

Progetto FISR “Cambiamenti climatici e sistemi produttivi agricoli e forestali: impatto sulle riserve di carbonio e sulla diversità microbica del suolo” SOILSINK

Linea di ricerca7: Carbon sink e cicli biogeochimici

Attività: MARKERS DELLE MICORRIZE PER IL CICLO DEL CARBONIO

Responsabile scientifico: Manuela Giovannetti, Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie, Università di Pisa

Produzione scientifica

- 1) Bedini Stefano, Pellegrino Elisa, Avio Luciano, Pellegrini Sergio, Bazzoffi Paolo, Argese Emanuele, Giovannetti Manuela (2008). Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. **Soil Biology and Biochemistry** (submitted).
- 2) Fortuna Paola, Avio Luciano, Morini Stefano, Giovannetti Manuela (2008). Arbuscular mycorrhizal networks as sinks for carbon under ambient and elevated atmospheric CO₂. **New Phytologist** (in preparation).

RELAZIONE 2° ANNO

Introduzione

L'obiettivo generale della attività è quello di studiare il ruolo dei funghi micorrizici arbuscolari (AM) nei processi di trasferimento e di immagazzinamento del carbonio atmosferico nel suolo.

I funghi AM costituiscono l'interfaccia abiotica/biotica tra suolo e pianta ed hanno un ruolo centrale nella nutrizione della pianta, in quanto le loro ife sono capaci di estendersi per molti metri nel terreno e di assorbire e traslocare alle radici sia i macro- che i micronutrienti presenti nel suolo (Smith e Read, 2008; Giovannetti e Avio, 2002). Ricerche recenti hanno dimostrato che il principale meccanismo che sta alla base della formazione di reti fungine che dalle radici si espandono tridimensionalmente nel terreno é rappresentato dalla capacità delle ife di formare anastomosi con ife originate da altri individui fungini compatibili, formando così reti di lunghezza indefinita (Giovannetti et al., 2001, 2004; Avio et al., 2006). La rottura di queste reti ifali e la riduzione del numero dei propaguli fungini, come conseguenza di alcune pratiche colturali dei sistemi agrari convenzionali, sono indicatori della diminuita stabilità del sistema pianta-suolo, in quanto vengono a mancare i principali mediatori del trasporto dei nutrienti dal terreno alla pianta e viceversa (Giovannetti e Gianinazzi-Pearson, 1994; Helgason et al., 1998).

I funghi AM rappresentano degli importanti fattori di carbon sink nel suolo, poiché il loro micelio, costituito principalmente da carboidrati complessi e recalcitranti alla degradazione microbica, tra cui la chitina, può raggiungere la lunghezza di 50 m/g. Il micelio extraradicale dei funghi AM è un forte produttore di una proteina di parete, la glomalina, che si accumula nel suolo come “Glomalin-Related Soil Protein” (GRSP) in quantità variabile da 2 a 15 mg g⁻¹ e, poiché contiene dal 30 al 40% di Carbonio, è considerata un ottimo strumento per compensare l'aumento dei livelli di CO₂ nell'atmosfera, data anche la sua lunga persistenza nel suolo (turn-over: 6-42 anni) (Wright e Upadhyaya, 1996; 1998; Rillig et al., 1999; 2001; Bedini et al., 2007).

Gli studi effettuati durante il 1° anno hanno permesso di determinare la produzione di reti micorriziche e di glomalina in ceppi fungini di riferimento per il confronto con i ceppi in

fase di isolamento provenienti dal sito di Agugliano (Università di Ancona). Il micelio extraradicale misurava da 12 a 42 m per pianta, i valori di glomalina (EE-GRSP) variavano da 0,40 a 0,45 mg per g di suolo secco, mentre i valori di glucosamina per mg di sostanza secca fungina variavano da 10 a 12 µg. Inoltre, le analisi dei siti di Agugliano dimostravano che la concentrazione di glomalina (TG-GRSP) era maggiore nei suoli non lavorati. Dai terreni di Agugliano lavorati e non lavorati, concimati e non concimati, erano stati effettuati isolamenti di funghi AM autoctoni, per poter procedere in seguito all'identificazione morfologica e molecolare.

