UNIONE EUROPEA

REPUBBLICA ITALIANA

REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA

POR FESR
SARDEGNA 2014-2020

Progetto strategico Sulcis

Risorse microbiche del Sulcis-Iglesiente per l'innovazione dei sistemi agropastorali

Isolamento e caratterizzazione di batteri N-fissatori simbionti della Sulla: nuove possibilità per la foraggicoltura del Sulcis-Iglesiente

GIOVANNI GARAU, Maria Sitzia, Pietrino Deiana

Agris

Bonassai 04 luglio 2019

Il progetto «Sulcis»

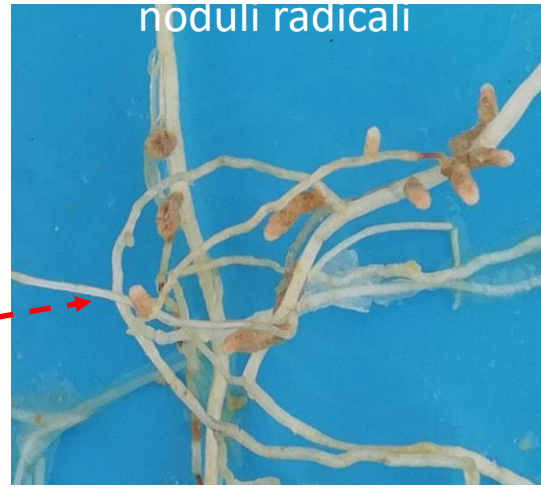
Obiettivo generale:

- sviluppo di nuovi sistemi foraggeri basati sull'inserimento della specie *Hedysarum coronarium* L. (Sulla), e dei relativi batteri azotofissatori simbionti, nelle filiere zootecniche del Sulcis-Iglesiente.

Il progetto «Sulcis»

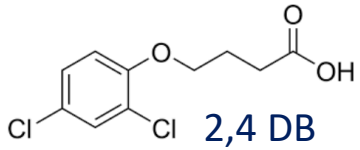
Obiettivi specifici:

- studio del germoplasma batterico (rizobi) presente all'interno dei noduli radicali di specie di *Hedysarum* cresciute su suoli del Sulcis-Iglesiente (UNISS);

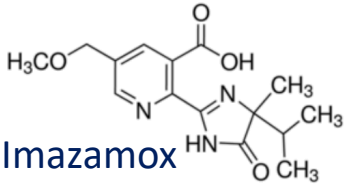


- valutazione delle potenzialità agronomiche e dell'influenza sulla produzione di latte ovino, di diverse combinazioni **Sulla-rizobi N-fissatori simbionti** in aziende del Sulcis-Iglesiente (AGRIS);

- valutazione degli effetti e dell'efficacia del diserbo chimico nel controllo delle malerbe e sulla struttura e funzione delle popolazioni microbiche dei suoli (AGRIS-UNISS).



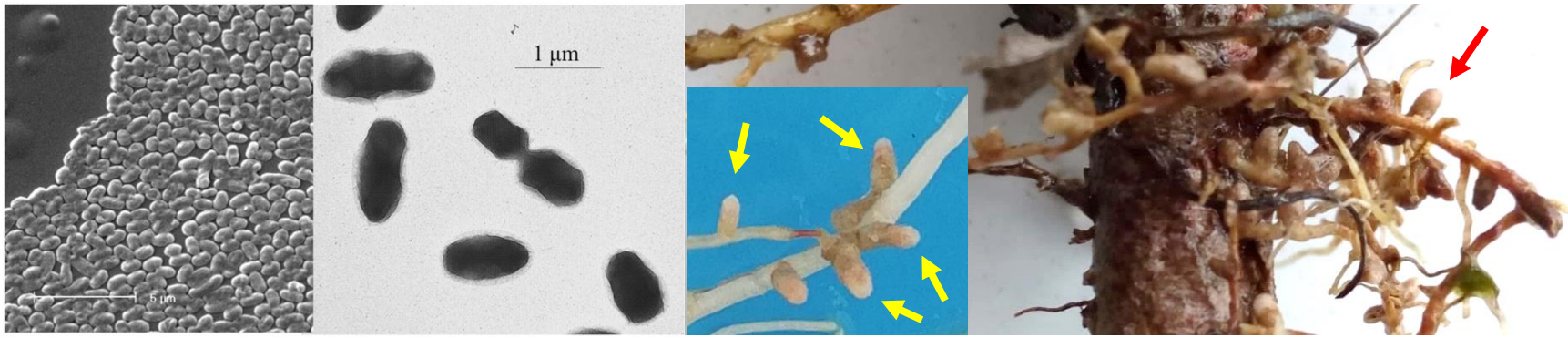
2,4 DB



Imazamox

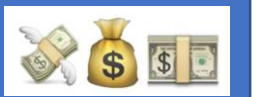
Perché isolare e caratterizzare i **rizobi della Sulla**?

- Rizobi: batteri Gram negativi aerobi dotati di flagelli (sono mobili).



- I rizobi vivono liberi nel suolo come saprofiti (si nutrono di sostanza organica).
- Possono infettare le radici della Sulla formando i noduli radicali.
- All'interno dei noduli, i rizobi possono convertire l'azoto atmosferico (N_2) in azoto ammoniacale (NH_3) che viene prontamente utilizzato dalla pianta.

La Sulla, in simbiosi con il rizobio, cresce senza bisogno di concimazioni azotate ➡ …. il suolo si arricchisce di N



- Abbiamo la Sulla, abbiamo i rizobi nel suolo… tutto bene dunque? **In effetti, NO**

Quali problemi:

1. il rizobio della Sulla, che appartiene alla specie *Rhizobium sullae*, **può essere assente** nel suolo (o presente in numero molto limitato);

   ➡ situazione comune in suoli dove la Sulla non viene coltivata, spesso a causa di condizioni edafiche non ideali (ad es. suoli con pH < 7.0). ★

2. il rizobio della Sulla **è presente** nel suolo ma **fissa N in maniera subottimale** all'interno dei noduli;

   ➡ situazione che si riscontra prevalentemente in suoli che hanno ospitato o ospitano la coltura. ☆

Quali problemi:

1. il rizobio della Sulla è assente nel suolo (o presente in numero molto limitato);

- la maggior parte delle piante non presenta noduli radicali;
- se l'N nel suolo è scarso le foglie appaiono clorotiche e la crescita stentata.

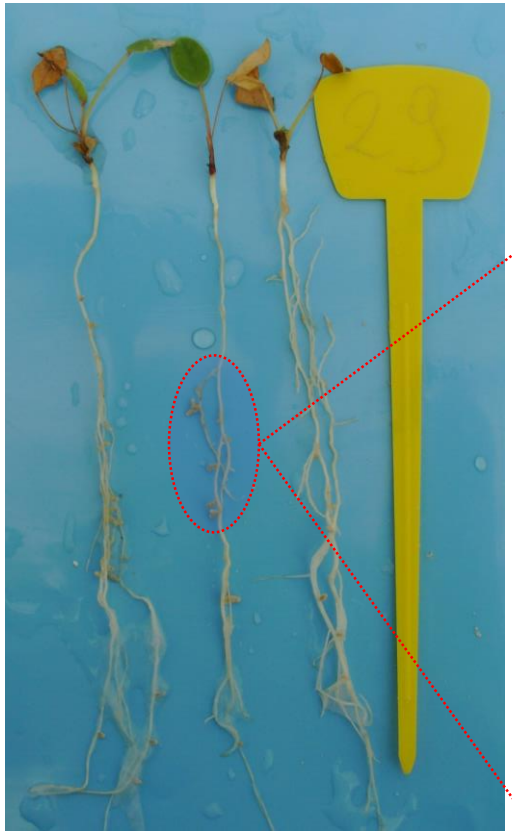
Rizobio assente
(piante di Sulla NON nodulate; nessuna N-fix; suolo povero di N)

Rizobio presente
(piante di Sulla nodulate; N-fix attiva; suolo povero di N)

Quali problemi:

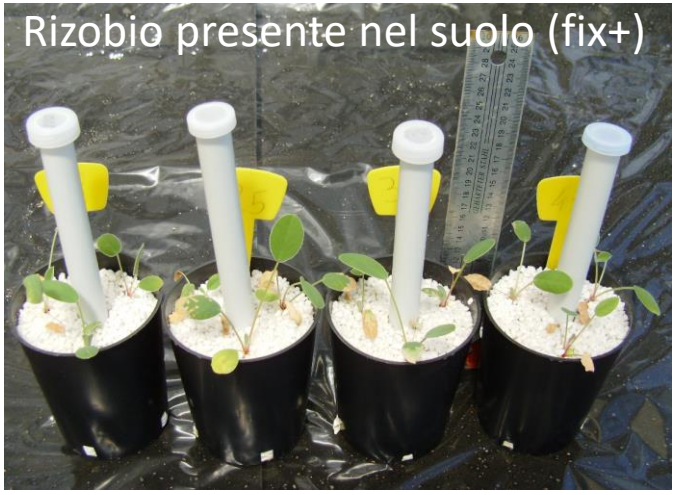
2. il rizobio della Sulla è presente nel suolo ma **fissa N in maniera subottimale**;

le piante si presentano ben nodulate ma la crescita della pianta rimane stentata

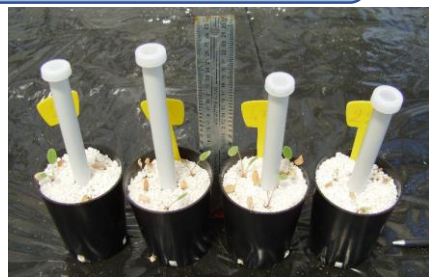


N-fissazione modesta

N-fissazione ottimale



- **Domanda:** esiste una soluzione per superare questi problemi?



