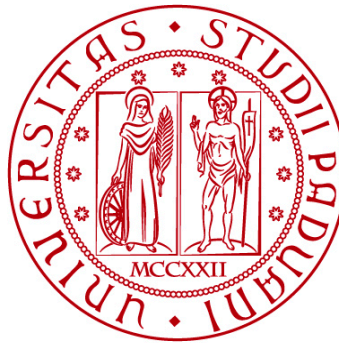


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea magistrale in Biologia Evoluzionistica



TESI DI LAUREA

Il ruolo centrale della diversità genetica di *Lactuca sativa* nel modellare le risposte fisiologiche e fenotipiche ad una comunità microbica sintetica del suolo

Relatore: Prof. Marco Giovannetti
Dipartimento di Biologia

Correlatore: Dott.ssa Arianna Capparotto
Dipartimento di Biologia

Laureando: Paolo Salvucci

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

ABSTRACT

Il fosforo (P) è un minerale essenziale per la crescita delle piante e uno dei nutrienti più importanti che ne limitano la crescita. Nonostante la sua importanza, nel terreno meno del 20% è disponibile in forma inorganica, l'unica disponibile per l'assorbimento da parte delle piante. I fertilizzanti a base di fosfato hanno storicamente affrontato questa problematica, ma dipendono da rocce con disponibilità limitate di fosfato e sono una fonte non rinnovabile. Le soluzioni basate su microrganismi possono offrire un'alternativa sostenibile. Tra questi, i più promettenti sono i funghi micorrizici arbuscolari, avendo la capacità di aumentare la superficie radicale coinvolta nell'assorbimento di fosfato. Inoltre, i batteri solubilizzatori di fosfato sono molto importanti, in quanto aumentano la disponibilità di questo nutriente nel terreno. Questo studio esplora l'impatto di un inoculo microbico, composto da due funghi micorrizici arbuscolari (*Rhizophagus irregularis* e *Funneliformis mosseae*) e due batteri solubilizzatori di fosfato (*Bacillus simplex* e *Cryseobacterium idolitheticum*), su 128 genotipi completamente sequenziati di *Lactuca sativa* cresciute in carenza di fosforo. Questa ricerca indaga il ruolo della diversità genetica delle piante nella risposta all'inoculazione microbica cercando di valutare le risposte fenotipiche e fisiologiche delle piante. I risultati hanno dimostrato un forte effetto della variazione intra-specifica nel determinare la vasta gamma di risposte delle piante all'inoculo. Analizzando le correlazioni tra polimorfismi a singolo nucleotide e variazioni nei tratti fenotipici, lo studio delle GWAS ha rivelato diverse regioni genomiche associate all'accumulo differenziale di fosfato solubile e agli effetti sulla biomassa delle foglie. Per esplorare ulteriormente i legami tra la variazione osservata e le comunità microbiche associate alle radici, sono stati indagati i genotipi di lattuga che mostravano fenotipi contrastanti per le differenze nel contenuto di metaboliti. Questo ha contribuito a identificare quattro gruppi di genotipi con risposte divergenti, dai quali verrà estratto il DNA delle radici per esplorare le loro comunità microbiche 16S e ITS. In conclusione, l'uso di consorzi microbici rappresenta un passo in avanti verso lo sviluppo di tecniche più sostenibili

in campo agronomo, ma è necessaria una comprensione più approfondita dell'interazione tra microorganismi del suolo e la diversità genetica delle piante. Con questo studio, ci proponiamo di aggiungere un nuovo tassello di conoscenza sui meccanismi genetici e fisiologici alla base dell'instaurazione di questa simbiosi e degli effetti dell'interazione benefica tra piante e microorganismi del suolo.

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Relazioni simbiotiche benefiche: batteri e funghi micorrizici arbuscolari	1
1.1.1 Relazioni simbiotiche benefiche	1
1.1.2 Interazione tra pianta e batteri.....	2
1.1.3 Fattori che guidano l'interazione tra pianta e microbiota	5
1.2 Variabilità e diversità genetica e gli studi di Genome Wide Association Studies (GWAS)	8
1.3 Uno dei macronutrienti fondamentali alla vita delle piante: il fosforo	14
1.4 Il metaboloma e la sua composizione	19
1.5 Significato, costruzione e applicazione delle SynCom: è questo un futuro più sostenibile?	22
2. SCOPO DEL PROGETTO	27
3. MATERIALI E METODI	29
3.1 Set up sperimentale	29
3.2 Landlab Phenotyping Platform (LLPhP)	30
3.3 Estrazione e quantificazione del fosfato solubile dai tessuti fogliari liofilizzati	32
3.4 Estrazione e quantificazione dei metaboliti dai tessuti fogliari liofilizzati	35
3.4.1 Quantificazione dei Pigmenti Fotosintetici (PHP).....	35
3.4.2 Quantificazione degli Aminoacidi Liberi (FAA).....	36
3.4.3 Quantificazione degli zuccheri solubili totali (TSS).....	38
3.4.4 Quantificazione dell'amido (STA).....	39

3.5 Estrazione del DNA da radice	40
3.6 Analisi Statistica.....	41
3.6.1 Analisi del fosfato fogliare.....	41
3.6.2 Analisi statistica della risposta fisiologica e morfologica delle piante all'inoculo microbico	41
3.6.3 Analisi dei metaboliti.....	42
3.7 Analisi GWAS	42
4. RISULTATI.....	45
4.1 Risposta nutrizionale delle piante all'inoculo microbico	45
4.2 Valutazione della risposta morfologica e fisiologica delle piante all'inoculo.....	49
4.3 Analisi GWAS	51
4.4 Analisi delle componenti principali (PCA).....	53
4.5 Analisi dei metaboliti	54
5. DISCUSSIONE.....	63
5.1 Effetto dell'inoculo microbico nell'accumulo di Pi	63
5.2 La risposta morfologica e fisiologica della pianta dipende dalla variabilità intraspecifica	65
5.3 Associazione tra variazione e risposta all'inoculo	66
5.4 Biomassa fogliare e contenuto di Pi nella foglia sono responsabili della clusterizzazione dei genotipi	67
5.5 La risposta metabolica della pianta all'inoculo microbico	68
6. CONCLUSIONI.....	71
BIBLIOGRAFIA.....	73
MATERIALI SUPPLEMENTARI.....	85

1. INTRODUZIONE

1.1 Relazioni simbiotiche benefiche: batteri e funghi micorrizici arbuscolari

1.1.1 Relazioni simbiotiche benefiche

La vita come la conosciamo oggi non sarebbe stata possibile senza l'interazione tra piante e microorganismi. Le piante terrestri si sono evolute grazie ad un'associazione simbiotica tra un'alga verde semi-acquatica e un fungo, il che ne ha permesso lo sviluppo sulla terra ferma circa 450 milioni di anni fa (Delaux et al., 2015). Questa interazione tra piante e microorganismi è stata fondamentale e tutt'ora continua ad esserlo, guidando l'ecologia e l'evoluzione vegetale (Hawkes et al., 2020). Lo studio delle dinamiche evolutive che sottostanno a questa associazione può essere condotto su più scale temporali. Da un punto di vista macroevolutivo ha permesso alle piante la conquista dell'ambiente terrestre risultando, ad esempio, in interazioni ed architetture genomiche specializzate. Analizzando scale temporali più piccole, i meccanismi utilizzati dalle piante e i loro simbionti nella difesa contro i patogeni hanno condotto a cambiamenti evolutivi molto rapidi come risultato di una forte pressione selettiva (Upson et al., 2018). Meccanismi di evoluzione o, più precisamente, di coevoluzione, possono nascere anche in assenza di benefici reciproci. In questo processo, una specie, definita il donatore, rilascia delle sostanze che casualmente beneficiano un'altra specie, detta il ricevente. Sotto specifiche condizioni spaziali e di limitata diffusione, il ricevente può sviluppare delle sostanze che, a loro volta, beneficiano il donatore. Di conseguenza, il donatore risponderà aumentando il beneficio apportato al ricevente. Questo scambio può quindi svilupparsi secondo una logica di coevoluzione di entrambe le specie. Nel campo dell'interazione tra pianta e microbiota, tale meccanismo evolutivo coinvolge spesso un singolo ceppo e la pianta che lo ospita e si realizza tramite lo scambio di nutrienti o altri servizi, come, ad esempio, la difesa contro i patogeni (Hawkes et al., 2020). La selezione su un membro ha quindi un effetto sull'evoluzione dell'altro membro e l'interazione tra i due viene mantenuta attraverso una

serie di *pathway* di segnali complessi, molti dei quali riguardano la modificazione dell'espressione genica in uno o in entrambi i membri (Heath et al., 2012).

È importante sottolineare che generalmente tutte le interazioni avvengono con un costo e anche quella tra pianta e microorganismi, per quanto sia stata, e sia tutt'ora, fondamentale, non è da meno. Infatti, sembra che alcuni dei geni che sono necessari alla pianta per stabilire interazioni simbiotiche benefiche con alcuni funghi, siano anche necessari per un'ampia colonizzazione da parte di patogeni biotrofici (Carella et al., 2018; Wang et al., 2012).

1.1.2 Interazione tra pianta e batteri

Con il termine simbiosi si intende un'associazione intima, spesso obbligata, fra organismi di specie diverse, sia animali sia vegetali, che può essere di tre tipologie. La prima è il mutualismo. Si tratta di un tipo di simbiosi in cui entrambe le specie beneficiano dell'interazione, fornendosi reciprocamente nutrienti, risorse, protezione o altro. Un classico esempio di simbiosi mutualistica è quella tra le api e i fiori, in cui le api ricevono nettare e polline e allo stesso tempo favoriscono l'impollinazione. La seconda tipologia di simbiosi è il commensalismo. In questo caso, mentre una prima specie beneficia dell'interazione tramite lo sfruttamento di risorse o dell'*habitat* dell'altra specie, la seconda non ne è né favorita né danneggiata. Un esempio di commensalismo è quello che si osserva tra alcune epifite, come alcune specie di orchidee, che crescono ancorate alle parti aeree di alcuni alberi. La terza tipologia di simbiosi è il parassitismo. Un organismo, il parassita, si avvale dell'altro organismo, l'ospite, per nutrirsi e proliferare vivendo sia all'interno che all'esterno di esso. Un esempio di parassitismo sono alcune piante del genere *Cuscuta* che non disponendo di clorofilla, sfruttano la pianta ospite per la loro sopravvivenza.

Nella simbiosi definiamo generalmente simbionte quello che presenta le dimensioni minori, mentre quello di dimensioni maggiori viene chiamato ospite. Quando il simbionte è in semplice contatto con l'ospite viene definito ectosimbionte. Gli ectosimbionti possono essere localizzati sia all'esterno

che all'interno dell'ospite, ma sempre in ambiente extracellulare. Un esempio di ectosimbionte sono i funghi ectomicorrizici che, con le loro ife, formano un ampio *network* con le radici di molte piante. I simbionti che invece penetrano all'interno della cellula vengono chiamati endosimbionti e ne sono un esempio i funghi micorrizici arbuscolari (AM), che colonizzano le cellule della radice formando delle strutture specializzate chiamate arbuscoli.

Nonostante i meccanismi che stanno alla base dell'interazione tra pianta e microorganismi non siano ancora ben chiari, molti studi hanno identificato particolari specie di microorganismi che promuovono la crescita della pianta rendendo reperibili i nutrienti nel suolo alle radici, modulando i segnali ormonali, producendo antibiotici ed interagendo con il sistema immunitario della pianta (Sohrabi et al., 2023; Trivedi et al., 2020). Nonostante non si abbia una piena conoscenza del microbiota e del suo funzionamento, prodotti contenenti microorganismi vengono utilizzati anche nel campo dell'agronomia, ad esempio, per la resistenza a patogeni, nematodi e insetti erbivori. È il caso della specie *Bacillus thuringiensis*, che viene ampiamente utilizzata e ha un'efficacia elevata nel ridurre l'impatto negativo degli insetti erbivori e degli insetticidi tradizionali (Sanahuja et al., 2011).

Anche il processo che guida la colonizzazione e lo stabilirsi della comunità microbica nella radice non è ancora del tutto chiaro. Partendo da una comunità del suolo molto diversificata, presente nell'ambiente circostante, i microorganismi possono essere attratti oppure allontanati dal microbiota della radice. Questo processo è dovuto ad una combinazione di proprietà chimiche e fisiche che sono presenti nella parte vicino alla radice (rizosfera), nella radice e nella foglia. Inoltre, i microorganismi devono affrontare anche il sistema immunitario della pianta che allo stesso modo può promuovere o meno la colonizzazione. Una volta raggiunto l'ambiente epifitico della pianta, si realizza una competizione per le risorse e per lo spazio con gli altri microorganismi che vogliono insediarsi nello stesso ambiente. Qui entrano in gioco specifici meccanismi come le caratteristiche uniche dell'ambiente, guidate dallo sviluppo delle varie parti della pianta, e

specifiche funzioni immunologiche delle cellule della radice che permettono lo sfruttamento della comunità microbica epifitica. Per quanto riguarda la colonizzazione dell'ambiente endofitico entrano in gioco il sistema immunitario, lo stadio di sviluppo delle diverse parti della pianta e quello delle cellule. Anche le condizioni ambientali (Figura 1) hanno un ruolo in questa scala di processi, cambiando drasticamente la capacità di colonizzazione e regolando la comunità microbica della radice (Russ et al., 2023). Questo processo di colonizzazione porta ad una progressiva riduzione della diversità microbica, partendo dal terreno e andando verso la rizosfera. D'altro canto, questa diminuzione della diversità è accompagnata da un parallelo aumento della specializzazione dei microorganismi associati alla radice (Bulgarelli et al., 2012; Lundberg et al., 2012), suggerendo che la pianta esercita una pressione selettiva sulla comunità microbica. Durante questo processo di colonizzazione della comunità microbica della radice è stato visto come membri del phylum Planctomyces e Acidobacteria, che sono molto abbondanti nel terreno, lasciano il posto a membri del phylum Actinobacteria e Proteobacteria, che risultano essere molto presenti sia nel compartimento epifitico (rizosfera) sia in quello endofitico (Bulgarelli et al., 2012; Lundberg et al., 2012). Anche nella fillosfera, che consiste nelle parti aree della pianta come foglie, steli, fiori e frutti, generalmente c'è una diversità microbica minore se paragonata a quella del suolo e della radice (Russ et al., 2023).

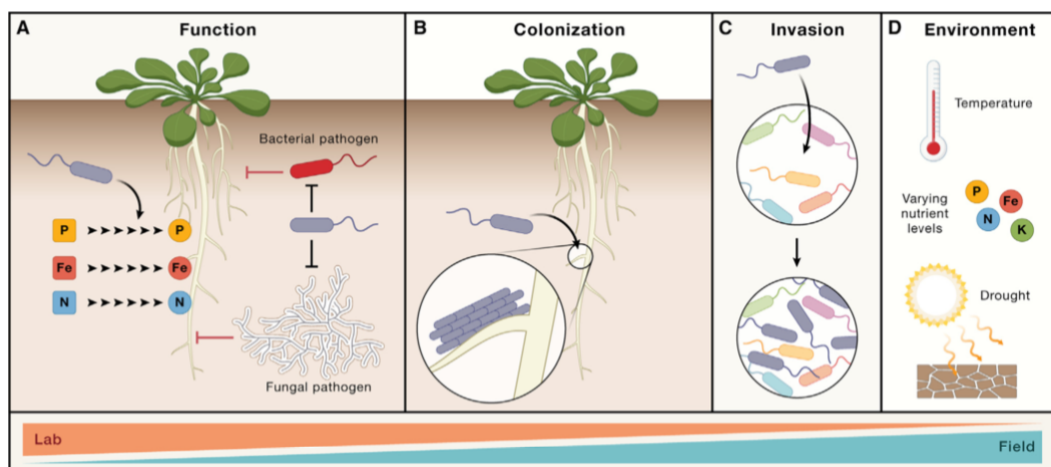


Figura 1: Requisiti dei microorganismi per aumentare la produttività della pianta:

(A-D) Per aumentare la produttività della pianta un microorganismo deve svolgere alcuni ruoli: (A) deve avere una funzione benefica per la pianta, ad esempio, fornire nutrienti come ferro (Fe), fosfato (P) o azoto (N), oppure un'azione contro batteri e funghi patogeni; (B) deve colonizzare l'organo e il tessuto della pianta corretto (C); deve invadere la colonia microbica già presente nella radice; (D) e deve svolgere tutte queste funzioni mentre è esposto a potenziali fattori ambientali non favorevoli. Alcune di questi ruoli possono essere studiati in laboratorio (tipo la funzione e in certi casi la colonizzazione) ma gli altri si riscontrano solo nel campo, come in alcuni casi l'invasione e la risposta all'ambiente (Russ et al., 2023).

1.1.3 Fattori che guidano l'interazione tra pianta e microbiota

Il sistema immunitario della pianta gioca quindi un ruolo molto importante nel formare la comunità microbica, sia della rizosfera che della fillosfera. Nello specifico, i fitormoni acido jasmonico (JA) e acido salicilico (SA), che svolgono un ruolo nella difesa contro i patogeni, hanno anche una funzione importante nel mediare l'omeostasi dei microorganismi commensali (Figura 2). La normale abbondanza e composizione del microbiota in piante sane e cresciute in condizioni ottimali viene generalmente definita eubiosi (Paasch & He, 2021). Ad esempio, mutanti di *Arabidopsis* che hanno una risposta immunitaria mediata dal SA costitutivamente elevata, presentano una diversità batterica ridotta nel microbiota endofitico della foglia. Invece, mutanti che mancano della risposta immunitaria mediata dal JA, hanno una diversità microbica maggiore nella zona epifitica della foglia (Kniskern et al., 2007). L'attivazione del *pathway* del JA, favorita dall'applicazione del metil-JA, comporta alterazioni nella composizione del microbiota anche nella rizosfera (Carvalhais et al., 2013). Un altro studio, in cui sono stati coinvolti molti mutanti ormonali, ha identificato che il SA è necessario per stabilire un normale microbiota della rizosfera e che la modulazione mediata dall'SA è probabile che si verifichi a livello di famiglia, invece di avere un impatto solo su pochi ceppi selezionati e molto abbondanti (Lebeis et al., 2015). Uno studio recente ha mostrato come l'etilene (Figura 2), un altro fitormone coinvolto nella difesa contro i patogeni, ha anche una funzione nella ramificazione radicale. Infatti sembra che il microbiota eserciti un controllo su alcune fasi di questo processo, come lo sviluppo delle radici laterali,

attraverso l'induzione dell'etilene (Gonin et al., 2023). Questo fitormone sembra anche essere coinvolto nello sviluppo di comunità microbiche della fillosfera diverse tra piante di *Arabidopsis wild type* e piante mutanti nella *pathway* della segnalazione dell'etilene (Bodenhausen et al., 2014). Oltre ai fitormoni, recenti studi hanno mostrato come *pattern-triggered immunity* (PTI) abbia un ruolo cruciale nel modulare l'omeostasi microbica radicale. È una delle principali forme di immunità delle piante, avviata dal riconoscimento di alcuni pattern microbici comuni da parte dei *pattern recognition receptors* (PRRs; Figura 2; Song et al., 2020; Ma et al., 2021; Zipfel, 2008).

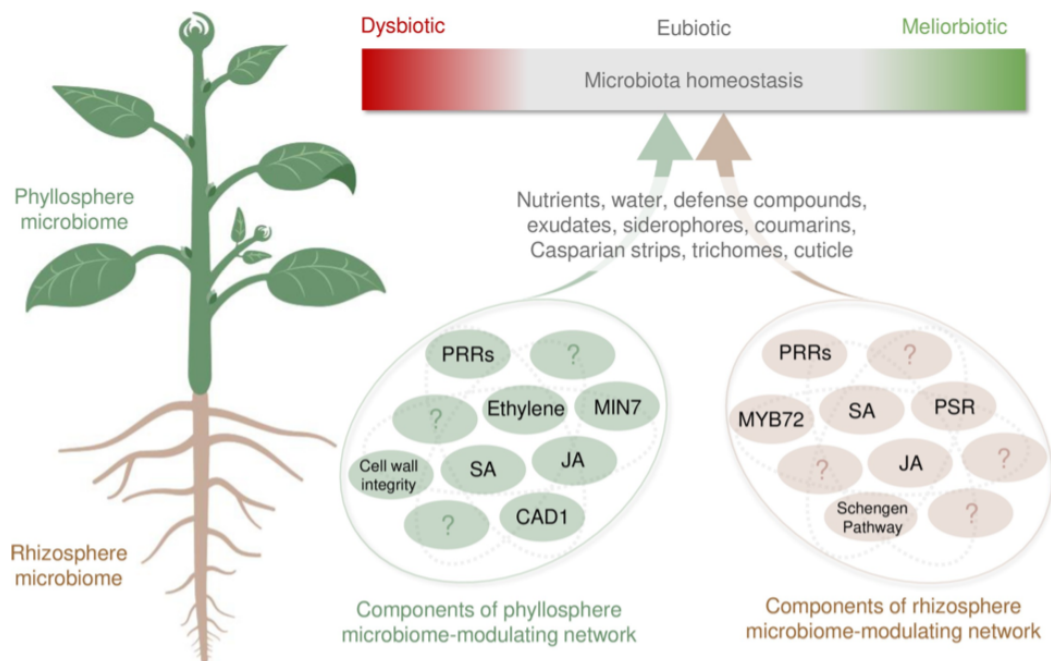


Figura 2: Fattori che controllano l'omeostasi microbica nella pianta

L'eubiosi microbica rappresenta il normale rapporto di composizione e abbondanza del microbiota nelle piante sane cresciute in condizioni ottimali. Quando l'eubiosi viene a mancare, sia per mutazioni che avvengono nell'ospite, stress abiotici, o infezione, o una combinazione di questi fattori, l'omeostasi può spostarsi in uno stato di disbiosi associato ad un impatto negativo sulla salute della pianta o verso uno stato di meliobiosi associato ad un impatto positivo sulla salute della pianta. Esempi di fattori della pianta che contribuiscono all'omeostasi del microbiota nella radice (marrone) e nella foglia (verde). Non tutti i fattori conosciuti sono riportati. JA: acido jasmonico; SA: acido salicilico; CAD1: constitutively activated cell death 1; MIN7: HOPM1-interactor 7; MYB72: MYB domain protein 72; PRRs: pattern recognition receptors; PSR: phosphate starvation response (Paasch & He, 2021).

Lo studio dell'interazione che intercorre tra pianta e microbiota è un argomento molto d'interesse e molto studiato al giorno d'oggi. Ciononostante, sono ancora numerose le domande senza risposta e si rileva una difficoltà nel traslare le conoscenze ottenute in laboratorio in un contesto ambientale non controllato. Da un lato, esistono ancora molti meccanismi biochimici e genetici alla base dell'instaurarsi di queste relazioni che non sono pienamente compresi. Dall'altro, le funzioni e/o il ruolo dei microorganismi che possono portare beneficio alla pianta, oppure, il ruolo dell'ambiente nello stabilire l'interazione, non sono ancora del tutto chiari. Inoltre, molto spesso gli esperimenti condotti in laboratorio sono di difficile replicazione in ambiente naturale a causa di una molteplicità di fattori che si aggiungono lavorando in un ambiente non controllato. Anche alla luce di queste limitazioni, la comunità scientifica sta facendo passi in avanti nella scoperta dei meccanismi che ne sono alla base. In campo agronomo questa interazione è studiata anche con il fine di sviluppare di fertilizzanti naturali, composti appunto da comunità microbiche che possono rimpiazzare fertilizzanti chimici o estratti da fonti non rinnovabili (quest'ultimo, ad esempio, è il caso delle rocce contenenti fosfato). Dato che la produttività della pianta è in costante diminuzione a causa di fattori come il cambiamento climatico, l'aumento della degradazione dei terreni, l'aumento della pressione che viene da patogeni, parassiti o insetti erbivori o l'introduzione di altre piante, native e non, che competono per le risorse o l'*habitat*, lo studio di questa simbiosi può offrire un interessante strumento per alleviare gli stress biotici, abiotici e quelli causati dall'impatto antropico (Lesk et al., 2016; Delgado-Baquerizo et al., 2020). Quindi, l'utilizzo di ceppi singoli, di consorzi microbici o la gestione di comunità esistenti per aumentare la produttività della pianta (Figura 1) e la sua capacità di accedere ai nutrienti nel suolo, può essere una soluzione grazie alla loro capacità di modificare i fenotipi della pianta e attenuare stress biotici ed abiotici (Giauque et al., 2019; Hawkes et al., 2021; Jurbrug et al., 2022). L'importanza dello studio di questa interazione risiede anche nel fatto che il microbiota può modellare la variabilità genetica della pianta (Gopal &

Gupta; 2016). Ad esempio, è noto che la trasmissione di batteri endofitici alle piante figlie può avvenire partendo dalla pianta parentale, continuando per i semi, che portano con sé l'impronta genetica della pianta, ed infine arrivare alla prole (trasferimento genico verticale; Robison et al., 2016). Quindi il microbiota può offrire una importante variabilità genetica alla pianta che può essere applicata, ad esempio, in tecniche di *breeding* (Gopal & Gupta; 2016).

