Università degli Studi di Napoli "Federico II"



Scuola Politecnica e delle Scienze di Base Area Didattica di Scienze Matematiche, Fisiche, Naturali

TESI DI DOTTORATO IN BIOLOGIA

PhD XXXIII ciclo

Approcci *omici* per lo studio dei microorganismi associati a leguminose e cereali

Omics approaches for the study of microorganisms associated with legumes and cereals

Relatore università Dr. Maurizio Chiurazzi **PhD studente** Anna Andreozzi

Relatore esterno (CNR-IBBR) Dr.ssa Carmen Bianco

Anno accademico 2020-2021

Premessa

Il riso, il grano, il mais, e in misura minore il sorgo e il miglio, rappresentano una fonte essenziale di nutrimento per miliardi di persone in tutto il mondo. Tra i cereali, il riso, grazie alla notevole adattabilità della pianta e alle diverse varietà esistenti, viene coltivato in tutti i continenti e in condizioni climatiche molto diversificate: dai delta dei fiumi, alle zone paludose, dalle pianure irrigue alle pendici montane, dalle aree tropicali alle zone temperate con inverni rigidi come la nostra pianura Padana. Nei secoli sono stati messi a punto sistemi di coltivazione specifici, ma quasi tutti accomunati dalla presenza di acqua per il rifornimento idrico e la regolazione termica. Il report sui cambiamenti climatici dell'Istituto internazionale per la ricerca sulle politiche alimentari (IFPRI) riporta che entro il 2050 a causa dei cambiamenti climatici, le perdite nelle rese potrebbero essere comprese tra il 10 e il 15%. Queste perdite potrebbero portare ad un aumento dei prezzi del riso stimato intorno al 32-37%, con conseguenze negative per le popolazioni dei paesi meno sviluppati in cui il riso rappresenta il principale alimento. I fattori che determinano una riduzione nelle rese dei raccolti di riso sono molteplici e riguardano: i) l'innalzamento del livello del mare con conseguente inondazione delle zone costiere o dei delta dei fiumi coltivate a riso, fenomeni che portano alla perdita di aree coltivabili; ii) l'intensificazione di eventi di allagamento incontrollato; iii) l'aumento della salinità del suolo; e infine iv) l'aumento dell'intensità e della frequenza dei periodi di siccità. Un altro aspetto importante da considerare è che la produzione di cibi ricchi di proteine, quali leguminose e cereali, è fortemente dipendente dalla quantità di azoto disponibile. Sebbene l'azoto si trovi in misura abbondante nell'atmosfera terrestre (circa 1'80%), esso è presente nella forma molecolare biatomica non utilizzabile dalle piante né da alcun organismo complesso. Le piante acquisiscono l'azoto da due fonti principali: a) l'atmosfera, attraverso la fissazione simbiotica dell'azoto, e b) il suolo, attraverso i fertilizzanti commerciali, il concime, e/o la mineralizzazione dei composti organici. L'uso dei fertilizzanti azotati di sintesi ha sicuramente contribuito allo sviluppo agricolo di molte aree. Tuttavia, un ulteriore incremento nel loro utilizzo non è sostenibile a lungo termine a causa delle forti emissioni di gas ad effetto serra. L'uso dei fertilizzanti azotati nell'agricoltura intensiva ha causato un aumento del costo del gas naturale e la deplezione dei combustibili fossili richiesti per la produzione di questi fertilizzanti. La grande quantità di residui rilasciati nel suolo dopo la fertilizzazione porta a numerosi problemi sia per l'ambiente sia per la salute umana e animale.

Per questo motivo e poiché viviamo in un mondo con risorse limitate, molti degli approcci esistenti in agricoltura quali l'uso di concimi, diserbanti e pesticidi devono essere riesaminati per promuovere soluzioni efficaci a lungo termine e più sostenibili a livello ambientale.

L'agricoltura sostenibile ha posto l'attenzione sul potenziale ruolo della fissazione biologica dell'azoto (BNF) come valida alternativa alla fertilizzazione industriale. La BNF può ridurre l'uso dei combustibili fossili e può essere di aiuto nella riforestazione e nella ristorazione delle terre marginali con scarsa produttività. Un miglioramento della fissazione biologica dell'azoto nelle regioni aride potrebbe incrementare la risorsa di azoto organico, ottimizzando la produzione in queste aree molto povere. Tale obiettivo, potrebbero essere raggiunto migliorando le relazioni che si instaurano tra i batteri azoto-fissatori (per esempio rizobi ed endofiti) e le loro piante ospiti (leguminose e cereali), ed in particolare, analizzando gli effetti che alcuni ormoni, come la principale auxina di pianta, l'acido indolo-3-acetico (oggetto di studio da anni nel laboratorio del dott. Defez e la dott.ssa Bianco), inducono sullo sviluppo della pianta e sui meccanismi di regolazione genica dei batteri endofiti stessi. In un nostro studio precedente pubblicato nel 2017 è stato osservato che il ceppo *Enterobacter cloacae* RCA25-64, geneticamente modificato per produrre e rilasciare 36 volte più acido indolo-3-acetico (IAA) in terreni liquidi rispetto al ceppo wild-type *E. Cloacae* RCA25, mostrava una maggiore espressione del gene *nifH* ed un aumento dell'attività nitrogenasica in colture liquide e piante di riso inoculate (Defez et al., 2017).

Negli ultimi anni si va diffondendo la pratica agricola basata sull'utilizzo di batteri promotori della crescita delle piante (PGPB). I PGPB possono essere trovati nella rizosfera in associazione con le radici delle piante, sia sulla superficie che al loro interno, e possono facilitare direttamente o indirettamente la crescita delle piante in condizioni ottimali, o in condizioni di stress biotici o abiotici.

Le conoscenze dei meccanismi attraverso cui i PGPB esplicano la loro azione benefica sono notevolmente aumentate, e diversi studi, in condizioni di laboratorio e di campo, hanno dimostrato l'efficacia dell'utilizzo di questi batteri non solo come biofertilizzanti, grazie alla BNF, ma anche come biostimolanti e nel rizorisanamento.

L'applicazione dei PGPB agli ecosistemi agricoli di ambienti estremi come quelli caratterizzati da carenza d'acqua, elevata salinità e temperature elevate potrebbe risultare fondamentale per aumentare la crescita e le rese delle colture in questi contesti.

È stato dimostrato che l'inoculazione di piante con PGPB produttori dell'enzima 1amminociclopropano-1-carbossilato (ACC) deaminasi allevia gli effetti dello stress causato dalla siccità riducendo i livelli di etilene vegetale solitamente aumentati in condizioni sfavorevoli. Il trattamento con PGPB fitostimolanti, capaci di produrre fitormoni come l'acido indolo-3acetico, modifica l'architettura radicale delle piante, favorendo esplorazione del suolo e l'assorbimento dell'acqua e dei nutrienti.

Le condizioni avverse, quali elevata salinità, basse temperature, siccità, bassi e elevati livelli di pH, etc. esercitano una pressione selettiva sull'interazione tra i PGPB e le loro piante ospiti. Appare quindi evidente che, in condizioni ambientali avverse, i batteri che si associano alle piante si sono coevoluti con queste contribuendo al loro adattamento. La struttura delle comunità batteriche associate alle piante si trasforma in risposta all'ambiente in modo da migliorarne la resistenza agli stress e promuoverne la crescita e la sopravvivenza.

Lo studio di Marasco et al. (2012) ha dimostrato come la coltivazione in condizioni di aridità di piante di peperoncino (*Capsicum annuum L.*) arricchiva le piante di batteri in grado di migliorare la resistenza delle piante alla siccità e allo stress idrico.

In uno studio simile, le piante di peperone inoculate con batteri isolati da zone desertiche mostravano una maggiore tolleranza alla carenza di acqua, rispetto al controllo, presentando un sistema radicale meglio sviluppato (Marasco et al. 2013). Questo studio inoltre metteva in evidenza la limitata specificità dell'interazione pianta-batteri, contribuendo a dimostrare che i PGPB isolati da una determinata pianta possono determinare resistenza allo stress idrico in piante diverse dall'ospite originale.

Negli ultimi anni diversi studi sono rivolti all'isolamento e alla caratterizzazione di PGPB da piante cresciute in ambienti estremi, al fine di isolare ceppi in grado di tollerare alcuni dei principali stress cui vanno o andranno sempre più incontro le colture di interesse commerciale. In tale contesto si è inserito questo lavoro di tesi che ha avuto come obiettivo la messa a punto di approcci eco-sostenibili per il miglioramento della crescita di piante di riso *Oryza sativa*, la varietà asiatica maggiormente coltivata. L'efficacia degli approcci utilizzati è stata valutata in condizioni di limitata disponibilità di azoto e di stress abiotici come l'elevata salinità.

Prefazione

Questo lavoro di tesi è diviso in tre capitoli in relazione agli obbiettivi e ai risultati ottenuti; con una conclusione generale in coda ai capitoli.

Nel capitolo 1 è stato dimostrato che:

- ✓ il trattamento esogeno di colture dell'endofita azoto-fissatore, *Enterobacter cloacae* RCA25, con la molecola di IAA porta ad un miglioramento della sua capacità azoto-fissativa. Il miglioramento osservato è paragonabile a quello ottenuto per il ceppo modificato RCA25-64 in grado di sintetizzare aumentati livelli di IAA.
- ✓ L'attività nitrogenasica aumenta quando le piante di riso sono co-inoculate con una miscela di endofiti costituita dal produttore di IAA *Herbaspirillum huttiense* RCA24 e dall'azoto fissatore *E. cloacae* RCA25, miscelati in un rapporto 1:10.
- ✓ L'analisi mediante microscopia confocale ci ha permesso di stabilire che un requisito importante per ottenere un aumento della fissazione dell'azoto è la co-localizzazione dei due endofiti negli spazi intracellulari delle radici di riso co-infettate.
- ✓ L'effetto della co-inoculazione con la miscela di endofiti, in condizioni di serra, influenza positivamente i parametri fisiologici e di crescita per la cultivar di riso Baldo ma non per la cultivar Vialone Nano rispetto all'inoculazione singola.

Nel capitolo 2 per far luce sui meccanismi attraverso i quali la molecola di IAA influenza l'espressione di alcuni geni, e in particolare quelli coinvolti nella fissazione dell'azoto, sono stati utulizzati saggi *in vivo* e *in vitro*, per dimostrare, per la prima volta, che l'IAA:

- ✓ influenza lo stato topologico del DNA nei batteri,
- ✓ interagisce direttamente con il DNA in vitro,
- ✓ inibisce l'attività di rilassamento della DNA topoisomerasi batterica di tipo IA,
- ✓ induce l'espressione di geni batterici sensibili ai cambiamenti topologici del DNA,
- ✓ attiva il promotore del gene *nifA*, il principale regolatore dei geni di fissazione dell'azoto. Le attività descritte nel Capitolo 3 riguardano l'isolamento dei batteri endofiti coltivabili associati al riso africano *O. glaberrima*. Il riso *O. glaberrima* è coltivato nella valle del fiume Niger in presenza di input esterni bassi o nulli. Questa varietà di riso è molto vicina a una varietà selvatica e ha molti tratti unici agronomicamente interessanti come la competitività alle infestanti, la tolleranza alla siccità e la capacità di crescere in condizioni di basso input. Queste caratteristiche sono determinate da molti fattori che includono il genotipo, le pratiche agronomiche, l'ambiente e il microbioma ad essa associato. In questa ultima parte del lavoro di tesi sono stati isolati gli endofiti coltivabili presenti nei tessuti di *O. glaberrima* ed è stata analizzata la capacità di questi

endofiti di colonizzare il riso asiatico *O. sativa*. Gli endofiti più efficienti sono stati poi utilizzati per cercare di migliorare la crescita del riso asiatico *O. sativa* in condizioni di stress abiotico.

INTRODUZIONE

1. I cereali e il riso

I cereali costituiscono da migliaia di anni una fonte alimentare primaria per gli esseri umani. Con la domesticazione del riso circa 10.000 anni fa in Cina (Molina et al., 2011), del mais nel Messico meridionale e nell'America centrale e del grano in Mesopotamia nello stesso periodo (Gustafson et al, 2009), i cereali hanno contribuito enormemente a trasformare la civiltà.

Il tipo di cereali coltivato dipende da vari fattori, e tra questi i più importanti sono quelli ambientali, culturali ed economici. Tra i fattori ambientali, la temperatura e la disponibilità di acqua sono probabilmente i fattori più critici nel determinare le colture coltivate in una data regione. Nelle regioni in cui vi è un'ampia disponibilità di acqua tendono a dominare il riso e, in certa misura, il mais. Entrambi sono suscettibili alla mancanza d'acqua, non sopportano il gelo e devono essere coltivati in ambienti temperati. Nelle regioni temperate, queste colture vengono coltivate in primavera e raccolte in estate. Al contrario il grano, viene cresciuto in una più ampia gamma di ambienti, ed è in grado di sopportare un ampio intervallo di temperature. Questi tre cereali insieme costituiscono circa il 90% della produzione cerealicola mondiale. Tra questi il riso, il secondo cereale più coltivato al mondo, rappresenta la fonte alimentare da cui dipende la buona parte delle popolazioni asiatiche. L'importanza di questo alimento è ormai nota da tempo, tanto da indurre le Nazioni Unite a proclamare l'anno 2004 Anno Internazionale del Riso (*International Year of Rice-IYR*), con l'obiettivo di promuovere la coltivazione di questo cereale in modo da rispondere alla sempre maggiore domanda di cibo nel pieno rispetto dell'ambiente (FAO, 2003a).

Tra l'altro il riso, non contenendo glutine sta sempre più allargando le aree di suo utilizzo alimentare visti gli aumenti di varie forme di intolleranze. Attualmente il riso viene coltivato in 122 paesi distribuiti in tutti i continenti del globo, fatta eccezione per l'Antartico. Sono noti più di 140.000 ecotipi di riso coltivati in tutto il mondo (FAO, 2003b), e la maggior parte appartengono alle due specie coltivate: *Oryza sativa*, di origine asiatica, ampiamente coltivata, e *Oryza glaberrima*, di origine africana, la cui coltura è in costante diminuzione a favore della specie asiatica che ha rese per ettaro molto superiori.

Prima dell'introduzione di *O. sativa, O. glaberrima* era l'unica specie di riso coltivata in Africa. In seguito, le aree di coltivazione sono andate via via diminuendo e la specie *O. glaberrima* è stata progressivamente soppiantata dalla specie asiatica *O. sativa*, preferita per via delle maggiori rese del raccolto (Linares, 2002). Nonostante le rese inferiori, numerosi agricoltori dell'Africa occidentale continuano a preferire il riso africano poiché la specie asiatica è poco resistente ai numerosi stress biotici e abiotici che affliggono le coltivazioni nell'Africa sub-sahariana.

Il riso *O. glaberrima* è coltivato nella valle del fiume Niger da oltre 2000 anni (Linares, 2002) con minimi interventi da parte dell'uomo, grazie alle sue tolleranze e resistenze verso numerosi stress (Sié et al., 2012).

In particolare, numerosi studi hanno evidenziato *O. glaberrima* possiede una buona resistenza nei confronti di parassiti (insetti, nematodi ecc) e malattie come quelle causate della Cecidomia africana del riso (AfRGM) (Ukwungwu et al., 1998), dal virus RYMV (Thiémélé et al., 2010) e dal fungo *Magnaporthe grisea* (Rama Devi et al., 2015). Inoltre *O. glaberrima* mostra una maggiore tolleranza rispetto ad *O. sativa* alla tossicità dei metalli pesanti (Sikirou et al., 2018) e alle condizioni climatiche avverse come la siccità (Ndjiondjop et al., 2012) e la salinità. Tuttavia questa specie presenta numerose caratteristiche negative come il limitato numero di spighette per panicolo dovuto a pochi rami secondari, la fragilità dei chicchi con conseguente rottura, e la dispersione dei semi che si traducono in basse rese (Ndjiondjop et al., 2010). Per questi motivi la produzione di riso nell'Africa sub-sahariana non riesce a rispondere alle richieste crescenti, costringendo queste nazioni ad importarlo con un costo annuale di circa 2 miliardi di dollari (FAO).

Il riso, grazie alla sua grande plasticità, può crescere in condizioni estremamente differenti. In base alla disponibilità idrica e ai rapporti che si possono stabilire tra suolo e acqua durante il ciclo colturale, la risicoltura mondiale è classificabile in 4 principali ecosistemi:

- Sistema pluviale: in terreni asciutti e drenanti dove le precipitazioni costituiscono la principale fonte di acqua.
- Sistema inondato: in terreni pianeggianti contornati da arginelli per trattenere l'acqua piovana o derivata da piccoli corsi d'acqua o esondazioni dei fiumi.
- Sistema dell'acqua profonda: in terreni soggetti a un'incontrollata sommersione.
- Sistema irrigato: in terreni pianeggianti adeguatamente livellati e contornati da arginellature che possono disporre di un uniforme strato di acqua regolabile in altezza a seconda delle esigenze della coltura.

Ciascuno di questi sistemi colturali presenta dei vantaggi e delle limitazioni. In particolare il sistema pluviale e quello irrigato sono più sensibili a stress biotici come malattie, insetti e piante infestanti. Al contrario il sistema inondato e quello dell'acqua profonda vanno incontro principalmente a stress ambientali dovuti alle variazioni nella disponibilità d'acqua (AA.VV. 2008).

Indipendentemente da quale sia il sistema di coltivazione, i principali fattori limitanti la crescita del riso sono la siccità e le temperature elevate. Entrambi i fattori determinano una riduzione nelle rese dei raccolti. La riduzione media nelle aree soggette a siccità in cui l'acqua piovana è l'unica fonte di irrigazione varia dal 17% al 40% a seconda dell'intensità e della frequenza dei periodi di siccità. Le temperature elevate invece possono ridurre la produzione del riso rendendo sterili i fiori. Le perdite legate a questo fattore sono più difficili da prevedere, ma da studi condotti dall'Istituto Internazionale di Ricerca sul Riso (IRRI) sembra che l'aumento di 1 grado della temperatura notturna possa ridurre le rese di circa il 10%.

Gran parte delle varietà più coltivate di *O. sativa* risultano particolarmente suscettibili a questi stress. Al contrario *O. glaberrima*, che cresce naturalmente in condizioni di aridità del suolo e temperature elevate senza particolari trattamenti da parte dell'uomo è particolarmente resistente. *O. glaberrima* rappresenta un'importante fonte di geni per la tolleranza e la resistenza a numerosi fattori di stress, il che la rende perfetta da utilizzare in esperimenti di *interbreeding* per il trasferimento di tali tolleranze agli ibridi interspecifici (Sié et al., 2012).

2. Il problema dell'utilizzo dei fertilizzanti azotati

Fonti di inquinamento artificiale includono l'eccessiva fertilizzazione delle colture, le acque reflue, acque piovane, l'industria, le automobili, combustione di legno e combustibili, ecc (Naz e Sulaiman, 2016). La maggior parte dell'azoto utilizzato per le coltivazioni agricole proviene principalmente dalla fissazione industriale dell'azoto, e contribuisce direttamente al rilascio all'azoto negli ecosistemi terrestri (Galloway et al, 2008). I fertilizzanti azotati, l'azoto negli alimenti e le emissioni di azoto nell'aria sono le tre principali fonti di azoto reattivo. I prodotti alimentari rappresentano la maggior parte dell'azoto reattivo (38-75%) nel mondo. Le emissioni atmosferiche di ammoniaca e ossidi di azoto e la successiva deposizione dall'atmosfera contribuiscono per circa l'11-36%, mentre i fertilizzanti azotati contribuiscono per l'11-32% all'azoto reattivo (Boyer et al, 2002). L'azoto reattivo in eccesso può causare problemi di inquinamento nell'ambiente, come la scarsa qualità dell'aria, l'acidificazione di laghi e fiumi, l'interruzione del processo forestale e il degrado della qualità dell'acqua costiera (Prakasa Rao e Puttanna 2006). L'N inorganico si trova principalmente come nitrato (NO₃) nei terreni coltivabili. Il nitrato è soggetto al processo della lisciviazione dal suolo, cioè i nitrati sono trasportati in profondità dall'acqua che scende per gravità e che va a rimpinguare la falda idrica. Nonostante molta attenzione sia stata prestata in tutto il mondo a questo fenomeno, la sua importanza si sta facendo sentire recentemente nei paesi in via di sviluppo come l'India dove l'enfasi è stata posta sui problemi legati all'aumento della produzione alimentare da limitati terreni coltivabili.

Gli effetti incombenti del cambiamento climatico impongono un utilizzo sostenibile dell'azoto necessario per la produzione agricola. Sempre più spesso, i paesi sviluppati cercano di implementare programmi volontari e regolamenti obbligatori riguardanti le pratiche di gestione dell'azoto al fine di ridurre gli effetti locali dell'inquinamento da azoto e delle emissioni di gas serra (Kanter 2018). L'obiettivo di vari progetti di ricerca è quello di trovare dei sistemi per ridurre al minimo le perdite di azoto.

2.1 Strategie sostenibili per aumentare le rese agricole

Per decenni, scienziati e agronomi hanno identificato la fissazione biologica dell'azoto, operata da alcuni procarioti e archei chiamati diazotrofi, come una fonte alternativa di azoto, con costi di produzione inferiori e maggiore efficienza d'uso (Reed et al., 2011). La fissazione biologica dell'azoto è stata caratterizzata per la prima volta in Rhizobiales, un ordine di proteobatteri in grado di catalizzare la riduzione dell'azoto atmosferico tramite l'enzima nitrogenasi, all'interno di noduli radicali simbiotici altamente specializzati di piante leguminose (Mus et al., 2016). Da allora, è stato visto che diversi batteri sono in grado di eseguire la fissazione dell'azoto in simbiosi con le piante non leguminose (Santi et al., 2013) e come popolazioni a vita libera nel suolo e negli ambienti acquatici (Smercina et al., 2019). Sebbene le colture di cereali non siano in grado di sviluppare una fissazione simbiotica dell'azoto, un recente lavoro su una varietà di mais autoctono suggerisce che le antiche linee di cereali potrebbero aver beneficiato dei batteri mutualistici che fissano l'azoto in modo significativo (Van Deynze et al., 2018). Negli ultimi secoli, tuttavia, le richieste per un aumento della resa dei cereali hanno reso necessario l'utilizzo di livelli di azoto superiori a quelli che potevano essere forniti dai diazotrofi, creando una dipendenza dai fertilizzanti azotati organici e successivamente sintetici.

Dall'avvento della tecnologia del DNA ricombinante negli anni '70, i ricercatori hanno utilizzato approcci genetici per studiare e manipolare la genetica della fissazione dell'azoto (Dixon e Kahn, 2004) al fine di trasferire questa capacità alle colture di cereali. Questi approcci si possono suddividere in due grandi categorie: 1) l'ingegneria delle colture di cereali per eseguire la fissazione simbiotica o autonoma dell'azoto e 2) l'utilizzo di diazotrofi associati alla radice per fornire azoto alla rizosfera tramite la fissazione dell'azoto.

Sebbene la fissazione dell'azoto sia sufficiente a fornire il completo fabbisogno di azoto alle colture di leguminose (Clua et al., 2018), ciò potrebbe non essere fattibile nelle colture di cereali ingegnerizzate, che vengono fertilizzate a tassi fino a 300 kg N/ha nei sistemi agricoli di

produzione. La capacità di fornire 25-50 kg di N/ha attraverso la fissazione dell'azoto potrebbe ridurre gli impatti dell'azoto sintetico nei sistemi industriali fornendo al contempo un percorso per una maggiore produttività nelle aree in via di sviluppo e di piccole dimensioni come l'Africa subsahariana (Folberth et al., 2013; Rogers e Oldroyd, 2014). Inoltre, si stima che i diazotrofi a vita libera sono in grado di produrre una quantità di azoto fisso equivalente a quasi il 60% dell'azoto prodotto industrialmente tramite Haber-Bosch (Smercina et al., 2019), fornendo una frazione significativa dell'azoto richiesto per i cereali (Garcia de Salamone et al., 1996; Montañez et al., 2009; Fox et al., 2016; Lima et al., 1987; Boddey et al., 2001; Iniguez et al., 2004). Infine, il rilascio continuo di azoto da parte dei batteri associati a cereali non è paragonabile a quello episodico fornito da fertilizzanti organici o sintetici che vanno incontro a concentrazioni eccessive in alcuni momenti della crescita vegetale, non sempre corrispondenti con la maggiore richiesta da parte della pianta, oltre ad essere degradati o dispersi in misura molto maggiore. Sebbene siano stati fatti grandi passi avanti verso l'ingegnerizzazione delle colture di cereali per la nodulazione e l'espressione della nitrogenasi, la complessità di questi approcci non consente

di raggiungere l'obiettivo in un tempo breve. Al contrario, gli inoculanti microbici produttori di azoto potrebbero avere un impatto più immediato e su un enorme numero di cultivars nei sistemi agricoli.

3. Lo studio del microbioma

L'associazione e il reclutamento, da parte delle piante di diversi microbi benefici per vivere all'interno e all'esterno delle loro radici, ha un effetto positivo sulla crescita e la salute delle piante e costituisce quello che viene chiamato microbiota vegetale. Lo studio delle comunità microbiche che vivono in stretta associazione con le piante può aiutare a comprendere i meccanismi coinvolti in queste interazioni benefiche.

Studi sul microbioma delle piante con resistenza naturale a stress biotici o piante che crescono in ambienti sfavorevoli possono fornire informazioni sui tratti microbici e vegetali che consentono loro di resistere a tali condizioni (Figura 1). Le piante selvatiche mostrano una maggiore tolleranza agli stress abiotici (siccità e salinità) e biotici (parassiti e agenti patogeni) rispetto alle piante domestiche. Lo sviluppo di varietà di colture con rese più elevate e altri tratti agronomici desiderabili tramite programmi di domesticazione e allevamento hanno alterato in modo significativo l'architettura e i tratti delle radici, oltre a ridurre la diversità genetica delle piante (Micallef et al., 2009; Pérez-Jaramillo et al., 2016; Cordovez et al., 2019). Mentre un numero crescente di studi ha mostrato differenze nella composizione e nelle funzioni del microbioma nella rizosfera di piante selvatiche, nonché di piante coltivate in terreni autoctoni e agricoli

(Zachow et al., 2014; Bulgarelli et al., 2015; Coleman- Derr et al., 2016; Pérez-Jaramillo et al., 2018, 2019; Brisson et al., 2019).

L'esplorazione del microbioma delle piante selvatiche nei loro habitat nativi, combinata con la conoscenza di come le diverse pratiche agricole influiscono sulle comunità microbiche, è un aspetto interessante che può essere utilizzato per svelare e, in definitiva, ripristinare le associazioni benefiche che potrebbero essere state minate durante l'addomesticamento delle piante. Inoltre, un aspetto chiave da esplorare nei programmi di miglioramento genetico dovrebbe essere l'identificazione dei geni delle piante coinvolti nel reclutamento di microrganismi benefici in diverse pratiche agricole. Questi approcci innovativi consentiranno alle piante di selezionare e mantenere microbiomi benefici (Schlatter et al., 2017; Compant et al., 2019).

Dunque, le scoperte di microbiomi vegetali potrebbero alimentare i progressi nell'agricoltura sostenibile (Berg, 2009; Lugtenberg e Kamilova, 2009), come lo sviluppo di inoculanti microbici come biofertilizzanti, biocontrollo o prodotti di protezione dallo stress (Berg, 2009; Berg et al., 2013).



Figura 1: Influenza dei fattori biotici e abiotici sulla composizione microbica negli organi vegetali (Compant et al., 2019)

4. L'uso dei batteri diazotrofici associati alle piante

Un approccio alternativo alle tecniche d'ingegneria per la fissazione dell'azoto riguarda l'utilizzo del microbioma associativo delle colture di cereali come fonte di azoto fissato (Geddes et al., 2015). La capacità di fissare l'azoto è stata trovata in un'ampia gamma di generi batterici, molti dei quali sono noti per essere rizobatteri associativi (che risiedono sopra o vicino alla superficie radicolare) ed endofitici (che risiedono all'interno delle cellule vegetali), inclusi Azospirillum, Azotobacter, Burkholderia, Gluconacetobacter, Herbaspirillum, Klebsiella, Paenibacillus e Pseudomonas (Santi et al., 2013). Sebbene le relazioni tra colture di cereali e batteri della rizosfera siano meno specializzate delle simbiosi legume-rizobia, sono comunque governate da sofisticate vie di segnalazione tra il microbo e la pianta ospite (Rocha et al., 2007; Alberton et al., 2013; Brusamarello-Santos et al., 2017; Kost et al., 2014). Si stima che oltre un terzo dei batteri endofitici siano diazotrofi, suggerendo che le associazioni endofitiche sono selettive per la fissazione dell'azoto (Johnston-Monje e Raizada, 2011; Ikeda et al., 2013). Alcuni studi hanno dimostrato che batteri endofiti e batteri associati alle radici forniscono azoto atmosferico attraverso la fissazione dell'azoto alla canna da zucchero in condizioni non fecondate (Boddey et al., 2001) e al mais quando applicati come inoculanti alle radici in studi in serra (Garcia de Salamone et al., 1996; Montañez et al., 2009) e grano (Iniguez et al., 2004). Un altro studio ha rivelato che una varietà autoctona di mais coltivata abitualmente utilizzando poco o nessun fertilizzante azotato si era evoluta per produrre radici aeree in eccesso che trasudavano una spessa mucillagine colonizzata da batteri diazotrofi. Sorprendentemente, la fissazione dell'azoto contribuiva fino all'82% del contenuto di azoto del raccolto (Van Deynze et al., 2018). Questo suggeriva che i batteri fissatori di azoto associativi possono avere un impatto significativo sulla produzione delle colture. In letteratura sono riportati studi che mostrano come l'inoculazione di colture con diazotrofi in prove di campo a basso contenuto di azoto migliora la crescita e la resa delle colture (Hungria et al., 2010; Kifle and Laing, 2016; Oliveira et al., 2017).

5. Batteri promotori la crescita delle piante (PGPB)

I PGPB sono stati definiti per la prima volta nel 1978 da Kloepper e Schroth per identificare batteri del suolo che si trovano spesso in associazione con radici, foglie o all'interno dei tessuti vegetali ed esercitano effetti benefici sulla crescita e lo sviluppo delle piante (Figura 1).

I PGPB che si trovano in stretta associazione con le radici sono generalmente definiti "associativi"; mentre i batteri isolati da piante sottoposte a sterilizzazione superficiale o da tessuti interni della pianta e che non risultano essere nocivi per questa vengono definiti "endofiti". All'interno di questa categoria si distinguono: gli endofiti obbligati, i quali non sono in grado di proliferare al di fuori degli impianti e vengono probabilmente trasmessi via seme; gli endofiti facoltativi, in grado di vivere liberi nel terreno e colonizzare la pianta quando si presenta l'occasione (Hardoim et al., 2008) e gli endofiti passivi, generalmente batteri associativi che possono essere riscontrati all'interno della pianta a causa di eventi stocastici, come ferite aperte lungo i peli radicali (Rosenblueth et al., 2006; Hardoim et al., 2008). La precisa distinzione fra queste categorie non è molto netta dal momento che solo circa il 3% di tali batteri è coltivabile in laboratorio.

Le interazioni con la pianta avvengono principalmente nella rizosfera, dove i PGPB sono stimolati ed attratti dagli essudati radicali (Raaijmakers et al., 2009; Compant et al., 2010) (Figura 2). La composizione degli essudati influenza profondamente la composizione del microbioma circostante favorendo la crescita e la proliferazione di alcuni batteri e sopprimendo quella di altri. Essa dipende dal tipo di suolo, dalla disponibilità di nutrienti, dal genotipo e dallo stadio di crescita della pianta e dagli stress biotici e abiotici legati all'ambiente (Mathesius et al., 2003; Rudrappa et al., 2008).

Tra gli essudati, i flavonoidi, sembrano avere un ruolo determinante. Diversi studi hanno infatti dimostrato il coinvolgimento di queste molecole nei processi di interazione tra rizobi e leguminose (Zhang et al., 2009), tra actinorrize del genere *Frankia* e piante non leguminose (Abdel-Lateif et al., 2012) e nella colonizzazione delle piante da parte di diversi PGPB (Tadra-Sfeir et al., 2011).

La colonizzazione della radice comporta la migrazione, l'ancoraggio al sistema radicale e la proliferazione microbica con la formazione di microcolonie o biofilm sulla superficie delle radici (Compant et al., 2010; Reinhold-Hurek and Hurek, 2011). I batteri possono utilizzare uno o più meccanismi per colonizzare con successo le radici delle piante, e quelli che mancano di questi meccanismi, come ad esempio gli endofiti passivi, risultano meno competitivi nella colonizzazione (Edwards et al., 2015; Reinhold-Hurek et al., 2015).

Tra i meccanismi interessati, la motilità, la chemiotassi, la produzione di enzimi degradativi, e la formazione di lipopolisaccaride sono tra i meccanismi più diffusi fra i PGPB (Piromyou et al., 2015).

In *Azoarcus* sp. è stato dimostrato che i pili di tipo IV sono coinvolti nell'adesione mentre i geni *pilA*, *pilB* e *pilT* sono essenziali per la colonizzazione e l'infezione dei tessuti vegetali in riso (Böhm et al., 2007).

La presenza di flagelli è stata osservata in diversi PGPB (Straub et al., 2013), e mutanti deficienti del macchinario flagellare sono meno efficienti nella colonizzazione.

Anche la presenza di polisaccaridi di superficie, come gli esopolisaccaridi e i lipopolisaccaridi (LPS), è implicata nella colonizzazione delle radici. Anche in questo caso, studi effettuati su ceppi di *Herbaspirillum serepedicae* (Balsanelli et al., 2010) e *Azospirillum brasilense* (Jofre´ et al., 2004) incapaci di sintetizzare queste molecole, hanno mostrato una ridotta capacità di colonizzazione rispetto ai ceppi *wild-type*.

Per quanto riguarda gli endofiti, i tessuti indifferenziati all'estremità delle radici e i punti di emergenza delle radici laterali rappresentano i siti preferenziali per la colonizzazione e l'ingresso nella pianta. In questa fase gli enzimi cellulolitici e pectinolitici contribuiscono all'infezione degradando le pareti delle cellule vegetali, e fornendo un passaggio attraverso l'endoderma per continuare la colonizzazione all'interno della pianta (Adriano-Anaya et al., 2005).

Tuttavia, poiché i geni che codificano questi enzimi degradativi non sono stati trovati in tutti gli endofiti, alcuni di loro sembrano entrare passivamente nel sistema radicale, sfruttando i passaggi creati da lesioni o dai punti di emergenza delle radici laterali.

Dopo la colonizzazione iniziale, alcuni endofiti possono risalire verso lo stelo e le foglie per via apoplastica attraverso i vasi xilematici (Zakria et al., 2007; Johnston-Monje and Raizada, 2011) dove la capacità di eludere il sistema di resistenza della pianta ospite gli assicura una nicchia all'interno del tessuto vegetale (Bais et al., 2006; Compant et al., 2010).

La colonizzazione della pianta può avvenire più o meno rapidamente a seconda del ceppo batterico; l'analisi al microscopio confocale di radici di mais inoculate con *Herbaspirillum seropedicae* ad esempio, ha mostrato che 30 minuti dopo l'inoculazione le cellule di *H. seropedicae* erano attaccate alla superficie della radice, dopo 24 ore erano visibili nei tessuti interni e nell'endoderma, e dopo 3 giorni si trovavano nel cilindro centrale e nello xylema (Monteiro et al., 2008).

In generale, si può affermare che le porzioni della pianta a contatto con il terreno contengono una concentrazione di endofiti molto maggiore rispetto alle porzioni aeree come fusti, foglie e fiori. In particolare le radici possono arrivare a presentare fino a 108 unità formanti colonie per grammo di radice fresca (Barraquio et al., 1997), mentre la densità di endofiti nelle foglie raggiunge le 103-104 CFU per grammo di peso fresco (Compant et al., 2010).

Riguardo ai batteri che colonizzano la fillosfera, numerose evidenze hanno dimostrato che una parte di questi batteri deriva dalla rizosfera (Lamb et al., 1996). Alcuni di questi batteri colonizzano le parti aeree della pianta tramite aperture naturali come stomi e idatodi o da ferite causate da vento, insetti ecc. (Vorholt, 2012).

Inoltre i PGPB sono stati trovati, seppur in piccole concentrazioni, anche negli organi riproduttivi delle piante (fiori, frutti e semi) (Truyens et al., 2015).



Figura 2: Rappresentazione della distribuzione batterica e dei modelli di colonizzazione nell'endosfera di una radice di pianta. I siti emergenti delle radici laterali sono i punti principali della colonizzazione batterica. Le frecce rappresentano la traslocazione dei batteri PGPB all'interno dello xilema e del floema. I batteri endofitici possono impegnarsi in diversi stili di vita, come raffigurato da diversi ovali colorati. Questa illustrazione è stata estratta dagli studi di Liu et al. (2017).

Stabilite le interazioni con la pianta ospite i batteri endofiti possono promuoverne la crescita attraverso un'ampia varietà di meccanismi diretti e indiretti.

I meccanismi diretti di promozione della crescita includono il rifornimento di sostanze nutritive o substrati alla pianta attraverso meccanismi come la solubilizzazione del fosforo, del potassio (Hu et al., 2006), dello zinco (Fasim et al., 2002) o la fissazione biologica dell'azoto (Boddey et al., 1995); e la produzione di ormoni vegetali come l'acido indolo-3-acetico (Bric et al., 1991), le citochine (Bhore et al., 2010), l'acido abscissico (Santoyo et al., 2016).

I meccanismi indiretti invece consistono principalmente nella protezione della pianta dai fitopatogeni (Compant et al., 2010). Alcuni dei meccanismi coinvolti includono la produzione di composti antimicrobici e di enzimi degradativi della parete cellulare (ad esempio chitinasi e β -1,3-glucanasi), la riduzione dell'etilene endogeno da stress, l'induzione della resistenza sistemica (ISR) nelle piante ospiti, il silenziamento del quorum sensing (QS) dei fitopatogeni e la competizione per le nicchie e le risorse (Compant et al., 2010; Santoyo et al., 2016).

Complessivamente quindi i PGPB svolgono i loro effetti benefici sulle piante attraverso tre meccanismi correlati: fitostimolazione, biofertilizzazione e biocontrollo (Gaiero et al., 2013).

I PGPB possono possedere una o più di una di queste caratteristiche benefiche, e per questo motivo negli ultimi anni i ricercatori di tutto il mondo sono impegnati nell'isolamento e nella caratterizzazione di batteri multifunzionali potenzialmente promettenti per il loro utilizzo in agricoltura.

Phylum	Ceppi batterici	Pianta ospite
Actinobacteria	Actinomycetes sp., Agromyces sp., Arthrobacter sp., Brevibacterium epidermidis, Cellulosimicrobium sp., Corynebacterium callunae, Kocuria kristinae, Micrococcus luteus, Providencia alcalifaciens, Zhihengliuella alba	cowpea, senape, miglio, grano
Bacteroidetes	Flavobacterium psychrophilum, Flavobacterium sp., Sphingobacterium sp., Chryseobacterium humi	orzo, miglio, frumento
Firmicutes	Bacillus sp., Brevibacterium halotolerans, Exiguobacterium acetylicum, Lysinibacillus fusiformis, Lysinibacillus xylanilyticus, Paenibacillus sp., Planococcus sp., Planomicrobium okeanokoites, Staphylococcus equorum	amaranto, mela, orzo, grano saraceno, mais, senape, avena, pepe, riso, sorgo, girasole, pomodoro, grano
Proteobacteria	Achromobacter piechaudii, Achromobacter xylosoxidans, Acinetobacter sp., Advenella sp., Agrobacterium larrymoorei, Alcaligenes sp., Azotobacter tropicalis, Bradyrhizobium sp., Enterobacter sp., Halomonas korlensis, Hartmannibacter diazotrophicus, Methylobacterium phyllosphaerae, M. radiotolerans, Nitrinicola lacisaponensis, Ochrobacterium haematophilum, Pantoea sp., Providencia rustigianii, Pseudomonas sp., Serratia marcescens, Tetrathiobacter sp.	amaranto, orzo, grano saraceno, cotone, cowpea, grammo, mais, miglio, senape, avena, riso, girasole, pomodoro, grano

Tabella 1: PGPB isolati da diversi tipi di piante ospiti.

6. Produzione di acido indolo-3-acetico (IAA)

Gli ormoni vegetali sono messaggeri chimici efficaci a bassissima concentrazione e che solitamente vengono sintetizzati in specifici tessuti o organi della pianta e poi trasportati in altre sedi dove interagiscono con specifici bersagli causando risposte fisiologiche, come la crescita o la maturazione dei frutti.

Ogni risposta è spesso il risultato dell'azione di due o più ormoni. Poiché questi ormoni stimolano o inibiscono la crescita delle piante, molti botanici si riferiscono a loro come regolatori della crescita delle piante. Si riconoscono cinque principali gruppi di fitormoni: le auxine, le gibberelline, l'etilene, le citochine e l'acido abscissico (Tabatabaei et al., 2016; Kaur et al., 2017). Oltre che dalle piante, i fitormoni possono essere prodotti anche da diversi microrganismi. Infatti, la capacità di produrre queste molecole è una caratteristica comune dei batteri endofiti. Attraverso la produzione di fitormoni essi possono migliorare la crescita delle piante e la loro tolleranza agli stress (fitostimolazione) (Pieterse et al., 2009).

Geni implicati nella biosintesi di acido indol-3-acetico (IAA) (Zúñiga et al., 2013), citochinine (CK) (Bhore et al., 2010) e gibberelline (GAs) (Shahzad et al., 2016) sono stati ritrovati spesso in studi di metagenomica sulle comunità microbiche delle piante (Tian et al., 2015).

Tra i fitormoni più comuni e meglio studiati prodotti dai PGPB c'è l'acido indol-3- acetico, considerato il più importante tra il gruppo delle auxine.

Questo ormone funziona come molecola segnale nella regolazione dello sviluppo delle piante ed è implicato in numerosi processi come l'organogenesi, il tropismo, e le risposte cellulari come l'espansione cellulare, la divisione, la differenziazione e la regolazione genica.

La capacità di produrre l'IAA è stata riscontrata in numerosi batteri (Ivanova et al., 2001), e si presume che oltre l'80% dei batteri della rizosfera sia in grado di produrre tale molecola (Khalid et al., 2004), determinando effetti che vanno dalla patogenesi alla fitostimolazione a seconda del tipo di interazione pianta-batterio.

