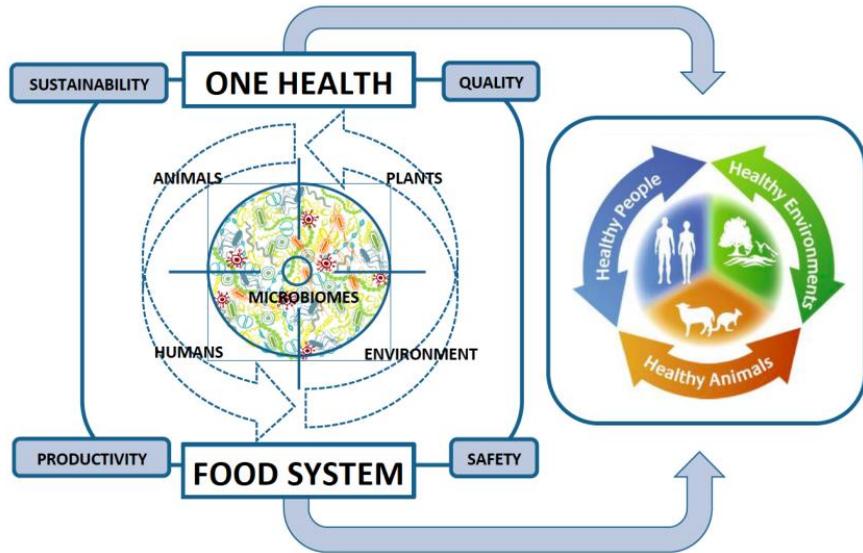


Vittoria Catara

## **Biostimolazione, biofertilizzazione, biocontrollo: Batteri benefici polifunzionali associati alla rizosfera del pomodoro**

Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione e Ambiente, Università di Catania.

# Microbioma e salute delle piante

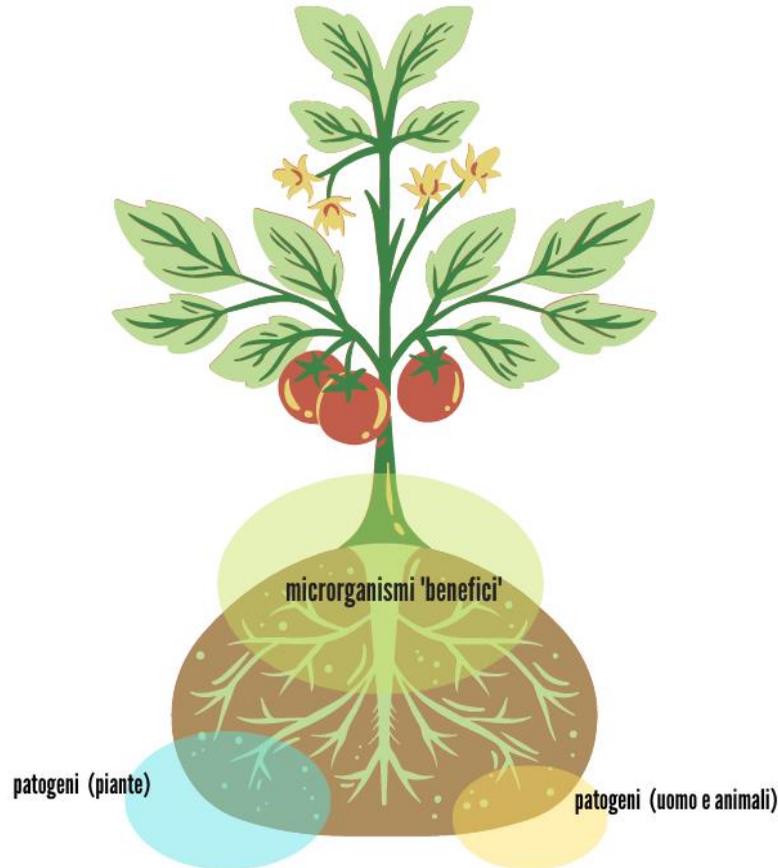


Il microbioma occupa una posizione centrale nel quadro «One Health» che si avvicina alla salute umana, animale e vegetale da una nuova prospettiva integrata

*Presidenza del Consiglio dei Ministri Comitato Nazionale per la Biosicurezza, le Biotecnologie e le Scienze della Vita, 2019*

