

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

Relazione tecnico-scientifica 2° semestre attività

Coordinatore: Alessio Mengoni, Università di Firenze, Firenze

Partner: Carmelina Bianco, IBBR-CNR, Napoli

Sommario

Obiettivi del progetto;	2
Cronoprogramma	3
Attività svolta nel secondo semestre di progetto	4
Azione 1.2 Test delle caratteristiche fisiologiche dei ceppi e dei consorzi.....	4
Azione 1.3 Analisi genomica dei ceppi selezionati	5
Azione 1.4 Prove pilota di simbiosi in vitro	6
Azione 3.1 Coordinamento	7
Azioni di disseminazione	8
Commenti finali	8

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 secondo semestre di progetto

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. Dalla caratterizzazione fisiologica dei ceppi ha riguardato la **misura dei livelli dell'auxina acido indolo-3-acetico (IAA) (Tabella 1)** si è evidenziato 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.

E' stata successivamente valutata la **tolleranza a NaCl** dei ceppi. I ceppi sono stati saggiati in due terreni di coltura (LB e TY) contenenti 1 M NaCl. La crescita dei ceppi è stata seguita per 72 h a 30°C partendo da un inoculo $OD_{600} = 0.01$. Il risultato è mostrato (**Figura 1**) indica che *S. meliloti* è meno alotollerante rispetto ai ceppi endofiti.

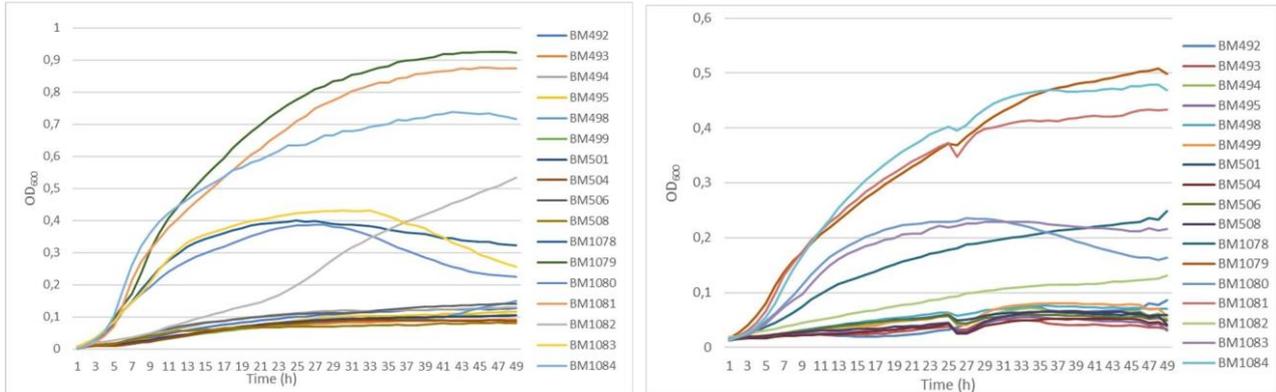


Figure 1. Curve di crescita in LB medium (sinistra) e TY medium (destra) da 0 a 48 ore.

E' stata infine valutata la **inibizione incrociata** tra i ceppi in modo da poter assemblare la comunità sintetica. Il test è stato effettuato con il metodo dell'agar diffusion, così come mostrato in Figura 2. Nessuna inibizione incrociata è stata evidenziata.

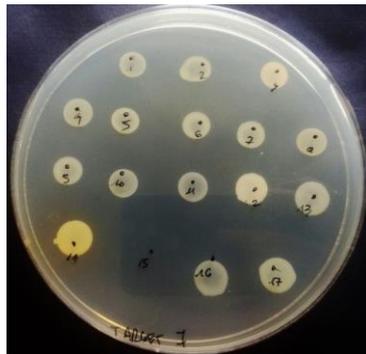


Figure 2. Esempio di una piastra Petri con il test di inibizione per agar diffusion. Target CO438LL

L'analisi dei risultati ottenuti consentirà di **individuare le combinazioni rizobio-endofita da utilizzare per l'inoculazione di erba medica.**

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 2**. Tutti i genomi risultano chiusi o in stato di draft di alta qualità (livello sufficiente per procedere alle analisi successive)

Tabella 2. Risultato del sequenziamento e annotazione dei genomi dei ceppi selezionati