1. rizobio assente (o poco presente);
2. rizobi presenti ma N-fissazione modesta.

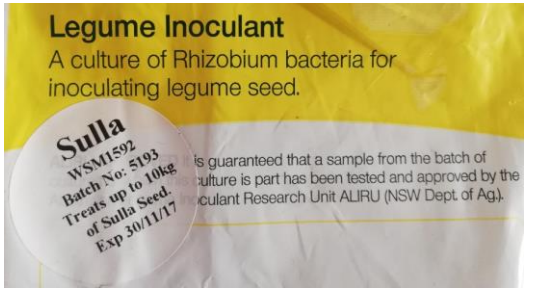
crescita e resa limitate o del tutto assenti

- Risposta: si, è possibile «manipolare» la simbiosi *pianta-batterio* per consentire una coltivazione soddisfacente della Sulla in aree dove sinora ha avuto poco successo.

- Come?

Selezionando ceppi rizobici capaci di elevata N-fissazione (fix+) nelle condizioni pedoclimatiche locali…..

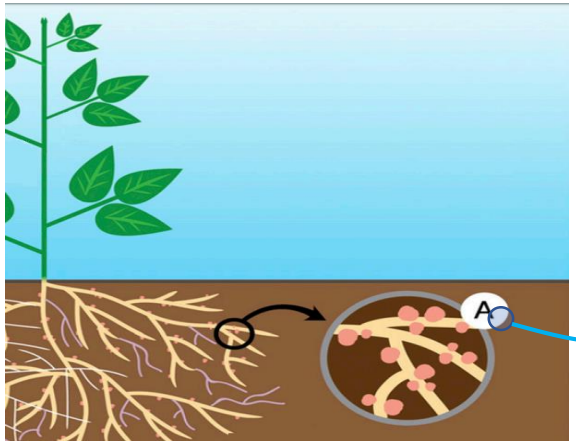
…. e utilizzando i migliori «rizobi locali» per inoculare i semi di Sulla.



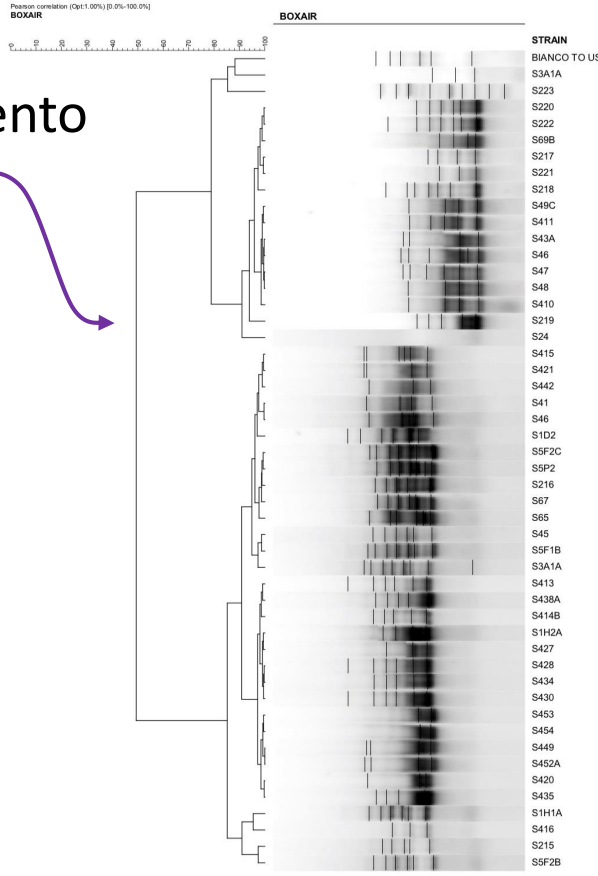
Selezione di ceppi di *R. sullae* ben adattati ai suoli del Sulcis-Iglesiente e capaci di elevata azotofissazione

Approccio sperimentale:

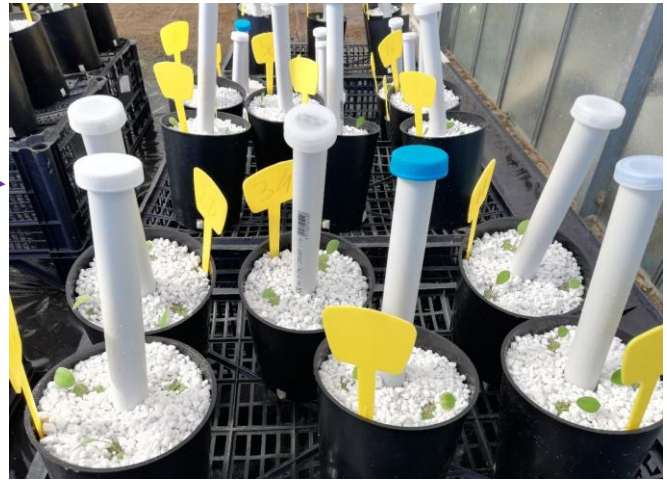
1. isolamento di rizobi dai noduli radicali di piante di Sulla cresciute nei suoli del Sulcis-Iglesiente;



2. tipizzazione genetica e raggruppamento dei ceppi;

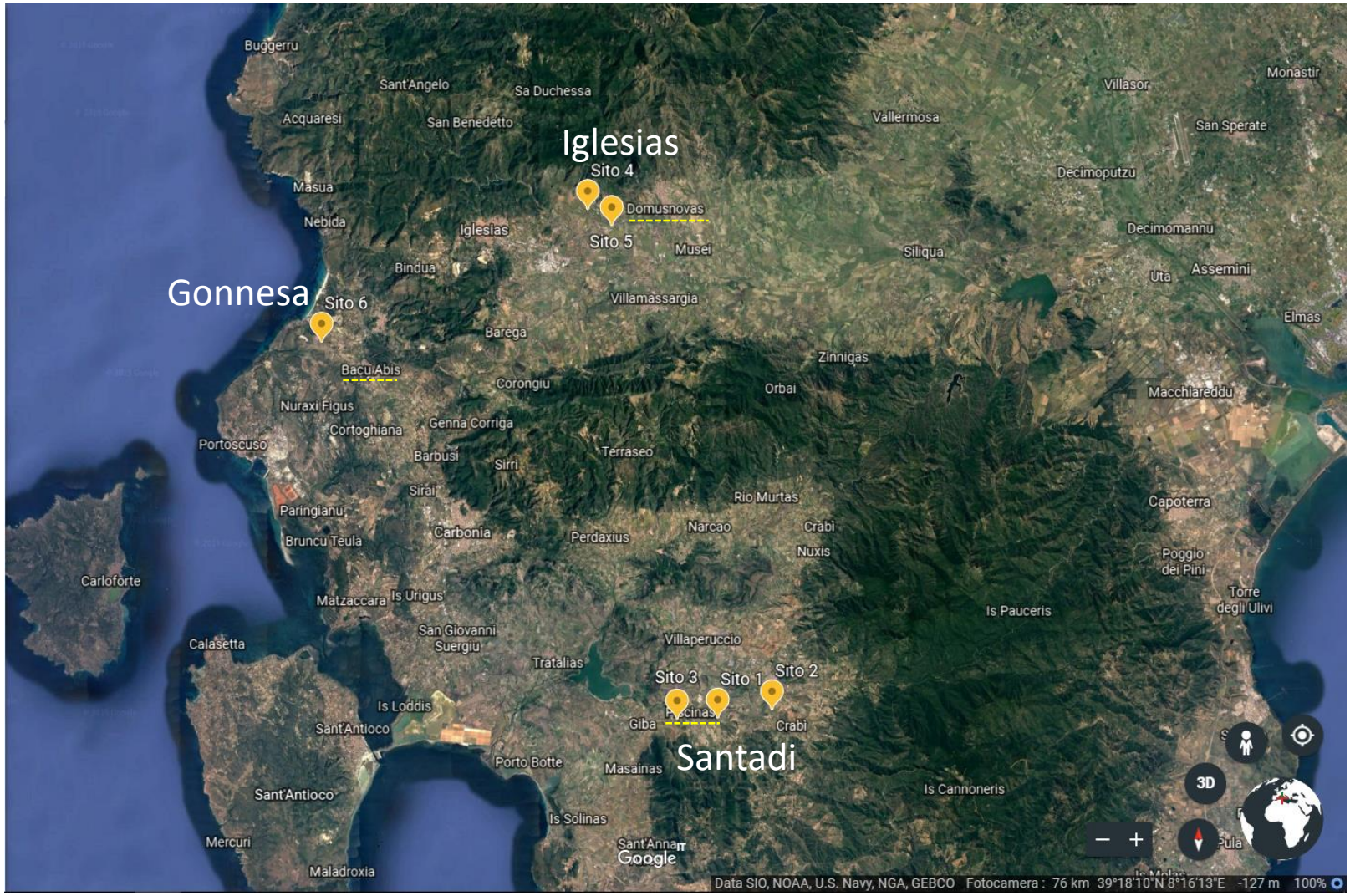


3. prove di infezione e azotofissazione.



