



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 7° semestre attività (proroga)**

**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 GANNT:

| Work packages ed Attività  | Responsabile e <i>partecipanti</i> | 1-6<br>mesi | 7-<br>12 | 13-<br>18 | 19-<br>24 | 25-<br>30 | 31-<br>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 settimo semestre di progetto (proroga)

### WP2 Efficacia dei consorzi

In questo semestre di attività sono proseguite le prove in campo presso le Aziende Agricole partecipanti e operanti in regime di agricoltura biologica:

- **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.

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).

Come relazionato precedentemente, 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 1).

Le condizioni sperimentali utilizzate sono le seguenti:

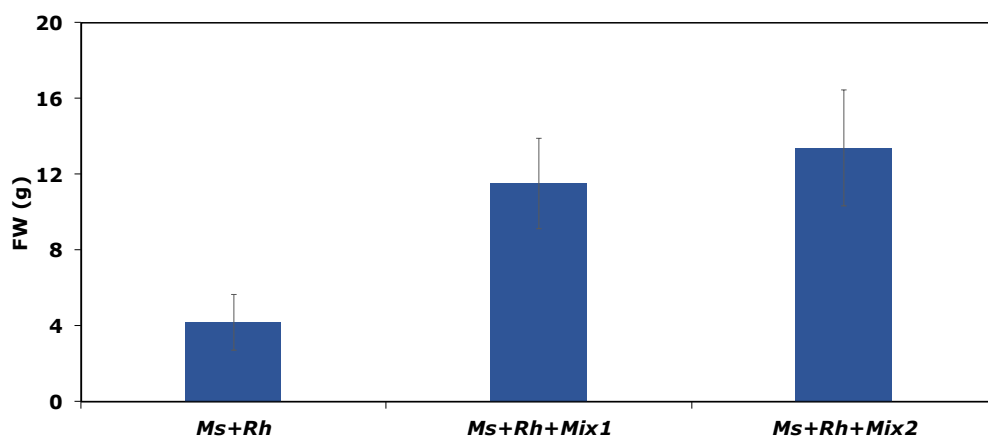
- Tesi = GEA+BL225C; GEA+Mix1; GEA+Mix2
- Altezza tubi = 70 cm
- Diametro tubi = 12 cm
- Numero piante per tubo = 5
- Numero tubi per tesi = 20

**Effetto della co-inoculazione del rizobio BL225C con batteri endofiti PGP sulla crescita di *Medicago sativa***



**Figura 1.** Prova in tubi allestita nell'autunno 2022.

Il monitoraggio della crescita nelle condizioni sperimentali settate è stato realizzato effettuando sfalci periodici. La misura del peso fresco dei fusti ha evidenziato notevoli differenze nella produzione vegetativa per le piante inoculate con le due mix rispetto al controllo inoculato con il solo rizobio (Figura 2).



**Figura 2.** Misura del peso fresco dei fusti (FW) di erba medica GEA coltivata nei tubi.

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 microbici selezionati (Figura 3).

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 N totale e la relativa concentrazione dell'isotopo <sup>15</sup>N. 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 i risultati saranno relazionati con la relazione finale del progetto.



**Figura 3.** Veduta del campo sperimentale presso l'azienda Pietranera.

### 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.

I risultati ottenuti sono stati inoltre oggetto di una giornata di incontro presso le



Aziende Agricole partecipanti a Colle Sannita.

## Azioni di disseminazione

E' stato organizzato un evento di disseminazione presso l'Azienda Agricola a Colle Sannita (Figura 5). All'evento, oltre ai partner del progetto e ai collaboratori, hanno preso parte anche il Presidente di Coldiretti Campania Dott. Gennarino Masiello ed un pubblico di circa 50 persone in rappresentanza delle realtà produttive locali tra le quali il Direttore Provinciale Coldiretti Gerardo Dell'Orto, il Vicesindaco del Comune di Colle Sannita e circa 10 Aziende (Figura 6).



**Il microbioma vegetale simbiote come  
strumento per il miglioramento delle  
leguminose foraggere  
(MICRO4LEGUMES)**

**26 Maggio 2023: Evento conclusivo di Progetto**

**ore 10:30 - 12:30**

**Aziende Agricole**

**Paolucci Lina e Tedesco Anna Maria**  
Colle Sannita (BN)

**10:30** Presentazione del Progetto, Coordinatore Alessio Mengoni  
**10:50** Batteri endofiti e fissazione biologica dell'azoto, Carmen Bianco  
**11:10** I microorganismi benefici in agricoltura: dal laboratorio al campo, Gaetano Amato  
**11:30** coffee break  
**11:50** La biodiversità microbica al servizio delle varietà vegetali, Roberto Defez  
**12:10** Considerazioni dal mondo della produzione, Coldiretti

### Organizzatori:

Dott.ssa Carmen Bianco (IBBR)  
Prof. Alessio Mengoni (UNIFI)  
Prof. Gaetano Amato (UNIPA)



ISTITUTO DI BIOSCIENZE  
E BIORISORSE (IBBR)



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

**BIO**  
DIPARTIMENTO DI  
BIOLOGIA



Collegamento per seguire l'evento tramite la  
piattaforma Google Meet :  
<https://meet.google.com/ccv-mgun-wtr>

**Figura 5.** Locandina evento di disseminazione.



**Figura 6.** Alcuni momenti dell'Evento Conclusivo

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. Riccardi C., Passeri I., Cangioli L., Fagorzi C., Mengoni A., Fondi M. (2023) Crossing bacterial genomic features and methylation patterns with MeStudio: an epigenomic analysis tool. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1): 159
2. Fagorzi C, Passeri I, Cangioli L, Vaccaro F, Mengoni A. (2023) When biodiversity preservation meets biotechnology: the challenge of developing synthetic microbiota for resilient sustainable crop production. *J Sustain Agric Environ*. 2(1): 5-15.

Nel periodo in considerazione si sono svolte tre tesi di laurea in Biotecnologie presso l'Università di Firenze.

Firenze, 20/06/2023

Il coordinatore del progetto  
Prof. Alessio Mengoni