Obiettivi del 2° anno

- 1) Isolamento e individuazione dei ceppi fungini, autoctoni, efficienti nella produzione di biomassa e nella formazione di reti miceliari nel suolo.
- 2) Mantenimento nella collezione IMA del Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie (DBPA) dell'Università di Pisa dei ceppi candidati come agenti di carbon-sink.
- 3) Determinazione della produzione di glomalina da parte di funghi AM e valutazione dei ceppi più efficienti nella produzione e nell'accumulo di glomalina, ai fini della loro valutazione come agenti di carbon-sink.

Risultati 2° anno

1) Isolamento e individuazione dei ceppi fungini autoctoni, efficienti nella produzione di biomassa e nella formazione di reti miceliari nel suolo.

a. Identificazione morfologica e molecolare degli isolati di Agugliano. Le colture delle piante trappola allevate sui suoli delle parcelle di Agugliano hanno prodotto, nel corso del primo anno, spore appartenenti a tipi morfologici diversi. In parte, queste spore sono state utilizzate per la produzione di colture di isolati morfologicamente omogenei. Le rimanenti spore sono state montate su vetrini per descrivere le loro caratteristiche al fine di effettuare una preliminare identificazione. Nel corso del secondo anno è stata effettuata una successiva estrazione di spore dal suolo delle colture trappola per confermare la presenza dei morfotipi già rilevati e per individuarne di altri caratterizzati da sporificazione tardiva. In questa analisi è stato anche contato il numero di spore prodotte per grammo di terreno e il numero di spore per ogni morfotipo presente. Da questa rilevazione è risultato che la produzione di spore in colture provenienti da parcelle non lavorate era più elevata rispetto alle parcelle lavorate, mentre il tipo di coltura o il livello di concimazione della parcella non avevano influenza sul numero totale di spore. Specificatamente, nelle trappole provenienti da parcelle non lavorate il numero di spore prodotte era di ca. $100 \pm 20 \text{ g}^{-1}$ suolo contro ca. $20 \pm 5 \text{ g}^{-1}$ suolo nelle trappole da parcelle lavorate (Figura 1). Le spore appartenevano più frequentemente alle specie *Glomus mosseae*, *Glomus viscosum* (Figura 2a), e *Glomus intraradices*. Questi morfotipi erano stati osservati anche nel precedente rilevamento, mentre spore di *Glomus geosporum* (Figura 2b) sono state osservate per la prima volta durante questo secondo rilievo con una frequenza tuttavia non molto elevata (2% del totale). L'attribuzione delle spore alle menzionate specie è confortata dalla identificazione mediante sequenze di SSU rDNA dalle spore delle trappole, ottenute dai colleghi del CRA-SSDS di Firenze. Per quanto riguarda la distribuzione delle singole specie, si evidenzia che *G. viscosum* e *G. intraradices* sporulano più abbondantemente nelle trappole da parcelle non lavorate, mentre gli altri morfotipi non danno differenze significative (Figura 3). La valutazione dell'efficienza degli isolati mediante stima della produzione di micelio extraradicale, nel sistema sperimentale messo a punto precedentemente, non è stata sinora possibile a causa della bassissima frequenza di germinazione delle spore degli isolati nativi.