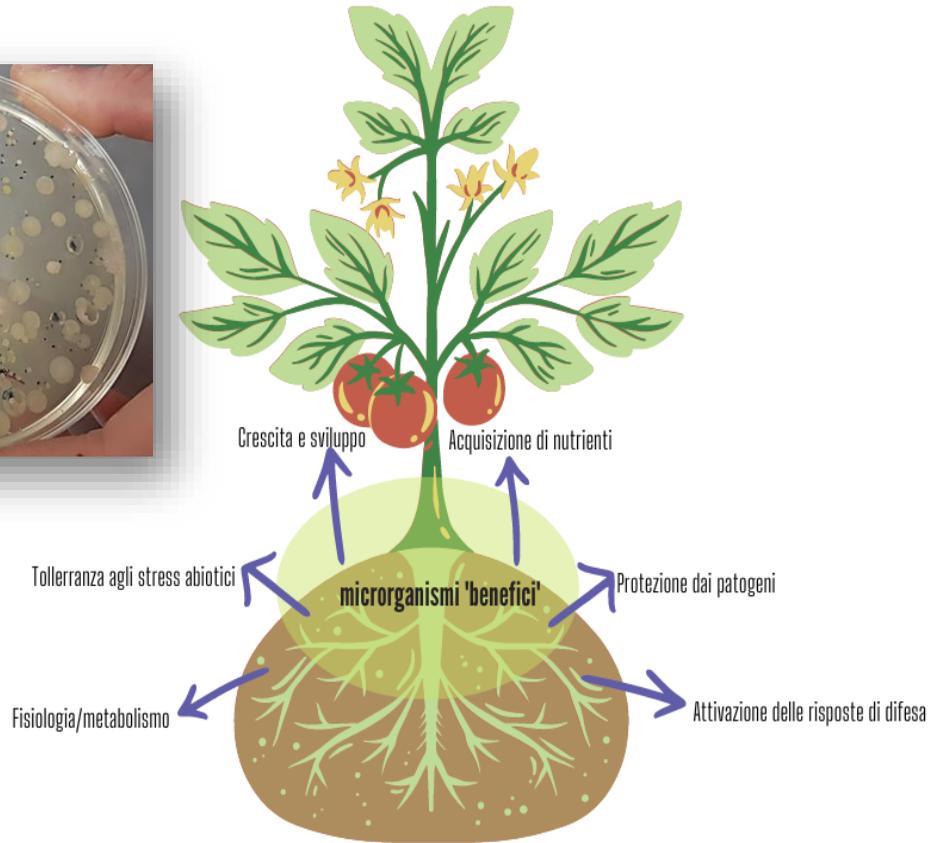
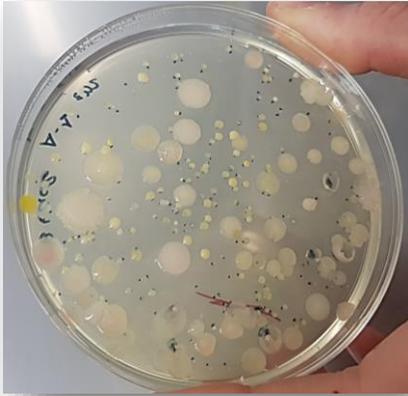
**microbioma** <-bi-ò-> s. m. – L'insieme dei microrganismi, dei loro genomi e delle interazioni ambientali che questi stabiliscono in un dato ambiente

# Microbioma della rizosfera



Il suolo è un pilastro del concetto di 'one health'. I suoli servono come sorgente e serbatoio di agenti patogeni, microrganismi benefici e della diversità microbica complessiva in una vasta gamma di organismi ed ecosistemi.

# Microrganismi benefici

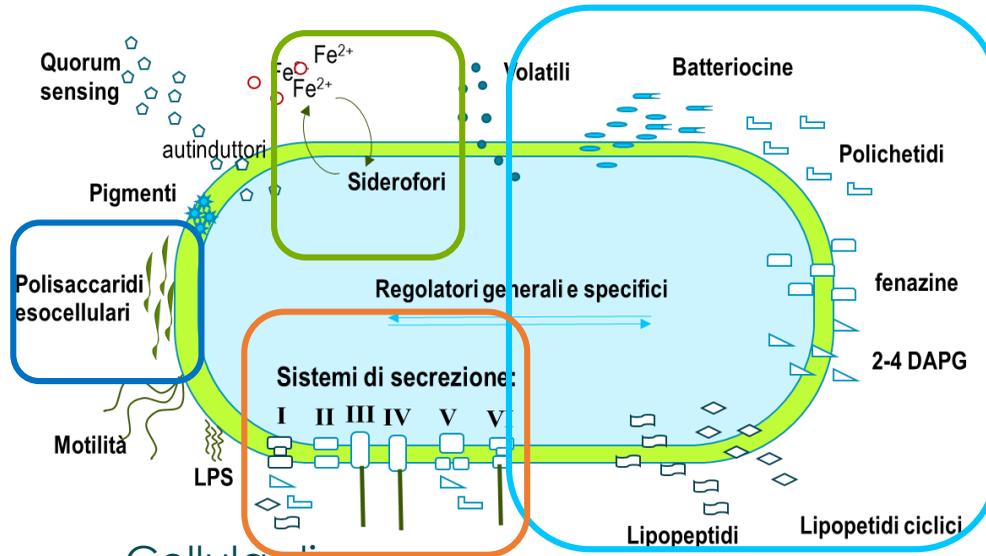


Possono interagire con la pianta in modo: i) diretto, con la produzione di fitormoni ed il rifornimento di nutrienti poco disponibili; ii) indiretto, con un complesso di meccanismi che contrastano l'effetto negativo dei patogeni vegetali, soprattutto terricoli, mediante competizione per spazio e nutrienti, produzione di sostanze antibiotiche oppure, attraverso l'induzione dei meccanismi di resistenza della pianta.

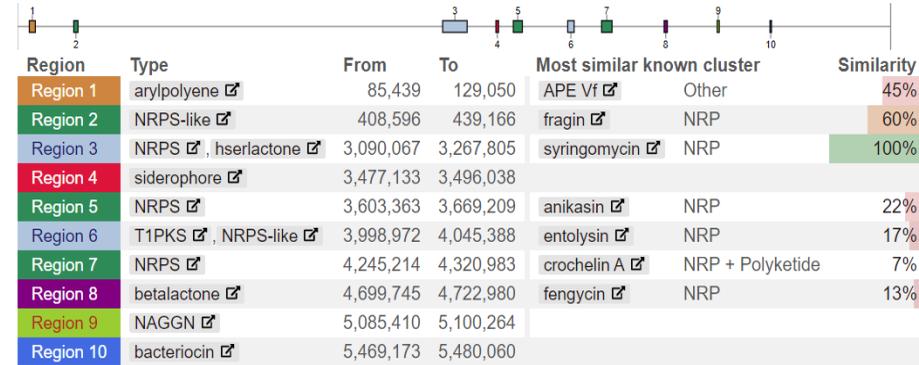
# I batteri 'benefici' associati alle piante: biostimolazione, biofertilizzazione o biocontrollo?