Il maggiore precursore della sintesi dell'IAA è il triptofano, e partendo da questo sono stati identificati almeno cinque differenti pathways di biosintesi, molti dei quali simili a quelli descritti per le piante (Spaepen et al., 2007).

In molti microrganismi, grazie ad esperimenti di knockout è stata dimostrata la presenza contemporanea di più pathways. In generale si può affermare che il pahtway dell'indol-3-acetamide (IAM) è associato maggiormente ai patogeni come ad esempio *Pseudomonas syringae* e *Agrobacterium tumefaciens* e contribuisce alla virulenza di questi ceppi (Liu et al., 1982; White and Ziegler, 1991). Il pathway più comune nelle piante, nei batteri benefici ad esse associati, nei fitopatogeni e nei cianobatteri è il pathway dell'indol-3-piruvato (IPA) (Patten and Glick, 2002).

L'IAA nei batteri svolge la funzione di molecola segnale regolando l'espressione di numerosi geni, e poiché rappresenta la più importante auxina nelle piante, potrebbe essersi evoluto come molecola di segnalazione reciproca nell'interazione pianta-batterio (Spaepen and Vanderleyden, 2011).

Nelle interazioni simbiotiche con i PGPB uno degli effetti principali legati alla produzione di IAA è il cambiamento nell'architettura della radice.

Gli effetti sono gli stessi sia attraverso la somministrazione della molecola, sia attraverso l'inoculazione di batteri produttori.

Concentrazioni basse di IAA, tra 10⁻⁹ M e 10⁻¹² M promuovono l'allungamento della radice primaria (Meuwly and Pilet, 1991; Peck and Kende, 1995), mentre concentrazioni più elevate (10⁻⁶), somministrate in forma di molecola o prodotte da ceppi naturalmente buoni produttori o ceppi mutanti over-produttori, determinano un aumento dei peli radicali e delle radici laterali e un accorciamento della radice primaria. In generale, si osserva un aumento della superficie totale della radice che porta ad un miglioramento dell'assorbimento dei minerali dal suolo e alla secrezione degli essudati radicali capaci di stimolare la colonizzazione delle radici da parte dei PGPB (Spaepen and Vanderleyden, 2011). Dosaggi più elevati impediscono la crescita delle radici e portano alla morte della pianta; per questo motivo alcuni erbicidi sono basati sulla somministrazione di alcune auxine.

È stato anche dimostrato che tale auxina è coinvolta nella formazione dei noduli nelle interazioni rizobi-leguminose (Mathesius et al., 2008), e che l'ipr-produzione di IAA in free-living nel ceppo mutato *Sinorizhobium meliloti* RD64 induce dei cambiamenti trascrizionali che normalmente avvengono all'interno dei noduli (Defez et al., 2016).

Inoltre, l'inoculazione di *Medicago truncatula* con ceppi trasformati iper-produttori di IAA ha ha avuto un effetto benefico sulla resistenza allo stress salino (Bianco and Defez, 2009) e sulla solubilizzazione del fosfato (Bianco and Defez, 2010). Un incremento dell'azoto fissazione è stato anche osservato in piante di riso inoculate con ceppi diazotrofi iper-produttori di acido indol-3-acetico rispetto alle piante inoculate con i ceppi wild-type (Defez et al., 2017). In tutti i casi si è osservato un incremento nella biomassa vegetale.

Infine in uno studio recente è stata dimostrata l'implicazione dell'IAA nel biocontrollo; l'inoculazione di semi di grano con il batterio *Streptomyces mutabilis* IA1 produttore di IAA contribuisce a ridurre l'avanzamento e la gravità dell'infezione del fungo *Fusarium culmorum* (Toumatia et al., 2016).

Bibliografia

- AA.VV. (2008): Il riso, coordinamento scientifico di A. Ferrero. Collana Coltura&Cultura, ideata e coordinata da R. Angelini, Bayer CropScience, Ed. Script, Bologna, pagg. 696.
- Abdel-Lateif K, Bogusz D, Hocher V (2012) The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and Frankia bacteria. Plant Signal Behav. 7(6):636-41. doi: 10.4161/psb.20039
- Adriano-Anaya M, Salvador-Figueroa M, Ocampo JA, Garcia-Romera I (2005) Plant cell-wall degrading hydrolytic enzymes of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Symbiosis. 40:151–156. ISSN 0334-5114
- Alberton D, Müller-Santos M, Brusamarello-Santos LCC, Valdameri G, Cordeiro FA, Yates MG, de Oliveira Pedrosa F, de Souza EM. (2013) Comparative proteomics analysis of the rice roots colonized by *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 reveals induction of the methionine recycling in the plant host. J Proteome Res 12: 4757–4768
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annu Rev Plant Biol. 57:233-66. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159
- Balsanelli E, Serrato R, de Baura VA et al. (2010) *Herbaspirillum seropedicae rfbB* and *rfbC* genes are required for maize colonization. Environmental Microbiology. 12:2233–2244. doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02187.x
- Barraquio W, Revilla L, Ladha J (1997) Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. Plant and Soil. 194:15–24. https://doi.org/10.1023/A:1004246904803
- Berg G, Zachow C, Müller H, Philipps J, Tilcher R. (2013) Next-Generation Bio-Products Sowing the Seeds of Success for Sustainable Agriculture. Agronomy. 3(4):648-656. https://doi.org/10.3390/agronomy3040648
- Berg G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 84, 11– 18. doi: 10.1007/s00253-009-2092-7
- Bhore SJ, Ravichantar N, Loh CY (2010) Screening of endophytic bacteria isolated from leaves of Sambung Nyawa [Gynura procumbens (Lour.) Merr.] for cytokinin-like compounds. Bioinformation. 5(5):191-7. doi: 10.6026/97320630005191

- Bianco C, Defez R. (2009) Medicago truncatula improves salt tolerance when nodulated by an indole-3-acetic acid-overproducing *Sinorhizobium meliloti* strain. Journal of Experimental Botany. 60(11):097-3107. https://doi.org/10.1093/jxb/erp140
- Bianco C, Defez R. (2010) Improvement of phosphate solubilization and medicago plant yield by an indole-3-acetic acid-overproducing strain of *Sinorhizobium meliloti*. Applied Environmental Microbiology. 76(14): 4626–4632. doi: 10.1128/AEM.02756-09
- Boddey RM, de Oliveira OC, Urquiaga S et al. (1995) Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. Plant Soil. 174:195–209. https://doi.org/10.1007/BF00032247
- Boddey RM, Polidoro JC, Resende AS, Alves BJR, Urquiaga S. (2001) Use of the 15N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N2 fixation to sugar cane and other grasses. Aust J Plant Physiol. 28: 889-895
- Böhm M, Hurek T, Reinhold-Hurek B (2007) Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N2-fixing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. Mol Plant Microbe Interact. 20(5):526-33. doi: 10.1094/MPMI-20-5-0526
- Boyer EW, Goodale CL, Jaworski NA, Howarth RW (2002) Anthropogenic nitrogen sources and relationships to riverine nitrogen export in the northeastern U.S.A. Biogeochemistry 57/58: 137–169. https://doi.org/10.1023/A:1015709302073.
- Bric JM, Bostock RM, Silverstone SE (1991) Rapid in situ assay for indoleacetic Acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. Appl Environ Microbiol. 57(2):535-8. doi: 10.1128/AEM.57.2.535-538.1991
- Brisson VL, Schmidt JE, Northen TR, Vogel JP, Gaudin ACM. (2019) Impacts of Maize Domestication and Breeding on Rhizosphere Microbial Community Recruitment from a Nutrient Depleted Agricultural Soil. Sci Rep. 9(1):15611. doi: 10.1038/s41598-019-52148-y
- Brusamarello-Santos LC, Gilard F, Brule´ L, Quillere´ I, Gourion B, Ratet P, et al. (2017) Metabolic profiling of two maize (*Zea mays L.*) inbred lines inoculated with the nitrogen fixing plant-interacting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*. PLoS ONE 12(3): e0174576. https://doi.org/10.1371/ journal.pone.0174576
- Bulgarelli D, Garrido-Oter R, Münch PC, Weiman A, Dröge J, Pan Y, et al. (2015). Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. Cell Host Microbe 17, 392–403. doi: 10.1016/j.chom. 2015.01.011

- Clua J, Roda C, Zanetti ME, Blanco FA. (2018) Compatibility between legumes and rhizobia for the establishment of a successful nitrogen-fixing symbiosis. Genes (Basel). 9
- Coleman-Derr D, Desgarennes D, Fonseca-Garcia C, Gross S, Clingenpeel S, Woyke T, et al. (2016). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native Agave species. New Phytol. 209, 798–811. doi: 10.1111/nph.13697
- Compant S, Clement C, Sessitsch A (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. Soil Biology and Biochemistry. 42:669–678. doi:10.1016/j.soilbio.2009.11.024
- Compant S, Samad A, Faist H, Sessitsch A. (2019). A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application. J. Advert. Res. 19, 29–37. doi: 10.1016/j.jare.2019.03.004
- Cordovez V, Dini-Andreote F, Carrión VJ, Raaijmakers JM. (2019). Ecology and evolution of plant microbiomes. Annu. Rev. Microbiol. 73, 69–88. doi: 10.1146/annurev-micro-090817-062524
- Defez R, Andreozzi A, Bianco C. (2017) The Overproduction of Indole-3-Acetic Acid (IAA) in Endophytes Upregulates Nitrogen Fixation in Both Bacterial Cultures and Inoculated Rice Plants. Microb Ecol. 74(2):441-452. doi: 10.1007/s00248-017-0948-4
- Defez R, Esposito R, Angelini C, Bianco C (2016) Overproduction of indole-3-acetic acid in free-living rhizobia induces transcriptional changes resembling those occurring in nodule bacteroids. MPMI. 29:484-95. https://doi.org/10.1094/MPMI-01-16-0010-R
- Dixon R, Kahn D (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. Nat Rev Microbiol. 2:621-631
- Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, Lurie E, Podishetty NK, Bhatnagar S, Eisen JA, Sundaresan V (2015) Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. PNAS USA. 112(8): E911-20. doi: 10.1073/pnas.1414592112
- FAO (2003a) Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation. Geneva, Switzerland. ISBN 92 4 120916 X
- FAO (2003b) United Nations Launches International Year of Rice. 31 October 2003, United Nations, New York

- Fasim F, Ahmed N, Parsons R, Gadd GM (2002) Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from the air environment of a tannery. FEMS Microbiol Lett. 213(1):1-6. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11277.x
- Folberth C, Yang H, Gaiser T, Abbaspour KC, Schulin R. (2013) Modeling maize yield responses to improvement in nutrient, water and cultivar inputs in sub-Saharan Africa. Agric Syst. 119: 22-34
- Fox AR, Soto G, Valverde C, Russo D, Lagares Jr. A, Zorreguieta A, Alleva K, Pascuan C, Frare R, Mercado-Blanco J, et al. (2016) Major cereal crops benefit from biological nitrogen fixation when inoculated with the nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas protegens* Pf-5 X940. Environ Microbiol. 18: 3522-3534
- Galloway JN, Townsend AR, Erisman JW, Bekunda M, Cai Z, Freney JR, Martinelli LA, Seitzinger SP, Sutton MA. (2008) Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. Science. 320:889–892. doi: 10.1126/science.1136674
- Garcia de Salamone IEDJ, Urquiaga S, Boddey RM. (1996) Biological nitrogen fixation in Azospirillum strain-maize genotype associations as evaluated by the 15N isotope dilution technique. Biol Fertil Soils. 23: 249-256
- Geddes BA, Ryu MH, Mus F, Garcia Costas A, Peters JW, Voigt CA, et al. (2015). Use of plant colonizing bacteria as chassis for transfer of N2-fixation to cereals. Curr. Opin. Biotechnol. 32: 216–222. doi: 10.1016/j.copbio.2015.01.004
- Gustafson JP, Raskina O, Ma X, Nevo E. (2009) Evolutionary Genomics of Wheat. In: Carver, BF editor. Wheat: Science and Trade. Hoboken, NJ. Wiley-Blackwell. p. 5-30.
- Hardoim PR, Van Overbeek LS, Elsas JD (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends in microbiology. 16(10):463-471. doi: 10.1016/j.tim.2008.07.008
- Hu X, Chen J, Guo J (2006) Two Phosphate- and Potassium-solubilizing Bacteria Isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. World J Microbiol Biotechnol. 22.983–990. https://doi.org/10.1007/s11274-006-9144-2
- Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedrosa FO. (2010) Inoculation with selected strains of Azospirillum brasilense and A. lipoferum improves yields of maize and wheat in Brazil. Plant Soil. 331:413–425

- Ikeda AG, Bassani LL, Adamoski D, Stringari D, Cordeiro VK, Glienke C, Maria Steffens BR, Hungria M, Galli-Terasawa LV. (2013) Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. Microb Ecol. 65:154–160
- Iniguez AL, Dong Y, Triplett EW. (2004) Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. Mol Plant Microbe Interact. 17: 1078-1085
- Ivanova EG, Doronina NV, Trotsenko IuA. (2001) Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. Mikrobiologiia. 70(4):452-8. Russian. PMID: 11558269.
- Jofré E, Lagares A, Mori G (2004) Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol Lett. 231(2):267-75. doi: 10.1016/S0378-1097(04)00003-5
- Johnston-Monje D, Raizada MN (2011) Conservation and diversity of seed associated endophytes in Zea across boundaries of evolution, ethnography and ecology. PLOS ONE 6(6): e20396. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020396
- Johnston-Monje D, Raizada MN. (2011) Conservation and diversity of seed associated endophytes in Zea across boundaries of evolution, ethnography and ecology. PLoS One 6: e20396. doi: 10.1371/journal.pone.0020396
- Kanter, D.R. Nitrogen pollution: a key building block for addressing climate change. *Climatic Change* **147**, 11–21 (2018). https://doi.org/10.1007/s10584-017-2126-6
- Kaur R, Saxena A, Sangwan P, Yadav AN, Kumar V et al. (2017) Production and characterization of a neutral phytase of *Penicillium oxalicum* EUFR-3 isolated from Himalayan region. Nusantara Bioscience. 9(1):68-76. doi: 10.13057/nusbiosci/n090112
- Khalid A, Tahir S, Arshad M, Zahir ZA (2004) Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere and non-rhizosphere soils. Australian Journal of Soil Research. 42:921-926.https://doi.org/10.1071/SR04019
- Kifle MH, Laing MD. (2016) Effects of Selected Diazotrophs on Maize Growth. Front Plant Sci. 7:1429. doi: 10.3389/fpls.2016.01429
- Kloepper JW, Schroth MN (1978) Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. IV international conference on plant pathogenic bacteria. 2:879-882. Station de patologie vegetale et phytobacteriologie INRA Angers (ed.) Gibert-Glarey, Tours, France.

- Kost T, Stopnisek N, Agnoli K, Eberl L, Weisskopf L. (2014). Oxalotrophy, a widespread trait of plant-associated Burkholderia species, is involved in successful root colonization of lupin and maize by Burkholderia phytofirmans. Front. Microbiol. 4:421. 10.3389/fmicb.2013.00421
- Lamb TG, Tonkyn DW, Kluepfel DA (1996) Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. Canadian Journal of Microbiology. 42:1112–1120. https://doi.org/10.1139/m96-143
- Lima E, Boddey RM, Dobereiner J. (1987) Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a 15N aided nitrogen balance. Soil Biol Biochem. 19: 165-170
- Linares OF (2002) African rice (*Oryza glaberrima*): history and future potential. PNAS. 99 (25) 16360-16365. doi.org/10.1073/pnas.252604599
- Liu ST, Perry KL, Schardl CL, Kado CI. (1982) Agrobacterium Ti plasmid indoleacetic acid gene is required for crown gall oncogenesis. PNAS USA. 79(9):2812-6. doi: 10.1073/pnas.79.9.2812
- Liu H, Carvalhais LC, Crawford M, Singh E, Dennis PG, Pieterse CMJ, Schenk PM. (2017) Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria. Front Microbiol. 8:2552. doi: 10.3389/fmicb.2017.02552
- Lugtenberg B, Kamilova F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annu. Rev. Microbiol. 63, 541–556
- Marasco R, Rolli E, Ettoumi B, Vigani G, Mapelli F, et al. (2012) A Drought Resistance-Promoting Microbiome Is Selected by Root System under Desert Farming. PLOS ONE 7(10): e48479. doi.org/10.1371/journal.pone.0048479
- Marasco R, Rolli E, Vigani G, Borin S, Sorlini C, Ouzari H, Zocchi G, Daffonchio D. (2013). Are drought-resistance promoting bacteria cross-compatible with different plant models? Plant Signaling and Behavior, 8:10. doi.org/10.4161/psb.26741
- Mathesius U, Mulders S, Gao M, Teplitski M, Caetano-Anolles G, Rolfe BG, Bauer WD (2003) Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. PNAS. 100(3):1444-1449. https://doi.org/10.1073/pnas.262672599
- Mathesius U. (2008) Auxin: at the root of nodule development? Funct Plant Biol. 35(8):651-668. doi: 10.1071/FP08177

- Meuwly P, Pilet PE. (1991) Local treatment with indole-3-acetic acid induces differential growth responses in Zea mays L. roots. Planta. 185(1):58-64. doi: 10.1007/BF00194515.
- Micallef SA, Shiaris MP, Colón-Carmona A. (2009). Influence of Arabidopsis thaliana accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. J. Exp. Bot. 60, 1729–1742. doi: 10.1093/jxb/erp053
- Molina J, Sikora M, Garud N, Flowers JM, Rubinstein S, Reynolds A, Huang P, Jackson S, Schaal BA, Bustamante CD, Boyko AR, Purugganan MD. (2011) Molecular evidence for a single evolutionary origin of domesticated rice. PNAS. 108 (20) 8351-8356. doi: 10.1073/pnas.1104686108
- Montañez A, Abreu C, Gill P, Hardarson G, Sicardi M. (2009) Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays L.*) by 15N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. Biol Fertil Soils. 45: 253-263
- Monteiro RA, Schmidt MA, Baura VA et al. (2008) Early colonizationpattern of maize (*Zea mays L. Poales, Poaceae*) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae). Genet. Mol. Biol. 31(4):932–937. https://doi.org/10.1590/S1415-47572008005000007
- Mus F, Crook MB, Garcia K, Garcia Costas A, Geddes BA, Kouri ED, Paramasivan P, Ryu MH, Oldroyd GE, Poole PS, et al. (2016) Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. Appl Environ Microbiol. 82:3698-3710
- Naz MY, Sulaiman SA. (2016) Slow release coating remedy for nitrogen loss from conventional urea: a review. J. Control. Release. 12. http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.037
- Ndjiondjop MN, Cisse F, Girma G, Sow M, Bocco R, Djedatin G, Blandine F (2010) Morphoagronomic and molecular characterisation of *Oryza glaberrima* germplasm from Mali. African Journal of Biotechnology. 9(44):7409-7417. doi: 10.5897/AJB2010.000-3312
- Ndjiondjop MN, Futakuchi K, Cisse F, Baimey H, Bocco R (2012) Field evaluation of rice genotypes from the two cultivated species (*Oryza sativa* L. and *Oryza glaberrima* Steud.) and their interspecifics for tolerance to drought. Crop Science. 52(2): 524-538. doi.org/10.2135/cropsci2011.05.0287
- Oliveira V, Gomes NCM, Santos M, Almeida A, Lillebø AI, Ezequiel J, Serôdio J, Silva AMS, Simões MMQ, Rocha SM, Cunha Â. (2017) Effects of the inoculant strain *Pseudomonas* sp. SPN31 nah + and of 2-methylnaphthalene contamination on the

rhizosphere and endosphere bacterial communities of Halimione portulacoides. Curr Microbiol. 74:575-583. doi:10.1007/s00284-017-1197-y

- Patten CL, Glick BR. (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. Appl Environ Microbiol. 68(8):3795-801. doi: 10.1128/aem.68.8.3795-3801.2002.
- Peck SC, Kende H (1995) Sequential induction of the ethylene biosynthetic enzymes by indole-3-acetic acid in etiolated peas. Plant Mol Biol. 28:293–301. doi.org/10.1007/BF00020248.
- Pérez-Jaramillo JE, Carrión VJ, Bosse M, Ferrão LFV, de Hollander M, Garcia AAF, et al. (2017). Linking rhizosphere microbiome composition of wild and domesticated Phaseolus vulgaris to genotypic and root phenotypic traits. ISME J. 11, 2244–2257.
- Pérez-Jaramillo JE, Carrión VJ, de Hollander M, Raaijmakers, JM. (2018). The wild side of plant microbiomes. Microbiome 6:143. https://doi.org/10.1186/s40168-018-0519-z
- Pérez-Jaramillo JE, de Hollander Ramírez CA, Mendes R, Raaijmakers JM, Carrión VJ. (2019).
 Deciphering rhizosphere microbiome assembly of wild and modern common bean (Phaseolus vulgaris) in native and agricultural soils from Colombia. Microbiome. 7(1):114. doi: 10.1186/s40168-019-0727-1
- Pieterse CM, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SC (2009) Networking by smallmolecule hormones in plant immunity. Nat Chem Biol. 5(5):308-16. doi: 10.1038/nchembio.164
- Piromyou P, Songwattana P, Greetatorn T, et al. (2015) The Type III Secretion System (T3SS) is a Determinant for Rice-Endophyte Colonization by Non-Photosynthetic Bradyrhizobium. Microbes Environ. 30(4):291-300. doi:10.1264/jsme2.ME15080
- Prakasa Rao EVS, Puttanna K (2006) Strategies for combating nitrate pollution. Current Science. 91(10):1335 1339. https://www.jstor.org/stable/24094057
- Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C et al. (2009) The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. Plant Soil. 321, 341– 361. https://doi.org/10.1007/s11104-008-9568-6
- Rama Devi SJS, Singh K, Umakanth B, Vishalakshi B, Renuka P, Vijay Sudakar K, Prasad MS, Viraktamath BC, Ravindra Babu V, Madhav MS (2015) Development and identification of novel rice blast resistant sources and their characterization using molecular markers. Rice Science. 22(6):300-308. doi.org/10.1016/j.rsci.2015.11.002

- Rao, E. V. S. Prakasa, and K. Puttanna. "Nitrates, Agriculture and Environment." *Current Science* 79, no. 9 (2000): 1163-168. Accessed February 3, 2021. http://www.jstor.org/stable/24105267.
- Reed SC, Cleveland CC, Townsend AR (2011) Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective. Ann Rev Ecol Evol Syst. 42:489-512
- Reinhold-Hurek B, Bünger W, Burbano CS, Sabale M, Hurek T (2015) Roots shaping their microbiome: global hotspots for microbial activity. Annual Review of Phytopathology. 53:403-424. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102342
- Reinhold-Hurek B, Hurek T (2011) Living inside plants: bacterial endophytes. Curr Opin Plant Biol. (4):435-43. doi: 10.1016/j.pbi.2011.04.004
- Rocha F, Papini-Terzi RS, Nishiyama MY, Vencio RZN, Vicentini R, Duarte RDC, De Rosa VE, et al. (2007). Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. BMC Genomics 8: 71
- Rogers C, Oldroyd GE. (2014) Synthetic biology approaches to engineering the nitrogen symbiosis in cereals. J Exp Bot. 65: 1939-1946
- Rosenblueth M, Martínez-Romero E (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Mol Plant Microbe Interact. 19(8):827-37. doi: 10.1094/MPMI-19-0827
- Rudrappa T, Czymmek KJ, Paré PW, Bais HP (2008) Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. Plant Physiol. 148(3):1547-56. doi: 10.1104/pp.108.127613
- Santi C, Bogusz D, Franche C. (2013) Biological nitrogen fixation in non-legume plants. Ann Bot. 111:743-767
- Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, Orozco-Mosqueda Mdel C, Glick BR. Plant growthpromoting bacterial endophytes. Microbiol Res. 2016 Feb; 183:92-9. doi: 10.1016/j.micres.2015.11.008
- Schlatter D, Kinkel L, Thomashow L, Weller D, Paulitz, T. (2017). Disease suppressive soils: new insights from the soil microbiome. Phytopathology 107, 1284–1297. doi: 10.1094/phyto-03-17-0111-rvw
- Shahzad R, Waqas M, Khan AL, Asaf S, Khan MA, Kang SM, Yun BW, Lee IJ (2016) Seedborne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. Plant Physiol Biochem. 106:236-43. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.05.006

- Sie M, Sanni K, Futakuchi K, Manneh B, Mande S, Vodouhe R, Dogbe S, Drame K, Ogunbayo A, Ndjiondjop M, Traore K. (2012) Towards a rational use of African rice (*Oryza glaberrima* Steud.) for breeding in Sub-Saharan Africa. Genes, Genomes and Genomics. 6(1):1-7. ISSN:1749-0383
- Sikirou M, Shittuc A, Konaté KA, Maji AT, Ngaujah AS, Sanni KA, Ogunbayo SA, Akintayo I, Saito K, Dramé KN, Ahanchédé A, Venuprasad R (2018) Screening African rice (*Oryza glaberrima*) for tolerance to abioticstresses: I. Fe toxicity. Field Crops Research. 220:3-9. doi.org/10.1016/j.fcr.2016.04.016
- Smercina DN, Evans SE, Friesen ML, Tiemann LK. (2019) To fix or not to fix: controls on freeliving nitrogen fixation in the rhizosphere. Appl Environ Microbiol. 85
- Spaepen S, Vanderleyden J. (2011) Auxin and plant-microbe interactions. Cold Spring Harb Perspect Biol. 3(4): a001438. doi: 10.1101/cshperspect. a001438.
- Stijn S, Jos V, Roseline R. (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiology Reviews. 31(4):425–448. doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x
- Straub D, Rothballer M, Hartmann A, Ludewig U (2013) The genome of the endophytic bacterium *H. frisingense* GSF30(T) identifies diverse strategies in the *Herbaspirillum* genus to interact with plants. Frontiers in Microbiology. 4(168). doi: 10.3389/fmicb.2013.00168
- Tabatabaei S, Ehsanzadeh P, Etesami H, Alikhani HA, Glick BR, Res SJA (2016) Indole-3acetic acid (IAA) producing *Pseudomonas* isolates inhibit seed germination and αamylase activity in durum wheat (*Triticum turgidum* L.). Spanish Journal of Agricultural Research. 4(1), e0802. doi: 10.5424/sjar/2016141-8859
- Tadra-Sfeir MZ, Souza EM, Faoro H, et al. (2011) Naringenin regulates expression of genes involved in cell wall synthesis in *Herbaspirillum seropedicae*. Applied and Environmental Microbiology. 77:2180-2183. doi: 10.1128/AEM.02071-10
- Thiémélé D, Boisnard A, Ndjiondjop MN et al. (2010) Identification of a second major resistance gene to Rice yellow mottle virus, RYMV2, in the African cultivated rice species, O. glaberrima. Theor Appl Genet. 121:169–179. doi.org/10.1007/s00122-010-1300-2

- Tian BY, Cao Y, Zhang KQ (2015) Metagenomic insights into communities, functions of endophytes, and their associates with infection by root-knot nematode, Meloidogyne incognita, in tomato roots. Sci Rep. 5:17087. doi: 10.1038/srep17087
- Toumatia O, Compant S, Yekkour A, Goudjal Y, Sabaou N, Mathieu F et al. (2016) Biocontrol and plant growth promoting properties of *Streptomyces mutabilis* strain IA1 isolated from a Saharan soil on wheat seedlings and visualization of its niches of colonization. South African Journal of Botany. 105:234-239. doi.org/10.1016/j.sajb.2016.03.020
- Truyens S, Weyens N, Cuypers A, Vangronsveld J (2015) Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. Environmental Microbiology Reports.7:40–50. https://doi.org/10.1111/1758-2229.12181
- Ukwungwu M, Williams C, Okhidievbie O (1998) Screening of African rice, *Oryza glaberrima Steud*, for resistance to the African rice gall midge *Orseolia oryzivora* Harris and Gagné. Insect Science and Its Application. 18(2):167-170. doi:10.1017/S1742758400007827
- Van Deynze A, Zamora P, Delaux PM, Heitmann C, Jayaraman D, Rajasekar S, Graham D, Maeda J, Gibson D, Schwartz KD, et al. (2018) Nitrogen fixation in a landrace of maize is supported by a mucilage-associated diazotrophic microbiota. PLoS Biol. 16. doi:e2006352
- Vorholt JA. Microbial life in the phyllosphere. Nat Rev Microbiol. 2012 Dec;10(12):828-40. doi: 10.1038/nrmicro2910
- White FF, Ziegler SF (1991) Cloning of the genes for indoleacetic acid synthesis from Pseudomonas syringae pv. Syringae. MPM. 4:207-210. doi: 10.1094/MPMI-4-207
- Zachow C, Müller H, Tilcher R, Berg G. (2014). Differences between the rhizosphere microbiome of Beta vulgaris ssp. maritima-ancestor of all beet crops-and modern sugar beets. Front. Microbiol. 5:415. doi: 10.3389/fmicb.2014.00415
- Zakria M, Njoloma J, Saeki Y, Akao S (2007) Colonization and nitrogen-fixing ability of *Herbaspirillum* sp. strain B501 gfp1 and assessment of its growth-promoting ability in cultivated rice. Microbes and Environments. 22(3):197-206. https://doi.org/10.1264/jsme2.22.197
- Zhang J, Subramanian S, Stacey G, Yu O (2009) Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of Medicago truncatula by *Sinorhizobium meliloti*. Plant J. 57(1):171-83. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03676.x

Zúñiga A, Poupin MJ, Donoso R, Ledger T, Guiliani N, Gutiérrez RA, González B (2013)
Quorum sensing and indole-3-acetic acid degradation play a role in colonization and plant growth promotion of Arabidopsis thaliana by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. Mol Plant Microbe Interact. 26(5):546-53. doi: 10.1094/MPMI-10-12-0241-R

Capitolo 1

Effetto di endofiti azoto-fissatori e produttori di acido indolo-3-acetico (IAA) sulla crescita di piante di riso

Introduzione

Materiali e Metodi

- 1. Ceppi batterici e condizioni di crescita
- **2.** Trattamento esogeno con IAA, acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D) e indolo (IND) sulla formazione di biofilm e sulla crescita batterica di *Enterobacter cloacae* RCA25
- **3.** Saggio di riduzione dell'acetilene (ARA) su coltura batterica di RCA25 dopo trattamento con IAA e suoi analoghi (2,4-D e IND)
- 4. Analisi quantitativa in tempo reale (qRT-PCR)
 - 4.1. Estrazione dell'RNA totale
 - 4.2. Trattamento con DNasi I
 - 4.3. Sintesi cDNA mediante retrotrascrizione dell'RNA (RT-PCR)
 - 4.4. Allestimento della reazione di qRT-PCR ed analisi del livello di espressione genica
- 5. Quantizzazione del livello di produzione di IAA batterico: metodo Salkowski
- 6. Analisi quantitativa della formazione di biofilm batterico in mezzo ricco
- 7. Marcatura batteri con proteine fluorescenti (FP)
- 8. Inoculazione e crescita delle piante di riso
 - 8.1. Sterilizzazione e germinazione dei semi di riso
 - 8.2. Metodi di inoculazione
 - 8.3. Coltivazione delle piante
- 9. Test ARA su piante di riso inoculate
- 10. Analisi di radici di riso inoculate al microscopio confocale (CLSM)
- 11. Ri-isolamento degli endofiti da piante di riso inoculate
- 12. Esperimenti di inoculazione in *Greenhouse* ed analisi dei parametri fisiologici di crescita di due cultivar di riso *O. sativa*, Baldo e Vialone nano, inoculate con i batteri endofiti (RCA25, RCA24 e RCA25 + RCA24)

Risultati

- Effetto del trattamento esogeno con IAA e i suoi analoghi strutturali (IND) e funzionali (2,4-D), sulla crescita batterica e sulla formazione di biofilm di RCA25
- 2. Livello di trascrizione del gene *nifH* e attività nitrogenasica in cellule di RCA25 sottoposte a trattamento esogeno con IAA, 2,4-D e IND

- Livello di produzione di IAA e capacità di formazione di biofilm per i ceppi selezionati (RCA23, RCA24, RCA25 e 377)
- 4. Capacità di colonizzazione dei ceppi produttori di IAA
- Selezione dell'endofita produttore di IAA da usare nella co-inoculazione di piante di riso
- Effetto dell'IAA esogeno sulla fissazione dell'azoto in piante di riso inoculate con RCA25
- 7. Capacità di colonizzazione degli endofiti benefici selezionati (RCA25, RCA24)
- 8. Localizzazione degli endofiti negli spazi intracellulari delle radici di riso Baldo
- Effetto della co-inoculazione sui parametri fisiologici e di crescita di due cultivar di O. sativa, Baldo e Vialone nano, coltivate in Greenhouse

Discussione

Referenze

Paper: <u>Andreozzi A</u>, Prieto P, Mercado-Blanco J, Monaco S, Zampieri E, Romano S, Valè G, Defez R, Bianco C. (2018) *Efficient colonization of the endophytes Herbaspirillum huttiense RCA24 and Enterobacter cloacae RCA25 influences the physiological parameters of Oryza sativa L. cv. Baldo rice*. Environmental Microbiology. 21(9): 3489-3504. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14688

Introduzione

L'azoto (N) è uno dei nutrienti più importanti per la crescita delle piante in agricoltura (Awika, 2011). Nonostante la sua prevalenza nell'atmosfera terrestre (78%), esiste principalmente in una forma (inerte) biologicamente non utilizzabile dalle piante. In agricoltura, la limitazione dell'N è aggirata dall'applicazione di fertilizzanti chimici prodotti industrialmente con il processo Haber-Bosch. L'applicazione eccessiva di questi fertilizzanti azotati ha portando negli anni a conseguenze ambientali, producendo così gas serra e l'eutrofizzazione dei sistemi idrici (Stokstad, 2016). Il riso è una delle principali colture alimentari per l'alimentazione umana contribuendo al 60 % del fabbisogno calorico nei paesi in via di sviluppo e al 50 % delle calorie nei paesi sviluppati. La disponibilità di azoto spesso ne limita la produzione di questo cereale ma i fertilizzanti chimici costosi e inquinanti sono già stati utilizzati in modo eccessivo (Rasul, 2016). La fissazione biologica dell'azoto (BNF) da parte di batteri azoto-fissatori (diazotrofi) nodulanti, che riducono l'N atmosferico in ammonio utilizzando il sistema enzimatico della Nitrogenasi, rappresenta il 30% - 50% dell'azoto totale presente nei campi coltivati (Wagner, 2011; Ormeño-Orrillo et al., 2013). L'area della ricerca sulla BNF è stata ampliata dalla scoperta di batteri endofiti azoto-fissatori anche in piante non nodulanti. I batteri endofiti sono capaci di promuovere la crescita delle piante attraverso vari meccanismi come la fissazione dell'azoto, la produzione di fitormoni e auxine, l'acquisizione di nutrienti e conferendo tolleranza alla pianta ospite a stress biotici e abiotici (Haney et al., 2015; Berg et al., 2016; Yuan et al., 2016; Santoyo et al., 2017). Più spesso abitano gli spazi intercellulari delle piante, che sono abbondanti di carboidrati, aminoacidi e nutrienti inorganici (Compant et al., 2011; Liuet al., 2017). Gli endofiti inizialmente si attaccano alla superficie della radice ed esplorano i potenziali siti di ingresso per accedere ai tessuti vegetali interni. Le ferite sulle radici, i punti dove emergono i peli delle radici o le radici laterali, così come le ferite nei germogli, sono considerati i principali punti di ingresso che gli endofiti utilizzano per entrare nella pianta ospite (Mercado-Blanco e Prieto, 2012; Compant et al., 2016; Kandel et al., 2017). Nei tessuti interni, dunque, questi risiedono per la maggior parte della loro vita senza alcun impatto dannoso per la pianta ospite (Mercado-Blanco e Lugtenberg, 2014; Hardoim et al., 2015). I tessuti vegetali interni costituiscono un ambiente favorevole per la fissazione dell'N eseguita da endofiti diazotrofici, poichè la competizione con altri microbi nella rizosfera è ridotta al minimo e inoltre rappresenta un ambiente microaerobico necessario per l'attività dell'enzima Nitrogenasi (Mus et al., 2016; Kandel et al., 2017). Negli ultimi anni, un'ampia varietà di batteri associati ai cereali ha dimostrato di possedere il gene nifH che codifica per l'enzima Dinitrogenasi reduttasi (Rosenblueth et al., 2018). Questo gene è considerato il più geneticamente conservato all'interno del regulone nif e tradizionalmente utilizzato come gene marker per studiare la diversità genetica dei diazotrofi in natura (Gaby e Buckley, 2014; Gaby et al., 2018; Angel et al., 2018). Le analisi molecolari funzionali nel riso hanno anche dimostrato che non tutti questi microrganismi sono attivi nella fissazione dell'azoto quando sono associati alle piante (Ueda et al., 1995; Elbeltagy e Ando, 2008). Inoltre, il livello di ammonio, fornito ai cereali ospiti da quelli più attivi, non era sufficientemente alto per sostenere la crescita della pianta in condizioni di limitate quantità di azoto. I fattori necessari per la fissazione dell'azoto sono ad oggi abbastanza definiti e quindi alcuni studi hanno proposto l'uso di diazotrofi geneticamente modificati per migliorare la crescita delle piante ospiti (Van Dommelen et al., 2009; Geddes et al., 2015; Ambrosio et al., 2017). Anche in un nostro studio precedente è riportato che il ceppo *Enterobacter cloacae* RCA25-64, geneticamente modificato per produrre e rilasciare 36 volte più acido indolo-3-acetico (IAA) in terreni liquidi rispetto al ceppo wild-type *E. Cloacae* RCA25, ha mostrato una maggiore espressione del gene *nifH* e attività della nitrogenasi in colture liquide e piante di riso inoculate (Defez et al., 2017).

Altri studi hanno invece evidenziato che gli effetti benefici dei microbi sulla crescita delle piante possono essere potenziati dalla co-inoculazione con diversi microrganismi endofiti. In particolare, sono stati osservati effetti sinergici sulla crescita e sulla resa di diverse piante mediante il coinoculo formato da batteri azoto fissatori e batteri con altre capacità di promozione di crescita della pianta (Islam et al., 2009; Jia et al., 2016; Korir et al., 2017; Orozco-Mosqueda et al., 2018). L'obiettivo principale di questo studio e che abbraccia per la maggior parte tutto il percorso di tesi di dottorato svolto, è quello di migliorare la crescita di piante di riso e farlo in modo sostenibile, per non arrecare danni all'ambiente, e con soluzioni efficaci, per superare la quantità limitata di azoto fissato e la produzione di bio-fertilizzanti senza approccio transgenico. In particolare, in questo studio sono stati sviluppati cinque punti fondamentali: (i) analizzare l'effetto della molecola di IAA purificata sulla capacità di fissazione dell'azoto di E. cloacae RCA25; (ii) selezionare endofiti produttori di IAA da utilizzare insieme al ceppo wild-type RCA25 per la coinoculazione di piante di riso; (iii) valutare se gli endofiti co-inoculati sono in grado di colonizzare gli spazi intercellulari, cioè l'interno della corteccia delle radici del riso inoculato; e (iv) identificare la combinazione di endofiti più efficace da utilizzare come bio-inoculo e analizzare i suoi effetti sui parametri fisiologici delle piante di riso ospiti.
Materiali e metodi

1. Ceppi batterici e condizioni di crescita

Gli endofiti *Enterobacter cloacae* RCA25 ed il suo isogenico RCA25-64 capace di iper-produrre IAA, *Enterobacter asburiae* RCA23, *Herbaspirillum huttiense* RCA24 (Defez et al., 2017; Andreozzi et al., 2019), sono stati cresciuti in mezzo LB (*Luria-Bertani*: 5 g/L di estratto di lievito, 10 g/L triptone, 10 g/L cloruro di sodio; per il terreno solido vengono aggiunti 15 g/L di Agar) mentre il ceppo *Staphylococcus* sp. 377 (Baldan et al., 2015) è stato cresciuto nel mezzo TY-CM (3 g/L di estratto di lievito, 5 g/L triptone, 2.5 mM CaCl₂ e 2.5 mM MgSO₄). Tutti i ceppi sono stati incubati a 30 °C su un agitatore a 200 rpm. Antibiotici specifici sono stati inclusi nel mezzo di crescita: la vancomicina (20 µg/ml) per i ceppi RCA25, RCA23 e RCA24, e la penicillina G (40 µg/ml) per il ceppo 377.

2. Trattamento esogeno con IAA, acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D) e indolo (IND) sulla formazione di biofilm e sulla crescita batterica di *Enterobacter cloacae* RCA25

Il ceppo diazotrofo *E. clocae* RCA25 è stato coltivato in un mezzo minimo M9 1x (64 g/L Na₂HPO₄*7 H₂O, 15 g/L KH₂PO₄, 2,5 g/L NaCl, 5 g/L NH₄Cl, 2 ml MgSO₄ 1M, 2 ml CaCl₂ 1M, 4 g di glucosio, 1 μ g/ml di tiamina e 1 mg/ml di bacto-casaminoacidi) per 24 ore a 30°C su un agitatore rotante a 200 rpm. Diverse concentrazioni (0,01 mM, 0,10 mM, 0,72 mM e 2,86 mM) di IAA purificato sono state aggiunte in 15 ml di coltura liquida del ceppo diazotrofo ad un OD₆₀₀ iniziale di 0.5. Per ogni concentrazione di IAA utilizzata è stata costruita una curva di crescita mediante misurazione dell'assorbanza a 600 nm a diversi tempi.

La concentrazione di IAA che non alterava la crescita batterica è stata utilizzata per le analisi successive. I composti 2,4-D e IND funzionalmente e chimicamente simili all'IAA, rispettivamente, sono stati solubilizzati in etanolo (EtOH) al 50% e aggiunti in colture liquide del ceppo RCA25 alla concentrazione finale di 0,1 mM. Per evitare l'interferenza del solvente etanolo con la crescita batterica nella cultura del ceppo RCA25 non trattato usata come controllo è stata aggiunta una quantità simile di soluzione di EtOH utilizzata per le colture trattate.