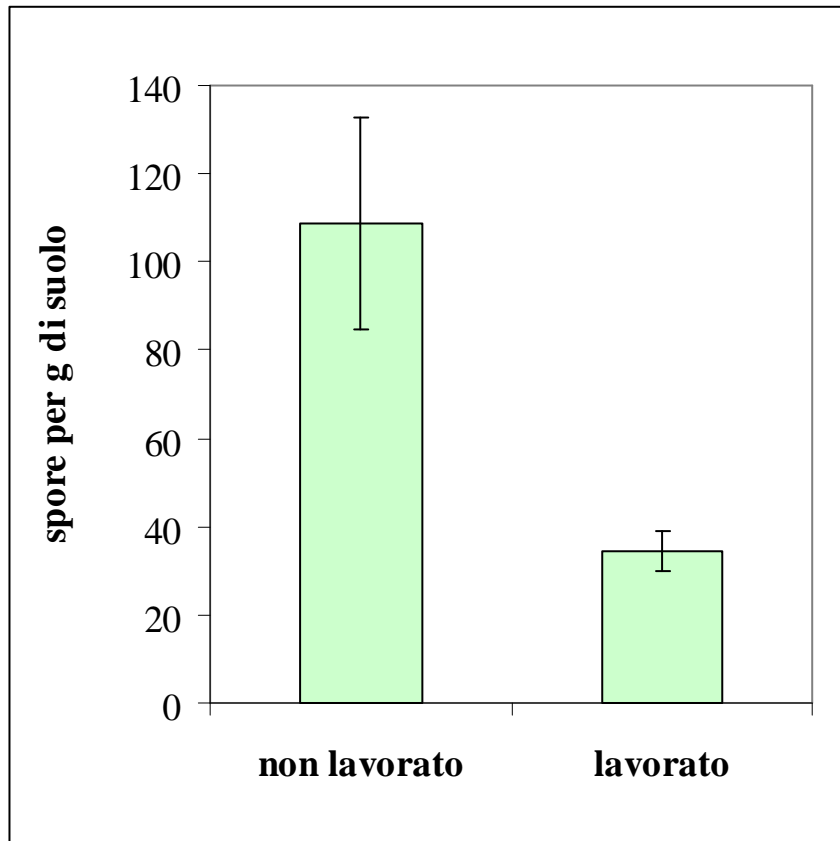


Figura 1. Numero di spore prodotte per grammo di terreno nelle piante trappola di parcelle lavorate e non lavorate del sistema sperimentale di Agugliano (AN), a 15 mesi dall' impianto. Le barre indicano l'errore standard (n=4).

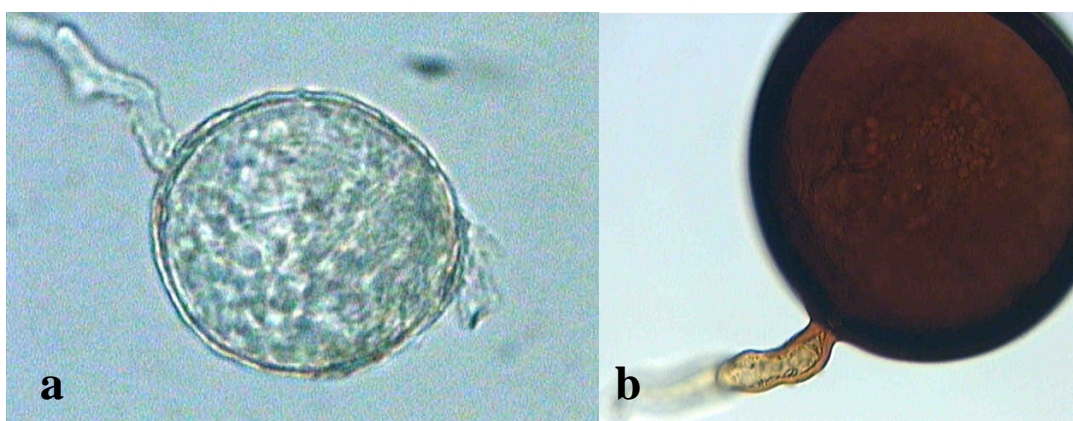


Figura 2. a) spora di *Glomus viscosum* b) spora di *Glomus geosporum*.