1.2 Variabilità e diversità genetica e gli studi di Genome Wide Association Studies (GWAS)

La genetica di popolazione studia la distribuzione e la variazione delle frequenze genetiche nelle popolazioni di organismi e può essere associata allo studio della variazione di tratti fenotipici di interesse e di come essi possano variare nel tempo e nello spazio. Per raggiungere questo obiettivo, viene studiata l'architettura genetica di una popolazione nelle generazioni, determinata dalla frequenza allelica e dalla frequenza genotipica del tratto sotto esame (Laurentin Tàriba, 2023). Per frequenza allelica si intende la frequenza relativa di un allele (variante di un gene) su un locus genetico della popolazione (Gillespie, 2004). Invece, per frequenza genotipica si intende il numero di individui con un dato genotipo in rapporto al numero totale degli individui di quella popolazione (Brooker et al., 2011), che si traduce nella frequenza o proporzione dei genotipi in una popolazione. Le basi teoretiche della genetica di popolazione sono date dal principio di equilibrio di Hardy-Weinberg, il quale afferma che ogni popolazione in panmissia (popolazione nella quale tutti gli accoppiamenti tra gli individui avvengono in modo casuale) e in assenza di mutazioni, migrazioni, selezione e deriva genica ha una frequenza allelica e genotipica uguale di generazione in generazione. Da qui ne segue quindi che la struttura genetica di un particolare gene in una popolazione può cambiare solo se si agisce in uno dei processi sopra elencati (Laurentin Tàriba, 2023). Nel caso in cui venga violato uno di questi processi, la frequenza allelica e quindi la frequenza genotipica vengono modificate. Nel caso in cui non

avvenga panmissia (come nelle piante auto impollinatrici), la frequenza genotipica verrà alterata. Quella allelica invece rimane costante, come ad esempio accade nel caso della riproduzione tra consanguinei. La variabilità genetica in una popolazione sarà la conseguenza di mutazioni o migrazioni e i processi di selezione (naturale o artificiale) o di deriva genetica determineranno la permanenza o l'eliminazione di questi cambiamenti nella generazione successiva di una popolazione (Laurentin Tàriba, 2023).

La diversità genetica è il numero totale di caratteristiche genetiche nel corredo genico di una specie. Essa varia molto tra specie diverse e all'interno della medesima specie e può essere attribuita alla capacità di sopravvivenza di una specie (Biological Online Dictionary, 2019). Differisce leggermente dalla variabilità genetica poiché quest'ultima si riferisce alla tendenza delle caratteristiche genetiche a cambiare. In generale, possiamo definire la diversità genetica come la quantità di variabilità genetica presente in una varietà o in una specie entro una popolazione. È il risultato della ricombinazione del materiale genetico (DNA) durante il processo di ereditarietà, mutazioni, selezione, flusso genico e deriva genetica (Brown, 1983; Figura 3) risultando in variazioni della sequenza di DNA, profili epigenetici, struttura della proteina o isoenzimi, proprietà fisiologiche e proprietà morfologiche. La diversità tra popolazioni di piante o di animali è determinata dal materiale ereditario presente negli individui della popolazione che si riproducono. La diversità genetica è la principale forza per la selezione e l'evoluzione delle popolazioni (Nevo et al., 1984). È cruciale per una popolazione sana in quanto mantiene geni diversi che possono portare a resistenze contro parassiti, malattie o altre tipologie di stress e permette agli individui di adattarsi a diversi stress biotici e abiotici. Quindi, quando l'ambiente cambia, molte specie riescono a sopravvivere grazie alla presenza di variazioni genetiche che permettono l'adattamento a quelle condizioni mentre, specie che non hanno o hanno poca diversità genetica, possono diventare suscettibili agli stress biotici o abiotici (Salgotra & Chauhan, 2023). Un esempio della diversità genetica nel mondo vegetale

può essere rappresentato dalle diverse colorazioni dei chicchi dei diversi fenotipi di mais (*Zea mays* L.).

Gli scienziati hanno visto come la diversità genetica possa essere conservata in forma di *Plant Genetic Resources* (PGR; Figura 3), come ad esempio banche di geni o librerie di DNA (Govindaraj et al., 2015). Quindi, in generale, possiamo definire i PGR come il materiale ereditario totale, che include tutti gli alleli di molti geni, oppure, come qualsiasi tipologia di materiale riproduttivo o di propagazione vegetativa delle specie vegetali. L'importanza della diversità genetica all'interno dei PGR risiede nella possibilità futura di sviluppare nuove varietà commerciali che possiedono determinate caratteristiche come resa maggiore, resistenza a patogeni o malattie e resistenza a stress biotici o abiotici. Il loro sviluppo è permesso dall'utilizzo di tecniche di accoppiamento tra piante che presentano le caratteristiche ricercate, oppure mediante tecniche di ingegneria genetica che permettono cambiamenti mirati che conferiscono determinate resistenze, ad esempio con il sistema CRISPR-Cas9 (Arora & Narula, 2017). Alla fine quindi, nuove varietà commerciali potranno avere sia caratteristiche favorevoli al commercio sia altre che permettono la loro sopravvivenza in condizioni di cambiamento climatico come quelle odierne (Salgotra & Chauhan, 2023).

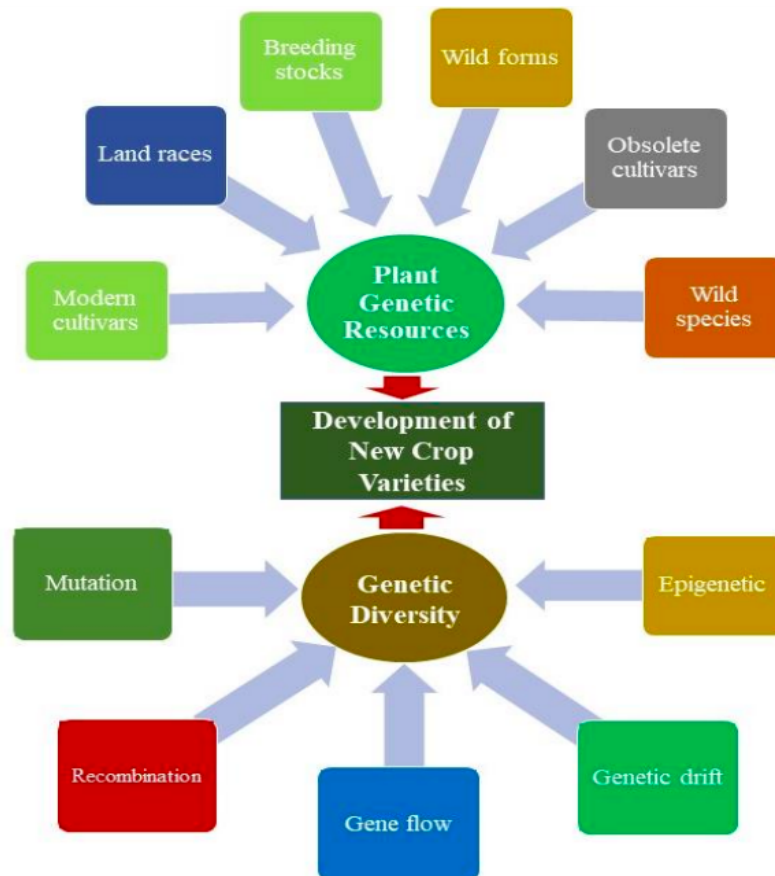


Figura 3: Fonti diverse di diversità genetica e la loro potenziale applicazione nello sviluppo di nuove varietà commerciali (Hafeez et al., 2023). Con il termine “per land races” si intende le varietà di piante e di semi che si sono adattati localmente ad un ambiente, derivanti dal ripetersi nel tempo delle classiche procedure di agricoltura (come semina, raccolta e conservazione; Panis et al., 2020).

I Polimorfismi a Singolo Nucleotide (SNP o SNPs) rappresentano differenze di un singolo nucleotide, in una specifica posizione, di due o più sequenze di DNA. Sono responsabili di specifiche caratteristiche o fenotipi e sono la tipologia più diffusa di variazione nella sequenza di DNA (Mukhopadhyay & Bhattacharjee, 2016). Gli SNPs possono essere considerati una misura della variabilità genetica all'interno di una specie e possono essere utilizzati per studiare la diversità genetica, la struttura di una popolazione e le relazioni evoluzionistiche. Un esempio è lo studio di Kandel e colleghi in cui, utilizzando 4615 SNPs provenienti da 493 *accession* di lattuga (*Lactuca sativa* L.), sono stati identificati due *Quantitative Trait Locus* (QTL) associati con la sua durata di conservazione e il suo tasso di sviluppo (Kandel et al., 2020).

Un metodo in cui vengono utilizzati gli SNPs sono gli *Genome Wide Association Studies* (GWAS), la cui funzione principale è quella di testare varianti genetiche di molti individui di una popolazione per identificare associazioni tra genotipo e fenotipo. La sua prima applicazione è stata in campo medico per l'identificazione di malattie genetiche nell'uomo (Alseekh et al., 2021). Il primo passaggio delle analisi GWAS è quello di identificare le caratteristiche che devono essere valutate e scegliere un'appropriata popolazione di studio considerando sia la sua dimensione sia la quantità di varianza genetica e dei tratti che essa possiede (Alseekh et al., 2021). Oltre all'utilizzo di SNP, l'analisi necessita anche dell'intero genoma sequenziato (Tam et al., 2019). A questo punto vengono utilizzati test di associazione per identificare le regioni genomiche che si associano alla varianza del fenotipo d'interesse con una significatività a livello del genoma (ossia il livello di significatività statistica che serve per affermare l'associazione tra la variante genica e la caratteristica considerando l'intero genoma), spesso usando meta-analisi per aumentare la potenza statistica nel rilevare le associazioni (Alseekh et al., 2021).

Dopo la sua prima applicazione in campo medico e la sua successiva esplosione, l'interesse per questo metodo è cresciuto anche nel campo vegetale. Alla luce delle numerose problematiche che la presenza di patogeni e il rapido mutare delle condizioni climatiche sono in grado di causare, tra cui siccità, minor resa delle piante e elevate concentrazioni di azoto nel terreno, la scoperta di specifiche associazioni tra genotipo e fenotipo per caratteristiche di interesse agronomo sta suscitando un crescente interesse. Oltre alla scoperta di caratteristiche di interesse agricolo, che ci riguardano anche in prima persona, questo metodo può essere utilizzato per la scoperta o lo studio di caratteristiche fisiologiche e/o metaboliche, oppure può essere utilizzato per la validazione di loci genici che sono stati scoperti con altri metodi. Ad esempio, in un recente lavoro sono stati valutati 517 ecotipi di *Arabidopsis* cresciuti in Spagna e Germania (Exposito-Alonso et al., 2019). Tale studio ha simulato alte e basse precipitazioni ad ogni sito e quantificato la sopravvivenza e la fecondità, eseguendo successivamente un'analisi GWAS sui coefficienti di selezione

quantificati. Gli autori hanno osservato che una porzione significativa della selezione naturale guidata dal clima era prevedibile sotto forma di adattamenti locali, poiché le varianti genetiche trovate nelle aree geografiche con climi più simili ai siti sperimentali sono state selezionate positivamente. Questi risultati hanno permesso di prevedere che, con l'aumento della frequenza della siccità e della temperatura in Europa, la selezione positiva si estenderà verso nord in tutta l'Europa (Exposito-Alonso et al., 2019). In un altro studio sono stati analizzate 441 *accession* di diverse specie di lattuga (*Lactuca sativa* L.), ricavando circa 180 mila SNPs, per studiare l'influenza della riproduzione selettiva sulla variazione genetica di lattuga (Park et al., 2021). È stato visto come la varietà Iceberg sia la più distante filogeneticamente rispetto alle altre tipologie da orticoltura. Inoltre, hanno identificato delle sue regioni genomiche sotto selezione positiva che, mediante un'analisi GWAS, hanno associato a dei tratti di domesticazione come un ritardo nell'allungamento dello stelo floreale (Park et al., 2021).

Data il suo vasto uso, è importante sottolineare anche che le analisi GWAS presentano delle criticità, principalmente sotto due punti di vista: la struttura della popolazione e gli alleli causali a bassa frequenza che risultano in falsi negativi (Korte & Farlow, 2013). Al fine di risolvere questi problemi sono state proposte due soluzioni: lo sviluppo di nuovi metodi statistici per l'esplorazione di alleli funzionali rari (Listgarten et al., 2013) o, in alternativa, il disegno di popolazioni artificiali e il loro utilizzo finalizzato al bilanciamento della frequenza allelica così da poter controllare la struttura della popolazione (Dell'Acqua et al., 2015).

La variabilità genetica è un importante fattore alla base dello studio sull'applicazione di tecniche di miglioramento delle piante finalizzate a fronteggiare problematiche sempre più incidenti, come l'aumento del numero della popolazione mondiale o i cambiamenti climatici. Al fine di poter utilizzare la variabilità genetica in campo agronomo, è importante capire come essa si esprima in termini di fenotipo. Infatti, l'espressione fenotipica di un tratto può essere complessa e il meccanismo di ereditarietà

delle caratteristiche d'interesse può non essere di facile predizione. È per questo motivo che, l'interazione osservata tra diversi genotipi di diversi loci che determina il fenotipo, si sta distinguendo come area di grande interesse (Henderson & Salt, 2017). Una volta che vengono scoperte le caratteristiche fenotipiche d'interesse, sia per gli allevatori che per i consumatori, e la variazione genetica responsabile del tratto e della loro espressione, questi tratti vengono conservati in semi (germaplasma; Swarup et al., 2021). Sono tre le metodologie principali utilizzate per il *breeding* di piante e quindi per lo sviluppo di nuove tipologie. La prima è la metodica convenzionale di allevamento che si avvale di tecniche come selezione, ibridazione e mutazione. La seconda metodologia consiste nell'utilizzo di tecniche molecolari per il *breeding* che permettono la selezione a livello molecolare di specifici tratti desiderati utilizzando marcatori molecolari. Infine, la terza metodologia si serve di approcci transgenici come le tecniche di *editing* genomico, tra cui ricordiamo CRISPR-Cas9, che hanno rivoluzionato l'indagine in questo campo (Hafeez et al., 2023).

Il successo nel miglioramento delle colture, quindi, risiede nell'efficiente identificazione e incorporazione della diversità genetica proveniente da diverse fonti vegetali per lo sviluppo di una progenie che possa presentare delle caratteristiche migliorate sia per l'utilizzo in campo agricolo ma anche per preservare le specie che sono a rischio estinzione (Figura 3; Swarup et al., 2021).

1.3 Uno dei macronutrienti fondamentali alla vita delle piante: il fosforo

Il fosforo (P) è uno dei macronutrienti fondamentali per la crescita della pianta, il suo metabolismo e per il corretto stabilirsi delle interazioni con i funghi micorrizici arbuscolari. Insieme al fosforo, giocano un ruolo fondamentale nel benessere della pianta anche l'azoto (N), lo zolfo (S) il magnesio (Mg), il calcio (Ca) e il potassio (K). Ad esempio, N, dopo il

carbonio, è uno dei macronutrienti più importanti, in quanto è il costituente principale di proteine, acidi nucleici e clorofilla (Hawkesdorf et al., 2012).

Il fosforo nel suolo può essere presente sia nella forma organica che in quella inorganica. Il P organico costituisce più del 20% del P totale nel suolo, essendo derivato da processi metabolici biologici come l'assimilazione dell'ortofosfato e da residui microbici, vegetali o animali (Rawat et al., 2021). Il P inorganico, che è l'unica tipologia di fosfato disponibile per le piante, costituisce circa il 20-60% del P organico del suolo ma, essendo fissato alle particelle del terreno, solo una piccola frazione (meno del 1%) in soluzione è disponibile all'assorbimento da parte delle piante (Wang et al., 2022). Il P inorganico presente nel suolo comprende i fosfati legati a minerali come il fosfato di calcio, il fosfato di alluminio e il fosfato di ferro (Rawat et al., 2021). Nella sua forma organica, è il costituente di molte molecole biologiche inclusi gli acidi nucleici, fosfolipidi e proteine. Nella sua forma di ortofosfato o fosfato inorganico (Pi), è il costituente delle molecole energetiche ed è necessario per la fosforilazione, un importante e frequente processo che ha funzione di regolazione e di segnalazione nelle cellule viventi. Uno dei problemi principali che le piante devono affrontare nell'acquisizione di P, è che esso ha una mobilità e una disponibilità limitata nel terreno. Per questo i produttori primari come le piante hanno la necessità di sviluppare delle strategie per la sua acquisizione (Paries & Gutjahr, 2023). Date le sue fondamentali funzioni per la sopravvivenza e lo sviluppo della pianta, il sufficiente apporto di fosfato è necessario anche per il mantenimento di una corretta catena alimentare. Per questo motivo, in agricoltura si fa uso di fertilizzanti a base di fosforo che derivano da rocce che lo contengono. Tali rocce sono una fonte non rinnovabile e le riserve mondiali potrebbero esaurirsi nel giro di 50-100 anni con il picco di produzione di P globale previsto intorno al 2030 (Cordell et al., 2009). Un altro problema di questi fertilizzanti è che solo una parte del P utilizzato viene assimilato dalle piante, portando ad un suo deflusso nelle acque che causa eutrofizzazione e *bloom* algali, tossici negli ecosistemi acquatici (Zak et al., 2018). Per questo motivo, le ricerche recenti si stanno concentrando sull'aumentare l'abilità delle piante di prelevare il P dal

terreno, focalizzandosi sul miglioramento di tre processi alla base del suo naturale assorbimento. Il primo riguarda l'architettura del sistema radicale, come una maggiore densità radicale (che consiste nella lunghezza della radice per unità di volume del suolo) e un aumento del numero di radici laterali, che permettono un maggiore assorbimento di P dal suolo superficiale. Il secondo consiste in un aumento del rilascio di protoni, di anioni organici ed enzimi che facilitano la solubilizzazione del P nel terreno. L'ultimo è quello di migliorare l'interazione con i microorganismi come i funghi micorrizici arbuscolari, che aumentano il volume di suolo sfruttato per l'acquisizione di P, oppure i batteri solubilizzatori di fosfato, che aumentano la disponibilità del P nel suolo (Han et al., 2022).

La colonizzazione della radice da parte di batteri che aiutano la pianta ad assorbire il Pi, è un processo che si divide in più passaggi. Inizialmente, i fotosintetati che sono secreti dalla pianta nella rizosfera, formano dei gradienti che sono percepiti dai batteri che occupano il suolo circostante. Il risultato è l'attivazione di un *pathway* chemosensoriale e il movimento dei batteri mobili verso la radice. Successivamente, avviene l'attacco dei batteri alla superficie della radice a contatto con il terreno (rizopiano). Questo processo generalmente si divide in due fasi: una prima fase caratterizzata da un legame reversibile tra batteri e rizopiano, una seconda fase che porta ad un'adesione irreversibile (Knights et al., 2021). La prima fase consiste in legami deboli, non specifici e reversibili, mediati da interazioni idrofobiche e elettrostatiche tra batteri e radice (Kendal & Roberts, 2015). La seconda fase comprende un legame tra rizopiano e batteri, forte e irreversibile, mediato dalla sintesi di fibrille di cellulosa extracellulare e altri composti secondari specie-specifici (Knights et al., 2021). A questo punto, una volta che il processo di attacco dei batteri alla radice è andato a buon fine, le micro-colonie formatesi si sviluppano in biofilm sulla superficie della radice. La formazione di biofilm è una parte fondamentale della corretta colonizzazione ed è una strategia utilizzata da molti batteri del suolo (Knights et al., 2021). Ad influenzare il processo di colonizzazione possono esserci diversi fattori quali le condizioni ambientali (ad esempio pH del

suolo, presenza di cationi divalenti, disponibilità di acqua; Howieson et al., 1993), l'interazione pianta-batteri e quella tra batteri e batteri. Quest'ultima può essere molto complessa, comprendendo sia cooperazione, come lo scambio di metaboliti (Zelezniak et al., 2015), oppure competizione, come la produzione di tossine antimicrobiche (Granato et al., 2019). Tutti i batteri che contribuiscono a rendere disponibile il Pi per le piante vengono definiti *phosphate-solubilizing bacteria* (PSB). I PSB esistono nella maggior parte dei suoli e, in condizioni *in vitro*, possono aumentare la biodisponibilità di P diminuendo il pH del terreno, solubilizzando il Pi, attivando la sintesi di fosfatasi, mineralizzando il P organico e/o chelando il P dagli ioni Al^{3+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} (Etesami et al., 2021).

Degli specifici trasportatori, mediante trasporto attivo, regolano l'assorbimento di fosfato nel terreno ed essi, a loro volta, sono regolati dalla concentrazione di fosfato nella pianta. Infatti, quando ci sono condizioni di carenza di fosfato, l'espressione dei geni che codificano per questi trasportatori viene aumentata (Smith, 2002). Appartengono a diverse famiglie di proteine che sono: la famiglia dei trasportatori di fosfato (PHT), la famiglia delle proteine contenenti il dominio SYG1/Pho81/XPR1 (SPX) e la famiglia dei TRASPORTATORI DI SOLFATO (SULTR; Wang et al., 2021a). I PHT sono classificati in base alla loro posizione all'interno della cellula con un numero da 1 a 5. La famiglia dei trasportatori PHT1 è localizzata nella membrana plasmatica ed ha il ruolo di mediare l'assorbimento di Pi dal terreno e/o la traslocazione del Pi tra cellule o tessuti (Wang et al., 2021a). La famiglia dei trasportatori PHT2/3/4 ha il ruolo del trasporto del Pi dentro o fuori gli organelli citoplasmatici, quali mitocondri plastidi o Golgi (Versaw & Garcia, 2017). La famiglia PHT5 invece è presente nel vacuolo, l'organello più grande delle cellule vegetali che immagazzina più del 90% del Pi sotto condizioni di Pi sufficienti, con il ruolo di trasporto del fosfato all'interno o all'esterno di questo organello. Questo movimento del Pi dentro e fuori dai vacuoli è molto importante per tamponare le concentrazioni citoplasmatiche di Pi contro le fluttuazioni di Pi all'esterno. Alla famiglia degli SPX appartiene il Arabidopsis FOSFATO 1 (PHO1) che media la fuoriuscita del Pi dalla cellula e il suo caricamento

nello xilema (Wang et al., 2021b) mentre, in *Medicago trunculata*, sembra che due proteine di questa famiglia (SPX1 e SPX3) regolano la colonizzazione della radice e la degradazione arbuscolare durante la simbiosi AM (P. Wang et al., 2021). Invece, alcuni membri della famiglia dei SULTR sembrano coinvolti nell'accumulo di P nei chicchi di riso (Yamaji et al., 2017).

Queste famiglie di trasportatori appartengono tutte ad un sistema specifico che le piante hanno evoluto chiamato *Phosphate Starvation Response* (PSR), presente già nelle alghe verdi e streptofite (Rubio et al., 2001) e mantenuto per tutta la filogenesi delle piante terrestri (Paries & Gutjahr, 2023). Uno dei ruoli principali nel sistema PSR lo hanno dei regolatori trascrizionali, chiamati *Phosphate Starvation Response* (PHR), conservati anch'essi dalle alghe verdi unicellulari fino alle piante vascolari (Rubio et al., 2002). I PHR si vanno a legare al *Phosphate Starvation Response 1 binding site* (P1BS), un motivo di sequenza parzialmente palindromico che si trova nella regione del promotore di geni coinvolti nel PSR (Bustos et al., 2010). I PHR svolgono, ad esempio, una funzione di regolazione sui geni per i trasportatori PHT1. Recentemente è stata dimostrata un'altra funzione molto importante del PSR: promuove la simbiosi con i funghi micorrizici arbuscolari in condizioni di carenza di fosfato (Das et al., 2022). È infatti ormai noto che la concentrazione di fosfato nella pianta influenza la formazione di AM: una carenza di Pi promuove il processo mentre un sufficiente contenuto di Pi reprime la colonizzazione delle radici (Paries & Gutjahr, 2023). La germinazione delle spore e la crescita dei funghi AM è indotta dallo strigolattone (Besserer et al., 2008) e dai flavonoidi (Akiyama et al., 2002), molecole che arricchiscono gli essudati prodotti dalle radici in condizioni di carenza di Pi. Una volta che il fungo prende contatto con la superficie radicale, forma una struttura di attacco, l'ifopodio, ed entra nella radice tra o attraverso le cellule dell'epidermide. Una volta che il fungo raggiunge la corteccia interna, inserisce protrusioni ifali nella cellula che si sviluppano in arbuscoli molto ramificati, circondati da una membrana della pianta peri-arbuscolare (PAM), in cui vengono scambiati i nutrienti tra i simbionti (Paries & Gutjahr, 2023). Una volta stabilita la simbiosi, la via di

assorbimento del Pi cambia da diretta, alla via di assorbimento micorrizica. In parallelo si ha una diminuzione dell'espressione dei geni che codificano per i trasportatori diretti dell'assorbimento di fosfato e all'attivazione dei geni dei trasportatori del Pi espressi nelle cellule contenenti gli arbuscoli (Yang et al., 2012). Una serie di geni indotti dall'AM e specificatamente espressi in cellule contenenti arbuscoli contengono elementi P1BS all'interno delle loro sequenze regolatorie (Lota et al., 2013). Infatti recentemente è stato scoperto il legame tra la segnalazione del PSR e lo sviluppo della simbiosi AM (Das et al., 2022). Il sistema di PSR, oltre al ruolo nella simbiosi AM, svolge una funzione anche nell'interazione tra funghi e piante che non sono capaci di stabilire simbiosi AM. Questo è quello che succede tra il fungo *Colletotrichum tofieldia* e *Arabidopsis thaliana*, una pianta incapace di fare simbiosi AM. Mediante il trasferimento di Pi alla pianta, promuove la crescita di quest'ultima, in condizioni di carenza di Pi. La promozione della crescita richiede i maggiori regolatori del sistema PSR, PHR e PHR1-LIKE (PHL1; Hiruma et al., 2016).

