



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

Relazione tecnico-scientifica 6° semestre attività

Coordinatore: Alessio Mengoni, Università di Firenze, Firenze

Partner: Carmelina Bianco, IBBR-CNR, Napoli

Sommario

Obiettivi del progetto;	1
Cronoprogramma	3
Attività svolta nel quarto semestre di progetto	4
WP2 Efficacia dei consorzi	4
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 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 svolgono secondo la programmazione temporale prevista nel seguente diagramma di GANTT:

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>						

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 sesto semestre di progetto

WP2 Efficacia dei consorzi

In questo semestre di attività sono proseguite le prove in campo presso le tre Aziende Agricole partecipanti e 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

Come già definito nella relazione del semestre precedente, le semine sono state condotte su appezzamenti di circa 250 m² individuati nei sopralluoghi effettuati nel semestre precedente.

Per l'infezione i semi di *Medicago sativa* varietà Gea (Continental Semences S.p.A.) miscelati con due consorzi microbici (Mix 1 Mix 2, Tabella 1 e Tabella 2).

Tabella 1. Elenco dei ceppi (rizobio ed endofiti) presenti nella miscela d'inoculazione

Inoculo Mix1 in PBS 1X	Inoculo Mix2 in PBS 1X
BL225C (10 ⁴ batteri/mL)	BL225C (10 ⁴ batteri/mL)
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)

Tabella 2. Caratteristiche promotrici della crescita di pianta dei ceppi selezionati.

Ceppo	Pianta ospite nativa	Tratto PGP
<i>Sinorhizobium meliloti</i> BL225C	<i>Medicago sativa</i>	Azoto fissazione
<i>Enterobacter cloacae</i> RCA24	<i>Oryza sativa</i> L, cv, Volano	Produzione di IAA
<i>Klebsiella variicola</i> RCA25	“	Azoto fissazione



<i>Citrobacter sp.</i> BDA59-3	<i>Oryza glaberrima</i> L.	Azoto fissazione
<i>Klebsiella pneumoniae</i> BDA62-2	“	Produzione di IAA
<i>Kasakonia pseudosacchari</i> BDA62-3	“	Azoto fissazione e Produzione di IAA IAA-producer And
<i>Klebsiella pasteurii</i> BDA134-6	“	Azoto fissazione e Produzione di IAA
<i>Microbacterium laevaniformans</i> BDA137-13	“	Produzione di IAA e positività <i>acdS</i>

IAA: Acido indol-3-acetico, il principale ormone di pianta appartenente alla classe delle auxine,
***acdS*:** gene codificante l'enzima 1-aminociclopropano-1-carbossilato (ACC) deaminasi, L'enzima ACC-deaminasi è coinvolto nella degradazione dell'ACC, il precursore dell'etilene, l'ormone prodotto dalle piante in risposta allo stress,

Nella Figura 1 sono riportati alcuni dettagli delle parcelle in cui è stata effettuata la semina ad ottobre 2022 in ciascuna Azienda.



Figura 1. Immagine esemplificativa dei risultati delle prove in campo (Ottobre 2022).

Purtroppo, a causa dell'elevata siccità dell'estate 2022, tutte le prove effettuate non hanno prodotto risultati tali da consentire una corretta valutazione della resa.

Tuttavia, per le prove condotte presso l'Azienda Agricola Leone (Capaccio, Salerno) è stato effettuato uno sfalcio per valutare il livello di produzione di biomassa dopo la ricrescita (Figura 2).



Figura 2. Stato delle parcelle presso l’Azienda Agricola Leone dopo lo sfalcio

Sono stati comunque prelevati dei campioni di suolo rizosferico e di piante per consentire una valutazione dell’effetto delle mix di bioinoculi sul microbiota endofita e rizosferico.

Per ovviare a questo inconveniente è stata allestita una nuova prova sperimentale in condizioni semi-controllate. In questa prova la crescita di erba medica è stata effettuata in tubi di plastica contenenti il terreno prelevato dai campi sperimentali (Figura 3).

