



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

BIO
DIPARTIMENTO
DI BIOLOGIA

Progetto: "Il microbioma vegetale simbiote come strumento per il miglioramento delle leguminose foraggere" - Acronimo MICRO4LEGUMES – ID n°20

Relazione tecnico-scientifica finale ai sensi dell'Art. 8 del decreto ministeriale n.89267 del 19-12-2019

Coordinatore: Prof. Alessio Mengoni, Università di Firenze, Firenze

Partner: Dott.ssa Carmelina Bianco, IBBR-CNR, Napoli

Direttore del Dipartimento di Biologia

dell'Università degli Studi di Firenze: Prof. David Caramelli

Sommario

Obiettivi del progetto;	2
Cronoprogramma	4
Attività svolta per il WP1	5
Azione 1.1 Selezione del pannello di ceppi	5
Azione 1.2 Test delle caratteristiche fisiologiche dei ceppi e dei consorzi	5
Azione 1.3 Analisi genomica dei ceppi selezionati	5
Azione 1.4 Prove pilota di simbiosi in vitro	6
Attività svolta per il WP2	6
Azione 2.1 Settaggio dell'esperimento in serra	6
Azione 2.2 Raccolta parametri di crescita	7
Azione 2.3 Valutazioni agronomiche di produttività	8
Azione 2.4 Identificazione dei rizobi simbiotici e dell'effetto sul microbioma del suolo	9



Attività svolta per il WP3	9
Azione 3.1 Coordinamento	10
Azione 3.2 Disseminazione	10
Considerazioni finali	12
Ringraziamenti	13

Obiettivi del progetto

Una moderna agricoltura sostenibile non può essere concepita senza la fissazione biologica dell'azoto. L'input di azoto biologicamente fissato consente di ridurre l'uso di fertilizzanti azotati industriali che producono una vasta gamma di effetti negativi sul suolo e nelle acque. Insieme alle normative e restrizioni ambientali sempre più severe, il miglioramento delle attività simbiotiche delle leguminose dovrebbe essere previsto nell'agricoltura sostenibile del futuro. **L'obiettivo del progetto** è quello di seguire queste **esigenze di sostenibilità ambientale potenziando gli effetti benefici dei rizobi azotofissatori sulla resa e qualità delle leguminose foraggere coltivate in agricoltura biologica**. Per ottenere tale scopo è necessario approfondire gli aspetti di interazione tra piante e microrganismi simbiotici andando verso una **smart farming e agricoltura di precisione** che faccia un uso razionale della vasta diversità genetica e funzionale dei rizobi presenti in natura. Sebbene la comunità scientifica ritenga di enorme importanza l'azotofissazione batterica, restano ancora da chiarire quali consorzi rizobici siano maggiormente efficaci nei diversi ambienti pedo-climatici. E' infatti noto che i diversi ceppi di rizobio, anche della stessa specie, hanno effetti significativamente diversi a seconda della specie, della cultivar, delle condizioni del suolo, e delle condizioni agronomiche ed ambientali. E' inoltre noto che l'associazione di questi rizobi con batteri del suolo non-rizobici può migliorare la crescita delle leguminose foraggere. E' quindi essenziale non solo valutare i diversi consorzi rizobici nei vari ambienti per determinare quello più efficace nel migliorare la resa e la qualità dei foraggi ottenuti, ma anche individuare i partner non-rizobici da utilizzare per la co-inoculazione.

L'erba medica è la più diffusa coltura foraggera coltivata nell'Italia Meridionale. Questo progetto si propone, in collaborazione con aziende di agricoltura biologica, di **sviluppare nuovi consorzi rizobici efficaci nel miglioramento della coltura foraggera in condizioni di aridità**. Questo obiettivo generale si divide in più obiettivi specifici che declinano la valutazione dell'efficacia degli inoculi e indagano le conseguenze degli inoculi sulla fisiologia della pianta e il microbioma del suolo:



- 1) Costituzione di miscele di ceppi azotofissatori più efficienti nelle condizioni colturali saggiate;
- 2) Selezione dei ceppi non-rizobici da utilizzare per la co-inoculazione;
- 3) Valutazione agronomica delle inoculazioni di consorzi rizobici in erba medica;
- 4) Comprensione delle risposte fisiologiche delle piante alle inoculazioni;
- 5) Valutazione delle risposte del microbioma del suolo e della rizosfera alle inoculazioni



Cronoprogramma

Le attività del progetto si sono svolte secondo la scansione dettata dalla iniziale programmazione temporale prevista nel seguente diagramma di GANNT: Tuttavia, a fronte dell'emergenza COVID-19 e della siccità nell'estate 2022 c'è stato uno slittamento di circa 6 mesi rispetto alle attività previste (come indicato nella proroga a suo tempo richiesta e accordata) e l'esecuzione di prove sperimentali alternative a quelle originariamente previste.

