



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea: Scienze Biologiche

Approcci per aumentare l'efficienza nell'uso dell'azoto nell'agricoltura

Tesi di laurea di: Teresa Emma Cutrona

Docente Referente: Prof. Caterina Gerotto

Sessione di laurea: Luglio 2023 - Estiva

A.A. 2022-2023

Indice

- Cos'è la sicurezza alimentare e quale importanza riveste?
- Che problemi comporta l'eccessivo utilizzo di azoto?
- Possibili soluzioni per un utilizzo più efficiente dell'azoto nell'agricoltura
 - ◆ Azioni chiave nella gestione dell'azoto
 - ◆ Inoculazione microbica
 - ◆ Progressi nel campo dell'inoculazione microbica
 - Comunità microbiche sintetiche (SynCom)
 - Programma ssCRISPR

Riassunto

La sicurezza alimentare è un problema attuale e lo sarà in misura sempre maggiore nel prossimo futuro. Un delle maniere per incidere sul tema è lo sviluppo di metodi più efficienti di gestire l'azoto nell'agricoltura. Sono state proposte varie tecniche a questo scopo.

Si possono implementare **pratiche chiave di gestione dell'azoto**, azioni che possono facilmente essere implementate dai contadini, come per esempio l'inclusione di legumi insieme alle coltivazioni, o l'implementazione di metodi di irrigazione adatti.

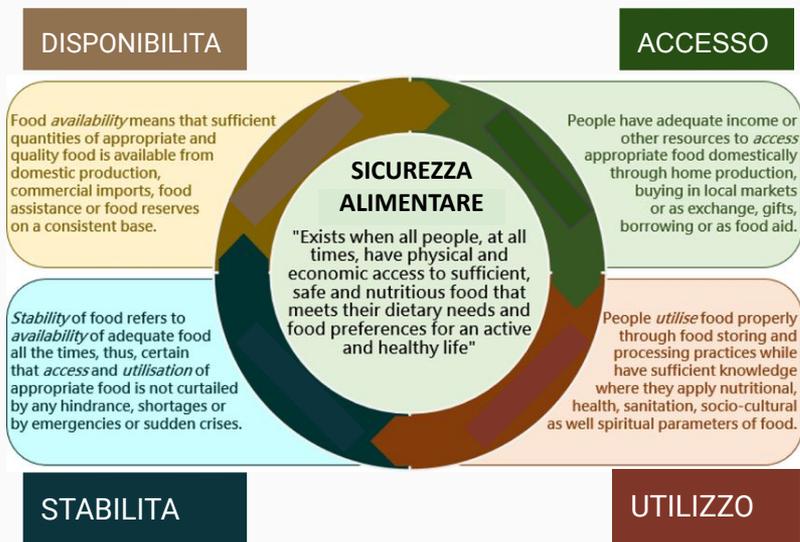
Successivamente, si può anche pensare all'**inoculazione microbica** come alternativa ai fertilizzanti azotati, una tecnica che promette di essere una fonte di azoto sostenibile.

Progressi in quest'area hanno permesso lo sviluppo di **Comunità Microbiche Sintetiche (SynCom)**, senza i tipici costi associati agli inoculanti microbici tradizionali. Inoltre, l'integrazione dell'approccio SynCom con strumenti quali **ssCRISPR** hanno la potenzialità di rendere la tecnica più efficace.

Certamente ci sono da tenere in considerazione anche altre pratiche. Le opzioni variano dalle tecnologie più avanzate che sono usate per identificare lo stress delle piante e tramite l'ingegneria genetica generarne di più resilienti, fino a discussioni più generali che integrano varie discipline e coinvolgono vari stakeholders.

Il perché: Cos'è la sicurezza alimentare e quale importanza riveste?

2
ZERO
HUNGER

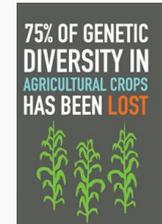
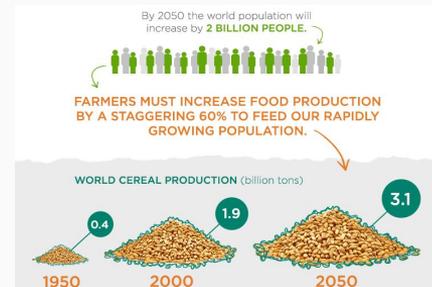


Come sfida nel 21esimo secolo:

Principali minacce alla sicurezza alimentare:

- Aumento della domanda di cibo, dovuto alla crescita della popolazione mondiale
- Aumento della scarsità di acqua e terreno coltivabile
- Spreco alimentare
- Perdita di diversità di specie di piante agricole

Come si possono minimizzare queste minacce alla sicurezza alimentare:
Fare un uso più efficiente di azoto nell'agricoltura

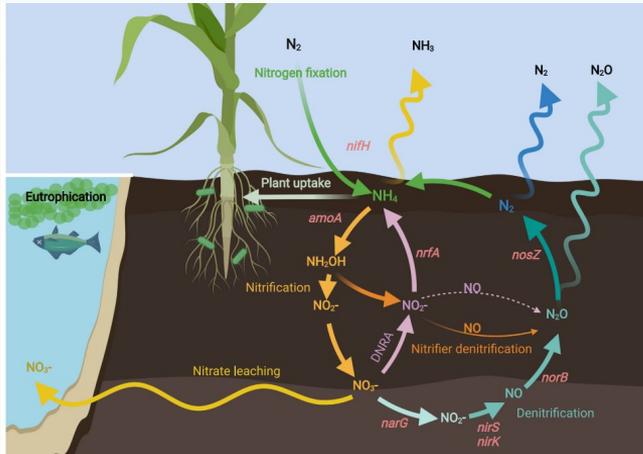


Il perché: Quali problemi comporta l'eccessivo utilizzo di azoto nell'ambiente?

Qual è l'importanza dell'azoto nella crescita di una pianta?

Nello specifico, stimola:

- L'accrescimento vegetale
- La radicazione
- La formazione della clorofilla
- La capacità fotosintetica delle piante



Uso eccessivo di fertilizzante azotato e conseguenze ecologiche derivanti

Più della metà degli input aggiuntivi di azoto nell'ambiente sono persi all'aria e all'acqua, causando:

- Inquinamento atmosferico e acqueo (eutrofizzazione) severo
- Acidificazione del terreno
- Cambiamento climatico
- Riduzione dell'ozono nella stratosfera
- Perdita di biodiversità

Possibili soluzioni - Attuali e per il futuro

Azioni chiave nella gestione dell'azoto

Inoculazione microbica

Progressi nel campo dell'inoculazione microbica

- Comunità microbiche sintetiche (SynCom)
- Programma ssCRISPR

Inoculazione microbica: Microorganismi fissatori d'azoto (inoculanti microbici) come alternativa ai fertilizzanti sintetici

Inoculanti microbici

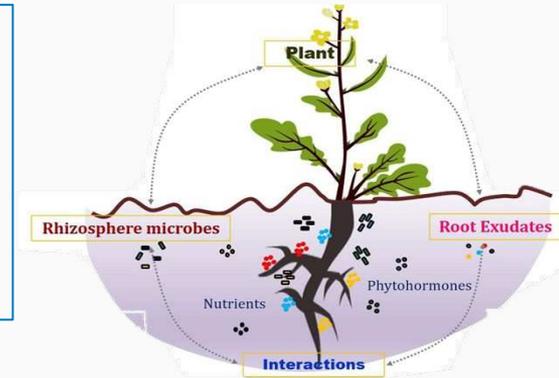
Classe di biostimolanti, applicati ai raccolti per stimolare processi naturali che danno un beneficio alla pianta

Includono biofertilizzanti

Influiscono sul ciclo dell'azoto

Il loro potenziale di utilizzo come un'alternativa ai fertilizzanti sintetici sta accelerando rapidamente

Promettono di essere una fonte di azoto sostenibile ed economicamente vantaggiosa



Approcci sperimentali attuali:

Fissazione d'azoto simbiotica (BNF) in piante non-leguminose (Guo et al., 2023)

- Coltivazioni di cereali auto-fertilizzanti di **prima generazione**: aumentare l'associazione di piante con batteri fissatori d'azoto
- Coltivazioni di cereali auto-fertilizzanti di **seconda generazione**: trasferire fissatori d'azoto simbiotici in coltivazioni di cereali
- Coltivazioni di cereali auto-fertilizzanti di **terza generazione**: progettare fissatori d'azoto autonomi in coltivazioni di cereali

Utilizzo di specie fissatrici di azoto per inoculare piante di grano (Hamani et al., 2023)

- Gli inoculanti non solo hanno ridotto l'uso di azoto sintetico, ma hanno anche aumentato PGP quali peso secco di radici e germoglio del 9.4% e 21.3% rispettivamente.
- L'impatto della pianta sul riscaldamento globale si è ridotto del 60%, dovuto ad una diminuzione nell'inquinamento di N₂O e CO₂.