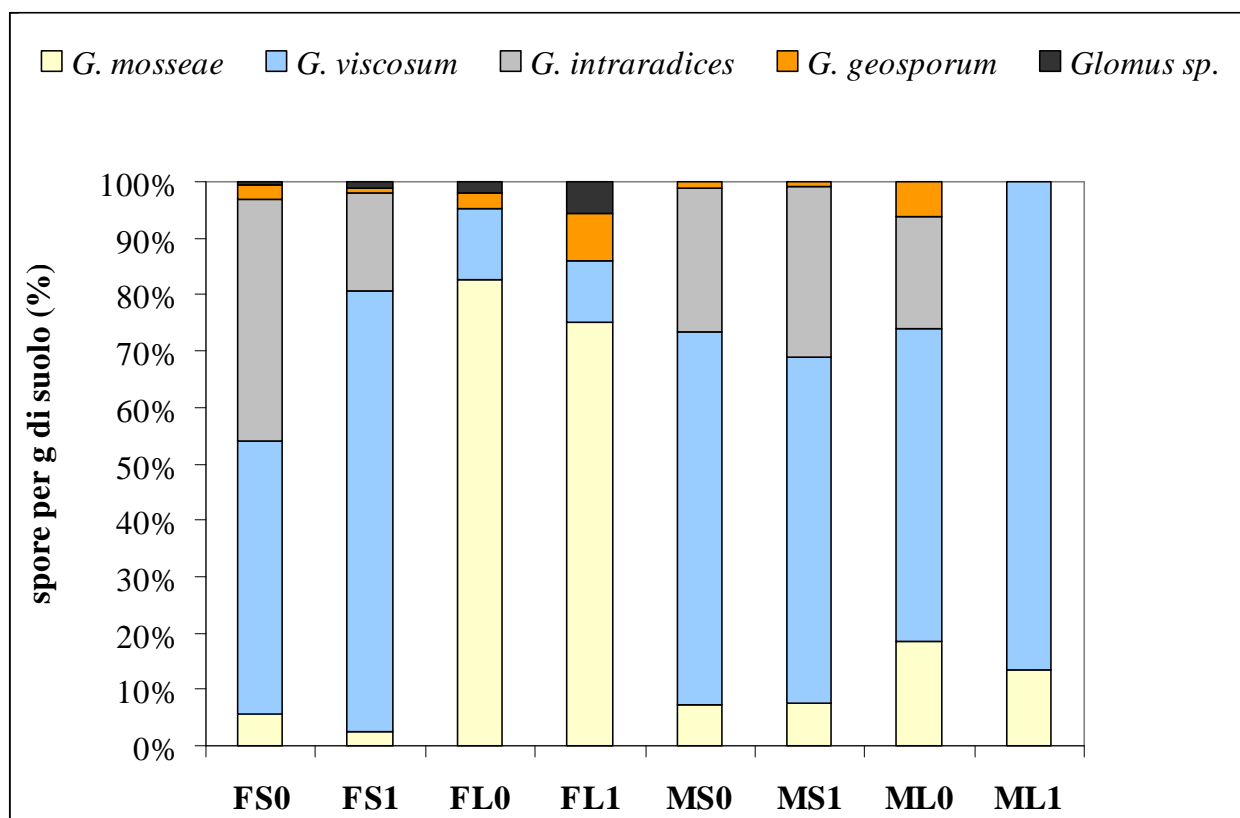


Figura 3. Distribuzione di frequenza delle spore prodotte nelle piante trappola delle parcelle del sistema sperimentale di Agugliano (AN), suddivise per specie. FS0, frumento non lavorato, non concimato; FS1, frumento non lavorato, concimato; FL0, frumento lavorato, non concimato; FL1, frumento lavorato, concimato; MS0, mais non lavorato, non concimato; MS1, mais non lavorato, concimato; ML0, mais lavorato, non concimato; ML1, mais lavorato, concimato.

b. Validazione del fattore di conversione da glucosamina a biomassa fungina in sistemi in purezza. I valori di glucosamina ottenuti nel primo anno risultavano conformi a quelli di letteratura. Tuttavia il metodo standard con il quale il micelio fungino è estratto dal suolo e successivamente selezionato produce un materiale ancora ricco di sostanza organica e inorganica di origine non fungina. Durante questo anno abbiamo messo a punto un sistema modello per l'ottenimento di abbondante micelio fungino puro, che abbiamo utilizzato per ottenere un nuovo e più affidabile fattore di conversione che possa permettere il calcolo della biomassa fungina prodotta dagli isolati autoctoni provenienti dai siti prescelti. Abbiamo utilizzato un sistema sperimentale in vivo, per raccogliere il micelio extraradicale prodotto da piantine micorrizzate micropropagate di *Prunus cerasifera* inoculate con *Glomus mosseae*. La determinazione biochimica della glucosamina (GLC) è stata effettuata utilizzando il metodo descritto nella relazione del primo anno (Ride e Drysdale, 1972). Il contenuto in GLC del micelio extraradicale era di $167.0 \pm 4.2 \mu\text{g}$, che, diviso per il peso fungino, dava il valore di $68.2 \pm 1.7 \mu\text{g}$ per mg di peso secco fungino, corrispondente ad un fattore di conversione di 14.7 da GLC a biomassa fungina. Tale fattore di conversione potrà essere utilizzato per le stime di biomassa fungina ogniqualvolta non sia possibile una determinazione diretta, i.e. quando il micelio prodotto non è sufficiente per determinarne il peso e per la stima del micelio intraradicale. E' interessante notare che utilizzando il nostro fattore di conversione abbiamo potuto stimare la quantità di biomassa fungina extraradicale producibile in un ettaro di suolo: 2.090 kg ha^{-1} . In aggiunta, abbiamo calcolato il peso

