



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

**Relazione tecnico-scientifica 3° semestre attività**

**Coordinatore:** Alessio Mengoni, Università di Firenze, Firenze

**Partner:** Carmelina Bianco, IBBR-CNR, Napoli

## Sommario

Obiettivi del progetto; .....	2
Cronoprogramma .....	4
Attività svolta nel terzo semestre di progetto.....	5
Azione 1.3 Analisi genomica dei ceppi selezionati.....	5
Azione 2.1 Settaggio dell'esperimento in serra .....	5
Azione 3.1 Coordinamento .....	7
Azioni di disseminazione .....	8
Commenti finali.....	9



## 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 pedoclimatici. 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 saggate;
- 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



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

**BIO**  
DIPARTIMENTO  
DI BIOLOGIA



## Cronoprogramma

Le attività del progetto si svolgono secondo la programmazione temporale prevista nel seguente diagramma di GANNT:

Work packages ed Attività	Responsabile e <i>partecipanti</i>	1-6 mesi	7- 12	13- 18	19- 24	25- 30	31- 36
<b>WP1 Costituzione dei consorzi simbiotici</b>	<b>UNIFI</b>						
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>						
<b>WP2 Efficacia dei consorzi</b>	<b>IBBR</b>						
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>						
<b>WP3 Coordinamento e disseminazione</b>	<b>UNIFI</b>						
Azione 3.1 Coordinamento	<i>UNIFI</i>						
Azione 3.2 Disseminazione	<i>UNIFI, IBBR, UNIPA, Aziende</i>						

In particolare sono state previste per il primo semestre le attività Azione 1.1., 1.2, 1.3 del WP1 e l'azione di coordinamento (azione 3.1.).



## Attività svolta nel terzo semestre di progetto

### Azione 1.3 Analisi genomica dei ceppi selezionati

E' stato ultimato il sequenziamento dei genomi dei ceppi ancora in stato di draft. In particolare dai ceppi RCA24, RCA25, BDA137-13, BDA62-2 è stato estratto il DNA ad alto peso molecolare. Dal 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.** I risultati ottenuti sono riportati sinteticamente in **Tabella 1**. Tutti i genomi risultano chiusi o in stato di draft di alta qualità (livello sufficiente per procedere alle analisi successive).

L'annotazione verrà eseguita nelle prossime settimane annotati al fine di catalogare la totalità dei geni presenti e identificare quelli legati a potenziali attività favorevoli alla crescita delle piante. Inoltre la totalità delle sequenze genomiche ottenute sarà utilizzata per identificare geni unici da impiegare come **sistema di barcoding** molecolare tali da permettere la tracciabilità degli inoculanti nel suolo e nella pianta.

**Tabella 1.** Risultato del sequenziamento dei genomi dei ceppi selezionati

	RCA24	RCA25	BDA62-2	BDA137-13
Polished Contigs	2	4	13	8
Maximum Contig Length	4631916	4728105	1712563	673415
N50 Contig Length	4631916	4728105	713233	628898
<b>Sum of Contig Lengths (genome size)</b>	<b>4731967</b>	<b>5080969</b>	<b>5431202</b>	<b>3207403</b>
E-size (sum of squares / sum)	4536096	4411287	959871	499843
Coverage	86	85	76	64
GC content %	55.84	53.66	57.65	69.42
Best taxonomic match	Enterobacter chengduensis/Enterobacter asburiae	Kosakonia sacchari	Klebsiella variicola subsp. Tropica	Microbacterium laevaniformans

### 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 saranno poi opportunamente suddivise in parcelle.. Nella Figura 1 sono riportate alcune immagini a titolo esemplificativo.

Sul terreno che verrà adibito alla coltivazione sono stati effettuati dei prelievi per definirne le caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche antecedenti alla semina. 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. Questo processo consente ai microorganismi di penetrare nei tessuti vegetali e di essere più efficienti nel promuovere la fissazione dell'azoto, rendendo il sistema autosufficiente per questo importante nutriente. Nelle varie prove effettuate i semi sono stati incubati con le sospensioni batteriche e poi lasciati ad asciugare sotto una cappa a flusso laminare. A diversi tempi dalla fine del trattamento i semi sono stati prelevati e messi in coltura per verificare il grado di germinabilità degli stessi. I risultati delle analisi effettuate hanno evidenziato che i semi continuavano ad avere un buon grado di germinazione anche dopo 8 giorni dal trattamento.

**Figura 1.** Foto dei siti che verranno adibiti alle prove di inoculo in campo





### Azione 3.1 Coordinamento

Sono stati organizzati due meeting (in modalità a distanza sulla piattaforma GMeet) a **gennaio 2021 e Giugno 2021**.

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



## Azioni di disseminazione

Si è inoltre tenuto un 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 a cui hanno preso parte ricercatori, esperti del settore, rappresentanti di associazioni di categoria e del MIPAAF. La locandina e il programma del convegno sono riportati nelle immagini sottostanti.