# I batteri 'benefici' associati alle piante: la risposta nel genoma



Cellula di una  
ipotetica  
*Pseudomonas*



Genome mining per la ricerca di putativi  
cluster biosintetici di metaboliti secondari

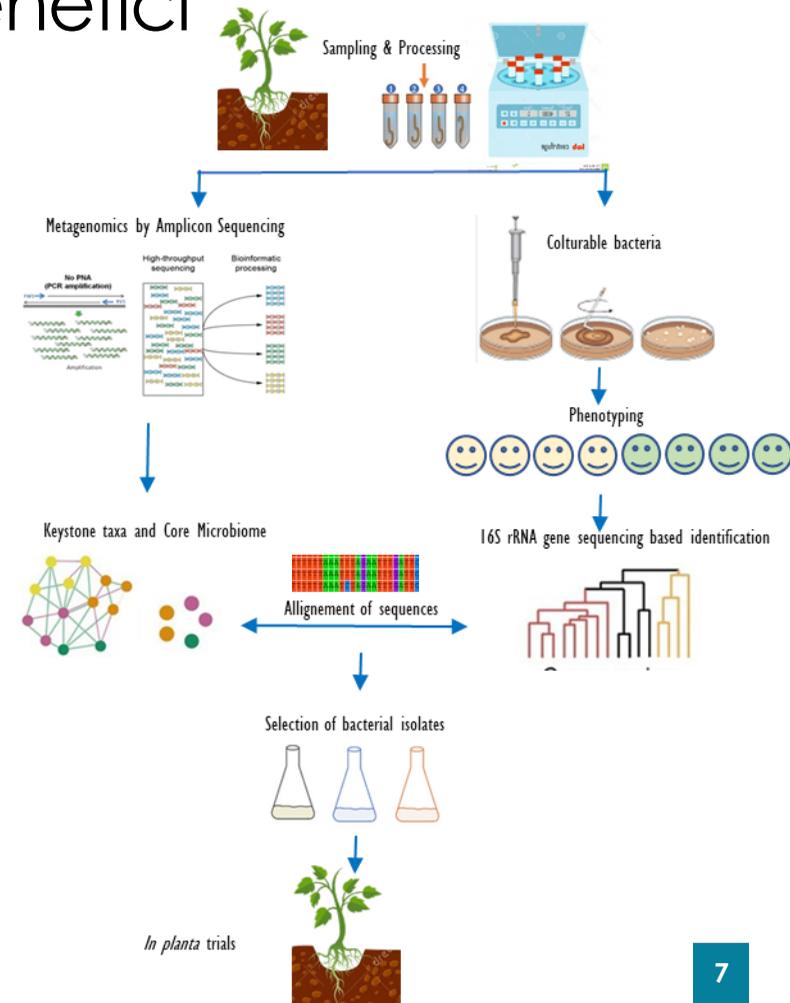
# la selezione di isolati batterici benefici

- Pomodoro in serra
- La rizosfera come hotspot
- Endofiti, probabilmente più persistenti
- Batteri associati alle piante la specializzazione del mio laboratorio

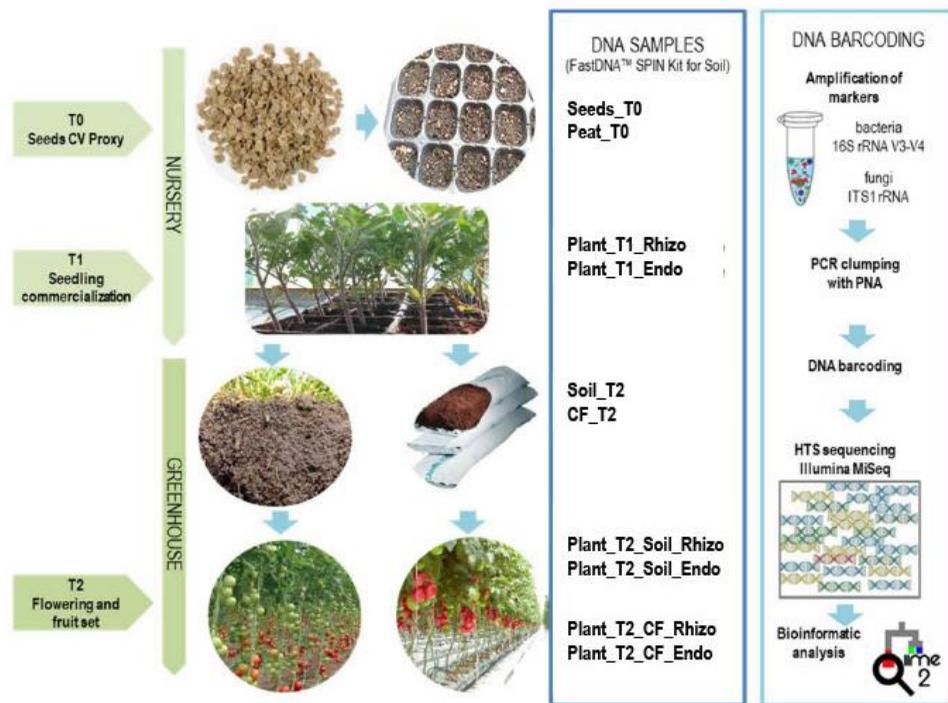
## GLOSSARIO

**Keystone taxa:** taxa altamente connessi, co-espressi nelle stesse condizioni, che esercitano una notevole influenza sulla struttura e sul funzionamento del microbioma indipendentemente dalla loro abbondanza.