1.4 Il metaboloma e la sua composizione

Lo studio della composizione chimica della pianta è sempre stato di grande interesse per le ricerche biologiche. Questo perché, in parte, i fenotipi biochimici riflettono molto bene lo stadio di sviluppo della pianta e la sua interazione con l'ambiente (Carreno-Quintero et al., 2015). Le piante sintetizzano centinaia di migliaia di metaboliti che sono, sia i prodotti, sia gli intermediari del metabolismo, con numerose funzioni come segnalazione, effetti inibitori sugli enzimi, difesa, cofattori di enzimi e protezione della pianta contro patogeni e malattie. I metaboliti della pianta si dividono concettualmente in due categorie: metaboliti primari e secondari. I metaboliti primari sono differenti tipologie di composti organici che servono alle funzioni di sviluppo e crescita, sintesi di ormoni e proteine, fotosintesi e respirazione (Adetunji et al., 2021). Dato che sono fondamentali per il corretto sviluppo e crescita, i cambiamenti evolutivi dei metaboliti primari sono limitati e la loro regolazione è strettamente controllata (Carreno-

Quintero et al., 2015). Le 4 grandi famiglie di metaboliti primari sono carboidrati, aminoacidi e proteine, lipidi, nucleotidi e acidi nucleici. I metaboliti secondari, invece, non sono coinvolti nelle funzioni di crescita e sviluppo della pianta ma svolgono funzioni che riguarda l'interazione con l'ambientale, per questo motivo presentano una grande variabilità. La selezione naturale, che è molto forte per i metaboliti primari essenziali e meno stringente per i secondari, potrebbe aver modellato la composizione biochimica della pianta. I metaboliti secondari, sulla base della loro origine biosintetica, si dividono principalmente in 5 gruppi: polichetidi, isoprenoidi, alcaloidi, fenilpropanoidi e flavonoidi. Questi composti hanno diversi ruoli come quelli coinvolti nella risposta a stress biotici e abiotici o regolazione ormonale (Adetunji et al., 2021).

Il controllo genetico e dello sviluppo della pianta e la loro interazione con l'ambiente forniscono il prodotto finale del metabolismo al quale ci riferiamo con il termine metaboloma (Kooke & Keurentjes, 2012). Quindi, capire la sua regolazione, permette una comprensione migliore delle vie metaboliche che controllano lo sviluppo della pianta. Esso è sottoposto ad un controllo multidimensionale il quale può essere di quattro tipologie. Per esempio, può esserci una regolazione temporale che può influenzare molto la composizione del metaboloma in quanto, variazioni temporali, si hanno sia in termini giornalieri che stagionali, portando la pianta a doversi adattare rapidamente e a volte in modo reversibile a questi cambiamenti. Può esserci una regolazione spaziale, in quanto l'accumulo di metaboliti può variare sia spazialmente, tra i vari stadi di sviluppo, oppure essere specifica di determinati organi, tessuti o specifiche tipologie cellulari. La terza è una regolazione ambientale perché alcuni stimoli ambientali come la luce, la disponibilità di nutrienti, la temperatura o gli stress biotici e abiotici, causano una flessibilità del contenuto metabolico. Questo permette di adattarsi a condizioni ambientali locali. Inoltre, alcuni metaboliti, hanno la funzione di messaggeri interni o esterni, consentendo una comunicazione interattiva con l'ambiente. Infine, possiamo avere una regolazione genetica dato che, le vie di biosintesi dei metaboliti, sono sotto il controllo del genoma della

pianta e la sua interazione con l'ambiente può causare profili metabolici localmente adattati (Figura 4; Kooke & Keurentjes, 2012).

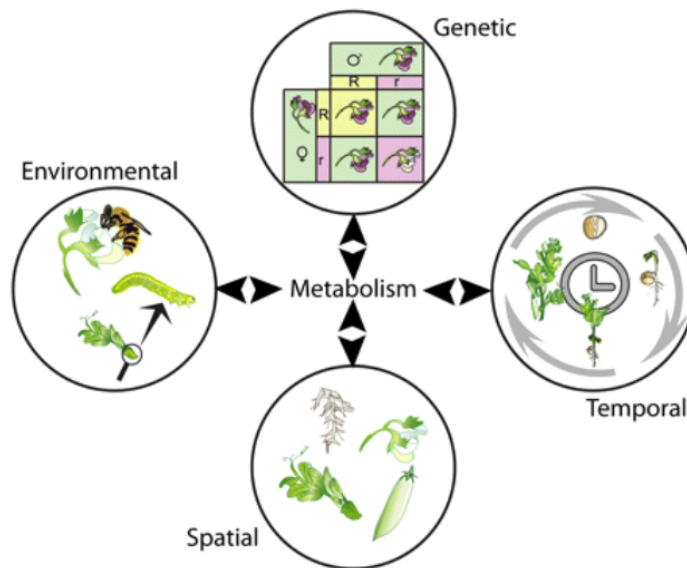


Figura 4: Il controllo multidimensionale alla quale è sottoposto il metabolismo. La loro interazione determina il profilo quantitativo e qualitativo del metaboloma (Kooke & Keurentjes, 2012).

Il metaboloma, essendo influenzato e controllato sotto un punto di vista multidimensionale, può variare tra organi, individui, popolazioni e specie. Quindi comprende i processi fisiologici che agiscono per massimizzare la fitness sia nel corso della vita di un individuo che tra le generazioni. Per questo, comprendendo la composizione, l'abbondanza e l'interazione tra migliaia di metaboliti, si può avere una misura diretta e multifunzionale dei meccanismi molecolari attraverso i quali i processi ecologici ed evolutivi modellano il funzionamento della pianta. Ne segue che, il metaboloma stesso, è un vasto archivio di caratteristiche funzionali (Walker et al., 2022). Per questo, considerare il metaboloma probabilmente migliorerà la capacità dei tratti funzionali nello spiegare i meccanismi alla base del funzionamento delle piante e degli ecosistemi. Ad esempio, è noto che l'attacco di patogeni o insetti erbivori, porta ad aumento della produzione di composti fenolici, alcaloidi e terpenoidi in molte specie di piante (Schuman & Baldwin, 2016).

1.5 Significato, costruzione e applicazione delle SynCom: è questo un futuro più sostenibile?

Per consorzio microbico intendiamo un raggruppamento, sia di specie diverse, sia della stessa specie ma di differenti ceppi, in cui i membri interagiscono tra di loro scambiandosi nutrienti, *cross-feeding*, o svolgendo comportamenti ingegnerizzati (McCarty & Ledesma-Amaro, 2019). Le comunità sintetiche microbiche (SynCom o SynComs) sono piccoli consorzi di microorganismi disegnati per imitare, in certa misura, la funzione e la struttura osservata del microbioma nelle condizioni naturali (De Souza et al., 2020). La logica è quella di ridurre la complessità della comunità microbica, continuando a preservare alcune delle interazioni tra i microorganismi e la pianta che li ospitano, fornendo una serie di funzioni che non potrebbero essere raggiunte da un singolo microorganismo (Kaminsky et al., 2019). Uno dei maggiori vantaggi delle SynComs risiede nella possibilità di personalizzare questi consorzi, utilizzando concetti che provengono dai campi dell'ecologia e della genetica, con caratteristiche definite e prevedibili. Per questo motivo possono essere utilizzate anche nel campo agronomo, progettando comunità che presentano caratteristiche favorevoli a questo settore (McCarty & Ledesma-Amaro, 2019). Ad esempio, la personalizzazione delle SynComs potrebbe essere un buon approccio per capire le interazioni pianta-microbiota. Questo è il caso dello studio di Niu e colleghi su piante di mais in cui, la singola rimozione di ceppo di *Enterobacter cloacae*, ha permesso di smantellare una comunità microbica in grado di ridurre la gravità della sintomatologia della peronospora (Niu et al., 2017).

La composizione delle SynComs generalmente è molto simile, perché la presenza di alcuni ceppi risulta predominante. In una recente revisione in cui sono stati analizzati 30 articoli con un totale di 1393 batteri isolati, i tre phyla maggiormente presenti erano Proteobacteria, Actinobacteria e Firmicutes. Anche nel caso di analisi di piccole SynComs (10 membri di 33 generi) i phyla più presenti erano i tre sopra menzionati (Marín et al., 2021).

Una SynCom può essere costruita utilizzando sia un metodo *top-down* sia un metodo *bottom-up*. Il primo approccio si focalizza sulla definizione funzionale di una comunità per caratterizzarne in dettaglio la struttura e la dinamica. Il secondo metodo, invece, si concentra sull'identificazione di modelli e processi d'interazione comuni tra le specie (Shayantan et al., 2022). In ogni caso, per la costruzione di una SynCom, ci sono quattro punti chiave che vanno considerati: ingegnerizzare le varie interazioni interspecie ed intraspecie, la costruzione di dinamiche spaziotemporali, modellare e mantenere la robustezza funzionale dell'intera comunità e sviluppare misure di controllo della popolazione e di biocontenimento. Per quanto riguarda il primo punto, in natura gli organismi interagiscono in molti modi che variano dai comportamenti predatori o competitivi alle relazioni commensali o mutualistiche. Per questo motivo, capire come le funzioni possano essere suddivise in una popolazione microbica in comparti produttivi, per ottenere comportamenti funzionali a livello di popolazione, è importante per ricavare SynComs stabili (Johns et al., 2016). Ad esempio, in uno studio di Duran e colleghi hanno visto come in una grande SynCom (190 membri) vi è una dominanza di interazioni negative tra i regni (funghi, oomiceti e batteri), mentre, all'interno del regno, le relazioni positive erano più frequenti. Inoltre la presenza o l'assenza di alcuni gruppi (i.e. la comunità batterica) ha un impatto fondamentale nella crescita e nella salute della pianta (Durán et al., 2018). Comprendere le dinamiche spaziali e temporali di una comunità microbica è fondamentale in quanto, in natura, molti microorganismi esistono in strutture spazialmente definite come, ad esempio, in biofilm attaccati alla superficie (Johns et al., 2016). I ricercatori di uno studio del 2014 hanno ideato un approccio, chiamato COMETS, che rende possibile la simulazione della crescita microbica in uno spazio bidimensionale. È infatti stato capace di predire l'abbondanza, allo stato stazionario, di un consorzio di tre specie in un mezzo definito (Harcombe et al., 2014). Il mantenimento della robustezza della comunità è un punto importante per la stabilità a lungo termine delle SynCom. Questo perché, in ambienti aperti, i consorzi possono affrontare condizioni in cambiamento e l'esposizione a specie competitive (Johns et al., 2016). Inoltre andranno in

contro a cambiamenti nel corso del tempo dovuti a evoluzioni del genoma e trasferimento genico orizzontale (Niehus et al., 2015). Ad esempio, nel contesto del mantenimento della robustezza della comunità, in uno studio è stato visto come pochi ceppi di microorganismi, che chiamano “*hub*” microbici, sono fortemente interconnessi ed hanno molti effetti sulla comunità. Infatti hanno analizzato l’effetto di due “*hub*” microbici, *Albugo* e *Dioszegia*, nella fillosfera di *Arabidopsis*, e visto che *Albugo* ha un effetto sulla colonizzazione batterica epifitica ed endofitica, mentre *Dioszegia* ha fornito prove per l’interazione diretta dell’*hub* con i batteri della fillosfera (Agler et al., 2016). Infine, il rilascio di comunità microbiche ingegnerizzate nell’ambiente necessita un controllo preciso della crescita della popolazione. Inoltre, il biocontenimento di questi sistemi garantirà che funzioni ingegnerizzate non vengano rilasciate negli ecosistemi naturali e non li perturbino, producendo effetti negativi indesiderati (Johns et al., 2016). Un esempio può essere l’utilizzo di circuiti genetici *kill switch*, che consistono in sistemi artificiali in grado di causare la morte cellulare sotto determinate condizioni, che sono stati programmati per rispondere a diverse condizioni ambientali (Chan et al., 2016).

Tenendo in considerazione i metodi per una costruzione corretta di una SynCom, l’applicazione di consorzi microbici nel campo dell’agronomia è risultato essere un approccio promettente e sostenibile per migliorare la produzione (Shayantan et al., 2022). Ad esempio, l’inoculazione delle piante di mais con una Syncom proveniente dalla comunità microbica associata alla canna da zucchero, ha aumentato la biomassa rispetto alle piante non inoculate (Armanhi et al., 2018). La stessa SynCom ha anche aumentato la tolleranza alla siccità e ridotto la perdita di resa nel mais (Armanhi et al., 2022). Inoltre, le SynCom vengono utilizzate per lo studio delle interazioni tra i microorganismi e tra pianta e microorganismi, oppure, nel limitare l’attacco di patogeni.

Anche se risulta essere un metodo molto promettente per il miglioramento del campo agronomo, l’utilizzo delle SynCom risulta essere tutt’ora difficile. Il motivo risiede nel fatto che un consorzio microbico, per stabilirsi in modo

adeguato, deve competere con la comunità microbica già presente, colonizzare efficacemente e formare associazioni stabili con la pianta (De Souza et al., 2020). Inoltre, l'applicazione delle SynCom in ambiente naturale spesso è di scarsi risultati, per via della quantità di fattori diversi che entrano in gioco in questi ambienti (Shayantan et al., 2022). Anche considerate tutte queste problematiche, l'applicazione delle SynCom per la produzione di colture è ancora nella sua fase iniziale ed ha il potenziale per fornire una soluzione verso un'agricoltura sostenibile.

2. SCOPO DEL PROGETTO

In questo studio abbiamo cercato di investigare il ruolo dell'interazione tra i diversi genotipi di lattuga (*Lactuca sativa*) e un inoculo microbico nel modellare la risposta fisiologica, metabolica e nutrizionale della pianta.

Per cercare di analizzare questa interazione, ci siamo posti tre domande biologiche:

1) C'è variazione intraspecifica nella risposta nutrizionale delle piante di lattuga all'inoculo microbico?

2) Se sì, questa variabilità intraspecifica nella risposta è osservabile anche per lo stato fisiologico e morfologico della pianta?

3) Inoltre, quali sono le variabili che guidano la variazione intraspecifica nella risposta? È possibile identificare dei gruppi basati su questa risposta?

In aggiunta, si è scelto di utilizzare una piattaforma di fenotipizzazione per avere una comprensione più ampia della risposta delle piante all'inoculo microbico.

Sapendo che la diversità genetica gioca un ruolo fondamentale e, date le condizioni di carenza di fosfato in cui sono state cresciute le piante, provare a capire quali siano i meccanismi che sottostanno a questa risposta può essere importante ed avere implicazioni anche in campi al di fuori della biologia, come quello dell'agricoltura sostenibile.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Set up sperimentale

La coltura delle piante è stata effettuata interamente presso la serra dell'azienda LandLab S.r.l. (Quinto Vicentino, Vicenza) nel periodo compreso tra la fine di Settembre e la metà di Dicembre 2022. Qui, 128 genotipi di *Lactuca sativa* (Materiali Supplementari S1) sono stati coltivati in condizioni di carenza di fosfato per favorirne l'interazione con i microrganismi nel suolo. Nello specifico, le piante sono state fatte germinare per un mese in appositi vassoi e sono state fertirrigate con una soluzione commerciale di azoto, fosforo e potassio (NPK) 18:18:18. Trascorso questo periodo, 6 o 7 piante per genotipo sono state spostate in vaso (15 cm x 15 cm x 20 cm), contenente sabbia. A seguito del loro trasferimento, 3 o 4 repliche per genotipo sono state trattate con un inoculo microbico formulato dall'azienda Sacco Srl e composto da due funghi micorrizici arbuscolari (*Rhizophagus irregularis* e *Funneliformis mosseae*) e due batteri solubilizzatori del fosfato (*Bacillus simplex* e *Cryseobacterium idolitheticum*). L'inoculo risospeso in acqua è stato applicato nel suolo ad una concentrazione di 5 mg/pianta. Durante la crescita, tutte le piante sono state fertirrigate con una soluzione di N-P₂O₅-K₂O ad una concentrazione di 250 - 32,61 - 76,92 kg/h, due volte a settimana fino al momento del loro campionamento (Materiali Supplementari S2). Durante il periodo di crescita, alcuni parametri fenotipici e fisiologici delle piante sono stati misurati due volte al giorno attraverso una piattaforma di fenotipizzazione, il PlantEye (PlantEye F600, Phenospex, Heerlen, The Netherlands), in dotazione dell'azienda. Trascorso un mese e una settimana dal trapianto, radici e foglie sono state prima pesate e poi campionate in racked collection microtubes (QIAGEN 1.2mL PP Racked Collection Microtube 10x96, Qiagen, Hilden, Germania). Complessivamente, per ogni replica sono stati campionati 3 dischi fogliari in 3 foglie diverse (per un totale di 9 dischi per pianta) e un frammento di radice per ogni pianta trattata. Per ridurre il carico di campionamento, le radici di piante controllo sono state raccolte solo per alcuni genotipi elencati nei Materiali Supplementari S3. Infine, I dischi

fogliari sono stati liofilizzati al fine di conservarli per le analisi successive. Tutta la parte di set up sperimentale e campionamento è stata eseguita da Arianna Capparotto (studente Phd, Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova).

3.2 Landlab Phenotyping Platform (LLPhP)

Il LLPhP è la piattaforma di fenotipizzazione (PlantEye F500, Phenospex B.V., Heerlen, The Netherlands) in dotazione dell'azienda, che ci ha permesso di seguire la risposta morfologica e fisiologica delle piante in risposta all'inoculo microbico somministrato. Essa si basa sulla combinazione di immagini 3D con immagini multispettrali. In questo studio sono stati analizzati i seguenti parametri (Zieschank et al., 2023):

- Greenness/Green leaf index [senza unità di misura]: è il rapporto della riflettanza del verde (Green) rispetto a quella del rosso (Red) e del blu (Blue) (Equazione 1). È un indicatore degli effetti combinati della fisiologia fogliare e della struttura della chioma.

$$Eq. 1) Greenness = \frac{2 \times Green - Red - Blue}{Red + Green + Blue}$$

- Hue [°]: corrisponde al colore visibile dipendente dalla lunghezza d'onda della luce che viene riflessa; tiene conto di tutti e tre i colori misurati (Green, Red, Blue), indipendentemente dal valore di saturazione e luminosità. È un indicatore del livello di pigmenti fotosintetici e della concentrazione di nutrienti nelle foglie.
- Digital Biomass [cm³]: è la biomassa della pianta eretta. È un indicatore della produttività della pianta (Equazione 2).

$$Eq. 2) Digital Biomass = Height \times 3D \text{ leaf area}$$

- Height [mm]: corrisponde all'altezza media delle piante della comunità; va dal suolo alla media del 10% delle piante più alte. È un

indicatore di produttività della pianta, disponibilità di nutrienti, competizione per la luce e strategia di crescita.

- Height max [mm]: rappresenta il punto più alto della comunità che viene scansionato; va dal suolo al punto più alto delle piante e ha la stessa funzione del parametro Height.
- Leaf area [cm³]: è l'area fogliare tridimensionale, cioè l'area fogliare digitale corretta per l'inclinazione fogliare. È un indicatore del carico di calore, ritenzione idrica e scambi gassosi.
- Leaf area index [cm²/cm²]: corrisponde all'area fogliare per unità di dimensione del settore (Equazione 3). È correlato all'attività fotosintetica, alla respirazione e intercettazione delle precipitazioni.

$$Eq. 3) \text{ Leaf Area Index} = \frac{\text{Leaf Area}}{\text{Sector Size}}$$

- Leaf area projected [cm²]: è l'area fogliare bidimensionale, cioè la quantità di dimensione del settore coperto dalle foglie. È un indicatore dello sviluppo della pianta, della sua crescita e competizione.
- Leaf angle [°]: corrisponde all'angolo medio delle superfici delle foglie rispetto alla perpendicolare. È un indicatore della cattura della luce, della ritenzione idrica e delle strategie della pianta nell'affrontare i fattori abiotici.
- Leaf inclination [cm²/cm²]: esprime, in media, quanto le foglie sono erette. Ha la stessa funzione del Leaf angle.
- Light penetration depth [mm]: è il punto più profondo che il laser può raggiungere attraverso la chioma, e corrisponde alla distanza tra la media del 20% inferiore e del 10% superiore della profondità verticale del laser. È una misura della densità di vegetazione e quindi un indicatore della disponibilità di risorse e competizione che avviene sopra il terreno.
- Normalized Digital Vegetation Index (NDVI) [senza unità di misura]: è il rapporto tra la luce rossa riflessa (Red) e la luce nel vicino

infrarosso (NIR) (Equazione 4). È un indicatore del tipo di vegetazione e della produttività ma anche dei parametri di crescita come leaf area index e biomassa.

$$Eq. 4) NDVI = \frac{NIR - Red}{NIR + Red}$$

- Normalized Pigments Chlorophyll ratio Index (NPCl) [senza unità di misura]: è il rapporto tra i canali del blu (Blue) e del rosso (Red) (Equazione 5). È associato al contenuto di clorofilla della pianta e rappresenta quindi un indicatore dello stato fisiologico della stessa.

$$Eq. 5) NPCI = \frac{Red - Blue}{Red + Blue}$$

- Plant Senescence Reflectance Index (PSRI) [senza unità di misura]: è espresso come il rapporto tra i canali del rosso (Red) e del verde (Green) e il canale dell'infrarosso (NIR) (Equazione 6). È associato al contenuto di carotenoidi e clorofilla e rappresenta quindi un indicatore della senescenza fogliare.

$$Eq. 6) PSRI = \frac{Red - Green}{NIR}$$

3.3 Estrazione e quantificazione del fosfato solubile dai tessuti fogliari liofilizzati

Il primo passaggio del processo d'estrazione del fosfato è stato quello di misurare il peso dei dischi fogliari attraverso una bilancia ultra analitica (sensibilità = 0.01 mg) e scegliendo un intervallo di peso tra 0.25 mg e 0.80 mg. Successivamente i tessuti sono stati lisati utilizzando il TissueLyzer (Qiagen, Hilden, Germania) impostando lo strumento alle seguenti specifiche: 25 Hz x 20 secondi. In seguito il rack è stato ruotato sottosopra e ripetuta la procedura precedente al fine di omogenizzare la rottura. Successivamente i campioni sono stati portati a ebollizione in 1 ml

di acqua milliQ per favorire la completa rottura dei tessuti e il rilascio di tutto il fosfato vacuolare. Questo passaggio è stato effettuato in un bagnetto termostato a 90 °C per 1 ora. Trascorso questo tempo i campioni sono stati centrifugati (Eppendorf 5810R) a 4 °C per 20 minuti a 4000g, impostando il freno a 0 in modo da evitare la ri-sospensione del pellet.

Per il processo di quantificazione del fosfato è stato utilizzato un Phosphate Assay Kit (MAK308, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), basato su verde di malachite.

Il primo passaggio del processo è stata la preparazione degli standard. Per cominciare, sono stati preparati 1000 µL di soluzione Premix a 40 µM, mescolando 40 µL di standard del fosfato a 1 mM, fornita nel kit, con 960 µL di acqua milliQ. Attraverso successive diluizioni di questa soluzione di partenza, riportate in Tabella 1, sono stati ottenuti gli standard utilizzati per costruire la retta di taratura.

	Premix + Acqua	Vol Finale (µL)	Conc Fosfato (µM)	pmoles di fosfato in 50 µL
1	200 µL + 0 µL	200	40	2000
2	160 µL + 40 µL	200	32	1600
3	120 µL + 80 µL	200	24	1200
4	80 µL + 120 µL	200	16	800
5	60 µL + 140 µL	200	12	600
6	40 µL + 160 µL	200	8	400
7	20 µL + 180 µL	200	4	200
8	0 + 200 µL	200	0	0

Tabella 1: Tabella rappresentante le aliquote per la preparazione degli standard diluiti per la quantificazione del fosfato (da protocollo MAK308 Phosphate Assay Kit).