Work packages ed Attività	Responsabile e <i>partecipanti</i>	1-6 mesi	7- 12	13- 18	19- 24	25- 30	31- 36
WP1 Costituzione dei consorzi simbiotici	UNIFI						
Azione 1.1 Selezione del pannello di ceppi	<i>UNIFI, IBBR</i>						
Azione 1.2 Test delle caratteristiche fisiologiche dei ceppi e dei consorzi	<i>IBBR</i>						
Azione 1.3 Analisi genomica dei ceppi selezionati	<i>UNIFI</i>						
Azione 1.4 Prove pilota di simbiosi in vitro	<i>UNIFI, IBBR</i>						
WP2 Efficacia dei consorzi	IBBR						
Azione 2.1 Settaggio dell'esperimento in serra	<i>IBBR, UNIPA, Aziende</i>						
Azione 2.2 Raccolta parametri di crescita	<i>IBBR, UNIPA, Aziende</i>						
Azione 2.3 Valutazioni agronomiche di produttività	<i>UNIPA, Aziende</i>						
Azione 2.4 Identificazione dei rizobi simbiotici e dell'effetto sul microbioma del suolo	<i>IBBR, UNIFI, Aziende</i>						
WP3 Coordinamento e disseminazione	UNIFI						
Azione 3.1 Coordinamento	<i>UNIFI</i>						
Azione 3.2 Disseminazione	<i>UNIFI, IBBR, UNIPA, Aziende</i>						



Attività svolta per il WP1

Azione 1.1 Selezione del pannello di ceppi

In questa prima azione è stato effettuato uno screening sulle collezioni di ceppi presenti presso i laboratori del Dipartimento di Biologia, Università di Firenze e dell'IBBR-CNR di Napoli al fine di individuare i ceppi che per le loro caratteristiche già studiate in precedenza fossero i migliori candidati per costituire il futuro consorzio microbico. In particolare, sono stati selezionati ceppi del rizobio *Sinorhizobium meliloti*, il simbiote azotofissatore specifico per erba medica, provenienti da diverse aree geografiche, tra cui la regione desertificata e salinizzata a nord del Mare d'Aral. Questo al fine di ottenere rizobi dotati di buone performance azotofissatrici ma anche in grado di tollerare condizioni di suolo arido.

Per quanto riguarda altri ceppi non-rizobici in grado di promuovere la crescita di erba medica è stata utilizzata una collezione di batteri endofiti isolati da varie specie di piante e per i quali dati precedenti indicavano buone caratteristiche di colonizzazione della pianta e di promozione della crescita vegetativa.

I dettagli dei ceppi analizzati sono riportati nella relazione del 1° semestre.

Azione 1.2 Test delle caratteristiche fisiologiche dei ceppi e dei consorzi

Questa attività ha riguardato la caratterizzazione fisiologica dei 17 ceppi da utilizzare per l'inoculazione di erba medica. Sono state condotte:

1. Analisi preliminare di resistenza agli antibiotici;
2. Stima della produzione dell'auxina acido indolo-3-acetico (IAA);
3. Analisi della tolleranza a NaCl dei ceppi selezionati;
4. Valutazione l'inibizione incrociata tra i ceppi.

I dettagli dei risultati sono riportati nelle relazioni del 1° e 2° semestre.