1 Isolamento di rizobi dai noduli radicali di piante di Sulla cresciute nei suoli del Sulcis-Iglesiente.

Siti di prelievo delle piante di Sulla



Sito 1
pH 6.8

Sito 2
pH 6.9

Sito 3
pH 6.9

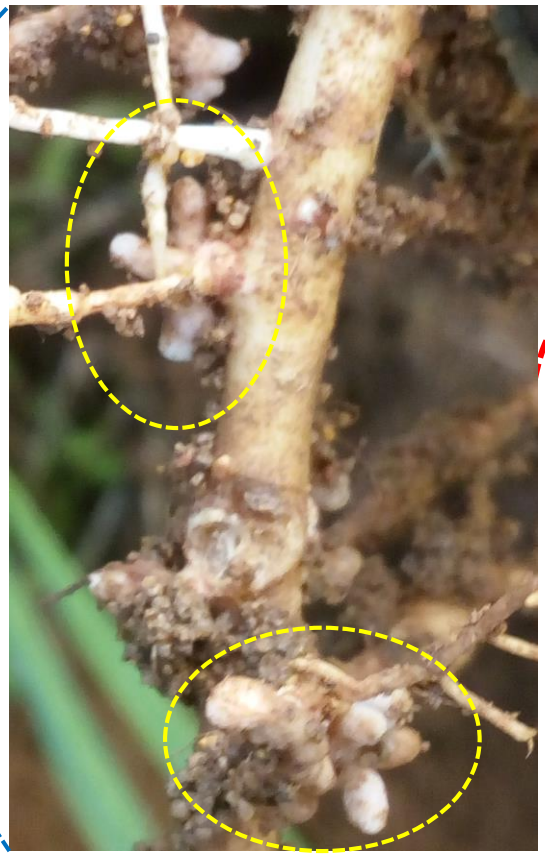
Sito 4
pH 6.8

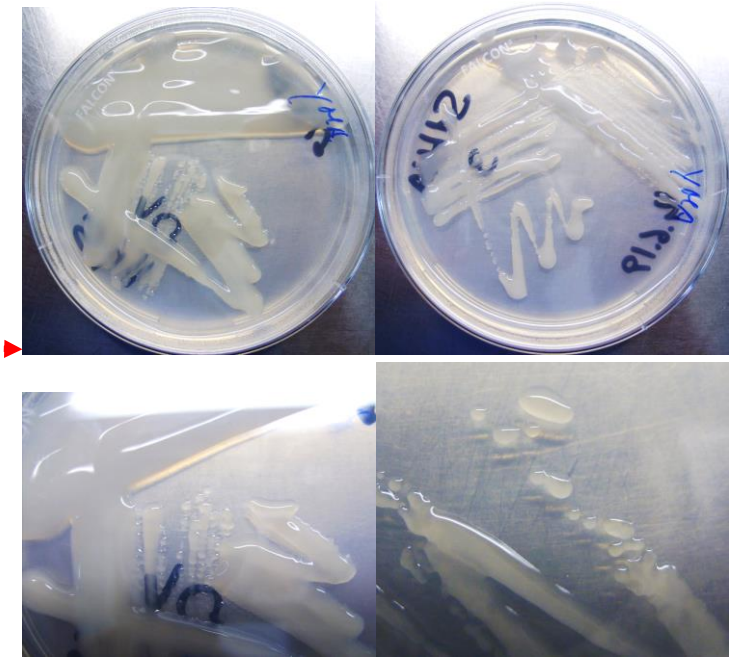
Sito 5
pH 6.9

Sito 6
pH 6.8

Bonassai 04 luglio 2019

1 Isolamento di rizobi dai noduli radicali di piante di Sulla cresciute nei suoli del Sulcis-Iglesiente.





Risultati

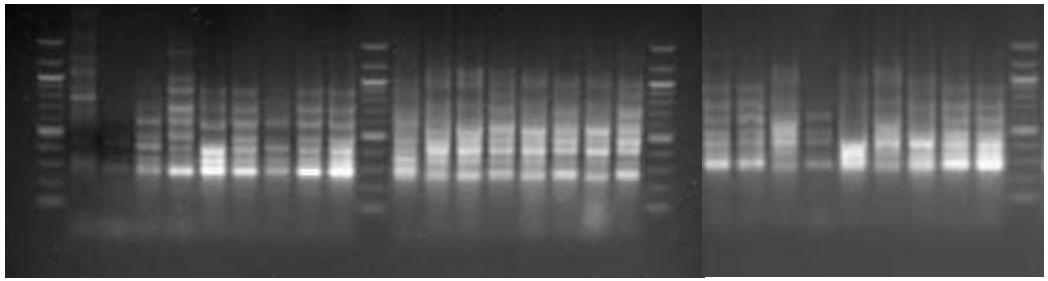
- Isolate (in totale) 51 colture pure batteriche dai noduli radicali (→ tutte conservate a -80 °C);
- isolati batteri da piante raccolte in tutti i siti;
- elevata presenza di batteri non coltivabili nei noduli prelevati nel sito S3.

Sito	Nr. noduli selezionati (nr. piante)	Colture pure
S1	8 (3)	3
S2	30 (3)	10
S3	39 (3)	1
S4	55 (10)	30
S5	14 (4)	4
S6	9 (4)	3

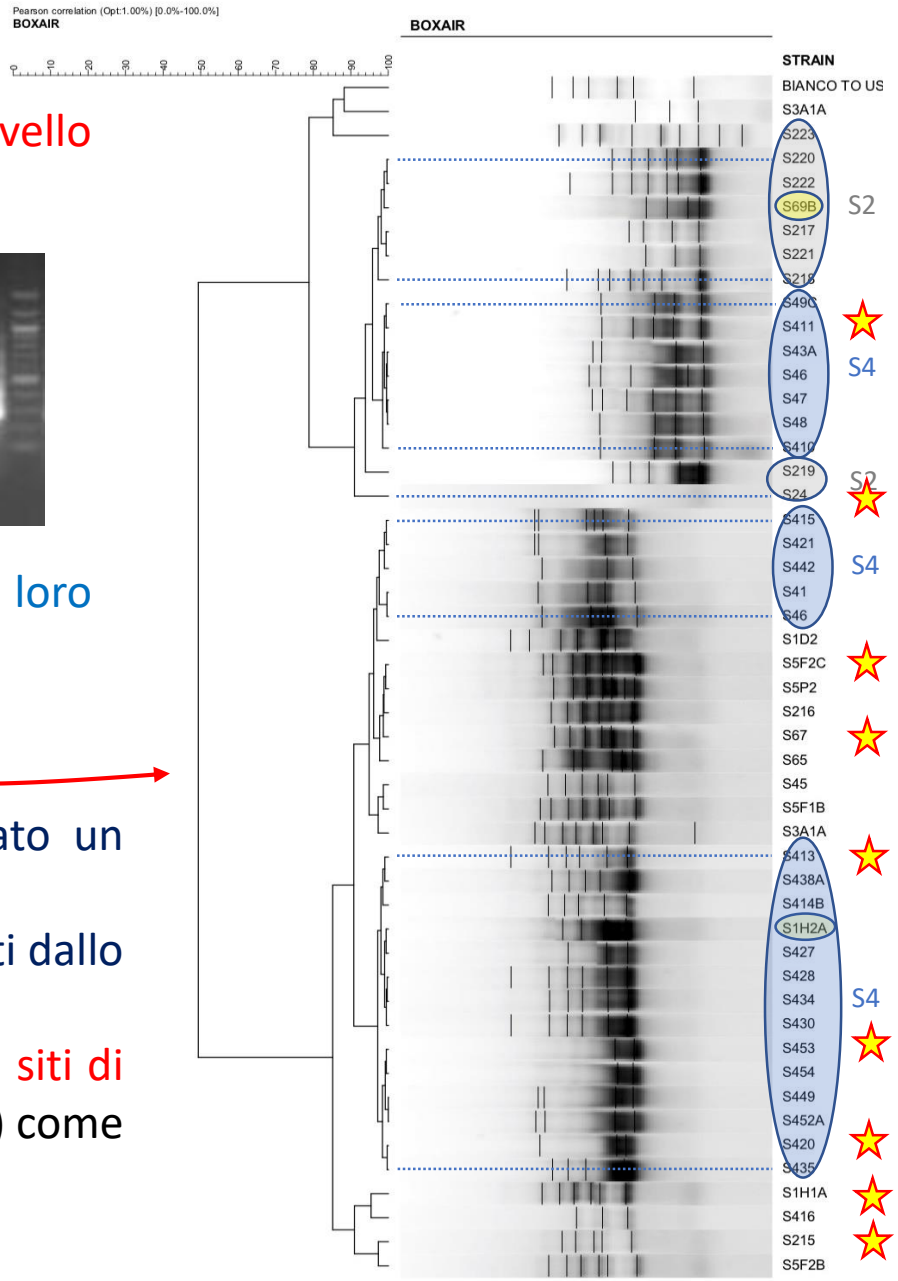
2

- Tipizzazione genetica e raggruppamento dei ceppi in base al profilo molecolare.