Rispetto al protocollo del MAK308 Phosphate Assay Kit, in questo studio sono state apportate alcune modifiche dei microlitri di campione e di standard utilizzati. Nello specifico ad ogni pozzetto della piastra per la lettura dell'assorbanza, sono stati aggiunti 16 μL di campione e 16 μL di standard, al contrario dei 50 μL consigliati nel protocollo. Ogni campione è stato analizzato in replica. Il passaggio successivo è stato quello di aggiungere 32 μL di Malachite Green Reagent, invece dei 100 μL consigliati, ad ogni pozzetto. La piastra (Figura 5) è stata infine incubata per 30 minuti (al buio), prima di leggerne l'assorbanza a 620 nm utilizzando lo spettrofotometro Tecan (Tecan Trading AG, Männedorf, Svizzera). La concentrazione di fosfato (Pi) è stata ottenuta mediante la formula inversa dell'equazione della regressione lineare (Equazione 7).

$$\text{Eq. 7) Concentrazione Pi } \left(\frac{\text{nmol}}{\text{ml}} \right) = \frac{y - b}{m}$$

In cui y rappresenta l'assorbanza calcolata come la media tra le 2 repliche, b rappresenta l'intercetta di y mentre m è la pendenza della retta

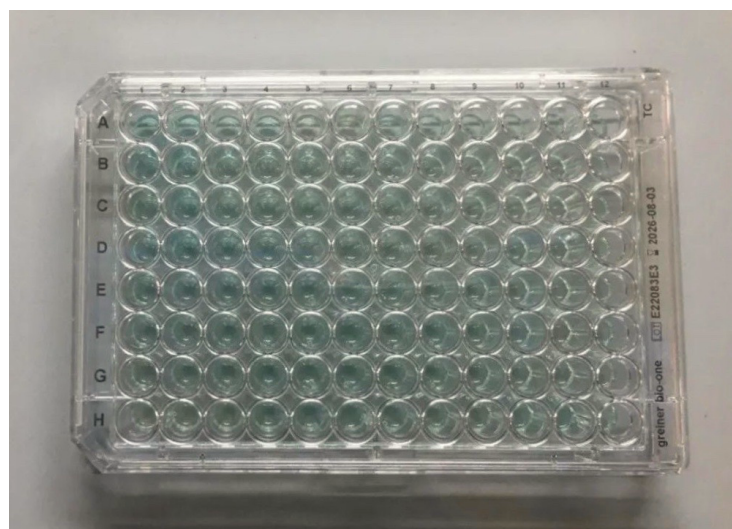


Fig. 5: Foto di una piastra d'assorbanza per la lettura del fosfato dopo l'applicazione del reagente e incubazione.

3.4 Estrazione e quantificazione dei metaboliti dai tessuti fogliari liofilizzati

La quantificazione dei metaboliti è stata eseguita secondo il protocollo Rainbow (López-Hidalgo et al., 2021). Delle molecole descritte, in questo studio sono stati estratti e quantificati i seguenti metaboliti: pigmenti fotosintetici (PHP), aminoacidi liberi (FAA), gli zuccheri solubili totali (TSS) e la quantità di amido (STA). Dei 128 genotipi di *Lactuca sativa* iniziali, per questa analisi sono stati analizzati 28 genotipi (Materiali supplementari S4).

Nel dettaglio, più di 1.30 mg di tessuto fogliare liofilizzato è stato prima pesato, riposto in racked 96-collection microtubes e poi lisato mediante l'utilizzo del TissueLyzer impostato a 25 Hz per 20 secondi. Il rack è stato poi capovolto sottosopra e l'operazione è stata ripetuta. Ad ogni campione sono stati aggiunti 600 µL di etanolo 80% e successivamente i racks sono stati vortexati e centrifugati (Eppendorf Centrifuge 5810R) per 20 minuti a 4000 g a 4 °C. In seguito sono stati prelevati 200 µL di surnatante e diluiti con 200 µL di etanolo 80%; questi sono stati aggiunti ad un nuovo rack che è stato chiamato surnatante 1 (S1). La soluzione ottenuta è stata utilizzata per la determinazione dei pigmenti fotosintetici (PHP). I rimanenti 300 µL sono stati trasferiti in un nuovo rack, denominato surnatante 2 (S2), ed utilizzato per la quantificazione degli aminoacidi liberi (FAA) e dello zucchero solubile totale (TSS). Alla soluzione iniziale rimanente, contenente il pellet, sono stati aggiunti 600 µL di acido perclorico (30% V/V; Acros Organics, Geel, Belgio). Il tutto è stato prima mescolato e poi incubato in bagnetto termostato a 60° per 1 ora. Trascorso questo tempo, il rack è stato centrifugato a 4000 g per 20 minuti a 4 °C. Infine, 400 µL di surnatante sono stati trasferiti in un nuovo rack, che è stato chiamato pellet 1 (P1), utilizzato per la quantificazione dell'amido (STA).

3.4.1 Quantificazione dei Pigmenti Fotosintetici (PHP)

Per la quantificazione dei pigmenti fotosintetici sono stati prelevati 100 µL di soluzione S1 e posti in una piastra per la lettura dell'assorbanza in replica. È stato utilizzato lo spettrofotometro Tecan per il saggio di

spettrofotometria (Figura 6). L'assorbanza è stata letta alle lunghezze d'onda di: 470 nm, 649 nm e 664 nm. Le concentrazioni dei pigmenti fotosintetici sono state determinate utilizzando le Equazioni 9, 10 e 11:

$$Eq. 9) \text{ Clorofilla } a \text{ (Chla)} \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = (13.36 \times A_{664}) - (5.19 \times A_{649})$$

$$Eq. 10) \text{ Clorofilla } b \text{ (Chlb)} \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = (27.43 \times A_{649}) - (8.12 \times A_{664})$$

$$Eq. 11) \text{ Carotenoidi} \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = \frac{(1000 \times A_{470}) - (2.13 \times ChLA) - (97.63 \times Chlb)}{209}$$



Fig. 6: Foto di una piastra utilizzata per la lettura dell'assorbanza dei PHP.

3.4.2 Quantificazione degli Aminoacidi Liberi (FAA)

Per la quantificazione dei FAA sono stati prelevati dal rack S2 50 μ L di soluzione ed inseriti in una piastra da PCR. Ogni campione è stato analizzato in replica. In seguito sono stati aggiunti 25 μ L di Ninhydrin Reagent e il tutto è stato incubato a 98°C per 10 minuti in un termociclatore. Al suo termine, sono stati addizionati 125 μ L di etanolo al 95% ad ogni campione. 100 μ L di campione e di standard sono infine stati trasferiti in una piastra per la lettura dell'assorbanza, che è stata letta alle lunghezze d'onda di 440 nm, 520 nm, 570 nm mediante lo spettrofotometro Tecan (Figura 7)

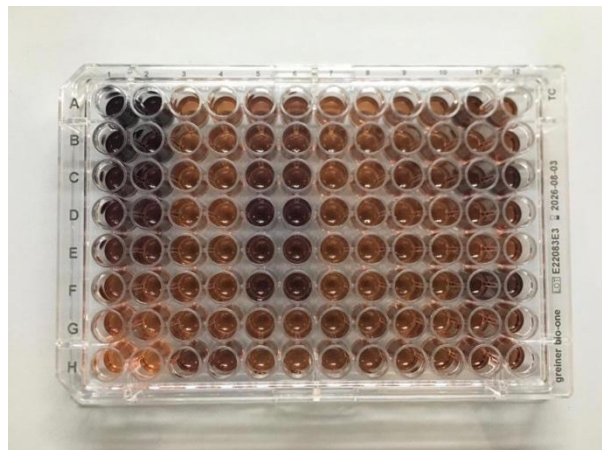


Fig. 7: Foto di una piastra utilizzata per la lettura dell'assorbanza degli FAA.

Gli standard sono stati preparati a partire da uno stock di 500 μL L-Glicina e L-prolina alla concentrazione di 1 mg/ml. A partire da questa soluzione, sono state effettuate le diluizioni, riportate in Tabella 2, per ottenere le concentrazioni di standard con cui costruire la retta di taratura.

Nell'esperimento, sono stati utilizzati 50 μL di standard sottoposti allo stesso trattamento dei campioni descritto sopra nel testo. La concentrazione dei FAA è stata calcolata utilizzando la formula inversa dell'equazione della regressione lineare (Equazione 7).

	Stock Standard	EtOH 88%	Conc. mg/ μL
1	43.75 μL	131.25 μL	0.25
2	32.815 μL	142.185 μL	0.1875
3	21.88 μL	153.12 μL	0.125
4	16.41 μL	158.59 μL	0.09375
5	10.94 μL	164.06 μL	0.09375
6	5.46 μL	169.54 μL	0.0625
7	2.73 μL	172.27 μL	0.03125
8	0	175 μL	0

Tabella 2: Tabella rappresentante le aliquote per la preparazione degli standard diluiti usati per la quantificazione dei FAA (aliquote e concentrazioni modificate dal protocollo Rainbow; López-Hidalgo et al., 2021).

3.4.3 Quantificazione degli zuccheri solubili totali (TSS)

Per la quantificazione dei TSS sono stati prelevati 10 μL di campione dal rack S2 e messi in una piastra da PCR. Ogni campione è stato analizzato in replica. In seguito sono stati aggiunti 150 μL di reagente all'antrone (Merck KGaA, Darmstadt, Germania). I campioni sono stati incubati a 98 °C per 10 minuti in un termociclatore lasciando il coperchio dello strumento aperto per evitare problemi di circolo d'aria. Successivamente sono stati trasferiti 100 μL di campione e di standard in una piastra per la lettura dell'assorbanza (Figura 8), effettuata a 625 nm utilizzando lo spettrofotometro Tecan.

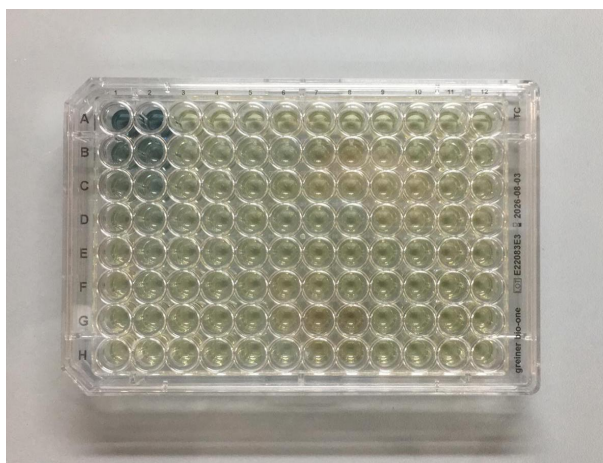


Fig. 8: Foto di una piastra utilizzata per la lettura dell'assorbanza dei TSS.

Gli standard sono stati preparati a partire da uno stock di D-Glucosio in etanolo 80% alla concentrazione di 1 mg/ml. A partire da questa soluzione, attraverso una serie di diluizioni riportate in Tabella 3, sono stati ottenuti gli standard per poter creare la retta di taratura. Il volume di standard utilizzato e il loro trattamento è stato lo stesso dei campioni e descritto sopra nel testo. La concentrazione di TSS è stata calcolata utilizzando la formula inversa dell'equazione della regressione lineare (Equazione 7).

	Stock Standard	EtOH 80%	Conc. mg/ μ L
1	100 μ L	0	1
2	50 μ L	50 μ L	0.5
3	25 μ L	75 μ L	0.25
4	12.5 μ L	87.5 μ L	0.125
5	6.25 μ L	93.75 μ L	0.0625
6	3.13 μ L	96.88 μ L	0.03125
7	1.56 μ L	98.44 μ L	0.015625
8	0	100 μ L	0

Tabella 3: Tabella rappresentante le aliquote per la preparazione degli standard diluiti usati per la quantificazione dei TSS (aliquote e concentrazioni modificate dal protocollo Rainbow; López-Hidalgo et al., 2021).

3.4.4 Quantificazione dell'amido (STA)

Per la quantificazione dell'amido sono stati prelevati 15 μ L dal rack P1 e messi in una piastra da PCR; in seguito sono stati aggiunti 150 μ L di reagente all'antrone. Successivamente i campioni sono stati incubati a 98 °C per 10 minuti in un termociclatore e, al termine di questo processo, 100 μ L sono stati trasferiti in piastre per la lettura dell'assorbanza. La lettura è avvenuta con lo spettrofotometro Tecan alla lunghezza d'onda di 625 nm (Figura 9)

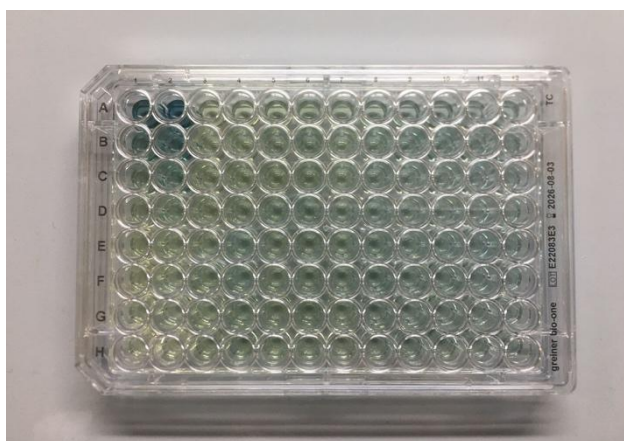


Fig. 9: Foto di una piastra utilizzata per la lettura dell'assorbanza dei STA.

Gli standard per la quantificazione dell'amido sono stati preparati partendo da uno stock di D-Glucosio alla concentrazione di 1 mg/ml in acido perclorico 30%. Lo stock così ottenuto è stato diluito seguendo la Tabella 4. La concentrazione degli STA è stata calcolata utilizzando la formula inversa dell'equazione della regressione lineare (Equazione 7).

	Stock Standard	30% acido percolorico	Conc. mg/μL
1	150 μL	0	1
2	75 μL	75 μL	0.5
3	37.5 μL	112.5 μL	0.25
4	18.75 μL	131.25 μL	0.125
5	9.38 μL	140.63 μL	0.0625
6	4.69 μL	145.31 μL	0.03125
7	2.34 μL	147.66 μL	0.015625
8	0	150 μL	0

Tabella 3: Tabella rappresentante le aliquote per la preparazione degli standard diluiti usati per la quantificazione degli STA (aliquote e concentrazioni modificate dal protocollo Rainbow; López-Hidalgo et al., 2021).

3.5 Estrazione del DNA da radice

Per poter studiare la comunità microbica associata alla radice di *Lactuca sativa*, è stata effettuata l'estrazione del DNA da questo tessuto attraverso il metodo CTAB. Nel dettaglio, circa 3.5 mg di campione sono stati pesati e successivamente lisati utilizzando il TissueLyzer. Il materiale è stato poi risospeso nel buffer CTAB, prima di essere incubato per 1 ora a 60°C. In seguito, per eliminare i residui di pellet e rimuovere proteine e carboidrati è stata aggiunta una soluzione composta da fenolo, cloroformio e alcol isoamilico alle proporzioni di 25:24:1, rispettivamente. I campioni sono stati vortexati 15 minuti e centrifugati per poter, infine, recuperare il surnatante. Questo passaggio è stato ripetuto due volte al fine di migliorare

la pulizia dei campioni. Terminata questa procedura, è stato aggiunto isopropanolo e i campioni sono stati incubati a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 2 ore per favorire la completa precipitazione del DNA. Attraverso una serie di lavaggi in etanolo, il DNA è stato ulteriormente purificato e risospeso in acqua milliq RNAsi/DNAsi free. Infine, la concentrazione del DNA è stata determinata al qubit, mentre i rapporti 260/230 e 260/280 sono stati misurati al nanodrop.

3.6 Analisi Statistica

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software di analisi RStudio (versione 4.4.2).

3.6.1 Analisi del fosfato fogliare

I genotipi sono prima stati raggruppati in piante trattate (T) e piante mock (K) e, per ogni gruppo, è stata calcolata la mediana delle concentrazioni di fosfato. La normalità dei dati e l'omogeneità delle varianze sono stati testati con il Shapiro-Wilk e il Levene test, rispettivamente. È stato utilizzato il Kruskal-Wallis test per valutare la significatività nel contenuto di fosfato tra piante trattate e mock. Sulle stesse variabili è stata eseguita la comparazione a coppie mediante il Dunn-fdr post Hoc test. È stata analizzata la correlazione tra contenuto di fosfato nella foglia, tra piante trattate e non, con la biomassa fogliare e radicale e con il peso di un disco fogliare mediante il pacchetto ggpubr con coefficiente di correlazione Pearson. Per la visualizzazione grafica delle differenze nel contenuto di fosfato tra tutti i genotipi trattati e mock, sono stati utilizzati i pacchetti ggplot2 e ggpubr.

3.6.2 Analisi statistica della risposta fisiologica e morfologica delle piante all'inoculo microbico

Per visualizzare la risposta dei vari genotipi di lattuga all'inoculo, è stata creata una heatmap mediante il pacchetto pheatmap utilizzando il rapporto tra le mediane dei parametri analizzati, come riportato nell'equazione 8. Questi dati sono prima stati normalizzati con la funzione

“scale” in R. Per l’analisi delle componenti principali (PCA) è stata utilizzata la funzione `prcomp`, già presente nel software e implementato la visualizzazione con il pacchetto `factoextra`.

$$\text{Eq. 8)} \frac{\text{Mediana Parametro } x \text{ Pianta Trattata}}{\text{Mediana Parametro } x \text{ Pianta Non Trattata}}$$

Per parametro *x* si intende uno dei parametri analizzati in questo studio

3.6.3 Analisi dei metaboliti

Per visualizzare la correlazione dei dati è stato utilizzato il pacchetto `corrplot`. È stata testata la normalità delle varianze mediante il Shapiro-Wilk test. L’omogeneità delle varianze è stata analizzata mediante la funzione `plot` del software. Per il contenuto di clorofilla è stato utilizzato il test ANOVA per le differenze nelle medie tra clorofilla, trattamento e genotipo. La comparazione a coppie è stata effettuata con il test di Tukey HSD. Per gli FAA, TSS e STA è stato applicato il Kruskal-Wallis test per le differenze tra le mediane tra i metaboliti sopra riportati, trattamento e genotipo. La comparazione a coppie è stata effettuata con il test di Dunn. Le rappresentazioni grafiche per tutti i metaboliti con genotipo e trattamento sono state fatte mediante i pacchetti `ggplot2` e `ggpubr`. L’analisi delle componenti principali è stata eseguita come riportato in 4.6.1. È stata visualizzata la correlazione tra le componenti della PCA e le variabili mediante il pacchetto `corrplot`.

3.7 Analisi GWAS

Da un recente studio pubblicato su *Nature Genetics* (Wei et al., 2021), sono stati ricavati gli SNPs riguardanti i 128 genotipi di *Lactuca sativa* analizzati. Questi SNPs sono stati utilizzati per determinare la risposta fenotipica, morfologica e nutrizionale della pianta all’inoculo microbico applicato nel suolo. La risposta è stata espressa come il rapporto tra le mediane delle piante trattate e controllo, raggruppate per genotipo.

L'analisi è stata inizialmente effettuata per due parametri: il fosfato solubile e la biomassa fogliare. La prima parte dell'analisi è stata svolta su visual studio code in Ubuntu, basandosi sui pacchetti Python bedtools, plink2 e gemma, mentre la parte di creazione dell'immagine finale su R studio con la library "tidyverse" e il pacchetto "wesanderson".

4. RISULTATI

4.1 Risposta nutrizionale delle piante all'inoculo microbico

L'effetto dell'inoculo microbico sulla concentrazione di fosfato solubile (Pi) nella foglia di lattuga (Figura 10 a-b) è stato prima analizzato sulla popolazione totale di piante. In totale sono stati analizzati 894 dischi fogliari. Complessivamente, non è stata rilevata una differenza significativa ($p\text{-value} = 0.72$) sulla concentrazione di fosfato solubile nella foglia tra piante controllo (Mock, K) e piante trattate (T) (Figura 10a), nonostante la loro crescita sia avvenuta in condizioni di carenza di fosfato. Tuttavia, osservando l'andamento specifico di ogni genotipo, in Figura 10b, è possibile osservare come l'accumulo di Pi solubile nelle foglie sia strettamente dipendente dal genotipo. In circa metà popolazione, infatti, l'inoculo ha avuto un effetto positivo sulle piante; viceversa, nell'altra metà la concentrazione di Pi fogliare è diminuita in risposta all'inoculo. Questo risultato evidenzia l'importanza della variabilità genetica nel determinare una diversa risposta nutrizionale della pianta alla comunità sintetica somministrata nel suolo.

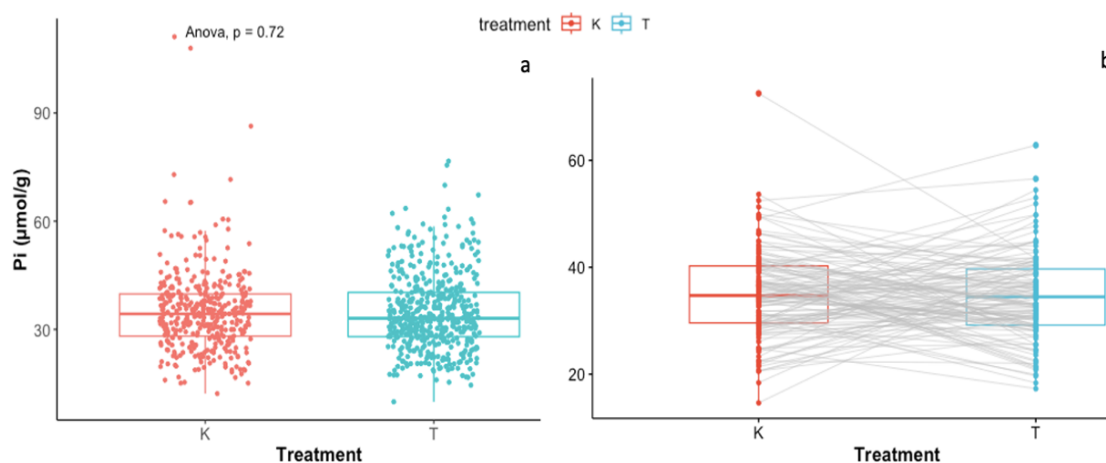


Fig. 10: (a-b) Effetto dell'inoculo sulla concentrazione di fosfato solubile fogliare. Ogni punto rappresenta un genotipo. K indica le piante non trattate con l'inoculo (mock, in rosso) mentre T indica le piante che sono state trattate con inoculo (in blu).

La variabilità con cui genotipi diversi hanno risposto all'inoculo microbico è ulteriormente rappresentata in Figura 11. Qui, sono rappresentati i genotipi che hanno risposto in maniera significativa. Dei 128 genotipi di partenza, hanno mostrato una risposta significativa i seguenti: 115, 136, 28, 45, 69, 122, 53, 57, 59 (dal 115 al 69 p -value = 0.0495; dal 122 al 59 p -value = 0.0338). Inoltre, possiamo osservare come la risposta all'inoculo varia tra questi genotipi: alcuni rispondono positivamente, dimostrando un aumento significativo della concentrazione di Pi nella foglia (genotipi 122, 28, 57 e 69) mentre gli altri hanno una risposta negativa e, quindi, una diminuzione significativa della concentrazione di Pi fogliare (genotipi 115, 136, 45, 53, 59).

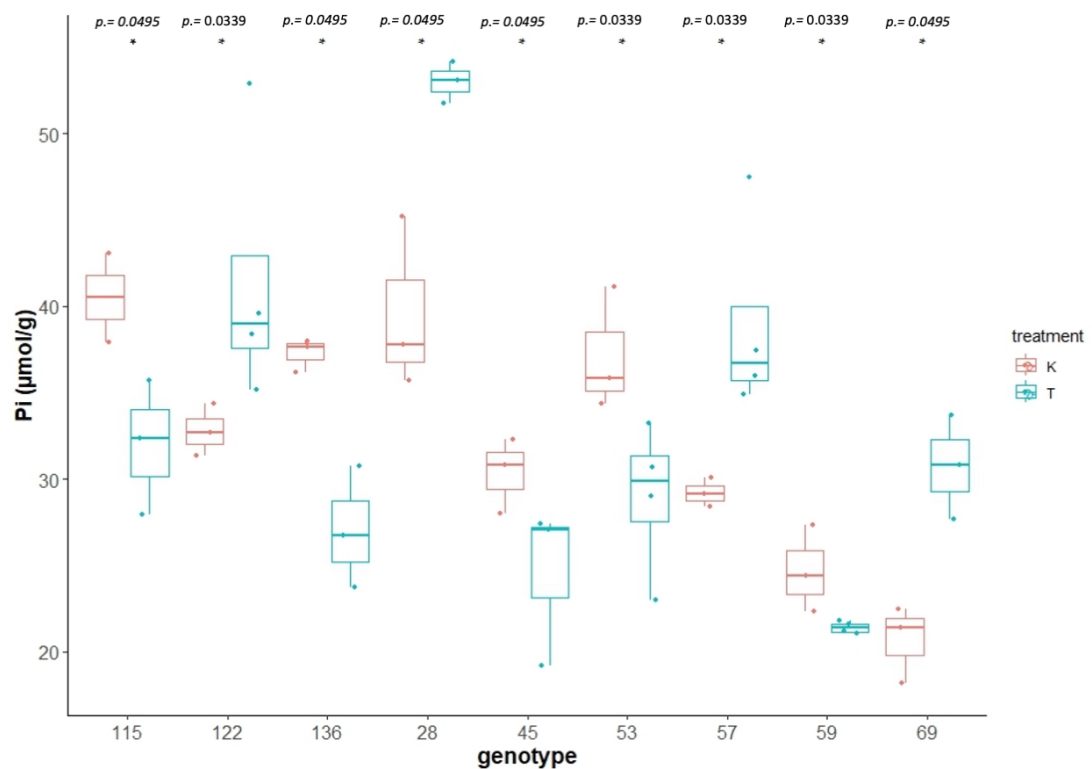


Fig. 11: Genotipi che hanno avuto una risposta significativa all'inoculo. Nell'asse x sono rappresentati i genotipi, divisi tra trattati (T, in blu) e non trattati (K, in rosso). Nell'asse y è espressa la concentrazione di fosfato (Pi) nella foglia. Gli asterischi raffigurati in alto denotano una differenza significativa.