Le colture di *E. cloacae* RCA25 trattate con IAA, 2,4-D e IND sono state anche utilizzate per l'analisi della formazione di biofilm. Le colture batteriche (10 ml) trattate per 4 ore, sono state lavate 3 volte con 2 ml di mezzo minimo M9 1x non contenente cloruro di ammonio (NH₄Cl) e poi centrifugato a 13.000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente. I pellet cellulari sono stati risospesi in 10 ml di terreno minimo contenente 1 mM di NH₄Cl. Un'aliquota di sospensione batterica (150 μ l) è stata trasferita nei pozzetti di una piastra *multiwell* di polistirene ed è stata incubata a 30°C. Dopo 20 ore di incubazione in statico, le cellule non legate alle pareti del

pozzetto sono state rimosse per inversione della piastra, eseguita da un energico tocco sulla carta adsorbente. Successivamente, le cellule adese sono state fissate, colorate e quantizzate come suggerito da Stepanovic et al. (2007). La fissazione è stata eseguita per 20 minuti con 150 µl di metanolo aggiunto in ogni pozzetto, la piastra è stata poi svuotata come descritto prima e lasciata asciugare all'aria per 30 minuti in posizione inversa a temperatura ambiente. Lo strato di biofilm adeso, formato in ciascun pozzetto della micropiastra è stato colorato con 200 µl di violetto di genziana al 2% per 15 minuti a temperatura ambiente. Il violetto di genziana (cloruro di esametilpararosanilina) permette la colorazione delle cellule batteriche adese alla superfice dei pozzetti. Il colorante è stato aspirato con una pipetta e la micropiastra è stata sciacquata sotto acqua corrente. Il colorante legato alle cellule è stato poi solubilizzato con 150 µl di etanolo al 95% per pozzetto. Per ottimizzare l'eluizione del colorante, la micropiastra è stata coperta con il coperchio (per ridurre al minimo l'evaporazione) e lasciata a temperatura ambiente per almeno 30 minuti. L'aggiunta di etanolo consente la misurazione indiretta dei batteri attaccati sia al fondo che alle pareti dei pozzetti. La densità ottica (OD) di ciascun pozzetto è stata misurata a 570 nm utilizzando un lettore di micropiastre. Pozzetti contenenti solo il mezzo non inoculato sono stati utilizzati come controllo negativo. I valori di OD ottenuti sono stati calcolati per tutti i ceppi testati ed i controlli negativi, tutti eseguiti in triplicato.

3. Saggio di riduzione dell'acetilene (ARA) su coltura batterica di RCA25 dopo trattamento con IAA ed i suoi analoghi (2,4-D e IND)

Il saggio ARA è un metodo rapido per la determinazione della fissazione biologica dell'azoto attraverso la misura indiretta dell'attività enzimatica della Nitrogenasi. In condizioni fisiologiche questo enzima è in grado non solo di catalizzare, la riduzione dell'azoto atmosferico ad ammonio, ma anche quella di altri composti come l'acetilene (C_2H_2) ad etilene (C_2H_4), in entrambi i casi con la rottura di un triplo legame covalente.

La capacità di fissazione dell'azoto del ceppo RCA25 dopo il trattato per 4 ore con IAA, 2,4-D e IND, come precedentemente descritto, è stata determinata mediante il test ARA. La coltura del ceppo RCA25 trattato con EtOH 0,125% è stata utilizzata come controllo. Le colture cellulari trattate (4 ml) sono state lavate due volte con 2 ml di terreno minimo M9 1x senza NH4Cl e centrifugate a 13.000 rpm per 7 minuti a temperatura ambiente. I pellet cellulari sono stati risospesi in 2 ml di terreno minimo senza NH4Cl e trasferiti in un tubo di vetro da 10 ml, sigillato con apposito tappo a vite contenente una parte centrale in silicone. Per evitare l'inibizione dell'attività enzimatica da parte dell'ossigeno è stata creata un'atmosfera ipossica (O₂ finale 2%)

all'interno del tubo, cui è stato aggiunto il substrato acetilene per una concentrazione saturante (10% finale).

I tubi così allestiti sono stati incubati per 18 ore a 30 °C in statico. I tubi contenenti la coltura non trattata con le varie sostanze sono stati utilizzati come controllo positivo, mentre i tubi contenenti la coltura non trattata e, senza acetilene iniettato sono stati usati come controllo negativo. Un campione (1 ml) di gas prelevato da ciascun tubo è stato iniettato in un gas cromatografo (GC) Clarus®580 (Perkin-Elmer) per misurare l'area del picco di etilene prodotto. Per la separazione dei picchi relativi all'etilene ed all'acetilene è stato impostato un programma con attenuazione - 6, temperatura del forno a 130 °C (dove alloggia la colonna di vetro), un'isotermia di 3 minuti e una velocità di 48 cm/s dell'elio, il gas di trasporto (fase mobile). Il gas cromatografo è dotato di un detector a ionizzazione di fiamma (FID) in grado di analizzare la quantità dei gas provenienti dalla colonna (30 m × 0.53 mm × 10 μ m; Thermo Scientific) in tempi diversi.

L'attività nitrogenasica espressa in nmoli di etilene prodotto al minuto per i mg di cellule saggiate (nmol $C_2H_4/min/mg$ cells) è stata ottenuta per interpolazione in una curva standard di etilene (gas puro) costruita, iniettando nel GC diverse quantità di etilene come gas puro. Le nmoli di etilene iniettate sono in funzione dell'area del picco di etilene che si ottiene dopo la corsa cromatografica.

4. Analisi quantitativa in tempo reale (qRT-PCR)

La PCR real-time è un metodo che permette simultaneamente di amplificare e quantizzare il DNA. La PCR real-time viene combinata con la PCR Retro Trascrizionale (RT-PCR) per quantificare i livelli di espressione di specifici trascritti. La combinazione di queste due tecniche è denominata RT-PCR quantitativa o qRT-PCR. La retro-trascrizione (o trascrizione inversa) produce DNA a singolo filamento complementare all'RNA estratto, detto cDNA, mantenendo inalterati i rapporti relativi di concentrazione delle diverse specie degli RNA. In questo modo è possibile, misurare l'espressione relativa di un gene ad un tempo particolare in una cellula (ad esempio in seguito ad un trattamento).

4.1.Estrazione dell'RNA totale

Aliquote di 2 ml delle colture batteriche (4 repliche) trattate con IAA, 2,4-D e IND (100 μ M) per 4 ore, come precedentemente descritto, sono state centrifugate a 13.000 rpm per 5 min e a 4 °C. Il liquido sovranatante è stato allontanato ed il pellet cellulare del congelato in azoto liquido, usato poi per l'estrazione e la purificazione dell'RNA totale, seguendo i passaggi qui di seguito descritti:

Aggiungere 1 ml di buffer di lisi (280 μl/ml di SDS 5%, 8 μl/ml EDTA 0,5 M, 1,5 μl/ml
 Proteinasi K 50 mg/ml) preriscaldato e incubare per 10 minuti a 65 °C

- Aggiungere 500 µl di NaCl 5 M, incubare per 5 minuti in ghiaccio e centrifugare per 10 minuti a 14.000 rpm a 4 °C
- Recuperare il sovranatante, aggiungere 1 volume di isopropanolo, agitare a mano e centrifugare come prima
- Allontanare il sovranatante, lavare il pellet con 200 µl di EtOH 70% (3 volte) e centrifugare come prima
- o Eliminare l'etanolo sovranatante e lasciare asciugare il pellet a temperatura ambiente
- \circ Idratare il pellet in H₂O DEPC (50 µl) (acqua RNase free).

L'RNA totale estratto è stato poi quantizzato in ng/µl utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis ThermoScientificTM NanoDrop 2000 che misura micro-volumi (0,5 - 2,0 µl) di campioni di dsDNA, ssDNA, RNA e proteine, pipettando il campione direttamente su una superficie di misurazione ottica. Un rapporto di assorbanza 260/280 di 2.0 è generalmente accettato come "purezza" dell'RNA. L'integrità dell'RNA è stata analizzata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio 1.5% in TAE 1x (Tris-acetato-EDTA) caricando 4 µl dell'RNA totale estratto. Per valutare la qualità dell'RNA batterico sono stati presi come riferimento l'integrità delle bande corrispondenti agli RNA più abbondanti in una cellula batterica (96% dell'RNA totale), ovvero gli RNA ribosomiali 23S e 16S.

4.2. Trattamento con DNasi I

Le tracce di DNA presente nei campioni di RNA totale estratto, riscontrato dalla visualizzazione su gel d'agarosio, sono state rimosse mediante un trattamento con DNasi I (endonucleasi non-specifica che taglia all'interno del singolo e doppio filamento di DNA) e purificazione dell'RNA totale utilizzando il kit commerciale TURBO DNA-freeTM Kit (Ambion by Life Technologies) seguendo le istruzioni della casa produttrice.

La qualità dell'RNA è stata valutata mediante elettroforesi su gel d'agarosio 1.5% in TAE 1x e la sua concentrazione determinata in ng/ μ l al NanoDrop 2000 come decritto prima. L'RNA totale libero da DNA è stato conservato a -20 °C fino a ulteriore utilizzo.

4.3. Sintesi del cDNA mediante retrotrascrizione dell'RNA (RT-PCR)

Il cDNA a singolo filamento è stato sintetizzato da 1 μ g di RNA totale utilizzando il kit QuantiTect® reverse transcription kit (QIAGEN), seguendo le istruzioni della casa produttrice. I campioni di cDNA ottenuti sono stati diluiti 1:10 e conservati a -20 °C per essere utilizzati nelle reazioni di *Real Time* PCR.

4.4.Allestimento della reazione di qRT-PCR e analisi del livello di espressione genica

La coppia dei primer specifici del gene target nifH di RCA25 di seguito indicata: forward 5'-CGAGGAAGTTAATCGCGGTG-3' e reverse 5'-ATTCCACGCGTTTGATCCTG-3' è stata utilizzata per le analisi qRT-PCR. La coppia di primer del gene dnaA di RCA25, costitutivamente espresso (housekeeping) (Defez et al., 2017; forward 5'-GTAAAGGCCCTGCAAAACAA-3' e reverse 5'-AACGATCCGAGGTCAAAATG-3') è stata inclusa nelle analisi qRT-PCR ai fini della normalizzazione dei dati. La miscela di reazione ($V_f = 20 \mu l$) è stata allestita utilizzando 10 µl di iQTM SYBR[®] Green Supermix 2X (Bio-Rad), 1µl delle coppie di primers (target e housekeeping) e 5 µl dei campioni di cDNA diluiti. Sono stati allestiti controlli negativi per escludere la presenza di eventuali contaminazioni nei reattivi della miscela di reazione. Il programma di amplificazione prevede 15 minuti iniziali a 95 °C e 40 cicli composti da: 20 secondi a 95 °C, 20 secondi alla temperatura di annealing dei primers utilizzati e 35 secondi a 72 °C, dopo i cicli seguono 10 minuti a 72 °C. Durante le reazioni di amplificazioni, il segnale di fluorescenza dovuto all'intercalante SYBR Green, in tempo reale, è stato monitorato per quantificare i prodotti a doppio filamento di DNA formati in ciascun ciclo di PCR. I risultati sono stati registrati come cambiamenti relativi dell'espressione genica dopo la normalizzazione con l'espressione del gene housekeeping e calcolati utilizzando il metodo comparativo del CT (2- AACT) come descritto da Livak e Schmittgen (2001). Il valore 2 - $\Delta\Delta CT$ risulta essere >1 per i geni più espressi nelle cellule RCA25 trattate con IAA, 2,4-D e IND; mentre il valore <1 è relativo ai geni più espressi nelle cellule di RCA25 non trattate. I dati qRT-PCR sono la media ± deviazione standard (DS) di almeno quattro repliche biologiche ciascuna condotta in momenti diversi.

5. Quantizzazione del livello di produzione di IAA batterico: metodo Salkowski

Per valutare i livelli di produzione di IAA rilasciati nel mezzo di coltura batterico è stato utilizzato un metodo colorimetrico (Salkowski et al., 1885) che prevede l'uso del reagente Salkowski (FeCl₃ 0.5 M in acido perclorico al 35%). Il reagente utilizzato permette l'ossidazione dei composti indolici di sali ferrici e porta ad una colorazione rosa della soluzione. L'intensità di colore varia a seconda della concentrazione di composto indolico in essa presente.

Il saggio è stato effettuato su 5 repliche biologiche di ciascun ceppo: RCA23, RCA24, RCA25 e 377. I pre-inoculi sono stati allestiti in un volume di 1 ml di mezzo ricco (LB per i ceppi RCA23, RCA24 e RCA25; TY-CM per 377) posti ad incubare *over-night* a 30 °C su un agitatore a 200 rpm. Successivamente i pre-inoculi sono stati diluiti (dil. 1:10) in un volume finale di 10 ml di mezzo ricco contenente Triptofano per una concentrazione finale di 100 μ M, e incubati *over-night* a 30 °C su un agitatore a 200 rpm.

Al termine dell'incubazione, le colture (V=10 ml) sono state centrifugate per 15 minuti a 5.000 rpm e a temperatura ambiente. Un'aliquota di sovranatante (1 ml) di ciascuna replica è stata trasferita in un tubo di vetro, mentre i *pellets* batterici sono stati seccati in Savant a 60 °C per circa 1 ora e pesati. Il peso ottenuto è stato poi utilizzato per normalizzare il dato.

Per determinare i livelli di IAA presenti nei sovranatanti batterici, è stata costruita una retta di taratura aggiungendo concentrazioni crescenti dello standard IAA in 1 ml di mezzo ricco sterile. Un controllo negativo, contente 1 ml di mezzo ricco sterile, è stato usato come riferimento.

Il reagente Salkowski (1 ml) è stato aggiunto in rapporto 1:1 ai tubi contenenti i campioni ed ai tubi della retta di taratura. Le miscele sono state agitate ed incubate al buio per 30 minuti. Al termine della reazione è stata effettuata la lettura dell'assorbanza a 530 nm dei campioni e della retta di taratura. Le µmoli di IAA prodotte da ciascun campione sono state calcolate mediante interpolazione grafica dei dati relativi allo standard IAA. Infine i dati ottenuti sono stati normalizzati rispetto ai mg di cellule saggiate.

6. Analisi quantitativa della formazione di biofilm batterico in mezzo ricco

Per valutare la capacità dei batteri selezionati di formare biofilm, i ceppi RCA23, RCA24, RCA25 e 377 sono stati coltivati in terreno ricco (LB o TY-CM per 377) e incubati a 30 °C in una piastra *mutiwell* di polistirene (150 μ l per pozzetto). Dopo 20 h di incubazione in condizioni statiche, le cellule non adese sono state rimosso per inversione della piastra e le cellule adese sono state fissate, colorate e quantificate come descritto sopra (paragrafo 2).

7. Marcatura batterica con proteine fluorescenti (FP)

Per analizzare al microscopio confocale la localizzazione dei batteri di interesse all'interno dei tessuti radicali della pianta ospite è stato necessario trasformare gli endofiti di interesse con plasmidi che esprimono marcatori selezionabili. Due derivati della proteina fluorescente verde (GFP) sono stati utilizzati come geni marker selezionabili che esprimono la proteina fluorescente potenziata verde (eGFP) e la proteina fluorescente rossa (RFP). I plasmidi pMP4655 (eGFP) e pMP4662 (RFP) sono stati purificati dalle cellule ospiti DH5α di *E. coli* utilizzando colonne con resine a scambio ionico presenti nel kit commerciale PureLink[™] HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Invitrogen) seguendo la procedura qui di seguito descritta.

Equilibratura della colonna:

 Posizionare la colonna a scambio ionico, con una cartuccia di filtrazione all'interno, su una beuta che funge da contenitore di scarico; Equilibrare la colonna con 15 ml di *buffer EQ1* (Sodio acetato 0.1 M a pH 5.0, NaCl 0.6 M, Triton® X-100 0.15% (v/v)) e far scendere per gravità.

Preparazione del lisato cellulare:

- Risospendere il pellet con 10 ml di *buffer R3* contenente *RNase A* (20 mg/ml in Sodio acetato 10 mM, pH 5.2) (Tris-HCl 50 mM a pH 8, EDTA 0.10 mM) mescolare delicatamente fino ad ottenere una sospensione omogenea;
- Lisare le cellule con 10 ml di *buffer L7* (NaOH 0.2 M, SDS 1% (w/v)), agitare delicatamente e incubare a temperatura ambiente per 5 minuti;
- Precipitare il lisato con 10 ml di *buffer N3* (Potassio acetato 3.1 M, pH 5.5), mescolare invertendo il tubo 10 - 15 volte.

Legare e lavare il DNA dalla colonna:

- Rovesciare la sospensione nella colonna e far scendere per gravità;
- o Lavare la colonna con 10 ml di *buffer W8* (Sodio acetato 0.1 M, pH 5, NaCl 0.825 mM);
- Eliminare la cartuccia di filtrazione interna alla colonna e lavare la colonna con 20 ml di *buffer* W8.

Eluizione e precipitazione del DNA:

- Trasferire la colonna su un tubo da 15 ml ed eluire il DNA plasmidico con 5 ml di *buffer E4* (Tris-HCl 100 mM, pH 8.5, NaCl 1.25 M) facendolo precipitare in 3.5 ml di *Isopropanolo* ed incubare per 2 minuti a temperatura ambiente;
- Centrifugare a 8000 rpm per 40 minuti a 4°C;
- Allontanare il sovranatante e lavare il pellet con 3 ml di *Etanolo 70%* e centrifugare a 8000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente;
- Rimuovere l'etanolo e lasciar asciugare il pellet all'aria;
- ο Risospendere il pellet di DNA plasmidico 100-200 μl di H₂O MilliQ sterile.

La qualità del DNA plasmidico purificato e la completa degradazione dell'RNA è stata visualizzata mediante una corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1.5 %. La quantizzazione è stata ottenuta mediante uno spettofotometro di micro-volumi (*NanoDrop2000*) caricando 2 µl del DNA plasmidico purificato.

Le cellule elettrocompetenti dei ceppi RCA25, RCA24 e 377 sono state preparate come segue: le cellule batteriche sono state coltivate in mezzo LB fino alla fase esponenziale ($OD_{600} = 0.5$), lavate due volte con acqua sterile preraffreddata, una volta con Glicerolo 10%, infine risospese in glicerolo 10% freddo. Aliquote (20 µl) di cellule rese competenti sono state congelate a -80°C. Per la trasformazione tramite elettroporazione, le cellule competenti sono state scongelate in

ghiaccio ed il DNA plasmidico purificato aggiunto alle cellule e rapidamente miscelato. Per trasformare le cellule di RCA25 è stato utilizzato il DNA plasmidico purificato pMP4662 (500 ng) mentre per trasformare le cellule di RCA24 e 377 è stato utilizzato il DNA plasmidico purificato pMP4655 (500 ng). Ogni miscela è stata incubata in ghiaccio per 1 minuto e trasferita in una cuvetta (spazio interelettrodo di 0,1 cm) sterile pre-raffreddata e posizionata all'interno dell'elettroporatore Gene Pulser II dotato di un Pulser Controller (BioRad Laboratories). L'unità di elettroporazione è stata utilizzata con le seguenti impostazioni: 2,5 kV, 25 μ F, 200 Ω e tempo dell'impulso 4–5 ms. Le cellule sono state immediatamente diluite con 1 ml di mezzo LB, trasferito in un tubo sterile e incubate a 30 °C per 4 ore. Dopo l'incubazione a 30°C, un'aliquota di 100 μ l di ciascun campione è stata spatolata su una piastra di terreno LB-agar contenente 20 μ g/ml di tetraciclina (Tc) ed incubata a 30 °C per 2 giorni. Le colonie cresciute su piastre selettive sono state selezionate in modo casuale e la presenza dei plasmidi pMP4655 o pMP4662 è stata verificata utilizzando un microscopio a fluorescenza.

La trasformazione delle cellule di RCA23 con il DNA plasmidico purificato pMP4655 è stata eseguita con il metodo del trasferimento genico laterale triparentale. Questo metodo di trasformazione prevede l'utilizzo di un ceppo donatore (E. coli DH5a che ospita il plasmide pMP4655), un ceppo helper (E. coli HB101 che ospita il plasmide pRK2013) e un ceppo ricevente (E. asburiae RCA23). I tre ceppi sono stati coltivati in mezzo LB fino alla fase di crescita esponenziale. Aliquote (2 ml) delle colture sono state poi centrifugate a 6000 rpm per 3 minuti a temperatura ambiente. Il surnatante è stato rimosso e il pellet è stato lavato una volta con 1 ml di MgSO₄ 10 mM e poi risospeso in 350 µl della soluzione di MgSO₄ alla stessa concentrazione utilizzata per il lavaggio. La miscela di trasformazione prevede l'utilizzo di 100 µl di cellule di RCA23 miscelati delicatamente con 20 µl di entrambe le cellule helper e donor. La miscela così formata è stata spottata su piastra LB-agar e incubata per tutta la notte a 30 °C. Due controlli negativi sono stati allestiti: uno contenente le cellule di RCA23 e l'helper e un altro contenente le cellule donatrici e l'helper. Dopo 24 h di incubazione a 30 °C, alcune colonie batteriche presenti sullo spot sono state prelevate con un'ansa sterile e strisciate su piastre LB-agar contenente l'antibiotico selettivo Tc (20 µg/ml). Questa procedura è stata eseguita 3-4 volte per isolare colonie pure. Anche in questo caso la presenza del plasmide è stata verificata utilizzando un microscopio a fluorescenza.

Le colonie trasformate selezionate sono state crioconservate a -80 ° C in brodo LB ($OD_{600} = 0.7$ -0.8) con una soluzione contenente di-metil-solfossido (DMSO) 16% (v/v) e glicerolo al 10% (v/v).

8. Inoculazione e crescita delle piante di riso

8.1 Sterilizzazione e germinazione dei semi di riso

I semi decorticati di *O. sativa* cultivar Baldo e Vialone Nano, forniti dal CREA-CI, Centro di ricerca di Cerealicoltura e Colture Industriali, Vercelli, Torino, Italia, sono stati sterilizzati in superficie con etanolo al 70% per 7 minuti, sciacquati con acqua sterile ed incubati in soluzione di ipoclorito di sodio al 5% per 25 minuti a temperatura ambiente sotto costante agitazione. I semi sono stati poi lavati diverse volte con acqua deionizzata sterile e posizionati sulla superficie di piastre acqua-agar allo 0.8% e incubati a 21 °C (in camera termostatata) al buio per la germinazione.

8.2 Metodi di inoculazione

Dopo i 5 giorni di germinazione, per facilitare l'assorbimento dei batteri le radici dei semi di riso germinati sono stati tagliati (0,5 cm dall'estremità) con un bisturi sterile. Per l'infezione, questi ultimi sono stati incubati con una sospensione dei batteri in PBS 1X in piastre Petri sotto costante agitazione delicata per 4 ore a temperatura ambiente. Semi incubati in PBS 1X non contenente i batteri sono stati usati come controllo non inoculato.

Per l'inoculazione sono stati utilizzati tre diversi metodi. Metodo 1 "inoculazione singola" (*single inoculation*): le piantine sono state incubate con un solo ceppo selezionato a una concentrazione batterica di 10^6 o 10^7 cellule per ml in una soluzione PBS 1X, come descritto prima. Metodo 2 "inoculazione in due fasi" (*two-step inoculation*): le piantine sono state incubate per 2 ore con il primo ceppo 10^6 cellule per ml, la sospensione cellulare è stata poi rimossa e le piantine sono state trattate con un secondo ceppo alla stessa concentrazione per altre 2 ore. Nessun lavaggio è stato eseguito tra le incubazioni con i due batteri. Metodo 3 "co-inoculazione" (*co-inoculation*): le piantine con le radici tagliate sono state incubate per 4 ore con una miscela batterica a due componenti, contenente il ceppo azotofissatore RCA25 ad una concentrazione di 10^7 cellule per ml.

8.3 Coltivazione delle piante

I semi infettati sono stati poi trasferiti in vasi di plastica contenenti terreno asettico (sabbia e perlite in rapporto 1: 1) come descritto in Defez et al. (2017), o in unità idroponiche (tubi di plastica di 15 cm di lunghezza e 5 cm di diametro) contenenti il terreno privo di azoto Kimura B riportato in Gao et al. (2019) con alcune modifiche, i macronutrienti KH₂PO₄ (0,2 mM), KNO₃ (0,01 mM), K₂SO₄ (0,1 mM), CaSO₄ (0,4 mM), MgSO₄ · 7H₂O (0,5 mM) e i micronutrienti Fe-

EDTA (0,11 mM), MnSO₄ (1,8 μ M), H₃BO₃ (46 μ M), ZnSO₄ · 7H₂O (0,3 μ M) e CuSO₄ · 5H2O (0,3 μ M).

Per analizzare l'effetto di IAA purificato sull'attività della Nitrogenasi di RCA25 in pianta, piante di riso inoculate con RCA25 sono state coltivate per 3 settimane in sistemi di coltivazione idroponica contenente la soluzione Jensen (Jensen, 1942) priva di azoto. Il mezzo di crescita è stato poi sostituito con una soluzione PBS contenente IAA alla concentrazione finale di 4 µM e le piante sono state mantenute nella camera di crescita per 4 ore. Dopo il trattamento con IAA, le piante sono state accuratamente rimosse dai vasi e utilizzate per il saggio ARA. Per verificare la specificità di IAA, molecole purificate simile all'IAA dal punto di vista funzionale (2,4-D) e strutturale (IND e acido indole-3-carbossilico (ICA)), sono state solubilizzate in EtOH al 50% e testate ad una concentrazione finale di 4 µM. Per evitare interferenze con il solvente, alcune piante di controllo sono state trattate con una quantità simile della soluzione di etanolo. Per esperimenti di microscopia confocale, è stata utilizzata l'inoculazione in due fasi e la co-inoculazione. Ogni unità di semina è stata mantenuta nella camera di crescita con 8 ore di buio e 16 ore di luce, a una temperatura di 19-23 °C rispettivamente, e umidità relativa del 75%. Per gli esperimenti in serra è stato utilizzato il metodo dell'inoculazione singola e di co-inoculazione.

9. Test ARA su piante di riso inoculate

Piante di riso di tre settimane (*O. sativa* cvs Baldo and Vialone Nano) cresciute in vasi con terreno asettico (come descritto prima), e piante di riso di due settimane (*O. sativa* cv. Baldo and *O. glaberrima* RAM133) coltivate con il sistema idroponica (come descritto prima), sono state accuratamente rimosse dai vasi e le radici sono state sciacquate con acqua. Il test di riduzione dell'acetilene è stato eseguito usando una pianta per tubo di vetro (20 ml) contenente 2 ml di terreno minimo M9 1X privo di fonti di azoto e sigillato con apposito tappo di silicone. I tubi, contenenti un'atmosfera del 2,5% di O₂, 10% di acetilene e 87,5% di azoto, sono stati incubati in serra per 20 ore. Il livello di etilene prodotto nel tubo è stato misurato mediante gascromatografo, come descritto dettagliatamente prima, settato con un programma attenuazione -3.

10. Analisi di radici di riso inoculate al microscopio confocale (CLSM)

Piante *Oryza sativa* Baldo inoculate singolarmente (*single inoculation*) con i ceppi batterici marcati con proteine fluorescenti (RCA25-RFP, RCA24-eGFP, RCA23-eGFP e 377-eGFP) sono state analizzate al microscopio confocale per verificare la capacità di questi batteri di colonizzare internamente le radici di riso. Campioni di radici di riso, quattro per ogni tesi di inoculazione, RCA25-RFP + RCA23-EGFP, RCA25-RFP + RCA24-EGFP, RCA25-RFP + 377-EGFP, 13

giorni dopo l'inoculazione (DAI, *day after inoculation*) secondo i metodi di *two-step inoculation* e *co-inoculation*, come descritto prima, sono stati analizzati al microscopio confocale per studiare e monitorare la doppia colonizzazione batterica nei tessuti radicali.

Le piante di riso sono state accuratamente rimosse dai vasi e gli apparati radicali lavati con acqua. Le immagini delle sezioni di radici osservate sono state raccolte utilizzando un microscopio Axioskop 2 MOT (Carl Zeiss, Jena GmbH, Germany) dotato di un laser a cripton e a argon, controllato dal software Carl Zeiss Laser Scanning System LSM5 PASCAL (Carl Zeiss). Le cellule batteriche marcate con la proteina fluorescente eGFP sono state eccitate con il laser Ar 488 nm e sono state rilevate nell'intervallo di 500-520 nm. Le cellule batteriche marcate con la proteina fluorescente RFP sono state eccitate con il laser Kr 568 nm e rilevate nell'intervallo di 580-620 nm. I dati del microscopio sono stati registrati e trasferiti per l'analisi sul software Zeiss LSM Image Browser version 4.0 (Carl Zeiss). La colonizzazione batterica delle radici del riso è stata analizzata su sezioni tridimensionali (3D) del campione di radice. Per costruire le immagini mostrate nella sezione Risultati sono state costruite le proiezioni delle sezioni ottiche confocali adiacenti. Le immagini finali sono state elaborate per luminosità e contrasto con il software Photoshop 4.0 (Adobe Systems, San Jose, CA).

11. Ri-isolamento degli endofiti da piante di riso inoculate

La colonizzazione delle piante di riso (*O. sativa* Baldo) inoculate attraverso i metodi della *single inoculation* e *co-inoculation* con il diazotrofo RCA25 e con gli endofiti produttori di IAA (RCA23, RCA24 e 377), marcati con proteine fluorescenti è stata valutata a 15 DAI e cresciute in terreno solido asettico.

La superficie dell'intera pianta è stata sterilizzata usando la seguente procedura: 1 minuto in EtOH al 70%, diversi lavaggi con acqua sterile e poi incubazione per 5 minuti in una soluzione di ipoclorito di sodio al 5% contenente 0,1% di tween20. I tessuti dell'intera pianta sono stati successivamente lavati più volte con acqua deionizzata sterilire ed omogeneizzati usando un mortaio e pestello sterile con 5 ml di PBS 1X. Le diluizioni degli omogenati (1:100 per l'estratto di piante Baldo e 1:1000 per le piante RAM133 coltivate in terreno solido; 1:1000 per l'estratto di piante Baldo cresciute in idroponica) sono state distribuite su piastre agar di terreno ricco contenente gli antibiotici specifici. Dopo 24 ore a 30 °C, l'identità degli endofiti ri-isolati è stata verificata in base alla loro resistenza agli antibiotici e il numero di CFU (unità formanti colonie) è stato contato.

L'efficienza della colonizzazione è stata presentata come rapporto CFU basato sul ceppo RCA25. Per determinare la distribuzione della popolazione batterica all'interno delle piante co-inoculate con i ceppi RCA25 *tagged* RFP (10⁷ cellule per ml) e RCA24 *tagged* eGFP a (10⁶ cellule per ml) è stato contato il numero di CFU. Le colonie sono state distinte in base alla diversa colororazione (rossa e verde) mostrata su piastre di LB- agar contenente l'antibiotico specifico. I numeri CFU di piante inoculate con i singoli ceppi alle stesse concentrazioni sono stati usati come riferimento.

12. Esperimenti di inoculazione in *Greenhouse* ed analisi dei parametri fisiologici di crescita di delle cultivar di riso *O. sativa*, Baldo e Vialone nano, inoculate con i batteri endofiti, RCA25, RCA24 e RCA25 + RCA24

Semi sgusciati di O. sativa cultivar Baldo e Vialone Nano sono stati sterilizzati esternamente e germinati come descritto precedentemente. Per la single incoculation, le piantine sono state incubate separatamente con i ceppi RCA25 (10⁷ cellule per ml) e RCA24 (10⁶ cellule per ml), mentre per la co-inoculation, le piantine sono state incubate con una miscela batterica contenente RCA25 e RCA24 alla stessa concentrazione usata per l'inoculazione singola. Per ogni campione sperimentale, cinque semi germinati non inoculati (di controllo) e inoculati (RCA25, RCA24 e RCA25 + RCA24) sono stati seminati in 12 vasi di plastica (23 cm × 21 cm) riempiti con terreno non sterile di risaia (47,8% sabbia, 9,4% argilla, 42,8% limo, pH 6.4, materia organica 1,45%) prelevato dalla risaia sperimentale di CREA-CI a Vercelli (Torino) nell'aprile 2018. Le piante sono state annaffiate ogni giorno con acqua di rubinetto e mantenute in una serra per 90 giorni, seguendo il fotoperiodo naturale. A 55 giorni dalla semina, l'efficienza di inoculazione è stata misurata come descritto sopra (Metodo di ri-isolamento). A 90 giorni dalla semina (ovvero fase di fioritura della prua), il misuratore SPAD (Konica Minolta, Milano, Italia) è stato utilizzato per la stima del contenuto di clorofilla delle foglie. Il rapporto tra concentrazione di clorofilla (CHL) e flavonoide (FLA), che è chiamato NBI (NBI = CHL/FLA), è stato anche registrato come indicatore dello stato di azoto della pianta all'inizio della fase di fioritura (Tremblay et al., 2012) utilizzando il misuratore di clorofilla DUALEX 4 Scientific (Dx4) (Force-A, Parigi, Francia) (Goulas et al., 2004). Le misurazioni sono state eseguite su entrambe le facce adassiali e abassiali della foglia di pannocchia per ogni pianta.

Le piante sono state poi rimosse dai vasi, immerse in acqua di rubinetto per rimuovere il terreno dal sistema radicale e misurate l'altezza e il peso dei fusti. Le piante sono state poi essiccate per 48 ore a 70 °C e pesate per determinare la massa secca del fusto. Il contenuto totale di azoto in 5 mg di materiale essiccato è stato determinato utilizzando un analizzatore elementare (Flash EA 1112, Thermo Finnigan) a 950 °C. Le curve di calibrazione per l'analizzatore elementare utilizzato per le analisi del contenuto di azoto sono state determinate utilizzando lo standard di atropina a diverse concentrazioni note di contenuto di azoto (LAR, Piemonte, Italia).

13. Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata eseguita applicando l'analisi della varianza a una via (ANOVA), seguita dal test post hoc di Tukey, utilizzando il programma ANOVA VassarStats disponibile su http://vassarstats.net/index.html. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi quando $P \le 0,05$. Sono stati effettuati cinque replicati biologici per la misurazione di biofilm, per l'analisi del livello di espressione genica, attività nitrogenasica, produzione IAA, contenuto di azoto ed endofiti re-isolati da piante inoculate. La valutazione dei parametri fisiologici è stata eseguita su 40 replicati biologici.

Risultati

1. Effetto del trattamento esogeno con IAA e i suoi analoghi strutturali (IND) e funzionali (2,4-D), sulla crescita batterica e sulla formazione di biofilm di RCA25

Per analizzare gli effetti della molecola IAA sulla crescita di *E. cloacae* RCA25, sono state aggiunte diverse concentrazioni (0,01 mM, 0,1 mM, 0,72 mM e 2,86 mM) del composto purificato e le colture batteriche sono state esaminate nel tempo, come descritto nella sezione Materiali e Metodi. I risultati hanno mostrato che la concentrazione massima di IAA che non influenzava la crescita batterica era 0,1 mM (Fig. 1). Questa concentrazione è stata selezionata anche per i trattamenti con 2,4-D e IND, molecole funzionalmente e chimicamente simili all'IAA, rispettivamente. Le cellule batteriche di RCA25 trattate con IAA e 2,4-D mostravano curve di crescita molto simili. La curva di crescita delle cellule di RCA25 non trattate (controllo) era invece molto simile a quella delle cellule trattate con IND (Fig. 2A). Le colture batteriche di RCA25 in terreno minimo trattate con IAA, 2,4-D e IND sono state utilizzate per la quantizzazione della produzione di biofilm. I risultati hanno mostrato che le cellule di RCA25 trattate con IAA e 2,4-D producevano livelli simili di biofilm rispetto alle cellule non trattate. Quando, invece, le cellule batteriche sono state trattate con IND, è stato misurato un maggiore sviluppo di biofilm (fino al 20%) rispetto alle cellule non trattate (Fig. 2B).

2. Livello di trascrizione del gene *nifH* e attività nitrogenasica in cellule di RCA25 trattate esogenamente con IAA, 2,4-D e IND

Per valutare l'effetto dei trattamenti con IAA, 2,4-D e IND sulla capacità di fissazione dell'azoto di *E. cloacae* RCA25, il livello di espressione del gene *nifH* è stato misurato nelle cellule di RCA25 trattate con le molecole in esame e confrontato con il livello di espressione dello stesso gene in cellule non trattate. I risultati ottenuti hanno mostrato che il livello di trascrizione del gene *nifH* aumentava significativamente (1.6 volte) nelle cellule trattate con IAA. Al contrario, l'espressione di *nifH* non cambiava significativamente dopo il trattamento con 2,4-D e IND (Fig. 2C).

L'attività dell'enzima nitrogenasi delle cellule RCA25 è stata poi misurata mediante il saggio di riduzione dell'acetilene (ARA) dopo il trattamento con questi composti. Quando le cellule non trattate sono state utilizzate come riferimento, è stato misurato un maggiore aumento (25%) dell'attività nitrogenasica per le cellule trattate con IAA (Fig. 2D). Un incremento significativo ma inferiore (18%) è stato anche osservato per le cellule trattate con IND. Infine, il trattamento con 2,4-D non influenzava l'attività dell'enzima rispetto al controllo non trattato.



Figura 1: Curva di crescita di RCA25 in risposta al trattamento con dosi progressivamente crescenti della molecola IAA. Diverse concentrazioni (mM) della principale auxina acido indolo-3-acetico (IAA) sono state aggiunte esogenamente in colture liquide di RCA25 e la sua crescita cellulare è stata misurata nel tempo. I dati presentati sono la media \pm deviazione standard (DS) di almeno tre replicati biologici.



Figura 2: Il trattamento esogeno con IAA induce specificamente l'espressione del gene *nifH* e l'attività dell'enzima nitrogenasi in *E. cloacae* RCA25, ma non influisce in modo significativo sulla sua crescita o formazione di biofilm. Per verificare la specificità degli effetti di IAA, un suo analogo funzionale, 2,4-D ed un analogo strutturale, IND, sono stati sciolti in una soluzione di EtOH al 50% ed aggiunti esogenamente alle colture batteriche di RCA25. Le colture non trattate con questi composti sono state usate come controllo. (A) Assorbanza a 600 nm nel tempo. (B) Saggio della capacità di formare biofilm in micropiastre di polistirene dopo trattamento esogeno con le molecole in esame. (C) Analisi quantitativa (qRT-PCR) dell'espressione genica *nifH*. L'espressione genica è stata presentata come cambiamento di espressione tra le cellule RCA25 trattate con i composti selezionati e quelle non trattate (*fold change*). (D) Attività della nitrogenasi mediante test ARA. Dopo il trattamento con i composti selezionati, le colture sono state centrifugate, i *pellet* cellulari sono stati nuovamente sospesi in un terreno minimo senza cloruro di ammonio e trasferiti in provette di vetro per il dosaggio.

I valori presentati sono la media \pm deviazione standard (SD) di almeno cinque colture batteriche indipendenti. L'asterisco in tutti i pannelli indica una differenza significativa (P <0,05, test post hoc di Tukey) tra cellule di controllo e cellule trattate.

3. Livello di produzione di IAA e capacità della formazione di biofilm per i ceppi selezionati (RCA23, RCA24, RCA25 e 377)

Una volta constatato che il trattamento esogeno con IAA influenza positivamente sia il livello di espressione del gene *nifH* che l'attività dell'enzima nitrogenasi, l'obiettivo successivo di questo lavoro è stato quello di valutare il livello di produzione di IAA negli endofiti testati mediante l'utilizzo del saggio colorimetrico Salkowski.

Il più alto livello di produzione di IAA è stato misurato per il ceppo *Staphylococcus sp.* 377. I ceppi *Enterobacter asburiae* RCA23 e *Herbaspirillum huttiense* RCA24 producevano livelli di auxina simili ma inferiori a quelli di 377. Un bassissimo livello di produzione IAA è stato invece misurato per il ceppo RCA25 (Tabella 1).

I processi di auto-aggregazione e sviluppo del biofilm sono rilevanti per la sopravvivenza batterica e la colonizzazione delle piante ospiti (Camerini et al., 2008). Pertanto, la capacità di formazione di biofilm dei ceppi RCA25, RCA24, RCA23 e 377 è stata valutata in terreno ricco. La più alta formazione di biofilm è stata osservata per *E. asburiae* RCA23 e *H. huttiense* RCA24, mentre la quantità di biofilm prodotta dai ceppi *E. cloacae* RCA25 e *Staphylococcus sp.* 377 era la più bassa come mostrato i dati riportati nella Tabella 1.

4. Capacità di colonizzazione dei ceppi produttori di IAA

La capacità degli endofiti selezionati di colonizzare individualmente piante di riso *O. sativa* Baldo è stata valutata misurando le unità formanti colonie (CFU) isolate dai tessuti dell'intera pianta ospite mediante il protocollo di estrazione degli endofiti descritto nella sezione Materiali e Metodi.

Per valutare l'esistenza di una competizione da colonizzazione tra i singoli produttori di IAA ed il ceppo di riferimento RCA25 (azoto-fissatore) il numero di CFU di piante inoculate con RCA25 è stato utilizzato come riferimento. La massima capacità di colonizzazione è stata osservata per il ceppo RCA24 (CFU RCA24/CFU RCA25 = $1,32 \pm 0,23$), mentre i ceppi RCA23 e 377 hanno mostrato una capacità di colonizzazione inferiore (CFU RCA23/CFU RCA25 = $0,34 \pm 0,08$ e CFU 377/CFU RCA25 $0,04 \pm 0,01$).

5. Selezione dell'endofita produttore di IAA per la co-inoculazione di piante di riso

Per valutare l'effetto che la produzione di IAA da parte di batteri endofitici ha sulla capacità di fissazione dell'azoto di *E. cloacae* RCA25, sono stati utilizzati due metodi di infezione di *O. sativa* baldo, *two-step inoculation* e *co-inoculation*. I risultati hanno mostrato che l'inoculazione in due fasi delle piante di riso Baldo con i ceppi RCA25 e RCA24, entrambi alla concentrazione di 10⁶ cellule/ml, portava ad un aumento significativo dell'attività della nitrogenasi, indipendentemente da quale ceppo era usato per primo nella procedura di inoculazione (Fig. 3A e 3B). L'aumento più elevato (fino al 60%) è stato misurato quando il ceppo RCA25 è stato utilizzato per primo, rispetto alle piante inoculate solo con questo ceppo (Fig. 3A).

Le piante di riso inoculate con 377+RCA25, RCA25+377, RCA23+RCA25 e RCA25+RCA23 hanno mostrato una riduzione dell'attività nitrogenasica del 40%, 30%, 10% e 50%, rispettivamente, quando le piante inoculate singolarmente con RCA25 sono state usate come riferimento.