**microbioma 'core' :** insieme di taxa microbici, o le caratteristiche genomiche e funzionali associati a tali taxa, che sono caratteristici di un ospite o di un ambiente di interesse. Più comunemente misurato come taxa microbico condiviso tra due o più campioni da un particolare ospite o ambiente.



# Microbioma associato alle radici del pomodoro: dal vivaio alla serra nel suolo e pomodoro coltivato senza suolo



Le analisi relative alla formazione del microbioma sono state eseguite su pomodoro cv Proxy in diversi momenti:

**in vivaio (T0)** semi e substrato a base di torba **(T1)** tomato seedlings ready for the commercialization

**in serra (T2)** alla fioritura e allegagione del primo palco dopo trapianto in suolo o in substrato a base di fibra di cocco

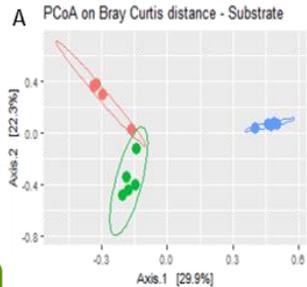
Anzalone et al. *Front Plant Sci.* **2021** 12:637582. doi: 10.3389/fpls.2021.637582.

Anzalone et al. *J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 8820. <https://doi.org/10.3390/ijms23158820>

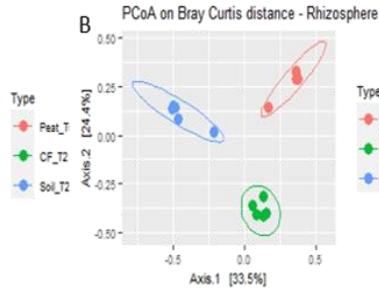
# Diversity of microbial communities

## BACTERIA

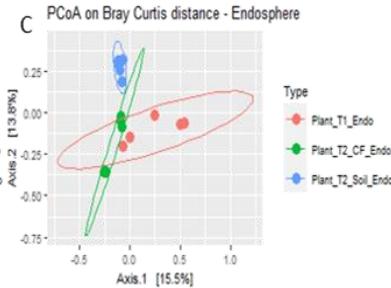
### Substrate



### Rhizosphere

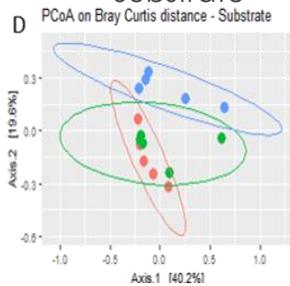


### Endosphere

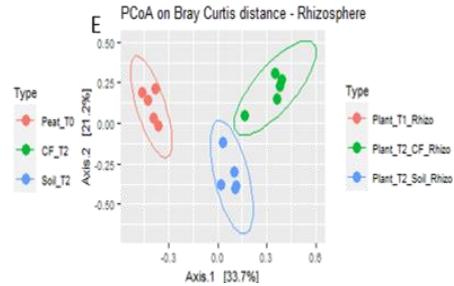


## FUNGI

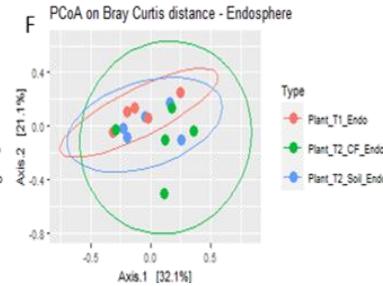
### Substrate



### Rhizosphere



### Endosphere

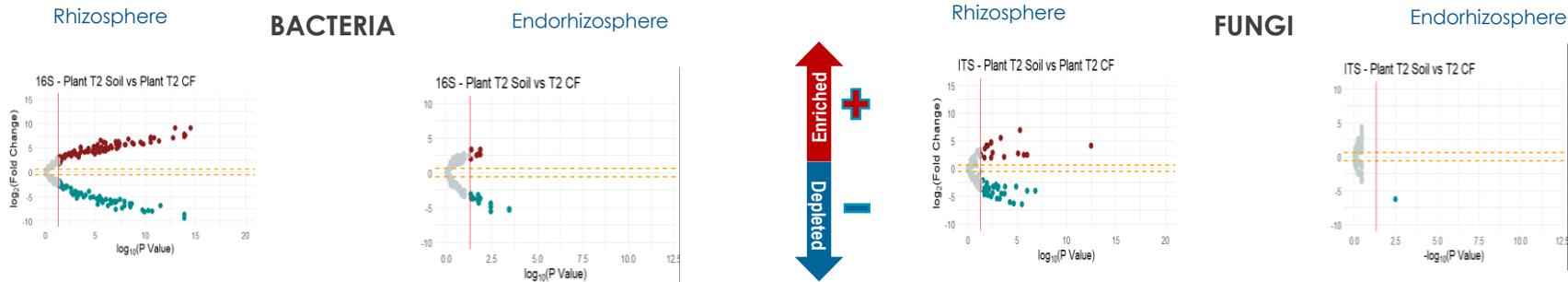


Le comunità microbiche della Rizosfera nei substrati di crescita (torba, fibra di cocco e suolo agrario) hanno mostrato chiaramente delle caratteristiche differenti. Cambiano drasticamente dopo il trapianto nelle due condizioni di crescita in serra.