Le condizioni sperimentali utilizzate sono le seguenti:

- Tesi = GEA+BL225C; GEA+Mix1; GEA+Mix2
- Altezza tubi = 70 cm
- Diametro tubi = 12 cm
- Numero piante per tubo = 5
- Numero tubi per tesi = 20

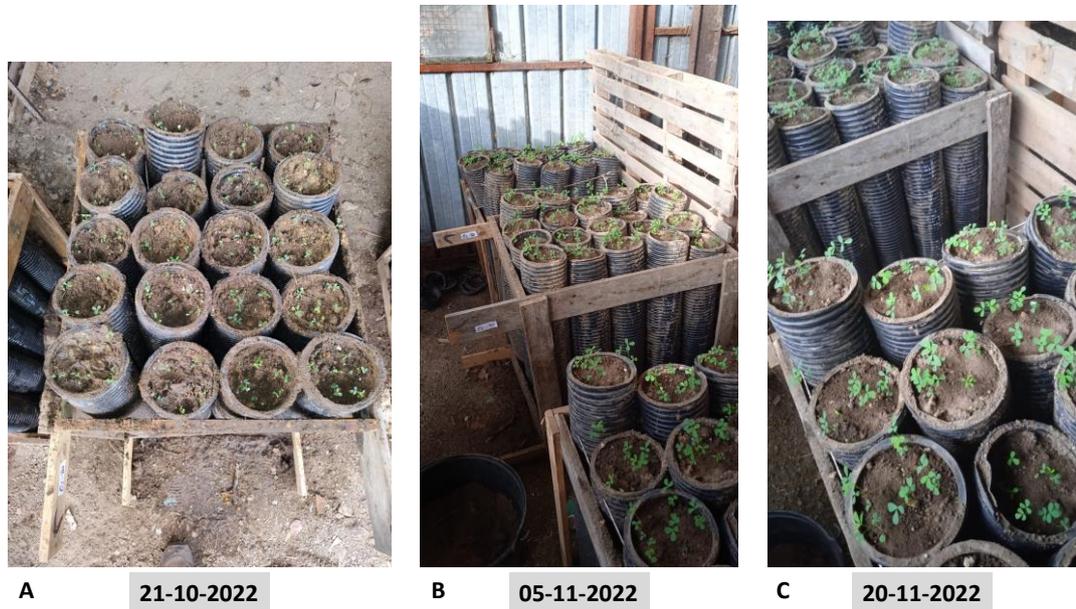


Figura 3. Immagini esemplificative della prova in tubi allestita nell'autunno 2022. Le immagini riportate in figura riguardano la messa in coltura delle piante inoculate (A) e la loro crescita dopo 15 (B) e 30 (C) giorni.

Il monitoraggio della crescita nelle condizioni invernali sta evidenziando l'avvio della fase di riposo vegetativo essenziale per soddisfare determinate condizioni tramite le quali le piante si prepareranno alla fase vegetativa e riproduttiva del periodo primaverile.

Come riportato nelle precedenti relazioni, 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 rizobici selezionati. A tal fine è stato adottato uno schema sperimentale a parcella suddivisa (split-plot) con parcelle elementari di 9 m² e 6 repliche per un totale di 72 parcelle elementari. In questa prova sono stati impiegati i due inoculi descritti sopra (Mix 1 e Mix 2), un controllo non inoculato ed un miscuglio di specie graminacee poliennali, utilizzate come specie di riferimento per la determinazione dell'azoto fissato biologicamente. Sono stati applicati 3 diversi livelli di disponibilità idrica corrispondenti alla reintegrazione del 100%, 75% e 50% dell'ETM.

La semina è stata realizzata nel mese di ottobre 2021 con una densità di seme di 33,3 kg ha⁻¹ utilizzando una seminatrice parcellare, con distanza tra le file di 18 cm. In media, l'emergenza dell'erba medica si è verificata dopo 5-6 giorni dalla semina e dopo 9-10 giorni per le



graminacee. Dopo l'emergenza delle graminacee si è proceduto con la picchettatura, in modo da delimitare le parcelle, e l'etichettatura delle singole parcelle.

Come relazionato precedentemente, le condizioni meteo post-semina non sono state ottimali per la coltura. Infatti, la straordinaria quantità di pioggia dei mesi di ottobre e novembre 2021 (record di piovosità degli ultimi 50 anni; 520 mm circa) ha reso necessario intervenire per limitare i danni creando dei canali di sgrondo per l'acqua in eccesso al fine di salvaguardare le giovani plantule. Le misure adottate si sono dimostrate efficaci consentendo una crescita regolare delle colture.