Sono stati quindi condotti esperimenti di co-inoculazione di riso Baldo con i ceppi RCA25 e RCA24 nei rapporti 100:1, 10:1 e 1:1. Quando i due ceppi sono stati utilizzati con un rapporto 10:1 (10⁷ cellule/ml e 10⁶ cellule/ml, rispettivamente), è stato osservato un aumento significativo (fino al 50%) dell'attività della nitrogenasi rispetto alle piante inoculate solo con il ceppo RCA25 (Fig. 3C). Al contrario, la co-inoculazione con ceppi RCA25 e RCA24 in un rapporto 100:1 (10⁷ cellule/ml e 10⁵ cellule/ml, rispettivamente) non ha aumentato significativamente l'attività della nitrogenasi (Fig. 3C). Risultati simili sono stati ottenuti anche quando i due ceppi sono stati co-inoculati alla stessa concentrazione di 10⁶ cellule/ml (dati non mostrati).

Quando il test ARA è stato condotto su piante inoculate con il ceppo RCA25 capace di overprodurre IAA (RCA25-64) alla concentrazione di 10⁷ cellule/ml, l'attività della nitrogenasi aumentava fino al 70% (Fig. 3C).

6. Effetto dell'IAA esogeno sulla fissazione dell'azoto in piante di riso inoculate con RCA25

Per valutare la specificità dell'effetto di IAA sulla fissazione dell'azoto in pianta, piante di 3 settimane inoculate con RCA25 (10⁷ cellule/ml) sono state trattate con molecole purificate strutturalmente (IND e ICA) e funzionalmente (2, 4-D) simili all'IAA. Nelle nostre condizioni, nessuno dei composti testati influenzava in modo significativo l'attività dell'enzima nitrogenasi (Fig. 3D), indicando così che l'induzione osservata era una peculiarità della molecola IAA.

Strain	IAA production ^a	Ratio	Biofilm ^b	
	(µmol mg ⁻¹ cells)		(OD _{570nm})	Katio
377	0.114 ± 0.007	22.8*	0.15 ± 0.01	0.75*
RCA23	0.040 ± 0.002	8.0*	0.71 ± 0.02	3.5*
RCA24	0.036 ± 0.011	7.2*	0.69 ± 0.02	3.4*
RCA25	0.005 ± 0.001		0.20 ± 0.03	

Tabella 1: Caratterizzazione dei ceppi selezionati per la produzione di IAA e la capacità di formazione di biofilm

Ratio è il calcolo del rapporto basato sulle colture di RCA25. I valori riportati nella tabella sono le medie \pm deviazione standard (SD) di almeno quattro colture batteriche indipendenti.

a. Per questo saggio sono state utilizzate colture in fase stazionarie trattate con L-triptofano.

b. Quantizzazione della colorazione con violetto di genziana.

* Il significato dei dati (P <0,01) è stato confermato dal test Student's t.



Figura 3: Attività nitrogenasica di piante di riso di tre settimane (*Oryza sativa* Baldo) inoculate con diverse combinazioni degli endofiti selezionati. (**A**) Attività della nitrogenasi nelle piante di riso inoculate con il metodo *two-step inoculation* (ceppi alla concentrazione di 10^6 cellul/ml). (**B**) Attività della nitrogenasi nelle piante di riso inoculate con gli stessi ceppi usati in A ma con un ordine inverso. (**C**) Attività della nitrogenasi in piante di riso inoculate singolarmente con RCA25 o RCA25-64, entrambi alla concentrazione di 10^7 cellule/ml e co-inoculate con RCA25 e RCA24 miscelati in due rapporti (100:1 e 10:1). (**D**) Effetto di molecole purificate, strutturalmente (IND e ICA) e funzionalmente (2,4-D) simili all'IAA, sulla fissazione dell'azoto in piante di riso inoculate con RCA25. I risultati del test ARA sono presentati come media ± SD di almeno cinque replicati di piante. Gli asterischi in tutti i pannelli indicano una differenza significativa (P <0,05, test post hoc di Tukey) tra le piante inoculate con RCA25 e ciascun trattamento.

7. Capacità di colonizzazione della coppia RCA25-RCA24

Per misurare la capacità di colonizzazione dei ceppi RCA25 e RCA24 *tagged* con la proteina fluorescente rossa (RFP) e la proteina fluorescente verde potenziata (EGFP) sono stati utilizzati per la *single-inoculation* di due cultivar di riso *O. sativa*, Baldo e Vialone Nano. La inoculazione singola è stata eseguita utilizzando una concentrazione finale di RCA25 (10⁷ cellule/ml) 10 volte superiore alla concentrazione usata per RCA24 (10⁶ cellule/ml). Questa concentrazione finale è stata scelta per due motivi: 1) il ceppo RCA24 è un colonizzatore più efficiente di RCA25 (vedi paragrafo 4); 2) piante di riso co-inoculate con questi ceppi batterici alle concentrazioni sopra indicate mostrano un aumento significativo dell'attività nitrogenasica (paragrafo 4). I valori di CFU sono stati valutati sia per radici e che fusti, separatamente.

Quando sono stati analizzati i tessuti radicali delle piante di riso Baldo, abbiamo osservato che il numero di CFU misurato per RCA25-RFP (1757 \pm 272) era superiore del 50% rispetto a quello stimato per RCA24-EGFP (1123 \pm 103). Per le piante di riso Vialone Nano è stato osservato un comportamento diverso: i valori CFU ottenuti per RCA25-RFP (130 \pm 12) e RCA24-EGFP (3439 \pm 485) erano più bassi del 10% e tre volte più alti, rispettivamente, di quelli misurati negli estratti delle radici di riso Baldo. Nessuna delle due varietà ha mostrato una significativa colonizzazione dei tessuti di germoglio per entrambe le cultivar di riso.

La co-inoculazione dei ceppi RCA25-RFP e RCA24-EGFP in un rapporto 10: 1 è stata anche effettuata per analizzare l'efficienza della colonizzazione dei tessuti radicolari di piante di riso Baldo co-inoculate. I valori di CFU misurati per RCA24-EGFP (1973 \pm 516) erano 2,5 volte più alti di quelli valutati per RCA25-RFP (808 \pm 138).

8. Localizzazione degli endofiti negli spazi intracellulari delle radici di riso Baldo

L'uso di batteri marcati con proteine fluorescenti e la microscopia confocale a scansione laser (CLSM) hanno permesso di dimostrare, con due diversi metodi di inoculazione (*two-step inoculation* e *co-inoculation*), che tutti i ceppi batterici colonizzavano efficacemente le radici delle piante di riso Baldo.

Al momento dell'analisi, l'adesione dei batteri alla superficie della radice e la colonizzazione interna delle cellule epidermiche (compresi i peli della radice) è stata osservata per tutti i ceppi e per tutte le piante (quattro per trattamento) sottoposti all'analisi CLSM, come è esemplificato nei pannelli riportati in Fig. 4. I pannelli riflettono osservazioni rappresentative di ciascun trattamento di infezione.

Batteri attaccati lungo l'intera superficie della radice, principalmente a distribuzione casuale, non presentavano alcun sito preferito per la colonizzazione esterna della radice della pianta. Sono state invece osservate differenze nella colonizzazione interna nelle piante campionate per ogni combinazione di batteri. Le singole cellule batteriche o le microcolonie batteriche si localizzavano prevalentemente negli spazi intercellulari della corteccia radicale.

Le piante inoculate con il ceppo RCA25-RFP sono state usate come controllo per confermare la colonizzazione interna dei tessuti delle radici del riso (Fig. 4A). Infatti, il ceppo RCA25-RFP ha colonizzato sia la superficie della radice che i tessuti interni, indipendentemente dal fatto che sia stato inoculato da solo o in combinazione con gli altri ceppi (Fig. 4).

Il ceppo RCA24-EGFP sembrava essere il miglior colonizzatore, sebbene tutti i produttori di IAA (RCA23, RCA24 e 377) fossero in grado di colonizzare internamente i tessuti delle radici del riso. In effetti, tutti i produttori IAA potevano essere osservati sia all'esterno che all'interno delle radici del riso (Fig. 4).

È stato osservato che solo il ceppo RCA24-EGFP coesisteva con il ceppo RCA25-RFP nella stessa regione di ragione (Fig. 4B e 4D). Questi ceppi sono in grado di occupare la stessa nicchia radicale (Fig. 4D). Per il ceppo 377-EGFP è possibile osservare una colonizzazione endofitica della radice del riso quando questa è inoculata contemporaneamente con RCA25-RFP (Fig. 4E e riquadro), ma la co-localizzazione di entrambi i ceppi nella stessa regione all'interno della radice non è stata osservata. Tuttavia, la possibilità che entrambi i ceppi possano coesistere all'interno del tessuto della radice del riso non può essere scartata. Infine, sia RCA25-RFP che RCA23-EGFP colonizzano endofiticamente le radici di riso (Fig. 4F).

Il ceppo RCA23-EGFP colonizzava abbondantemente l'interno della radice ed era in grado di colonizzare la stessa regione occupata dal ceppo RCA25-RFP, tuttavia questi due ceppi, a differenza della combinazione RCA25-RFP + RCA24-EGFP, non coesistevano.



Figura 4: Immagini al microscopio confocale (CLSM) della localizzazione dei ceppi selezionati nei tessuti radicali della pianta ospite Baldo. Le piante di riso sono state inoculate singolarmente con il ceppo RCA25-RFP e con le seguenti combinazioni: RCA25-RFP + RCA23-EGFP, RCA25-RFP + RCA24-EGFP, RCA25-RFP + 377-EGFP e analizzate al CLSM 13 giorni dopo l'inoculazione in due fasi (two-step inoculation). L'analisi confocale è stata eseguita su radici di riso lunghe 3-4 cm per mostrare la colonizzazione batterica. Le immagini riportate nei pannelli B, C, E ed F sono le proiezioni di 10 sezioni ottiche adiacenti, mentre nei pannelli A e D sono riportate le e singole immagini confocali. I pannelli riportati in questa figura sono immagini rappresentative di quattro repliche di piante per ciascun trattamento. a: Pelo radicale colonizzato internamente da cellule batteriche RCA25-RFP. b: Localizzazione simultanea all'interno del tessuto corticale della radice di riso delle cellule batteriche RCA25-RFP e RCA24-EGFP. c: Una diversa regione di radice di riso colonizzata internamente dalla stessa combinazione RCA25-RFP + RCA24-EGFP. d: Un'immagine ravvicinata (inserto in C) che mostra entrambi i batteri che coesistono nella stessa nicchia radicolare. e: Immagine di una radice di riso colonizzata internamente, ma in aree diverse, dalla combinazione RCA25-RFP + 377-EGFP. Il ceppo 377-EGFP è stato anche in grado di colonizzare internamente il tessuto radicale in diverse regioni radicolari in cui RCA25-RFP non è stato rilevato (inserto). f: Localizzazione simultanea di entrambe le cellule batteriche RCA25-RFP e RCA23-EGFP all'interno della corteccia della radice del riso. L'asterisco in tutti i pannelli rappresenta la colonizzazione interna dei batteri, mentre la colonizzazione della superficie della radice del riso è indicata da una freccia. rh: pelo radicale; co: corteccia. La barra della scala rappresenta i 50 micron in tutti i pannelli tranne in D dove rappresenta i 20 micron.

9. Effetto della co-inoculazione sui parametri fisiologici e di crescita di due cultivar di *O. sativa*, Baldo e Vialone Nano, in condizioni di *Greenhouse*

Per valutare l'effetto sulla crescita delle piante di riso della singola inoculazione con RCA25 e RCA24 e della co-inoculazione con entrambi i ceppi in un rapporto 10:1, sono stati misurati vari parametri fisiologici sul fusto di due cultivar di riso O. sativa, Baldo e Vialone Nano. Per le due cultivar sono stati ottenuti risultati diversi (Fig. 5 e 6). A 55 giorni dalla semina, è stato verificato che le radici delle piante Baldo sono state colonizzate in modo efficiente dai ceppi selezionati, mentre le piante Vialone Nano hanno mostrato un'efficienza di colonizzazione inferiore (dati non mostrati), coerente con i dati già osservati per le piante coltivate nella camera di crescita, riportati nel paragrafo 7. A 90 giorni dalla semina sono stati analizzati sia i parametri fisiologici che di crescita della pianta ospite. Per quanto riguarda i parametri fisiologici: un significativo aumento del contenuto di clorofilla è stato misurato solo per le piante Baldo co-inoculate con RCA25 e RCA24 rispetto alle piante di controllo non inoculate (Fig. 5A e 5C). Per Vialone Nano, è stata misurata una riduzione significativa del contenuto di clorofilla quando le piante sono state inoculate singolarmente con il ceppo RCA25 o in combinazione con RCA24. Il contenuto di flavonoidi non è stato significativamente modificato in nessuna delle cultivar testate (Fig. 5B). Per l'indice di bilancio dell'azoto (NBI), è stato misurato un aumento significativo per le piante Baldo inoculate singolarmente con RCA25 e co-inoculate con RCA25 e RCA24, rispetto al controllo non inoculato. Un risultato opposto (riduzione del parametro NBI) è stato ottenuto per le piante Vialone Nano. I dati misurati con l'analizzatore SPAD (Fig. 5D) hanno confermato quelli ottenuti con il Dualex e hanno anche mostrato un contributo positivo della singola inoculazione con ceppo RCA24 per il riso Baldo. Dall'analisi dei parametri di crescita a 90 giorni dalla semina ha evidenziato che sia il riso Baldo inoculato singolarmente che quello co-inoculato mostravano un significativo miglioramento dell'altezza e del peso secco (DW) del fusto, (Fig. 6) rispetto alle piante di controllo non inoculate utilizzate come riferimento. Tuttavia, le piante co-inoculate hanno mostrato il più alto aumento di DW (fino all'89%, P <0,05) (Fig. 6B) e contenuto di N (fino all'80%, P <0,01) (Fig. 6C). Al contrario, non sono stati osservati effetti positivi sui parametri di crescita per il riso Vialone Nano, quando le piante di controllo non inoculate sono state usate come riferimento (Fig. 6). Risultati simili alle condizioni di crescita in Greenhouse sono stati osservati per le piante Baldo (di 3 settimane) co-inoculate con RCA25 e RCA24 e cresciute in condizioni di camera di crescita. Le piante co-inoculate hanno mostrato un aumento di DW (Baldo + RCA25, germogli DW = 9 1 mg; Baldo + RCA25 + RCA24, spara DW = 12 3 mg) e del contenuto di N (Baldo + RCA25, N = 0,14 0,03 g per pianta; Baldo + RCA25 + RCA24, N = 0,19

0,02 g per pianta) rispettivamente del 44% e del 36%, quando le piante inoculate con RCA25 sono state usate come riferimento.



Figura 5: La co-inoculazione influenza il contenuto di clorofilla e azoto nelle foglie di riso Baldo. Due cultivar di *Oryza sativa*, Baldo e Vialone Nano, sono state inoculate singolarmente e co-inoculate con RCA25 (10^7 cellule/ml) e RCA24 (10^6 cellule/ml). A 90 giorni dopo l'inoculazione due sensori a clip (Dualex e SPAD) sono stati utilizzati per valutare il contenuto di clorofilla e lo stato nutrizionale delle piante di riso. Il contenuto di clorofilla (chl), la concentrazione dei polifenoli come i flavonoidi (fla) e l'NBI, calcolati come rapporto tra chl e fla, sono stati misurati su foglie completamente aperte con il sensore Dualex (**A**, **B** e **C**). Il contenuto di clorofilla è stato anche misurato con il sensore SPAD (**D**). La media dei risultati riportati in questa figura è relativa a quaranta replicati di piante. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard (SD). Gli asterischi indicano una differenza significativa (P <0,05, test post hoc di Tukey) tra piante di controllo e inoculate. L'analisi statistica è stata effettuata separatamente per le due cultivar.



Figura 6: La co-inoculazione di *E. cloacae* RCA25 e *H. huttiense* RCA24 influenza i parametri fisiologici di *Oryza sativa* Baldo. A 90 giorni dopo la semina le piante inoculate singolarmente e co-inoculate con RCA25 (10^7 cellule/ml) e RCA24 (10^6 cellule/ml) sono state rimosse dai vasi ed è stata misurata l'altezza (**A**), il peso secco (**B**) e il contenuto di azoto (**C**) dei fusti. I grafici a scatola (*dotplot*) riportati nei pannelli A e B mostrano l'andamento del 50% dei campioni. La linea nera all'interno della scatola rappresenta la mediana, le caselle rappresentano il quartile superiore (primo) e il quartile inferiore (quattro). I baffi indicano la variabilità del primo e del terzo quartile. I dati sono presentati come media ± SD. Per la misurazione dell'altezza e del peso secco sono state processate 40 repliche di piante, mentre per le misurazioni del contenuto totale di azoto sono stati utilizzati almeno cinque replicati di piante. Gli asterischi indicano differenze significative (P <0,05, test post hoc di Tukey) tra piante inoculate con RCA25 e piante co-inoculate.

Discussione

La produzione di cibi ricchi di proteine, quali leguminose e cereali, è fortemente dipendente dalla disponibilità di azoto. Negli ultimi decenni, l'uso dei fertilizzanti azotati prodotti industrialmente attraverso il processo Haber-Bosch ha portato ad un notevole aumento delle produzioni agricole favorendo lo sviluppo agricolo di molte aree.

Tuttavia, l'uso eccessivo di questi fertilizzanti ha avuto un impatto negativo sulla salute umana e sull'ambientale. In particolare, ha contribuito ad aumentare notevolmente la produzione di gas serra. Inoltre, poiché le piante utilizzano solo una minima parte dei fertilizzanti introdotti nel terreno, la parte non utilizzata si disperde nelle falde acquifere sotterranee causando il fenomeno dell'eutrofizzazione dei sistemi idrici. L'uso mirato di batteri con capacità promotrici della crescita delle piante (PGPB, *Plant Growth Promoting Bacteria*) come biofertilizzanti in agricoltura permette di aumentare la quantità di azoto fissato in modo eco-sostenibile (Arora e Mishra, 2016; Sruthilaxmi e Babu, 2017; Orozco-Mosqueda et al., 2018). In un lavoro pubblicato nel 2017 (di cui sono coautrice) è stato dimostrato che l'over-produzione endogena di IAA nei batteri endofiti migliorava la loro capacità di fissazione dell'azoto. Abbiamo dimostrato che la biosintesi di alti livelli di IAA da parte di *E. cloacae* RCA25-64 (un ceppo ingegnerizzato di *E. cloacae* RCA25) portava ad un aumento significativo dell'espressione genica di *nifH* e dell'attività della nitrogenasi sia in colture liquide di RCA25-64 sia in piante di riso inoculate con questo ceppo (Defez et al., 2017).

In questo *Capitolo* ho mostrato che il trattamento esogeno delle cellule di RCA25 con IAA purificato, e con molecole strutturalmente (IND) e funzionalmente (2,4-D) simili ad esso (, utilizzate ad una concentrazione che non altera la crescita batterica, porta ad un aumento significativo (1,6 volte) dell'espressione del gene *nifH* solo quando le cellule di RCA25 vengono trattate con IAA. Il test ARA ha confermato questi dati: la massima up-regolazione (fino al 25%) dell'attività della nitrogenasi è stata misurata per le cellule trattate con IAA. Questi risultati hanno suggerito che l'effetto positivo osservato sulla capacità di fissazione dell'azoto di *E. cloacae* RCA25 era specifico per la molecola IAA. L'aumento dell'attività della nitrogenasi osservato anche per le cellule trattate con IND era probabilmente dovuto al suo effetto sulla formazione di biofilm batterico. L'alto livello di biofilm prodotto da queste cellule potrebbe aver portato alla formazione di un ambiente a basso contenuto di ossigeno, adatto all'attività di questo enzima (Hu et al., 2010; Lee and Lee, 2010; Kim and Park, 2015).

Due batteri isolati da riso [*E. asburiae* RCA23 e *H. huttiense* RCA24 (Defez et al., 2017)] e un ceppo batterico isolato da vite [*Staphylococcus sp.* 377 (Baldan et al., 2015)] sono stati selezionati per la loro capacità di produrre IAA. Questi ceppi sono stati utilizzati uno alla volta in esperimenti

di "inoculazione doppia" con il ceppo azoto-fissatore RCA25 per selezionare la combinazione batterica in grado di migliorare la fissazione dell'N in pianta.

Come primo obiettivo è stata determinata la quantità di IAA prodotta da questi batteri. Il miglior produttore di IAA si è rivelato il ceppo 377, che ha rilasciato nel terreno di crescita livelli di IAA paragonabili a quelli prodotti dal ceppo RCA25-64 (Defez et al. 2017). I ceppi RCA23 e RCA24 hanno prodotto livelli IAA simili ma inferiori a quelli prodotti da 377. È stata poi valutata la capacità dei singoli ceppi produttori-IAA di colonizzare la pianta ospite, rispetto alla capacità di colonizzazione di RCA25. È stato qui dimostrato che i ceppi RCA25, RCA24, RCA23 e 377 sono in grado di colonizzare endofiticamente le piante di riso Baldo e che i ceppi RCA25 e RCA24 sembrano essere i migliori colonizzatori, quando inoculati singolarmente.

Gli esperimenti di *co-inoculation* dei ceppi RCA25 e RCA24 condotti in un rapporto 10:1 su piante di riso ha portato al più alto aumento dell'attività della nitrogenasi. Questo dato ci suggerisce che probabilmente l'interazione tra i batteri ha avuto luogo nell'ambiente endofitico, poiché i tessuti vegetali rappresentano delle barriere fisiche (Czajkowski et al., 2012; Liu et al., 2017; Kandel et al., 2017). Con l'analisi della microscopia confocale (CLSM) è stato dimostrato che sebbene tutti i produttori-IAA erano in grado di colonizzare internamente il tessuto della radice di riso, solo il ceppo RCA24-eGFP coesisteva con RCA25-RFP nella stessa nicchia di radice. Abbiamo anche verificato che le radici colonizzate contenevano una popolazione mista di batteri marcati con RFP e GFP quando veniva effettuata la doppia inoculazione batterica. Questo modello di colonizzazione era simile a quello già descritto da Prieto et al. (2011) per altri batteri che promuovono la crescita delle piante e dimostra che le radici già colonizzate non impediscono ulteriori adesioni e penetrazioni batteriche.

La migliore capacità del ceppo RCA24 di colonizzare le radici del riso potrebbe essere dovuta sia alla sua capacità di produrre una maggiore quantità di biofilm, che a sua volta promuove l'adesione di batteri alle superfici delle piante, sia alla mancanza di azione competitiva per l'occupazione della nicchia interna della pianta (Kawarai et al., 2009; Qurashi e Sabri, 2012; Bogino et al., 2013). È noto che molte specie di batteri benefici del suolo, inclusi i rizobi, formano micro-colonie o biofilm durante la colonizzazione di radici (Rinaudi e Giordano, 2010; Sorroche et al., 2012). L'aumento dell'attività nitrogenasica misurato per le piante co-inoculate era statisticamente significativo ma inferiore a quello osservato per le piante Baldo inoculate con il ceppo ingegnerizzato RCA25-64 che over-produce IAA e per le piante inoculate con RCA25 e poi trattate con IAA purificato.

Qui proponiamo un approccio alternativo all'uso di endofiti geneticamente modificati per il miglioramento della fissazione dell'azoto nelle piante di riso. Le piante Baldo co-inoculate con i

ceppi RCA25 e RCA24 in condizioni di serra (*Greenhouse*) mostravano un più alto contenuto di clorofilla e azoto nel fusto e anche un aumento di biomassa, rispetto alle piante inoculate con RCA25.

L'assenza di variazioni statisticamente significative nei parametri fisiologici delle piante di riso Vialone Nano inoculate è coerente con la minore efficienza di colonizzazione osservata per questa cultivar rispetto al riso Baldo. Anche se l'identificazione dei tratti morfologici, fisiologici e molecolari collegati a questa minore efficienza di colonizzazione richiede ulteriori ricerche, i nostri risultati rafforzano il concetto che una specificità dell'ospite può esistere anche per i batteri endofiti.

Negli ultimi anni, è stata prodotta una grande quantità di letteratura sull'uso dei co-inoculi (consorzi batterici) di batteri benefici e in molti casi sono stati osservati benefici rispetto alla singola inoculazione (Akintokun e Taiwo, 2016; Sahu et al., 2016; Molina- Romero et al., 2017; Lally et al., 2017; Orozco-Mosqueda et al., 2018; Sahu et al., 2018). Questo *Capitolo 1* mostra che gli endofiti benefici *E. cloacae* RCA25 e *H. huttiens*e RCA24 possono essere ceppi promettenti per migliorare, direttamente o indirettamente, la fissazione dell'azoto nelle piante di riso in condizioni di serra. I dati qui riportati evidenziano che la valutazione della localizzazione e della distribuzione delle singole componenti microbiche all'interno dei tessuti vegetali è fondamentale per la selezione di questi bio-inoculi in grado di migliorare la capacità di fissazione dell'azoto delle piante ospiti.

Referenze

- Akintokun, A. K., and Taiwo, M. O. (2016) Comparison of single culture and the consortium of growth-promoting rhizobacteria from three tomato (Lycopersicon esculentum Mill) varieties. Adv Plants Agric Res 5:167. doi: 10.15406/apar.2016.05.00167.
- Ambrosio, R., Ortiz-Marqueza, J. C. F., and Curattia, L. (2017) Metabolic engineering of a diazotrophic bacterium improves ammonium release and biofertilization of plants and microalgae. *Metabolic Engineering* 40: 59–68.
- Angel, R., Nepel, M., Panhölzl, C., Schmidt, H., Herbold, C. W., Eichorst, S. A., Woebken, D. (2018) Evaluation of primers targeting the diazotroph functional gene and development of NifMAP A bioinformatics pipeline for analyzing *nifH* amplicon data. *Front Microbiol* 9: 703.
- Arora, N. K., and Mishra, J. (2016) Prospecting the roles of metabolites and additives in future bioformulations for sustainable agriculture. *App Soil Ecol* 107: 405-407. doi: 10.1016/j.apsoil.2016.05.020.
- Awika, J. M. (2011) Major cereal grains production and use around the world. *ACS Implications to Food Processing and Health Promotion* 1: 1-13. doi: 10.1021/bk-2011-1089.ch001.
- Baldan, E., Nigris, S., Romualdi, C., D'Alessandro, S., Clocchiatti, A., Zottini, M., (2015). Beneficial bacteria isolated from grapevine inner tissues shape Arabidopsis thaliana roots. *PLoS ONE* 10. doi:10.1371/journal. pone.0140252.
- Berg, G., Rybakova, D., Grube, M., and Köberl, M. (2016) The plant microbiome explored: implications for experimental botany. *J Exp Bot* 67: 995–1002.
- Bianco, C., Imperlini, E., Calogero, R., Senatore, B., Amoresano, A., Carpentieri, A., et al. (2006) Indole-3-acetic acid improves *Escherichia coli's* defences to stress. Arch Microbiol 185: 373–382. doi:10.1007/s00203-006-0103-y.
- Bianco, C., Imperlini, E., Calogero, R., Senatore, B., Pucci, P., and Defez, R. (2006) Indole-3acetic acid regulates the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *Microbiology* 152: 2421–2431.
- Bloemberg, G. V., Wijfjes, A. H. M., Lamers, G. E. M., Stuurman, N., and Lugtenberg, B. J. J. (2000) Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities. *Mol Plant Microb Interact* 13: 1170–1176.

- Bogino, P. C., Oliva, M. M., Sorroche, F. G., and Giordano, W. (2013) The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *Int J Mol Sci* 14: 15838-15859. doi: 10.3390/ijms140815838.
- Camerini, S. *et al.* Introduction of a novel pathway for IAA biosynthesis to rhizobia alters vetch root nodule development. *Arch. Microbiol.* **190**, 67-77 (2008).
- Compant, S. Clément, C., and Sessitsch, A. (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizoand endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* **42**: 669-678.
- Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J. G., Gangl, H., and Sessitsch, A. (2011) Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microb Ecol* 62: 188– 197. doi: 10.1007/s00248-011-9883-y.
- Compant, S., Saikkonen, EK., Mitter, B., Campisano, A., and Mercado-Blanco, J. (2016) Editorial special issue: soil, plants and endophytes. *Plant Soil* **405**: 1–11. doi: 10.1007/s11104-016-2927-9.
- Czajkowski, R., de Boer, W. J., van Veen, J. A., and van der Wolf, J. M. (2012) Characterization of bacterial isolates from rotting potato tuber tissue showing antagonism to *Dickeya sp.* biovar 3 in vitro and in planta. *Plant Pathol J* 61: 169–182. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02486.x.
- Defez, R., Andreozzi, A., and Bianco, C. (2017) The overproduction of indole-3-acetic acid (IAA) in endophytes upregulates nitrogen fixation in both bacterial cultures and inoculated rice plants. *Microb Ecol* **74**: 441-452. doi:10.1007/s00248-017-0948-4.
- Elbeltagy, A., and Ando, Y. (2008) Expression of nitrogenase gene (*nifH*) in roots and stems of rice, *Oryza sativa*, by endophytic nitrogen-fixing communities. *Afr J Biotechnol* 7:1950– 1957. doi: 10.5897/AJB2008.000-5042.
- Fox, A. R., Soto, G., Valverde, C., Russo, D., Lagares, A. Jr., Zorreguieta Á., *et al.* (2016) Major cereal crops benefit from biological nitrogen fixation when inoculated with the nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas protegens* Pf-5 X940. *Environ Microbiol* 18: 3522–3534. doi: 10.1111/1462-2920.13376.
- Gaby J. C., Rishishwar, L., Valderrama-Aguirre, L. C., Green, S. J., Valderrama-Aguirre, A., Jordan, I. K. and Kostka, J. E. (2018). Diazotroph community characterization via a

highthroughput *nifH* amplicon sequencing and analysis pipeline. *Appl Environ Microbiol* **84**: 4. doi:10.1128/AEM.01512-17.

- Gaby, J. C., and Buckley, D. H. (2014). A comprehensive aligned *nifH* gene database: a multipurpose tool for studies of nitrogen-fixing bacteria. *Database: the journal of biological databases and curation*, 2014, bau001. doi: 10.1093/database/bau001.
- Geddes, B. A., Ryu, M. H., Mus, F., Garcia-Costas, A., Peters, J. W., Voigt, C. A., and Poole,
 P. (2015) Use of plant colonizing bacteria as chassis for transfer of N₂-fixation to cereals. *Curr Opin Biotechnol* 32: 216–222. doi: 10.1016/j.copbio.2015.01.004.
- Goulas, Y., Cerovic, Z. G., Cartelat, A., and Moya, I. (2004) Dualex: a new instrument for field measurements of epidermal ultraviolet absorbance by chlorophyll fluorescence. *Appl Opt* 43: 4488–4496. doi: 10.1364/AO.43.004488.
- Haney, C. H., Samuel, B. S., Bush, J., and Ausubel, F. M. (2015) Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. *Nat Plants* **1**:15051.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., *et al.* (2015) The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev* **79**: 293–320.
- Hu, M., Zhang, C., Mu, Y., Shen, Q., and Feng. Y. (2010) Indole effects biofilm formation in bacteria. *Indian J Microbiol* 50: 362-368. doi: 10.1007/s12088-011-0142-1.
- Imperlini, E., Bianco, C., Lonardo, E., Camerini, S., Cermola, M., Moschetti, G., and Defez, R. (2009) Effect of indole-3-acetic acid on *Sinorhizobium meliloti* serviva and on symbiotic nitrogen fixation and stem dry weight production. *Appl Microbiol Biotechnol* 83: 727– 738. doi: 10.1007/s00253-009-1974-z.
- Islam, M. R., Madhaiyan, M., Deka-Boruah, H. P., Yim, W., Lee, G., Saravanan, V. S., *et al.* (2009) Characterization of plant growth-promoting traits of free-living diazotrophic bacteria and their inoculation effects on growth and nitrogen uptake of crop plants. J *Microbiol Biotechnol* 19: 1213-1222.
- Jia, X., Liu, C., Song, H., Ding, M., Du, J., Ma, Q., and Yuan, Y. (2016) Design, analysis and application of synthetic microbial consortia. *Synth Syst Biotechnol* 1: 109-117. doi: 10.1016/j.synbio.2016.02.001.
- Kandel, S. L., Joubert, P. M., and Doty, S. L. (2017) Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms* 5: 77. doi: 10.3390/microorganisms5040077.

- Kawarai, T., Furukawa, S., Narisawa, N., Hagiwara, C., Ogihara, H., and Yamasaki, M. (2009)
 Biofilm formation by *Escherichia coli* in hypertonic sucrose media. *J Biosci Bioeng* 107: 630-635. doi: 10.1016/j.jbiosc.2009.01.018.
- Kim, J., and Park, W. (2015) Indole: a signaling molecule or a mere metabolic byproduct that alters bacterial physiology at a high concentration? *J Microbiol* 53: 421-428. doi: 10.1007/s12275-015-5273-3.
- Korir, H., Mungai, N. W., Thuita, M., Hamba, Y., and Masso, C. (2017) Co-inoculation effect of rhizobia and plant growth promoting rhizobacteria on common bean growth in a low phosphorus soil. *Front Plant Sci* 8: 141. doi:10.3389/fpls.2017.0014.
- Lally, R. D., Galbally, P., Moreira, A.S., Spink, J., Ryan, D., Germaine, K.J., Dowling, D. N. (2017) Application of endophytic *Pseudomonas fluorescens* and a bacterial consortium to *Brassica napus* can increase plant height and biomass under greenhouse and field conditions. *Front Plant Sci* 8: 2193. doi: 10.3389/fpls.2017.02193
- Lee, J. H. and Lee, J. (2010) Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbial Rev* **34**: 426–444. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00204.x.
- Liu, H., Carvalhais, L. C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P. G., Pieterse, C. M. J., and Schenk, P. M. (2017) Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. *Front Microbiol* 8: 2552. doi: 10.3389/fmicb.2017.02552.
- Mercado-Blanco, J., and Lugtenberg B. J. J. (2014) Biotechnological applications of bacterial endophytes. *Curr Biotech* **3**: 60-75.
- Mercado-Blanco, J., and Prieto P. (2012) Bacterial endophytes and root hairs. *Plant Soil* **361**: 301–306. doi: 10.1007/s11104-012-1212-9.
- Molina-Romero, D., Baez, A., Quintero-Hernández, V., Castañeda-Lucio, M., Fuentes-Ramírez, L. E., Bustillos-Cristales, M. D. R. (2017) Compatible bacterial mixture, tolerant to desiccation, improves maize plant growth. *PLoS ONE* 12. doi: 10.1371/ journal.pone.0187913.
- Mus, F., Crook, M. B., Garcia, K., Garcia-Costas, A., Geddes, B. A., and Kouri, E. D. (2016) Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. *Appl Environ Microbiol* 82: 3698-3710.
- Mus, F., Crook, M. B., Garcia, K., Garcia-Costas, A., Geddes, B. A., and Kouri, E. D. (2016) Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. *Appl Environ Microbiol* 82: 3698-3710.

- Ormeño-Orrillo, E., Hungria, M., and Martínez-Romero, E. (2013) Dinitrogen-fixing prokaryotes. In *The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry*. Rosenberg, E., De Long, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E. and Thompson F. (eds). Berlin: Springer-Verlag, pp. 427–451. doi: 10.1007/978-3-642-30141-4_72.
- Ormeño-Orrillo, E., Hungria, M., and Martínez-Romero, E. (2013) Dinitrogen-fixing prokaryotes. In *The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry*. Rosenberg, E., De Long, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E. and Thompson F. (eds). Berlin: Springer-Verlag, pp. 427–451. doi: 10.1007/978-3-642-30141-4_72.
- Orozco-Mosqueda, M. D. C., Rocha-Granados, M. D. C., Glick, B. R., and Santoyo, G. (2018) Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. *Microbiol Res* 208: 25–31. doi: 10.1016/j.micres.2018.01.005.
- Orozco-Mosqueda, M. D. C., Rocha-Granados, M. D. C., Glick, B. R., and Santoyo, G. (2018) Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. *Microbiol Res* 208: 25–31. doi: 10.1016/j.micres.2018.01.005.
- Prieto, P. and Mercado-Blanco, J. (2008) Endophytic colonization of olive roots by the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *FEMS Microbiol Ecol* 64: 297–306. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00450.x.
- Prieto, P. and Mercado-Blanco, J. (2008) Endophytic colonization of olive roots by the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *FEMS Microbiol Ecol* 64: 297–306. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00450.x.
- Prieto, P., Schilirò, E., Maldonado-González, M. M., Valderrama, R., Barroso-Albarracín, J. B., and Mercado-Blanco, J. (2011). Root hairs play a key role in the endophytic colonization of olive roots by *Pseudomonas spp*. with biocontrol activity. *Microbial ecology* 62: 435-45. doi: 10.1007/s00248-011-9827-6.
- Prieto, P., Schilirò, E., Maldonado-González, M. M., Valderrama, R., Barroso-Albarracín, J. B., and Mercado-Blanco, J. (2011). Root hairs play a key role in the endophytic colonization of olive roots by *Pseudomonas spp*. with biocontrol activity. *Microbial ecology* 62: 435-45. doi: 10.1007/s00248-011-9827-6.
- Qurashi, A. W., and Sabri, A. N. (2012) Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Braz J Microbiol* 43: 1183-1191. doi: 10.1590/S1517-838220120003000046.

- Qurashi, A. W., and Sabri, A. N. (2012) Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Braz J Microbiol* 43: 1183-1191. doi: 10.1590/S1517-838220120003000046.
- Rasul, G. (2016) Managing the food, water, and energy nexus for achieving the Sustainable
 Development Goals in South Asia. *Environ Dev* 18: 14–25. doi: 10.1016/j.envdev.2015.12.00.
- Rasul, G. (2016) Managing the food, water, and energy nexus for achieving the Sustainable Development Goals in South Asia. *Environ Dev* 18: 14–25. doi: 10.1016/j.envdev.2015.12.00.
- Rinaudi, L.V., and Giordano, W. (2010) An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS Microbiol Lett* **304**: 1–11.
- Rinaudi, L.V., and Giordano, W. (2010) An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS Microbiol Lett* **304**: 1–11.
- Rogers, C., and Oldroyd, G. E. D. (2014) Synthetic biology approaches to engineering the nitrogen symbiosis in cereals. *J Exp Bot* **65**: 1939–1946. doi: 10.1093/jxb/eru098.
- Rogers, C., and Oldroyd, G. E. D. (2014) Synthetic biology approaches to engineering the nitrogen symbiosis in cereals. *J Exp Bot* **65**: 1939–1946. doi: 10.1093/jxb/eru098.
- Rosenblueth, M., Ormeño-Orrillo, E., López-López, A., Rogel, M. A., Reyes-Hernández, B. J., Martínez-Romero, J. C. (2018) Nitrogen fixation in cereals. *Front Microbiol* 9: 1794. doi: 10.3389/fmicb.2018.01794.
- Sahu, P. K., Lavanya, G., Gupta, A., and Brahmaprakash, G. P. (2016) Fluid bed dried microbial consortium for enhanced plant growth: a step towards next generation bio formulation. *Vegetos* 29: 4. doi: 10.5958/2229-4473.2016.00093.8.
- Sahu, P. K., Shivaprakash, M. K., Mallesha, B. C., Subbarayappa, C. T., and Brahmaprakash, G. P. (2018) Effect of bacterial endophytes *Lysinibacillus sp.* on plant growth and fruit yield of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Int J Curr Microbiol App Sci* 7: 3399-3408. doi: 10.20546/ijcmas.2018.705.397.
- Salkowski, E. (1885) Ueber das verhalten der skatolcarbonsaure im organismus. *Z Physiol Chem* **9**: 23–33.
- Santoyo, G., Hernández-Pacheco, C., Hernández-Salmerón, J., and Hernández-León, R. (2017) The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions: toward sustainable agriculture. *Span J Agric Res.* **15**:1. doi: 10.5424/sjar/2017151-9990.
- Sorroche, F. G., Spesia, M. B., Zorreguieta, Á., and Giordano, W. (2012) A Positive correlation between bacterial autoaggregation and biofilm formation in native *Sinorhizobium meliloti* isolates from argentina. *Appl Environ Microbiol* **78**: 4092-4101. doi: 10.1128/AEM.07826-11.
- Sruthilaxmi, C.B., and Babu, S. (2017) Microbial bio-inoculants in indian agriculture: ecological perspectives for a more optimized use. *Agr Ecosyst Environ* 242: 23-25. doi: 10.1016/j.agee.2017.03.019.
- Stokstad, E. (2016) The nitrogen fix. *Science* **353**: 1225–1227. doi: 10.1126/science.353.6305.1225.
- Tremblay, N., Wang, Z., and Cerovic, Z. G. (2012) Sensing crop nitrogen status with fluorescence indicators. A review. Agron Sustain Dev 32: 451–464. doi: 10.1007/s13593-011-0041-1.
- Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N., and Matsuguchi, T. (1995) Remarable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *J Bacteriol* **177**: 1414–1417. doi: 10.1128/jb.177.5.1414-1417.1995.
- Van Dommelen, A., Croonenborghs, A., Spaepen, S., and Vanderleyden, J. (2009) Wheat growth promotion through inoculation with an ammonium-excreting mutant of *Azospirillum brasilense*. *Biol Fertil Soils* **45**: 549–553. doi: 10.1007/s00374-009-0357z.
- Wagner, S. C. (2011) Biological nitrogen fixation. Nature Education Knowledge 3 (10): 15.
- Yuan, Z., Druzhinina, I. S., Labbé, J., Redman, R., Qin, Y., Rodriguez, R., *et al.* (2016) Specialized microbiome of a halophyte and its role in helping non-host plants to withstand salinity. *Sci Rep.* 6: 32467. doi: 10.1038/srep32467.