❑ Tutti gli isolati (n=51) sono stati tipizzati a livello molecolare utilizzando il primer BOX A1R;



❑ i profili molecolari ottenuti sono stati confrontati tra loro e raggruppati in base alla similitudine;



Risultati

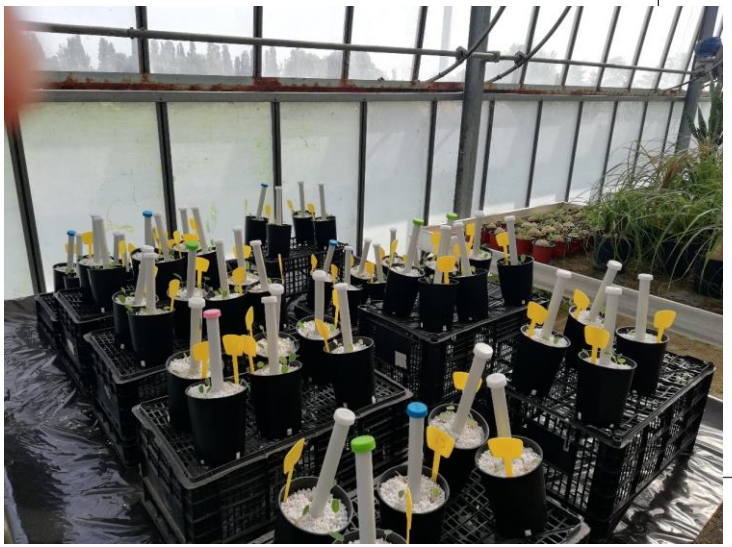
- Notevole biodiversità: tutti i ceppi hanno presentato un profilo unico (popolazione batterica eterogenea);
- influenza del sito sulla diversità batterica (ceppi isolati dallo stesso sito sono risultati simili tra loro, S2 ed S4);
- ceppi rappresentativi dei diversi gruppi e dei diversi siti di collezione sono stati identificati (seq. Gene 16S rRNA) come ***R. sullae***.

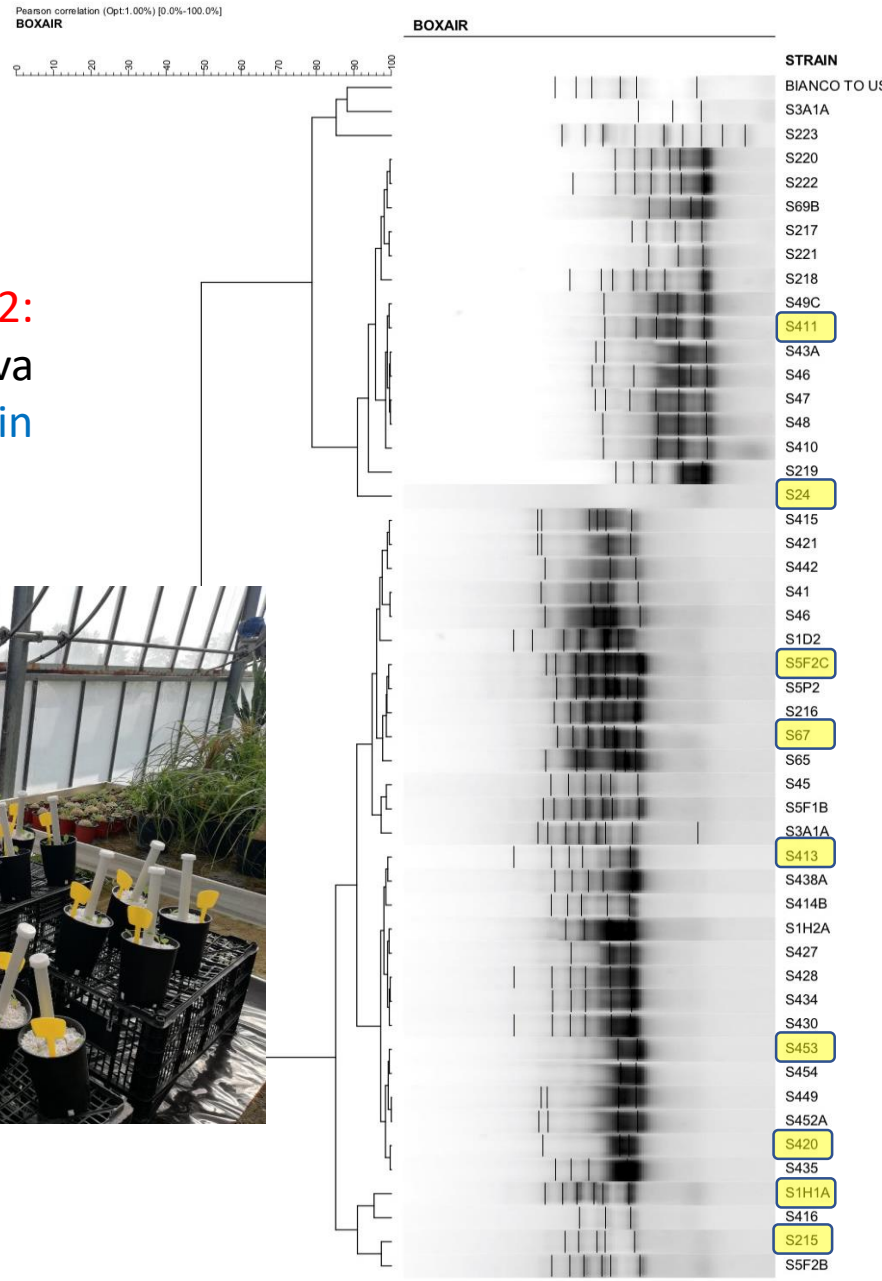
3

- Prove di infezione e azotofissazione in ambiente controllato.

- I ceppi identificati a livello molecolare sono stati utilizzati in prove di infezione e N-fissazione in combinazione con la Sulla.

- Nell'esperimento è stato incluso il *R. sullae* WSM1592: isolato nel 1995 da una pianta di Sulla raccolta ad Ottava (Sassari), ha ottime capacità N-fix, è disponibile in commercio come «peat-inoculant» .





3 • Prove di infezione e azotofissazione in ambiente controllato.

L'esperimento

Sabbia sterilizzata due volte a 120°C per 30 min

Piantine di Sulla (3 per vaso) germinate da semi sterilizzati in superficie (con etanolo 70% e ipoclorito di sodio 4%)

Vasi immersi in varechina per 72h, poi lavati con acqua calda

Piante inoculate con i ceppi rizobici; successivamente la superficie del suolo viene coperta con perlite sterile

3 • Prove di infezione e azotofissazione in ambiente controllato.

L'esperimento

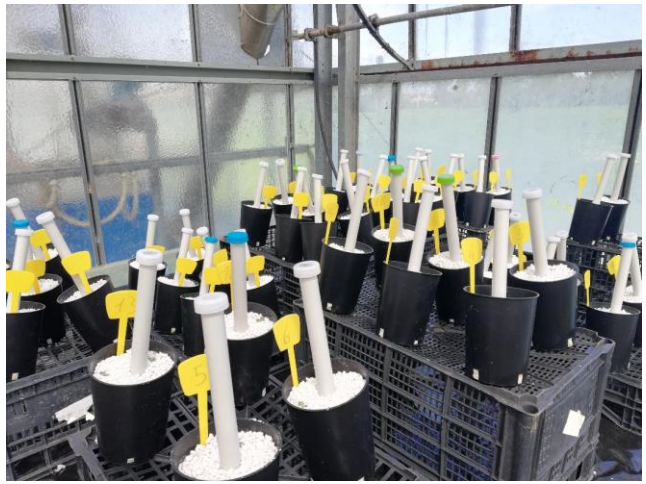
tubo di irrigazione sterile

- Ogni ceppo rizobico è stato inoculato su 12 piante (4 vasi)
- piante di controllo **NON inoculate** (24 in tutto, 8 vasi)
  - 4 vasi (-N)
  - 4 vasi (+N)

Tutte le piante irrigate con soluz. nutriente sterile **senza N**

Tranne….

le piante **non inoculate (+N)** irrigate con soluz. KNO_3 (10 g/L)



Tutte le piante irrigate con soluz. nutriente sterile **senza N**

La crescita delle piante inoculate con i ceppi rizobici dipende dalla capacità dei batteri di fissare N in simbiosi con la pianta

1

La biomassa prodotta (sviluppo, peso secco, altezza, nr. foglie …) fornisce una misura dell'azotofissazione batterica

2

Anche il colore delle foglie può fornire indicazioni sulla nutrizione azotata della pianta:

foglie verdi: N-fix attiva

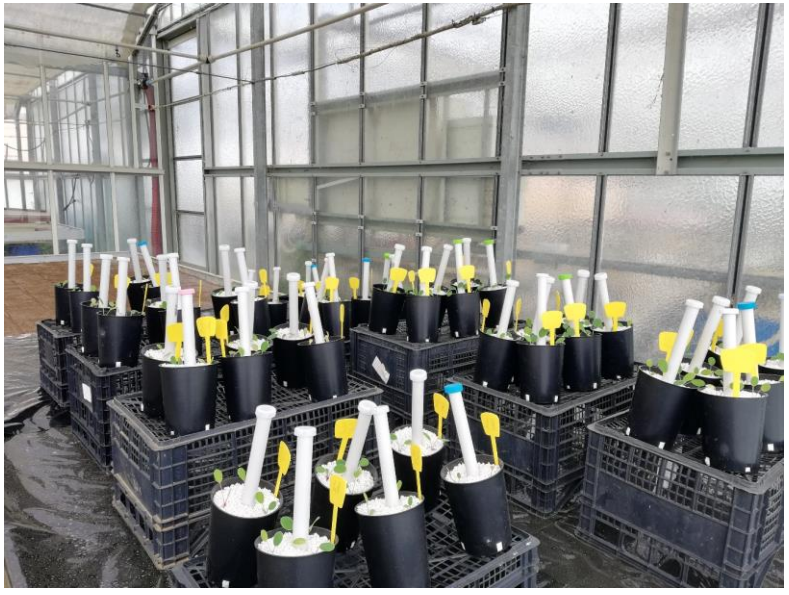
foglie clorotiche: N-fix limitata o assente

Piante **non inoculate (+N)** irrigate con soluz. KNO_3 (10 g/L)

La crescita di queste piante fornisce una indicazione sulle potenzialità di crescita della Sulla in presenza di quantità non-limitanti di N (NO_3^-)

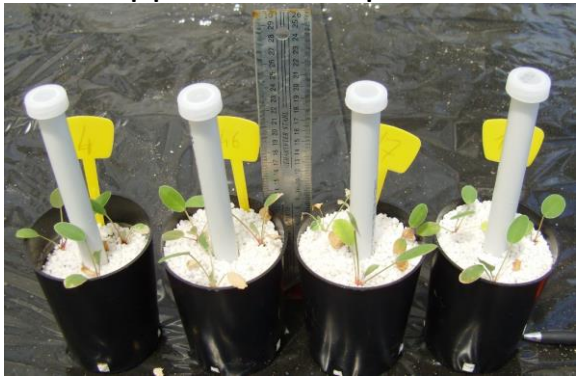
3 • Prove di infezione e azotofissazione in ambiente controllato.