Nella Figura 12 sono mostrati i genotipi che hanno avuto una risposta all'inoculo vicina alla significatività ($p\text{-value} = 0.0770$). I genotipi sono: 102, 103, 106, 118, 124, 128, 129, 38, 40, 85, 95. Anche in questo caso la risposta risulta essere sia positiva che negativa, come nel caso riportato in Figura 11.

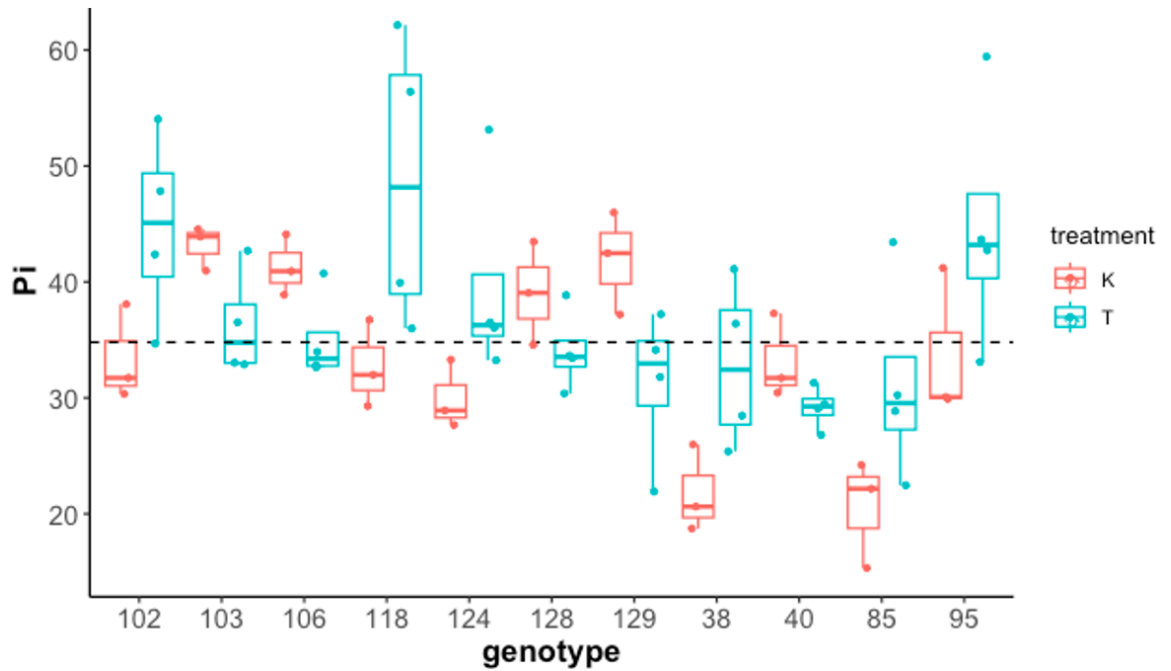


Fig. 12: Genotipi che hanno avuto una risposta all'inoculo vicina alla significatività ($p\text{-value} = 0.0770$). Nell'asse x vengono mostrati i genotipi mentre nell'asse y la concentrazione di fosfato (Pi) nella foglia, espresso in $\mu\text{mol/g}$. K rappresenta i genotipi non trattati con inoculo (rosso) mentre T rappresenta i genotipi che sono stati trattati con l'inoculo (blu).

Per cercare di capire se, foglie o radici con biomassa più grande, presentano concentrazioni maggiori o minori di Pi nelle foglie, è stata analizzata la correlazione tra fosfato nelle foglie e biomassa fogliare e radicale. Questo perché ci si aspetta che piante con biomasse maggiori accumulino meno fosfato o che sia diluito nei tessuti, rappresentando quindi uno stress nutrizionale. Nel caso della biomassa fogliare, non è stata riscontrata una differenza significativa nell'accumulo di fosfato nelle foglie sia per le piante trattate che per il controllo (Figura 13). Per le piante non trattate l'indice di correlazione Pearson R è uguale a -0.072 e risulta non significativo ($p\text{-value} = 0.16$). Per le piante trattate invece è uguale -0.009 e anch'esso non è significativo ($p\text{-value} = 0.84$). Si può osservare una

diminuzione del Pi quando la biomassa della foglia cresce e viceversa. Questo effetto risulta essere maggiore per le piante Mock rispetto alle trattate, ma la correlazione non è significativa e l'indice R è molto vicino allo zero.

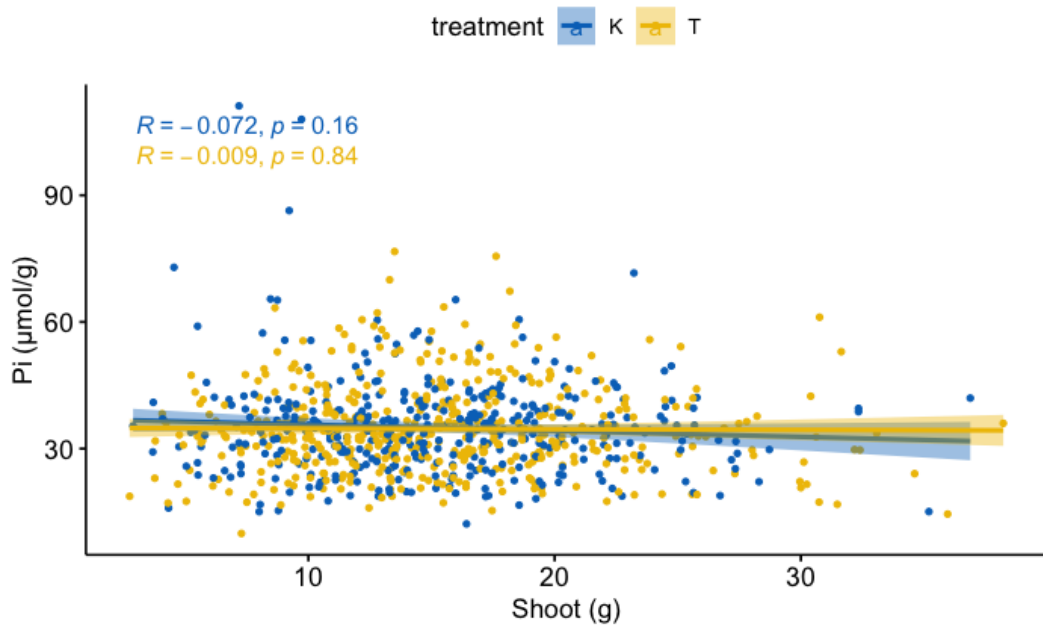


Fig. 13: Correlazione tra concentrazione di fosfato (Pi) fogliare e la sua biomassa, espressa in grammi (g). T indica le piante trattate con inoculo (giallo) mentre K indica le piante non trattate con inoculo (blu). In alto viene mostrato l'indice di correlazione e il rispettivo *p-value* per trattati (giallo) e non trattati (blu)

Invece, osservando la correlazione tra Pi e biomassa radicale (Figura 14) è stata riscontrata una correlazione negativa e significativa per le piante non trattate. Infatti, per le piante Mock l'indice R è di -0.12 e la correlazione risulta significativa (*p-value* = 0.017). Questo ci sta ad indicare che, nel caso delle piante controllo, piante con un apparato radicale più esteso potrebbero aver raggiunto una condizione per la quale il fosfato si diluisce maggiormente nei tessuti, raggiungendo quindi una carenza fisiologica del nutriente. Al contrario, per le piante trattate vi è l'indice di correlazione Pearson R di -0.057, ma la correlazione non è significativa (*p-value* = 0.21), rendendo quindi possibile intuire che la condizione di carenza di fosfato (e

quindi di forte correlazione negativa tra biomassa e concentrazione di fosfato) non fosse stata ancora raggiunta.

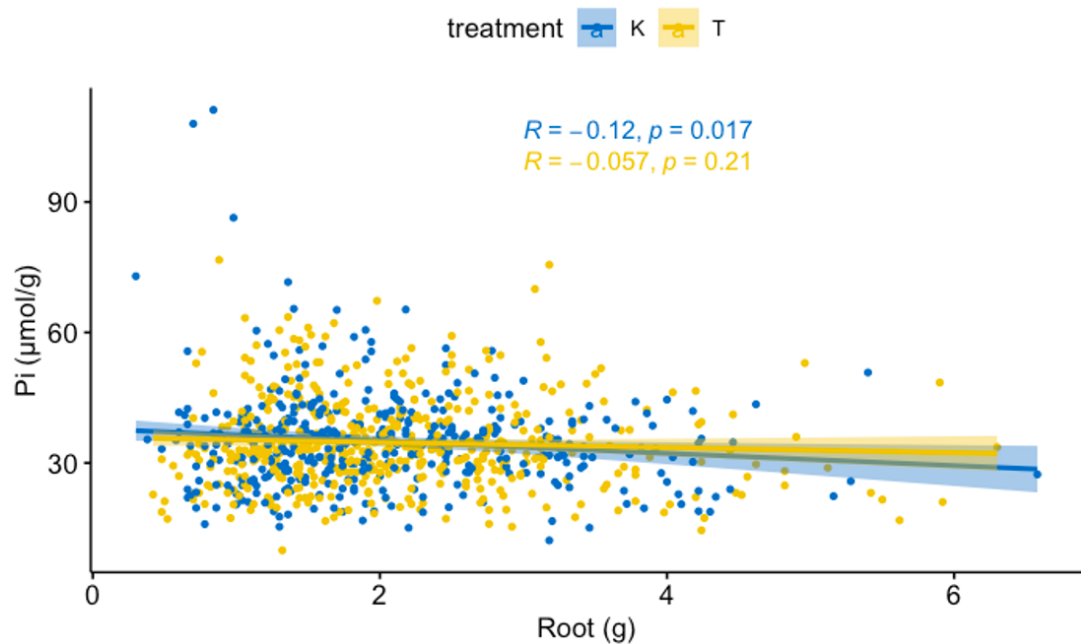


Fig. 14: Correlazione tra concentrazione di fosfato (Pi) nella foglia e la biomassa radicale, espressa in grammi (g). T indica le piante trattate con inoculo (giallo) mentre K indica le piante non trattate con inoculo (blu). In alto viene mostrato l'indice di correlazione R e il rispettivo *p-value* per piante trattate (giallo) e non trattate (blu).

4.2 Valutazione della risposta morfologica e fisiologica delle piante all'inoculo

Considerando tutti i parametri raccolti grazie alla piattaforma di *phenotyping* delle piante di lattuga, l'*heatmap* (Figura 15) mostra la variabilità fenotipica dei genotipi delle piante analizzate nella risposta all'inoculo microbico. Si possono osservare due raggruppamenti principali, a seconda che vengano considerati i genotipi oppure i parametri fenotipici. Nello specifico, se si valutano i parametri fenotipici, la risposta si divide in due gruppi: uno in cui troviamo principalmente parametri riguardanti la biomassa della pianta come Digital Biomass, Shoot o Root. L'altro gruppo, invece, è costituito principalmente da parametri che considerano lo spettro della luce riflessa dalla pianta come NPCI, Grenness, Hue o PSRI, oppure, parametri come il Pi o l'altezza della pianta. Nel caso in cui vengano

considerati i tre gruppi che si formano quando vengono presi in esame i genotipi, possiamo notare come questi non dipendono dalla varietà di lattuga analizzata. Questo perché, nella colonna che rappresenta la varietà, quest'ultime sono distribuite casualmente in tutti e tre i gruppi che si sono formati. In generale possiamo notare come la correlazione tra i genotipi e i vari parametri fenotipici sia molto diversificata a seconda del genotipo che si prende in esame. Essendo la risposta così differenziata, e tenendo presente quanto visto nel paragrafo precedente, possiamo notare anche in questo caso una risposta all'inoculo positiva o negativa a seconda del genotipo in questione, a dimostrazione di come la risposta morfologica e fisiologica della pianta dipenda dalla diversità genetica nelle piante di *Lactuca sativa*.

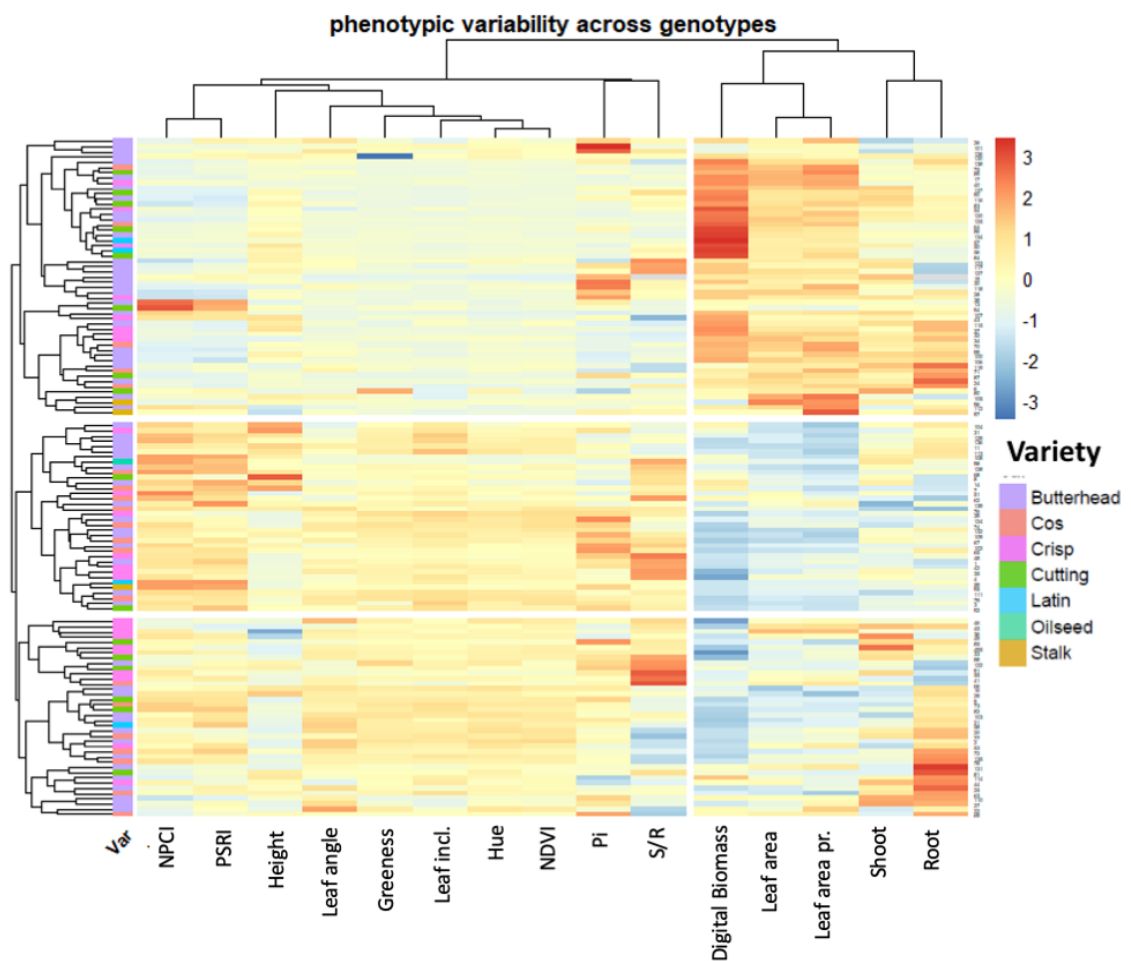


Fig. 15: Heatmap raffigurante la variabilità fenotipica della pianta nella risposta all'inoculo nei diversi genotipi. Ogni colonna rappresenta sia i parametri fenotipici analizzati mediante la piattaforma di fenotipizzazione (LLPhP), sia parametri che non provengono dalla LLPhP (Root, Shoot, S/R, Pi).

Ogni riga rappresenta uno dei 128 genotipi di *Lactuca sativa* presi in esame. Il rosso indica una risposta positiva all'inoculo mentre il blu una risposta negativa. I parametri rappresentati sono la mediana del rapporto tra piante trattate con inoculo e quelle non trattate. Var, varietà; Pi, contenuto di fosfato solubile nella foglia; S/R, rapporto tra biomassa fogliare e radicale; Height, altezza della pianta; NPCI, Normalized Pigments Chlorophyll ratio Index; PSRI, Plant Senescence Reflectance Index; Leaf incl., Leaf inclination; NDVI, Normalized Digital Vegetation Index, Dig. Biom., Digital Biomass; Leaf area pr., Leaf area projected; Shoot, biomassa fogliare; Root, biomassa radicale.

4.3 Analisi GWAS

Per investigare in modo specifico la base genetica della variabilità osservata nei nostri dati, è stata condotta un'analisi GWAS utilizzando i Polimorfismi a Singolo Nucleotide (SNP). È stato analizzato il rapporto tra piante trattate e controllo rispetto a due parametri: il fosfato solubile e la biomassa fogliare. Sono stati scelti questi due parametri perché forniscono delle informazioni riguardo lo stato nutrizionale e fisiologico della pianta. Successivamente verranno condotte anche analisi GWAS per il resto dei parametri fenotipici. Per quanto riguarda il primo parametro (Figura 16) è stata individuata nel cromosoma 4 una SNP molto vicina alla significatività. Per quanto concerne il rapporto della biomassa fogliare (Figura 17) sono state individuate due SNP: una significativa nel cromosoma 3 ed una vicina alla significatività nel cromosoma 5. Entrambi i loci genetici saranno analizzati più nel dettaglio per cercare di identificare geni o varianti alleliche che possano modulare la diversa risposta fenotipica ad uno stesso inoculo microbico.

Analisi GWAS sul rapporto di fosfato solubile

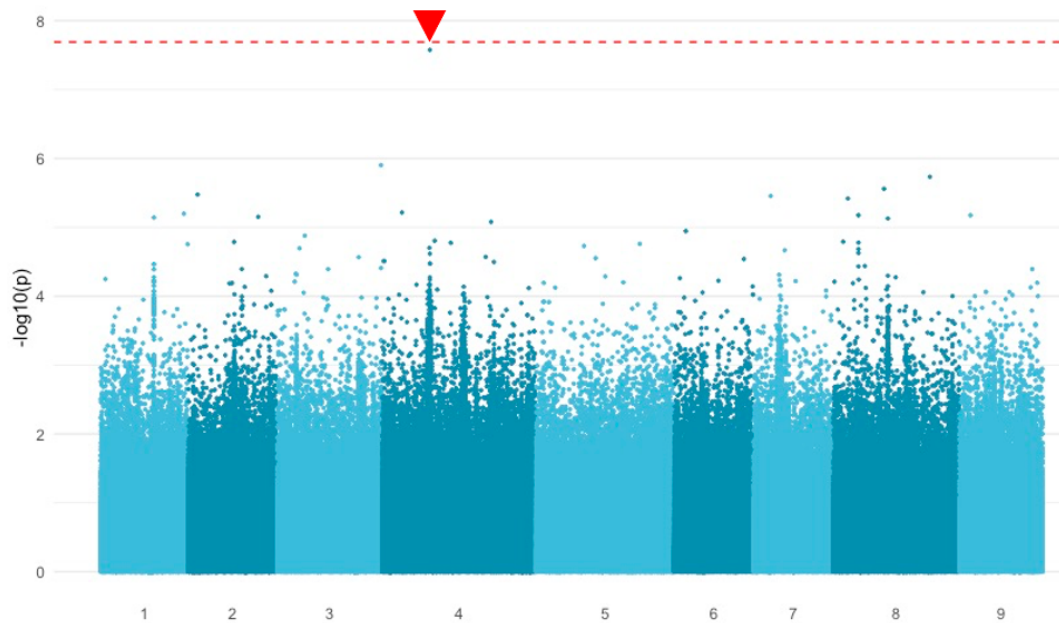


Fig. 16: Manhattan plot rappresentante il risultato dell'analisi GWAS condotta sul contenuto di fosfato solubile tra piante trattate e non trattate. Nell'asse delle y sono raffigurati i cromosomi; l'asse delle x rappresenta il *p-value*. La linea tratteggiata in alto rappresenta la correzione di Bonferroni. La freccia in rosso indica una SNP vicina alla significatività.

Analisi GWAS sul rapporto della biomassa fogliare

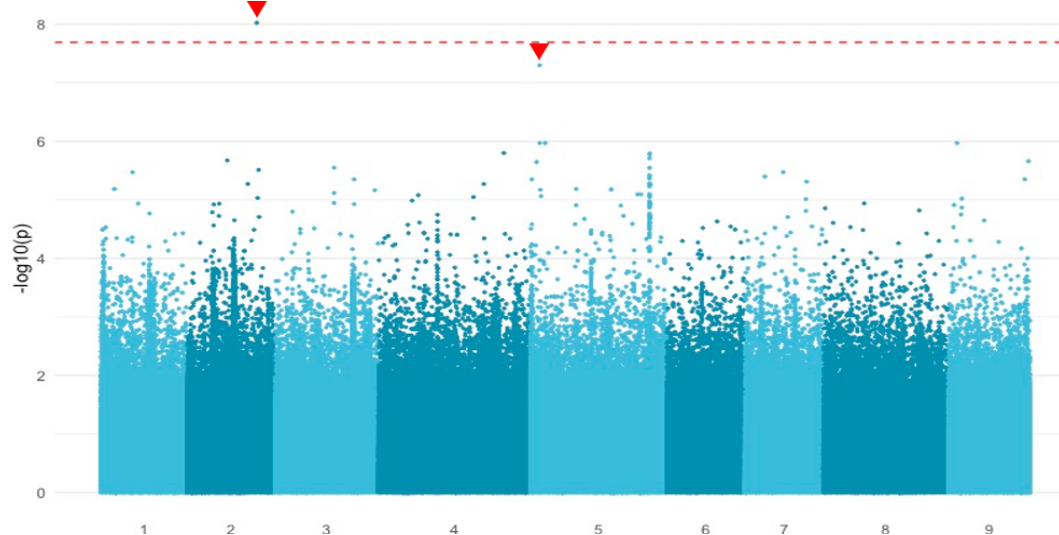
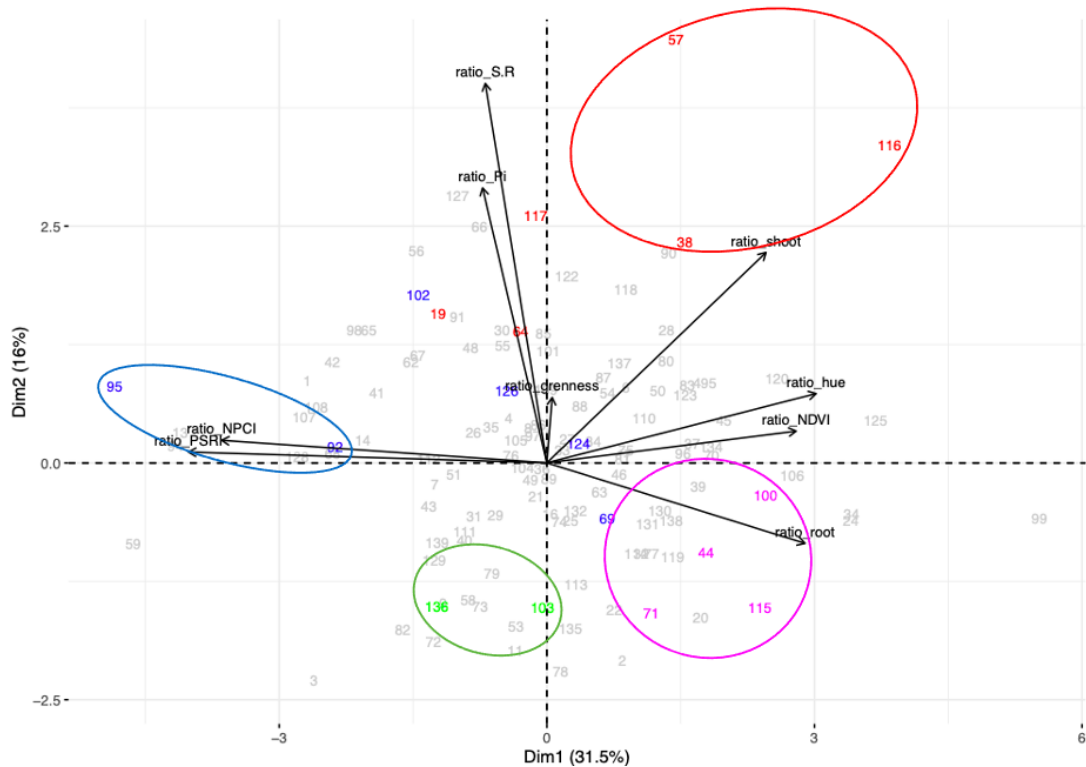


Fig. 17: Manhattan plot raffigurante il risultato dell'analisi GWAS condotta sulla biomassa fogliare tra piante trattate e non trattate. Nell'asse delle y sono raffigurati i cromosomi; l'asse delle x rappresenta il *p-value*. La linea tratteggiata in alto rappresenta la correzione di Bonferroni. Le frecce in rosso indicano le SNPs di interesse.