Capitolo 2

Ruolo strutturale e funzionale dell'acido indolo-3-acetico (IAA) sulla topologia del DNA

Introduzione

Materiali e Metodi

- 1. Ceppi batterici e plasmidi
- 2. Analisi del superavvolgimento del DNA in vivo dopo trattamento con IAA
- 3. Esperimenti di binding IAA-DNA
 - 3.1. Titolazione degli spettri di assorbimento nell'UV
 - 3.2. Studio competitivo con bromuro di etidio (EtBr)
 - 3.3. Analisi del dicroismo circolare (CD)
- 4. Saggio di rilassamento del DNA mediato dall'enzima Topoisomerasi I
- 5. Saggio dell'enzima DNA Girasi
- 6. Trattamento della coltura batterica di *Ensifer meliloti* 1021 pCHK57 con IAA e novobiocina (Saggio β -Gal)
- 7. Analisi quantitativa in tempo reale della PCR (qRT-PCR)
 - 7.1 Allestimento della reazione di qRT-PCR e analisi del livello di espressione genica

Risulatati

- 10. L'IAA influenza il superavvolgimento del DNA in vivo
- 11. L'IAA interagisce con il DNA inducendo un'alterazione nella sua struttura
 - 11.1. Spettri di assorbimento dell'IAA in presenza di DNA plasmidico
 - 11.2. Analisi competitiva con il bromuro di etidio (EtBr)
 - 11.3. Analisi al dicroismo circolare (CD)
- 12. L'IAA influisce sull'attività di rilassamento delle DNA Topoisomerasi di E.coli
- 13. L'IAA induce l'espressione di geni sensibili ad un inibitore della DNA girasi
- L'attività del promotore di *nifA* è stimolata dall'IAA e inibita dall'inibitore della DNA girasi

Discussione

Referenze

Paper: Defez R, Valenti A, <u>Andreozzi A</u>, Romano S, Ciaramella M, Pesaresi P, Forlani S, Bianco C. (2019) *New Insights into Structural and Functional Roles of Indole-3-acetic acid (IAA): Changes in DNA Topology and Gene Expression in Bacteria*. Biomolecules. 9(10):522. https://doi.org/10.3390/biom9100522

Introduzione

La biologia delle auxine è tra i campi più antichi della ricerca sperimentale sulle piante. Nel 1880, per la prima volta, fu proposto da Darwin che una molecola diffusibile, sensibile alla luce, fosse trasportata verso il basso. Successivamente, Went e Thiemann (1937) identificarono la molecola come acido indole-3-acetico (IAA). Quasi otto decenni dopo il chiarimento strutturale dell'IAA, molti aspetti del metabolismo, del trasporto e della segnalazione delle auxine sono stati ben stabiliti. Inoltre, negli ultimi due decenni, è stato riportato che la IAA induce importanti cambiamenti nelle funzioni dello sviluppo e del metabolismo in sistemi abbastanza diversi, come le cellule tumorali (De Melo et al., 2004), piante (Woodward e Bartel, 2005), funghi (Prusty et al., 2004) e batteri (Defez e Spena, 1998; Bianco et al., 2006a; Bianco et al., 2006b) attraverso meccanismi ancora sconosciuti.

In particolare per quanto riguarda i batteri è riportato che il trattamento delle cellule di *Escherichia coli* con IAA purificato ha indotto l'espressione di geni coinvolti nelle vie del metabolismo energetico e ha portato a una migliore risposta allo stress (Bianco et al., 2006a; Bianco et al., 2006b). Inoltre, l'over-produzione di IAA nel ceppo *Ensifer meliloti* RD64, un derivato di *E. meliloti* 1021 modificato geneticamente per iper-produrre l'auxina IAA (Defez e Spena, 1998; Pandolfini et al., 2000), ha portato direttamente o indirettamente all'attivazione dei geni coinvolti nei processi di fissazione dell'azoto e del metabolismo energetico in condizioni di vita libera (Imperlini et al., 2009; Bianco e Defez, 2010; Defez et al., 2016). L'induzione di geni di fissazione dell'azoto in risposta alla maggiore disponibilità di IAA è stata osservata anche nei batteri diazotrofi associati ai cereali (Defez et al., 2017; Andreozzi et al., 2019).

Questi risultati ci portano a ipotizzare che l'attivazione dell'espressione dei geni per la fissazione dell'azoto (*nif* e *fix*) innescata dall'IAA sia un effetto diffuso. Per far luce sui meccanismi attraverso i quali la molecola di IAA influenza l'espressione di alcuni geni, e in particolare quelli coinvolti nella fissazione dell'azoto, abbiamo considerato in questo che: (1) l'attivazione dell'espressione dei geni *nif* e *fix* in *E. meliloti* è mediata dall'attivatore trascrizionale *nifA* (Fischer, 1994); e (2) che l'attività del promotore *nifH* in *E. meliloti* è stimolata dai cambiamenti nel super-avvolgimento del DNA (Liu et al., 2005). I dati pubblicati circa 40 anni fa da Jacobsen (1977) e Witham et al. (1978) sono stati il punto di partenza di questo studio. Questi autori hanno ipotizzato possibili riconoscimenti stereochimici in vivo tra acidi nucleici e fitoormoni intercalati. È noto che il legame dei ligandi esterni al DNA altera transitoriamente la topologia locale del DNA, inducendo variazioni nella sua struttura. Inoltre, il superavvolgimento negativo è essenziale per il funzionamento ottimale dei processi di trascrizione, in quanto facilita la fusione del promotore (Dorman, 2006; Ma e Wang, 2016; Zhi et al., 2017). È anche noto che il mantenimento

del livello di superavvolgimento negativo del DNA allo stato stazionario nei batteri si basa in gran parte sull'azione di superavvolgimento dell'enzima DNA girasi e sull'attività di rilassamento della DNA topoisomerasi I (Champoux, 2001). L'enzima DNA topoisomerasi di tipo IA è un enzima onnipresente in tutti i batteri. L'inibizione dell'attività della girasi in vivo da parte di uno specifico inibitore (cioè la novobiocina) altera lo stato di superavvolgimento del DNA, con un impatto negativo sulla vitalità cellulare.

Utilizzando saggi in vivo e in vitro, qui abbiamo verificato, per la prima volta, che l'IAA: (i) influenza lo stato topologico del DNA nei batteri; (ii) interagisce direttamente con il DNA in vitro; (iii) inibisce l'attività di rilassamento della DNA topoisomerasi batterica di tipo IA; (iv) induce l'espressione di geni batterici sensibili ai cambiamenti topologici del DNA; e (v) attiva il promotore del gene *nifA*, il principale regolatore dei geni di fissazione dell'azoto.

Inoltre, ulteriori approfondimenti di questi risultati potrebbero aiutare a capire se l'IAA svolge ruoli diretti e/o indiretti nel modulare la topologia del DNA e quali potrebbero essere le implicazioni biologiche sulla regolazione dell'espressione genica.

Materiali e metodi

1. Ceppi batterici e plasmidi

I ceppi batterici utilizzati usati per approfondire il ruolo strutturale e funzionale dell'IAA, sono: *Ensifer meliloti* 1021 (Galibert et al, 2001), *E. meliloti* 1021 che ospita il plasmide pMB393 (7000 bp) (Bianco et al., 2006), *E. meliloti* 1021 che contiene il plasmide ricombinante pCHK57 con il gene di fusione promotore *nifA-LacZ* (Ditta et al., 1987) e il ceppo *E. coli* BL21 che ospita il plasmide reporter pBluScript (pBS di 3000 bp).

2. Analisi del superavvolgimento del DNA in vivo dopo trattamento con IAA

Il superavvolgimento in vivo è stato studiato analizzando la distribuzione relativa dei topoisomeri del plasmide pMB393 (di *E. meliloti* 1021) e del plasmide reporter pBS (di *E. coli* BL21). Le cellule batteriche di *E. meliloti* 1021 sono state coltivate in mezzo RMM-glutammato mentre le cellule di *E. coli* BL21 sono state coltivate in mezzo minimo M9. Entrambe le colture cellulari sono state coltivate fino alla fase esponenziale di crescita ($OD_{600}=0,6$) e poi sottoposte a trattamenti di con IAA (0,2, 1 e 5 mM) o novobiocina (15 e 75 μ M) per 0,5, 1 e 1,5 ore come descritto prima. Il plasmide pMB393 è stato purificato da cellule di *E. meliloti* 1021 utilizzando il kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) secondo le istruzioni della casa produttrice mentre il plasmide pBS è stato purificato dalle cellule di *E. coli* BL21 mediante il kit NucleoSpin Plasmid (Macherey Nagel) secondo le istruzioni della casa produttrice.

La topologia del DNA dei plasmidi purificati è stata analizzata come descritto di seguito. I topoisomeri sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio allo 0.7% contenente clorochina alle concentrazioni finali di 1 µg/ml per il plasmide pBS (3000 bp) e 10 µg/ml per il plasmide pMB393 (7000 bp). L'elettroforesi è stata eseguita in tampone TBE (Tris-borato-EDTA) 0.5x contenente 1 o 10 µg/ml di clorochina a 100 V (4.5 V/cm) per 20 ore a temperatura ambiente. Dopo l'elettroforesi, la clorochina 1 µg/ml) o 24 ore (gel contenenti clorochina 10 µg/ml) prima della colorazione con bromuro di etidio (EtBr) (1 µg/ml). Infine, il gel è stato lavato in acqua distillata e fotografato alla luce UV utilizzando il sistema di *Imaging* VersaDoc (Bio-Rad). L'intensità relativa di ciascuna banda è stata misurata mediante densitometria con il software Quantity One (Bio-Rad) e utilizzata per calcolare la quantità totale di DNA e l'abbondanza relativa di ciascun topoisomero. Le proprietà topologiche del DNA sono state definite da parametri specifici: *Twist* (T_w = avvolgimento), il numero di volte che un filamento di elica gira intorno all'altra, e *Writhe* (W_r = superavvolgimento), rappresenta il numero di incroci

dell'asse longitudinale della doppia elica su sé stessa (ovvero il numero di spirali). In una molecola di DNA circolare covalentemente chiusa, la somma di questi due parametri è una proprietà topologica fissa, chiamata *linking number* ovvero numero di legame topologico (Lk = $T_w + W_r$) (Crozat et al., 2005). Poiché l'energia richiesta per il superavvolgimento di un polimero dipende dalla sua lunghezza, un parametro utile per confrontare diversi isomeri topologici (topoisomeri) è la densità di superavvolgimento $\sigma = (Lk - Lk_0) / Lk_0$, dove Lk_0 e Lk (ΔLk) rappresentano la quantità dei superavvolgimenti per il DNA rilassato e superavvolto, rispettivamente. La densità di superelica di topoisomeri con diversi gradi di superavvolgimento è stata stimata mediante elettroforesi monodimensionale in presenza di clorochina come agente intercalante, che provoca una diminuzione di T_w e di conseguenza un aumento di W_r . In queste condizioni, il plasmide altamente negativo migra come bande diverse con un ΔLk specifico. Il *linking number* del DNA di ciascun topoisomero è stato determinato e utilizzato per ottenere valori σ applicando l'equazione di cui sopra. La quantità relativa di tutti i topoisomeri è stata espressa in percentuale di topoisomero singolo rispetto al DNA totale in ciascuna corsia di migrazione su gel (Bettotti et al., 2018).

3. Esperimenti di binding IAA-DNA

3.1. Titolazione degli spettri di assorbimento nell'UV

Gli spettri di assorbimento dell'IAA nell'UV sono stati eseguiti con uno spettrofotometro Cary50 (Agilent) usando cuvette di quarzo da 1 cm. Sono state eseguite titolazioni di assorbanza mantenendo costante la concentrazione di IAA e variando quella del DNA. Una soluzione stock di IAA è stata preparata ad una concentrazione finale di 25 μ M in una soluzione di etanolo 50% e incubata con diversa quantità del plasmide pBS (0.2, 0.4, 0.8 e 1.7 μ g/ml). Le misure spettroscopiche sono state registrate dopo cinque minuti per consentire l'equilibrio di legame tra l'IAA e il DNA. Gli spettri sono stati registrati a temperatura ambiente nell'intervallo di lunghezze d'onda da 200 a 350 nm a intervalli regolari di 0.15 nm e una velocità di scansione di 60 nm/minuto. Miscele di soluzione etanolo e plasmide pBS sono state utilizzate come riferimento e sottratte da ciascuna misurazione.

3.2. Studio competitivo con bromuro di etidio (EtBr)

È stato condotto un saggio di legame competitivo con l'EtBr per studiare l'interazione del DNA del timo di vitello (ctDNA) con IAA utilizzando la spettroscopia UV-Visibile (UV-Vis). Il Il

ctDNA è un DNA naturale ampiamente utilizzato negli studi sugli agenti leganti il DNA che modulano la struttura e la funzione del DNA.

Gli spettri di assorbimento UV-Vis sono stati ottenuti con uno spettrofotometro Cary100 (Agilent) usando cuvette di quarzo da 1 cm a temperatura ambiente. La concentrazione stock di ctDNA è stata determinata utilizzando i valori del coefficiente di estinzione molare di 6600 M/cm a 260 nm. Gli spettri di assorbimento di EtBr (7 μ M) sono stati registrati nell'intervallo di lunghezze d'onda da 400 a 600 nm in assenza e presenza di ctDNA (300 μ M). Sono stati inoltre misurati gli spettri di assorbimento del complesso EtBr - ctDNA in presenza di concentrazioni crescenti di IAA (da 2 μ M a 25 mM).

3.3. Analisi del dicroismo circolare (CD)

Le misurazioni del dicroismo circolare (CD) sono state eseguite con uno spettropolarimetro J-810 (Jasco) utilizzando una cuvetta di quarzo con 0,1 cm di camino ottico, a temperatura ambiente e con i seguenti parametri: tre scansioni a una velocità di 20 nm/min, a un tempo costante di 4 secondi. La larghezza di banda spettrale è stata impostata a 1 nm nell'intervallo di lunghezze d'onda da 225 a 300 nm. Gli spettri CD del ctDNA 125 ng/ml sono stati misurati in atmosfera di azoto utilizzando un tampone Tris HCl da 10 mM a pH 7.5 e aumentando la concentrazione di IAA (0,0315, 0,0625, 0,125, 0,25 e 0,5 mM). I risultati sono presentati come media di tre scansioni ed il rumore di fondo è stato sottratto elettronicamente da ogni misurazione.

4. Saggio di rilassamento del DNA mediato dall'enzima Topoisomerasi I

Il test di rilassamento del DNA è stato eseguito utilizzando il plasmide pBS, purificato dalle colture di *E. coli* nella sua forma negativamente superavvolta, come substrato dell'enzima Topoisomerasi I di *E. coli*. Per testare l'effetto di IAA sull'attività della Topoisomerasi, le soluzioni stock di IAA sono state preparate in etanolo 50% (v/v) e aggiunte al plasmide pBS (7 μ g/ml). Per evitare l'interferenze dei solventi, le reazioni di controllo senza IAA sono state incubate nelle stesse condizioni con un volume uguale di soluzione di etanolo. Le miscele sono state incubate per 15 minuti a temperatura ambiente per garantire un equilibrio di *binding* tra IAA-pDNA. Per ottenere il rilassamento del DNA è stata aggiunta la Topoisomerasi, alla miscela di reazione. La miscela di reazione conteneva 50 mM di acetato di potassio, 20 mM di trisacetato, 10 mM di magnesio-acetato e 100 μ g/ml BSA (pH 7.5). Esperimenti preliminari sono

stati condotti utilizzando la topoisomerasi I di E. coli (EcTopoI) (New England BioLabs) e graduali concentrazioni di IAA (0,2, 1 e 3 mM) per selezionarne la migliore. L'enzima EcTopoI ha un'omologia di sequenza di amminoacidi del 40% con la Topoisomerasi I di E. meliloti. La concentrazione di IAA 1 mM è stata scelta per esperimenti successivi. Lo stock concentrato di *Ec*TopoI è stato diluito (0,1, 0,5 e 2,5 U/ml) e aggiunto alle miscele di reazione e incubate a 37 °C per 45 minuti. Per verificare la specificità di IAA, molecole strutturalmente (IND, acido indole-3-carbossilico (ICA) e triptofano (Trp)) e funzionalmente (2,4-D) simili all'IAA sono state testate anch'esse ad una concentrazione finale di 1 mM, usando EcTopoI a due concentrazioni differenti (2,5 e 5 U/mL). Tutte le reazioni sono state interrotte dall'aggiunta di SDS a una concentrazione finale dell'1% e i prodotti sono stati analizzati mediante elettroforesi su un gel di agarosio all'1,2% in presenza di tampone TBE 50 mM. Il plasmide superavvolto è stato caricato contemporaneamente come controllo della migrazione dei plasmidi. Per visualizzare i prodotti di reazione, il gel è stato colorato dopo l'elettroforesi immergendolo in un bagnetto contenente bromuro di etidio (1 µg/ml) per 30 minuti a temperatura ambiente e decolorato in acqua deionizzata per almeno 1 ora. Infine, il gel è stato fotografato alla luce UV con Gel-Doc Imaging System (UVP) e analizzato con il software Image Lab Software (Bio-Rad). L'intensità relativa di ciascuna banda nel gel è stata misurata e utilizzata per calcolare la quantità di DNA totale (il DNA non trasformato più le differenti specie di topoisomeri) e quella di tutti i singoli prodotti di reazione. Per ciascuna condizione, l'attività della topoisomerasi I è stata espressa in percentuale e calcolata dividendo l'intensità di ciascuna banda di topoisomeri per la quantità di DNA totale in ciascuna corsia.

5. Saggio dell'enzima DNA Girasi

Il saggio della DNA Topoisomerasi Girasi è stato eseguito utilizzando un plasmide di DNA rilassato come substrato della Girasi di *E. coli* (*Ec*Gyr) (BioLabs). Il DNA rilassato è stato ottenuto incubando il plasmide pBS superavvolto negativamente con la Topoisomerasi I da germe di grano (Promega), secondo le istruzioni della casa produttrice. Dopo l'incubazione, il plasmide è stato purificato mediante estrazione con fenolo e precipitazione con etanolo e utilizzato per il test della Girasi. Prima dell'aggiunta dell'enzima, il plasmide (1,9 μ g/ml) è stato incubato per 15 minuti a temperatura ambiente con IAA (1 mM) o senza per garantire l'equilibrio di legame. Quantità crescenti di Girasi (75, 150, 375 e 500 U/ml) sono stati quindi aggiunti alla miscela e incubati a 37 °C per 30 minuti. Le reazioni sono state terminate con l'aggiunta di SDS

all'1% e analizzate mediante elettroforesi su gel di agarosio come precedentemente descritto. Il plasmide di DNA linearizzato è stato caricato come controllo della migrazione di plasmidi.

6. Trattamento della coltura batterica di *Ensifer meliloti* 1021 pCHK57 con IAA e novobiocina (Saggio β -Gal)

Per vedere se l'IAA era in grado di influenzare l'attività del promotore del gene nifA (regolatore trascrizionale coinvolto nell'espressione dei geni per la fissazione dell'azoto in E. meliloti), le cellule di E. meliloti 1021 che ospitano il plasmide pCHK57contenente la fusione trascrizionale nifA-lacZ sono state trattate con IAA e novobiocina (antibiotico che inibisce l'attività della DNA Girasi, risolvendone i superavvolgimenti) ed è stato eseguito il saggio dell'attività della β-Galattosidasi (β -Gal). Le colture cellulari wilde-type di E. meliloti 1021 e quelle di E. meliloti 1021 che ospitano il plasmide pCHK57 sono state coltivate aerobicamente a 30 °C in terreno TYR (3 g/L estratto di lievito, 5g/L triptone, 6mM CaCl2) per 48 ore, lavate tre volte con terreno minimo RMM 1x (1 mg/ml K2HPO4/KH2PO4, 0,02 µg/ml H3BO3/Na2Mo4, 0,02 µg/ml MnSO4*H2O/ZnSO4*7 H2OCuSO4*5 H2O, 250 µg/ml MgSO4*H2O, 0,01 µg/mlbiotina/Capambitenato/timina, 100 µg/ml CaCl2*H2O, 0,002 µg/ml CoCl2, 10 µg/ml FeCl3*6 H2O) privo di azoto e risospese nello stesso terreno utilizzato per i lavaggi, integrato con glutammato 5 mM. Queste colture batteriche ($OD_{600} = 0.6$) sono state poi suddivise in quattro aliquote: una soluzione IAA alla concentrazione finale di 1 mM è stata aggiunta ad un'aliquota; alla seconda e alla terza aliquota è stata aggiunta invece una soluzione di novobiocina alle concentrazioni finali di 15 e 1,5 mM, mentre la quarta aliquota è stata utilizzata come controllo non trattato. La crescita batterica è stata misurata dopo 0,5, 1, 1,5, 3 e 6 ore di incubazione a 30 °C; agli stessi tempi sono state raccolte aliquote indipendenti di cellule di controllo e trattateper saggiare l'attività della β -Gal come descritto da Miller (1972).

Le soluzioni stock di IAA e novobiocina sono state preparate usando una soluzione di dimetilsolfossido (DMSO) al 50% (v/v). Per evitare interferenze con i solventi, le cellule di controllo sono state trattate con una quantità simile di soluzione DMSO. Esperimenti preliminari sono stati condotti per selezionare le concentrazioni di IAA e novobiocina che non influenzavano la vitalità delle cellule batteriche di *E. meliloti* 1021.

7. Analisi quantitativa in tempo reale (qRT-PCR)

Per analizzare l'effetto del trattamento con IAA e novobiocina sull'espressione genica mediante analisi qRT-PCR, le colture cellulari di *E. meliloti* 1021 che ospitano il plasmide pMB393 sono

state portate alla fase esponenziale nel mezzo RMM 1x integrato con glutammato come descritto prima e sottoposti a un trattamento di 1 ora con IAA 1 mM o novobiocina 15 μM.

Per selezionare la concentrazione di novobiocina in grado di influenzare l'espressione dei geni selezionati, senza avere un impatto negativo sulla sintesi di DNA e RNA, sono stati condotti esperimenti preliminari. Abbiamo verificato che la migliore concentrazione di novobiocina era di 15 μ M. Le cellule non trattate e quelle trattate sono state raccolte ed utilizzate per l'estrazione dell'RNA come descritto nel Capitolo 1. Il DNA residuo presente nelle preparazioni di RNA è stato rimosso usando il kit TURBO DNase I privo di RNAse (Applied Biosystems) secondo le istruzioni della casa produttrice. Dopo purificazione e controllo di qualità mediante elettroforesi su gel di agarosio 1.5%, la concentrazione di RNA è stata determinata mediante assorbanza a 260 nm e l'RNA è stato conservato a -20 °C fino a ulteriore utilizzo. Il cDNA è stato sintetizzato da 1 μ g di RNA totale con il kit RETROscript (Applied Biosystems) e decameri casuali, secondo le istruzioni della casa produttrice.

7.1 Allestimento della reazione di qRT-PCR e analisi del livello di espressione genica

Le coppie di primers specifici di *E. meliloti* 1021 (Defez et al., 2019) utilizzate per l'analisi qRT-PCR sono state progettate utilizzando il software Primer3 e sono riportate nella Tabella 1. La coppia di primer per il gene *rpoB* di 1021 (presente nella tabella 1) è stata inclusa in tutte le analisi qRT-PCR ai fini della normalizzazione dei dati.

La miscela di reazione ($V_f = 20 \ \mu$ l) è stata allestita utilizzando 10 μ l di i Q^{TM} SYBR[®] Green Supermix 2X (Bio-Rad), 200 nM delle diverse coppie di primers (*target* e *housekeeping*) e 5 μ l dei campioni di cDNA diluiti 1:10.

Sono stati allestiti controlli negativi per escludere la presenza di eventuali contaminazioni nei reattivi della miscela di reazione. Il programma di amplificazione prevede 15 minuti iniziali a 95 °C e 40 cicli composti da: 20 secondi a 95 °C, 20 secondi alla temperatura di *annealing* dei primers utilizzati e 35 secondi a 72 °C, dopo i cicli seguono 10 minuti a 72 °C.

Durante le reazioni di amplificazioni, il segnale di fluorescenza dovuto all'intercalante SYBR Green è stato monitorato in tempo reale per quantificare i prodotti a doppio filamento di DNA formati in ciascun ciclo di PCR. I risultati sono stati registrati come cambiamenti relativi dell'espressione genica dopo la normalizzazione con l'espressione del gene *housekeeping*, calcolata utilizzando il metodo comparativo del CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) come descritto da Livak e Schmittgen (2001). Il valore $2^{-\Delta\Delta CT}$ risulta essere >1 per i geni più espressi nelle cellule 1021 trattate con IAA e novobiocina, mentre il valore <1 è relativo ai geni più espressi nelle cellule di 1021 non trattate. I dati qRT-PCR sono la media ± deviazione standard (DS) di almeno quattro repliche biologiche ciascuna condotta in momenti diversi.

Gene ID	Gene	Forward $(5' \rightarrow 3')$	Reverse $(5' \rightarrow 3')$
SMc04040	ibpA	GACCTATCCGCCCTACAACA	GAAGCGGACTTGATCTCGAC
SMc00646	rpoH1	GTGAGGAAGAGGTCGTCTCG	TCAGAACCTTCATGGCATTG
SMc02163	pgi	GGCAAGAAGATCACCGATGT	GTCTCGATCGTGGTGAAGGT
SMa1227	fixJ	CTCGTGACGGACCTGAGAAT	GCAGCAACCAGATGTTCAGA
SMa0815	nifA	CCTTGCAAGAGCATTCCTTC	TCTTTGACCTGGCGAGAGTT
SMa1225	fixK1	CATTCTTTCTTTGCCGAAGC	CGCAAAGATCGACGAGAAAT
SMc02857	dnaK	CCGAGTTCAAGAAGGAGCAG	AGCTTCATCGTCAGGTGCTT
SMc01364	topA	CATCGACCGTGACTATGTGG	GCACGTCCTTCCAATTGAGT
SMc02482	sucA	AAGACCGTCGTCCAGCTCTA	CGACCTCCTTCAACTGCTTC
SMc02481	sucD	TGTTCCAGACGACCAATGAA	CCTCGTCTTTCAGGAACTGC
SMc02480	icd	AACCTGGACGAATCGATCAC	TTCCTCGTCGAACACCTTCT
SMc00869	atpF2	GCTGCTTACGAGCAGGAGTT	GCAAGAGCCTTCGACTTGAT
SMc00768	aceA	GGACGCTATTCCATCTGGTC	CGAGAACGTTGCGATTGTAG
SMc01317	rpoB	CGTCAACAAGTACGGCTTCA	CGTCCATCAGGTTGATGTTG

Tabella 1: Coppie di primers specifiche di *E. meliloti* 1021 utilizzate nell'analisi qRT-PCR. Il gene *rpoB* è il gene costitutivamente espresso (*housekeeping*) nelle cellule 1021, utilizzato per la normalizzazione dei dati nel metodo comparativo del CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

Risultati

1. L'IAA influenza il superavvolgimento del DNA in vivo

Per verificare se l'IAA influenza la topologia del DNA in vivo, il livello di superavvolgimento del DNA è stato valutato in due batteri non correlati: *E. meliloti* 1021, batterio del suolo e produttore povero di IAA e *E. coli*, batterio enterico che non sintetizza IAA ma per il quale è stato già dimostrato da Bianco et al. (2006) che l'IAA ha un ruolo in questo batterio nei cambiamenti di espressione genica.

Le cellule *E. meliloti* ed *E. coli* che ospitano i plasmidi pMB393 (7.000 bp) e pBS (3.000 bp), rispettivamente, sono state trattate nel tempo con concentrazioni graduali di IAA (0,2, 1 e 5 mM). I due DNA plasmidici sono stati poi purificati da cellule non trattate (controllo) e trattate con IAA e sottoposti separatamente ad analisi di mobilità elettroforetica in presenza di clorochina.

La Figura 1A mostra la mobilità elettroforetica del plasmide pMB393 estratto dalle cellule di *E. meliloti* trattate con IAA per 30 e 60 minuti. Nella figura 1B sono anche riportati i diagrammi densitometrici dei plasmidi estratti da cellule di *E. meliloti* trattati con IAA per 60 minuti.

Quando è stato utilizzato IAA 0,2 mM, il pattern generale dei topoisomeri è rimasto invariato. Con l'aumentare della concentrazione di IAA la quantità relativa di ciascun topoisomero è cambiata. In particolare, i topoisomeri con un'alta densità di superavvolgimento negativo (bande inferiori) erano chiaramente visibili dopo il trattamento con IAA 5 mM.

Risultati simili sono stati ottenuti per il plasmide pBS estratto dalle cellule di *E. coli* dopo il trattamento con IAA. In particolare, con l'aumentare della concentrazione di IAA, i topoisomeri generati erano maggiormente quelli superavvolti negativamente (Figura 2A - C). Il trattamento in vivo delle cellule di *E. coli* con novobiocina inibisce l'attività della DNA girasi e porta, come previsto da Gilbert and Allan (2014), a una riduzione del livello di superavvolgimento negativo dei plasmidi. Questi risultati mostrano che il trattamento con IAA aumenta il livello di superavvolgimento negativo in vivo in due batteri non correlati, il batterio del suolo e povero produttore di IAA *E. meliloti* e il batterio enterico *E. coli* che non sintetizza IAA, suggerendo che IAA influenza lo stato topologico del DNA in vivo.



Figura 1: Effetto dell'acido indolo-3-acetico (IAA) sulla topologia del DNA nelle cellule di *Ensifer meliloti*. (**A**) Analisi della distribuzione relativa di topoisomeri per il plasmide pMB393. Il plasmide pMB393 è stato purificato dalle cellule di controllo di *E. meliloti* 1021 trattate per 30 e 60 minuti con IAA (0,2, 1 e 5 mM) ed analizzato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio allo 0,7% contenente 10 μ g/mL clorochina. **OC**: DNA circolare aperto; **SC**: DNA superavvolto. La mobilità elettroforetica riportata è un'immagine rappresentativa di tre replicati biologici.

(**B**) La distribuzione dei topoisomeri è calcolata come percentuale di topoisomeri sulla densità superelica specifica rispetto al DNA totale in cellule di controllo non trattate e cellule trattate per 60 minuti con 0,2, 1 e 5 mM IAA. Lo stato topologico di ciascun topoisomero è espresso come la densità superelica specifica (σ).



Figura 2: Effetto dell'IAA sulla topologia del DNA nelle cellule di *Escherichia coli*. (**A**) Analisi della distribuzione relativa dei topoisomeri del plasmide reporter pBlueScript (pBS). Il plasmide pBS è stato purificato dalle cellule di E. *coli* BL21 di controllo e trattate per 30 e 60 min con IAA (0,2, 1 e 5 mM) o novobiocina (Nov 79 μ M) ed analizzato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio allo 0,7% contenente 1 μ g/mL clorochina. **OC**: DNA circolare aperto; **SC**: DNA superavvolto. La mobilità elettroforetica riportata è un'immagine rappresentativa di tre replicati biologici.

(**B** e **C**) Distribuzione dei topoisomeri calcolata come percentuale di topoisomeri sulla densità superelica specifica (σ) rispetto al DNA totale in ciascuna condizione dopo 30 e 60 minuti di trattamento, rispettivamente.

2. L'IAA interagisce con il DNA inducendo un'alterazione nella sua struttura

Per valutare se l'IAA potesse interagire direttamente con il DNA, è stata utilizzata la spettrofotometria UV-Vis e il dicroismo circolare (CD) (Gonzalez-Ruiz et al., 2011; Biver, 2012).

2.1. Spettri di assorbimento di IAA in presenza di DNA plasmidico

Abbiamo verificato che gli spettri UV dell'IAA erano caratterizzati da due bande di assorbanza massima registrate a 220 e 280 nm (Caric et al., 2004; Dobrev et al., 2005; Meliani et al., 2017). Quando il plasmide pBS è stato aggiunto alla soluzione IAA (25 μ M) alla concentrazione finale di 1,7 μ g/mL, sono state misurate variazioni ipercromiche deboli ma riproducibili nell'assorbanza a 280 nm, probabilmente a seguito della formazione del complesso DNA – IAA (Figura 3A).

2.2. Analisi competitiva con il bromuro di etido (EtBr)

Lo spettro di assorbimento UV-Vis di EtBr in soluzione acquosa è riportato nella Figura 3B. L'aggiunta di ctDNA (DNA del timo di vitello) alla soluzione di EtBr (7 μ M) ha comportato una riduzione dell'assorbanza e uno spostamento (nel rosso) del suo assorbimento massimo da 480 a 521 nm. Il marcato spostamento dovuto a una diminuzione della polarità dell'ambiente di EtBr nel complesso EtBr-ctDNA rispetto a EtBr libero è coerente con i dati della letteratura precedente (Baneriee et al., 2013; Sohrabi, 2015).

L'aggiunta di concentrazioni crescenti di IAA (2, 10, 15, 25 mM) al complesso EtBr – ctDNA ha portato ad un graduale aumento (spostamento nel blu) dell'assorbanza e ad un nuovo spostamento dell'assorbanza massima da 521 fino a 489 nm registrato con la concentrazione massima di IAA utilizzata (25 mM).

2.3. Analisi spettroscopica del dicroismo circolare (CD)

L'interazione tra molecole esterne e DNA porta a cambiamenti significativi nella sua struttura e quindi a perturbazioni nei suoi spettri CD (Chang et al., 2012; Salem et al., 2016). L'effetto di IAA sulla conformazione della struttura secondaria di ctDNA è stato analizzato mediante CD. Mantenendo la concentrazione di ctDNA fissa a 0,125 mg/mL, la concentrazione di IAA variava da 0 a 0,5 mM. Come illustrato nella figura 3C il ctDNA mostrava due bande CD nella regione UV: un segnale positivo a 278 nm, dovuto alle interazioni di impilamento delle basi della molecola di DNA, e una banda negativa a 245 nm, caratteristica dell'ellitticità. Nella stessa gamma di lunghezze d'onda, la molecola di IAA non mostrava spettri CD. Dall'analisi degli spettri CD, è stato osservato che la banda negativa diminuiva con l'aggiunta di IAA 0,0315 mM e diminuiva

ulteriormente al progressivo aumento della concentrazione di IAA, come mostrato nella figura 3C. I cambiamenti osservati negli spettri CD indicano chiaramente che il legame di IAA con ctDNA ha portato a una perturbazione nella conformazione della sua struttura secondaria.



Figura 3: L'IAA altera la struttura del DNA. (A) Spettri di assorbimento UV dell'IAA con quantità crescenti del plasmide pBS. Miscele di etanolo e plasmide pBS sono state utilizzate come riferimento e sottratte da ciascuna misurazione. (B) Spettri di assorbanza UV-Vis del bromuro di etidio (EtBr) in assenza (linea nera) e presenza (linea rossa) del ctDNA. Sono anche riportati gli spettri di assorbimento del complesso EtBr - ctDNA in presenza di concentrazioni crescenti di IAA. (C) Spettri di dicroismo circolare del ctDNA (125 ng/mL) in presenza di concentrazioni crescenti di IAA.

A

3. L'IAA influenza l'attività di rilassamento delle DNA Topoisomerasi di E. coli

Lo stato topologico del DNA è strettamente regolato nella cellula dalle attività combinate delle topoisomerasi. Diversi tipi di topoisomerasi sono state trovate in tutti gli organismi viventi e svolgono un ruolo chiave nella risoluzione dei problemi topologici critici nel metabolismo del DNA (Forterre et al., 2007; Forterre and Gadelle, 2009). L'azione di superavvolgimento del DNA ad opera della DNA girasi e l'azione di rilassamento del DNA ad opera della topoisomerasi I sono importanti per il mantenimento del superavvolgimento del DNA allo stato stazionario nei batteri.

Per studiare ulteriormente la relazione tra l'azione dell'IAA e la topologia del DNA, abbiamo analizzato l'effetto di questa molecola sull'attività catalitica delle topoisomerasi del DNA. L'attività di rilassamento della topoisomerasi IA da E. coli (EcTopoI) in presenza di IAA è stata analizzata sfruttando la diversa mobilità elettroforetica delle molecole di DNA rilassate (topoisomeri), rispetto al substrato superavvolto negativamente. Come mostrato nella figura 4A e C, l'IAA non ha influenzato la migrazione del DNA con livelli di superavvolgimento elevato (SC). Al contrario, dopo il trattamento con IAA è stata osservata una minore intensità del DNA a circolo aperto (OC). Il DNA OC è meno stabile del DNA SC, quindi il legame di IAA potrebbe destabilizzare ulteriormente questo DNA, rendendolo più sensibile alla degradazione. Quando il substrato di DNA è stato pre-incubato con IAA è stato poi aggiunto EcTopoI alla miscela di reazione, l'attività di rilassamento dell'enzima è stata significativamente inibita in modo dipendente dalla concentrazione di IAA rispetto al DNA non trattato (Figura 4A e B). Inoltre, l'inibizione mediata da IAA si è verificata a tutte le concentrazioni di topoisomerasi testata (Figura 4C e D), con un'inibizione del 60% raggiunta quando sono stati testati 0,5 U/mL di EcTopoI e 1 mM IAA rispetto al DNA non trattato (Figura 4D). L'effetto inibitorio è stato osservato soltanto quando l'IAA è stato pre-incubato con il DNA e solo successivamente è stato aggiunto l'enzima EcTopoI. L'aggiunta simultanea delle tre componenti non ha portato ad alcun effetto.

Questi risultati indicano che: (1) Il legame di IAA al DNA inibisce l'attività di rilassamento di EcTopoI; e (2) l'IAA non ha influenzato la stabilità/funzione delle proteine.

Per verificare la specificità di inibizione dell'IAA, l'attività di *Ec*TopoI è stata anche testata in presenza di molecole diverse che erano strutturalmente e funzionalmente simili all'IAA. Nelle nostre condizioni, nessuno dei composti testati ha influenzato l'attività di rilassamento di *Ec*TopoI, indicando che l'inibizione dell'attività della topoisomerasi è una peculiarità di IAA (Figura 5). Al contrario, nelle condizioni analizzate, l'IAA non ha esercitato un significativo

effetto inibente sull'attività di superavvolgimento della DNA girasi di tipo II, a tutte le concentrazioni di enzima testato.



Figura 4: L'IAA influenza l'attività della topoisomerasi I. (**A**) e (**B**) Effetto di 0,2, 1,0 e 3,0 mM IAA sull'attività di 2,5 U/mL topoisomerasi I da *E. coli* (*Ec*TopoI). (**C**) e (**D**) Effetto di 1,0 mM IAA sull'attività di 0,1, 0,5 e 2,5 U/mL *Ec*TopoI. Per visualizzare i prodotti di reazione, i gel sono stati colorati dopo la corsa elettroforetica con bromuro di etidio e successivamente lavati con acqua deionizzata. L'intensità relativa di ciascuna banda nel gel è stata misurata ed utilizzata per calcolare la quantità di DNA totale (il DNA non trasformato più le distinte specie di topoisomeri) e quella di tutti i singoli prodotti di reazione. Per ogni condizione, l'attività di rilassamento è espressa come percentuale dei topoisomeri prodotti sul DNA totale in ciascuna corsia. I valori sono la media \pm DS di tre diversi replicati biologici. Gli asterischi (*) indicano differenze significative (*p* <0,05, ANOVA unidirezionale con il test post-hoc di Tukey) tra il controllo e i campioni di DNA trattati con IAA. **OC** è il DNA circolare aperto; **SC** è il DNA superavvolto.



Figura5: L'inibizione delle topoisomerasi è una peculiarità dell'IAA. L'effetto di molecole purificate, strutturalmente (indolo, IND; acido indole-3-carbossilico, ICA; triptofano, Trp) o funzionalmente (acido 2,4-diclorofenossiacetico, 2,4-D) simile all'IAA, sull'attività di *Ec*TopoI è stato analizzato aggiungendo 5 U/ml (**A** e **B**) e 2,5 U/ml (**C** e **D**) dell'enzima a una miscela contenente il plasmide di DNA superavvolto e ciascun composto alla concentrazione di 1 mM. Le miscele sono state poi incubate a 37 °C per 30 minuti. Prima dell'aggiunta dell'enzima, il DNA plasmidico è stato incubato con o senza le molecole purificate per 15 minuti a temperatura ambiente per garantire l'equilibrio di legame. Per visualizzare i prodotti di reazione dopo la corsa elettroforetica, i gel sono stati colorati con bromuro di etidio e lavati con acqua deionizzata. La quantità di tutti i singoli topoisomeri è stata espressa come percentuale ed è stata calcolata dividendo l'intensità di ciascuna banda di topoisomero per la quantità di DNA totale in ciascuna corsia. Nelle nostre condizioni, nessuno dei composti testati ha influenzato il rilassamento del DNA plasmidico superavvolto in modo dipendente dalla topoisomerasi I, indicando che l'inibizione delle topoisomerasi è una peculiarità dell'IAA. OC, DNA circolare aperto; SC, DNA superavvolto.

4. L'IAA innesca l'espressione di geni sensibili a un inibitore della DNA girasi

È noto che il superavvolgimento del DNA funge da regolatore della trascrizione procariotica (Vvedenskaya et al., 2015; Dormann e Dormann, 2016). In effetti, alcuni promotori hanno un livello ottimale di superavvolgimento per la loro trascrizione e questo livello è diverso per i diversi promotori. Studi genetici hanno anche dimostrato che lo stato di superavvolgimento del DNA cellulare nei procarioti dipende dalle due principali azioni delle topoisomerasi: DNA girasi e topoisomerasi I. È stato segnalato da Defez e Spena (1998) che l'IAA ha indotto cambiamenti nella trascrizione di geni specifici come quelli relativi a: fissazione dell'azoto (*nifA*, *fixK1*, *fixJ*), risposta allo stress (*dnaK*, *ibpa*, *rpoH1*) e metabolismo (*pgi*, *sucA*, *sucD*, *icd*, *aceA*, *atpF2*). In questo lavoro, tenendo conto di questi dati, abbiamo valutato se l'espressione del gruppo di geni selezionato era sensibile ai cambiamenti specifici nella topologia del DNA. Le cellule di *E. meliloti* che ospitano il plasmide pMB393 (Defez et al., 2016) sono state trattate con IAA, che inibisce l'attività della topoisomerasi, e con novobiocina, che riduce i livelli di superavvolgimento del DNA attraverso l'inibizione della DNA girasi. Per verificare se i geni selezionati fossero sensibili a specifici cambiamenti topologici del DNA, il livello di espressione di questi geni è stato mediante analisi qRT-PCR.

Coerentemente con i risultati ottenuti nel laboratorio dove ho svolto questo progetto di dottorato, abbiamo scoperto che sette geni (*nifA*, *fixK1*, *fixJ*, *dnaK*, *ibpa*, *rpoH1* e *icd*) erano significativamente indotti nelle cellule trattate con IAA. Per questi geni, è stato osservato un risultato opposto per il trattamento con novobiocina: il livello di trascrizione di quasi tutti i geni era fortemente ridotto, con un effetto repressivo più debole osservato solo per il gene *dnaK* (Figura 6). I livelli di espressione misurati per i restanti geni hanno mostrato che la novobiocina non ha represso tutti i geni e che l'IAA non ha indotto alcuni geni. Questi risultati suggeriscono una possibile correlazione tra l'espressione dei geni selezionati e le modifiche osservate nella topologia del DNA.