- Piante cresciute in serra per 2 mesi (maggio-giugno 2019)



Rilievi effettuati alla raccolta:

- Sviluppo e altezza piante



- Colore e numero di foglie

- Peso secco parte aerea

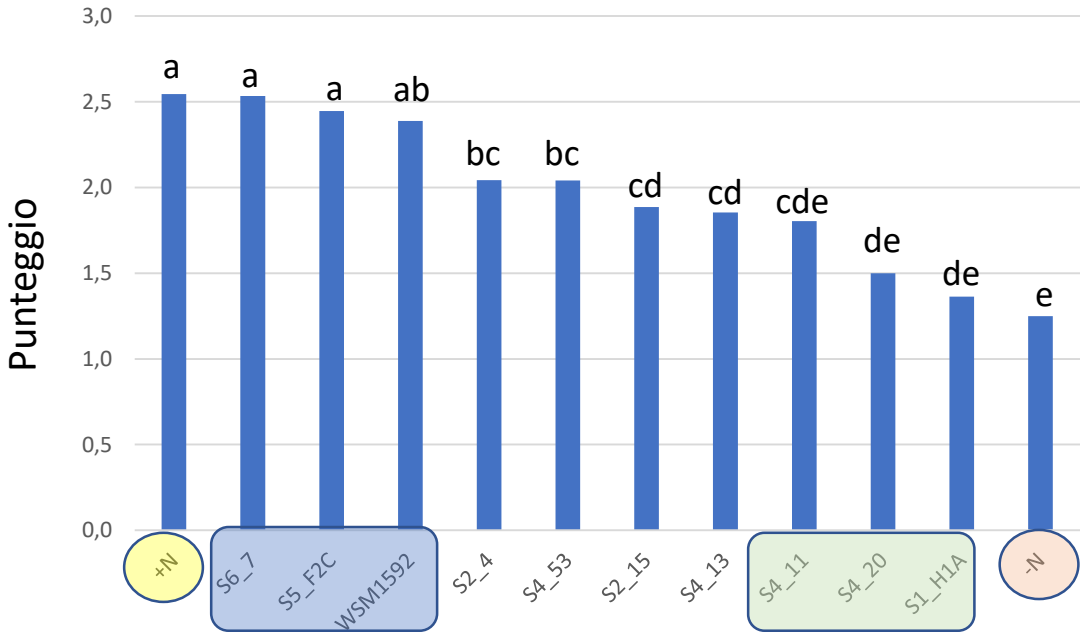
- Presenza e numero noduli radicali

3

- Prove di infezione e azotofissazione in ambiente controllato.

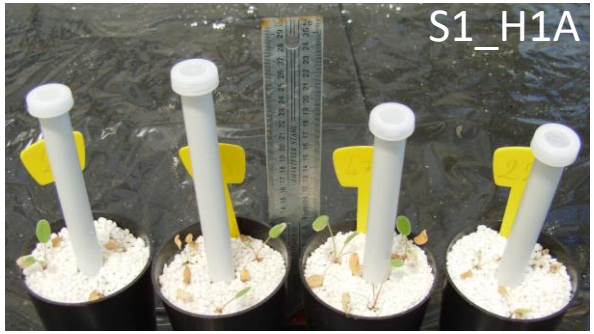
Risultati

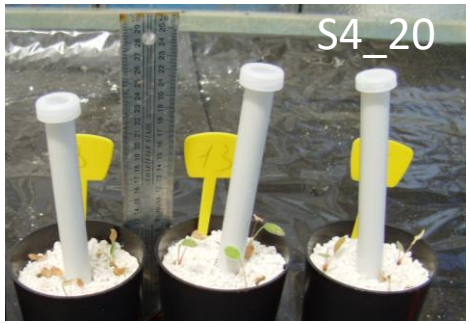
- Sviluppo e altezza delle piante



-N

+N



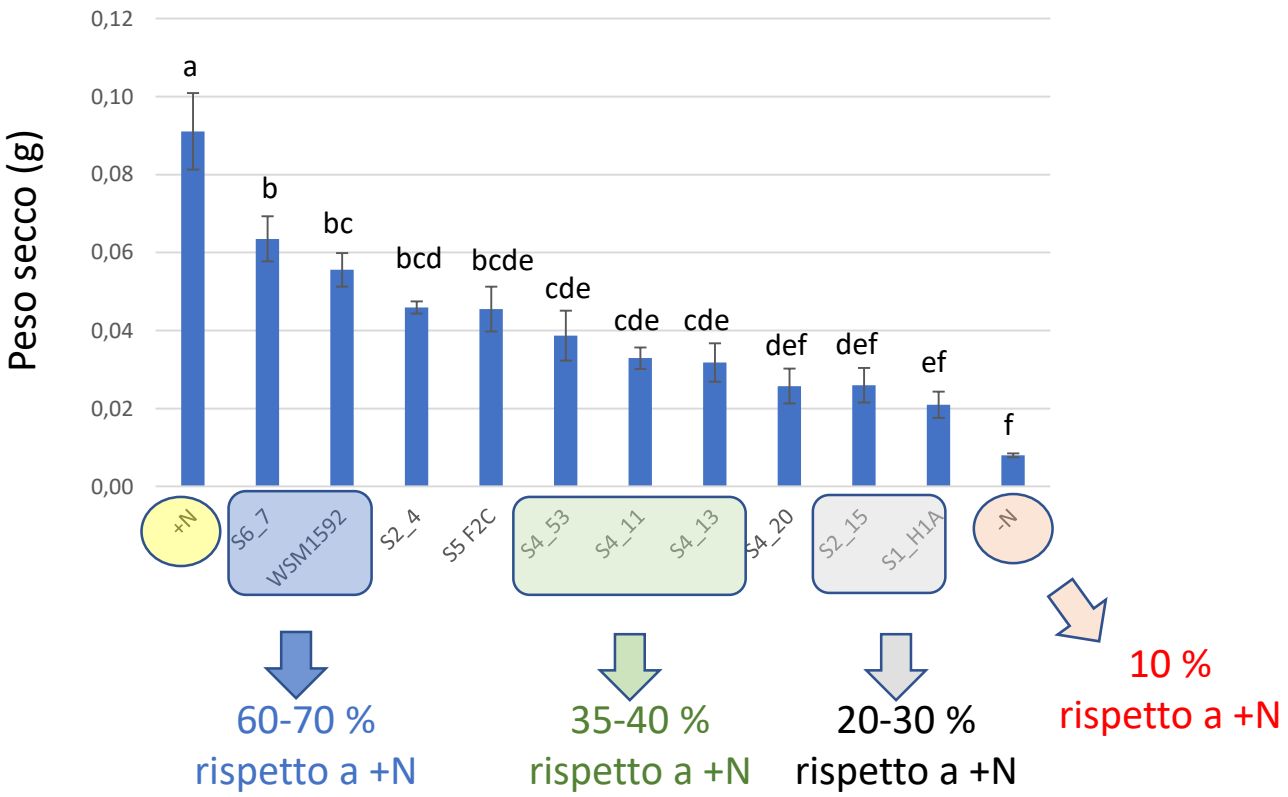


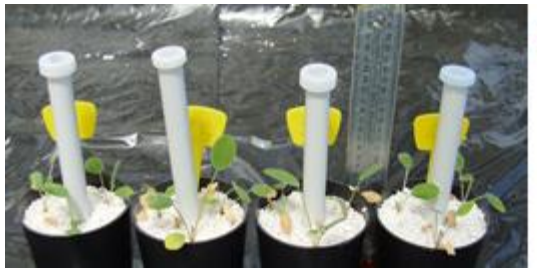
3

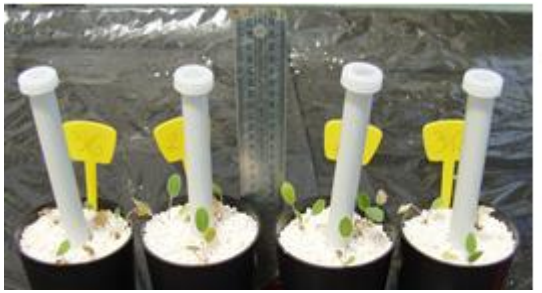
- Prove di infezione e azotofissazione in ambiente controllato.