	AK58	AK83	BL225C	BO21CC	AO643DD	CO438LL	AK75	CO431A	SM11	BDA62-2	BDA137-13	RCA25	RCA24
contigs	74	20	46	28	14	23	11	18	20	65	39	17	11
bases	6414491	5291506	5056432	4875083	4222335	6104601	4804066	5189680	4943353	4467173	3115823	2629886	3020905
CDS	6189	5214	4857	4635	4059	5845	4578	4952	4829	4278	2901	2526	2825
rRNA	3	3	3	15	6	6	12	11	6	13	6	6	22
tRNA	47	35	36	61	39	55	41	38	43	65	51	32	45
tmRNA	1	1	1	1		1		1	1	1		1	

	BDA59-3		BDA62-3	
	FA1	FA2	FA1	FA2
contigs	1	1	2	2
bases	5349552	5349556	5003042	5003047
CDS	4960	4958	4686	4683
rRNA	22	22	22	22
tRNA	85	85	84	84
tmRNA	1	1	1	1
repeat region	3	3		

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 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. Il ceppo di rizobio utilizzato per la co-inoculazione deriva dalla collezione dei 17 ceppi caratterizzati nell’Azione 1.2 e sequenziati nell’Azione 1.3. E’ stata effettuata una **co-inoculazione** di erba medica con il ceppo di rizobio *S. meliloti* BL225C e con ciascuno degli endofiti selezionati e con la mix di tutti gli endofiti. Piante di erba medica inoculate con il solo rizobio serviranno come controllo dell’esperimento. La capacità azoto-fissativa delle piante inoculate, attualmente in crescita, sarà effettuata mediante un saggio in vitro in cui l'acetilene, un substrato alternativo all’N₂, verrà utilizzato per saggiare l’attività dell’enzima nitrogenasi mediante l’uso di un Gas Cromatografo. Nella **Figura 3** è mostrato il fenotipo delle piante inoculate.

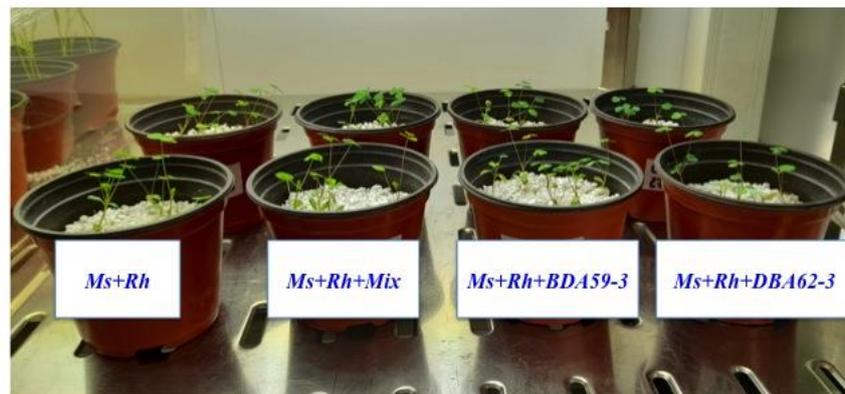


Figura 3. Fenotipo di piante di erba medica Gea inoculate con il rizobio (Rh), con la mix di tutti gli endofiti (Mix) e con gli endofiti BDA59-3 e BDA62-3 le cui annotazioni genomiche sono riportate nella Tabella 2.

Azione 3.1 Coordinamento

L'azione di coordinamento ha previsto l'organizzazione di un meeting intermedio 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. Un meeting ulteriore è previsto a **gennaio 2021**. 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 (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 decorso dal 30 novembre 2020. La dottoranda di ricerca selezionata è la Dott.ssa Lisa Cangioi, in possesso di una laurea magistrale in Biotecnologie per la Gestione Ambientale e l'Agricoltura sostenibile. Infine, 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

Il progetto è stato oggetto di una tesi di laurea magistrale in Biologia Molecolare e Applicata (Dott.ssa Francesca Vaccaro, in discussione nella sessione del 22/12/2020 presso l'Università degli Studi di Firenze).

L'idea progettuale è stata oggetto di un'intervista radiofonica e di un intervento durante l'evento [Bright - Notte della ricerca](#)

Dati parziali del progetto sono stati oggetto delle seguenti 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

Commenti finali

Le attività previste sono state effettuate come da programma, seppur con alcuni ritardi (es. analisi 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, 16/12/2020

Il coordinatore del progetto

Prof. Alessio Mengoni