



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

## **Relazione tecnico-scientifica 5° 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 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 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 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 quinto semestre di progetto

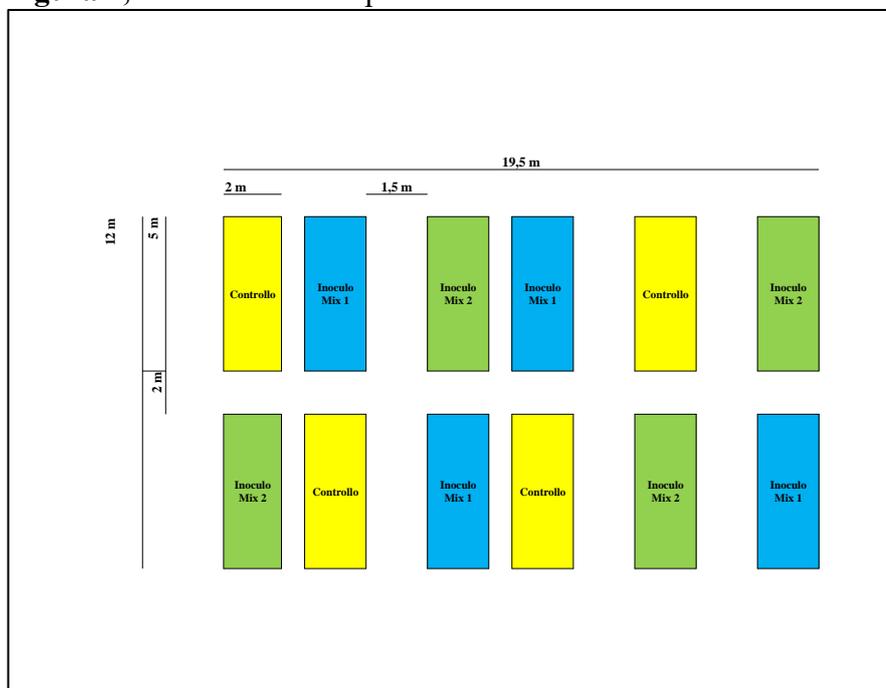
### WP2 Efficacia dei consorzi

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 m<sup>2</sup> individuati nei sopralluoghi effettuati nel semestre precedente, Lo schema sperimentale è costituito da blocchi randomizzati con 4 ripetizioni e parcelle elementari di 10 m<sup>2</sup> (Figura 1),

**Figura 1, Planimetria delle parcelle**



Per l'infezione i semi di *Medicago sativa* varietà Gea (Continental Semences S.p.A.)

sono stati incubati con l'inoculo Mix1 oppure con l'inoculo Mix2 a temperatura ambiente per 2 ore sotto costante e lenta agitazione. Trascorse le 2 ore il liquido rimasto è stato eliminato ed i semi sono stati asciugati sotto cappa a flusso laminare per circa 3 ore.

La composizione delle due Mix è riportata nella Tabella 1, mentre le caratteristiche dei ceppi selezionati sono riportate nella 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> <b>RI 225C</b>	<i>Medicago sativa</i>	Azoto fissazione
<i>Enterobacter cloacae</i> <b>RCA24</b>	<i>Oryza sativa</i> L. cv.	Produzione di IAA
<i>Klebsiella variicola</i> <b>RCA25</b>	“	Azoto fissazione
<i>Citrobacter sp.</i> <b>BDA59-3</b>	<i>Oryza glaberrima</i> L.	Azoto fissazione
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <b>BDA62-2</b>	“	Produzione di IAA
<i>Kasakonia pseudosacchari</i> <b>BDA62-3</b>	“	Azoto fissazione e Produzione di IAA
<i>Klebsiella pasteurii</i> <b>BDA134-6</b>	“	Azoto fissazione e Produzione di IAA
<i>Microbacterium laevaniformans</i> <b>BDA137-13</b>	“	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,

La semina è stata effettuata manualmente con metodica a spaglio ed i semi sono stati poi ricoperti con rastrello.

La semina, già effettuata nell'autunno 2021 è stata ripetuta a Marzo 2022 a causa della scarsa resa in biomassa ottenuta per le avverse condizioni meteorologiche (inclusa la siccità) del periodo. Per le prove eseguite a Marzo 2022 è stata incrementata la densità di semina (50 kg/ha) per favorire la crescita di erba medica rispetto alle infestanti. Quindi per ciascun trattamento sono stati utilizzati 200 g di medica varietà GEA. Nella Figura 1 sono riportati alcuni dettagli delle parcelle e della semina effettuata in ciascuna Azienda a Marzo 2022.

**Figura 1.** Immagini esemplificative delle prove in campo effettuate a Marzo 2022.



Nell'autunno 2021 è stata anche condotta una prova presso l'azienda Pietranera situata nell'entroterra collinare siciliano nel territorio di S. Stefano Quisquina (AG). Per la prova è stato adottato uno schema sperimentale a parcella suddivisa (split-plot) con parcella elementari di 9 m<sup>2</sup> e 6 repliche per un totale di 72 parcella 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.

Pertanto le 12 tesi analizzate sono state:

- 1) T1: controllo non inoculato - 100% ETM;
- 2) T2: controllo non inoculato - 75% ETM;
- 3) T3: controllo non inoculato - 50% ETM;
- 4) T4: mix1- 100% ETM;
- 5) T5: mix1- 75% ETM;
- 6) T6: mix1- 50% ETM;

- 7) T7: mix2 - 100% ETM;
- 8) T8: mix2- 75% ETM;
- 9) T9: mix2- 50% ETM;
- 10) T10: graminacea - 100% ETM;
- 11) T11: graminacea - 75% ETM;
- 12) T12: graminacea - 50% ETM;

La semina è stata realizzata nel mese di ottobre con una densità di seme di 33,3 kg ha<sup>-1</sup> utilizzando una seminatrice parcellare e 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.

Le condizioni meteo post-semine 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. Nella Figura 2 sono riportate due immagini del campo sperimentale.



**Figura 2.** Situazione del campo sperimentale a dicembre 2021.

### 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 del Fascination of Plants Day 2022 (21 maggio 2022) presso l'Orto Botanico di Portici (Figura 3).

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 in cui è stato riconosciuto alla sezione "Acknowledgments" il contributo di MICRO4Legumes:

1. Cangioli L., et al. (2022) [Differential Response of Wheat Rhizosphere Bacterial Community to Plant Variety and Fertilization](#). *Int. J. Mol. Sci.* 23(7), 3616
2. Cangioli L., et al. (2022) [Scent of a Symbiont: The Personalized Genetic Relationships of Rhizobium—Plant Interaction](#). *Int. J. Mol. Sci.* 23(6), 3358
3. Kuzmanovic N., et al. (2022) [Taxonomy of Rhizobiaceae revisited: proposal of a new framework for genus delimitation](#). *Int J. Syst Evol Microbiol* 72:005243
4. García-Tomsig N.I., et al. (2022) [Pervasive RNA Regulation of Metabolism Enhances the Root Colonization Ability of Nitrogen-Fixing Symbiotic  \$\alpha\$ -Rhizobia](#). *mBio* 13:e03576-21
5. 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
6. 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

**Figura 3.** Locandina dell'evento Fascination of Plants Day 2022 e relativo poster presentato.





Nel periodo in considerazione si sono svolte due tesi di laurea in Biotecnologie e una tesi di Laurea in Scienze Biologiche 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, 13/06/2022

Il coordinatore del progetto  
Prof. Alessio Mengoni