Risultati

- Peso secco parte aerea







3

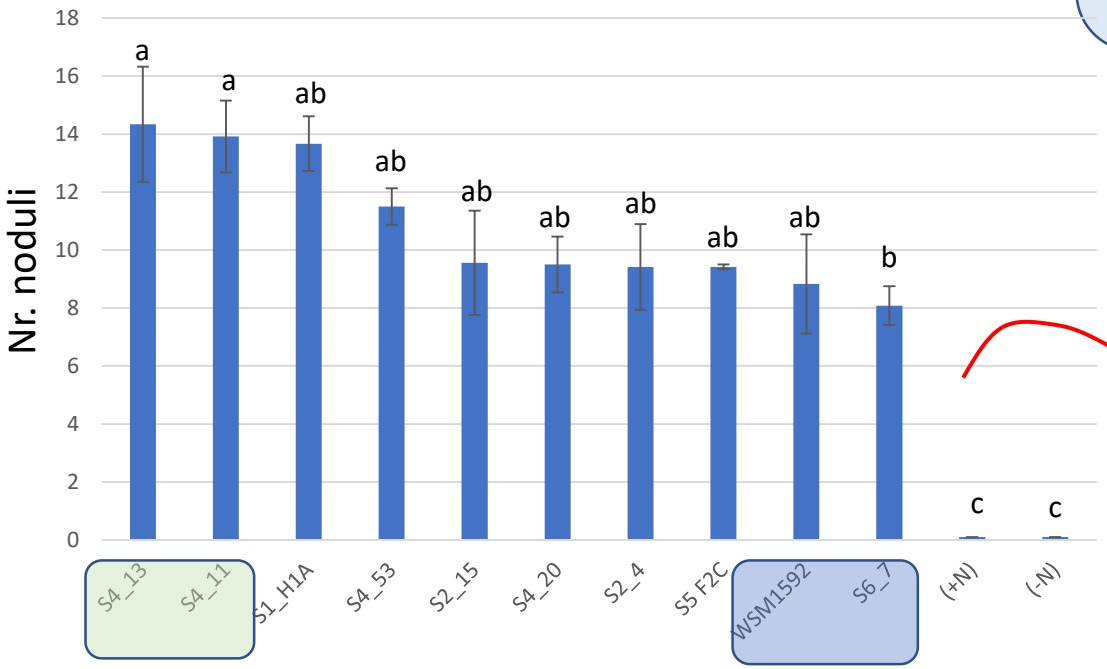
- Prove di infezione e azotofissazione in ambiente controllato.

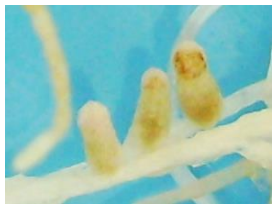
La presenza di noduli radicali nelle piante inoculate indica la capacità infettiva dei ceppi

NON sempre ciò implica una elevata capacità di fissare N

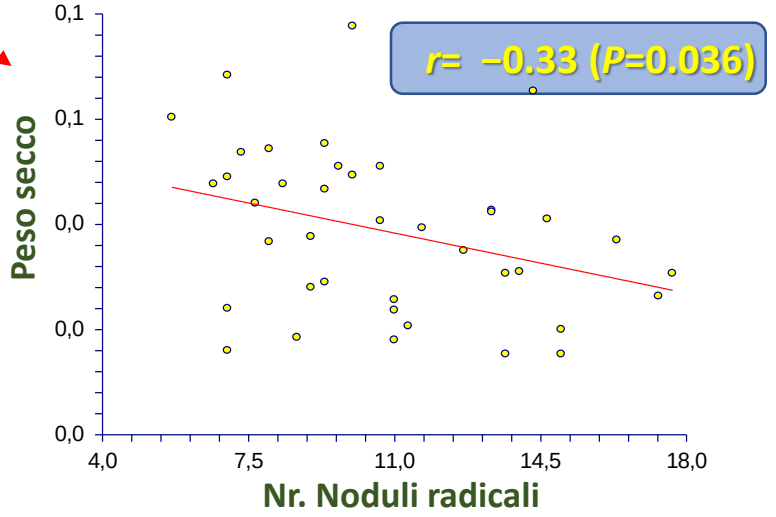
Risultati

- Numero di noduli radicali





piante ben nodulate possono avere limitate capacità N-fissatrici



Correlazione negativa tra nr noduli e peso secco

Cosa sappiamo in più …..

- I rizobi della Sulla sono presenti nei suoli del Sulcis-Iglesiente.

- I batteri isolati dai noduli radicali hanno evidenziato una elevata diversità genotipica e fenotipica:

  - la maggior parte dei rizobi testati è risultata infettiva (nod+) ma con limitate capacità di N-fissazione (fix+);

  - il ceppo S6_7 è invece risultato fix+ ed in grado di produrre valori di biomassa superiori al ceppo commerciale e pari circa al 70% della biomassa prodotta dalle piante +N.

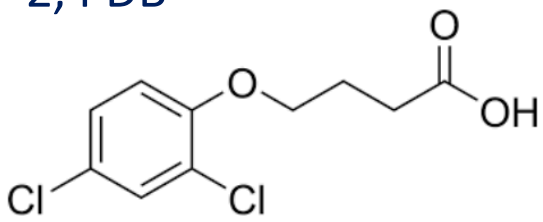
- Le performance del ceppo S6_7 dovranno essere testate in campo prima di un suo eventuale impiego su larga scala per l'inoculo dei semi.

- Il ceppo commerciale WSM1592 ha confermato buone capacità fix+ e potrebbe rappresentare (sin da ora) una risorsa per la diffusione della Sulla nei suoli del Sulcis-Iglesiente (e non solo).

- Valutazione degli effetti di Imazamox e 2,4 DB sulla struttura e funzione delle popolazioni microbiche del suolo (UNISS).

- Valutazione dell'efficacia di Imazamox e 2,4 DB per il siserbo post-emergenza della Sulla (AGRIS)

2,4 DB



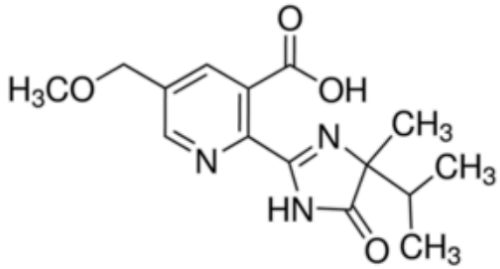
Diserbante selettivo, azione di tipo auxino-simile.

Induce nelle specie sensibili crescita abnorme, senescenza e morte della pianta.

Effetti tossici del 2,4-D

Effetti tossici di Imazamox

Imazamox

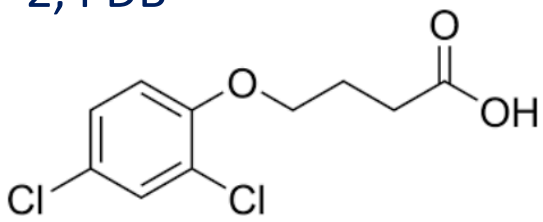


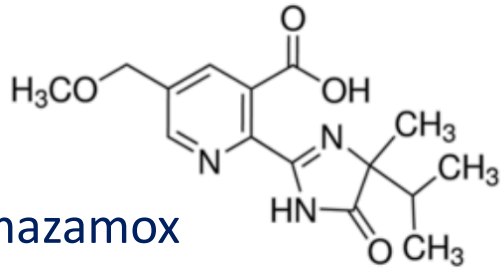
Diserbante selettivo, inibisce la sintesi degli amminoacidi ramificati.

Induce nelle specie sensibili arresto della crescita, ingiallimento e morte della pianta.

- Valutazione degli effetti di Imazamox e 2,4 DB sulla struttura e funzione delle popolazioni microbiche del suolo.

2,4 DB





Imazamox

Prove sperimentali

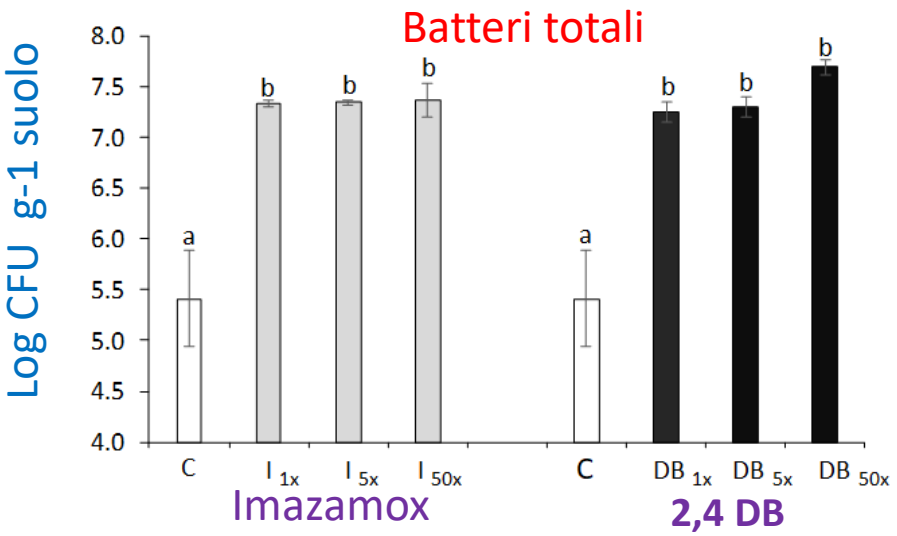
❑ 2,4 DB e Imazamox sono stati aggiunti ai suoli delle diverse aziende a concentrazioni: **1X, 5X e 50X.**