Ultimamente, microorganismi con caratteristiche di promozione della crescita delle piante (PGP) sono stati isolati e usati come inoculanti microbici per migliorare la produzione del raccolto.

Benefici: gli inoculanti microbici assistono nella crescita del raccolto	Costi: l'inoculazione microbica può fallire nel tentativo di raggiungere buoni risultati
Migliorando l'acquisizione di nutrienti tramite la fissazione dell'azoto o la solubilizzazione del fosforo	Perché le associazioni pianta-microorganismo non sono state considerate in relazione a varie condizioni di stress biotico e abiotico
Producendo sostanze di promozione della crescita delle piante (PGP)	A volte non sono in grado di competere con microorganismi del suolo autoctoni, in diverse condizioni ambientali

Quindi... è ora di sviluppare consorzi di microorganismi con comportamenti robusti, stabili, e prevedibili.

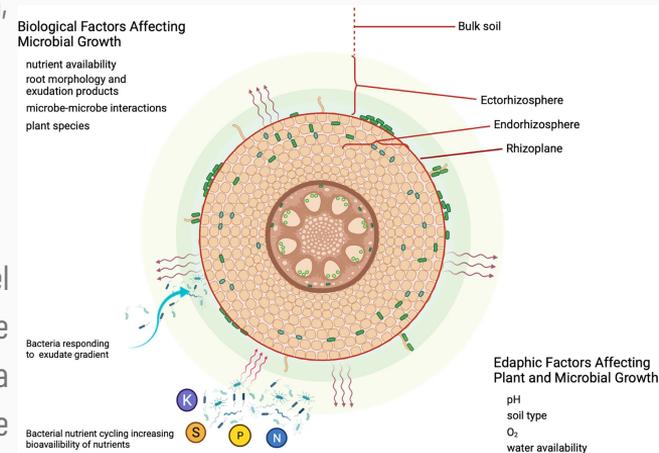
Comunità Microbiche Sintetiche (SynCom)

SynComs: costruiti tramite la co-coltura di molteplici taxa in condizioni ben definite, per imitare la struttura e funzione di un microbiota. Permettono un aumento di stabilità e prevedibilità della comunità microbica associata ad una pianta, attraverso interazioni sinergistiche tra i membri.

I fattori che influenzano la composizione di comunità microbiche nell'ecosistema della pianta, soprattutto attraverso **esudati radicali** (metaboliti primari/secondari) includono:

- Interazioni pianta-microorganismo
- Interazioni microorganismo-microorganismo (sinergia o antagonismo)
- Fattori edafici

La composizione del microbiota della rizosfera è strutturata diversamente da quella del microbiota del resto del terreno. Questa differenza è catalizzata dalla pianta attraverso esudati radicali che attraggono specifici microorganismi alla rizosfera, contribuendo alla crescita e allo sviluppo della pianta. Infatti le piante modificano la loro rizosfera per attrarre organismi che hanno caratteristiche benefiche quali PGP, solubilizzazione di nutrienti, e inibizione della crescita di patogeni.



Attraverso la regolazione della composizione degli esudati radicali, la diversità microbica nell'ecosistema della pianta può essere alterata in maniera sostanziale.

Comunità Microbiche Sintetiche (SynCom): La strategia SynCom nell'agricoltura sostenibile

L'identificazione del **microbiota core** è necessaria per poter applicare l'approccio SynCom all'agricoltura

- Il microbiota core è composto da microorganismi reclutati da una pianta indipendentemente dall'ambiente in cui si trova. Contiene taxa microbici chiave che possiedono geni funzionali essenziali per la pianta ospite. Quando si fanno studi sulle comunità SynCom, queste possono essere formate concentrandosi sul microbiota core invece che sui microbioti nativi altamente complessi.

I microorganismi benefici vengono selezionati in base a screening in vitro per taxa specifici con caratteristiche PGP, con soltanto una valutazione limitata in condizioni ambientali controllate.