4.4 Analisi delle componenti principali (PCA)

Per investigare quali siano i fattori che spiegano la variabilità osservata nei genotipi analizzati, è stata condotta un'analisi delle componenti principali (Figura 18). La PCA ci ha permesso di identificare delle variabili principali che potrebbero essere una fonte della diversità nella risposta all'inoculo e di capire come variano questi fattori nella popolazione. Le prime due componenti principali (PC) sono in grado di spiegare il 47.5% della variabilità dei nostri dati. Tenendo conto di PC1 e 2, si nota come il vettore "ratio_Pi" (ovvero variazione della concentrazione di fosfato) sia parallelo al vettore "ratio_S_R" (ovvero variazione nel rapporto biomassa fogliare/ biomassa radicale), confermando quindi una correlazione negativa tra il contenuto di fosfato fogliare e l'investimento della pianta nella parte ipogea. Sono stati, inoltre, individuati quattro gruppi principali di genotipi che sembrano divergere nella risposta all'inoculo. Questi, sono stati scelti in base alla diversa occupazione dello spazio fenotipico mostrato in Figura 18, con una particolare attenzione al contenuto di fosfato e alla biomassa fogliare: il codice colore rosso rappresenta un rapporto delle mediane, per entrambi i parametri, superiore ad 1.20. Nel gruppo verde, invece, il rapporto di entrambi i parametri erano inferiori a 0.80. Nel caso del gruppo blu la risposta era maggiore di 1.20 per la concentrazione di Pi e inferiore ad 0.80 per la biomassa. I genotipi raggruppati in viola, infine, hanno un andamento contrario rispetto ai blu. Se prendiamo in esame il gruppo evidenziato in rosso, i parametri più importanti che spiegano la variazione dei genotipi sono la variazione del Pi nella foglia e della biomassa fogliare. Al contrario, considerando i genotipi nel gruppo verde, sembra che questi siano guidati da un minor rapporto nel contenuto di biomassa fogliare e, in una certa misura, anche da una diminuzione del rapporto nel contenuto di Pi nella foglia. I genotipi in viola, mostrano un aumento del rapporto della biomassa radicale. Per quanto riguarda i genotipi in blu, alcuni mostrano un aumento nel rapporto della clorofilla e della senescenza fogliare.



Risposta [Pi] e biomassa fogliare: ● = ++ ● = -- ● = +- ● = -+ ● = altro

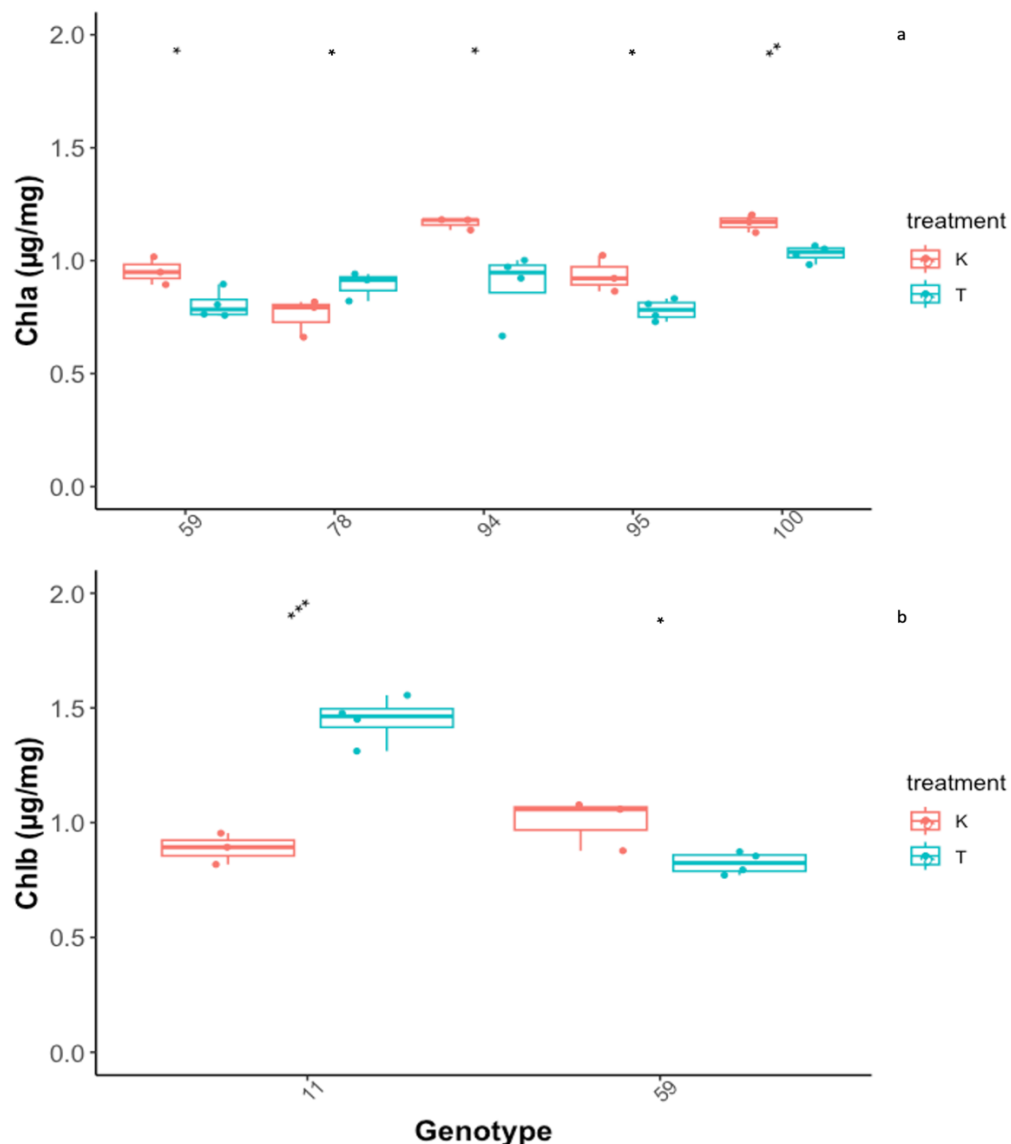
Fig. 18: Analisi delle componenti principali. In figura sono rappresentati i parametri derivanti da: piattaforma di fenotipizzazione, estrazione del Pi, e biomassa della radice e della foglia. Essi sono espressi come il rapporto delle mediane delle piante trattate rispetto a quelle non trattate. Nella legenda in basso alla figura è riportato il significato dei colori. Per [Pi] si intende la concentrazione del Pi fogliare. Il simbolo + indica una risposta del genotipo al trattamento maggiore dell'1.20; il simbolo – indica una risposta minore del 0.80. Tutti i genotipi che non hanno risposta compresa tra 0.80 e 1.20 sono rappresentati in grigio. Il primo simbolo dopo l'uguale si riferisce a [Pi] mentre il secondo alla biomassa fogliare.

4.5 Analisi dei metaboliti

Per cercare di investigare in modo più approfondito i principali attori coinvolti nella variazione di risposta all'inoculo microbico delle piante di lattuga è stato analizzato il contenuto di metaboliti nella foglia in una selezione di 28 genotipi che presentava una risposta divergente all'inoculo. I metaboliti analizzati sono stati i seguenti: clorofilla a (Chla) e clorofilla b (Chlb), aminoacidi liberi (FAA), zuccheri solubili totali (TSS) e il contenuto di amido (STA) tramite un protocollo denominato Rainbow che si basa su

analisi dell'assorbanza in seguito a facili estrazioni dei metaboliti (López-Hidalgo et al., 2021). Per la selezione dei genotipi da analizzare la scelta è stata fatta basandosi su: i genotipi significativi e vicino alla significatività per il contenuto di Pi nella foglia e i genotipi identificati dopo l'analisi delle componenti principali (Tabella Supplementare S4).

Per quanto riguarda la risposta generale delle piante all'inoculo, utilizzando il test ANOVA, non è stata riscontrata una differenza significativa nel contenuto dei metaboliti tra piante trattate e non trattate (Figura 19). Nello specifico, per Chla e Chlb, i *p-value* non sono significativi (Figura 19 a-b; *p-value* = 0.39; *p-value* = 0.99, rispettivamente). Anche per i FAA, i TSS e gli STA i *p-value* non sono significativi (Figura 19 c-d-e; *p-value* = 0.43; *p-value* = 0.78; *p-value* = 0.99, rispettivamente).



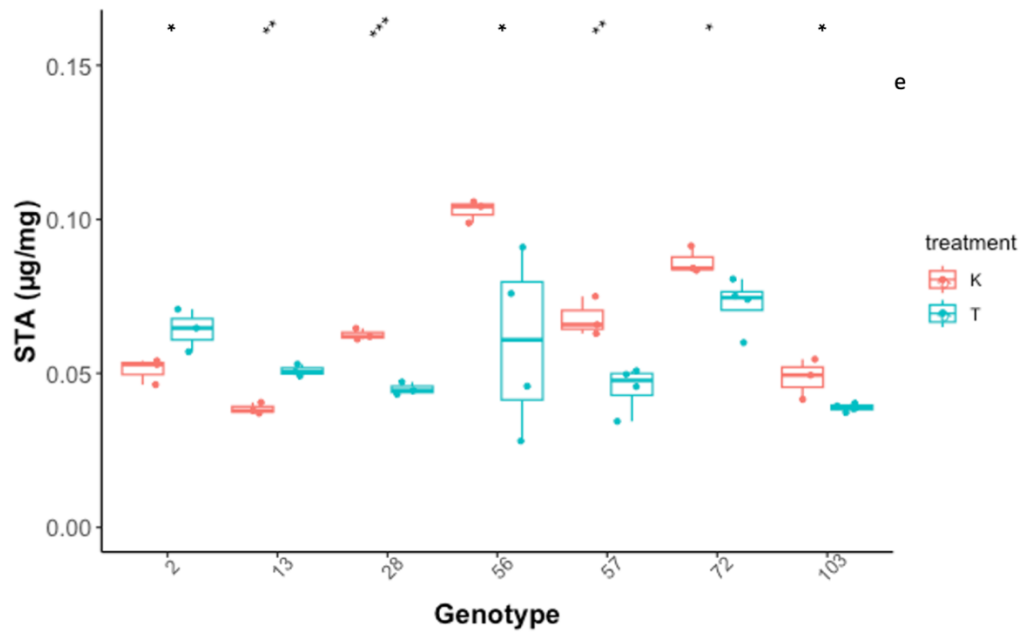
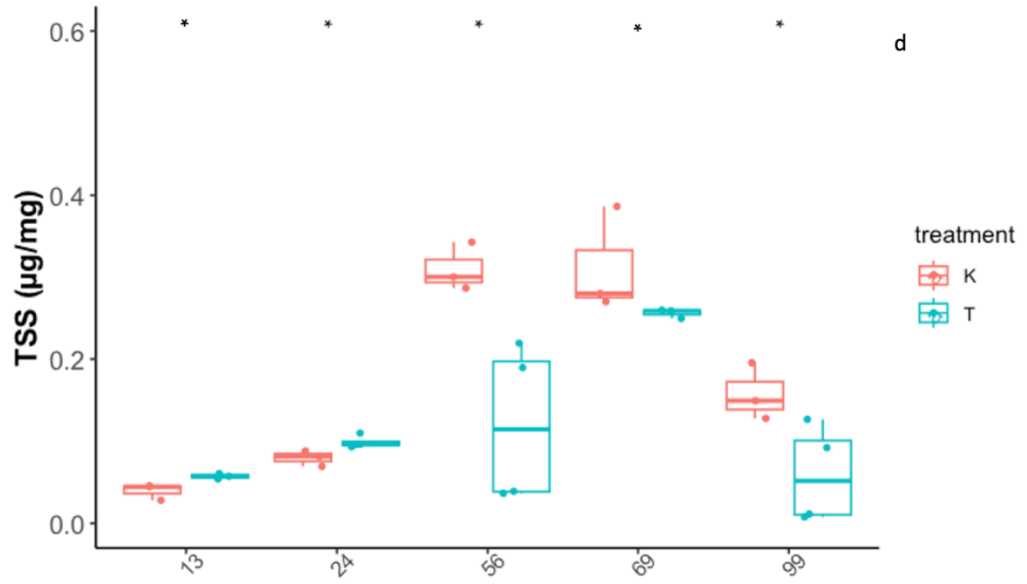
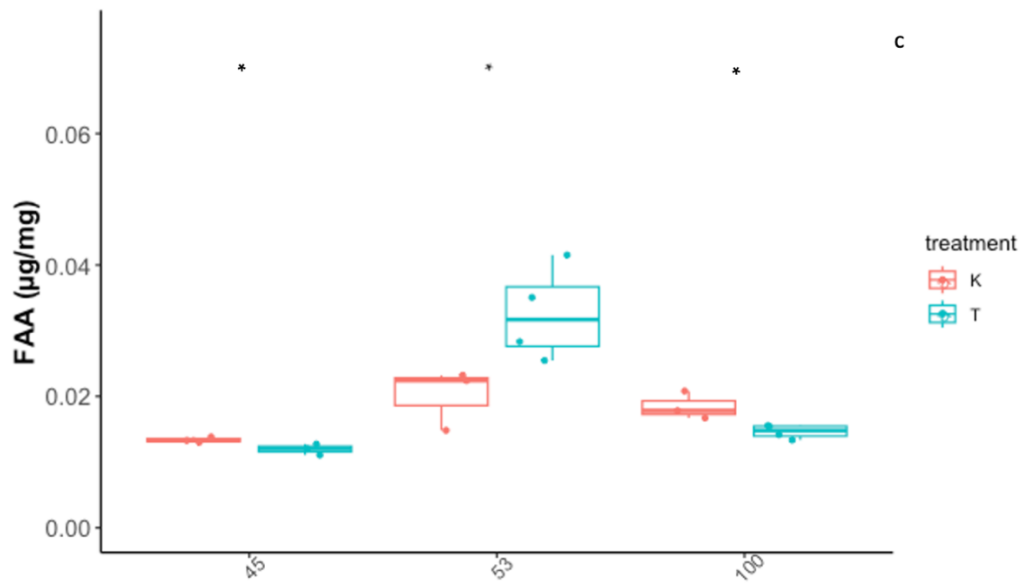
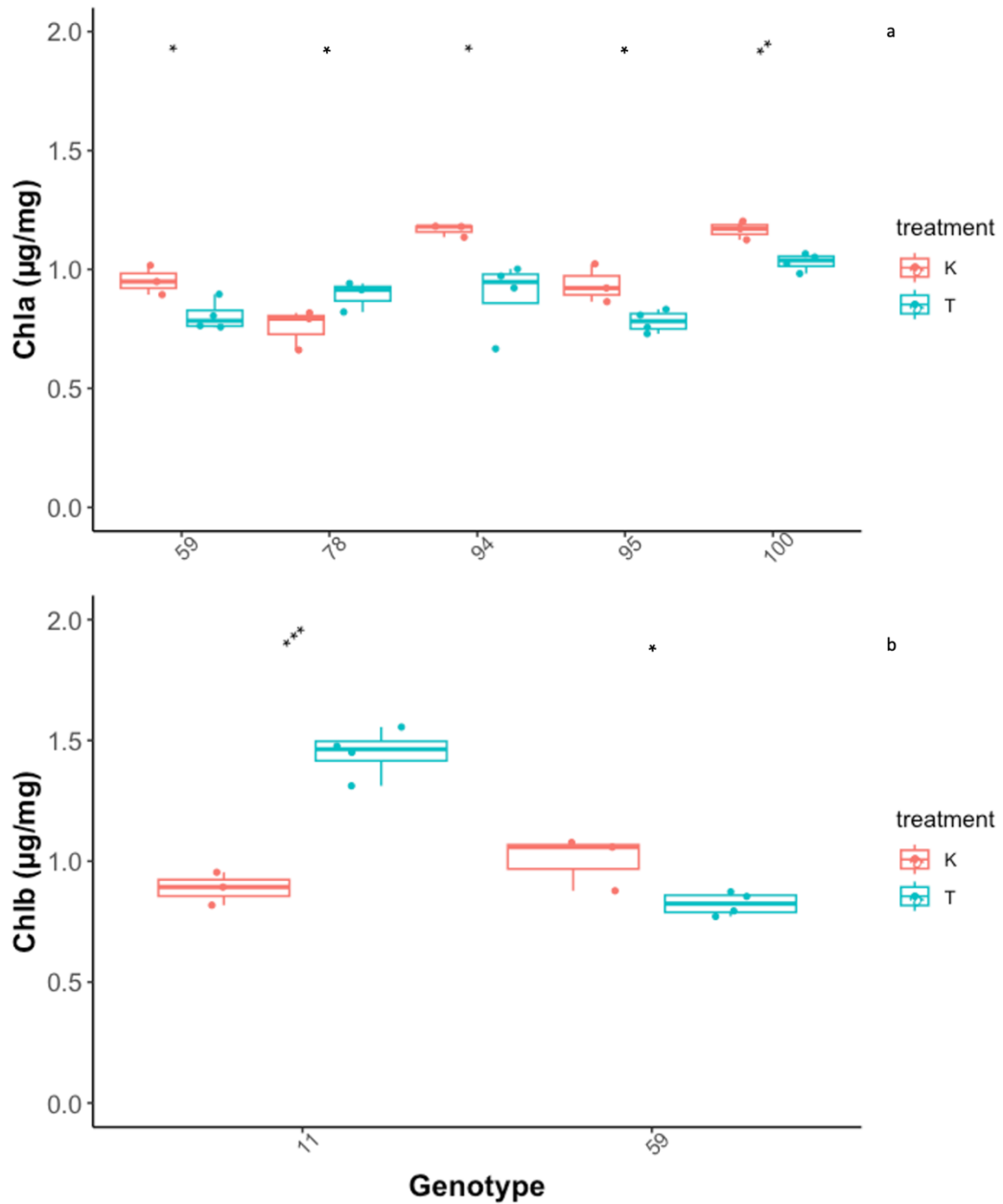


Fig. 19: (a-e) Effetto dell'inoculo sul contenuto di metaboliti della foglia. Nell'asse y sono rappresentati i metaboliti mentre nell'asse x le piante trattate e non trattate con inoculo. K sono le piante non trattate (rosso) mentre T sono le piante trattate (blu). In alto ad ogni figura viene mostrato il *p-value* dell'analisi ANOVA. (a) effetto dell'inoculo sul contenuto di clorofilla a (Chla). (b) effetto dell'inoculo sul contenuto di clorofilla b (Chlb). (c) effetto dell'inoculo sul contenuto di aminoacidi liberi (FAA). (d) effetto dell'inoculo sul contenuto degli zuccheri solubili liberi (TSS). (e) effetto dell'inoculo sul contenuto di amido (STA).

Successivamente, sono state analizzate più in dettaglio le risposte all'inoculo dei singoli genotipi (Figura 20). Dopo la comparazione a coppie eseguita con il test Tukey HSD, sono risultati significati cinque genotipi nel caso della Chla (59, *p-value* = 0.006; 78, *p-value* = 0.02; 94, *p-value* = $1 \cdot e^{-6}$; 95, *p-value* = 0,004; 100, *p-value* = 0.01) mentre, nel caso della Chlb sono risultati significativi 2 genotipi (11, *p-value* = $2 \cdot e^{-11}$; 59, *p-value* = 0.01). Nel caso della Chla (Figura 20a), considerando alcuni dei genotipi significativi, sembra che la loro concentrazione nella foglia sia minore nelle piante trattate rispetto a quelle non trattate. Mentre, nel caso della Chlb, il genotipo 11 trattato dimostra una concentrazione maggiore del pigmento rispetto a quello non trattato (Figura 20b).

Nel caso invece di FAA, TSS e STA, dopo la comparazione a coppie eseguita con il test Dunn, sono risultati significativi alcuni genotipi. Partendo dagli FAA, sono stati identificati tre genotipi con una differenza significativa nel contenuto di FAA tra trattati e non trattati (Figura 20c; 45, *p-value* = 0.049; 53 e 100 con *p-value* = 0.033). Per quanto riguarda i TSS, sono risultati significativi cinque genotipi (Figura 20d; 13 e 69 con *p-value* = 0.049; 24, 56 e 99 con *p-value* = 0.033). Considerando gli STA sono risultati significativi sette genotipi (Figura 20e; 2, 13 e 20 con *p-value* = 0.049; 56, 57, 72, 103 con *p-value* = 0.033). In generale, possiamo osservare una risposta diversa a seconda del metabolita e del genotipo preso in considerazione (Figura 20). In ogni caso, considerando sia genotipi significativi dopo la comparazione a coppie sia la comparazione a coppie di tutti i genotipi (Materiale Supplementare S5), la risposta delle piante all'inoculo non ha un netto andamento anche nel caso dei metaboliti. Però, quando vengono presi in esami i singoli genotipi, si può riscontrare una dipendenza della risposta all'inoculo dovuta al genotipo. Questo perché

nell'andamento della risposta nutrizionale, anche nel caso dei metaboliti, osserviamo aumenti e diminuzioni significative per tutti i metaboliti analizzati, sottolineando l'importanza della variabilità genetica quando si vuole costruire una comunità sintetica del suolo.



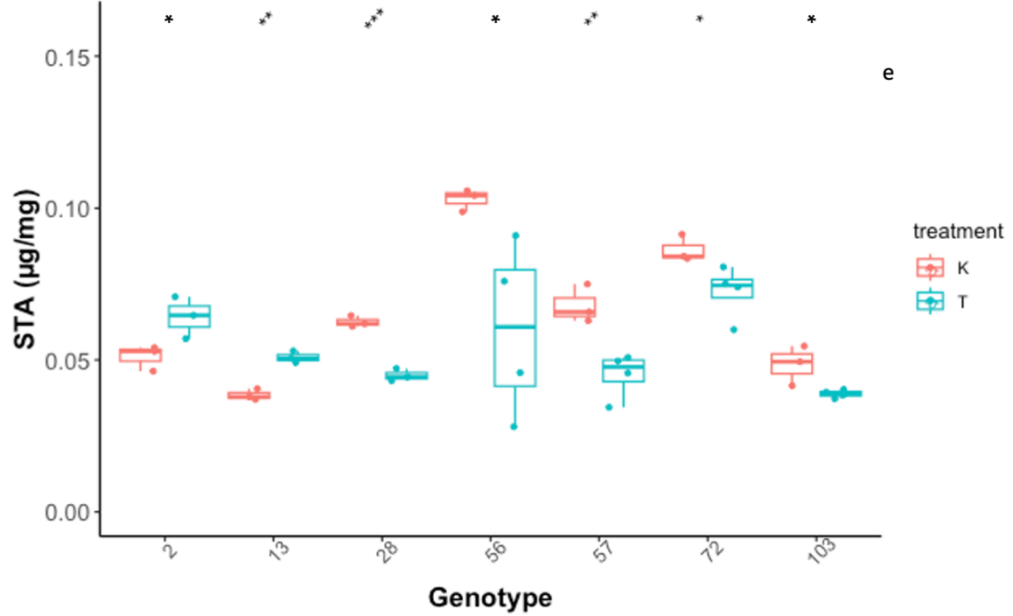
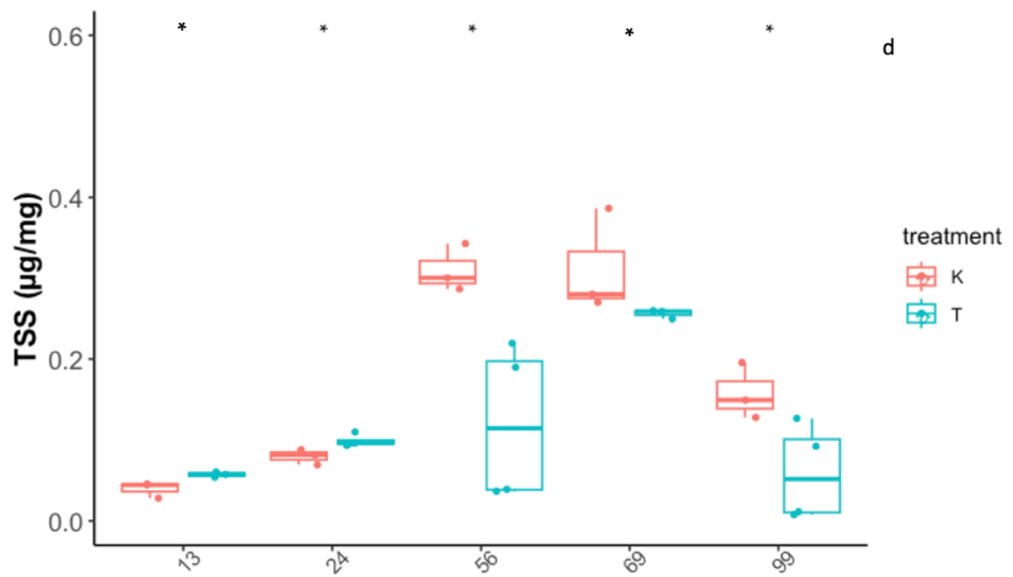
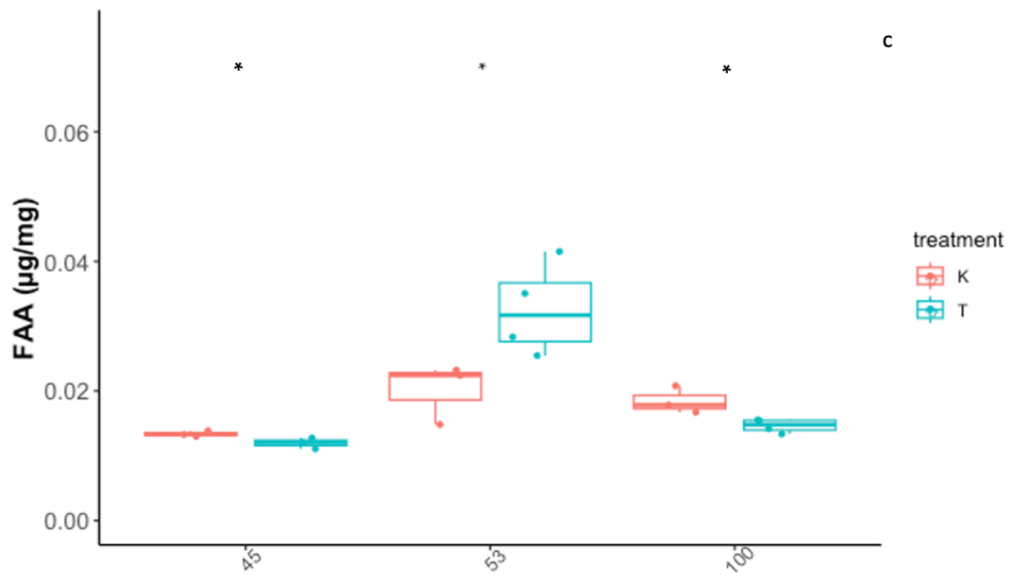


Fig. 20: Confronto tra i genotipi delle piante trattate e quelle non trattate nel contenuto di metaboliti della foglia. Nell'asse x sono rappresentati i genotipi significativi, nell'asse y il contenuto dei metaboliti nella foglia. Per K si intendono le piante non trattate (rosso) per T quelle trattate (blu). Gli asterischi in alto ad ogni immagine rappresentano la significatività.