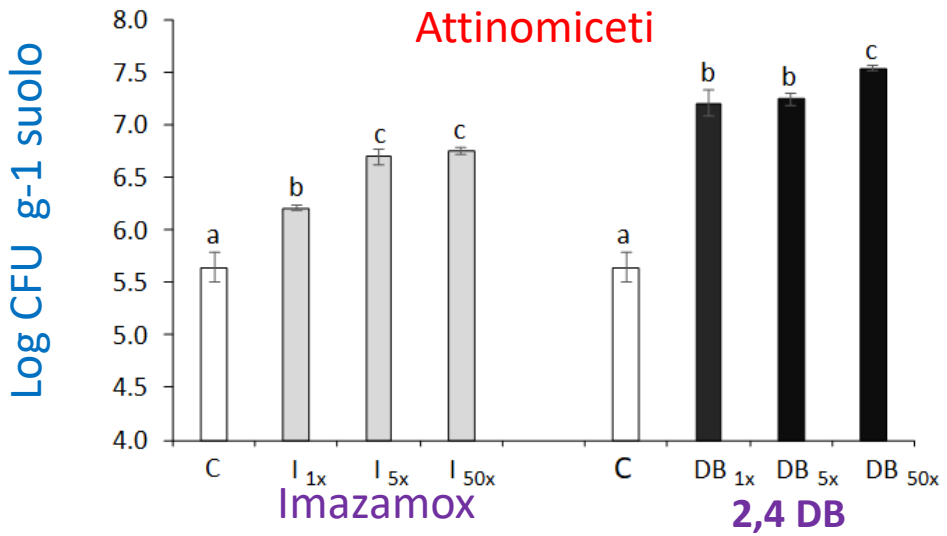
❑ Parametri monitorati dopo 3 e 30 gg dall'applicazione:

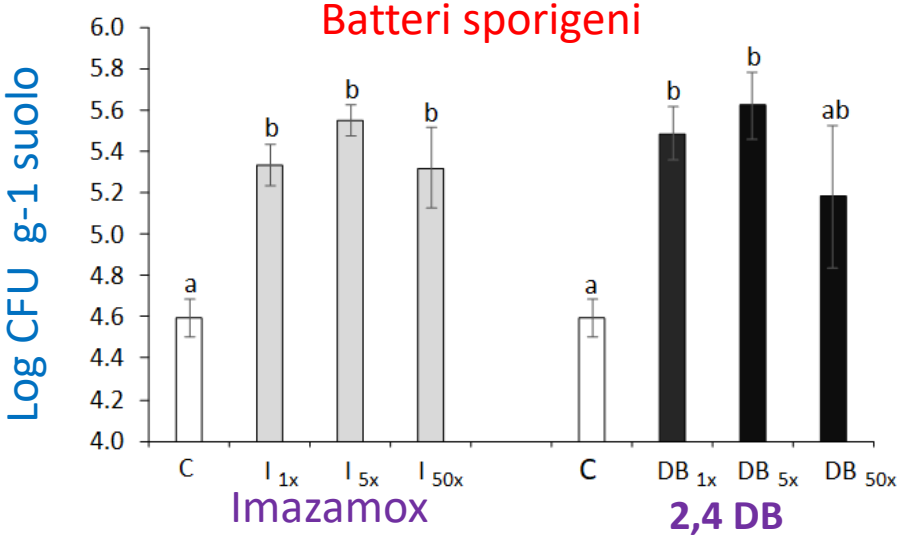
- dimensione di popolazioni microbiche coltivabili (batteri totali, attinomiceti, batteri sporigeni, *Pseudomonas* spp.);
- profilo fisiologico delle comunità microbiche del suolo;
- attività enzimatiche (DHG, URE, b-GLU);
- respirazione del suolo;
- tossicità vs *R. sullae.*

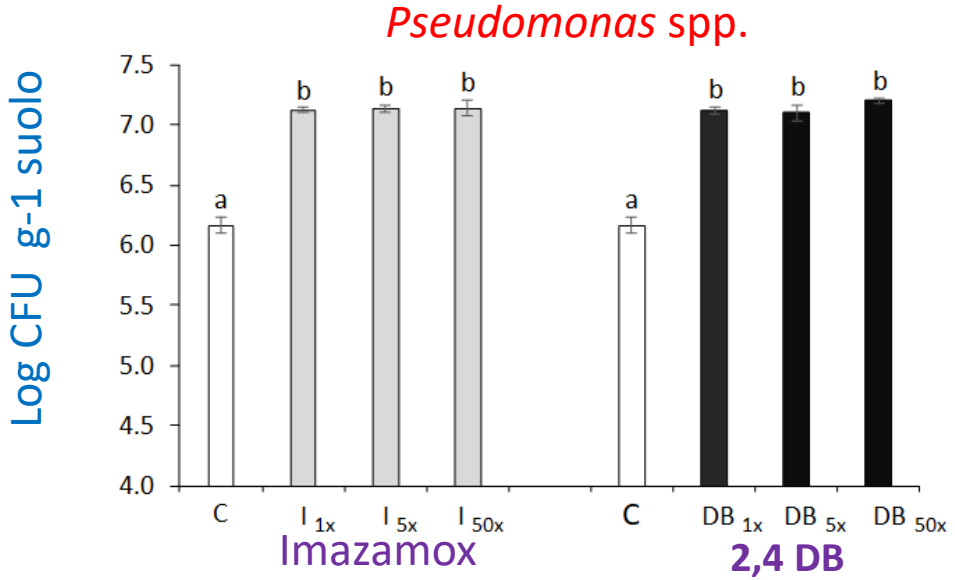
Risultati in sintesi….

- L'aggiunta dei diserbanti stimola la crescita dei m.o. coltivabili presenti nel suolo



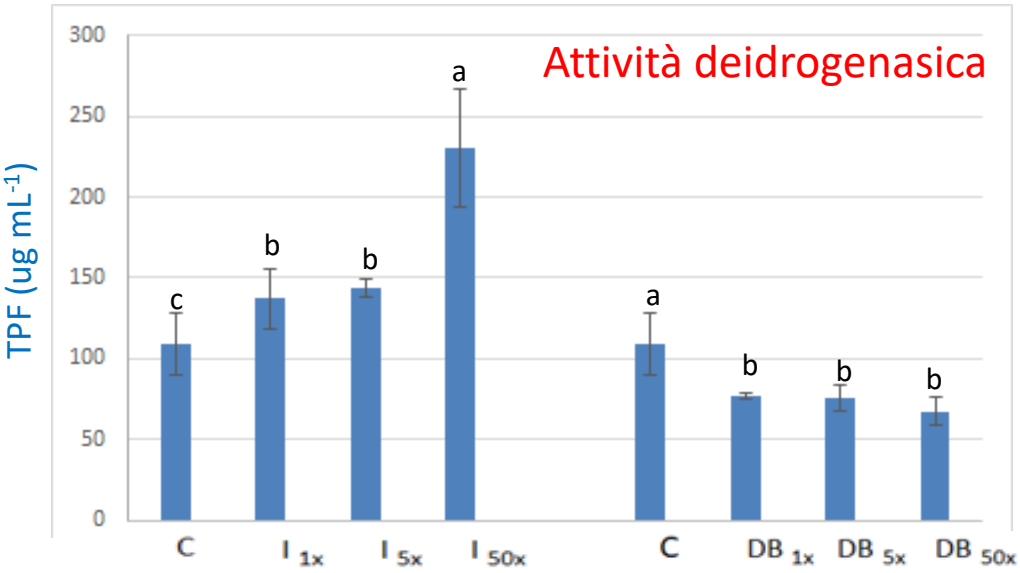




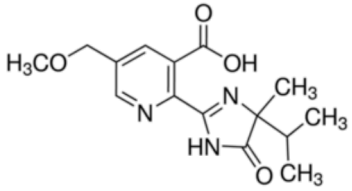


Risultati in sintesi….

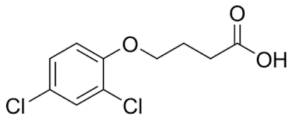
- L'aggiunta dei Imazamox stimola l'attività deidrogenasica nel suolo, il 2,4-DB la riduce;
- Imazamox e 2,4-DB riducono l'attività ureasica.

