



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

BIO
DIPARTIMENTO
DI BIOLOGIA

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

Relazione tecnico-scientifica 1° semestre attività

Coordinatore: Alessio Mengoni, Università di Firenze, Firenze

Partner: Carmelina Bianco, IBBR-CNR, Napoli

Sommario

Obiettivi del progetto;	2
Cronoprogramma	3
Attività svolta ne primi semestre di progetto	4
Azione 1.1 Selezione del pannello di ceppi	4
Azione 1.2 Test delle caratteristiche fisiologiche dei ceppi e dei consorzi.....	5
Azione 1.3 Analisi genomica dei ceppi selezionati.....	6
Azione 3.1 Coordinamento	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
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 ne primi semestre di progetto

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 simbionte 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 consentire di ottenere rizobi dotati di buone performance azotofissatrici ma anche in grado di tollerare condizioni di suolo arido. I rizobi (n=10) selezionati e le loro caratteristiche sono presentati in Tabella 1.

Tabella 1. Ceppi di *Sinorhizobium meliloti* selezionati

Codice	Nome del ceppo	Origine	Sequenza parziale del genoma (codice genbank)	Livello di tolleranza a NaCl
BM492	AK58	Area salinizzata a nord del Mare d'Aral	GCA_000473425.1	1 M
BM493	AK83	Area salinizzata a nord del Mare d'Aral	GCA_000147795.3	1 M
BM494	BL225C	Suolo agrario italiano	GCA_000147775.3	nd
BM495	BO21CC	Suolo agrario italiano	GCA_000473405.1	1M
BM498	H1	Suolo agrario italiano	GCA_000287475.1	1M
BM499	AO643DD	Agricultural soil from Lodi, Italy	GCA_000287575.1	1M
BM501	CO438LL	Suolo agrario italiano	GCA_000287495.1	2M
BM504	AK75	Area salinizzata a nord del Mare d'Aral	GCA_000287515.2	2M
BM506	CO431A	Suolo agrario italiano	GCA_000287375.1	1M
BM508	SM11	Suolo agrario tedesco	GCA_000218265.1	0.4M

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 (Tabella 2). Questi ceppi (n=7) appartengono a due classi batteriche, i gammaproteobatteri e i betaproteobatteri,

specie note per essere associate con le piante.

Tabella 2. Ceppi endofiti selezionati

Affiliazione tassonomica	Codice
<i>Citrobacter sp.</i>	BDA59-3
<i>Klebsiella sp.</i>	BDA62-2
<i>Enterobacter sp.</i>	BDA62-3
<i>Ralstonia sp.</i>	BDA134-6
<i>Microbacterium sp.</i>	BDA137-13
<i>Enterobacter sp.</i>	RCA25
<i>Herbaspirillum sp.</i>	RCA24

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. Per gli endofiti è stata condotta un'analisi preliminare di resistenza agli antibiotici al fine di individuare quello specifico da utilizzare per la messa in coltura di ciascun ceppo. La resistenza a specifici antibiotici sarà anche utilizzata, in combinazione con altre specifiche caratteristiche, per l'identificazione di ciascun batterio endofita re-isolato dalle piante di erba medica dopo l'inoculazione. In questo primo semestre, la caratterizzazione fisiologica dei ceppi ha riguardato la **misura dei livelli dell'auxina acido indolo-3-acetico (IAA)** prodotti in coltura liquida mediante un metodo colorimetrico che prevede l'utilizzo del reagente Salkowski. Le colture liquide di ciascun ceppo sono state trattate per circa 18 ore con triptofano, il precursore dell'IAA. Il reagente utilizzato contiene ferro e acido perclorico e consente di valutare la colorazione rosa prodotta in seguito alla formazione di un complesso tris-(indolo-3-acetato)-ferro(III). Sono state allestite almeno 5 colture indipendenti per ciascun ceppo da caratterizzare. I risultati ottenuti e riportati nella **Tabella 3** mostrano che circa l'80% dei ceppi di rizobio produce livelli bassi e molto simili di IAA, mentre soltanto due ceppi (BM499 e BM508) producono maggiori quantità di auxina. Un risultato opposto è stato ottenuto per i ceppi endofiti (evidenziati in grigio nella Tabella 1): circa il 70% produce buoni livelli IAA, mentre per il restante 30% sono stati misurati livelli molto simili a quelli registrati per la maggior parte dei rizobi. L'analisi dei risultati ottenuti consentirà di **individuare le combinazioni rizobio-endofita da utilizzare per l'inoculazione di**

erba medica.