(a) effetto dell'inoculo sul contenuto di clorofilla a (Chla). (b) effetto dell'inoculo sul contenuto di clorofilla b (Chlb). (c) effetto dell'inoculo sul contenuto di aminoacidi liberi (FAA). (d) effetto dell'inoculo sul contenuto totale degli zuccheri solubili (TSS). (e) effetto dell'inoculo sul contenuto di amido (STA).

Per approfondire ulteriormente quali sono le variabili responsabili della diversità nella risposta delle piante di lattuga, è stata condotta una PCA utilizzando i parametri derivati da: analisi dei metaboliti, LLPhP (Greenness, hue, NDVI, PSRI, NPCI) e da analisi di laboratorio (biomassa radice e foglia, concentrazione di Pi; Figura 21). Inoltre quest'analisi è servita per individuare dei genotipi che rispondono in maniera diversa al fine di poterne analizzare la comunità microbica associata alla radice, la cui variazione potrebbe aggiungere un altro tassello per spiegare la variabilità di risposta osservata. In totale viene spiegato il 42.2% della variabilità dei dati analizzati, permettendoci di individuare parametri come "ratio_greenness" (ossia il rapporto tra la riflettanza nel verde comparata con quella nel blu e nel rosso) che sembra avere un'influenza maggiore, rispetto alla PCA in Figura 11, nel modellare la diversità della risposta del gruppo evidenziato in rosso. Si può osservare come i parametri che riguardano il contenuto di clorofilla nella foglia ("ratio_Chla" e "ratio_Chlb") non si dispongono in modo parallelo nello spazio fenotipico. Questo potrebbe rispecchiare quanto osservato precedentemente ovvero che, le piante trattate accumulano meno clorofilla a mentre, per la clorofilla b, le piante trattate hanno un contenuto maggiore. Inoltre, è possibile osservare come l'andamento di "ratio_FAA" (ossia il rapporto tra trattati e controllo nel contenuto di aminoacidi liberi nella foglia), sia parallelo ai parametri "ratio_Pi" e "ratio_S_R", indicando un potenziale investimento delle piante anche nel metabolismo di composti azotati rispetto alla crescita dell'apparato radicale. Infine si può notare che, l'aggiunta dei parametri metabolici della pianta, ha permesso una separazione migliore dei genotipi nello spazio. Anche in

questo caso, considerando la risposta all'inoculo, si possono formare quattro gruppi, considerando i genotipi evidenziati in Figura 18. Questi gruppi sono stati individuati in base alla risposta che hanno avuto quando è stato considerato il rapporto della mediana di due parametri: concentrazione di Pi e biomassa fogliare. Nel caso del gruppo in rosso, si nota un aumento nel contenuto di Pi e della biomassa fogliare. Al contrario, il gruppo in verde mostra una diminuzione del contenuto di TSS e una diminuzione di Pi e biomassa fogliare. Per il blu invece si vede un aumento del rapporto del contenuto di clorofilla e della senescenza fogliare e una diminuzione del rapporto della biomassa fogliare. Infine, il gruppo in viola, mostra un aumento del rapporto della biomassa radicale. Si può notare come i gruppi che erano stati individuati con la prima PCA si sovrappongono parzialmente a quelli individuati quando si aggiungono anche i metaboliti all'analisi, identificando genotipi che potrebbero rispondere in modo simile all'interno del loro gruppo e diverso quando paragonati con genotipi di un altro gruppo. Questa variabilità nella risposta, oltre alla variabilità genetica, potrebbe dipendere da una diversa comunità microbica associata alla radice.

5. DISCUSSIONE

In questo lavoro sono stati analizzati 128 genotipi di *Lactuca sativa* per cercare di capire il ruolo dell'interazione tra genotipo e inoculo microbico nel modellare la risposta fisiologica, metabolica e nutrizionale della pianta. L'inoculo microbico è stato formulato utilizzando comunità batteriche e fungine che hanno un ruolo comprovato nell'aumentare la mineralizzazione di fosfato nel terreno (Han et al., 2022). Inoltre, le piante sono state cresciute in un suolo con disponibilità limitata di Pi, in modo da favorire l'interazione con i componenti della comunità sintetica. Essendo il fosfato inorganico l'unica forma di fosforo assimilabile dalle piante, comprendere come diversi genotipi di lattuga rispondano all'inoculo microbico è di fondamentale importanza per ottimizzare i benefici nutrizionali derivanti dall'interazione tra i due (Wang et al., 2022). Inoltre, per ampliare la risoluzione di risposta fenotipica delle piante, è stata utilizzata una piattaforma di fenotipizzazione. Questo ci ha permesso di raccogliere dei parametri fisiologici della pianta, con una risoluzione temporale, che sarebbero stati di difficile reperibilità.

5.1 Effetto dell'inoculo microbico nell'accumulo di Pi

L'analisi del contenuto di fosfato nella foglia ha dato dei risultati parzialmente contrari rispetto a quanto ipotizzato. Infatti, il confronto tra piante trattate e non trattate non ha prodotto una differenza significativa nell'accumulo di fosfato fogliare (Figura 10). Questo potrebbe essere spiegato in tre modi. La prima spiegazione potrebbe risiedere nel fatto che, la condizione iniziale di carenza di fosfato nel terreno, non ha causato una vera condizione di stress nutrizionale nelle piante. Capire effettivamente quali siano le condizioni di carenza di fosfato per le piante di lattuga che favoriscono in maniera efficace lo stabilirsi della simbiosi, non è sempre di facile predizione e dipende fortemente anche dalle condizioni ambientali e, conseguentemente, dalla crescita della pianta. Questo perché, le limitazioni da contenuto di fosfato nel terreno che si osservano per piante modello come *Arabidopsis thaliana* o *Lotus japonicus*, possono non essere le stesse

per altre piante, come nel caso di quelle di lattuga. Il secondo motivo potrebbe essere il periodo nel quale è stato svolto l'esperimento. Essendo *Lactuca sativa* una pianta che cresce principalmente in condizioni climatiche temperate-calde, la crescita a temperature più fredde potrebbe aver innescato meccanismi che non hanno consentito la formazione dell'interazione desiderata (Persyn et al., 2023). Ad esempio, essudati delle piante secreti in condizioni di stress da basse temperature potrebbe favorire determinate famiglie batteriche rispetto ad altre (Persyn et al., 2023). Infine, anche il tempo di crescita delle piante prima del campionamento può aver influito nello stabilirsi della simbiosi tra inoculo e pianta. Avendo campionato le piante dopo 30 giorni, e tenendo in considerazione le temperature più basse, probabilmente le piante avrebbero necessitato di più tempo di crescita al fine di raggiungere vere condizioni di stress nutrizionale, correlate con la biomassa totale. Inoltre, quando è stata confrontata la concentrazione di fosfato con la biomassa della foglia non c'è stata nessuna correlazione negativa significativa delle piante trattate indicando che, probabilmente, le piante non hanno raggiunto una vera e propria condizione di crescita in carenza di fosfato. Questo perché, durante la crescita delle piante, aumentando la biomassa fogliare, si dovrebbe osservare un effetto diluizione (Bates, 1971) con conseguente diminuzione della concentrazione di fosfato nella foglia, se il fosfato costituisce il principale elemento limitante la crescita della pianta (Paries & Gutjahr, 2023). D'altro canto, quando si osserva la correlazione tra Pi nella foglia e biomassa radicale, per le piante controllo, essa risulta essere negativa. Quindi, le piante non trattate sembrano aver investito maggiore energia in un apparato radicale più sviluppato, raggiungendo quindi una potenziale condizione di carenza fisiologica del nutriente, al contrario di quanto si può osservare nelle piante inoculate.

L'ultima spiegazione riguardante l'inefficacia generale dell'inoculo potrebbe risiedere nella poca vitalità dell'inoculo stesso o nell'instaurarsi di meccanismi di competizione per la nicchia ecologica, tra inoculo e comunità microbica già presente nelle radici, che non ha permesso ai microorganismi

della SynCom la colonizzazione della radice (Granato et al., 2019, Russ et al., 2023).

A livello di singoli genotipi, invece, è stata osservata una variabilità nella risposta nutrizionale, fisiologica e morfologica delle piante all'inoculo microbico. La variabilità genetica della pianta ospite ha risultato quindi essere determinante per stabilire una diversa efficacia della comunità microbica applicata nel suolo. Ad esempio nel caso della soia, è stato osservato come diversi genotipi ospitano specifiche comunità microbiche (Zheng et al., 2023). Inoltre, Beroueg e colleghi, esaminando la variabilità genetica associata a caratteristiche dell'architettura radicale in risposta a carenza di P nel genere *Lactuca*, hanno identificato una concreta variazione genetica in tutti tratti analizzati e un effetto della disponibilità di P su questi tratti (Beroueg et al., 2021). Quindi, anche se l'inoculo microbico non sembra aver avuto un effetto univoco sulla popolazione di *Lactuca sativa*, la diversità genetica delle piante di lattuga ha evidenziato una variazione intraspecifica nella risposta nutrizionale all'inoculo microbico.

5.2 La risposta morfologica e fisiologica della pianta dipende dalla variabilità intraspecifica

Per investigare in modo più approfondito la variabilità nella risposta fisiologica e morfologica delle piante di lattuga e il rapporto tra i diversi tratti fenotipici considerati, è stata utilizzata una *heatmap* (Figura 15). Quest'ultima, avendo incluso tutti i parametri fenotipici a disposizione, ci ha permesso di osservare un'ampia variabilità della pianta nella risposta all'inoculo e come questa risposta dipenda dal genotipo considerato. Ad esempio, se prendiamo in considerazione il parametro della concentrazione di fosfato nella foglia (P_i , Figura 15), possiamo osservare come correli in modo diverso con i parametri che riguardano la biomassa e, quindi, la produttività della pianta. Questo permette di evidenziare come piante diverse, della stessa specie, possano esplorare meccanismi diversi di crescita per affrontare un ambiente di fosfato limitante. Infatti, possiamo notare come, alte concentrazioni di fosfato nella foglia correlano sia negativamente che positivamente con parametri riguardanti la biomassa,

indicandoci un aumento o diminuzione della produttività della pianta basata sul genotipo considerato. Nel caso dei genotipi che hanno una correlazione negativa, una quantità assoluta di fosfato maggiore, senza un parallelo investimento nella produttività, potrebbe significare che questo accumulo dipenda dall'inoculo microbico e quindi il raggiungimento di una condizione di carenza di Pi nel terreno. Invece, i genotipi che mostrano una correlazione positiva, potrebbero avere una maggiore efficienza nell'uso del fosfato, investendo quindi nella produttività e/o che le condizioni di deficit di Pi nel suolo non sono state raggiunte. Un altro esempio che può validare questa osservazione si può osservare nel caso in cui consideriamo le varietà di lattuga prese in esame. Avendo incluso sette varietà commerciali diverse, nel caso in cui ci fosse una dipendenza della risposta a questo parametro e non alla diversità genetica, ci si sarebbe potuto aspettare una clusterizzazione dei fenotipi in base alle cultivar prese in esame. Invece così non è, in quanto nei gruppi che si formano, sono sempre presenti quasi tutte le varietà. L'*Heatmap* dimostra come anche la risposta fisiologica e morfologica dipenda dalla variabilità intraspecifica presente in lattuga, evidenziando l'importanza della considerazione della variabilità genotipica quando si costruiscono consorzi microbici.

5.3 Associazione tra variazione e risposta all'inoculo

Avendo constatato che c'è variazione intraspecifica nella risposta delle piante all'inoculo, capire a cosa è associata a livello genetico può rivelare locus genici che sono responsabili della risposta osservata. Infatti, mediante un'analisi GWAS, sono stati individuati 3 SNPs, in due parametri che sembrano essere associati alla variazione riscontrata nelle piante di lattuga. Nel caso del rapporto tra trattati e non trattati nel contenuto di fosfato solubile, è stata individuata una SNP nel cromosoma 4 che potrebbe essere associata alla variazione nella risposta all'accumulo di fosfato (Figura 16). Mentre, quando si considera il rapporto tra inoculo e controllo della biomassa fogliare (Figura 17), sono state osservate due SNPs che potrebbero spiegare la variazione: una nel cromosoma 2 mentre l'altra nel cromosoma 5. C'è da dire però che, essendo due SNPs vicine alla

significatività e tenendo presente i problemi che possono avere le analisi GWAS come struttura della popolazione o falsi negativi, altre analisi per convalidare questa osservazione andrebbero svolte. Ad esempio, anche se è stata utilizzata la correzione di Bonferroni per ridurre la probabilità di errori di tipo I (falsi positivi), determinare quali geni in quel locus genetico possano essere espressi nei tessuti vegetali di interesse e influenzati dalla presenza/assenza dell'inoculo microbico, costituirà una guida importante per trovare un nesso causale tra gene e variabilità osservata.

5.4 Biomassa fogliare e contenuto di Pi nella foglia sono responsabili della clusterizzazione dei genotipi

L'analisi delle componenti principali ci ha permesso di spiegare il 47.5 % della variabilità osservata (Figura 18) mostrando, data la disposizione parallela dei vettori "ratio_Pi" e "ratio_S_R" nello spazio fenotipico, una correlazione negativa tra grandezza dell'apparato radicale e contenuto di fosfato nella foglia. A conferma di ciò possiamo notare anche che il parametro "ratio_root" (ovvero il rapporto tra trattati e controllo nella biomassa radicale) si posizioni nel quadrante opposto rispetto a quello appartenente ai vettori sopra citati. L'aumento sia di biomassa fogliare che della concentrazione di fosfato non è un comportamento classico. Questo perché si osserva una diminuzione nell'accumulo totale di P quando la biomassa della pianta aumenta (Sosa et al., 2012). La motivazione di questo incremento parallelo di entrambi i parametri potrebbe dipendere dall'instaurarsi della simbiosi microbica. Infatti Liu e colleghi hanno visto come il corretto stabilirsi della SynCom nelle piante di grano ha portato ad un incremento della crescita della pianta, dello sviluppo delle radici e della produzione di biomassa (Liu et al., 2022). Al contrario, un aumento della concentrazione di Pi e una diminuzione della biomassa (e viceversa) è in linea con quanto osservato precedentemente (Sosa et al., 2012). Una diminuzione di entrambi i parametri potrebbe indicare che la condizione di carenza di fosfato iniziale si sia stabilita per questi genotipi e che il consorzio microbico abbia costituito solo un costo e non un beneficio per la pianta (Bechtaoui et al., 2021; Zhang et al., 2022).

5.5 La risposta metabolica della pianta all'inoculo microbico

Per quanto riguarda il contenuto di metaboliti nella foglia in generale possiamo dire che, anche in questo caso, l'inoculo sembra aver avuto un effetto blando che è dipeso molto dal singolo genotipo. Questo perché, quando è stato analizzato l'effetto dell'inoculo per i singoli metaboliti, non è stata riscontrata nessuna differenza significativa tra trattati e non (Figura 19). Inoltre, osservando il comportamento di tutti i genotipi analizzati (Materiale Supplementare S5), non sembra si possa osservare un netto aumento o diminuzione del loro contenuto. Ad esempio, la maggior parte dei genotipi significativi nella differenza del contenuto di clorofilla a, hanno una diminuzione della sua concentrazione nella foglia. È un riscontro non in linea con quanto si osserva ad esempio per le leguminose, dato che mostrano un aumento significativo del contenuto di clorofilla quando cresciute in deficit di Pi, rispetto a quelle trattate con elevate concentrazioni di Pi (Bechtaoui et al., 2021). Al contrario, quando si osservano i genotipi significativi per la clorofilla b, ci sono sia aumenti che diminuzioni di questo parametro. Questo, ancora una volta, può indicare che la risposta dipende dal genotipo e dallo stato fisiologico delle singole piante. Infatti, quando si visualizzano tutti e 28 i genotipi presi in esame (Materiale Supplementare S5), si nota che metà popolazione risponde positivamente, quindi con un aumento della concentrazione di clorofilla, mentre l'altra metà negativamente, quindi con una diminuzione di Chla e Chlb. Anche se si visualizzano gli altri metaboliti analizzati (FAA, TSS, STA) si osserva una risposta generale con un andamento uguale a quello descritto per il contenuto di clorofilla. Quando però si analizzano nello specifico i singoli genotipi la risposta, anche in questo caso, dipende dal genotipo. Questo perché non si osserva solo una diminuzione o solamente un aumento del loro contenuto nella foglia. Ad esempio, se prendiamo in considerazione il contenuto di zuccheri (TSS) e di amido (STA; Figura 15 d-e), in condizioni di carenza di fosfato, generalmente le concentrazioni di TSS e STA aumentano (Rouached et al., 2010). Questo aumento però risulta significativo solo nel caso di alcuni genotipi e questo potrebbe significare

che solo alcune piante hanno raggiunto carenze di fosfato e/o che questa tendenza potrebbe dipendere dalla variabilità genotipica in lattuga.

Per approfondire quali sono i fattori responsabili della variabilità osservata nel caso dei metaboliti è stata svolta un'analisi delle componenti principali, comprendendo i metaboliti analizzati. Viene spiegata quasi la metà della variabilità osservata e in questo caso abbiamo dei vettori diversi che guidano questa risposta all'inoculo. I parametri selezionati in precedenza hanno permesso una discriminazione migliore dei genotipi, mantenendo la stessa distribuzione nello spazio fenotipico. Si può osservare come il genotipo che ha una diminuzione nella concentrazione di Pi e nella biomassa fogliare, mostra anche una diminuzione della concentrazione degli zuccheri nella foglia. Questo potrebbe essere in linea con quanto osservato nel caso dei genotipi significativi analizzati per i TSS. Infatti, più della metà dei genotipi significativi rispondono con una diminuzione della sua concentrazione. Anche quando presi in esame tutti i genotipi per la concentrazione dei TSS (Materiale Supplementare S5), possiamo osservare che più della metà dei genotipi rispondono all'inoculo con un decremento della concentrazione degli zuccheri. Infatti, in condizioni di stress nutrizionale la concentrazione degli zuccheri diminuisce (Rosa et al., 2009). Tuttavia, cambiamenti nel contenuto di zucchero dipendono anche dalla variazione genotipica (Rosa et al., 2009) e questa correlazione è stata osservata anche in questo studio. Inoltre si può notare come i vettori riguardanti la concentrazione di clorofilla si dispongono in maniera perpendicolare tra di loro. Questo potrebbe rispecchiare quanto è stato osservato in precedenza, cioè una tendenza alla risposta all'inoculo opposta per alcuni genotipi.

Nel complesso, i risultati osservati nell'analisi della PCA comprendente i metaboliti ci ha permesso di discriminare ulteriormente i gruppi che differiscono nella risposta quando vengono comparati tra di loro e selezionare un numero più ristretto di genotipi che verranno seguiti in analisi successive. Per esempio, per avere una comprensione più ampia dei fattori che influenzano la risposta fisiologica della pianta, verrà analizzata la

comunità microbica associata alle loro radici. Infatti, diversi lavori hanno dimostrato come genotipi diversi possono associare comunità microbiche diverse (Shenton et al., 2016; Zheng et al., 2023).

6. CONCLUSIONI

La simbiosi che si instaura tra piante e microorganismi nel terreno è una interazione fondamentale, che ha permesso lo stabilirsi del mondo come lo conosciamo oggi (Delaux et al., 2015). In questo studio, utilizzando 128 genotipi di *Lactuca sativa* cresciuti in un una condizione di carenza di fosfato, è stata studiata la loro risposta ad un inoculo microbico, che favorisce l'assorbimento di Pi nel terreno. È stato possibile osservare che la risposta nutrizionale, fisiologica e morfologica in lattuga dipende fortemente dalla variazione intraspecifica presente nella popolazione in esame. Infatti, quando si osserva la risposta nutrizionale complessiva all'inoculo microbico in termini di accumulo di fosfato solubile nella foglia, non è stata rilevata alcuna differenza significativa tra piante controllo e trattate. Al contrario, quando è stata osservata la risposta per ogni singolo genotipo, è stata riscontrata una dipendenza al genotipo preso in esame. Infatti, in circa metà popolazione l'inoculo ha avuto un effetto positivo; viceversa, nell'altra metà la concentrazione di fosfato nella foglia è diminuita in risposta all'inoculo.

La consapevolezza che l'effetto e l'efficacia di un inoculo misto batterico-fungino dipenda dal genotipo ospite apre la strada a diverse possibilità future riguardanti sia un lato biologico-meccanicistico sia un importante aspetto-applicativo. Infatti è auspicabile che, associando a queste analisi approcci trascrittomici si potrà capire quali geni e/o varianti alleliche siano responsabili della diversa risposta della pianta, aiutandoci quindi a comprendere aspetti cellulare e fisiologici alla base dell'interazione. In parallelo, si potrà comunque sapere quali varietà commerciali di lattuga siano più adatte ad un particolare prodotto microbiologico ed, eventualmente, trasferire tramite incroci classici i loci genetici di interesse ad altre varietà di lattuga. Si può quindi ipotizzare un futuro in cui la parte di selezione varietale (*breeding*) avvenga in concomitanza alla formulazione di prodotti a base di funghi e batteri per un miglioramento della resa finale e una diminuzione degli input a base di fertilizzanti.

Questo studio ci ha permesso di far luce sull'importanza della variabilità genotipica delle piante di lattuga. Essendo il fosfato un nutriente limitante nel terreno ma fondamentale per la salute e la crescita della pianta, considerare la variabilità genetica delle piante quando si costruiscono consorzi microbici è risultato essere un punto cardine. L'analisi delle comunità microbiche associate alle radici dei genotipi che hanno dimostrato una risposta divergente all'inoculo, ci permetterà di capire se tale variabilità può anche essere correlata all'associazione a batteri e funghi in questo compartimento. Inoltre, le analisi GWAS su gli altri parametri fenotipici ci permetterà di capire se ci sono varianti alleliche responsabili della risposta divergente e, associandoli a locus genici, ci consentirà di avere una comprensione più dettagliata della risposta delle piante ad uno stesso inoculo microbico.