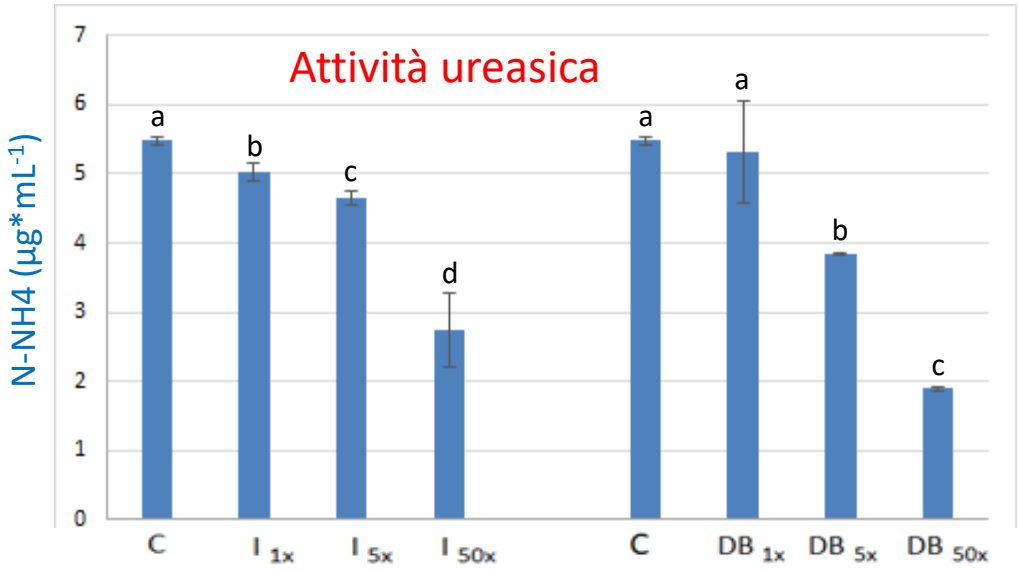


Imazamox

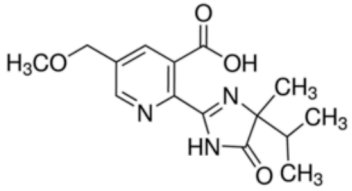


2,4 DB

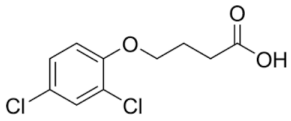




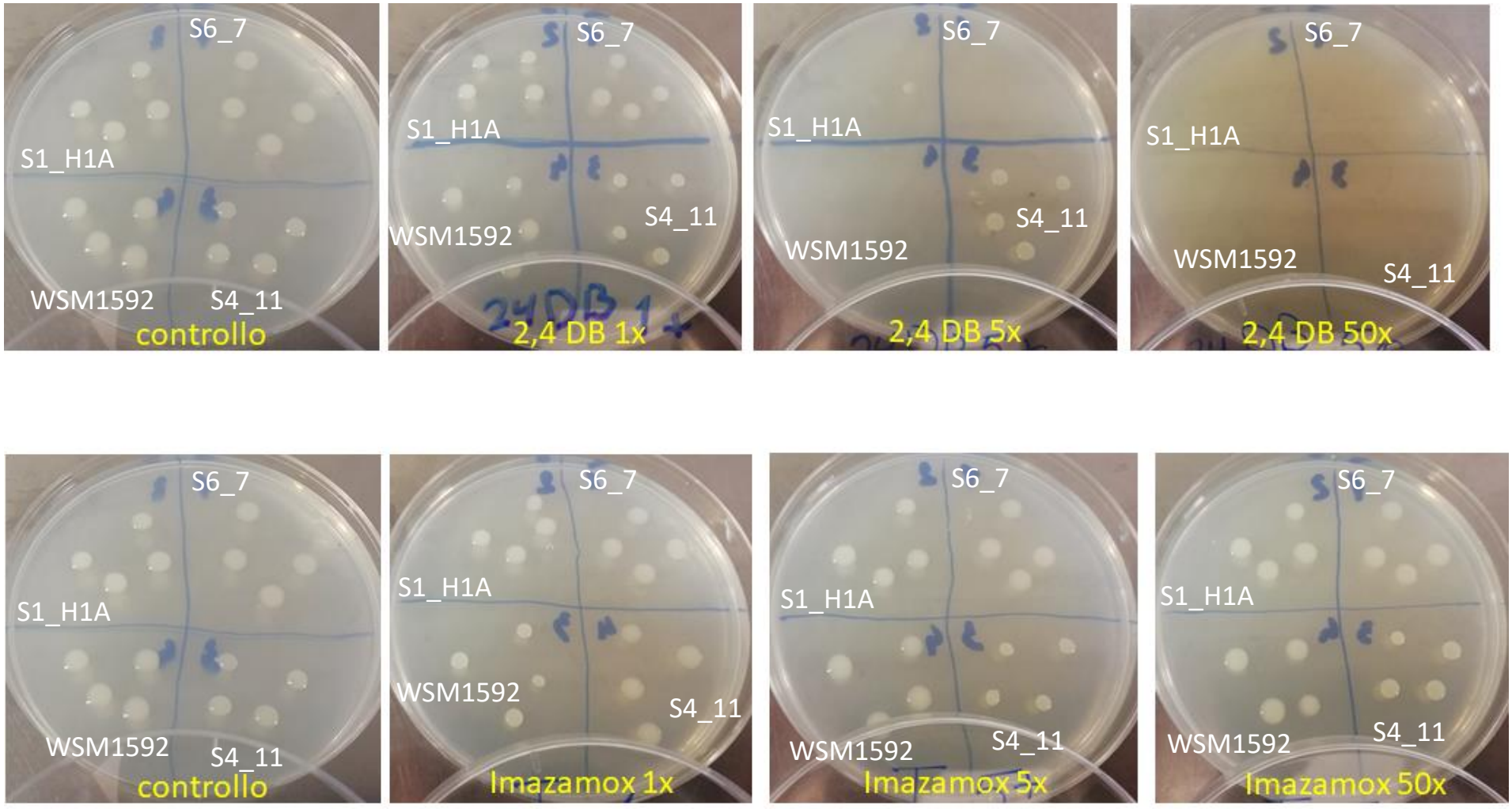
Imazamox



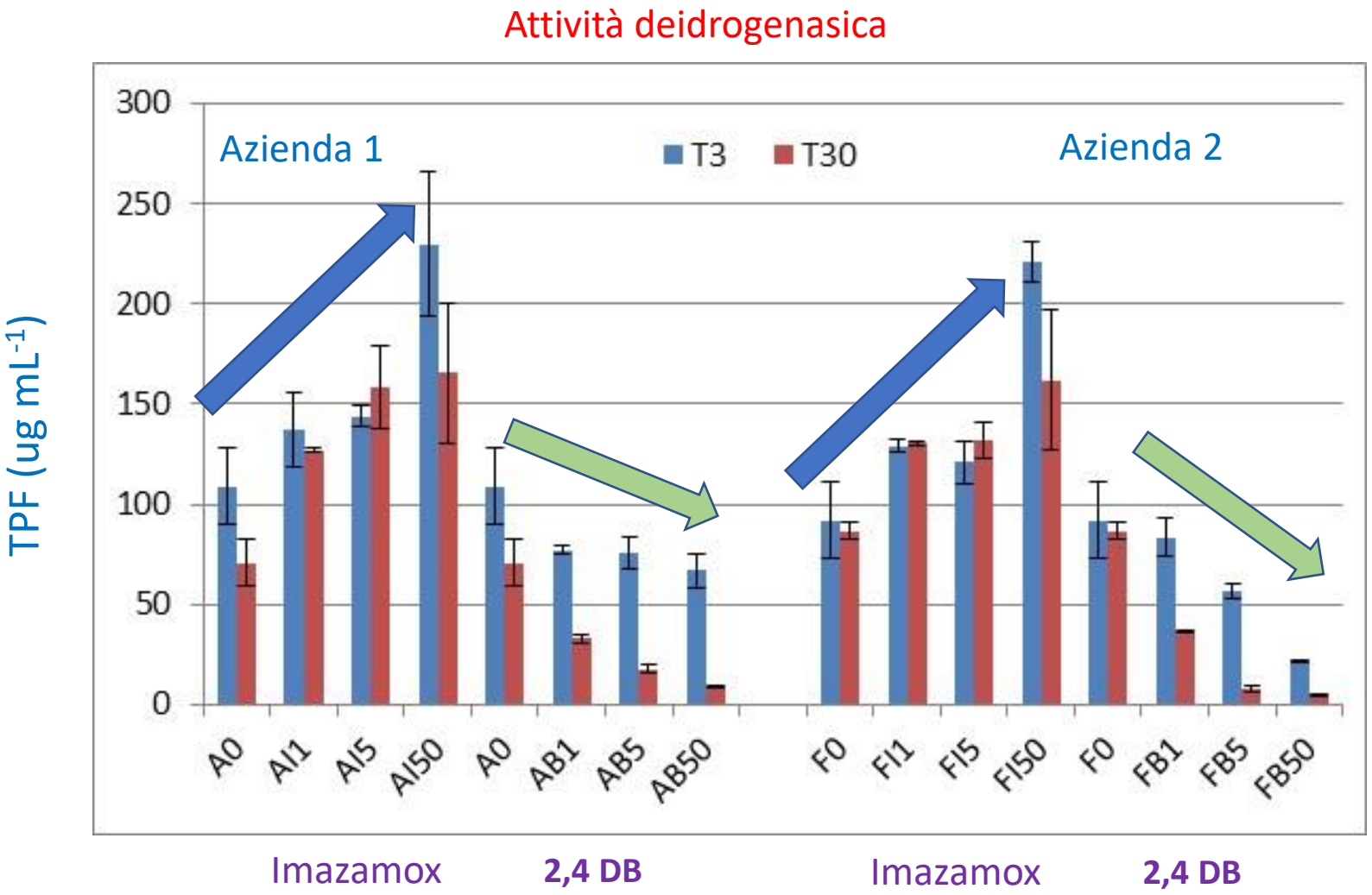
2,4 DB



- L’aggiunta dei diserbanti ha effetti diversi su *R. sullae*



- Effetti residui dopo un mese dall'applicazione….



Cosa possiamo dire ora…..

- Imazamox e 2,4 DB hanno una evidente influenza sulle popolazioni microbiche del suolo e sulla loro attività;
  - la rilevanza di quanto osservato sui cicli biogeochimici del suolo è da accertare.

- L'uso dell'**Imazamox** sembra non avere effetti negativi sui rizobi testati ma potrebbe influenzare le fasi di infezione e formazione del nodulo;

- il 2,4 DB ha effetti tossici sui rizobi della Sulla e NON dovrebbe essere utilizzato;

- aspetti legati alla risposta vegetale….. ➡ osservazioni M. Sitzia

Un ringraziamento particolare a tutti coloro che hanno contribuito alla realizzazione dello studio:

- Le aziende del Sulcis-Iglesiente partner del progetto

- Maria Sitzia e Ivan Dettori (Agris Sardegna)

Agris

- Chiara Multineddu, Angela Bianco, Nicoletta Mangia, Matteo Garau, Stefania Diquattro (Università di Sassari)

- Centre for Rhizobium Studies, Murdoch University (Perth)

C R S

Free N Farming

- La Regione Sardegna

REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA

Iglesias 02 luglio 2019