specifico fungino, corrispondente a $7.84 \mu\text{g m}^{-1}$ di ife. Tale dato risulta utile per la determinazione della biomassa fungina disponendo della sola lunghezza ifale.

- c. Isolamento di ceppi fungini autoctoni da suoli prelevati da parcelle sperimentali site in Berchidda (SS). Il campionamento del terreno è stato eseguito sulle parcelle a vigneto inerbito, vigneto lavorato e a sughereta, e le piante trappola sono state preparate come descritto nella relazione del primo anno relativamente al suolo di Agugliano (Figura 4). In breve il suolo campionato, miscelato in parti uguali con terragreen, è stato seminato con erba medica e leucantemo. Dopo 6, 10 e 14 mesi sono stati effettuati dei controlli di sporificazione. Le spore, che sono state osservate solo all'ultimo rilevamento, sono state distinte per morfotipo, separate e montate su vetrini per effettuare una preliminare identificazione. In totale sono stati ottenuti otto morfotipi, di cui uno costituito da spore esclusivamente intraradicali. La identificazione a livello di specie è in corso, in attesa di ottenere colture multi- o monosporali dagli stessi morfotipi (Figura 5).



Figura 4. Le parcelle a vigneto inerbito e a sughereta del sistema sperimentale di Berchidda (SS).

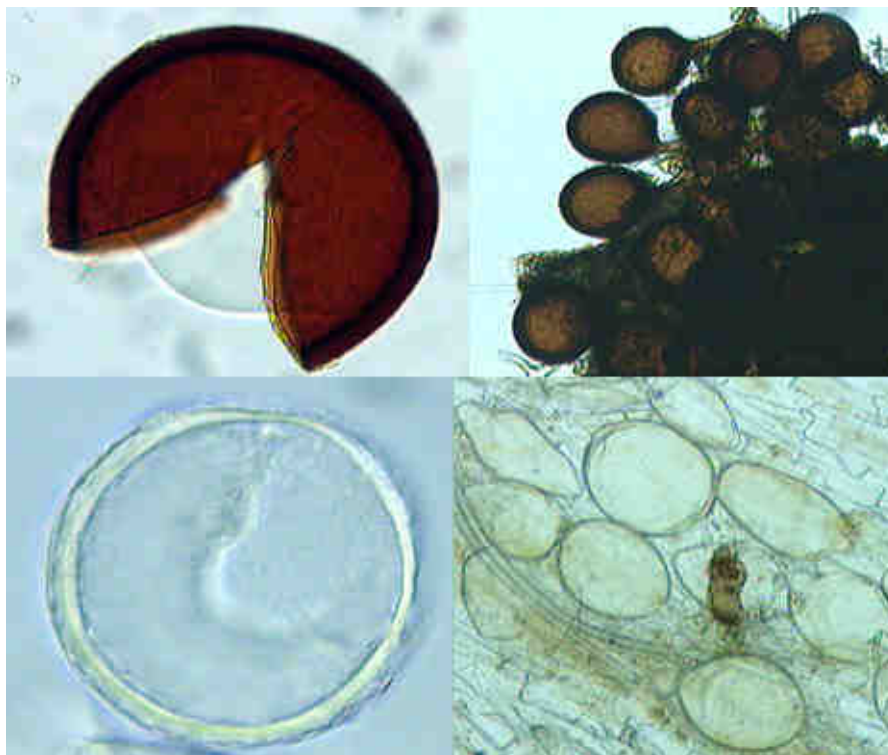


Figura 5. Varietà dei morfotipi rinvenuti nelle piante trappola delle parcelle del sistema sperimentale di Berchidda (SS).