Caratteristiche differenti anche tra comunità batteriche della endorizosfera in suolo e fuori suolo

**Figure 5.** PCoA of bacterial (A–C); and fungal communities (D–F) based on amplicon sequencing data. Sample clustering was based on the Bray–Curtis dissimilarity matrix. Each point on the graph corresponds to a single sample (biological replication).

# Il pomodoro coltivato in suolo e in substrato attraggono comunità di microrganismi diverse



**Figure 6.** Volcano plots showing differentially abundant bacteria and fungi in rhizosphere (A,C) and endorhizosphere (B,D), respectively

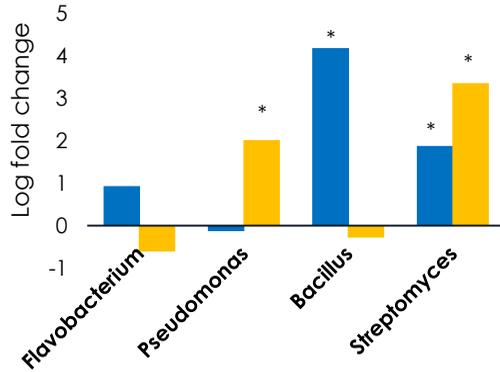
L'abbondanza differenziale di comunità batteriche di piante coltivate nel suolo agrario rispetto alla fibra di cocco è in accordo con l'analisi della diversità beta.



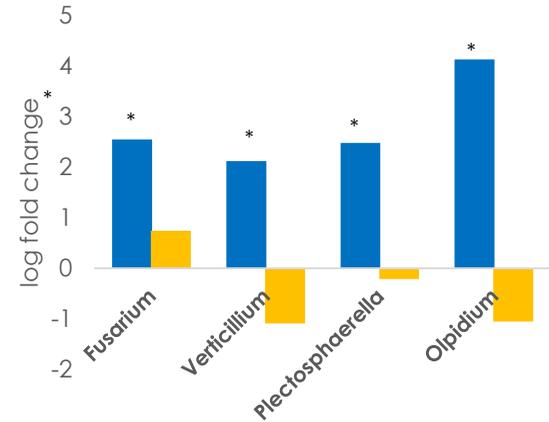
L'arricchimento e la diminuzione dei generi batterici nelle due circostanze erano rilevanti.

Anzalone et al *J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 8820. <https://doi.org/10.3390/ijms23158820>

# Il pomodoro coltivato in suolo e in substrato attraggono comunità di microrganismi diverse



Differentially abundant taxa of the bacterial (A) and fungal (B) communities in the endorhizosphere and rhizosphere of tomatoes grown in agricultural soil versus those grown in soilless cultivation.



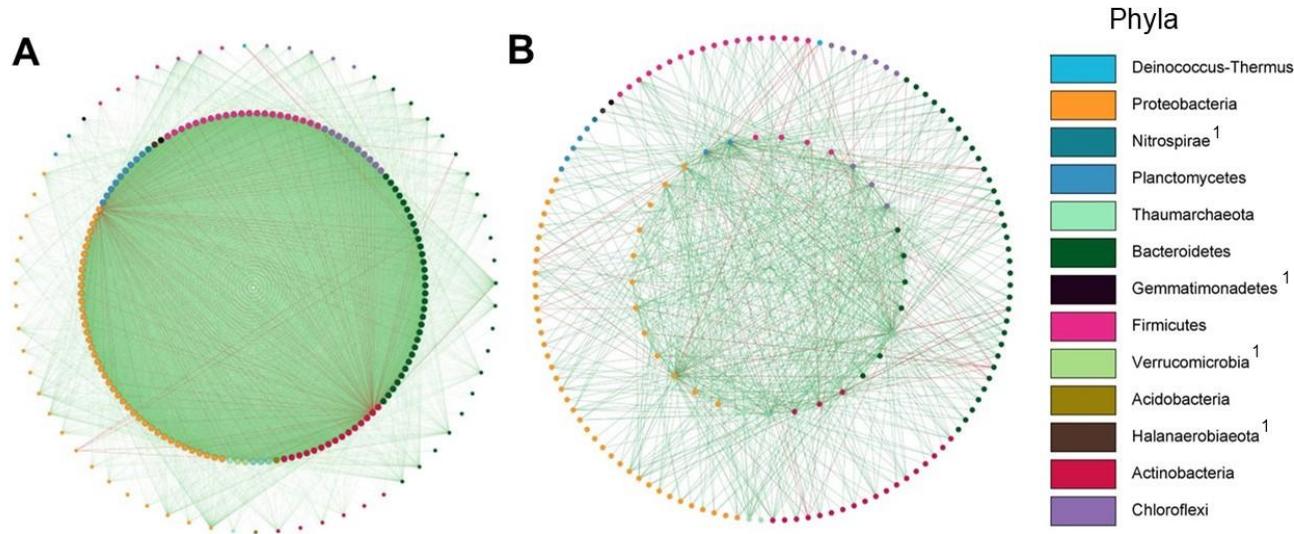
L'analisi differenziale dei generi batterici più rappresentativi (ca. 50%) ha mostrato che la rizosfera e/o l'endorizosfera erano significativamente arricchite in generi batterici rilevanti per il biocontrollo.



la rizosfera di pomodoro coltivato in terreno agricolo si sono arricchiti in generi fungini putativamente fitopatogeni.

