata dall'inerbimento, in quanto le parcelle inerbite possiedono una dotazione di propaguli nel suolo più alta rispetto a quelle lavorate. Il suolo dell'interfila presenta valori più alti di densità di spore rispetto a quello vicino al piede della pianta. Anche in questo caso come nel sito marchigiano le parcelle analizzate non presentano differenze statisticamente significative per ciò che riguarda i tre indici analizzati.

L'analisi della biodiversità dei funghi AM effettuata attraverso lo studio delle spore presenti nei due siti non ha permesso di evidenziare delle differenze significative legate alle diverse lavorazioni e concimazioni del suolo. Tuttavia le parcelle che hanno subito la lavorazione del suolo presentano in modo consistente valori di densità spongina maggiori rispetto a quelle che non hanno avuto alcuna lavorazione.

Linea 3 Attività 4

Scopo dell'attività 4 è di identificare i funghi micorrizici arbuscolari (AM fungal types) nei due siti agroforestali individuati dal progetto (Marche e Sardegna) usando approcci molecolari.

Durante il 1° anno sono state messe a punto le tecniche di estrazione di DNA dal suolo e di analisi delle comunità AMF in radici di mais, fagiolo e sorgo provenienti da altre località. I risultati sono stati oggetto di una pubblicazione su *Ecological Applications* (Alguacil et al 2008). Durante il 2° anno abbiamo effettuato l'analisi dei campioni di suolo e radici di mais provenienti dal sito marchigiano. In particolare sono state eseguite estrazioni di DNA da 12 campioni di suolo e 12 da radici di mais sottoposte a 4 diverse combinazioni di fertilizzazione (0 e 90 Kg/ha di Azoto) e lavorazione (Lavorato -T0 e non lavorato -T1). I fungal types sono stati caratterizzati attraverso PCR-RFLP e sequenziamento di regioni specifiche dei geni ribosomali (SSU e/o LSU). I fungal types identificati appartengono al genere *Glomus* e ad alcuni membri dell'ordine Diversisporales (Diversisporaceae e Gigasporaceae). In particolare all'interno del gruppo *Glomus* sono presenti funghi AM filogeneticamente correlati con *Glomus mosseae*, *G. intraradices*, *G. caledonium*, *G. fasciculatum*, *G. viscosum* e numerosi altri

Glomus sp. non riferibili a specie di funghi AM di riferimento. I dati ottenuti finora, sulla base di circa 400 sequenze, hanno permesso di caratterizzare le comunità dei funghi AM nel suolo nelle differenti situazioni colturali. Allo stato attuale la biodiversità AMF, valutata attraverso l'indice di Shannon, risulta influenzata dal tipo di lavorazione piuttosto che dalla fertilizzazione. Interessante risulta inoltre la comparazione tra la componente fungina ottenuta nel comparto suolo e quella presente nelle radici di mais. Infatti nelle radici le comunità AMF, che consistono esclusivamente di funghi con capacità colonizzatrici, differiscono sensibilmente in numero e tipo da quelle presenti nel suolo.

Parallelamente è stato intrapreso lo studio delle comunità AMF del sito sardo effettuando analisi di campioni provenienti da 5 diversi tipi di utilizzo del suolo (vigneto inerbito e lavorato, erbaio, pascolo, sughereta). Sono state effettuate 27 estrazioni di DNA da suolo e relative amplificazioni PCR del DNA ribosomale dei funghi AM. Tale DNA è stato utilizzato per impostare e mettere a punto uno studio di metagenomica dei funghi del suolo (AMF inclusi) attraverso un approccio di pirosequenziamento (454 Life Sciences pyrosequencing). Finora sono state ottenute un totale di circa 21000 sequenze per i 5 siti. I dati sono in corso di elaborazione.

I risultati dell'attività riguardante il sito marchigiano sono stati presentati al 9 ECFG tenuto ad Edinburgo. I dati completi riguardanti i due siti verranno presentati all'International congress Endure che si terrà ad Ottobre a Montpellier.

Alguacil M.M., E Lumini., A Roldan., J.R Salinas-Garcia., P Bonfante and V. Bianciotto. 2008. The Impact of tillage practices on AM fungal diversity in crop fields under subtropical conditions. *Ecological Applications*. 18:527-536.