Figura 6: Le alterazioni del superavvolgimento del DNA mediate dall'IAA stimolano l'espressione di geni coinvolti nella fissazione dell'azoto e nella risposta allo stress. Misurazione quantitativa dei livelli di trascrizione di *nifA*, *fixK1*, *fixJ*, *dnaK*, *ibpa*, *rpoH1*, *pgi* e *topA* in colture trattate per 2 ore con novobiocina e IAA. I valori sono relativi alla media \pm DS di quattro diversi replicati biologici. Gli asterischi (*) indicano differenze significative (p <0,05, ANOVA unidirezionale con il test post-hoc di Tukey) tra il controllo e le cellule trattate. Nov, novobiocina.

5. L'attività del promotore di *nifA* è stimolata dall'IAA e repressa dall'inibitore della DNA girasi

Il gene *nifA* è il principale regolatore trascrizionale coinvolto nell'espressione dei geni della fissazione dell'azoto in E. meliloti (Fisher 1994). Inoltre, Liu et al. (2005) hanno dimostrato che l'espressione genica guidata dal promotore di nifH di E. meliloti, richiedeva la presenza di DNA girasi attiva. In effetti, l'attività del promotore di *nifH* è stata significativamente ridotta quando le cellule sono state trattate con la novobiocina che inibisce la DNA girasi. Considerando che la DNA girasi ha la capacità di introdurre superavvolgimenti negativi nel DNA a spese dell'idrolisi dell'adenosina trifosfato (ATP), i loro risultati indicavano che il superavvolgimento negativo era importante per attività del promotore di nifH. Considerando la capacità di IAA di indurre l'espressione del gene nifA, abbiamo studiato se anche l'IAA potesse avere un effetto sull'attività del promotore *nifA*. Sono stati condotti esperimenti preliminari per selezionare le concentrazioni di IAA e novobiocina che non influenzavano la vitalità delle cellule batteriche (Figura 7 B e D). La sensibilità del promotore nifA di E. meliloti all'IAA e alla novobiocina inibitrice della girasi è stata valutata misurando l'attività relativa della β -galattosidasi delle cellule batteriche, cresciuta aerobicamente in mezzo privo di azoto, dopo il trattamento con le due molecole. Un significativo effetto inibitorio sull'attività degli enzimi è stato registrato dopo tre e sei ore di trattamento con novobiocina (Figura 7A), suggerendo che il promotore di nifA era sensibile ai cambiamenti nella topologia del DNA. Un effetto opposto è stato osservato quando le cellule sono state trattate con IAA 1 mM: un aumento significativo dell'attività della β -galattosidasi è stato misurato nel tempo, con l'induzione più elevata registrata dopo 30 minuti (Figura 7C). Questi risultati supportano l'idea che l'IAA e la novobiocina possano regolare l'espressione del gene nifA, probabilmente modulando l'attività del suo promotore attraverso cambiamenti nel suo stato di superavvolgimento.



Figura 7: L'IAA stimola l'attività del gene *nifA*, il regolatore della fissazione dell'azoto. Le cellule di *E. meliloti* coltivate in mezzo privo di azoto sono state trattate con IAA e novobiocina alle concentrazioni finali di 1 e 1,5 mM, rispettivamente. L'espressione del gene di fusione promotore *nifA* - lacZ (**A** e **C**) e la crescita batterica (**B** e **D**) sono state misurate nel tempo. Gli asterischi (*) indicano differenze significative (p < 0,05, ANOVA unidirezionale con il test post-hoc di Tukey) tra il controllo e le cellule trattate con IAA e novobiocina (Nov).

Discussione

Nel 1978, Witham et al. ipotizzarono l'esistenza di una specifica interazione tra fitoormoni intercalanti e DNA. È noto che il legame dei ligandi esterni al DNA altera transitoriamente la topologia locale del DNA, inducendo variazioni nella sua struttura. Inoltre, il superavvolgimento negativo è essenziale per il funzionamento ottimale dei processi di trascrizione, poichè facilita l'accesso (apertura del DNA) alla sequenza del promotre (Dorman, 2006; Ma and Wang, 2016; Zhi et al., 2017).

A seguito di tale ipotesi e osservazioni, abbiamo condotto esperimenti in vivo e in vitro per verificare l'esistenza di una possibile connessione tra l'azione dell'IAA e la struttura/funzione del DNA. Sono stati condotti esperimenti in vivo con due batteri non correlati: il batterio del suolo e scarso produttore di IAA *E. meliloti* e il batterio enterico *E. coli* che non sintetizza IAA. Ognuno di questi batteri ospita specifici plasmidi.

I due batteri sono stati trattati con concentrazioni crescenti di IAA che non influenzavano la crescita batterica e lo stato topologico del DNA dei due plasmidi. I DNA plasmidici delle cellule trattate con IAA hanno mostrato un aumento del superavvolgimento del DNA in modo dipendente dalla concentrazione, suggerendo che l'IAA influenza lo stato topologico del DNA in vivo. È stata poi condotta un'analisi in vitro mediante spettroscopia CD per caratterizzare l'interazione IAA-DNA. Abbiamo dimostrato che l'IAA è in grado di indurre cambiamenti conformazionali del DNA con cui interagisce, comunemente indotti da agenti intercalanti (Snyder et al., 2006; Hendry et al., 2007). Inoltre, l'aggiunta di concentrazioni crescenti di IAA al complesso EtBr-ctDNA in uno studio competitivo ha portato a una diminuzione dei siti di legame del DNA disponibili per EtBr, indicando che IAA potrebbe spostare l'intercalante EtBr dal suo equilibrio nel complesso EtBr-ctDNA in modo dipendente dalla concentrazione.

È stato poi analizzato l'effetto di IAA sull'attività delle topoisomerasi del DNA che regolano lo stato topologico del DNA nei batteri: EcTopoI e DNA girasi. I dati ottenuti hanno dimostrato che l'IAA ha inibito specificamente l'attività di rilassamento del DNA di EcTopoI ma non ha influenzato l'attività di superavvolgimento della DNA girasi. Inoltre, nelle nostre condizioni, molecole strutturalmente e funzionalmente simili all'IAA non hanno influenzato l'attività di IAA.

Non possiamo escludere che l'anello indolico presente nella struttura dell'IAA possa svolgere un ruolo importante nel processo di intercalazione. Tuttavia, ipotizziamo che la semplice presenza dell'anello indolico non sia sufficiente per inibire l'attività dell'enzima topoisomerasi I. Pertanto, suggeriamo che tre componenti chimiche sono importanti per l'interazione di IAA con il DNA:

l'anello indolico, i gruppi idrossilici disponibili per la formazione del legame idrogeno e la giusta distanza tra l'idrossile e l'anello indolico.

Un altro risultato importante è che l'inibizione si è verificata solo quando il DNA e l'IAA sono stati pre-incubati nella miscela di reazione, dimostrando che l'interazione tra IAA e DNA è essenziale per l'inibizione degli enzimi. Questi risultati dimostrano che l'inibizione di *Ec*TopoI non è dovuta all'interferenza diretta dell'IAA con l'enzima ma all'interazione dell'IAA con il DNA, impedendo il rilassamento del plasmide negativamente superavvolto da parte dell'enzima. Tali risultati erano coerenti con l'aumento del superavvolgimento negativo osservato in vivo per le cellule trattate con IAA.

I dati generali suggeriscono che l'IAA ha un ruolo nella modifica del superavvolgimento del DNA. Molti geni vengono attivati aumentando il superavvolgimento negativo, poiché favorisce lo svolgimento della doppia elica del DNA necessaria per la formazione di complessi aperti, portando così ad un aumento della trascrizione dei promotori, per il quale la formazione di complessi aperti è un fattore limitante (Vvedenskaya et al., 2015; Dorman and Dorman, 2016).

Quando i livelli di mRNA dei geni della fissazione dell'azoto e di geni correlati allo stress sono stati misurati in cellule *E. meliloti* 1021 trattate con IAA e novobiocina, sono stati registrati risultati opposti: l'espressione di questi geni è stata significativamente indotta nelle cellule trattate con IAA e fortemente ridotta dopo il trattamento con novobiocina. L'effetto repressivo più elevato indotto dalla novobiocina è stato misurato per la trascrizione del gene *topA*, la cui espressione è sensibile al superavvolgimento (Szafran et al., 2016).

Abbiamo anche verificato, per la prima volta, che il promotore di *nifA*, il principale regolatore dei geni di fissazione dell'azoto in *E. meliloti* 1021, era significativamente attivato in presenza di IAA e inibito dalla novobiocina, che riduce il livello di superavvolgimento del DNA batterico. Questi risultati suggeriscono che l'attività del promotore *nifA* è regolata da cambiamenti nel superavvolgimento del DNA. Tali dati erano coerenti con quelli precedentemente ottenuti da studi trascrizionali e biochimici condotti su *E. meliloti* (Defez and Spena, 1998). I nostri risultati sono anche in linea con i dati precedenti riguardanti l'effetto stimolante del superavvolgimento del DNA sull'attività del promotore del *rpoH* in *E. coli* (Ueshima et al., 1989) e con il coinvolgimento della proteina da shock termico codificata da *dnaK* nel mantenimento del superavvolgimento del DNA locale (Ogata et al., 1996).

I risultati per l'interazione IAA-DNA ottenuti *in vivo* e *in vitro*, e presentati in questo *Capitolo 2* suggeriscono un ruolo per l'IAA nella modulazione dei cambiamenti topologici del DNA. È noto che diversi tipi di agenti leganti il DNA possono agire da modulatori genici sequenza-specifica, esercitando il loro effetto dalla regolazione della trascrizione alla modificazione genica (Hendry

et al., 2007). Pensiamo quindi che un approfondimento dei nostri risultati potrebbe aiutare a capire se la nuova funzione dell'IAA è coinvolta nella promozione dell'espressione di geni specifici, inclusi quelli coinvolti nella fissazione dell'azoto.

Referenze

- Andreozzi, A.; Prietro, P.; Mercado-Blanco, J.; Monaco, S.; Zampieri, E.; Romano, S.; Valé, G.; Defez, R.; Bianco, C. The co-inoculation with nitrogen-fixing and indole-3-acetic (IAA)-producing bacterial endophytes positively affects rice (Oryza sativa L. cv. Baldo) rice. Env. Microbiol. 2019.
- Baneriee, A.; Singh, J.; Dasgupta, D. Fluorescence spectroscopic and calorimetry based approaches to characterize the mode of interaction of small molecules with DNA. J. Fluoresc. 2013, 23, 745–752.
- Bettotti, P.; Visone, V.; Lunelli, L.; Perugino, G.; Ciaramella, M.; Valenti, A. Structure and properties of DNA molecules over the full range of biologically relevant supercoiling states. Sci. Rep. 2018, 8, 6163.
- Bianco, C.; Defez, R. A Sinorhizobium meliloti IAA-overproducing strain improves phosphate solubilization and Medicago plant yield. Appl. Environ. Microbiol. 2010, 76, 4626–4632.
- Bianco, C.; Defez, R. Auxins upregulate nif and fix genes. Plant Signal. Behav. 2010, 5, 1290–1294.
- Bianco, C.; Imperlini, E.; Calogero, R.; Senatore, B.; Pucci, P.; Defez, R. Indole-3-acetic acid regulates the central metabolic pathways in Escherichia coli. Microbiology 2006, 152, 2421–2431.
- Biver, T. Use of UV-Vis spectrometry to gain information on the mode of binding of small molecules to DNAs and RNAs. Appl. Spectr. Rev. 2012, 47, 271–325.
- Caric, D.; Tomisic, V.; Kveder, M.; Galic, N.; Pifat, G.; Magnus, V.; Soskic, M. Absorption and fluorescence spectra of ring-substituted indole-3-acetic acids. Biophys. Chem. 2004, 111, 247–257.
- Champoux, J.J. DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism. Annu. Rev. Biochem. 2001, 70, 369–413.
- Chang, Y.-M.; Chen, C.K.-M.; Hou, M.-H. Conformational changes in DNA upon ligand binding monitored by circular dichroism. Int. J. Sci. 2012, 13, 3394–3413.
- Crozat, E.; Philippe, N.; Lenski, E.R.; Geiselmann, J.; Schneider, D. Long-term experimental evolution in Escherichia coli. XII. DNA topology as a key target selection. Genetics 2005, 169, 523–532.
- Darwin, C. The power of Movement in Plants; John Murray: London, UK, 1880.

- De Melo, M.P.; Pithon-Curi, T.C.; Curi, R. Indole-3- acetic acid increases glutamine utilization by high peroxidase activity-presenting leucocytes. Life Sci. 2004, 75, 1713– 1725.
- Defez, R.; Andreozzi, A.; Bianco, C. The overproduction of indole-3-acetic acid (IAA) in endophytes upregulates nitrogen fixation in both bacterial cultures and inoculated rice plants. Microb. Ecol. 2017, 74, 441–452.
- Defez, R.; Esposito, R.; Angelini, A.; Bianco, C. Overproduction of indole-3-acetic acid in free-living rhizobia induces transcriptional changes resembling those occurring in nodule bacteroids. Mol. Plant-Microbe Interact. 2016, 29, 484–495.
- Defez, R.; Spena, A. Method to control gene expression in bacteria, namely Rhizobiaceae, to improve root nodule development, nitrogen fixation and plant biomass production. US patent EP98/830674.2, 9 November 1998.
- Ditta, G.; Virts, E.; Palomares, A.; Kim, C.H. The nifA gene of Rhizobium meliloti is oxygen regulated. J. Bacteriol. 1987, 169, 3217–3223.
- Dobrev, P.I.; Havlicek, L.; Vagner, M.; Malbeck, J.; Kaminek, M. Purification and determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography. J. Chromat. 2005, 1075, 159–166.
- Dorman, C. DNA supercoiling and bacterial gene expression. Sci. Prog. 2006, 89, 151–166.
- Dormann, C.J.; Dormann, M.J. DNA supercoiling is a fundamental regulatory principle in the control of bacterial gene expression. Biophys. Rev. 2016, 8, S89–S100.
- Fisher, H.M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. Microbiol. Rev. 1994, 58, 352–386.
- Forterre, P.; Gadelle, D. Phylogenomics of DNA topoisomerases: Their origin and putative roles in the emergence of modern organisms. Nucleic Acids Res. 2009, 37, 679–692.
- Forterre, P.; Gribaldo, S.; Gadelle, D.; Serre, M.C. Origin and evolution of DNA topoisomerases. Biochimie 2007, 89, 427–446.
- Galibert, F.; Finan, T.M.; Long, S.R.; Puhler, A.; Abola, P.; Ampe, F.; Barloy-Hubler, F.;
 Barnett, M.J.; Becker, A.; Boistard, P.; et al. The composite genome of the legume symbiont Sinorhizobium meliloti. Science 2001, 293, 668–672.
- Gilbert, N.; Allan, J. Supercoiling in DNA and chromatin. Curr. Op. Genet. Dev. 2014, 25, 15–21.

- González-Ruiz, V.; Olives, A.I.; Martin, M.A.; Ribelles, P.; Ramos, M.T.; Menéndez, C. An overview of analytical techniques employed to evidence drug-DNA interactions.
 Applications to the design of genosensors. In Biochemical engineering, Trends, Research and Techologies; NTECH Open Acces Publisher: Rijeka, Croatia, 2011; pp. 65–90.
- Hendry, L.B.; Mahesh, V.B.; Bransome, E.D.; Ewing, D.E. Small molecule intercalation with double stranded DNA: Implications for normal gene regulation and for predicting the biological efficacy and genotoxicity of drugs and other chemicals. Mut. Res. 2007, 623, 53–71.
- Imperlini, E.; Bianco, C.; Lonardo, E.; Camerini, S.; Cermola, M.; Moschetti, G.; Defez, R. Effect of indole-3-acetic acid on Sinorhizobium meliloti survival and on symbiotic nitrogen fixation and stem dry weight production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009, 83, 727–738.
- Jacobsen, J.V. Regulation of ribonucleic acid metabolism by plant hormones. Ann. Rev. Plant Physiol. 1977, 28, 537–564.
- Lee, Y.-R.; Cheng, M.; Lee, J.D.; Zhang, J.; Lin, S.-Y.; Fu, T.-M.; Chen, H.; Ishikawa, T.; Chiang, S.-Y.; Katon, J.; et al. Reactivation of PTEN tumor suppressor for cancer treatment through inhibition of a MYC-WWP1 inhibitory pathway. Science 2019, 364, aau0159.
- Liu, Y.-J.; Hu, B.; Zhu, J.-B.; Shen, S.-J.; Yu, G.-Q. nifH promoter is regulated by DNA supercoiling in Sinorhizobium meliloti. Acta Bioch. Bioph. Sin. 2005, 37, 221–226.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2-\Delta\Delta$ CT method. Methods 2001, 25, 402–408.
- Ma, J.; Wang, M.D. DNA supercoiling during transcription. Biophys. Rev. 2016, 8, S75–S87.
- Meliani, A.; Bensoltane, A.; Benidire, L.; Oufdou, K. Plant growth-promotion and IAA secretion with Pseudomonas fluorescens and Pseudomonas putida. J. Bot. Sci. 2017, 6, 16–24.
- Miller, J.H. Esperiments in molecular genetics. In Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor: New York, NY, USA, 1972.
- Ogata, Y.; Mizushima, T.; Kataoka, K.; Kita, K.; Miki, T.; Sekimizu, K. DnaK heat shock protein of Escherichia coli maintains the negative supercoiling of DNA against thermal stress. J. Biol. Chem. 1996, 271, 29407–29414.

- Pandolfini, T.; Storlazzi, A.; Calabria, E.; Defez, R.; Spena, A. The spliceosomal intron of the rolA gene of Agrobacterium rhizogenes is a prokaryotic promoter. Mol. Microbiol. 2000, 35, 1326–1334.
- Prusty, R.; Grisafi, P.; Fink, G.R. The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004, 101, 4153– 4157.
- Salem, O.M.; Vilková, M.; Janocková, J.; Jendzelovsky, R.; Fedorocko, P.; Zilecká, E.; Kaspárková, J.; Brabec, V.; Imrich, J.; Kozurková, M. New spiro tria(thia)zolidine– acridines as topoisomerase inhibitors, DNA binders and cytostatic compounds. Int. J. Biol. Macrom. 2016, 86, 690–700.
- Smith, D.H.; Davis, B.D. Mode of action of Novobiocin in Escherichia coli. J. Bacteriol. 1967, 93, 71–79.
- Snyder, R.D.; Ewing, D.; Hendry, L.B. DNA intercalative potential of marketed drugs testing positive in in vitro cytogenetics assays. Mut. Res. 2006, 609, 47–59.
- Sohrabi, N. Binding and UV/Vis spectral investigation of interaction of Ni(II) piroxicam complex with Calf thymus deoxyribonucleic acid (Ct-DNA): A thermodynamic approach. J. Pharm. Sci. Res. 2015, 7, 533–537.
- Szafran, M.J.; Gongerowska, M.; Gutkowski, P.; Zakrzewska-Czerwinska, J.; Jakimowicz, D. The coordinate positive regulation of topoisomerase genes maintains topological homeostasis in Streptomyces coelicolor. J. Bacteriol. 2016, 198, 3016–3028.
- Ueshima, R.; Fujita, N.; Hishihama, A. DNA supercoiling and temperature shift the promoter activity of the Escherichia coli rpoH gene encoding the heat-shock sigma subunit of RNA polymerase. Mol. Gen. Genet. 1989, 215, 185–189.
- Vvedenskaya, I.O.; Zhang, Y.; Goldman, S.R.; Valenti, A.; Visone, V.; Taylor, D.M.; Ebright, R.H.; Nickels, B.E. Massively systematic transcript end readout, "MASTER": Transcription start site selection, transcriptional slippage, and transcript yields. Moll. Cell. 2015, 60, 953–965.
- Went, F.W.; Thimann, K.V. Phytohormones. New York The Macmillan Company 1937, 251–283.
- Witham, F.H.; Hendry, L.B.; Chapman, O.L. Chirality and stereochemical recognition in DNA-phytohormone interactions: A model approach. Origin of Life 1978, 9, 7–15.

- Woodward, A.W.; Bartel, B. Auxin: Regulation, action, and interaction. Ann. Bot. 2005, 95, 707–735.
- Zhi, X.; Dages, S.; Dages, K.; Liu, Y.; Hua, Z.-C.; Makemson, J.; Leng, F. Transient and dynamic DNA supercoiling potently stimulates the leu-500 promoter in Escherichia coli. J. Biol. Chem. 2017, 292, 14566–14575.

Capitolo 3

Inoculazione del riso asiatico Oryza sativa L. cv. Baldo con endofiti isolati dal riso africano Oryza glaberrima L.: effetto sulla crescita e sulla risposta a stress salino.

Introduzione

Materiali e Metodi

- 1. Campioni di piante
- 2. Isolamento e purificazione dei batteri endofiti dai tessuti di riso O. glaberrima
- Identificazione degli endofiti isolati mediante analisi della sequenza genica rDNA 16S
 - 3.1. Estrazione del DNA genomico
 - 3.2. Amplificazione (PCR) del frammento genico del DNA ribosomale 16S
 - 3.3. Purificazione del prodotto di PCR
 - 3.4. Procedura di clonaggio
 - 3.5. Screening delle colonie positive mediante PCR-colony
 - 3.6. Analisi delle sequenze 16S e identificazione delle specie isolate
 - 3.7. Analisi filogenetica
- 4. Caratterizzazione degli endofiti isolati ed identificati
 - 4.1. Produzione di IAA
 - 4.2. Analisi HPLC-MS/MS
 - 4.3. Amplificazione dei frammenti dei geni della Nitrogenasi (*nifH*) e ACC deaminase (*acdS*)
- 5. Metodo di inoculazione e crescita delle piante
- 6. Ri-isolamento dei batteri diazotrofi da piante inoculate
- 7. Saggio di riduzione dell'acetilene (ARA) per la misura dell'attività nitrogenasica
 - 7.1. Coltura liquida
 - 7.2. Piante inoculate
- 8. Stress salino
- 9. Saggio degli enzimi antiossidanti
- 10. Misura del contenuto di clorofilla
- 11. Analisi del contenuto di carbonio e azoto nel fusto
- 12. Analisi statistiche

Risultati

- 13. Identificazione dei batteri endofiti
 - 13.1. Analisi della qualità delle sequenze 16S

- 13.2. Filogenesi delle specie identificate
- 14. Screening dei ceppi isolati per tratti PGP
- 15. Capacità degli endofiti N-fissatori isolati di colonizzare la specie di riso d'origine (*O. glaberrima*) e la nuova specie ospite (*O. sativa*)
- 16. Attività della nitrogenasi nelle due specie di riso inoculate con i sei diazotrofi
- 17. Valutazione della capacità azoto-fissativa e di colonizzazione della radice di *O*. *sativa* per i tre endofiti caratterizzati da una elevata attività azoto-fissativa
- 18. Miglioramento dei parametri di crescita delle piante O. sativa
- 19. Effetto dell'inoculazione di *O. sativa* con il ceppo BDA134-6 sull'attività degli enzimi antiossidanti e sulla funzione azoto-fissativa in condizioni di stress salino

Discussione

Referenze

Paper submitted: Bianco C, <u>Andreozzi A</u>, Romano S, Fagorzi C, Cangioli L, Cisse F, Niangado O, Sidibé A, Pianezze S, Perini M, Mengoni A, Defez R. Endophytes from African rice (*Oryza glaberrima L*.) increase the nitrogen, carbon, and chlorophyll content of Asian rice (*Oryza sativa L*.) improving its salinity stress tolerance. Environmental Microbiology, april 2021

Materiali e metodi

1. Campioni di piante

Nel presente studio, piante del riso africano *Oryza glaberrima* sono state utilizzate per l'isolamento e l'identificazione di endofiti autoctoni. Le piantine di *O. glaberrima* utilizzate sono state coltivate lungo il corso del Delta del fiume Niger (Mali) (Figura 1) tramite il sistema dell'acqua profonda (ciclo vitale: giugno-dicembre; fenotipo della pianta: *Floating type*)e sono state gentilmente fornite da Fousseyni Cisse e Amadou Sidibé dell'Institut d'Economie Rurale, Bamako.

Il riso *O. glaberrima* è coltivato nella valle del fiume Niger da oltre 2000 anni con minimi interventi da parte dell'uomo, grazie alle sue tolleranze e resistenze verso numerosi stress (siccità, patogeni e malattie).

2. Isolamento e purificazione dei batteri endofiti dai tessuti di riso O. glaberrima

Le piante di *O. glaberrima* sono state sterilizzate esternamente come segue: 1 minuto in etanolo al 70%, 1 minuto in ipoclorito di sodio al 5% (NaClO) e 30 secondi in etanolo al 70%. I campioni vegetali sono stati poi lavati più volte con acqua distillata sterile e macinati con 5 ml di tampone PBS 1X usando un mortaio e pestello sterili. Per l'isolamento e la selezione dei batteri endofitici, gli estratti di tessuto sono stati diluiti in serie (1:10, 1:50, 1:100, 1:1000) in soluzione PBS 1X e spatolati su piastre con terreno di crescita ricco R-2A (Sigma-Aldrich, USA). Le piastre sono state incubate per un massimo di 5 giorni a 30 °C. Le singole colonie sono state selezionate in base alla loro morfologia e poi strisciate su nuove piastre R-2A. Per isolare le colonie pure la procedura sopra descritta è stata ripetuta più volte. Tutte le colonie purificate sono state coltivate a 30 °C per 2 giorni in terreno liquido Luria Bertani (LB), comunemente utilizzato per la crescita batterica. Le colture batteriche in fase di crescita esponenziale (OD₆₀₀ = 0.7) sono state conservate a -80 °C in una soluzione contenente DMSO al 16% (v/v) e glicerolo al 10% (v/v).


Figura 1: Mappa climatica del Mali.

3. Identificazione degli endofiti isolati mediante analisi della sequenza genica rRNA 16S

Per ciascuna specie batterica, un'aliquota (2 ml) di coltura in LB in fase stazionaria di crescita è stata centrifugata per 5 minuti a 13.000 rpm. Il sovranatante è stato eliminato e il pellet cellulare conservato a -20 °C per l'estrazione del DNA genomico, necessario per i passaggi di identificazione batterica.

3.1 Estrazione DNA genomico

Per l'estrazione del DNA genomico dai pellet cellulari è stato utilizzato il Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), seguendo la procedura indicata dalla casa produttrice. Tale procedura prevede i seguenti passaggi:

- Risospendere il pellet con 600 µl di *Nuclei Lysis Solution* e pipettare delicatamente con un puntale tagliato per evitare danni al DNA
- Incubare per 6 minuti in un bagnetto a 70 °C e poi far raffreddare a temperatura ambiente
- o Aggiungere 3 µl di RNase 4 mg/ml e miscelare
- Incubare in un bagnetto a 37 °C per circa 40 minuti e raffreddare come prima
- Aggiungere 200 µl di *Protein Precipitation Solution*, vortexare per qualche secondo e incubare in ghiaccio per 5 minuti
- Centrifugare per 5 minuti a 13.000 rpm a temperatura ambiente, recuperare il sovranatante e trasferirlo in una nuova eppendorf
- Aggiungere 1 volume di Isopropanolo a temperatura ambiente e miscelare
- Centrifugare per 2 minuti a 13.000 rpm e allontanare il sovranatante
- Eliminare i residui di isopropanolo effettuando due lavaggi con 600 μl di *EtOH 70%*, miscelare e centrifugare per 2 minuti a 13.000 rpm
- o Allontanare l'etanolo sovranatante e asciugare il pellet all'aria
- Reidratare il pellet in buffer TE 1X (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1mM a pH 8) in un bagnetto a 65 °C per 1 ora

Per ogni campione di DNA genomico estratto 2 µl sono stati utilizzati per la quantificazione allo spettrofotometro NanoDrop 2000, come descritto prima. La purezza del DNA è assicurata da un rapporto di assorbanza $260/280 \ge 1.8$.

La qualità del DNA estratto è stata valutata mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio in TAE 1X. I campioni per la corsa sono stati allestiti in un volume finale di 10 μ l, con 5 μ l di DNA genomico e 2 μ l di indicatore di corsa. Per la visualizzazione del DNA è stato utilizzato il colorante fluorescente, *Bromuro di Etidio* (EtBr), che si intercala tra le basi di DNA. Il complesso DNA-EtBr è fluorescente alla luce UV (assorbe tra 260 e 360 nm ed emette a 590 nm), per cui le bande di DNA sono visibili posizionando il gel su un transilluminatore UV (Gel-doc, Thermo Scientific).

3.2 Amplificazione (PCR) del frammento genico dell'RNA ribosomale 16S

Il DNA genomico, estratto come sopra descritto, è stato utilizzato come stampo per l'amplificazione di un tratto del gene rRNA 16S mediante PCR, utilizzando *primers* universali per Eubatteri.

Per l'amplificazione sono state utilizzate le seguenti coppie di primer: 8-27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3 ') e 1510-1492R (5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3 '). La reazione di amplificazione (25 µl) conteneva: 2,5 µl di DreamTaq Buffer 10x (Thermo Scientific) contenete MgCl₂ 2 mM, 100 ng di DNA genomico, 200 nM di ogni primer, 1 mM di ciascun dNTP e 0,03 U di DreamTaq Hot Start DNA Polimerasi (Thermo Scientific). Una miscela di PCR senza DNA è stata inclusa come controllo negativo. Le condizioni di reazione della PCR erano le seguenti: 3 minuti a 95 °C, poi seguono 30 cicli di denaturazione a 95 °C per 30 secondi, appaiamento dei primers a 52 °C per 30 secondi e allungamento a 72 ° C per 1 minuto, al termine dei cicli segue un'estensione finale a 72 ° C per 10 minuti. I prodotti della reazione sono stati poi caricati su gel d'agarosio all'1,5% accanto ad un marker di peso molecolare (1Kb DNA Ladder) per verificare se il peso molecolare del frammento amplificato era uguale a quello atteso (1.4 Kb).

3.3 Purificazione del prodotto di PCR

I frammenti amplificati sono stati purificati utilizzando il Kit *QIAquick PCR Purification* (*Qiagen*) che permette la purificazione di frammenti lunghi da 100 bp a 10 kb. Questo kit si basa sulla tecnologia delle membrane a gel di silice e sfrutta la capacità del DNA d'interesse di legarsi a tali supporti. Il protocollo prevede i seguenti passaggi:

- Aggiungere 5 volumi di Buffer PB ad 1 volume di campione di PCR e miscelare;
- Posizionare una microcolonna QIAquick in un tubo da 2 ml fornito dal kit;

- Aggiungere il campione sulla microcolonna e centrifugare a 13.000 rpm per 30-60 secondi, per permettere il legame del DNA alla resina contenuta in essa;
- Eliminare il liquido filtrato attraverso la microcolonna (*flow-through*) e posizionare la microcolonna nello stesso tubo da 2 ml;
- Lavare aggiungendo 750 μl di Buffer PE alla microcolonna (tale tampone contiene etanolo che favorisce l'allontanamento dei sali) e centrifugare, come prima, per 30-60 secondi;
- Eliminare il flow-through e collocare la microcolonna nello stesso tubo da 2 ml;
- Centrifugare ulteriormente per 1 minuto in modo da eliminare le ultime tracce di etanolo;
- Porre la microcolonna su un tubo Eppendorf® da 1.5 ml ed eluire il DNA presente sulla resina della microcolonna aggiungendo al centro della membrana 30 µl di Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5);
- Lasciare a temperatura ambiente per 1 minuto, centrifugare a 13.000 rpm per 1 minuto e recuperare l'eluato.

I frammenti di DNA purificati sono stati caricati su gel d'agarosio all'1,5% accanto ad un marker adatto alla quantizzazione (N3232S *Biolabs*) e sottoposti a corsa elettroforetica. La quantizzazione delle bande elettroforetiche ottenute è stata effettuata tramite il programma *Image Lab* (Bio-Rad).

3.4 Procedura di clonaggio

I frammenti 16S amplificati e purificati sono stati utilizzati per costruire l'inserto da inserire nel vettore linearizzato pHTP1. L'inserto e stato clonato in cellule competenti di *E. coli* DH5α come indicato nel manuale NZYEasy Cloning and Expression Kit I (NZYTech). Gli inserti 16S sono stati preparati mediante reazione di amplificazione usando primer con sporgenze di 16 bp che comprendono le estremità 5' di entrambe le coppie di primers, *forward* e *reverse*. Questo consente di aggiungere ai singoli filamenti sequenze terminali complementari al vettore linearizzato. I primer utilizzati sono stati disegnati con il programma online *Primer3* e sintetizzati dall'azienda *Eurofins* (Gand, Belgio): 16S-NZYf (5'-T CAG CAA GGG CTG AGG CCT AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3 ') e 16S-NZYr (5'-T CAG CGG AAG CTG AGG GGT TAC CTT GTT ACG ATTO T-3 '). La preparazione degli inserti di DNA è stata effettuata con una reazione di amplificazione (25 μl) contenente 0,5 μl di prodotti della PCR-16S, sopra ottenuti, 2,5 μl di buffer 10x con MgCl₂2 mM, 200 nM della coppia di primer 16S-NZY, 0,2 mM di ciascuno dNTP, 0,03 U di DreamTaq Hot Start DNA Polymerase (Thermo Scientific). Le condizioni di reazione della PCR erano le seguenti: 3 minuti a 95 °C, 30 cicli di denaturazione a 95 °C per 30 secondi,

appaiamento dei primers a 68 °C per 30 secondi e allungamento a 72 °C per 1 minuto, al termine dei cicli segue un'estensione finale a 72 °C per 10 min. Gli inserti sono stati poi purificati utilizzando il kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN), descritto prima, e inseriti nel vettore pHTP1, per tale scopo una reazione di clonazione senza l'utilizzo della ligasi è stata preparata seguendo le istruzioni della casa produttrice, usando un rapporto molare vettore: inserto di 1 a 5. Il prodotto di clonazione è stato usato per la trasformazione delle cellule competenti di *E. coli* DH5 α seguendo le istruzioni della casa produttrice NZYTech.

3.5 Screening delle colonie positive mediante PCR-colony

Lo screening delle colonie positive che avevano acquisito l'inserto di interesse è stato effettuato tramite una PCR-*colony* utilizzando la coppia di primer indicata sopra ed utilizzata in precedenza per costruire l'inserto 16S da clonare. Per ciascun clonaggio effettuato, sono state testate circa 10 colonie dalla piastra della reazione vettore+inserto d'interesse, e altrettante colonie dalla piastra della reazione di controllo.

Per ciascun clone è stata preparata una miscela di reazione ($V_f = 25 \mu$ l) contenente 2,5 µl di buffer 10x con MgCl2 2 mM, 200 nM della coppia di primer 16S-NZY, 0,2 mM di ciascuno dNTP, 0,03 U di DreamTaq Hot Start DNA Polymerase (Thermo Scientific). Ciascuna colonia è stata prelevata con un puntale sterile e stemperata nella miscela di reazione. Il programma di amplificazione utilizzato è stato il seguente: 3 minuti a 95 ° C, 30 cicli di denaturazione a 95 °C per 30 secondi, appaiamento dei primers a 53 °C per 30 secondi e allungamento a 72 °C per 1 minuto, al termine dei cicli segue un'estensione finale a 72 °C per 10 min. I prodotti della reazione sono stati poi caricati su gel d'agarosio all'1,5% accanto ad un *Marker* di peso molecolare (1Kb DNA Ladder) per selezionare l'amplificato con lunghezza corrispondente a quella attesa. La lunghezza attesa dell'amplificato è stata calcolata sommando le lunghezze dell'inserto di interesse più la lunghezza dei due primers.

Infine, un'aliquota (10µl) del prodotto di PCR con lunghezza attesa e un'aliquota (15µl) del primer 16S-NZY *forward* (10µM), sono state inviate all'azienda Eurofins Scientific (Germania) per effettuare il sequenziamento.

3.6 Analisi delle sequenze 16S e identificazione delle specie isolate

La qualità delle sequenze ottenute per ciascun campione è stata analizzata tramite il programma FastQC (BMR genomics) (previa conversione della sequenza da formato Ab1 a formato Fastq). In particolare, utilizzando l'opzione "*Per base sequence quality*" è stata visualizzata la distribuzione dei valori di qualità lungo la sequenza. Questo ha permesso di effettuare un *trimming* della sequenza di bassa qualità sia all'estremità 5′ che all'estremità 3′ ottenendo una sequenza di 750 bp per ciascun campione. Successivamente per l'identificazione delle specie, ciascuna sequenza trimmata è stata confrontata, tramite il programma BLASTn, con il database di sequenze disponibile online GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) che permette di assegnare una precisa identificazione al microrganismo in esame.

3.7 Analisi filogenetica

L'analisi filogenetica dei ceppi è stata effettuata sulla base del confronto delle sequenze del gene ribosomiale 16S. Per tale analisi è stato utilizzato il *Software* MEGA6 (Tamura et al., 2013). Le sequenze 16S dei ceppi e le rispettive sequenze di riferimento ottenute da *GenBank* sono state allineate tramite il programma, disponibile online sul sito NCBI, CLUSTALW (Thompson et al., 1994) mantenendo le impostazioni predefinite del programma. Le sequenze sono state poi tagliate all'estremità mantenendo una porzione del gene di circa 400 bp comune a tutte le sequenze allineate. Successivamente si è proceduto all'elaborazione dell'albero filogenetico utilizzando il metodo della massima verosimiglianza (*Maximum likelihood*) basato sul modello Tamura-Nei (Tamura and Nei, 2013) con 1000 repliche di *bootstrap*.

4. Screening delle attività di promozione della crescita della pianta (PGP)

4.1. Produzione di IAA

Per valutare i livelli di produzione di IAA nel mezzo di coltura batterica è stato utilizzato un metodo colorimetrico (Salkowski et al., 1885) che prevede l'uso del reagente Salkowki (49 ml HClO₄ 35% e 1 ml FeCl₃ 0,5 M). Il reagente utilizzato permette l'ossidazione dei composti indolici di sali ferrici portando ad una colorazione rosa della soluzione la cui intensità di colore varia secondo la concentrazione di IAA presenti in essa. Le colture batteriche (4 repliche biologiche per batterio) sono state cresciute per una notte a 30 °C sotto costante agitazione a 200 rpm nel terreno liquido LB contenente 100 µM di L-triptofano. Un'aliquota (2 ml) della coltura liquida è stata centrifugata a 12.000 rpm per 5 minuti per raccogliere le cellule batteriche, il surnatante è stato miscelato con il reagente in un rapporto 1 a 1 ed incubato al buio a temperatura ambiente. Dopo 30 minuti di incubazione è stato osservato il viraggio di colore e l'assorbanza

delle miscele è stata misurata allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 530 nm. Un controllo negativo come riferimento per l'avvenuto viraggio di colore, è stato preparato con 1 ml di terreno LB sterile aggiunto a 1 ml di reagente Salkowski. Le cellule batteriche sono state essiccate e pesate per la normalizzazione dei dati. La concentrazione di IAA da ciascun mezzo di coltura è stata calcolata utilizzando una retta di taratura standard costruita con concentrazioni crescenti (μ g/ml) di sostanza IAA pura.

4.2.Analisi HPLC-MS/MS

Per la cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) è stata usata una colonna Ultra AQ C18 (dimensione dei pori di 3 μ m, 100 x 2,1 mm), operante a una portata di 250 μ l/min e termostatata a 35 °C. Le fasi mobili utilizzate sono state: acetato di ammonio 5 mM in H₂O contenente acido formico allo 0,2% (fase mobile A) e acetonitrile contenente acido formico allo 0,2% (fase mobile B). Per l'eluizione in gradiente, la percentuale di fase mobile B è stata aumentata linearmente dallo 0% al 40% in 11 min, poi al 90% in 2 min; dopo 7 min al 90% di fase mobile B, la composizione iniziale è stata ripristinata e equilibrato il sistema per 10 min. Il volume di iniezione era di 10 µl. L'HPLC Serie 200 era formtata da una pompa con un autocampionatore (Perkin Elmer Italia, Milano, Italia) accoppiato a uno spettrometro di massa 4000 Q Trap (Sciex, Framingham, MA, USA), dotato di un'interfaccia Turbo V IonSpray. L'interfaccia e i parametri di pettrometria di massa (MS) sono stati ottimizzati mediante infusione di una soluzione standard di IAA (Sigma-Aldrich). Le impostazioni utilizzate sono state le seguenti: gas di cortina 25, gas nebulizzatore 70, gas riscaldatore 68, temperatura 550 °C, tensione di spruzzatura ESI, 5,2 kV; potenziale di declassamento (DP) 40 V, potenziale di ingresso (EP) 10 V. L'azoto è stato utilizzato come nebulizzatore e gas di riscaldamento. L'acquisizione è stata eseguita in modalità di monitoraggio di reazioni multiple (MRM) con polarità ionica positiva, registrando due transizioni MRM per IAA e il suo isotopologo, acido indolo-2,4,5,6,7-d5-3-acetico-2,2-d2 (d7-IAA; acquistato da CDN Isotopes, Pointe-Claire, Canada): gli ioni protonati di IAA (m/z 176.1) e d7-IAA (m/z 183.1) sono stati frammentati nella cella di collisione della MS e gli ioni prodotti sono stati registrati a: m/z 130 (energia di collisione, CE, 23 V) e m/z 103 (CE 36 V) per IAA e, m/z 136 (CE 23 V) e m/z 109 (CE 40 V) per d7 -IAA. Per le analisi HPLC-MS/, 1 µl di una soluzione di d7-IAA (25 ng/µl in metanolo) è stato aggiunto a 100 µl di campione e quindi iniettato nello strumento HPLC-MS/MS. L'identificazione del picco è stata accettata solo se il tempo di ritenzione relativo dell'IAA era coerente con quello dello standard interno d7-IAA (±

0,5%) e se il rapporto dei segnali delle due transizioni era in accordo con quello registrato per lo standard. A fini quantitativi è stato misurato per ciascun campione il rapporto delle aree dei picchi (PAR, peak area ratio) dei segnali corrispondenti alla transizione MRM più intensa per IAA (m/z $176 \rightarrow m/z 130$) e per d7-IAA (m/z $183 \rightarrow m/z 136$). La concentrazione del campione è stata calcolata utilizzando una curva di calibrazione lineare a 6 punti preparata aggiungendo quantità scalari di IAA, nell'intervallo di concentrazione da 0,025 ng/ml a 0,5 ng/ml a diverse aliquote del mezzo di coltura. I punti di calibrazione sono stati elaborati parallelamente ai campioni, seguendo la stessa procedura. Per ogni campione sono state misurate tre aliquote da 100 µl in triplicato.