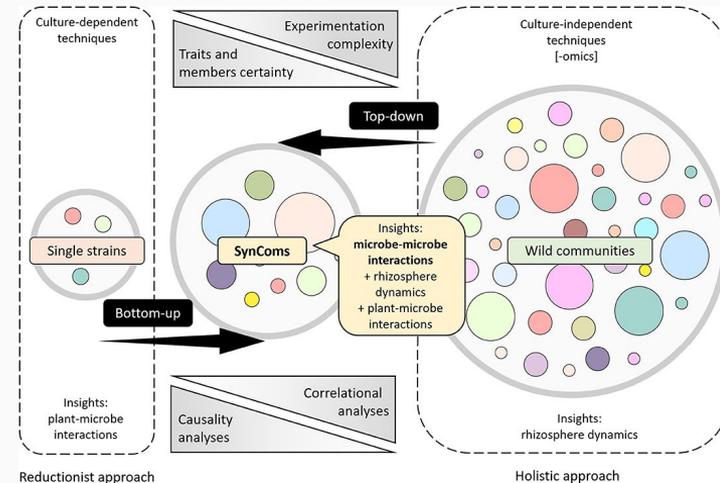
Un SynCom può essere un'alternativa importante per superare i problemi associati all'uso di inoculanti classici, infatti si possono creare diverse comunità microbiche che imitano in parte l'ambiente funzionale di quei microorganismi.

Un SynCom efficace può essere prodotto

- Identificando comunità funzionali attraverso un **approccio top-down**
- Poi applicando l'**approccio bottom-up** per studiare le interazioni tra i membri

3 passaggi:

- **Creare la migliore combinazione microbica per il consorzio microbico** - usando informazione genomica e profili di espressione genica
- **Screening per candidati microbici benefici in dataset genomici preesistenti**- usando strumenti computazionali
- **Costruzione del SynCom con un approccio bottom-up**- tramite addizione, eliminazione, o sostituzione di specie



Reductionist approach

Marín, Olga, et al. "From Microbial Dynamics to Functionality in the Rhizosphere: A Systematic Review of the Opportunities with Synthetic Microbial Communities." *Frontiers in Plant Science*, vol. 12, 2021, <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.650609>.

Comunità Microbiche Sintetiche (SynCom): I prossimi passi

Benefici



Miglioramento
della crescita
e della
produzione
della pianta



Eliminazione
di organismi
patogeni



Fornisce informazioni utili

Es: Studi su piante modello per capire interazioni
pianta-microorganismo usando SynComs

- Microorganismi associati alle radici del mais: dinamiche di colonizzazione delle radici, interazioni interspecie, ruolo di ogni membro nella comunità (Niu et al., 2017)
- Ruolo di metaboliti specifici nella colonizzazione da parte dei batteri nella rizosfera di *A. thaliana* (Voges et al., 2019)

Produttività della coltivazione e resa del raccolto

Es: Studio sull'inoculazione con un SynCom costruito da
microorganismi associati alla canna da zucchero (Armanhi et al., 2018)

- Ha aumentato la biomassa di piante di mais rispetto ai gruppi di controllo non inoculati
- Ha migliorato la tolleranza alla siccità e ridotto la perdita di resa del mais

Problemi da superare prima di poterle usare in larga scala

Disegnare SynCom con centinaia di microorganismi non è pratico.

La difficoltà di prevedere interazioni SynCom tra pianta ospite e microorganismi del terreno in ambienti naturali.

La difficoltà nel mantenere una stabilità a lungo termine del SynCom.