# Analisi delle Network e Keystone Taxa Associati con le comunità batteriche

Anzalone et al *J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8820. <https://doi.org/10.3390/ijms23158820>



Co-occurrence network analysis: keystone bacterial taxa of the root environment of tomato plants grown in agricultural soil (**A**) and in coconut fiber substrate (**B**). The nodes represent OTUs and the edges represent correlations between and within the keystone taxa nodes and the peripheral taxa nodes. Keystone taxa nodes are depicted as internal to the external peripheral nodes. A connection indicates a statistically significant correlation (FDR adjusted p value < 0.05) with positive correlation values >0.6 (green edges) or < 0.6 (red edges). Each node color represents an OTU at phylum level. <sup>1</sup> Phyla present only in the soil system as keystone taxa.

# Identificazione di batteri endofiti coltivabili

68% Siderophore production

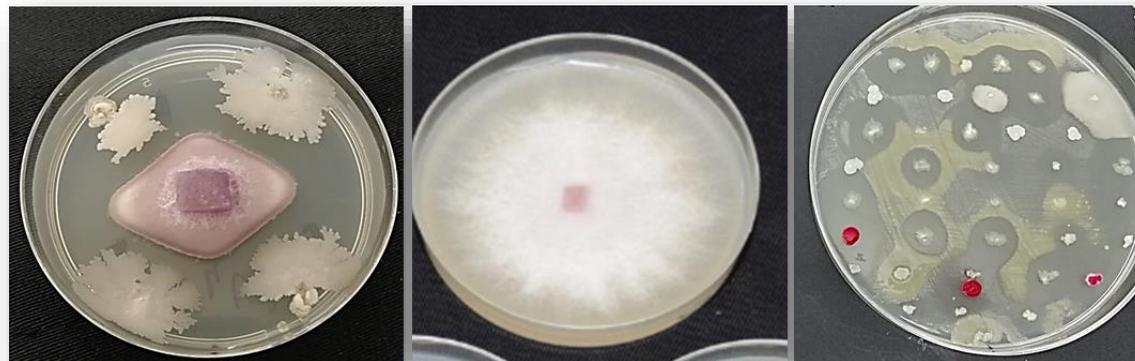
85% Salt tolerance

57% Phosphate solubilization

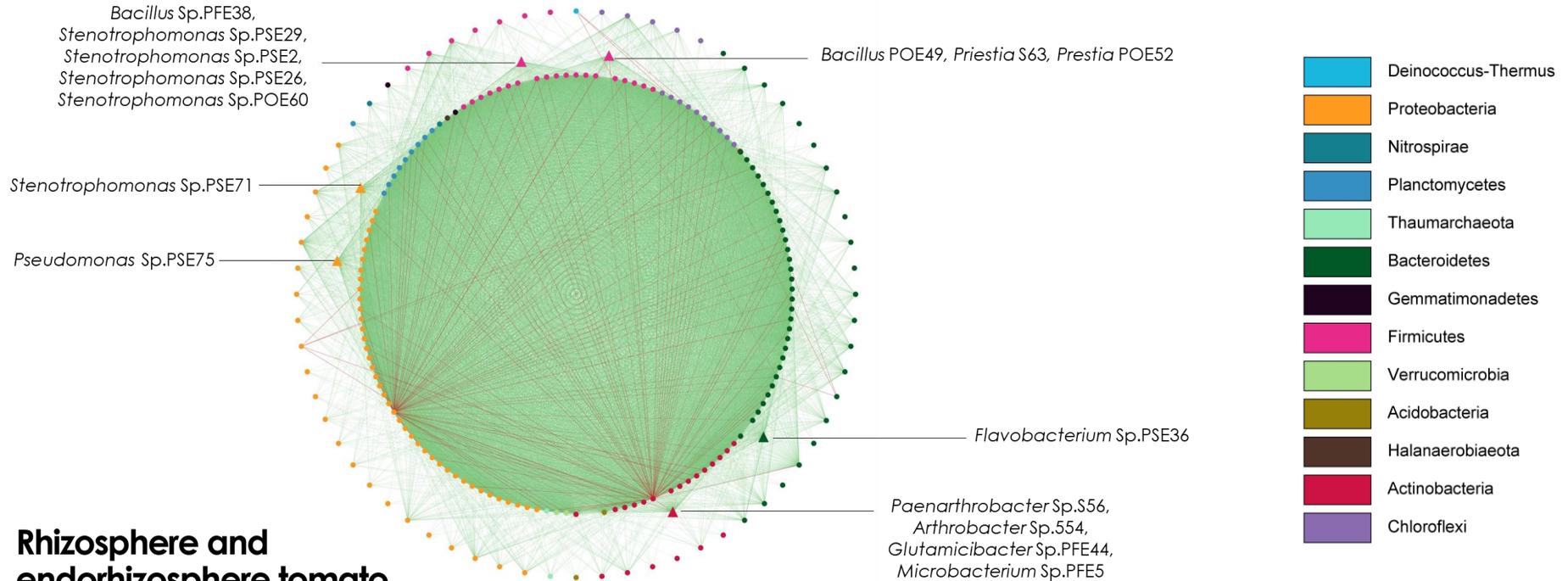
31.7% ACC deaminase production

2.43% HCN production

18



# Batteri corrispondenti: coltivabili e Keystone



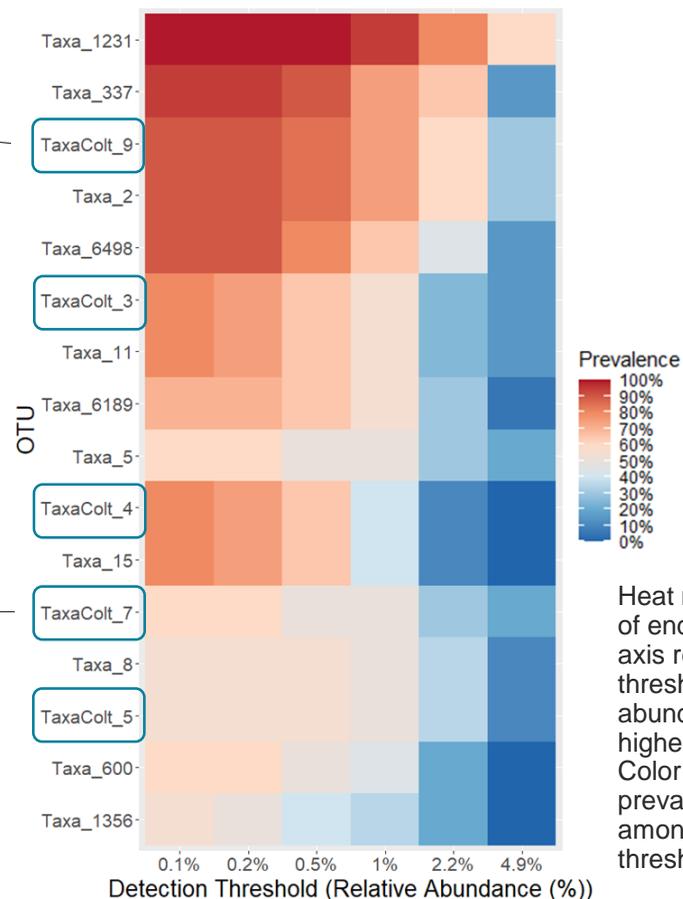
## Rhizosphere and endorhizosphere tomato plants in agricultural soil

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) command-line was used to perform the alignment between the 94 culturable bacteria sequences and each representative sequences of the bacterial OTUs in our data set.