Tabella 3. Valutazione della produzione dell'auxina acido indolo-3-acetico (IAA)

Ceppo	Produzione IAA (nmol IAA/mg cellule)
<i>Sinorhizobium meliloti</i> BM492	4,7 ± 0,6
<i>Sinorhizobium meliloti</i> BM493	4,6 ± 0,4
<i>Sinorhizobium meliloti</i> BM494	6,5 ± 0,9
<i>Sinorhizobium meliloti</i> BM495	4,7 ± 0,4
<i>Sinorhizobium meliloti</i> BM498	3,7 ± 0,2
<i>Sinorhizobium meliloti</i> BM499	13 ± 3
<i>Sinorhizobium meliloti</i> BM501	6,5 ± 0,5
<i>Sinorhizobium meliloti</i> BM504	3,3 ± 0,2
<i>Sinorhizobium meliloti</i> BM506	3,5 ± 0,3
<i>Sinorhizobium meliloti</i> BM805	12 ± 1
<i>Citrobacter</i> sp. BDA59-3	61 ± 10
<i>Klebsiella</i> sp. BDA62-2	56 ± 12
<i>Enterobacter</i> sp. BDA62-3	7,7 ± 0,5
<i>Ralstonia</i> sp. BDA134-6	31 ± 2
<i>Microbacterium</i> sp. BDA137-13	17 ± 2
<i>Enterobacter</i> sp. RCA25	3,1 ± 0,3
<i>Herbaspirillum</i> sp. RCA24	36 ± 11

Azione 1.3 Analisi genomica dei ceppi selezionati

DA tutti i ceppi in esame sono state effettuate colture in terreno liquido ed è stato estratto il DNA. 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 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.

I risultati ottenuti sono riportati sinteticamente in Tabella 4. Per alcuni genomi la qualità dei dati ottenuti non è ancora soddisfacente e si dovrà procedere con una ulteriore analisi di sequenziamento.

Tabella 4. Dati ottenuti dal sequenziamento dei genomi dei ceppi selezionati (output software SMRT Link)

Analysis Metric	AK58	AK83	BL225C	BO21CC	AO643D	CO438LL	AK75	CO431A	SM11	59-)	62-2	62-3	134-6	RCA25	RCA24
Polymerase Read Length Mean (aligned)	22.897	22.846	22.755	22.888	23.128	22.975	23.336	23.401	23.255	41.451	24.675	40.661	25.461	26.042	25.468
Polymerase Read Length Max (aligned)	104.56	104.07	102.98	114.73	108.07	109.04	109.22	111.84	106.62	129.48	113.65	127.79	105.28	114.16	107.47
Mean Coverage	75	88	72	77	92	87	98	97	105	191	49	141	66	62	68
Polished Contigs	139	146	161	149	164	149	129	150	145	1	65	2	11	17	11
Maximum Contig Length	94.772	209.24	66.198	143.75	122.65	120.97	160.98	141.18	138.01	5,349,552	251.19	4,909,996	505.46	664.52	1,062,552



Sum of Conti g Lengt hs	2,67 2,26 0	4,33 1,06 9	2,88 9,91 4	3,98 2,12 3	3,94 0,24 1	4,07 3,58 8	4,74 0,21 6	4,86 5,86 3	4,96 1,11 2	5,34 9,55 2	4,46 7,17 3	5,00 3,04 7	2,65 9,00 3	2,62 9,88 6	3,02 0,90 5
--	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------

Azione 3.1 Coordinamento

L'azione di coordinamento ha previsto la stipula di un accordo di partenariato tra il Dip. di Biologia Università di Firenze e l'IBBR-CNR.

E' stato effettuato un meeting iniziale del progetto (**Kick-off meeting**) in videoconferenza tramite la piattaforma Google Meet in data 26/02/2020 a cui hanno preso parte il coordinatore, il partner IBBR-CNR e i partecipanti all'unità partner (Università di Palermo). A chiusura del primo semestre di attività è stato effettuato un ulteriore meeting (**meeting primo semestre**) in videoconferenza tramite la piattaforma Google Meet in data 08/10/2020 nel quale sono state presentati risultati scientifici ottenuti, si sono verificate le spese effettuate e si è programmato le attività future.

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 bandita inizialmente una **borsa di ricerca** da parte del Dip. di Biologia, con decorrenza dal 01/04/2020 per un totale di mesi 6. Successivamente è stata messa a bando una **borsa di dottorato di ricerca** all'interno del Dottorato di Ricerca in Biologia Evoluzionistica ed Ecologia (https://scvsa.unipr.it/it/dottorato_bee e https://www.unipr.it/sites/default/files/albo_pretorio/bandi/studenti_didattica/23-07-2020/schede_singole_corsi_dottorato_xxxvi_ciclo.pdf), consorziato con l'Università di Firenze, il cui inizio di attività è previsto a novembre 2020.

Infine è stata creata una **pagina web** (<https://www.bio.unifi.it/vp-171-genomics-of-plant-microbe-interactions.html>) che verrà utilizzata per descrivere l'andamento del progetto.



Commenti finali

Le attività previste sono state effettuate come da programma, seppur con alcuni ritardi (es. sequenziamento dei genomi) legate alla necessità di compattare gli esperimenti (di fatto iniziati a maggio 2020, con oltre 3 mesi di ritardo rispetto al previsto) in un **breve lasso temporale a causa delle restrizioni dovute ai DPCM relativi alla pandemia da COVID-19.**

Firenze, 27/10/2020

Il coordinatore del progetto

Prof. Alessio Mengoni