Comunità Microbiche Sintetiche (SynCom): I prossimi passi

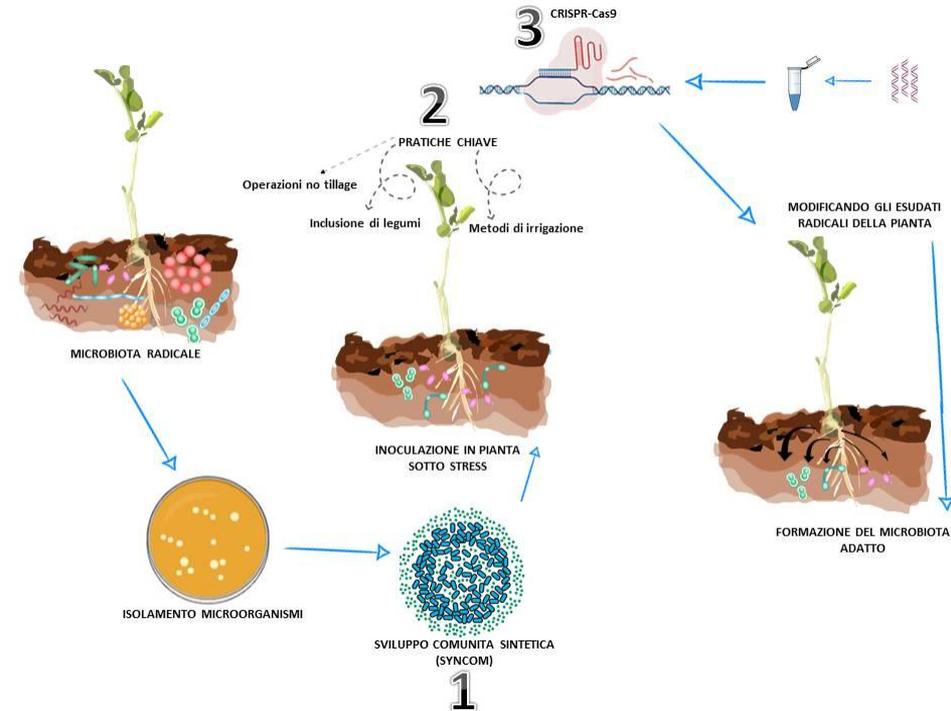
Integrazione con tecniche di CRISPR/Cas9

La strategia di inoculazione microbica può essere integrata con tecniche di biologia molecolare quali CRISPR-Cas9.

I sistemi CRISPR-Cas possono fornire opportunità per il riconoscimento di specie in comunità microbiche complesse, permettendo la selezione specifica di specie associative azoto-fissatrici che sopravviverebbero più a lungo se introdotte in un terreno diverso da quello nativo.

In uno studio, è stato sviluppato un programma, **ssCRISPR**, che progetta gRNA CRISPR specie-specifici. Per dimostrare la funzionalità di ssCRISPR, RNA guida progettati con ssCRISPR sono stati applicati a due funzioni:

- La **purificazione (isolazione)** di una singola specie
- E l'**eliminazione (rimozione)** di una singola specie
 - Da un consorzio microbico



Bibliografia

FAO. 2017. *The Future of Food and Agriculture: Trends and Challenges*. Rome.

Brink, Susanne C. "Food Security: Solutions Offered by Plant Science." *Trends in Plant Science*, vol. 28, no. 5, 2023, pp. 489–490, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2023.03.012>.

Gu, Baojing, et al. "Cost-Effective Mitigation of Nitrogen Pollution from Global Croplands." *Nature*, vol. 613, no. 7942, 2023, pp. 77–84, <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05481-8>.

Guo, Kaiyan, et al. "Biological Nitrogen Fixation in Cereal Crops: Progress, Strategies, and Perspectives." *Plant Communications*, vol. 4, no. 2, 2023, p. 100499, <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100499>.

Klimasmith, Isaac M., and Angela D. Kent. "Micromanaging the Nitrogen Cycle in Agroecosystems." *Trends in Microbiology*, vol. 30, no. 11, 2022, pp. 1045–1055, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.04.006>.

Hamani, Abdoul Kader, et al. "Optimized Application of Combined Nitrogen and Microbial Decomposing Inoculants Increases Wheat (*Triticum Aestivum* L.) Physiological Growth and Mitigates Global Warming Potential under Different Water Regimes." *Environmental and Experimental Botany*, vol. 206, 2023, p. 105170, <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.105170>.

Shayanthan, Ambihai, et al. "The Role of Synthetic Microbial Communities (Syncom) in Sustainable Agriculture." *Frontiers in Agronomy*, vol. 4, 2022, <https://doi.org/10.3389/fagro.2022.896307>.

Rottinghaus, Austin G., et al. "Computational Design of CRISPR Guide RNAs to Enable Strain-Specific Control of Microbial Consortia." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 120, no. 1, 2022, <https://doi.org/10.1073/pnas.2213154120>.

Waqas, Muhammad, et al. "Feeding the World Sustainably: Efficient Nitrogen Use." *Trends in Plant Science*, vol. 28, no. 5, 2023, pp. 505–508, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2023.02.010>.

Armanhi J. S. L., de Souza R. S. C., Damasceno de N. B., de Araújo L. M., Imperial J., Arruda P. (2018). A Community-Based Culture Collection for Targeting Novel Plant Growth-Promoting Bacteria From the Sugarcane Microbiome. *Front. Plant Sci.* 8. doi: 10.3389/fpls.2017.02191