2) **Mantenimento nella collezione IMA dell'Università di Pisa dei ceppi candidati come agenti di carbon-sink.**

Gli isolati ottenuti dai suoli di Agugliano sono stati inseriti nella collezione IMA, ospitata nei nostri laboratori, in cui sono accolti e mantenuti isolati indigeni e provenienti da altre collezioni. Gli isolati sono riprodotti in "pot-cultures" e controllati periodicamente per garantirne la purezza e la infettività.

3) **Determinazione della produzione di glomalina da parte di funghi AM e valutazione dei ceppi più efficienti nella produzione e nell'accumulo di glomalina, ai fini della loro valutazione come agenti di carbon-sink.**

a. *Analisi della glomalina negli aggregati del suolo di Agugliano.* Aggregati di particelle di suolo di dimensioni comprese tra 1 e 2 mm sono stati estratti mediante setacciatura a secco da campioni di suolo di Agugliano da parcelle ex frumento e sottoposti ad analisi per la concentrazione di glomalina misurata come EE-GRSP e T-GRSP. L'estrazione della glomalina è stata effettuata secondo la procedura descritta da Wright e Upadhyaya (1996). La EE-GRSP è stata estratta con citrato 20 mM, pH 7.0 a 121 °C per 30 min. La T-GRSP è stata estratta con citrato di sodio 50 mM, pH 8.0 a 121 °C con più cicli di estrazione di 90 min ciascuno. Il supernatante di ciascun ciclo di estrazione è stato raccolto in un unico pool e il contenuto in proteine è stato determinato mediante lettura spettrofotometrica con il metodo Bradford usando sieralbumina bovina come standard. I risultati ottenuti mostrano una diversità nella concentrazione di glomalina negli aggregati di suolo tra le parcelle lavorate e non lavorate sia per quanto riguarda la T-GRSP che la EE-GRSP ($F_{1,14} = 83.42$; $p < 0.001$ e $F_{1,14} = 50.83$; $p < 0.001$; rispettivamente) (Figura 6). Nessuna differenza significativa è risultata essere determinata dalla diversa concimazione delle colture né dalla posizione delle parcelle (vicine o lontane dalla strada).

b. *Analisi della glomalina da piante trappola di Agugliano.* Il substrato proveniente dalle colture di piante trappola, allestite per l'isolamento dei funghi autoctoni a partire dalle parcelle coltivate a frumento, è stato sottoposto, dopo sei mesi di crescita delle piante utilizzate come ospiti (erba medica e mais), ad analisi del contenuto di glomalina misurata come EE-GRSP. L'estrazione della glomalina è stata effettuata a partire da 1 g di substrato seguendo la procedura sopra descritta. La concentrazione di EE-GRSP dopo sei mesi di coltura è risultata essere sempre maggiore dei valori iniziali del terreno originario variando da 0.28 a 0.38 mg g⁻¹ di suolo. L'aumento di concentrazione rispetto ai valori della parcella di provenienza è risultato essere compreso tra il 17 e l' 87%. Differenze nelle variazioni di concentrazione di EE-GRSP al termine della prova sono risultate essere determinate dalla concimazione effettuata nel terreno di origine ($F_{1,14} = 6.81$; $p = 0.023$), mentre nessuna differenza è risultata essere dovuta agli altri fattori, compresa la specie di pianta trappola (Figura 7).

c. *Analisi della Glomalina nei terreni di Berchidda* I campioni di suolo proveniente dalle parcelle di Berchidda sono stati analizzati per il loro contenuto in glomalina sia come EE-GRSP, sia come T-GRSP, secondo le modalità sopra descritte. Dai risultati ottenuti è risultata una concentrazione di EE-GRSP variabile tra 0.55, 0.62 e 0.67 mg g⁻¹, rispettivamente per il vigneto non inerbito, inerbito e la sughereta, mentre la T-GRSP è risultata variare tra 2.17, 2.72 e 2.60 mg g⁻¹ sempre per vigneto non inerbito, inerbito e sughereta (Figura 8). Nessuna differenza statisticamente significativa è risultata dall'analisi della varianza effettuata sui valori di EE-GRSP dei tre diversi sistemi colturali, mentre la concentrazione della T-GRSP è risultata essere significativamente maggiore nella sughereta e nel vigneto inerbito rispetto al vigneto non inerbito ($F_{2,23} = 3.59$; $p = 0.044$).