4.2. Amplificazione dei frammenti dei geni della Nitrogenasi (*nifH*) e ACC deaminase (*acdS*)

L'amplificazione (PCR) dei geni *nifH* e acdS è stata eseguita per identificare i batteri che fissano l'azoto atmosferico (diazotrofico) e che producono l'enzima ACC-deaminasi (alotoleranti). Le coppie di primer degenerati utilizzate sono: 19F (5'-GCI WTY TAY GGI AAR GGI GG-3') e 407R (5'-AAI CCR CCR CAI ACI ACR TC-3'), che ha amplificato un frammento di 388 bp del gene nifH (Gaby et al., 2012), acdSF3 (5'- ATCGGCGGCATCCAGWSNAAYCANAC -3') e acdSR3 (5'-GTGCATCGACTTGCCCTCRTANACNGGRT-3'), che ha amplificato un segmento di 683 bp del gene acdS (Zhengy, 2015). Le reazioni di amplificazione (25 µl) per lo screening di questi due geni sono state allestite come segue: 2,5 µl di 10x DreamTaq Buffer (Thermo Scientific) con 2 mM MgCl₂, 100 ng di DNA genomico, 200 nM (per il gene nifH) e 400 nM (per il gene acdS) di ciascun primer, 1 mM di ciascun dNTP e 0,03 U di DreamTaq Hot Start DNA Polymerase (Thermo Scientific). Le condizioni di amplificazione per i geni nifH e acdS erano le seguenti: 30 sec a 94 °C, 35 cicli di denaturazione a 95 °C, appaiamento delle coppie di primers a 50 °C (nifH) e 62 °C (acdS) per 1 minuto e allungamento a 72 °C per 1 minuto, al termine dei cicli segue un'estensione finale a 72 ° C per 10 minuti. Per allestire la reazione di controllo e per escludere la contaminazione dei reattivi utilizzati nella reazione di amplificazione, il DNA genomico è stato sostituito daacqua sterile Milli-Q.

Il DNA di *Herbaspirillum seropedicae* z67 (HSz67) è stato usato come controllo positivo (Zhengyi et al., 2015) per i frammenti di geni *acdS*, mentre il DNA di *Sinorhizobium meliloti* 1021 è stato usato come controllo positivo per i frammenti di geni *nifH*. Il DNA di *Escherichia coli* MG1655 è stato usato come controllo negativo per entrambi i geni. I prodotti della reazione sono stati poi caricati su gel d'agarosio all'1,5% accanto ad un marker (1Kb DNA Ladder) per verificare che il peso molecolare dei frammenti amplificati.

4.3. Crescita delle piante ed inoculazione con i batteri endofiti

Il riso "Baldo", utilizzato in questi studi, appartiene alla specie asiatica Oryza sativa L. maggiormente coltivato nell'Italia settentrionale, soprattutto nelle regioni come Piemonte e Lombardia, caratterizzata da condizioni ambientali molto diverse da quelle tipiche dell'Africa occidentale. Infatti, la temperatura media annuale in Mali è di circa 27 °C, con poche variazioni nelle diverse stagioni, mentre nelle regioni dell'Italia settentrionale le temperature oscillano tra 0 °C in inverno e una media di 20 - 21 °C nei mesi caldi.

Semi decorticati di O. sativa L. cv. Baldo (Ente Nazionale Risi, Milano, Italia) e O. glaberrima RAM133 (Mali, Africa occidentale) sono stati sterilizzati in superficie come descritto da Defez et al. (2017) con le seguenti modifiche: 70% di etanolo per 7 minuti e 5% di soluzione di ipoclorito di sodio contenente lo 0,1% di Tween 20. I semi sono stati poi lavati più volte con acqua distillata sterilizzata, posizionati sulla superficie di piastre di acqua-agar 0,8% e incubati a 21 °C al buio in una camera termostatata per la germinazione (Defez et al., 2017). Dopo 5 giorni, le radici dei semi germinati sono state tagliate (0,5 cm dall'estremità) con un bisturi sterile e incubate in piastre di Petri con 10⁷ cellule per millilitro in una soluzione di PBS 1x per 4 ore a temperatura ambiente (Andreozzi et al., 2019). I semi incubati solo in PBS 1x sono stati usati come controllo non inoculato. I semi inoculati sono stati quindi trasferiti in vasi di plastica contenenti sabbia (granuli 2-1,2 mm) e materiale inerte perlite (granuli 3-4 mm) in rapporto 1:1 oppure in unità idroponiche (tubi di plastica di 15 cm di lunghezza e 5 cm di diametro) contenenti terreno liquido Kimura B privo di azoto, come usato in Gao et al. (2019) con alcune modifiche. I macronutrienti erano i seguenti: KH2PO4 (0,2 mM), KNO3 (0,01 mM), K2SO4 (0,1 mM), CaSO4 (0,4 mM), MgSO4 · 7H2O (0,5 mM). I micronutrienti erano i seguenti: Fe-EDTA (0,11 mM), MnSO4 (1,8 μM), H3BO3 (46 μM), ZnSO4 · 7H2O (0,3 μM) e CuSO4 · 5H2O (0,3 μM). Ogni unità di semina è stata mantenuta nella camera di crescita sotto una lunga luce diurna (16 ore), una temperatura di 19-23 °C e un'umidità relativa del 75%.

4.4.Ri-isolamento dei batteri diazotrofi da piante inoculate

La colonizzazione di piante di riso *O. sativa* cv. Baldo e *O. glaberrima* RAM133 con gli endofiti diazotrofi identificati è stata valutata sia per le piante coltivate nel terreno di sabbia-perlite che nelle unità idroponiche, rispettivamente a 15 e 8 giorni dopo l'inoculazione (DAI). La superficie delle piante intere è stata sterilizzata usando la seguente procedura: 1) 1 minuto in EtOH al 70%; 2) lavare più volte con acqua distillata sterile; 3) incubazione per 5 minuti in soluzione di

ipoclorito di sodio al 5% contenente 0,1% di Tween 20; 4) lavare più volte con acqua distillata sterile. I tessuti dell'intera pianta sono stati quindi omogeneizzati in 5 ml di PBS 1x usando un mortaio e un pestello sterili. Le diluizioni degli omogenati (1:100 per l'estratto di Baldo e 1:1000 per quello delle piante di RAM133) sono state distribuite su piastre di terreno solido LB-agar 1,5% contenenti gli antibiotici specifici per i diversi diazotrofi usati: 60 µg/ml di ampicillina per BDA59-3; 25 µg/ml di carbenicillina per BDA62-3, BDA134-6 e BDA137-1; 25 µg/ml di penicillina G per BDA86-11 e 50 µg/ml di novobiocina per BDAM41-2. Le piastre sono state così incubate a 30 °C. Dopo 24 ore, è stato contato il numero di colonie cresciute (CFU) e l'identità degli endofiti re-isolati è stata verificata dai loro antibiogrammi.

Per valutare l'efficacia del processo di sterilizzazione, i tessuti vegetali sterilizzati sono stati posizionati su piastre di agar LB all'1,5% e incubati a 30 °C per 3 giorni. Dopo il periodo di incubazione non è stata osservata alcuna crescita microbica intorno ai tessuti vegetali. I dati per le piante coltivate nel suolo di sabbia perlite e le condizioni idroponiche sono la media \pm DS di almeno cinque e otto repliche indipendenti, rispettivamente, ciascuna effettuata in tempi diversi.

4.5. Saggio di riduzione dell'acetilene (ARA) per la misura dell'attività nitrogenasica

a. In cultura liquida

I ceppi selezionati come positivi dall'analisi PCR del gene *nifH* sono stati coltivati in un mezzo minimo M9 1x in presenza di cloruro di ammonio (vedi composizione mezzo nel Capitolo 1) per 48 ore a 30 °C su un agitatore rotante a 200 rpm. I pellet cellulari (2 ml) sono stati poi sospesi nello stesso mezzo senza fonte di azoto, come descritto da Defez et al. (2017), trasferiti in tubi di vetro (10 ml) e sigillati con tappo a vite con una parte centrale di silicone. Per valutare l'attività della nitrogenasi, abbiamo usato il saggio di riduzione dell'acetilene (ARA), che si basa sulla capacità ben documentata del complesso enzimatico della nitrogenasi di ridurre una varietà di substrati, incluso l'acetilene, aventi un triplo legame analogo al gas N₂ (Stiefel 1977). L'acetilene purificato è stato iniettato in ciascun tubo per circa il 10% del volume dello spazio libero presente nel tubo, in atmosfera ipossica con il 2% O₂. Dopo 18 ore di incubazione a 30 °C, un campione da 1 ml da ogni tubo è stato iniettato in un gas cromatografo GC Clarus®580 (Perkin-Elmer, USA) per valutare la quantità di etilene (C₂H₄) prodotta dopo l'aggiunta di acetilene. Nel GC è stata iniettata una serie crescente di standard C₂H₄ per calibrare la sua sensibilità, linearità e la concentrazione di C₂H₄ prodotta nei campioni. Il GC utilizzato è dotato di un rivelatore di fiamma a idrogeno (FID) e di una colonna di allumina TG-IBOND (disattivazione Na2SO4) (30 m × 0,53

mm × 10 μ m) (Thermo Scientific, USA). La portata del gas di trasporto (elio) è di 48 cm/s e il forno settato ad una temperatura di 130 °C isocratico per 3 minuti. Come controllo negativo sono stati utilizzati tubi inoculati senza acetilene iniettato. I dati sono la media ± DS di almeno cinque colture batteriche indipendenti, ciascuna cresciuta in momenti diversi e provenienti da diverse colonie batteriche.

b. In piante inoculate

Piante di riso di due settimane (*O. sativa* cv. Baldo e *O. glaberrima* RAM133), coltivate come precedentemente descritto, sono state accuratamente rimosse dai vasi di crescita con sabbia e perlite e in condizioni idroponiche, e le radici sciacquate con acqua. Le piante sono state poi trasferite in tubi di vetro da 20 ml, incubate in serra per 20 ore e analizzate per il saggio ARA come descritto da Defez et al. (2017) e nei capitoli precedenti. La quantità di etilene prodotta è stata misurata mediante gascromatografo come descritto sopra. I dati sono la media \pm DS di almeno sei e otto repliche indipendenti, rispettivamente, ciascuna effettuata in tempi diversi.

4.6. Stress salino

Per applicare lo stress salino, le piante di tre settimane sono state accuratamente rimosse dai vasi e le radici sono state sciacquate con acqua. Le piante sono state poi trasferite in tubi di vetro da 20 ml ermeticamente chiusi con un tappo a vite con una parte centrale di silicone, contenente 2 ml di terreno minimo privo di fonti di azoto e NaCl ad una concentrazione finale di 0,3 M. Le piante nei tubi allestiti come appena descritto, sono state incubate in serra per 20 ore e analizzate per il test ARA come descritto nei capitoli precedenti. Dopo il test ARA, i tessuti vegetali (radici e foglie) sono stati immediatamente raccolti, congelati in azoto liquido e conservati a -80 °C per ulteriori analisi.

4.7. Attività degli enzimi antiossidanti

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) () sono tossiche ma partecipano anche a eventi significativi. Le cellule vegetali sono dotate di almeno due meccanismi diversi per regolare le concentrazioni di ROS intracellulari: uno consente la modulazione fine dei bassi livelli di ROS, come la perossidasi (POX), superossido dismutasi (SOD) e catalasi (CAT) e uno rigenera gli antiossidanti ossidati come l'ascorbato perossidasi (APX). Le proteine delle foglie solubili sono state estratte 4 °C e quantificate come segue: il materiale congelato è stato omogeneizzato con

tampone TRIS-HCl 20 mM (pH 8,0) integrato con 1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 ml bmercaptoetanolo e 1% (p/v) poli-vinil-poli-pirrolidone. L'omogenato è stato poi centrifugato per 20 minuti a 13000 rpm a 4 °C. La concentrazione proteica nel surnatante è stata misurata con il saggio di Bradford utilizzando BSA come standard (Bianco e Defez 2009).

Le attività di tutti gli enzimi APX, CAT, POX SOD sono state misurate spettrofotometricamente a 25 °C all'interno della regione lineare sia per tempo che per concentrazione di enzimi. L'attività dell'APX è stata determinata in seguito all'ossidazione dell'ascorbato in deidroascorbato (Asada, 1984). L'attività di POX è stata determinata misurando la perossidazione del perossido di idrogeno con il guaiacolo come donatore di elettroni (Leeet al., 2001). L'attività CAT è stata valutata misurando il tasso di conversione del perossido di idrogeno in molecole di acqua e ossigeno (Leeet al., 2001). L'attività SOD totale è stata valutata determinando la riduzione del citocromo c (Rubio et al. 2002).

4.8. Misura del contenuto di clorofilla

A 13 e 40 DAI le foglie staccate sono state incubate per almeno 24 ore a temperatura ambiente in una provetta da 2 ml contenente 1,5 ml di soluzione di acetone all'80%. Dopo la decolorazione totale delle foglie i campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 15.000 x g. L'assorbanza del supernatante è stata misurata alle lunghezze d'onda 645, 646 e 663 nm (A645, A646, A663) (Liang et al., 2017) con uno spettrofotomero UV/visibile DU 800 (Beckman Coulter, USA). La concentrazione di clorofilla fu stimata seguendo le equazioni di Arnon (Arnon, 1949) come segue:

Clorofilla a (μ g / mL) = 12,7 (A663) - 2,69 (A645)

Clorofilla b (μ g / mL) = 22,9 (A645) - 4.68 (A663)

Clorofilla totale (μ g / mL) = 20,2 (A645) + 8,02 (A663)

I dati sono la media \pm DS di almeno cinque replicati biologici indipendenti, ciascuno condotto in momenti diversi.

4.9. Analisi del contenuto di carbonio e azoto nel fusto

Il contenuto totale di carbonio organico e azoto dalle foglie di *O. sativa* a 13 e 40 DAI è stato determinato con materiale essiccato utilizzando un analizzatore elementare (CKIC 5E-CHN 2200, Emme3, Lainate, Milano, Italia) a 950 °C, secondo la norma europea metodo standard UNI

EN 15407: 2011. I dati sono la media \pm DS di almeno cinque replicati biologici indipendenti, ciascuno condotto in momenti diversi.

4.10. Analisi statistiche

L'analisi statistica dei dati è stata eseguita applicando l'analisi unidirezionale della varianza (ANOVA), seguita dal test post hoc HSD di Tukey, utilizzando il programma ANOVA VassarStats disponibile su http://vassarstats.net/index.html. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi quando $P \le 0.05$. Sono stati effettuati cinque replicati biologiche per la misurazione della produzione di IAA, il re-isolamento degli endofiti da piante inoculate e coltivate nel suolo di sabbia e perlite, l'attività azoto-fissativa delle colture batteriche, il contenuto di azoto, il contenuto di carbonio ed il contenuto di clorofilla.

Sono stati, invece, effettuati sei replicati biologici per l'attività della nitrogenasi in piante inoculate. Inoltre, la valutazione dell'attività della nitrogenasi ed il re-isolamento degli endofiti da piante inoculate e coltivate in condizioni idroponiche è stata eseguita su otto replicati biologici.

Risultati

1. Identificazione dei batteri endofiti

Le piante di riso intere sono state sottoposte alle procedure di sterilizzazione della superfice esterna e di estrazione come precedentemente descritto nella sezione Materiali e Metodi (paragrafo 2). Tali procedure hanno permesso di isolare 69 batteri endofiti coltivabili dai tessuti interni delle piante di riso africane (*Oryzae glaberrima*).

1.1 Analisi della qualità delle sequenze 16S

Per l'identificazione dei batteri isolati si è proceduto all'amplificazione, clonaggio e successivo sequenziamento di una porzione del gene 16S, come descritto prima. La qualità delle sequenze geniche ottenute è stata poi verificata tramite il programma FASTQC (BMR genomics). Questa analisi ha permesso di eliminare ("trimmare") le estremità 5' e 3' di bassa qualità. Tutte le sequenze 16S sequenziate hanno presentato uno score di qualità media (Phred score) > 45.

Tutti gli isolati batterici sono stati identificati mediante analisi comparativa di sequenze parziali di rDNA 16S. Per tutti gli isolati, è stata registrata una somiglianza del 99–100% con le specie già descritte nel database GenBank (Tabella 1). Gli isolati appartengono a quattro phylum: Proteobacteria (80%, Aeromonadales, Burkholderiales, Enterobacteriales, Pseudomonadales e

Xantomonadales generi), Firmicutes (9%, genere Bacillales), Actinobacteria (7%, Actinomycetales genus) e Bacteroides (4%, Sphingobes e Flavobacteriales) (figure 2).



Figure 2

Figura 2: Diversità dei batteri endofiti coltivabili isolati dalle piante di *Oryza glaberrima*. La composizione della comunità batterica è stata espressa come percentuale di abbondanza degli isolati trovati in ciascun phylum rappresentato.

Isolati	Accession	Specie corrispondente (accession number) ^b	Similarità (%)
BDA11-1	number MT241164	Aeromonas hydrophila strain F 5 (MG428760 1)	99.8
BDA11-2	MT241104	Stenotrophomonas maltophilia strain IAF99 (MK415049.1)	99.4
BDA11-3	MT241103	Stenotrophomonas maltophilia strain BPS2 (MK786692.1)	100
BDA11-4	MT241100	Pseudomonas mosselii strain AB1816 (MK045617.1)	99.4
BDA59-1	MT241107	Pseudomonas moraviensis strain IAS18 (KF528828.1)	100
BDA59-2	MT241108	Stenotrophomonas maltophilia strain B641 (MK301171.1)	100
BDA59-3	MT241109	Citrobacter sp. strain TC163 (MK459531.1)	98.7
BDA59-4	MT241170	Klebsiella pneumoniae strain AR 0080 (LC386023.1)	98.7
BDA62-2	MT241171	Klebsiella pneumoniae strain TBMAX84 (MK834722.1)	99.5
BDA62-3	MT241172	Kasakonia pseudosacchari strain TL13 (MN607214.1)	100
BDA62-4	MT241175	Pantoea stewartii strain EP200 (MG778874 1)	99.2
BDA73-4	MT241174	Exiguobacterium indicum strain E19 (MH150815.1)	99.8
BDA73-5	MT241175	Bacillus numilus isolate KMP123-MS1 (LT978407.1)	100
BDA73-7	MT241170	Pseudomonas nitroreducens strain I 4 (MH196902 1)	99.9
BDA73-8	MT241179	Paenibacillus silvae strain CH03 (MK618628 1)	99.9
BDA73-9	MT241178	Arthrobacter woluwensis strain ICMP 20856 (MG786378 1)	100
BDA73-10	MT241179	Acinetobacter orvzae strain WIB33 (KU877635.1)	100
BDA73-10	MT241180	Friguobacterium indicum strain DSAM 62 (MH819520.1)	100
BDA86-1	M1241181	Pagnibacillus hungnonsis strain KH3 (I C025995 1)	96.7
BDA86-2	MT241182	Pseudomonas otitidis strain T8 (MG283318 1)	99.5
BDA86-3	MT241183	Klebsiella orvioca strain R1 (MK8012351)	99.7
BDA86 4	MT241184	Curtobactorium plantarum strain tai 20 (KV027406 1)	99.7
BDA86 5	MT241185	Curtobacterium planiarum strain lat-29 (K1927400.1) Pseudomonas montailii strain HE_P46 (MK235233.1)	99.0
BDA86 6	MT241186	Futarabaatar raagankampii strain SOUCC_LB11 (MK583581.1)	100
DDA86 7	MT241187	Enerobacier roggenkampti strain SQUCC_LD11 (MK585581.1) Racillus correus strain N12 (ME000842.1)	00.5
DDA00-7	MT241188	Microbactarium hydrotharmala strain mICPO84 (MK606251 1)	100
DDA00-10	MT241189	Enterobacter tam hydroinermale strain MICRO84 (MIR690251.1)	100
DDA00-11	MT241190	Enterobacter succentri strain WV208E (HQ204515.1)	100
	MT241191	Enterobacter tuawigit strain HB14 (MG5/1088.1)	100
BDA09-2	MT241192	Sphingoodclerium multivorum strain B2108 (MR880720.1)	00.8
DDA09-3	MT241193	Enterobacter asburiae strain 102 (MH910200.1)	99.0
BDA107-2	MT241194	Enterobacier asburiae strain N15105 (NIKS89524.1)	99.7
BDA107-5	MT241195	Panuoea sp. A1126 (JA200509.1)	99.9
DDA107-5	MT241196	Actinetobacter seigeritt strain 54M (MR8/4918.1)	100
DDA107-0	MT241197	Chrystophastorium alaum strain CIEPI SPM4 (MK770612.1)	99.0
BDA107-7	MT241198	Chryseobacterium gleum strain CIFRI-SRM4 (MK7/0015.1)	99.0
BDA107-9	MT241199	Enterobacter asburiae strain 04 (KC434995.1)	99.9
BDA107-11	MT241200	Enterobacter luawigh strain AO_03 (KX/60131.1)	99.9
BDA107-12	MT241201	Enterobacter sp. UTWRF0555 (KR189/51.1)	99.9
BDA107-13	MT241202	<i>Enterobacter</i> sp. 5-11 (EU543090.1)	99.5
BDA134-1	MT241203	Enterobacter sp. strain MK17 (KP9/42/2.1)	100
BDA134-2	MT241204	Stenotrophomonas maltophilia strain IAE127 (MK414820.1)	100
BDA134-4	MT241205	Enterobacter asburiae strain BKA4 (MK530091.1)	100
BDA134-5	MT241206	Pseudomonas putida strain AEGB5 (MK829424.1)	100
BDA134-6	MT241207	Klebsiella pasteurii strain NN208E (MK389324.1)	100

Tabella 1: Endofiti coltivabili isolati dalle piante di Oryza glaberrima e identificati mediante analisi della sequenza dell'rDNA 16S

Isolati	Accession number ^a	Specie corrispondente (accession number) ^b	Similarità (%)
BDA134-8	MT241208	Aeromonas hydrophila strain CP2V8-03 (MK534033.1)	99.9
BDA137-1	MT241209	Kosakonia oryzendophytica strain Tm.Vt-SE.Av01 (MK039407.1)	99.8
BDA137-3	MT241210	Pseudomonas taiwanensis strain Pt-CW19 (MK880383.1)	99.6
BDA137-4	MT241211	Pseudescherichia vulneris JCM 2130 (LC382121.1)	99.7
BDA137-5	MT241212	Enterobacter cloacae strain PYLG (KY767543.1)	99.9
BDA137-6	MT241213	Pantoea stewartii strain JZ82 (KY194282.1)	99.7
BDA137-7	MT241214	Pantoea agglomerans strain TKW_28 (KY486214.1)	99.6
BDA137-8	MT241215	Enterobacter sp. DL4.7 (JQ912516.1)	99.9
BDA137-9	MT241216	Ralstonia mannitolilytica strain PMB-2 (MH890459.1)	100
BDA137-10	MT241217	Stenotrophomonas maltophilia strain IAE123 (MK414816.1)	99.6
BDA137-11	MT241218	Klebsiella pneumoniae strain TBMAX84 (MK834722.1)	99.9
BDA137-12	MT241219	Enterobacter sp. MK17 (KP974272.1)	99.8
BDA137-13	MT241220	Microbacterium laevaniformans strain RT83 (MK014262.1)	99.8
BDA137-15	MT241221	Pantoea agglomerans strain TKW_51 (KY486229.1)	100
BDA137-16	MT241222	Microbacterium sp. B05 (HM209349.1)	99.6
BDA138-1a	MT241223	Pantoea agglomerans strain D51_MA4R (MK883157.1)	100
BDA138-1b	MT241224	Acinetobacter baumannii strain LIM-PHCN-016 (MK840990.1)	99.8
BDA141-1	MT241225	Leclercia adecarboxylata strain NIBSM_OsR11 (KY930711.1)	99.5
BDA141-2	MT241226	Chryseobacterium endophyticum strain CC-YTH209 (NR_156142.1)	99.9
BDAM41-2	MT241227	Enterobacter sp. strain ERR 833 (MF442271.1)	100
BDAM41-6	MT241228	Stenotrophomonas rhizophila strain ELM4B45 (KP860574.1)	99.2
BDAM42-1	MT241229	Enterobacter sp. CZGRN4 (KJ184910.1)	99.8
BDAM42-2	MT241230	Stenotrophomonas pavanii strain WZN-1 (KY000522.1)	99.8
BDAM42-3	MT241231	Klebsiella pneumoniae strain SISX20 (MK780048.1)	100
BDAM42-4	MT241232	Leclercia adecarboxylata strain UQCH 006 (MK214731.1)	99.8

Tabella 1: continuo identificazione degli endofiti isolati

^a Numero di accessione GenBank per la sequenza nucleotidica depositata nel database di NCBI. ^b Per identificare gli endofiti isolati, i frammenti del gene 16S rDNA sono stati amplificati mediante PCR usando primer universali, inseriti in un vettore commerciale di clonazione e sequenziati i cloni positivi. Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle depositate nel database GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) usando l'algoritmo BLASTN.

1.2 Filogenesi delle specie identificate

Le sequenze 16S degli isolati e le sequenze di riferimento ottenute da GenBank sono state utilizzate per determinare le relazioni filogenetiche dei ceppi utilizzando il Software MEGA6 come descritto nei Materiali e Metodi.

L'analisi ha permesso di ottenere l'albero filogenetico riportato in Figura 3, rappresentato in scala, con la lunghezza dei rami corrispondente al numero di sostituzioni nucleotidiche per sito.

Le distanze filogenetiche sono state stimate utilizzando il metodo della massima verosimiglianza con il modello Tamura-Nei e 1000 repliche di bootstraps.

Figura 3: Albero filogenetico basato sulle sequenze del gene 16S dei ceppi isolati. Le sequenze di riferimento sono indicate con il nome della specie seguito dall'accession number di GenBank.



2. Screening dei ceppi isolati per i tratti PGP

Tutti gli isolati sono stati esaminati per la produzione di IAA e per la presenza dei geni coinvolti nella fissazione dell'azoto (*nifH*) e nella riduzione del livello di etilene all'interno della pianta (acdS). I risultati ottenuti in queste analisi sono riportati nella Tabella 2. Diverse concentrazioni di auxina sono state rilasciate nelle colture dei ceppi batterici quando L-triptofano è stato aggiunto al mezzo di crescita. Il 19% degli isolati ha prodotto alti livelli di IAA (da 61 a 118 nmol/mg cellule), il 27% ha prodotto livelli di IAA più bassi (da 21,3 a 56 nmol/mg cellule) e il 54% ha prodotto i livelli di IAA più bassi (da 0,3 a 17nmol/mg cellule). L'amplicone di 388 bp previsto per il gene *nifH* è stato osservato per sei (9%) ceppi batterici. Gli isolati positivi erano BDA59-3 (Citrobacter sp.), BDA62-3 (Enterobacter sacchari), BDA86-11 (Enterobacter sacchari), BDA134-6 (Ralstonia picketii), BDA137-1 (Kasakonia oryzendophytica) e BDAM41-2 (Enterobacter sp.). Per i tre ceppi azoto-fissatori BDA59-3, BDA62-3 e BDA134-6 utilizzati nelle analisi successive, è stata quantificata l'IAA prodotta utilizzando la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (HPLC-MS/MS). Questa procedure permette di ottenere segnali elevati rispetto al rumore di fondo e quindi una maggiore sensibilità. La molecola IAA deuterata (d7-IAA) è stata utilizzata come standard interno per scopi quantitativi. Livelli apprezzabili di IAA sono stati misurati solo per il ceppo BDA134-6 ($0,44 \pm 0,04$ ng mL-1). Per i ceppi BDA59-3 e BDA62-3 è stato osservato un livello di IAA (<0,025 ng mL-1) al di sotto della soglia dello strumento.

L'attività dell'enzima nitrogenasi nelle colture batteriche dei sei ceppi *nifH* positivi è stata valutata misurando la produzione di etilene a partire dal substrato alternativo acetilene (test ARA) ed espressa come nmol etilene/mg cellule/min. I dati riportati nella Tabella 3 hanno confermato la natura diazotrofica di questi ceppi. La più alta attività di nitrogenasi è stata registrata per il ceppo *Ralstonia picketii* BDA134-6. I ceppi BDA86-11, BDA59-3 e BDA62-3 hanno mostrato circa un terzo dell'attività registrata per BDA134-6. L'attività più bassa di nitrogenasi è stata misurata per i ceppi BDA137-1 e BDAM41-2. Per l'amplificazione del gene parziale *acdS* sono stati utilizzati primers ibridi degenerati (acdSF3 e acdSR3) descritti nella sezione Materiali e Metodi. Per selezionare i batteri *acdS*-positivi mediante analisi PCR, è stato usato come controllo positivo il frammento di 683 bp ottenuto per *H. seropediace* z67. Le dimensioni attese dei prodotti di amplificazione sono state osservate per sette isolati appartenenti alle specie: *Enterobacter* (BDA86-6 e BDAM41-2), *Ralstonia* (BDA137-9), *Microbatterium* (BDA137-13 e BDA137-16), *Klebsiella* (BDA134-6) e *Stenotrophomonas* (BDAM41-6).

Isolati	Specie identificata	Produzione IAA ^a	nifH ^b	acds ^b
		(nmol IAA/mg cells)	gene	gene
BDA11-1	Aeromonas hydrophila strain F_5	3.3 ± 0.2	-	-
BDA11-2	Stenotrophomonas maltophilia strain IAE99	0.51 ± 0.17	-	-
BDA11-3	Stenotrophomonas maltophilia strain BPS2	0.68 ± 0.04	-	-
BDA11-4	Pseudomonas mosselii strain AB1816	1.12 ± 0.01	-	-
BDA59-1	Pseudomonas moraviensis strain JAS18	5.2 ± 0.7	-	-
BDA59-2	Stenotrophomonas maltophilia strain B641	1.6 ± 0.2	-	-
BDA59-3	Citrobacter sp. strain TC163	61 ± 10	+	-
BDA59-4	Klebsiella pneumoniae strain AR_0080	7.2 ± 0.6	-	-
BDA62-2	Klebsiella pneumoniae strain TBMAX84	56 ± 12	-	-
BDA62-3	Kasakonia pseudosacchari strain TL13	7.7 ± 0.5	+	-
BDA62-4	Pantoea stewartii strain EP200	7.1 ± 0.2	-	-
BDA73-4	Exiguobacterium indicum strain E19	4.2 ± 0.1	-	-
BDA73-5	Bacillus pumilus isolate KMP123-MS1	1.0 ± 0.3	-	-
BDA73-7	Pseudomonas nitroreducens strain L4	1.4 ± 0.4	-	-
BDA73-8	Paenibacillus silvae strain CH03	8.3 ± 1.9	-	-
BDA73-9	Arthrobacter woluwensis strain ICMP 20856	0.7 ± 0.2	-	-
BDA73-10	Acinetobacter oryzae strain WJB33	23 ± 5	-	-
BDA73-12	Exiguobacterium indicum strain DSAM 62	4.0 ± 0.8	-	-
BDA86-1	Paenibacillus hunanensis strain KH3	43 ± 13	-	-
BDA86-2	Pseudomonas otitidis strain T8	7.1 ± 1.3	-	-
BDA86-3	Klebsiella oxytoca strain R1	31 ± 11	-	-
BDA86-4	Curtobacterium plantarum strain tai-29	33 ± 3	-	-
BDA86-5	Pseudomonas monteilii strain HE_P46	3.8 ± 1.4	-	-
BDA86-6	Enterobacter roggenkampii strain SQUCC_LB11	68 ± 9	-	+
BDA86-7	Bacillus cereus strain N12	2.1 ± 0.4	-	-
BDA86-10	Microbacterium hydrothermale strain mICRO84 21.3 ± 0.6 -		-	
BDA86-11	Enterobacter sacchari strain NN208E	7.4 ± 0.3	+	-
BDA89-1	Enterobacter ludwigii strain HBT4	91 ± 6	-	-
BDA89-2	Sphingobacterium multivorum strain BZN8	0.5 ±0.2	-	-
BDA89-3	Enterobacter asburiae strain 162	61 ± 6	-	-
BDA107-2	Enterobacter asburiae strain N15165	64 ± 8	-	-
BDA107-3	Pantoea sp. A1128	27 ± 4	-	-
BDA107-5	Acinetobacter seifertii strain 34M	0.91 ± 0.08	-	-
BDA107-6	Enterobacter roggenkampii strain HBUAS53378	49 ± 6	-	-
BDA107-7	Chryseobacterium gleum strain CIFRI-SRM4	8.3 ± 1.0	-	-
BDA107-9	Enterobacter asburiae strain U4	99 ± 9	-	-
BDA107-11	Enterobacter ludwigii strain AO_03	47 ± 5	-	-
BDA107-12	Enterobacter sp. UIWRF0555	43 ± 5	-	-
BDA107-13	Enterobacter sp. 3-1t	62 ± 13	-	-
BDA134-1	Enterobacter sp. strain MK17	30 ± 5	-	-
BDA134-2	Stenotrophomonas maltophilia strain IAE127	0.3 ± 0.1	-	-
BDA134-4	Enterobacter asburiae strain BKA4	79 ± 2	-	-
BDA134-5	Pseudomonas putida strain AEGB5	1.1 ± 0.2	-	-
BDA134-6	Klebsiella pasteurii strain NN208E	31 ± 2	+	+
BDA134-8	Aeromonas hydrophila strain CP2V8-03	11.0 ± 0.6	-	-

Tabella 2: Caratterizzazione degli endofiti identificati

Isolati	Specie identificata	Produzione IAA ^a	nifH ^b	Acds ^b
		(nmol IAA/mg cells)	gene	gene
BDA137-1	Kosakonia oryzendophytica strain Tm.Vt-SE.Av01	8.7 ± 1.4	+	-
BDA137-3	Pseudomonas taiwanensis strain Pt-CW19	6.6 ± 0.6	-	-
BDA137-4	Pseudescherichia vulneris JCM 2130	4.9 ± 0.7	-	-
BDA137-5	Enterobacter cloacae strain PYLG	22 ± 2	-	-
BDA137-6	Pantoea stewartii strain JZ82	26.0 ± 1.6	-	-
BDA137-7	Pantoea agglomerans strain TKW_28	118 ± 12	-	-
BDA137-8	Enterobacter sp. DL4.7	7.0 ± 0.9	-	-
BDA137-9	Ralstonia mannitolilytica strain PMB-2	1.3 ± 0.1	-	+
BDA137-10	Stenotrophomonas maltophilia strain IAE123	1.3 ± 0.1	-	-
BDA137-11	Klebsiella pneumoniae strain TBMAX84	81 ± 9	-	-
BDA137-12	Enterobacter sp. MK17	32 ± 1	-	-
BDA137-13	Microbacterium laevaniformans strain RT83	17 ± 2	-	+
BDA137-15	Pantoea agglomerans strain TKW_51	47 ± 5	-	
BDA137-16	Microbacterium sp. B05	44 ± 13	-	+
BDA138-1a	Pantoea agglomerans strain D51_MA4R	28 ± 1	-	-
BDA138-1b	-1b Acinetobacter baumannii strain LIM-PHCN-016 3.9 ± 0.2		-	
BDA141-1	-1 Leclercia adecarboxylata strain NIBSM_OsR11 115 ± 1		-	-
BDA141-2	Chryseobacterium endophyticum	7.0 ± 1.1	-	-
BDAM41-2	Enterobacter sp. strain ERR 833	6.1 ± 0.3	+	+
BDAM41-6	Stenotrophomonas rhizophila strain ELM4B45	29 ± 7	-	+
BDAM42-1	Enterobacter sp. CZGRN4	2.5 ± 0.1	-	-
BDAM42-2	Stenotrophomonas pavanii strain WZN-1	0.83 ± 0.14	-	-
BDAM42-3	Klebsiella pneumoniae strain SISX20	103 ± 5	-	-
BDAM42-4	Leclercia adecarboxylata strain UQCH 006	83 ± 19	-	-

^a La coltura batterica è stata coltivata durante la notte in terreno LB contenente L-triptofano. L'IAA prodotto e rilasciato nel supernatante di coltura è stato quantificato utilizzando il reagente Salkowski. I valori riportati nella tabella sono la media \pm DS di almeno cinque colture batteriche indipendenti, ciascuna cresciuta in momenti diversi e provenienti da diverse colonie batteriche.

^b I frammenti dei geni *nifH* e *acdS* amplificati mediante PCR utilizzando il DNA di *Herbaspirillum seropedicae* z67 e *Sinorhizobium meliloti* 1021 sono stati usati come controlli positivi per l'identificazione di endofiti che producono azoto e ACC-deaminasi.

Tabella 3: Attività della Nitrogenasi in colture liquide degli endofiti N-fissatori

Серро	Attività nitrogenasica ^a (nmol etilene/mg cells/min)
BDA59-3	0.044 ± 0.003^{a}
BDA62-3	$0.049\pm0.008^{\mathrm{a}}$
BDA86-11	0.064 ± 0.008^{a}
BDA134-6	0.160 ± 0.024^{b}
BDA137-1	0.032 ± 0.004^{c}
BDAM41-2	$0.025 \pm 0.005^{\circ}$

^a Le cellule batteriche cresciute in un mezzo minimo non contenente fonte di azoto sono state incubate in atmosfera 2% O₂ e 10% acetilene. Dopo 20 ore di incubazione a 30 °C, la quantità di etilene prodotta è stata misurata usando un gascromatografo. I valori riportati nella tabella sono la media \pm DS di almeno cinque colture batteriche indipendenti, ciascuna cresciuta in momenti diversi e provenienti da diverse colonie batteriche. Le misure con lettere diverse sono significativamente diverse con un livello di confidenza del 5%.

3. Gli endofiti N-fissatori isolati colonizzano in modo diverso *O. glaberrima* (ospite d'origine) e *O. sativa* (nuovo ospite)

La capacità degli endofiti N-fissatori di colonizzare individualmente le piante di riso *O. sativa* cv. Baldo e *O. glaberrima* cv. RAM133 è stata valutata misurando le unità formanti colonie (CFU) in omogenati ottenuti da piante intere inoculate. I ceppi diazotrofi colonizzano in modo più efficiente le piante di *O. glaberrima* rispetto a quelle di *O. sativa* (Tabella 4). In effetti, il numero di CFU misurato per le piante di *O. glaberrima* inoculate con ceppi N-fissatori era circa 10 volte superiore a quello stimato per le piante di *O. sativa* inoculate con gli stessi ceppi. È stata osservata una diversa capacità di colonizzazione delle piante di *O. sativa* per i ceppi diazotrofi identificati: il numero CFU più alto è stato misurato per i ceppi BDA62-3, BDA86-11 e BDA134-6, mentre quello stimato per il ceppo BDA59-3 era circa un terzo inferiore. La più bassa capacità di colonizzazione è stata osservata per i ceppi BDA137-1 e BDAM41-2. Dunque, i ceppi BDA59-3, BDA62-3 e BDA134-6 sono stati scelti per ulteriori analisi.

Tabella 4: Colonizzazione delle piante Oryza sativa e Oryza glaberrima da parte degli end	ofiti
N-fissatori	

Strain	Oryza sativa (CFU) ^a	Oryza glaberrima (CFU) ^a
BDA59-3	$487 \text{ x } 10^2 \pm 84^{a}$	$384 \times 10^3 \pm 57^a$
BDA62-3	$1,544 \ge 10^2 \pm 245^{b}$	$312 \text{ x } 10^3 \pm 92^a$
BDA86-11	$1,800 \ge 10^2 \pm 379^{b}$	$613 \times 10^3 \pm 76^{b}$
BDA134-6	$1,761 \ge 10^2 \pm 391^{b}$	$1,064 \ge 10^3 \pm 93^{\circ}$
BDA137-1	$104 \text{ x } 10^2 \pm 23^{\circ}$	$151 \ge 10^3 \pm 24^d$
BDAM41-2	$103 \ge 10^2 \pm 24^{\circ}$	$2,264 \ge 10^3 \pm 410^{\text{e}}$

^aLe piantine di *Oryza sativa* e *Oryza glaberrima* sono state inoculate individualmente con ciascun ceppo N-fissatore (10^6 cellule/ml) e coltivate in terreno di sabbia e perlite. A 13 giorni dall'inoculazione, gli endofiti sono stati nuovamente isolati dai tessuti radicolari per valutare il numero di CFU. I valori riportati nella tabella sono la media ± DS di almeno cinque repliche indipendenti eseguite ciascuna in momenti diversi. Le misure indicate con lettere diverse sono significativamente diverse con un livello di confidenza del 5%.

4. Attività della nitrogenasi nelle due specie di riso inoculate con i sei diazotrofi

Per valutare la capacità di fissazione dell'azoto dei ceppi diazotrofi isolati quando interagiscono con le loro piante ospiti (*O. glaberrima* RAM133 e *O. sativa* cv. Baldo) è stato eseguito un test ARA su piante di 2 settimane inoculate con i diversi ceppi. I risultati riportati nella Figura 4 mostrano che l'inoculazione delle due specie di *Oryzae* con i ceppi BDA134-6 e BDA59-3 ha portato alla più alta attività nitrogenasica. Per le piante inoculate con BDA137-1 e BDAM41-2 è stata misurata un'attività nitrogenasica inferiore. L'attività enzimatica registrata per i ceppi BDA62-3 e BDA86-11 era circa il 65% di quella misurata per il ceppo BDA134-6.



Figura 4: Attività nitrogenasica nelle piante di *Oryza glaberrima* e *Oryza sativa* inoculate con endofiti N-fissatori. Le piante di *O. glaberrima* e *O. sativa* sono state inoculate con i singoli endofiti N-fissatori e dopo due settimane dall'infezione sono state accuratamente rimosse dai vasi ed utilizzate per il test ARA. I dati sono la media \pm DS di almeno sei repliche biologiche indipendenti, ciascuna effettuata in momenti diversi. Le medie con lettere diverse sono significativamente diverse con un livello di confidenza del 5% (P <0,05, test post hoc di Tukey).

5. Valutazione della capacità azoto-fissativa in piante di O. sativa per tre endofiti scelti

Gli endofiti batterici *Citrobacter sp.* BDA59-3, *Kasakonia pseudosacchari* BDA62-3 e *Klebsiella pasteurii* BDA134-6, con uno, due o tre tratti PGP, sono stati selezionati per inoculare piante di *Oryza sativa* cv. Baldo ad una concentrazione finale di 10⁶ cellule/ml. Piante di 2 settimane coltivate in condizioni idroponiche sono state utilizzate per analizzare la capacità di colonizzazione e l'attività della nitrogenasi. I dati ARA hanno mostrato che l'inoculazione delle piante di riso Baldo con il ceppo BDA134-6 ha portato ad un'attività di azofissazione più elevata. I livelli di attività registrati per i ceppi BDA62-3 e BDA59-3 erano inferiori del 90% e del 70% rispetto a quello misurato per il ceppo 134-6, rispettivamente (Tabella 5).