BIBLIOGRAFIA

- Adetunji, C. O., Palai, S., Ekwuabu, C. P., Egbuna, C., Adetunji, J. B., Ehis-Eriakha, C. B., ... & Mtewa, A. G. (2021). General principle of primary and secondary plant metabolites: Biogenesis, metabolism, and extraction. In *Preparation of Phytopharmaceuticals for the Management of Disorders* (pp. 3-23). Academic Press.
- Agler, M. T., Ruhe, J., Kroll, S., Morhenn, C., Kim, S. T., Weigel, D., & Kemen, E. M. (2016). Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. *PLoS biology*, *14*(1), e1002352.
- Akiyama, K., Matsuoka, H., & Hayashi, H. (2002). Isolation and identification of a phosphate deficiency-induced C-glycosylflavonoid that stimulates arbuscular mycorrhiza formation in melon roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *15*(4), 334-340.
- Alseekh, S., Kostova, D., Bulut, M., & Fernie, A. R. (2021). Genome-wide association studies: assessing trait characteristics in model and crop plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *78*, 5743-5754.
- Armanhi, J. S. L., de Souza, R. S. C., Biazotti, B. B., Yassitepe, J. E. D. C. T., & Arruda, P. (2021). Modulating drought stress response of maize by a synthetic bacterial community. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 747541.
- Armanhi, J. S. L., De Souza, R. S. C., Damasceno, N. D. B., De Araujo, L. M., Imperial, J., & Arruda, P. (2018). A community-based culture collection for targeting novel plant growth-promoting bacteria from the sugarcane microbiome. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 2191.
- Arora, L., & Narula, A. (2017). Gene editing and crop improvement using CRISPR-Cas9 system. *Frontiers in plant science*, *8*, 1932.
- Bates, T. E. (1971). Factors affecting critical nutrient concentrations in plants and their evaluation: A review. *Soil science*, *112*(2), 116-130.
- Bechtaoui, N., Rabiou, M. K., Raklami, A., Oufdou, K., Hafidi, M., & Jemo, M. (2021). Phosphate-dependent regulation of growth and stresses management in plants. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 679916.
- Beroueg, A., Lecompte, F., Mollier, A., & Pagès, L. (2021). Genetic Variation in Root Architectural Traits in *Lactuca* and Their Roles in Increasing Phosphorus-Use-Efficiency in Response to Low Phosphorus Availability. *Frontiers in plant science*, *12*, 658321.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.658321>
- Besserer, A., Bécard, G., Jauneau, A., Roux, C., & Séjalon-Delmas, N. (2008). GR24, a synthetic analog of strigolactones, stimulates the mitosis

and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* by boosting its energy metabolism. *Plant Physiology*, 148(1), 402-413.

biological online dictionary, genetic diversity (7 October 2019). "genetic diversity definition and examples".

Bodenhausen, N., Bortfeld-Miller, M., Ackermann, M., & Vorholt, J. A. (2014). A synthetic community approach reveals plant genotypes affecting the phyllosphere microbiota. *PLoS genetics*, 10(4), e1004283.

Brooker R, Widmaier E, Graham L, and Stiling P. *Biology* (2011): p. G-14
Brown, W. L. (1983). Genetic diversity and genetic vulnerability—an appraisal. *Economic botany*, 37, 4-12.

Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppi, K., Ver Loren van Themaat, E., Ahmadinejad, N., Assenza, F., ... & Schulze-Lefert, P. (2012). Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*, 488(7409), 91-95.

Bustos, R., Castrillo, G., Linhares, F., Puga, M. I., Rubio, V., Pérez-Pérez, J., ... & Paz-Ares, J. (2010). A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *PLoS genetics*, 6(9), e1001102.

Carella, P., Gogleva, A., Tomaselli, M., Alfs, C., & Schornack, S. (2018). *Phytophthora palmivora* establishes tissue-specific intracellular infection structures in the earliest divergent land plant lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(16), E3846-E3855.

Carreno-Quintero, N., Bouwmeester, H. J., & Keurentjes, J. J. (2013). Genetic analysis of metabolome–phenotype interactions: from model to crop species. *Trends in Genetics*, 29(1), 41-50.

Carvalhais, L. C., Dennis, P. G., Badri, D. V., Tyson, G. W., Vivanco, J. M., & Schenk, P. M. (2013). Activation of the jasmonic acid plant defence pathway alters the composition of rhizosphere bacterial communities. *PLoS One*, 8(2), e56457.

Cordell, D., Drangert, J. O., & White, S. (2009). The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global environmental change*, 19(2), 292-305.

Das, D., Paries, M., Hobecker, K., Gigl, M., Dawid, C., Lam, H. M., ... & Gutjahr, C. (2022). PHOSPHATE STARVATION RESPONSE transcription factors enable arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Nature Communications*, 13(1), 477.

- De Souza, R. S. C., Armanhi, J. S. L., & Arruda, P. (2020). From microbiome to traits: designing synthetic microbial communities for improved crop resiliency. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 1179.
- Delaux, P. M., Radhakrishnan, G. V., Jayaraman, D., Cheema, J., Malbreil, M., Volkening, J. D., ... & Ané, J. M. (2015). Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(43), 13390-13395.
- Delgado-Baquerizo, M., Guerra, C. A., Cano-Díaz, C., Egidi, E., Wang, J. T., Eisenhauer, N., ... & Maestre, F. T. (2020). The proportion of soil-borne pathogens increases with warming at the global scale. *Nature Climate Change*, *10*(6), 550-554.
- Dell'Acqua, M., Gatti, D. M., Pea, G., Cattonaro, F., Coppens, F., Magris, G., ... & Pè, M. E. (2015). Genetic properties of the MAGIC maize population: a new platform for high definition QTL mapping in *Zea mays*. *Genome biology*, *16*(1), 1-23.
- Durán, P., Thiergart, T., Garrido-Oter, R., Agler, M., Kemen, E., Schulze-Lefert, P., & Hacquard, S. (2018). Microbial interkingdom interactions in roots promote *Arabidopsis* survival. *Cell*, *175*(4), 973-983.
- Etesami, H., Jeong, B. R., & Glick, B. R. (2021). Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi, phosphate-solubilizing bacteria, and silicon to P uptake by plant. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 699618.
- Exposito-Alonso, M., Burbano, H. A., Bossdorf, O., Nielsen, R., & Weigel, D. (2019). Natural selection on the *Arabidopsis thaliana* genome in present and future climates. *Nature*, *573*(7772), 126-129.
- Giauque, H., Connor, E. W., & Hawkes, C. V. (2019). Endophyte traits relevant to stress tolerance, resource use and habitat of origin predict effects on host plants. *New Phytologist*, *221*(4), 2239-2249.
- Gillespie, J. H. (2004). *Population genetics: a concise guide*. JHU press.
- Gonin, M., Salas-González, I., Gopaulchan, D., Frene, J. P., Roden, S., Van de Poel, B., ... & Castrillo, G. (2023). Plant microbiota controls an alternative root branching regulatory mechanism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *120*(15), e2301054120.
- Gopal, M., & Gupta, A. (2016). Microbiome selection could spur next-generation plant breeding strategies. *Frontiers in microbiology*, *7*, 1971.
- Govindaraj, M., Vetriventhan, M., & Srinivasan, M. (2015). Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. *Genetics research international*, 2015.

Granato, E. T., Meiller-Legrand, T. A., & Foster, K. R. (2019). The evolution and ecology of bacterial warfare. *Current biology*, 29(11), R521-R537.

Hafeez, U., Ali, M., Hassan, S. M., Akram, M. A., & Zafar, A. (2023). Advances in Breeding and Engineering Climate-Resilient Crops: A Comprehensive Review. *International Journal of Research and Advances in Agricultural Sciences*, 2(2), 85-99.

Han, Y., White, P. J., & Cheng, L. (2022). Mechanisms for improving phosphorus utilization efficiency in plants. *Annals of botany*, 129(3), 247-258.

Harcombe, W. R., Riehl, W. J., Dukovski, I., Granger, B. R., Betts, A., Lang, A. H., ... & Segre, D. (2014). Metabolic resource allocation in individual microbes determines ecosystem interactions and spatial dynamics. *Cell reports*, 7(4), 1104-1115.

Hawkes, C. V., Bull, J. J., & Lau, J. A. (2020). Symbiosis and stress: how plant microbiomes affect host evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 375(1808), 20190590.

Hawkes, C. V., Kjølner, R., Raaijmakers, J. M., Riber, L., Christensen, S., Rasmussen, S., ... & Hestbjerg Hansen, L. (2021). Extension of plant phenotypes by the foliar microbiome. *Annual Review of Plant Biology*, 72, 823-846.

Hawkesford, M., Horst, W., Kichey, T., Lambers, H., Schjoerring, J., Møller, I. S., & White, P. (2012). Functions of macronutrients. In *Marschner's mineral nutrition of higher plants* (pp. 135-189). Academic press.

Heath, K. D., Burke, P. V., & Stinchcombe, J. R. (2012). Coevolutionary genetic variation in the legume-rhizobium transcriptome. *Molecular ecology*, 21(19), 4735-4747.

Henderson, I. R., & Salt, D. E. (2017). Natural genetic variation and hybridization in plants. *Journal of Experimental Botany*, 68(20), 5415-5417.

Hilder, V. A., & Boulter, D. (1999). Genetic engineering of crop plants for insect resistance—a critical review. *Crop protection*, 18(3), 177-191.

Hiruma, K., Gerlach, N., Sacristán, S., Nakano, R. T., Hacquard, S., Kracher, B., ... & Schulze-Lefert, P. (2016). Root endophyte Colletotrichum tofieldiae confers plant fitness benefits that are phosphate status dependent. *Cell*, 165(2), 464-474.

Howieson, J. G., Robson, A. D., & Ewing, M. A. (1993). External phosphate and calcium concentrations, and pH, but not the products of

rhizobial nodulation genes, affect the attachment of *Rhizobium meliloti* to roots of annual medics. *Soil Biology and Biochemistry*, 25(5), 567-573.

Johns, N. I., Blazejewski, T., Gomes, A. L., & Wang, H. H. (2016). Principles for designing synthetic microbial communities. *Current Opinion in Microbiology*, 31, 146-153.

Jurburg, S. D., Eisenhauer, N., Buscot, F., Chatzinotas, A., Chaudhari, N. M., Heintz-Buschart, A., ... & Singh, B. K. (2022). Potential of microbiome-based solutions for agrifood systems. *Nature Food*, 3(8), 557-560.

Kaminsky, L. M., Trexler, R. V., Malik, R. J., Hockett, K. L., & Bell, T. H. (2019). The inherent conflicts in developing soil microbial inoculants. *Trends in Biotechnology*, 37(2), 140-151.

Kendall, K., & Roberts, A. D. (2015). van der Waals forces influencing adhesion of cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1661), 20140078.

Knights, H. E., Jorin, B., Haskett, T. L., & Poole, P. S. (2021). Deciphering bacterial mechanisms of root colonization. *Environmental Microbiology Reports*, 13(4), 428-444.

Kniskern, J. M., Traw, M. B., & Bergelson, J. (2007). Salicylic acid and jasmonic acid signaling defense pathways reduce natural bacterial diversity on *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant-microbe interactions*, 20(12), 1512-1522.

Kooke, R., & Keurentjes, J. J. B. (2012). Multi-dimensional regulation of metabolic networks shaping plant development and performance. *Journal of experimental botany*, 63(9), 3353-3365.

Korte, A., & Farlow, A. (2013). The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant methods*, 9(1), 1-9.

Laurentin Táriba, H. E. (2023). Population Genetics. In *Agricultural Genetics: From the DNA Molecule to Population Management* (pp. 137-166). Cham: Springer Nature Switzerland.

Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Lundberg, D. S., Breakfield, N., Gehring, J., McDonald, M., ... & Dangl, J. L. (2015). Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa. *Science*, 349(6250), 860-864.

Lesk, C., Rowhani, P., & Ramankutty, N. (2016). Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature*, 529(7584), 84-87.
Listgarten, J., Lippert, C., & Heckerman, D. (2013). FaST-LMM-Select for addressing confounding from spatial structure and rare variants. *Nature genetics*, 45(5), 470-471.

Liu, Y., Xie, Y., Wang, H., Ma, X., Yao, W., & Wang, H. (2017). Light and ethylene coordinately regulate the phosphate starvation response through transcriptional regulation of PHOSPHATE STARVATION RESPONSE1. *The Plant Cell*, 29(9), 2269-2284.

Liu, H., Qiu, Z., Ye, J., Verma, J. P., Li, J., & Singh, B. K. (2022). Effective colonisation by a bacterial synthetic community promotes plant growth and alters soil microbial community. *Journal of Sustainable Agriculture and Environment*, 1(1), 30-42.

López-Hidalgo, C., Meijón, M., Lamelas, L., & Valledor, L. (2021). *The rainbow protocol: A sequential method for quantifying pigments, sugars, free amino acids, phenolics, flavonoids and MDA from a small amount of sample* (Vol. 44, No. 6, pp. 1977-1986). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd..

Lota, F., Wegmüller, S., Buer, B., Sato, S., Bräutigam, A., Hanf, B., & Bucher, M. (2013). The cis-acting CTTC–P1 BS module is indicative for gene function of L j VTI 12, a Q b-SNARE protein gene that is required for arbuscule formation in *L otus japonicus*. *The Plant Journal*, 74(2), 280-293.

Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., ... & Dangl, J. L. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, 488(7409), 86-90.

Ma, K. W., Niu, Y., Jia, Y., Ordon, J., Copeland, C., Emonet, A., ... & Schulze-Lefert, P. (2021). Coordination of microbe–host homeostasis by crosstalk with plant innate immunity. *Nature Plants*, 7(6), 814-825.

Marín, O., González, B., & Poupin, M. J. (2021). From microbial dynamics to functionality in the rhizosphere: a systematic review of the opportunities with synthetic microbial communities. *Frontiers in Plant Science*, 12, 650609.

McCarty, N. S., & Ledesma-Amaro, R. (2019). Synthetic biology tools to engineer microbial communities for biotechnology. *Trends in biotechnology*, 37(2), 181-197.

Mukhopadhyay, T., & Bhattacharjee, S. (2016). Genetic Diversity: Importance and Measurements. *Conserving Biological Diversity: A Multiscaled Approach*. Research India Publications, New Delhi, 251-295.

Nevo, E., Beiles, A., & Ben-Shlomo, R. (1984). The evolutionary significance of genetic diversity: ecological, demographic and life history correlates. In *Evolutionary Dynamics of Genetic Diversity: Proceedings of*

a Symposium held in Manchester, England, March 29–30, 1983 (pp. 13-213). Springer Berlin Heidelberg.

Niehus, R., Mitri, S., Fletcher, A. G., & Foster, K. R. (2015). Migration and horizontal gene transfer divide microbial genomes into multiple niches. *Nature communications*, 6(1), 8924.

Nilsson, L., Lundmark, M., Jensen, P. E., & Nielsen, T. H. (2012). The Arabidopsis transcription factor PHR1 is essential for adaptation to high light and retaining functional photosynthesis during phosphate starvation. *Physiologia Plantarum*, 144(1), 35-47.

Niu, B., Paulson, J. N., Zheng, X., & Kolter, R. (2017). Simplified and representative bacterial community of maize roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(12), E2450-E2459.

Paasch, B. C., & He, S. Y. (2021). Toward understanding microbiota homeostasis in the plant kingdom. *PLoS Pathogens*, 17(4), e1009472

Panis, B., Nagel, M., & Van den Houwe, I. (2020). Challenges and prospects for the conservation of crop genetic resources in field genebanks, in in vitro collections and/or in liquid nitrogen. *Plants*, 9(12), 1634

Paries, M., & Gutjahr, C. (2023). The good, the bad, and the phosphate: regulation of beneficial and detrimental plant–microbe interactions by the plant phosphate status. *New Phytologist*.

Park, S., Kumar, P., Shi, A., & Mou, B. (2021). Population genetics and genome-wide association studies provide insights into the influence of selective breeding on genetic variation in lettuce. *The plant genome*, 14(2), e20086.

Persyn, A., Garcia Mendez, S., Beirinckx, S., De Meyer, S., Willems, A., De Tender, C., & Goormachtig, S. (2023). Digging into the lettuce cold-specific root microbiome in search of chilling stress tolerance-conferring plant growth-promoting bacteria. *Phytobiomes Journal*, (ja).

Poirier, Y., & Bucher, M. (2002). Phosphate transport and homeostasis in Arabidopsis. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 1.

Prasanna, B. M., Hossain, F., & Lal, R. (2020). Climate-resilient agriculture: Principles, approaches and challenges. *Journal of Experimental Botany*, 71(15), 4517-4525.

Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D., & Shankhdhar, S. C. (2021). Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 21, 49-68.

- Robinson, R. J., Fraaije, B. A., Clark, I. M., Jackson, R. W., Hirsch, P. R., & Mauchline, T. H. (2016). Wheat seed embryo excision enables the creation of axenic seedlings and Koch's postulates testing of putative bacterial endophytes. *Scientific Reports*, 6(1), 25581.
- Rouached, H., Arpat, A. B., & Poirier, Y. (2010). Regulation of phosphate starvation responses in plants: signaling players and cross-talks. *Molecular plant*, 3(2), 288-299.
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J. A., Hilal, M., & Prado, F. E. (2009). Soluble sugars: Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. *Plant signaling & behavior*, 4(5), 388-393.
- Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martín, A. C., Iglesias, J., Leyva, A., & Paz-Ares, J. (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes & development*, 15(16), 2122-2133.
- Russ, D., Fitzpatrick, C. R., Teixeira, P. J., & Dangl, J. L. (2023). Deep discovery informs difficult deployment in plant microbiome science. *Cell*, 186(21), 4496-4513.
- Salgotra, R. K., & Chauhan, B. S. (2023). Genetic diversity, conservation, and utilization of plant genetic resources. *Genes*, 14(1), 174.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., & Christou, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant biotechnology journal*, 9(3), 283-300.
- Schuman, M. C., & Baldwin, I. T. (2016). The layers of plant responses to insect herbivores. *Annual review of entomology*, 61, 373-394.
- Shayanthan, A., Ordoñez, P. A. C., & Oresnik, I. J. (2022). The role of synthetic microbial communities (syncom) in sustainable agriculture. *Frontiers in Agronomy*, 4, 58.
- Shenton, M., Iwamoto, C., Kurata, N., & Ikeo, K. (2016). Effect of wild and cultivated rice genotypes on rhizosphere bacterial community composition. *Rice*, 9, 1-11.
- Smith, F. W. (2002). The phosphate uptake mechanism. *Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities*, 235-244.
- Sohrabi, R., Paasch, B. C., Liber, J. A., & He, S. Y. (2023). Phyllosphere microbiome. *Annual Review of Plant Biology*, 74, 539-568.

Song, Y., Wilson, A. J., Zhang, X. C., Thoms, D., Sohrabi, R., Song, S., ... & Haney, C. H. (2020). Loss of a plant receptor kinase recruits beneficial rhizosphere-associated *Pseudomonas*. *BioRxiv*, 2020-11.

Sosa, A., Padilla, J., Ortiz, J., & Etchevers, J. D. (2012). Biomass accumulation and its relationship with the demand and concentration of nitrogen, phosphorus, and potassium in lettuce. *Communications in soil science and plant analysis*, 43(1-2), 121-133.

Sthapit Kandel, J., Peng, H., Hayes, R. J., Mou, B., & Simko, I. (2020). Genome-wide association mapping reveals loci for shelf life and developmental rate of lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 133, 1947-1966.

Swarup, S., Cargill, E. J., Crosby, K., Flagel, L., Kniskern, J., & Glenn, K. C. (2021). Genetic diversity is indispensable for plant breeding to improve crops. *Crop Science*, 61(2), 839-852.

Tam, V., Patel, N., Turcotte, M., Bossé, Y., Paré, G., & Meyre, D. (2019). Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics*, 20(8), 467-484.

Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., & Singh, B. K. (2020). Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature reviews microbiology*, 18(11), 607-621.

Upton, J. L., Zess, E. K., Bialas, A., Wu, C. H., & Kamoun, S. (2018). The coming of age of EvoMPMI: evolutionary molecular plant-microbe interactions across multiple timescales. *Current Opinion in Plant Biology*, 44, 108-116.

Versaw, W. K., & Garcia, L. R. (2017). Intracellular transport and compartmentation of phosphate in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 39, 25-30.

Walker, T. W., Alexander, J. M., Allard, P. M., Baines, O., Baldy, V., Bardgett, R. D., ... & Salguero-Gómez, R. (2022). Functional Traits 2.0: The power of the metabolome for ecology. *Journal of Ecology*, 110(1), 4-20.

Wang, E., Schornack, S., Marsh, J. F., Gobbato, E., Schwessinger, B., Eastmond, P., ... & Oldroyd, G. E. (2012). A common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants. *Current Biology*, 22(23), 2242-2246.

Wang, P., Snijders, R., Kohlen, W., Liu, J., Bisseling, T., & Limpens, E. (2021). Medicago SPX1 and SPX3 regulate phosphate homeostasis, mycorrhizal colonization, and arbuscule degradation. *The Plant Cell*, 33(11), 3470-3486.

Wang, X., Wang, H. F., Chen, Y., Sun, M. M., Wang, Y., & Chen, Y. F. (2020). The transcription factor NIGT1. 2 modulates both phosphate uptake and nitrate influx during phosphate starvation in Arabidopsis and maize. *Plant Cell*, 32(11), 3519-3534.

Wang, Y. P., Huang, Y., Augusto, L., Goll, D. S., Helfenstein, J., & Hou, E. (2022). Toward a global model for soil inorganic phosphorus dynamics: Dependence of exchange kinetics and soil bioavailability on soil physicochemical properties. *Global Biogeochemical Cycles*, 36(3), e2021GB007061.

Wang, Y., Wang, F., Lu, H., Liu, Y., & Mao, C. (2021). Phosphate uptake and transport in plants: an elaborate regulatory system. *Plant and Cell Physiology*, 62(4), 564-572.

Webber, H., Ewert, F., Olesen, J. E., Müller, C., Fronzek, S., Ruane, A. C., ... & Wallach, D. (2018). Diverging importance of drought stress for maize and winter wheat in Europe. *Nature communications*, 9(1), 4249.

Wei, T., Van Treuren, R., Liu, X., Zhang, Z., Chen, J., Liu, Y., ... & Liu, H. (2021). Whole-genome resequencing of 445 *Lactuca* accessions reveals the domestication history of cultivated lettuce. *Nature Genetics*, 53(5), 752-760.

Yamaji, N., Takemoto, Y., Miyaji, T., Mitani-Ueno, N., Yoshida, K. T., & Ma, J. F. (2017). Reducing phosphorus accumulation in rice grains with an impaired transporter in the node. *Nature*, 541(7635), 92-95.

Yang, S. Y., Grønlund, M., Jakobsen, I., Grotemeyer, M. S., Rentsch, D., Miyao, A., ... & Paszkowski, U. (2012). Nonredundant regulation of rice arbuscular mycorrhizal symbiosis by two members of the PHOSPHATE TRANSPORTER1 gene family. *The Plant Cell*, 24(10), 4236-4251.

Zak, D., Kronvang, B., Carstensen, M. V., Hoffmann, C. C., Kjeldgaard, A., Larsen, S. E., ... & Jensen, H. S. (2018). Nitrogen and phosphorus removal from agricultural runoff in integrated buffer zones. *Environmental science & technology*, 52(11), 6508-6517.

Zelezniak, A., Andrejev, S., Ponomarova, O., Mende, D. R., Bork, P., & Patil, K. R. (2015). Metabolic dependencies drive species co-occurrence in diverse microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(20), 6449-6454.

Zhang, W., Li, H., Zhang, J., Shen, J., Brown, H., & Wang, E. (2022). Contrasting patterns of accumulation, partitioning, and remobilization of biomass and phosphorus in a maize cultivar. *The Crop Journal*, 10(1), 254-261.

Zheng, Q. U., LI, Y. H., XU, W. H., CHEN, W. J., HU, Y. L., & WANG, Z. G. (2023). Different genotypes regulate the microbial community structure in the soybean rhizosphere. *Journal of Integrative Agriculture*, 22(2), 585-597.

Zieschank, V., & Junker, R. R. (2023). Digital whole-community phenotyping: tracking morphological and physiological responses of plant communities to environmental changes in the field. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1141554.

Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current opinion in immunology*, 20(1), 10-16.

MATERIALI SUPPLEMENTARI

I materiali supplementari possono essere visualizzati tramite il “link privato figshare” della piattaforma Figshare.

Materiali Supplementare S1: in questo file è disponibile la lista completa e dettagliata di tutte le *accession* di lattuga (*Lactuca sativa*) che sono state coltivate nell’azienda LandLab e successivamente utilizzate per le analisi condotte in questo studio.

<https://figshare.com/s/35bfa793c6769d259efe>

Materiale Supplementare S2: in questo file è presente una tabella in cui sono riportati i giorni delle fertirrigazioni, la quantità di nutrienti e di soluzione somministrata alle piante.

<https://figshare.com/s/bcad04fef00e00bc564f>

Materiale Supplementare S3: in questo link è presente una tabella con la lista delle radici delle piante trattate e non trattate che sono state campionate.

<https://figshare.com/s/b3aee4cfcc9c66f1938a>

Materiale Supplementare S4: In questo file sono presenti i genotipi che sono stati scelti per l’analisi dei metaboliti. Nella tabella, le colonne nominate “Significant” e “Close to significance” si riferiscono ai genotipi che sono risultati significati e vicini alla significatività dopo l’analisi del contenuto di fosfato fogliare. La colonna “After PCA” si riferisce ai genotipi di interesse che sono stati individuati dopo l’analisi delle componenti principali.

<https://figshare.com/s/a1237dce73b6ba088f61>

Materiale Supplementare S5: In questa cartella vengono riportate le immagini riguardanti la comparazione tra tutti i genotipi analizzati per i metaboliti e la loro concentrazione nella foglia, divisi per trattati e non trattati.

<https://figshare.com/s/bc6cdc0e6a1992aa2f26>