



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

## **Relazione tecnico-scientifica 4° 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 .....	6
Azioni di disseminazione .....	7
Commenti finali.....	7

### **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 quarto semestre di progetto

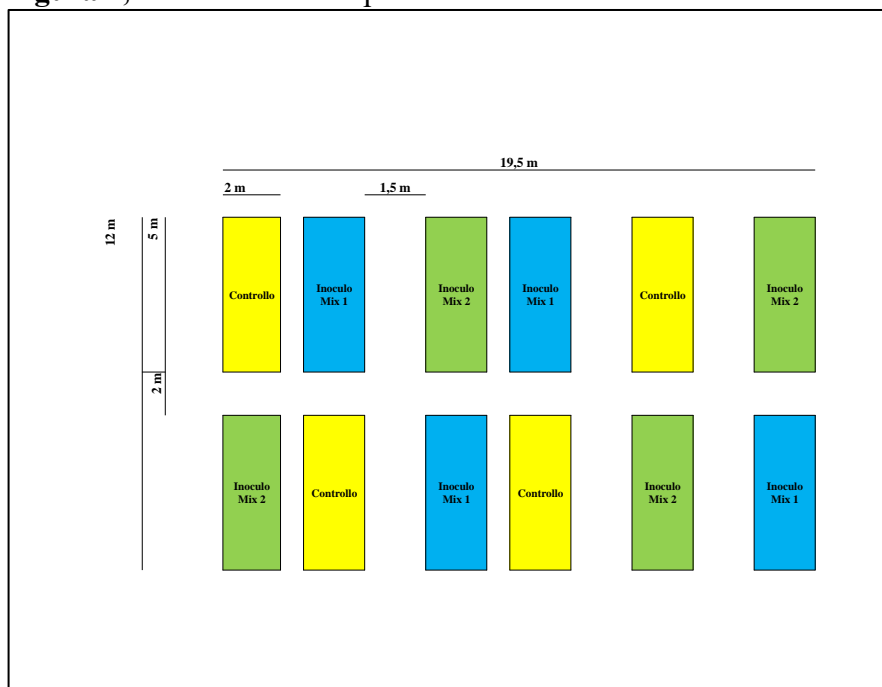
### WP2 Efficacia dei consorzi

In questo semestre di attività sono state effettuate 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

Le prove di semina 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 <sup>4</sup> batteri/mL)	BL225C (10 <sup>4</sup> batteri/mL)
BDA62-2 (10 <sup>6</sup> batteri/mL)	BDA59-3 (10 <sup>6</sup> batteri/mL)
BDA137-13 (10 <sup>6</sup> batteri/mL)	BDA62-2 (10 <sup>6</sup> batteri/mL)
	BDA62-3 (10 <sup>6</sup> batteri/mL)
	BDA134-6 (10 <sup>6</sup> batteri/mL)
	BDA137-13 (10 <sup>6</sup> batteri/mL)
	RCA24 (10 <sup>6</sup> batteri/mL)
	RCA25 (10 <sup>6</sup> batteri/mL)

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

Ceppo	Pianta ospite	Tratto PGP
<i>Sinorhizobium meliloti</i> BL225C	<i>Medicago sativa</i>	Azoto fissazione
<i>Enterobacter cloacae</i> RCA24	<i>Oryza sativa</i> L, cv, V1	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
<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,

Per ciascun trattamento sono stati utilizzati 120 g di medica varietà GEA (densità di semina 30 kg/ha), La semina è stata effettuata manualmente con metodica a spaglio ed i semi sono stati poi ricoperti con rastrello, Per evitare contaminazioni è stata effettuata la semina sulle 4 parcelle dello stesso trattamento e prima di passare al trattamento successivo si è proceduto alla sanificazione delle attrezzature utilizzate, Prima dell'impianto sono stati effettuati 4 carotaggi prelevando campioni nello strato 0-30 cm, I 12 campioni sono stati essiccati all'aria e, previa setacciatura a 2 mm, sono stati sottoposti ad una serie di analisi chimico-fisiche (tessitura, pH, contenuto in sostanza organica, in azoto totale, capacità di scambio cationico, contenuto di calcare, conduttività elettrica e costanti idrologiche) i cui risultati sono riportati nella Tabella 3.

**Tabella 3, Analisi chimico-fisica dei suoli**

Analisi	Azienda	Azienda	Azienda Leone
Argilla %	18,71	26,29	38,14
Limo %	16,71	12,21	21,83
Sabbia %	64,58	61,50	40,04
Capacità di scambio cationico (mEq)	25,96	31,76	35,05
pH (1:5 in acqua)	6,30	6,18	7,52
Conducibilità (mS m <sup>-1</sup> ) (EC 1:5 in acqua)	0,06	0,04	0,11
% Calcare totale	0,89	0,82	0,84
% Sostanza Organica	3,88	2,41	3,89
% TOC	2,3	1,4	2,3
% Azoto totale	1,65	0,98	1,38
Rapporto C/N	14,0	14,4	16,5
Fosforo totale (mg kg <sup>-1</sup> ) (Olsen)	13,03	17,43	24,72

### Azione 3.1 Coordinamento

E' stato organizzato un meeting (in modalità a distanza sulla piattaforma GMeet) a gennaio 2021 e Giugno 2021.



Inoltre, 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

MICRO4Legumes, tramite le Dott.sse Lisa Cangioli e Camilla Fagorzi e il coordinatore ha partecipato agli eventi promossi dal Centro OpenLab dell'Università degli Studi di Firenze in relazione alle manifestazioni **Bright – Notte della Ricerca 2021** e **ScienzEstate 2021**. Inoltre, la Dott.ssa **Camilla Fagorzi** ha tenuto uno spettacolo teatrale presso il Teatro alla Pergola di Firenze nell'ambito del ciclo di eventi "**Mappe di un Mondo Nuovo**". All'interno del progetto si sono svolte due tesi di laurea in Biotecnologie e in Biotecnologie Molecolari.

## Commenti finali

Come relazione in precedenza le attività previste hanno avuto uno slittamento a seguito nell'attuazione degli obiettivi delle azioni del WP2 di circa 6 mesi.

Firenze, 10/01/2022

Il coordinatore del progetto  
Prof. Alessio Mengoni