# Batteri corrispondenti: coltivabili e endofitoma 'core

Bacillus\_Sp.PFE3, Bacillus\_Sp.POE68, Bacillus\_Sp.PSE32,  
 Bacillus\_Sp.PFE47, Bacillus\_Sp.PFE40, Bacillus\_Sp.PFE39,  
 Bacillus\_Sp.PFE11, Bacillus\_Sp.PFE7, Bacillus\_Sp.S51,  
 Bacillus\_Sp.POE53, Bacillus\_Sp.PSE35, Bacillus\_Sp.POE51,  
 Bacillus\_Sp.S61, Bacillus\_Sp.S60, Bacillus\_Sp.S59,  
 Bacillus\_Sp.S57, Bacillus\_Sp.PSE31B, Bacillus\_Sp.PFE9,  
 Bacillus\_Sp.PFE52, Bacillus\_Sp.PFE45, Bacillus\_Sp.PFE43,  
 Bacillus\_Sp.PFE42

Pseudomonas\_Sp.PSE78, Pseudomonas\_Sp.PSE76,  
 Pseudomonas\_Sp.PSE30, Pseudomonas\_Sp.POE69.2,  
 Pseudomonas\_Sp.POE72, Pseudomonas\_Sp.POE71,  
 Pseudomonas\_Sp.POE70, Pseudomonas\_Sp.POE69,  
 Pseudomonas\_Sp.POE65, Pseudomonas\_Sp.POE64,  
 Pseudomonas\_Sp.POE63, Pseudomonas\_Sp.POE59,  
 Pseudomonas\_Sp.POE58, Pseudomonas\_Sp.POE55,  
 Pseudomonas\_Sp.POE46, Pseudomonas\_Sp.POE45,  
 Pseudomonas\_Sp.PFE51, Pseudomonas\_Sp.PFE50,  
 Pseudomonas\_Sp.PFE49, Pseudomonas\_Sp.POE49,  
 Pseudomonas\_Sp.POE44, Pseudomonas\_Sp.POE54,  
 Pseudomonas\_Sp.POE78A, Pseudomonas\_Sp.POE79,  
 Pseudomonas\_Sp.POE75, Pseudomonas\_Sp.POE62,  
 Pseudomonas\_Sp.POE73, Pseudomonas\_Sp.POE81,  
 Pseudomonas\_Sp.PSE77, Pseudomonas\_Sp.POE78