Tabella 5: Attività della nitrogenasi degli endofiti N-fissatori in piante di Oryzae sativa.

Sample	Nitrogenase activity ^a (nmoli C2H4 plants- ¹ min- ¹)
Baldo+BDA59-3	0.105 ± 0.025^{a}
Baldo+BDA62-3	0.031 ± 0.005^{b}
Baldo+BDA134-6	0.315 ± 0.062^{c}

^a Le piantine di *Oryza sativa* inoculate singolarmente in condizioni idroponiche con ciascun endofita (10^6 cellule7ml). 13 giorni dopo l'inoculazione è stato effettuato il test ARA per misurare l'attività della nitrogenasi. I valori riportati nella tabella sono la media ± DS di almeno otto repliche indipendenti eseguite ciascuna in momenti diversi. Le misure con lettere diverse sono significativamente diverse con un livello di confidenza del 5%.

6. Miglioramento dei parametri di crescita di O. sativa

Per analizzare l'effetto dell'inoculazione dei ceppi *Citrobacter sp.* BDA59-3, *K. pseudosacchari* BDA62-3 e *K. pasteurii* BDA134-6 sulla crescita delle piante di *O. sativa* Baldo in condizioni idroponiche è stato misurato il contenuto totale di C, N e clorofilla (chl) a 14 e 40 DAI, utilizzando le piante non inoculate come riferimento (Figura 5). A 14 DAI è stato misurato un aumento significativo e simultaneo del contenuto di tutti e tre i parametri (C, N e chl) quando le piante sono state inoculate con il ceppo BDA59-3 (fino al 14%, 19% e 24%, rispettivamente). Tuttavia, è stato misurato un aumento significativo (fino al 21%) del contenuto di clorofilla anche per le piante inoculate con il ceppo BDA134-6. A 40 DAI è stato misurato un aumento significativo dei parametri di crescita testati per le piante di riso Baldo inoculate con BDA59-3 (contenuto di C fino al 38%, contenuto di N fino al 39% e chl fino al 35%) e BDA134-6 (C, Contenuto in N e chl fino al 20%). Per le piante inoculate con il ceppo BDA62-3 nessuno dei parametri analizzati è cambiato significativamente sia a 13 che a 40 DAI.

7. L'inoculazione di *O. sativa* con il ceppo BDA134-6 migliora l'attività degli enzimi antiossidanti e consente il mantenimento della sua funzione azoto-fissativa in piante sottoposte a stress salino

Il riso Baldo è stato inoculato singolarmente con gli endofiti BDA59-3 (capacità N-fissativa e produzione di IAA) e BDA134-6 (buon produttore di IAA e N-fissatore). A 21 DAI le piante inoculate sono state sottoposte al trattamento con NaCl e valutati i suoi effetti sulla fissazione dell'N e sulla risposta allo stress. Quando è stata misurata l'attività dell'enzima nitrogenasi, è stata registrata una repressione per le piante inoculate BDA59-3 mentre solo una leggera riduzione di attività è stata osservata per le piante inoculate con BDA134-6 (figura 6). Inoltre, le poiante inoculate con BDA134-6 mostravano un significativo aumento dell'attività degli enzimi antiossidanti rispetto alle piante di controllo non inoculate utilizzate come riferimento. Un effetto positivo solo sull'attività di APX e CAT è stato invece misurato per le piante inoculate con BDA59-3 (figura 7).



Figura 5: Effetto dell'inoculazione con *Citrobacter sp.* BDA59-3, *Kasakonia pseudosacchari* BDA62-3 e *Klebsiella pasteurii* BDA134-6 sui parametri fisiologici delle piante di *Oryza sativa*. Le piante di *Oryza sativa* sono state inoculate con i singoli ceppi e coltivate in condizioni idroponiche come descritto nella sezione dei Materiali e Metodi. A 13 e 40 DAI le piante sono state rimosse dall'unità di crescita e le foglie sono state staccate e utilizzate per le analisi del contenuto di N (A), C (B) e clorofilla (C). I dati sono la media ± DS di almeno cinque repliche biologiche indipendenti, ciascuna effettuata in momenti diversi. Le medie con lettere diverse sono significativamente diverse con un livello di confidenza del 5% (P <0,05, test post hoc di Tukey).



Figura 6: Misura dell'attività nitrogenasica in piante di riso *O. sativa* cv. Baldo inoculate con *Citrobacter sp.* BDA59-3 e *Klebsiella pasteurii* BDA134-6 dopo trattamento con NaCl 0.3 M. Le piante di *Oryza sativa* sono state inoculate con i singoli ceppi e coltivate in terreno contenente sabbia e perlite come descritto nei Materiali e Metodi. Dopo tre settimane sono state rimosse dai vasi e le radici sono state sciacquate con acqua e utilizzate per il test ARA. I dati sono la media \pm DS di almeno sei repliche biologiche indipendenti, ciascuna effettuata in momenti diversi. Le medie con lettere diverse sono significativamente diverse con un livello di confidenza del 5% (P <0,05, test post hoc di Tukey).



Figura 7: Attività degli enzimi antiossidanti di piante di riso trattate con NaCl 0,3 M. Le proteine solubili delle foglie sono state estratte, quantificate e l'attività di tutti gli enzimi APX, CAT, POX SOD misurata spettrofotometricamente. I dati sono la media \pm DS di almeno sei repliche biologiche indipendenti, ciascuna effettuata in momenti diversi. Le medie con lettere diverse sono significativamente diverse con un livello di confidenza del 5% (P <0,05, test post hoc di Tukey).

Discussione

Il microbioma della rizosfera è essenziale per la crescita e la salute delle piante: fornisce difesa contro parassiti e malattie, facilita l'acquisizione di nutrienti e aiuta le piante a resistere agli stress biotici e abiotici. L'addomesticamento delle specie vegetali ha sostanzialmente contribuito allo sviluppo della civiltà umana, ma ha anche causato una forte riduzione della biodiversità del microbioma della rizosfera (Smith and Goodman, 1999; Haudry et al., 2007; Pérez - Jaramillo et al., 2016; Pérez - Jaramillo et al., 2017). Infatti, la diversità e la funzionalità delle comunità batteriche endofitiche è significativamente influenzata dalle pratiche agricole organiche e convenzionali (Xia et al., 2015; Correa-Galeote et al., 2018).

In questo capitolo di tesi abbiamo ipotizzato che il riso africano *O. glaberrima*, coltivato nella valle del fiume Niger con scarsi input esterni ed in presenza di stress ambientali, principalmente l'estrema variazione del regime idrico, stabiliva associazioni con una comunità batterica endofita le cui caratteristiche contribuivano alla sua particolare resistenza allo stress abiotico. A partire da questa considerazione, gli endofiti batterici coltivabili isolati dal riso africano *O. glaberrima* sono stati utilizzati per inoculare il riso *O. sativa* L. cv. Baldo, ampiamente coltivato nell'Italia settentrionale (regioni Piemonte e Lombardia). È stato poi valutato l'effetto dell'inoculazione sulla crescita e sulla risposta agli stress abiotici delle piante "Baldo".

In questo studio, sono stati isolati, identificati e caratterizzati gli endofiti coltivabili dai tessuti interni delle piante di *O. glaberrima*. Gli endofiti isolati sono stati assegnati a 9 diversi generi appartenenti a quattro phyla: Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroides. Gli Enterobacterales e Pseudomonadales sono stati gli ordini più comuni rilevati in questo lavoro, seguiti da Xanthomonadales e Bacillales. Questi risultati sono coerenti con altri studi sull'isolamento delle comunità batteriche endofite da piante ospiti mediante metodi basati sulla cultura (Pereira et al., 2016; Santoyo et al., 2016; Etminani et al., 2018; Brígido et al., 2019) e con il modello di diversità batterica precedentemente riportato in altri studi per il microbioma del riso (Bertani et al., 2016; Moronta-Barrios et al., 2018).

È noto che la maggior parte dei batteri endofiti, compresi quelli coltivabili, possiedono due o più caratteristiche che favoriscono la crescita delle piante, la cui caratterizzazione aiuta a comprendere meglio le loro funzioni.

La modulazione dei livelli di acido indole-3-acetico (IAA) delle piante è un tratto importante attraverso il quale i batteri endofiti possono migliorare la crescita delle piante. L'IAA è la principale auxina che funge da fitoormone in molti processi di sviluppo delle piante (Ljung, 2013).

L'omeostasi delle auxine ha un impatto notevole sull'architettura delle radici, migliorando così l'acquisizione dei nutrienti (Olatunji et al, 2017). Un'alta percentuale di batteri endofiti isolati in questo studio produce IAA. I livelli più alti di IAA sono stati misurati per tre isolati appartenenti alle famiglie delle Erwiniaceae (*Pantoea agglomerans* BDA137-7) e delle Enterobacteriaceae (*Leclercia adecarboxylate* BDA141-1, *Klebsiella polmonite* BDAM42-3). Questi dati sono in accordo con quelli riportati in letteratura e rafforzano il concetto che la produzione di IAA è molto comune tra i batteri con comportamento endofitico (Spaepen et al., 2007; Khan Chowdhury et al., 2017).

I batteri endofiti possono fornire azoto atmosferico fissato alla pianta ospite grazie alla presenza del complesso enzimatico dellanitrogenasi. Questi batteri sono comunemente noti come endofiti diazotrofi. Sebbene questi diazotrofi siano meno efficienti nella capacità di fissazione dell'azoto rispetto ai rizobi associati ai noduli radicali, in letteratura sono però riportati alcuni ceppi che hanno una buona capacità azotofissativa (Afzal et al., 2019).

In questo studio, è stato applicato un test basato sulla PCR per selezionare gli endofiti che possedevano il gene *nifH*, che è tradizionalmente usato come gene marker per studiare la diversità genetica dei diazotrofi in natura. Sono stati identificati sei ceppi capaci di fissare l'azoto: *Citrobacter sp.* (BDA59-3), *Kasakonia pseudosacchari* (BDA62-3), *Enterobacter sacchari* (BDA86-11), *Klebsiella pasteurii* (BDA134-6), *Kasakonia oryzendophytica* (BDA137-1) e *Enterobacter sp.* (BDAM41-2). Per verificare se questi ceppi erano in grado di fissare azoto in condizioni di vita libera, è stato eseguito un test ARA sulla coltura liquida. I dati ottenuti hanno confermato la natura diazotrofa di questi endofiti, dimostrando che il ceppo BDA134-6 aveva la più alta attività nitrogenasica. Poiché il complesso enzimatico della nitrogenasi nei diazotrofi a vita libera è fortemente sensibile all'ossigeno molecolare, noi ipotizziamo che nei sei diazotrofi asotari liattività dei sistemi respiratori di trasporto degli elettroni in gran parte non accoppiati possa aver protetto l'enzima nitrogenasi dai danni dell'ossigeno, come già riportato in altri studi (Hill, 1992; Batista e Dixon, 2019).

E' inoltre noto che i batteri endofiti producono l'enzima 1-aminociclopropano-1-carbossilato (ACC) deaminasi, che può idrolizzare l'ACC, il precursore dell'ormone vegetale etilene. L'enzima microbico ACC-deaminasi è coinvolto nella dissociazione dell'ACC indotto dallo stress (secreto come essudati radicali) in ammoniaca e α -chetobutirrato, evitando la produzione di etilene, che ha un impatto drastico sulla crescita e sullo sviluppo delle piante in condizioni normali, nonché in condizioni di stress (Glick, 2012; Barnawal et al., 2014; Heydarian et al., 2016; Ali and Kim, 2018; Saleem et al., 2018; Zhang et al., 2018; Chandra et al., 2018; Gupta e Pandey, 2019).

Nell'analisi PCR del gene marcatore *acdS* abbiamo ottenuto risultati positivi per sette ceppi appartenenti alle famiglie delle Ralstoniaceae (*Ralstonia mannitolilytica* BDA137-9), Microbacteriaceae (*Microbacterium laevaniformans* BDA137-13 e *Microbacterium sp.* BDA137-16), Enterobacteriaceae (*Enterobacter roggenkampii* BDA86-6, *Klebsiella pasteurii* BDA134-6 e *Enterobacter sp.* BDAM41-2) e Xanthomonadaceae (*Stenotrophomonas rhizophila* BDAM41-6). È interessante notare che il ceppo *Stenotrophomonas rhizophila* M41-6 è risultato positivo per il gene *acdS*, mentre altri ceppi all'interno del genere Stenotrophomonas non lo erano. Abbiamo ipotizzato che questo risultato fosse dovuto alla specifica eredità di questo gene, che potrebbe essere avvenuta in orizzontale (assorbimento ed espressione del materiale genetico di altri batteri) piuttosto che in verticale (un organismo riceve il materiale genetico dei suoi antenati) (Hontzeas et al., 2005). In effetti, ci sono prove che i geni *acdS* dei microrganismi non sono sempre parte integrante del DNA cromosomico, ma piuttosto sono presenti su grandi plasmidi relativamente stabili (Blaha et al., 2006; Glick et al., 2007; Zhengyi et al., 2015).

Quando le capacità di fissazione dell'azoto dei sei ceppi diazotrofi sono state valutate nelle loro piante ospiti (*O. glaberrima* RAM133 e *O. sativa* cv. Baldo), l'attività nitrogenasica più elevata è stata registrata per le piante inoculate con i ceppi BDA134-6 e BDA59-3, per entrambe le specie di riso.

È stato poi verificato che questi ceppi erano in grado di colonizzare anche le piante *O. sativa* cv. Baldo abbastanza efficientemente, sebbene il numero di CFU misurato fosse 10 volte inferiore a quello registrato per le piante di *O. glaberrima* inoculate con gli stessi ceppi. Questo risultato non è banale se consideriamo che ci sono dati contrastanti sulla specificità dell'ospite degli endofiti. Alcuni ricercatori hanno mostrato che gli endofiti sono solo in grado di promuovere la crescita di piante strettamente correlate ai loro ospiti naturali. Al contrario, ci sono altri studi riguardanti la capacità degli endofiti di promuovere la crescita di diversi ospiti di piante (Afzal et al., 2019). Le due specie di riso utilizzate in questo studio sono geneticamente diverse. *O. glaberrima* è apparsa circa 3000 anni fa in Africa, dove è limitatamente coltivata, mentre *O. sativa* ha avuto origine in Asia circa 6000-7000 anni fa ed è la specie maggiormente coltivata a livello mondiale. Esse sono caratterizzate anche da condizioni climatiche di crescita molto diverse: *O. glaberrima* è adattata al rigido clima africano e presenta resistenza o tolleranza a virus, nematodi, batteri, siccità, tossicità del ferro e alta salinità (Ndjiondjop et al., 2018; Wambugu et al., 2019); mentre le piante di *O. sativa* cv. Baldo sono coltivate attraverso una tecnica di immersione nelle regioni italiane caratterizzate da clima temperato.

Tra i batteri che fissano l'azoto isolati in questo studio, tre sono stati selezionati per ulteriori analisi: *Citrobacter sp.* BDA59-3 (debole produttore IAA e N-fissatore), *Kasakonia*

pseudosacchari BDA62-3 (debole produttore IAA e N-fissatore) e Klebsiella pasteurii BDA134-6 (buon produttore di IAA e N-fissatore). L'efficienza di colonizzazione, di fissazione dell'azoto e i parametri fisiologici sono stati valutati in due diversi tempi di crescita (14 e 40 DAI) per le piante inoculate con i singoli diazotrofi e cresciute in condizioni idroponiche. È stato verificato che a 14 DAI nessuno dei tre ceppi ha mostrato una significativa colonizzazione dei tessuti del fusto. Al contrario, quando sono state analizzate le radici, l'efficienza di colonizzazione dei ceppi BDA59-3- e BDA62-3 era molto simile, mentre quella misurata per il ceppo BDA134-6 era inferiore. Tuttavia, le piante inoculate con BDA134-6 hanno mostrato la più alta attività nitrogenasica. Questo risultato potrebbe essere dovuto alla maggiore attività di fissazione dell'azoto misurata per la coltura di BDA134-6. Quando il contenuto di C, N e clorofilla è stato misurato a 14 DAI, è stato osservato un aumento significativo per le piante "Baldo" inoculate con il ceppo BDA59-3. A 40 DAI è stato misurato un effetto positivo sui parametri di crescita selezionati per le piante inoculate con i ceppi BDA59-3 e BDA134-6. Le piante inoculate con il ceppo BDA62-3, il più debole tra i produttori IAA, non hanno mostrato cambiamenti significativi nei parametri selezionati, sia a 14 che a 40 DAI. Questo risultato era coerente con i risultati precedenti riguardanti la stimolazione del metabolismo N e C da parte dei PGPR che producevano IAA (Andreozzi et al., 2019). Noi ipotizziamo che l'effetto positivo osservato per la crescita delle piante "Baldo" inoculate con il ceppo 134-6 sia dovuto alla sua maggiore produzione di IAA, come osservato negli studi di Defez et al. 2017, Andreozzi et al., 2019 e Defez et al. 2019. In particolare nel capitolo 2 è stato dimostrato che l'IAA è capace di innescare l'espressione dei geni coinvolti nella fissazione dell'azoto attraverso cambiamenti dello stato topologico del DNA (Defez et al. 2019).

Considerando che il riso è uno dei cereali più sensibili al sale, abbiamo valutato la risposta delle piante "Baldo" inoculate con BDA59-3 e BDA134-6 allo stress salinino. Le piante inoculate sono state trattate con NaCl 0,3 M ed è stata misurata l'attività di quattro enzimi antiossidanti (APX, CAT, POX e SOD). L'attività degli enzimi antiossidanti riduce i livelli di ROS prodotti come sottoprodotti metabolici durante lo stress osmotico e convertendoli in una forma non reattiva. Il nostro studio mostra che le piante inoculate con il ceppo BDA134-6 mostrano un significativo miglioramento di tutte le attività degli enzimi antiossidanti rispetto al ceppo BDA59-3. Coerentemente con questi risultati, è stata osservata una lieve perdita di attività della nitrogenasi per le piante inoculate con BDA134-6, mentre una riduzione più forte è stata registrata per quelle inoculate con BDA59-3. Noi ipotizziamo che i risultati positivi osservati per il ceppo BDA134-6 potrebbero essere legati alla sua caratteristica di azoto-fissatore e buon produttore di IAA.

Referenze

- Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., and Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiol. Res.* 221, 36-49. doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001
- Agler, M. T., Ruhe, J., Kroll, S., Morhenn, C., Kim, S. T., Weigel, D., et al. (2016). Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. *PLOS Biology* 14(1), e1002352. doi: 10.1371/journal.pbio.1002352
- Ali, S., Kim, W. C. (2018). Plant growth promotion under water: decrease of waterlogginginduced ACC and ethylene levels by ACC deaminase-producing bacteria. *Front. Microbiol.* 9, 1096. doi: 10.3389/fmicb.2018.01096
- Andreozzi, A., Prieto, P., Mercado-Blanco, J., Monaco, S., Zampieri, E., Romano, S., Valè, G., Defez, R., and Bianco, C. (2019). Efficient colonization of the endophytes *Herbaspirillum huttiense* RCA24 and *Enterobacter cloacae* RCA25 influences the physiological parameters of *Oryza sativa* L. cv. Baldo rice. *Environ. Microbiol.* 21, 3489-3504. doi: 10.1111/1462-2920.14688
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenol oxidase in beta vulgaris. *Plant Physiol*. 24, 1-15. doi: 10.1104/pp.24.1.1
- Barnawal, D., Bharti, N., Maji, D., Chanotiya, C. S., and Kalra, A. (2014). ACC deaminasecontaining Arthrobacter protophormiae induces NaCl stress tolerance through reduced ACC oxidase activity and ethylene production resulting in improved nodulation and mycorrhization in Pisum sativum. J. Plant Physiol. 171, 884-94. doi: 10.1016/j.jplph.2014.03.007
- Batista, M. B., and Dixon, R. (2019). Manipulating nitrogen regulation in diazotrophic bacteria for agronomic benefit. *Biochem. Soc. Trans.* 47, 603-614. doi:10.1042/BST20180342
- Berg, G., Kober, M., Rybakova, D., Muller, H., Grosch, R., and Smalla, K. (2017). Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93 (5). doi: 10.1093/femsec/ x050
- Bertani, I., Abbruscato, P., Piffanelli, P., Subramoni, S., and Venturi, V. (2016). Rice bacterial endophytes: isolation of a collection, identification of beneficial strains and microbiome analysis. *Environ. Microbiol. Rep.* 8, 388-98. doi: 10.1111 / 1758-2229.12403
- Bianco, C., and Defez, R. (2009). *Medicago truncatula* improves salt tolerance when nodulated by an indole-3-acetic acid-overproducing *Sinorhizobium meliloti* strain. J. Exp. Bot. doi:10.1093/jxb/erp140

- Blaha, D., Prigent-Combaret, C., Mirza, M. S., and Moenne-Loccoz, Y. (2006). Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase encoding gene *acdS* in phyto beneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56, 455-470. doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00082.x
- Brachi, B., Filiault, D., Darme, P., Le Mentec, M., Kerdaffrec, E., Rabanal, F., et al. (2017). Plant genes influence microbial hubs that shape leaf communities. *Biorxiv*. doi: 10.1101/181198
- Brígido, C., Singh, S., Menéndez, E., Tavares, M. J., Glick, B. R., Félix, M., Oliveira, S., and Carvalho, M. (2019). Diversity and functionality of culturable endophytic bacterial communities in Chickpea plants. *Plants* (Basel, Switzerland). 8, 42. doi: 10.3390/plants8020042
- Caverzan, A., Cassola, A., and Brammer, S. P. (2016). Reactive oxygen species and antioxidant enzymes involved in plant tolerance to stress. *IntechOpen*. http://dx.doi.org/10.5772/61368
- Chandra, D., Srivastava, R., Glick, B. R., and Sharma, A. K. (2018). Drought-tolerant *Pseudomonas spp*. Improve the growth performance of finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) under non-stressed and drought-stressed conditions. *Pedosphere*. 28, 227-240. doi: 10.1016/s1002-0160(18)60013-x
- Correa-Galeote, D., Bedmar, E. J., and Arone, G. J. (2018). Maize endophytic bacterial diversity as affected by soil cultivation history. *Front. Microbiol.* 9, 484. doi: 10.3389/fmicb.2018.00484
- Defez, R., Andreozzi, A., Romano, S., Pocsfalvi, G., Fiume, I., Esposito, R., et al. (2019). Bacterial IAA-delivery into Medicago root nodules triggers a balanced stimulation of C and N metabolism leading to biomass increase. *Microorganisms*. 7, 403. doi: 10.3390/microorganisms7100403
- Defez, R., Andreozzi, A., and Bianco, C. (2017). The overproduction of indole-3-acetic acid (IAA) in endophytes upregulates nitrogen fixation in both Bacterial Cultures and Inoculated Rice Plants. *Microb. Ecol.* 74, 441-452. doi: 10.1007/s00248-017-0948-4
- Defez, R., Esposito, R., Angelini, A., and Bianco, C. (2016). Overproduction of indole-3-acetic acid in free-living rhizobia induces transcriptional changes resembling those occurring inside nodule bacteroids. *MPMI* 29, 484-495. doi: 10.1094/MPMI-01-16-0010-R
- Di Benedetto, N. A., Corbo, M. R., Campaniello, D., Caldi, M. P., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., and Flagella, Z. (2017). The role of plant growth promoting bacteria in improving

nitrogen use efficiency for sustainable crop production: a focus on wheat. *Microbiol*. 3, 413-434. doi: 10.3934/microbiol.2017.3.413

- Dubey, S., and Sharma, S. (2019). Rhizospheric microbiome engineering as a sustainable tool in agriculture: approaches and challenges. In: Satyanarayana T., Das S., Johri B. (eds)
 Microbial diversity in ecosystem sustainability and biotechnological applications. Springer, Singapore.
- Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Alqarawi, A. A., Abd-Allah, E. F., and Hashem, A. (2017). Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2017.02104
- Escudero-Martinez, C., and Bulgarelli, D. (2019). Tracing the evolutionary routes of plantmicrobiota interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 49, 34-40. doi.org/10.1016/j.mib.2019.09.013
- Etminani, F., and Harighi, B. (2018). Isolation and identification of endophytic bacteria with plant growth promoting activity and biocontrol potential from wild Pistachio trees. *Plant Pathol. J.* 34, 208-217. doi: 10.5423 / PPJ.OA.07.2017.0158
- Gaby, J. C., and Buckley, D. H. (2012). A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase. PLOSE ONE. doi.org/10.1371/journal.pone.0042149
- Gao, S., Xiao, Y., Xu, F., Gao, X., Cao, S., Zhang, F. (2019). Cytokinin-dependent regulatory module underlies the maintenance of zinc nutrition in rice. *New Phytol.* 224, 202-215. doi: 10.1111/nph.15962
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*. 2012, 963401. doi: 10.6064/2012/963401
- Glick, B. R., Cheng, Z., Czarny, J., and Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit. Rev. Plant Sci.* 26, 227-242. doi: 10.1080/07352680701572966
- Grichko, V. P., and Glick, B. R. (2001). Amelioration of flooding stress by ACC deaminasecontaining plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiol. Biochem.* 39, 11–17. doi: 10.1016/S0981-9428(00)01212-2
- Gupta, B., and Huang, B. (2014). Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. Int. J. Genom. dx.doi.org/10.1155/2014/701596
- Gupta, S., and Pandey, S. (2019). ACC deaminase producing bacteria with multifarious plant growth promoting traits alleviates salinity stress in french bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. *Front. Microbiol.* 10, 1506. doi: 10.3389/fmicb.2019.01506
- Haudry, A., Cenci, A., Ravel, C., Bataillon, T., Brunel, D., Poncet, C., et al. (2007) Grinding up wheat: a massive loss of nucleotide diversity since domestication. *Mol. Biol. Evol.* 24(7), 1506-1517. doi:10.1093/molbev/msm077
- Heydarian, Z., Yu, M., Gruber, M., Glick, B. R., Zhou, R., and Hegedus, D. D. (2016). Inoculation of soil with plant growth promoting bacteria producing 1aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase or expression of the corresponding acdS gene in transgenic plants increases salinity tolerance in *Camelina sativa*. Front. Microbiol. 7, 1966. doi: 10.3389/fmicb.2016.01966
- Hill, S. (1992). Physiology of nitrogen fixation in free-living heterotrophs. In "Biological Nitrogen Fixation". Stacey, G., Burris, R.H. and Evans, H.J. (eds). 87-134. Chapman Hall, New York.
- Hontzeas, N., Richardson, A. O., Belimov, A., Safronova, V., Abu-Omar, M. M., Glick, B. R. (2005). Evidence for horizontal transfer of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7556-7558. doi:10.1128/AEM.71.11.7556-7558.2005
- Ji, S. H., Gururanib, M. A., and Chun, S. C. (2014). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiol. Res.* 169, 83-98. doi: 10.1016/j.micres.2013.06.003
- Kandel, S. L., Joubert, P. M., and Doty, S. L. (2017). Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms* 5, 77. doi:10.3390/microorganisms5040077
- Khan Chowdhury, M. D. E., Jeon, J., Ok Rim, S., Park, Y.-H., Lee, S. K., and Bae, H. (2017). Composition, diversity and bioactivity of culturable bacterial endophytes in mountaincultivated ginseng in Korea. *Sci. Rep.* 7, 10098. doi:10.1038/s41598-017-10280-7
- Kibria, M. G., and Hoque, M. A. (2019). A review on plant response to soil salinity and amelioration strategies. J. Soil Sci. 9, 219-231.
- Kong, Z., Glick, B. R., Duan, J., Ding, S., Tian, J., McConkey, B. J., and Wei, G. (2015). Effects of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase-overproducing *Sinorhizobium meliloti* on plant growth and copper tolerance of *Medicago lupulina*. Plant Soil 391, 383-398. doi.org/10.1007/s11104-015-2434-4
- Kruasuwan, W., Thamchaipenet, A. (2018). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase-producing endophytic diazotrophic *Enterobacter* sp. EN-21 modulates salt– stress response in sugarcane. *J. Plant Growth Regul.* 37, 849–858. doi.org/10.1007/s00344-018-9780-4

- Levy, A., Conway, J. M., Dangl, J. L., and Woyke, T. (2018). Elucidating bacterial gene functions in the plant microbiome. Cell Host & Microbe 24, 475-485. doi: 10.1016/j.chom.2018.09.005
- Liang, Y., Urano, D., Liao, K.-L., Hedrick, T. L., Gao, Y., and Jones, A. M. (2017). A nondestructive method to estimate the chlorophyll content of *Arabidopsis* seedlings. *Plant Methods* 13, 26. doi: 10.1186/s13007-017-0174-6
- Lin, L., Wei, C., Chen, M., Wang, H., Li, Y., Li, Y., et al. (2015). Complete genome sequence of endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E. *Stand. Genomic Sci.* 10, 22. doi: 10.1186/s40793-015-0004-2
- Linares, O. F. (2002). African rice (*Oryza glaberrima*): History and future potential. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 99, 16360-16365. doi: 10.1073/pnas.252604599
- Liu, H., Carvalhais, L. C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P. G., Pieterse, C. M. J., and Schenk,
 P. M. (2017). Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. *Front. Microbiol.* 8, 2552. doi: 10.3389/fmicb.2017.02552
- Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140, 943-950. doi:10.1242/dev.086363
- Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., et al. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*. 488, 86-90. doi: 10.1038/nature11237
- Moronta-Barrios, F., Gionechetti, F., Pallavicini, A., Marys, E., and Venturi, V. (2018). Bacterial microbiota of rice roots: 16S-based taxonomic profiling of endophytic and rhizospheric diversity, endophytes isolation and simplified endophytic community. *Microorganisms*. 6(1), 14. doi: 10.3390/microorganisms6010014
- Ndjiondjop M. N., Cisse, F., Girma, G., Sow, M., Bocco, R., Djedatin, G., and Blandine, F. (2010). Morpho-agronomic and molecular characterization of *Oryza glaberrima* germaplasm from Mali. *Afr. J. Biotechnol.* 9(44),7409-7417. doi: 10.5897/AJB2010.000-3312
- Ndjiondjop M. N., Wambugu, P., Sangare, J. R., Dro, T., Kpeki, B., and Gnikoua, K. (2018) Oryza glaberrima Steud. In: Mondal, T., Henry, R. (eds) The wild Oryza genomes. Compendium of plant genomes. Springer, Cham. pp 105-126. doi: 10.1007 / 978-3-319-71997-9
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., and Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. World J. Microbiol. Biotechnol. 33, 197. doi: 10.1007/s11274-017-2364-9

- Olatunji, D., Geelen, D., and Verstraeten, I. (2017). Control of endogenous auxin levels in plant root development. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2587. doi: 10.3390/ijms18122587
- Pereira, S. I. A., Monteiro, C., Vega, A. L., and Castro, P. M. L. (2016). Endophytic culturable bacteria colonizing *Lavandula dentata* L. plants: isolation, characterization and evaluation of their plant growth-promoting activities. *Ecol. Eng.* 87, 91-97. doi: 10.1016/j.ecoleng.2015.11.033
- Pérez-Jaramillo, J. E., Mendes, R., and Raaijmakers, J. M. (2016). Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. *Plant Mol. Biol.* 90, 635-644. doi: 10.1007/s11103-015-0337-7
- Pérez-Jaramillo, J., Carrión, V. J., Bosse, M., Frraro, L. F. V., Hollander, M., et al. (2017). Linking rhizosphere microbiome composition of wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* to genotypic and root phenotypic traits. *Multidisc. J. Microb. Ecol.* 11, 2244-2257. doi: 10.1038/ismej.2017.85
- Qin, S., Zhang, Y. J., Yuan, B., Xu, Y. P., Xing, K., Wang, J., et al. (2014). Isolation of ACC deaminase-producing habitat-adapted symbiotic bacteria associated with halophyte *Limonium sinense* (Girard) Kuntze and evaluating their plant growth-promoting activity under salt stress. *Plant Soil*. 374, 753-766. doi: 10.1007/s11104-013-1918-3
- Saleem, A. R., Brunetti, C., Khalid, A., Della Rocca, G., Raio, A., Emiliani, G., et al. (2018). Drought response of *Mucuna pruriens* (L.) DC. Inoculated with ACC deaminase and IAA producing rhizobacteria. *PLoS One* 13: e0191218. doi: 10.1371/journal.pone.0191218
- Salkowski, E. (1885). Uber das verhalten der skatolcarbonsaure im organismus. Z. Physiol. *Chem.* 9, 23-33. http://echo.mpiwg-berlin.mpg.de/MPIWG:CM1NKAU0
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., and Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol. Res.* 183, 92-99. doi: 10.1016/j.micres.2015.11.008
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., and Pessarakli, M. (2012). Reactice oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. J. Bot. doi:10.1155/2012/217037
- Sie, M., Sanni, K., Futakuchi, K., Manneh, B., Mande, S., Vodouhe, R., et al. (2012). Towards a rational use of African rice (*Oryza glaberrima* Steud.) for breeding in Sub-Saharan Africa-Genes, Genomes and Genomics 6 (Special Issue 1)-p. 1-7
- Smith, K. P., and Goodman, R. M. (1999). Host variation for interactions with beneficial plantassociated microbes. Annu. Rev. Phytopathol. 37, 473-491. doi: 10.1146/annurev.phyto.37.1.473

- Spaepen, S., Vanderleyden, J., and Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 425-448. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x
- Stiefel, E. I. (1977). The mechanism of nitrogen fixation. In: Recent Development of Nitrogen Fixation (Newton, W., Postgate, J. R., and Rodriguez-Barrueco, C., Eds.), pp. 69-108. Academic Press, London.
- Tamura, K., and Nei, M. (1993). Estimation of the number on nucleotide substitutions in the control region on mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512–526. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetic analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729. 10.1093/molbev/mst197
- Tavares, M. J., Nascimento, F. X., Glick, B. R., and Rossi, M. J. (2018). The expression of an exogenous ACC deaminase by the endophyte *Serratia grimesii* BXF1 promotes the early nodulation and growth of common bean. *Lett. Appl. Microbiol.* 66, 252–259. doi.org/10.1111/lam.12847
- Tiwari, G., Duraivadivel, P., Sharma, S., and Hariprased, P. (2018). 1-Aminocyclopropane-1carboxylic acid deaminase producing beneficial rhizobacteria ameliorate the biomass characters of *Panicum maximum* Jacq. By mitigating drought and salt stress. Sci. Report. doi:10.1038/s41598-018-35565-3
- Van Andel, T. (2010). African Rice (*Oryza glaberrima* Steud.): lost crop of the enslaved Africans discovered in suriname. *Econ. Bot.* 64:1–10. <u>https://doi.org/10.1007/s12231-010-9111-6</u>
- Van Zelm, E. Zhang, Y., Testerink, C. (2020). Salt tolerance mechanisms of plants. *Ann Rev. Plant Biol.* 71, 24.1-24.31.
- Wakelin, S., Mander, C., Gerard, E., Jansa, J., Erb, A., Young, S., et al. (2012). Response of soil microbial communities to contrasted histories of phosphorus fertilisation in pastures. *Appl. Soil Ecol.* 61, 40-48. doi: 10.1016/j.apsoil. 2012.06.002
- Wambugu, P. W., Ndjiondjop, M.-N., and Henry, R. (2019). Advances in molecular genetics and genomics of African rice (Oryza glaberrima Steud). *Plants.* 8:376. doi: 10.3390/ plants8100376
- Xia, Y., DeBolt, S., Dreyer, J., Scott, D., and Williams, M. A. (2015). Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices. *Front. Plant Sci.* 6, 490. doi: 10.3389/fpls.2015.00490

- Yadav, A. N., Verma, P., Chauahan, V. S., Suman, A., and Saxena, A. K. (2017). Plant growth promoting bacteria: biodiversity and multifunctional attributes for sustainable agriculture. Adv. Biotech. & Micro. 5(5): 555671. doi: 10.19080/ AIBM.2017.05.5556671
- Zhang, G., Sun, Y., Sheng, H., Li H., and Liu X. (2018). Effects of the inoculations using bacteria producing ACC deaminase on ethylene metabolism and growth of wheat grown under different soil water contents. *Plant Physiol. Biochem.* 125, 178-184. doi: 10.1016/j.plaphy.2018.02.005
- Zhengyi, L., Chang, S., Ye, S., Chen, M., Lin, L., Li, Y., et al. (2015). Differentiation of 1aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase from its homologs is the key for identifying bacteria containing ACC deaminase. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91(10). doi: 10.1093/femsec/ v112
- Zhu, B., Chen, M., Lin, L., Yang, L., Li, Y., and An, Q. (2012). Genome sequence of *Enterobacter sp.* strain SP1, an endophytic nitrogen-fixing bacterium isolated from sugarcane. J. Bacteriol. 194, 6963-6964. doi: 10.1128/JB.01933-12

CONCLUSIONI

Negli ultimi anni, sono stati pubblicati numerosi studi sull'uso dei consorzi microbici (bioinoculi) e in molti casi sono stati osservati benefici rispetto all'inoculazione con le singole specie microbiche. In questo lavoro di dottorato è stato dimostrato che la co-inoculazione degli endofiti *E. cloacae* RCA25 (N-fissatore) e *H. huttiens*e RCA24 (produttore di IAA) porta ad un miglioramento, diretto o indiretto, della fissazione dell'azoto nelle piante di riso in condizioni di serra. I dati riportati nel Capitolo 1 evidenziano che la valutazione della localizzazione e della distribuzione delle singole specie microbiche all'interno dei tessuti vegetali è fondamentale per la selezione di bio-inoculi in grado di migliorare la capacità di fissazione dell'azoto e i parametri fisiologici e di crescita delle piante ospiti.

Nel Capitolo 2 sono stati condotti esperimenti *in vivo* e *in vitro* con due batteri non correlati, il batterio del suolo e scarso produttore di IAA *E. meliloti* e il batterio enterico *E. coli* che non sintetizza IAA, per verificare l'esistenza di una possibile connessione tra l'azione dell'IAA e la struttura/funzione del DNA. I risultati ottenuti in questi esperimenti suggeriscono che l'IAA ha un ruolo nella modulazione dei cambiamenti topologici del DNA ed in particolare nella modifica del suo superavvolgimento. Il superavvolgimento negativo favorisce lo svolgimento della doppia elica del DNA necessaria per la formazione di complessi aperti, portando così ad un aumento della velocità di trascrizione dei promotori per i quali la formazione di complessi aperti è un fattore limitante. È noto che le molecole che si legano al DNA possono agire come modulatori genici sequenza-specifici, esercitando il loro effetto sia sulla regolazione della trascrizione sia sulle modifiche geniche. I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi ci portano ad ipotizzare che l'IAA è in grado di regolare la trascrizione di geni specifici, inclusi quelli coinvolti nella fissazione dell'azoto.

Le analisi descritte nel Capitolo 3 riguardano lo studio del microbioma del riso africano *O. glaberrima*. Sebbene ci siano agricoltori in Africa occidentale che coltivano ancora *O. glaberrima*, a causa delle sue scarse prestazioni causate dall'allettamento e dalla frantumazione, viene massicciamente sostituito dalla varietà di riso asiatico *O. sativa*. Il riso africano e quello asiatico sono geneticamente diversi: *O. glaberrima* è apparsa circa 3000 anni fa in Africa, mentre *O. sativa* ha avuto origine in Asia circa 6000-7000 anni fa ed è la specie maggiormente coltivata a livello mondiale. Il microbioma della rizosfera è essenziale per la crescita e la salute delle piante: esso fornisce una difesa contro parassiti e malattie, facilita l'acquisizione di nutrienti e aiuta le piante a resistere agli stress biotici e abiotici. Il riso africano è coltivato con input agronomici poveri o assenti, ha acquisito e sviluppato tolleranza e resistenza contro la maggior parte degli

stress biotici e abiotici che interessano la coltivazione del riso nell'Africa sub-sahariana, ed è probabilmente più incline ad associarsi a microrganismi che promuovono crescita delle piante.

Nel capitolo 3 sono stati isolati, identificati e caratterizzati per i tratti di promozione di crescita della pianta (PGP) gli endofiti coltivabili dai tessuti interni delle piante di *O. glaberrima*. Un'alta percentuale di batteri endofiti isolati in questo studio produce IAA. Questo risultato rafforza il concetto che la produzione di IAA è molto comune tra i batteri con comportamento endofitico. Inoltre, 6 endofiti mostravano attività azoto-fissativa e 6 diversi endofiti possedevano il gene *acdS*. Questi endofiti sono stati poi utilizzati per inoculare piante di *O. sativa* cv. Baldo. I risultati ottenuti mostrano che i diazotrofi testati sono in grado di colonizzare abbastanza efficientemente *O. sativa* cv. Baldo.

Considerando che il riso è uno dei cereali più sensibili al sale, abbiamo valutato la risposta allo stress salino delle piante "Baldo" inoculate con i due ceppi (BDA59-3 e BDA134-6) che mostravano la più alta capacità azotofissativa e producevano livelli di IAA differenti.

Le piante inoculate sono state trattate con NaCl 0,3 M ed è stata misurata l'attività di quattro enzimi antiossidanti (APX, CAT, POX e SOD. Un significativo miglioramento di tutte le attività degli enzimi antiossidanti è stato osservato nei tessuti delle piante inoculate con il ceppo BDA134-6 rispetto a quelle inoculate con il ceppo BDA59-3. Coerentemente, è stata osservata solo una lieve perdita di attività della nitrogenasi per le piante inoculate con BDA134-6, mentre una riduzione più forte è stata registrata per quelle inoculate con BDA59-3. I risultati osservati per il ceppo BDA134-6 potrebbero essere collegati alla sua maggiore produzione di IAA ed alla sua capacità di fissazione dell'azoto, come osservato negli studi di Defez et al. 2017, Andreozzi et al., 2019 e Defez et al. 2019.

I risultati mostrati in questo lavoro di tesi suggeriscono che il recupero della biodiversità microbica da piante cresciute con il minimo intervento dell'uomo e senza l'aggiunta di fertilizzanti e la sua introduzione nelle colture commerciali, per esempio attraverso un trattamento delle sementi, potrebbe aiutare a sviluppare approcci efficaci per migliorare la produttività delle piante in condizioni di stress abiotico e per ridurre la dipendenza dai fertilizzanti chimici. Per il successo di questi approcci è importante andare a valutare l'interazione dei nuovi endofiti inoculati con il microbioma autoctono delle colture.