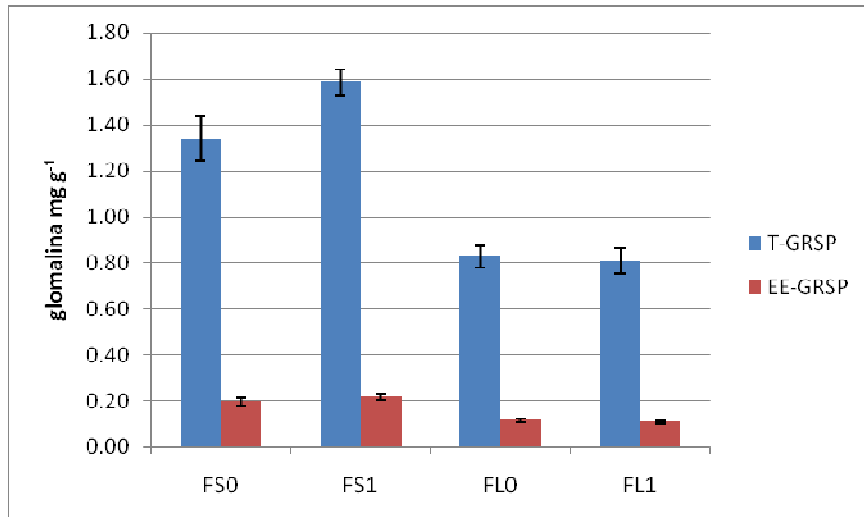


Figura 6. Contenuto in glomalina (EE-GRSP e T-GRSP) in aggregati di particelle di suolo (1-2 mm) provenienti dalle parcelle di Agugliano (AN). FS0, frumento non lavorato, non concimato; FS1, frumento non lavorato, concimato; FL0, frumento lavorato, non concimato; FL1, frumento lavorato, concimato. In blu è rappresentato il valore di T-GRSP, in rosso il valore di EE-GRSP. Le barre indicano l'errore standard (N=6).

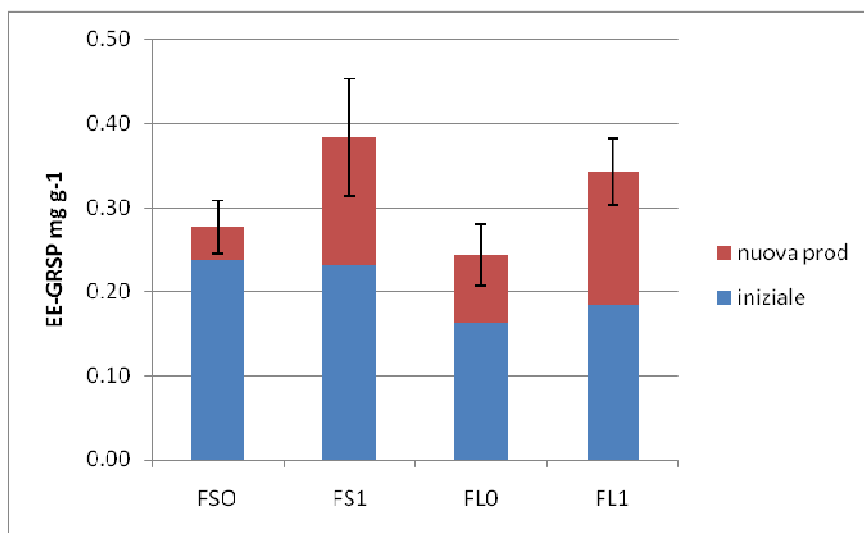


Figura 7. Contenuto in glomalina (EE-GRSP) del substrato delle piante trappola dopo sei mesi di coltura con terreno proveniente dalle parcelle di Agugliano (AN). FS0, frumento non lavorato, non concimato; FS1, frumento non lavorato, concimato; FL0, frumento lavorato, non concimato; FL1, frumento lavorato, concimato. In blu è rappresentato il valore iniziale di EE-GRSP, in rosso la differenza tra il valore finale e il valore iniziale della concentrazione di EE-GRSP. Le barre indicano l'errore standard (n=4).