Borriello R, Lumini E., R. Bergero, Bianciotto V. ' Bonfante P. The impact of tillage practices and fertilizer regimens on arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) diversity in crop fields in central Italy investigated by ribosomal and mitochondrial markers. 9th European Conference on Fungal Genetics (ECFG9) 5th - 8th April 2008, Edimburgh, Scotland.

Lumini E., R. Borriello, M. Alguacil, P. Bonfante, V. Bianciotto. The impact of agricultural practices on arbuscular mycorrhizal fungi. Endure annual meeting, Diversifying crop protection, 13-15 October 2008 la Grande Motte, France

Linea 3 Attività 5

Scopo di questa attività è di analizzare i meccanismi molecolari che permettono ai funghi AM di agire da biofertilizzatori nei confronti della loro pianta ospite. Un aspetto chiave della simbiosi AM è infatti lo scambio di nutrienti tra i due partner: il fungo AM cede alla pianta elementi minerali, soprattutto fosforo, e riceve composti del carbonio. Il trasporto del fosfato nelle micorrizze arbuscolari è stato oggetto di numerosi studi e nell'ultimo decennio sono state ottenute numerose informazioni sulle basi molecolari di questo processo. Mediante l'utilizzo del microdissettore laser abbiamo dimostrato che nel sistema *Lycopersicon esculentum* (pomodoro) / *Glomus mosseae* le cellule che contengono gli arbuscoli sono caratterizzate da un pattern di espressione di geni per trasportatori del fosfato (PT) chiaramente distinto da quello presente nelle cellule adiacenti non arbuscolate. Si è dimostrato inoltre che il trascritto per un trasportatore del fosfato fungino (*GmosPT*) è costantemente presente nelle cellule contenenti arbuscoli. Questi risultati nel complesso hanno fornito uno scenario nuovo per lo scambio di nutrienti tra pianta e fungo (Balestrini et al., 2007).

E' noto che i funghi AM contribuiscono in modo significativo al trasferimento alla pianta anche di un altro elemento, l'azoto, sebbene non sia ancora noto in quale forma molecolare. Anche i determinanti genetici e molecolari di questo trasferimento sono ancora largamente sconosciuti. L'interesse è stato rivolto all'azoto organico. Con un approccio di SSH (Suppressive Subtractive Hybridization) applicato a colture monoaxeniche è stato dimostrato che il micelio extraradicale del fungo AM *G. mosseae* risponde a concentrazioni limitanti di azoto organico inducendo una risposta a livello trascrizionale (Cappellazzo et al., 2007). Questi dati suggeriscono inoltre che l'azoto abbia un ruolo di molecola segnale nei funghi AM.

Recentemente, sempre dal medesimo fungo AM è stato caratterizzato un gene codificante un trasportatore di amino acidi (*GmosAAP1*). La complementazione funzionale in un mutante di lievito ha permesso di stabilire che la proteina è in grado di trasportare prolina con un processo che dipende dal pH, dalla presenza di glucosio ed è accoppiato all'attività di pompe protoniche. Possibili substrati sono amino acidi non polari e idrofobici. Studi di espressione genica hanno dimostrato che il gene è principalmente espresso a livello del micelio extraradicale dove la quantità del trascritto aumenta in seguito ad esposizione ad azoto organico nella concentrazione millimolare. Nel complesso questi risultati suggeriscono che *GmosAAP1* abbia un ruolo nelle prime fasi di acquisizione di azoto organico, permettendo l'assorbimento di amino acidi dal suolo (Cappellazzo et al., 2008).

Balestrini R, Gomez-Ariza J, Lanfranco L, Bonfante P. (2007) Laser microdissection reveals that transcripts for five plant and one fungal phosphate transporter genes are contemporaneously present in arbusculated cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20(9): 1055-106. Citato in Faculty of 1000 Biology (<http://www.f1000biology.com/article/id/1091922/evaluation>)

Cappellazzo G, Lanfranco L, Bonfante P. (2007) A limiting source of organic nitrogen induces specific transcriptional responses in the extraradical structures of the endomycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Current Genetics*. 51:59-70.

Cappellazzo G, Lanfranco L, Fitz M, Wipf D, Bonfante P. (2008). Characterization of an amino acid permease from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiology*. vol. 147: 429-437.