Azione 1.3 Analisi genomica dei ceppi selezionati

Per tutti i ceppi in esame sono state allestite colture in terreno liquido ed è stato estratto il DNA genomico. Con DNA estratto sono state costituite delle library per il sequenziamento su piattaforma Pacific Biosciences Sequel in dotazione presso il Dip. di Biologia, Università di Firenze. I genomi così sequenziati sono stati assemblati e annotati al fine di catalogare la totalità dei geni presenti e identificare quelli legati a potenziali attività favorevoli la crescita delle piante. Le sequenze genomiche ottenute saranno successivamente utilizzate per poter sviluppare dei sistemi di barcoding molecolare tali da permettere la tracciabilità degli inoculanti nel suolo e nella pianta. Tutti i genomi risultano chiusi o in stato di draft di alta qualità (livello sufficiente per procedere alle analisi successive). I dettagli dei risultati sono riportati nelle relazioni



del 1°, 2° e 3° semestre.

Azione 1.4 Prove pilota di simbiosi in vitro

Le attività svolte hanno riguardato la selezione delle cultivar di erba medica da utilizzare per le prove di co-inoculazione con i rizobi ed i batteri endofiti. Sono state selezionate inizialmente 3 cultivar (Gea - Italia, Hunter River – Australia, NB Banat ZMSII - Serbia) con diversa sensibilità alla siccità e provenienti da tre aree geografiche con differenti pedoclimi. La cultivar che è risultata maggiormente efficace con i rizobi selezionati è stata la cultivar Gea, con la quale quindi si è proceduto con le prove in campo.

I dettagli dei risultati sono riportati nella relazione del 2° semestre.

Deliverable:

1. Sono state allestite miscele di bioinoculanti
2. Sono stati sequenziati i genomi di tutti i componenti delle miscele

Attività svolta per il WP2

Le attività del WP2 sono state impattate negativamente dalle avverse condizioni stagionali incontrate. I paragrafi seguenti riportano in modo sintetico le attività che è stato possibile svolgere. Va tuttavia notato che, pur in presenza di avverse condizioni ambientali e della pandemia di COVID-19, il Progetto è riuscito a terminare le analisi previste, attuando delle variazioni temporali delle attività e introducendo esperimenti aggiuntivi, non previsti inizialmente (prove in tubi), tali da consentire di ottenere il risultato di verifica dell'efficacia dei consorzi.

Azione 2.1 Settaggio dell'esperimento in serra

Sono state attivati i contratti con le tre Aziende Agricole partecipanti operanti in regime di agricoltura biologica:

Azienda Leone Alberto

Via Laghetto/C.da Sellino, 84047 Capaccio Paestum (SA), Campania,

Azienda Tedesco Anna Maria

Via Cesare Battisti n. 35, 82024 Colle Sannita (BN)

Azienda Paolucci Lina

C/da Marcandindoli SNC, 82024 Colle Sannita (BN), Campania

Successivamente sono stati effettuati i sopralluoghi presso le tre Aziende agricole per individuare le porzioni di terreno da utilizzare per la coltivazione di erba medica. Le superfici selezionate sono state poi opportunamente suddivise in parcelle.



Parallelamente sono state condotte prove di laboratorio per individuare il metodo di co-inoculazione dei semi di erba medica con i rizobi azoto-fissatori e con i ceppi non-rizobici prima della semina. In particolare, sono state effettuate prove di bio-priming per l'adesione dei microorganismi selezionati ai semi da destinare alla semina. I risultati delle analisi effettuate hanno evidenziato che i semi continuavano ad avere un buon grado di germinazione anche dopo 8 giorni dal trattamento.

Sono state definite due miscele di ceppi, denominate Mix1 e Mix2 (Tabella 1) che includono il ceppo di rizobio *Sinorhizobium meliloti* BL225C, dimostratosi il più efficace nelle prove in vitro, e un diverso mix di ceppi endofiti, sia produttori di auxine che azotofissatori liberi (come da relazione del 1° e 2° semestre). Tutti i ceppi hanno mostrato una buona tolleranza alla salinità.

Tabella 1. Elenco dei ceppi (rizobio ed endofiti) presenti nelle miscele d'inoculazione

Mix1	Mix2
BL225C (10 ⁴ batteri/mL) - rizobio	BL225C (10 ⁴ batteri/mL)- rizobio
BDA62-2 (10 ⁶ batteri/mL)	BDA59-3 (10 ⁶ batteri/mL)
BDA137-13 (10 ⁶ batteri/mL)	BDA62-2 (10 ⁶ batteri/mL)
	BDA62-3 (10 ⁶ batteri/mL)
	BDA134-6 (10 ⁶ batteri/mL)
	BDA137-13 (10 ⁶ batteri/mL)
	RCA24 (10 ⁶ batteri/mL)
	RCA25 (10 ⁶ batteri/mL)

I dettagli dei risultati sono riportati nelle relazioni del 3° e 4° semestre.