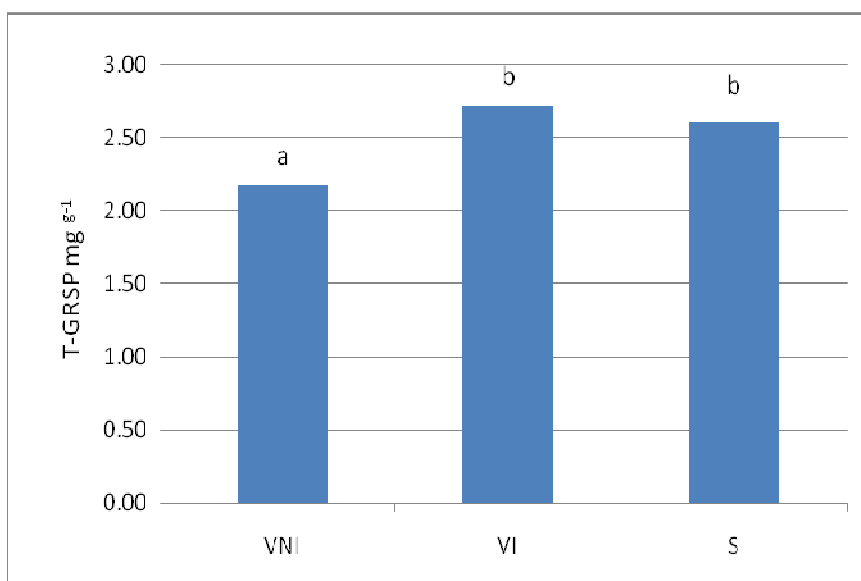


Figura 8. Concentrazione di glomalina (T-GRSP) nel suolo di Berchidda (SS) in diversi sistemi colturali. VNI, vigneto non inerbito; VI, vigneto inerbito; S, sughereta. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$) secondo il Tukey HSD post hoc test.

Bibliografia

- Avio L., Pellegrino E., Bonari E., Giovannetti M. (2006). Functional diversity of arbuscular mycorrhizal fungal isolates in relation to extraradical mycelial networks. *New Phytologist*, 172, 347-357.
- Bedini S., Avio L., Argese E., Giovannetti M. (2007). Effects of long-term land use on arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin-related soil protein. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 120, 463-466.
- Giovannetti M., Avio L. (2002). Biotechnology of arbuscular mycorrhizas. In "Applied Mycology and Biotechnology". Vol. 2. Agriculture and Food Production, Elsevier, pp. 275-310.
- Giovannetti M., Fortuna P., Citeresi A. S., Morini S., Nuti M. P. (2001). The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist*, 151, 717-724.
- Giovannetti M., Sbrana C., Avio L., Strani P. (2004). Patterns of belowground plant interconnections established by means of arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist*, 164, 175-181.
- Giovannetti M., Gianinazzi-Pearson V. (1994). Biodiversity in arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research*, 98: 705-715.
- Helgason T., Daniell T. J., Husband R., Fitter A. H., Young J. P. W. (1998). Ploughing up the wood-wide web? *Nature*, 394, 431.
- Ride J. P., Drysdale R. B. (1972). A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiol. Plant Pathol.* 2, 7-15.
- Rillig M.C., Wright S.F., Allen M. F., Field C. B. (1999). Rise in carbon dioxide changes soil structure. *Nature*, 400, 628.
- Rillig M.C., Wright S.F., Kimball B.A., Pinter P.J., Wall G.W., Ottmans M.J. and Leavitt S.W. (2001). Elevated carbon dioxide and irrigation effects on water stable aggregates in a Sorghum field: a possible role for arbuscularmycorrhizal fungi. *Global Change Biology* 7, 333-337.
- Smith S. E., Read D. J. *Mycorrhizal symbiosis*. (2008). Academic Press, San Diego, USA.
- Wright S. F., Upadhyaya A. (1996). Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science*, 161, 575-586.
- Wright S. F., Upadhyaya A. (1998). A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 198, 97-107.