ACCADEMIA DEI GEORGOFILII

Giornata di studio on line su:

### **SOLUZIONI INNOVATIVE PER L’IMPIEGO DELLE LEGUMINOSE IN UNO SCENARIO DI CAMBIAMENTI CLIMATICI**

**Giovedì 8 aprile 2021 - Ore 9.30**

Lo sviluppo di industrie locali volte alla produzione alimentare sostenibile è un fattore chiave per fronteggiare le emergenti problematiche legate all’inquinamento e ai cambiamenti climatici. La simbiosi mutualistica tra ceppi di rizobi azotofissatori e leguminose contribuisce in misura sostanziale al processo di fissazione biologica dell’azoto (BNF) costituendo il principale apporto naturale di azoto nella biosfera. Gli inoculanti a base di ceppi di rizobi sono, infatti, ampiamente utilizzati in agricoltura, fornendo uno dei modi più economici per aumentare le prestazioni delle colture di leguminose.

Ad oggi, considerando i cambiamenti climatici in corso ed il costante aumento delle temperature, un’accurata selezione di ceppi di rizobi resistenti a stress abiotici (es. elevate concentrazioni di sali) ed altamente competitivi, quindi in grado di superare altri ceppi compatibili presenti nel suolo, e la selezione di genotipi di leguminose che meglio si adattano ai cambiamenti climatici è fondamentale nell’ottica dello sviluppo dell’agricoltura sostenibile.

La partecipazione potrà avvenire solo dietro compilazione, entro martedì 6 aprile, del seguente form:

<https://forms.gle/y33jaHP5Em1HQo9z6>

I partecipanti riceveranno le credenziali di accesso alla piattaforma web, saranno accolte le prime 230 iscrizioni



### PROGRAMMA

9.30 - Apertura dei lavori, SIMONE ORLANDINI - Accademia dei Georgofili

Coordina i lavori: MARCO BAZZICALUPO - Università degli Studi di Firenze

#### Prima Sessione: Relazioni

SIMONE ORLANDINI, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agrarie, Alimentari Ambientali e Forestali (DAGR) - Università degli Studi di Firenze

**Le leguminose: una risorsa attuale per la gestione della fertilità.**

MATTEO DELL'ACQUA, Scuola Superiore Sant'Anna

**Analisi del genoma delle leguminose per la ricerca dei tratti di adattamento ai cambiamenti climatici**

FRANCESCO PINI, Dipartimento di Biologia - Università degli Studi di Bari

**Interazioni rizobi-leguminose, chi nodula è il migliore?**

FEDERICA MANNELLI, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agrarie, Alimentari Ambientali e Forestali (DAGR) - Università degli Studi di Firenze

**Legumi come base per la dieta integrata con scarti dell'industria alimentare mediterranea**

10.50 - Seconda Sessione: I finanziamenti della ricerca

GUALTIERO BITTINI, Direzione Generale dello sviluppo rurale - Ufficio DESR IV - Ricerca e Sperimentazione MIPAAF

**I finanziamenti del MIPAAF sul tema delle leguminose per uso foraggero e per il consumo umano**

11.10 - Terza Sessione: Presentazione di progetti

CARLO VITI, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agrarie, Alimentari Ambientali e Forestali (DAGR) - Università degli Studi di Firenze

**Progetto SusFOOD2-Core Organic "Alfalfa for sustainable Livestock farming systems: Improve alfalfa-rhizobia symbiosis and New feeding strategy based on ecological leftovers - ALL-IN"**

FEDERICO MARTINELLI, Dipartimento di Biologia - Università degli Studi di Firenze

**Progetto PRIMA "Biodiversity and resilience in the Mediterranean crops - LEGU-MED"**

ALESSIO MENGONI, Dipartimento di Biologia - Università degli Studi di Firenze

**Progetto MIPAAF PQAI 1 - Ufficio Agricoltura Biologica "Il microbioma vegetale simbiote come strumento per il miglioramento delle leguminose foraggere - MICRO4Legumes"**

12.10 - Discussione e conclusioni



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

**BIO**  
DIPARTIMENTO  
DI BIOLOGIA



ALL-IN



mipAAF

Ministero delle politiche  
agricole, alimentari e rurali



PRIMA

Programma di Sviluppo Rurale



CORE organic



CORE organic



SINOB

## Commenti finali

Le attività previste hanno avuto un ulteriore slittamento a seguito della **perdurante pandemia** e della classificazione in **zona rossa** di alcune delle Regioni nei cui territori insistono le attività progettuali. **Questo sta comportando un ritardo nell'attuazione degli obiettivi delle azioni del WP2 di circa 6 mesi.**

Firenze, 09/07/2021

Il coordinatore del progetto  
Prof. Alessio Mengoni