Azione 2.2 Raccolta parametri di crescita

Le prove nei tubi effettuate presso le aziende hanno consentito una prima valutazione dei parametri di crescita di piante di Gea inoculate con le Mix 1 e Mix2. I risultati hanno evidenziato notevoli differenze nella produzione vegetativa per le piante trattate con le due mix rispetto al controllo con i soli rizobi (Figura 1). I dettagli dei risultati sono riportati nella relazione del 7° semestre.

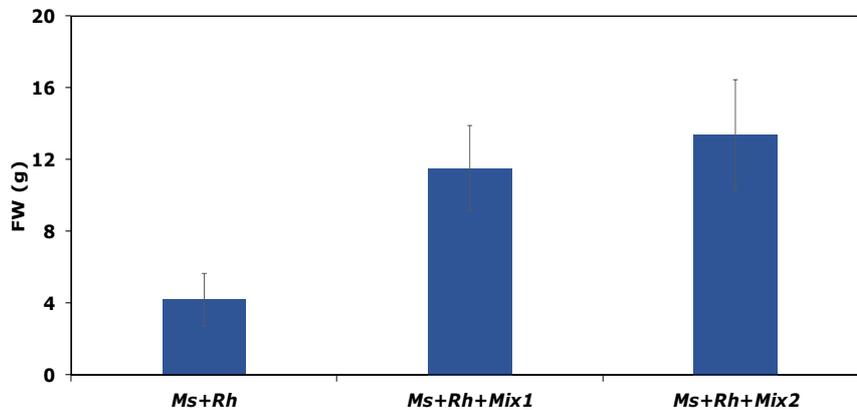


Figura 1. Misura del peso fresco dei fusti (FW) di erba medica GEA coltivata nei tubi.

Azione 2.3 Valutazioni agronomiche di produttività

Come riportato nelle relazioni semestrali, presso l'azienda Pietranera situata nell'entroterra collinare siciliano nel territorio di S. Stefano Quisquina (AG) è stata avviata nell'autunno del 2021 una ulteriore prova sperimentale di campo volta ad accertare l'efficacia dei consorzi microbici selezionati. Questa prova ha superato le avversità climatiche del 2022 ed ha consentito una valutazione agronomica di produttività.

In Figura 2 è riportata una fotografia delle parcelle analizzate.



Figura 2. Immagine delle parcelle della prova in campo effettuata presso l'Azienda Pietranera (Univ. Palermo).

La valutazione della produzione di sostanza secca ha evidenziato che le due Mix di inoculazione hanno avuto un effetto positivo sulla crescita delle piante inoculate, confermando quanto osservato per la crescita in tubo (Azione 2.2), con un marcato effetto della Mix2 (Figura 3).

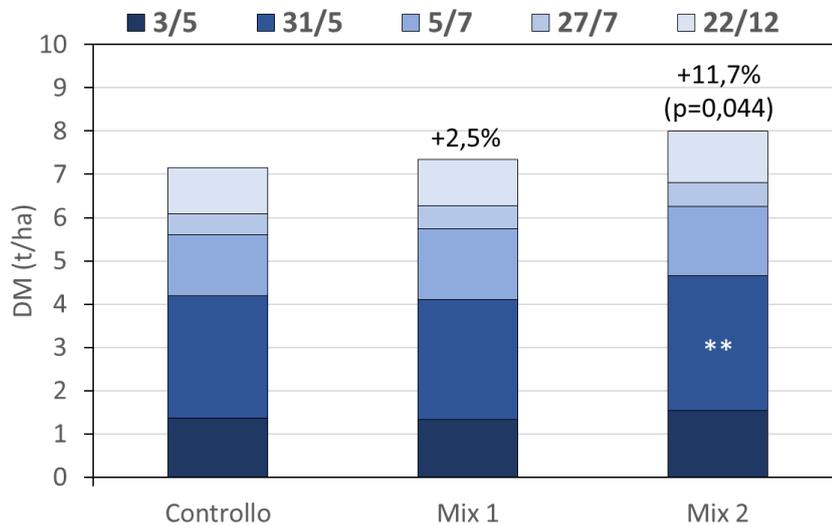


Figura 3. Produzione di sostanza secca (DW) nei diversi sfalci. Le date si riferiscono al 2022

I dettagli dei risultati sono riportati nelle relazioni del 6° e 7° semestre.