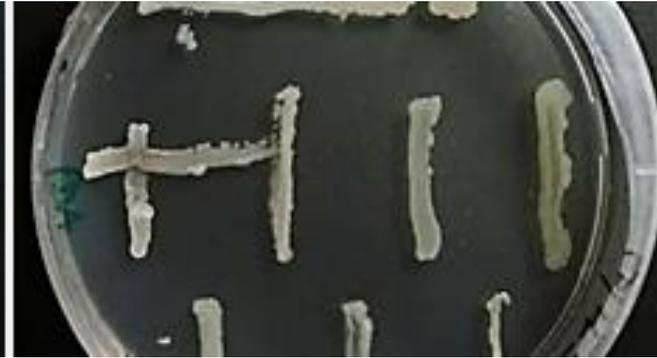
# Bacterial consortia



**MIX 1**



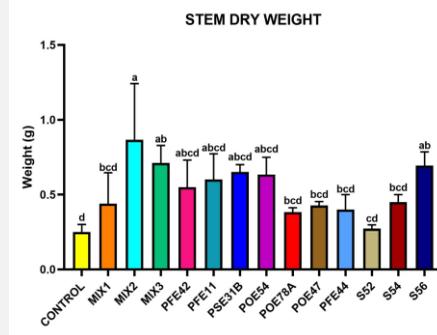
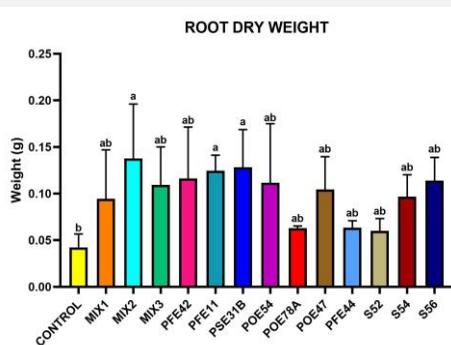
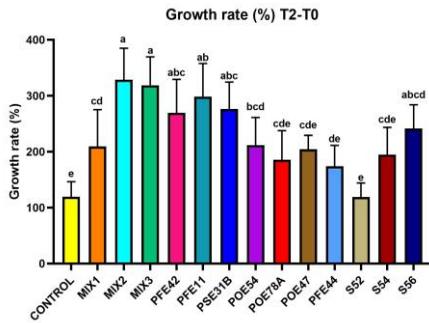
**MIX 2**



**MIX 3**

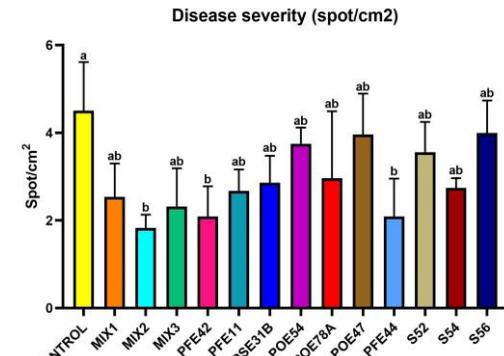
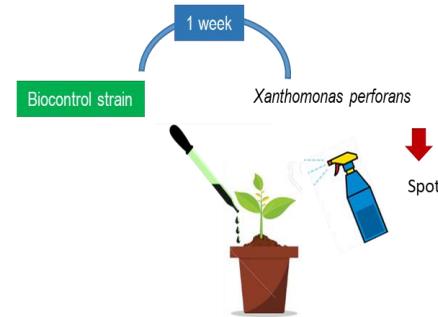
# Plant growth promotion

## Soil drenching



Growth rate (%) of tomato plants two weeks after the bacterial treatment (A). Root (B) and stem (C) dry weight of tomato plants four weeks after the treatment. Data represent means and standard errors of three replicates. Means that do not share a letter are significantly different according to Tukey's test at  $p < 0.05$ .

# Resistance induction



Disease severity of bacterial spot disease expressed as number of spots per cm<sup>2</sup>. Data represent means and standard errors of three replicates. Means that do not share a letter are significantly different according to Tukey's test at  $p < 0.05$ .

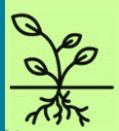
# Conclusioni

Pomodoro come coltura modello e la comunità microbica associata alla rizosfera è stata studiata per fornire un quadro dei meccanismi e delle complessità che si verificano in questa nicchia.

La metagenomica ci ha permesso di sviluppare un modello per ulteriore studio dell'effetto dell'introduzione dei batteri utili nelle colture del suolo e senza suolo.



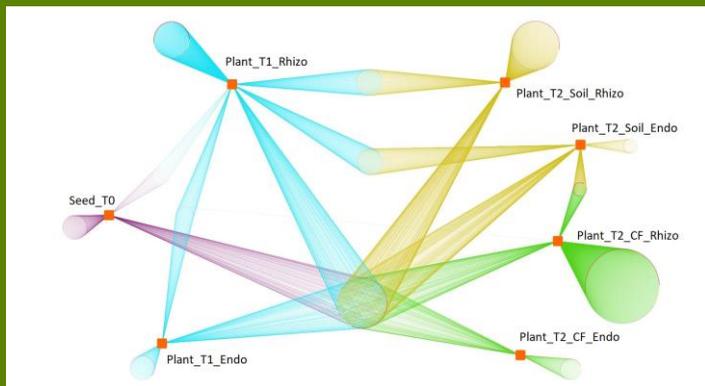
La collezione microbica istituita potrebbe fornire la base per il futuro sviluppo di bio-inoculanti utilizzando ceppi singoli o comunità microbiche sintetiche.



Gli isolati batterici sono stati ottenuti dalla stessa nicchia di patogeni, quindi è ipotizzabile che possano colonizzare le radici del pomodoro, anche se la colonizzazione endofita è ancora da dimostrare.



Gli studi in corso dimostreranno il successo di questo approccio e se gli isolati potrebbero essere utilizzati per inoculare piantine in vivaio, fornendo così aree di coltivazione intensiva di pomodoro con piante protette.



# Collaboratori Di3A



Alice Anzalone, PhD

Selection of endophytic bacterial communities, genes and secondary metabolites for the sustainable cultivation of tomatoes in greenhouse

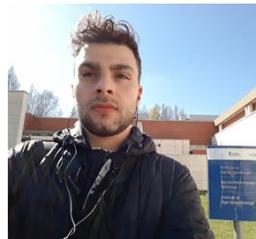
Biotechnology- PON 'Dottorati industriali'



Daniele Nicotra, PhD student

Microbiome and plant health, beneficial bacteria for the eco-sustainable protection of tomato from stresses

Biotechnology- PON 'Dottorati green'



Giulio Dimaria, PhD student

The *Pseudomonas fluorescens*: complex as resource for plant pathogens control.

Biotechnology



Alexandros Mosca; PhD student

Development of Tools and pipeline for microbiome analysis

Complex Systems for Physical, Socio-economic and Life Sciences



## Progetti finanziati