Durante il mese di febbraio 2022, all'interno di ciascuna parcella elementare è stata delimitata un'area di saggio di 0,81 m² (5 file distanti 18 cm e lunghe 90 cm) su cui è stata effettuata una concimazione azotata distribuendo nel complesso 11,5 kg N ha⁻¹ sottoforma di solfato ammonico con un arricchimento isotopico (¹⁵N) pari al 10% utilizzato come tracciante per quantificare l'entità dell'azotofissazione simbiotica attraverso il metodo della diluizione isotopica; il quantitativo complessivo è stato somministrato in 4 momenti (9/3, 15/5, 31/5 e 7/7/2022), al fine di garantire maggiore stabilità dell'arricchimento di ¹⁵N nel suolo.

La flora infestante è stata eliminata manualmente attraverso due interventi, realizzati l'8 marzo ed il 10 aprile 2022. Durante la primavera-estate del 2022, considerando le condizioni climatiche particolarmente siccitose dell'ambiente di prova, è stato necessario intervenire ripetutamente per garantire il soddisfacimento delle esigenze idriche della coltura; in particolare sono stati effettuati 24 interventi irrigui apportando complessivamente 2500, 3750 e 5000 m³ ha⁻¹, rispettivamente per le tesi 50%, 75% e 100% dell'ETM.

La coltura è stata sottoposta a tagli multipli; in particolare, ad oggi, sono stati realizzati quattro tagli: il 3/5, 30/5, 5/7 e 27/7/2022. In Figura 4 è riportata una documentazione fotografica dello stato delle parcelle a maggio 2022.

Ad ogni taglio, su ciascuna parcella elementare sono stati eseguiti i seguenti rilievi: altezza della vegetazione, ricoprimento specifico, produzione di biomassa. Un campione di biomassa fresca prelevata all'interno di ciascuna area di saggio su cui è stato distribuito il fertilizzante arricchito isotopicamente, è stato essiccato in stufa ventilata (a 40° C) per la determinazione del peso secco e successivamente macinato; i campioni verranno analizzati determinando il contenuto di N totale e la relativa concentrazione dell'isotopo ¹⁵N. Infine, durante il ciclo della coltura, in ogni parcella elementare, sono stati ripetutamente prelevati campioni di terreno (strato 0-40 cm) per la determinazione del contenuto idrico (metodo gravimetrico). La prova è tuttora in svolgimento e prima del riposo invernale verrà realizzato un ulteriore taglio.



Figura 4. Veduta del campo sperimentale presso l'azienda Pietranera (S. Stefano Q. – AG) nel maggio 2022.

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.

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.

Azioni di disseminazione

MICRO4Legumes ha partecipato agli eventi promossi in occasione di Bright Night 2022, Notte europea delle Ricercatrici e dei Ricercatori (30 settembre 2022) presso Piazza SS. Annunziata, Firenze

La messa a punto dei protocolli di analisi molecolari e gli obiettivi di MICRO4Legumes sono stati oggetto di pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali. Di seguito l'elenco delle pubblicazioni relativo al 6° semestre in cui è stato riconosciuto alla sezione "Acknowledgments" il contributo di MICRO4Legumes:

1. Mapelli F., et al. (2022) Bacterial culturing is crucial to boost sustainable agriculture. *Trends in Microbiology*. doi: [10.1016/j.tim.2022.10.005](https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.10.005)
2. Fagorzi C., and Mengoni A. (2022) Endophytes: Improving Plant Performance. *Microorganisms* 10(9), 1777
3. Cangioli L., et al. (2022) Effect of Site and Phenological Status on the Potato Bacterial Rhizomicrobiota. *Microorganisms* 10(9), 1743



4. Vaccaro F., et al. (2022) Synthetic plant microbiota challenges in nonmodel species. *Trends in Microbiology* doi: 10.1016/j.tim.2022.06.006

Nel periodo in considerazione si sono svolte due tesi di laurea in Biotecnologie e una tesi di Laurea in Biologia Molecolare ed Applicata presso l'Università di Firenze.

Commenti finali

Come relazionato in precedenza le attività previste hanno avuto uno slittamento a seguito nell'attuazione degli obiettivi delle azioni del WP2 di circa 6 mesi e un ulteriore ritardo dovuto alle condizioni climatiche particolarmente avverse che stanno richiedendo un numero maggiore del previsto di ripetizione delle prove in campo.

Firenze, 19/12/2022

Il coordinatore del progetto
Prof. Alessio Mengoni