Azione 2.4 Identificazione dei rizobi simbiotici e dell'effetto sul microbioma del suolo

I campioni prelevati dalle parcelle delle prove in campo e dai tubi sono stati utilizzati per l'estrazione del DNA genomico utilizzato per amplificare il gene codificante il 16S rRNA. Gli ampliconi sono stati sequenziati su piattaforma Illumina MiSeq e sono in corso le analisi dei dati.

Deliverable

1. E' stato sviluppato un solido protocollo agronomico per la valutazione in campo dell'efficacia di bioinoculanti.
2. E' stata identificata una miscela (Mix2) maggiormente efficace nelle condizioni di campo allestite.
3. Sono state fornite indicazioni sull'efficacia in termini di sostanza secca prodotta delle miscele di bioinoculanti.

Attività svolta per il WP3



Azione 3.1 Coordinamento

Sono stati effettuati scambi continui di informazioni circa l'andamento delle prove in campo, sia tramite piattaforme on line (GMeet, Teams), sia via e-mail e telefono, oltre ad un kick-off meeting e ad un evento conclusivo.

La pagina web (<https://www.bio.unifi.it/vp-171-genomics-of-plant-microbe-interactions.html>) che descrive l'andamento del progetto è stata aggiornata.

Al fine di favorire le attività scientifiche e in relazione anche al carico di lavoro necessario per il coordinamento e la disseminazione futura, è stata messa a bando una borsa di dottorato di ricerca all'interno del Dottorato di Ricerca in Biologia Evoluzionistica ed Ecologia, consorziato con l'Università di Firenze, il cui inizio di attività è decorso dal 30 novembre 2020. La dottoranda di ricerca è la Dott.ssa Lisa Cangioli.

Azione 3.2 Disseminazione

Eventi organizzati:

1. Convegno dal titolo "Soluzioni innovative per l'impiego delle leguminose in uno scenario di cambiamenti climatici" presso l'Accademia dei Georgofili in data 8.04.2021
2. Convegno conclusivo presso le Aziende Agricole Paolucci Lina e Tedesco Anna Maria (Colle Sannita) il 26/05/2023

Eventi a cui si è partecipato come MICRO4Legumes

1. Bright – Notte della Ricerca 2021 (Firenze)
2. Bright – Notte della Ricerca 2022 (Firenze)
3. ScienzEstate 2021 (Firenze)
4. ScienzEstate 2022 (Firenze)
5. "Mappe di un Mondo Nuovo", Teatro alla Pergola (Firenze) 2022
6. Fascination of Plant Day 2022
7. Webinar Terra Pianeta alieno (New Business Media Terra è Vita) 2022

Tesi di laurea

n. 6 tesi in tesi di laurea in Biotecnologie, Scienze Biologiche e in Biotecnologie Molecolari.

Tesi di Dottorato di Ricerca

n. 1 tesi



Borse di ricerca per giovani

n. 1 borsa

Pubblicazioni

La messa a punto dei protocolli di analisi molecolari, le analisi preliminari e i risultati in itinere di MICRO4Legumes sono stati oggetto di 15 pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali.

Di seguito l'elenco delle pubblicazioni:

1. Fagorzi C., et al (2020) Symbiotic and non-symbiotic members of the genus *Ensifer* (syn. *Sinorhizobium*) are separated into two clades based on comparative genomics and high-throughput phenotyping. *Genome Biology and Evolution*
2. diCenzo, G.C., et al. (2020) Genome-scale metabolic reconstruction of the symbiosis between a leguminous plant and a nitrogen-fixing bacterium. *Nature Communications* 11, Article number: 2574
3. Bianco C., Andreozzi A., Romano S., Fagorzi C., Cangioli L., Cisse F., Niangado O., Sidibé A., Pienozzi S., Perini M., Mengoni A., Defez R. (2021) Endophytes from African rice (*Oryza glaberrima* L.) efficiently colonize Asian rice (*Oryza sativa* L.) stimulating the activity of its antioxidant enzymes and increasing the content of nitrogen, carbon, and chlorophyll. *Microorganisms* 9: 1714
4. Cangioli L., et al. (2022) Differential Response of Wheat Rhizosphere Bacterial Community to Plant Variety and Fertilization. *Int. J. Mol. Sci.* 23(7), 3616
5. Cangioli L., et al. (2022) Scent of a Symbiont: The Personalized Genetic Relationships of *Rhizobium*—Plant Interaction. *Int. J. Mol. Sci.* 23(6), 3358
6. Kuzmanovic N., et al. (2022) Taxonomy of *Rhizobiaceae* revisited: proposal of a new framework for genus delimitation. *Int J. Syst Evol Microbiol* 72:005243
7. García-Tomsig N.I., et al. (2022) Pervasive RNA Regulation of Metabolism Enhances the Root Colonization Ability of Nitrogen-Fixing Symbiotic α -Rhizobia. *mBio* 13:e03576-21
8. Mapelli F., et al. (2022) A meta-analysis approach to defining the culturable core of plant endophytic bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* on line 9 february 2022
9. diCenzo G.C. et al. (2022) DNA Methylation in *Ensifer* Species during Free-Living Growth and during Nitrogen-Fixing Symbiosis with *Medicago* spp. *mSystems* 7: e01092-21



10. Mapelli F., et al. (2022) Bacterial culturing is crucial to boost sustainable agriculture. *Trends in Microbiology*. doi: 10.1016/j.tim.2022.10.005
11. Fagorzi C., and Mengoni A. (2022) Endophytes: Improving Plant Performance. *Microorganisms* 10(9), 1777
12. Cangiali L., et al. (2022) Effect of Site and Phenological Status on the Potato Bacterial Rhizomicrobiota. *Microorganisms* 10(9), 1743
13. Vaccaro F., et al. (2022) Synthetic plant microbiota challenges in nonmodel species. *Trends in Microbiology* doi: 10.1016/j.tim.2022.06.006
14. Riccardi C., Passeri I., Cangiali L., Fagorzi C., Mengoni A., Fondi M. (2023) Crossing bacterial genomic features and methylation patterns with MeStudio: an epigenomic analysis tool. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1): 159
15. Fagorzi C, Passeri I, Cangiali L, Vaccaro F, Mengoni A. (2023) When biodiversity preservation meets biotechnology: the challenge of developing synthetic microbiota for resilient sustainable crop production. *J Sustain Agric Environ*. 2(1): 5-15.

Considerazioni finali

Le analisi svolte nel progetto hanno permesso di identificare una miscela di bioinoculanti innovativa, composta da rizobi simbiotici di erba medica e da batteri non simbiotici ma in grado di esplicare attività di promozione della crescita delle piante, efficace sia in condizioni controllate che in campo e resistente alla salinità. Per sfruttare al meglio il capitale scientifico e metodologico sviluppato, e soprattutto per portare a produzione la miscela di bioinoculo sviluppata e consentire un netto miglioramento della produzione foraggera in regime di agricoltura biologica e in condizioni di scarsità idrica, sarà necessaria una accurata valutazione dell'efficacia delle miscele in anni successivi ed in ulteriori condizioni pedoclimatiche che caratterizzano la Penisola italiana.

A fronte delle difficoltà emerse nell'utilizzo in toto del finanziamento da parte del partner IBBR, legato alle regole di cofinanziamento, la messa a disposizione nelle due unità di ricerca di un numero di ore/persona del personale strutturato superiore a quanto previsto ha comunque consentito di portare a termine gli esperimenti pianificati. Le difficoltà nel cofinanziamento hanno tuttavia rallentato l'acquisto di reagenti e materiali da laboratorio portando ad un'ulteriore dilazione di alcune prove sperimentali rispetto ai ritardi già in essere dovuti alla pandemia da COVID-19.



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

BIO
DIPARTIMENTO
DI BIOLOGIA

Ringraziamenti

Si ringrazia Continental Semences S.p.A. per aver fornito le cultivar di erba medica per le prove sperimentali.

Continental Semences S.p.A. non ha avuto nessun ruolo nel disegno sperimentale e nella valutazione dei dati ottenuti.

Firenze, 31/07/2023

Il coordinatore del progetto
Prof. Alessio Mengoni

Il Direttore del Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Firenze
Prof. David Caramelli

Il Direttore
(Prof. David Caramelli)

