

♦ FERTILITAS ♦ AGRORUM ♦



Volume I • Dicembre 2006 • Numero 1

Convegno

Biostimolanti in agricoltura: aspetti agronomici, analitici, normativi

7-8 luglio 2006

Montegridolfo (RN)

Fertilitas Agrorum

Edizione a cura del
CENTRO SCIENTIFICO ITALIANO DEI FERTILIZZANTI

Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma

Periodico registrato presso il Tribunale di Roma il 03-08-2006
al n. 322/2006 del Registro della Stampa

ISSN 1971-0755

Direttore responsabile
PAOLO SEQUI

Segreteria scientifica
ELVIRA REA

Direttore editoriale
ROSA FRANCAVIGLIA

Grafica e impaginazione
ELEONORA LOMBARDI

Segreteria di redazione
FILIPPO ILARDI

Copertina a cura di
GIOVANNI GREGO

Indice

Presentazione - P. Sequi	5
I SESSIONE: Biostimolanti in agricoltura: problemi e prospettive (Moderatore: P. Sequi)	
Problematiche per l'inserimento dei biostimolanti nella legislazione dei fertilizzanti - C. Ciavatta, L. Cavani	11
I biostimolanti: uno strumento per migliorare la qualità delle produzioni - P. Vernieri, A. Ferrante, E. Borghesi, S. Mugnai	17
Effetti della biostimolazione in ortofrutticoltura: alcune esperienze a confronto - S. Tagliavini, C. Kubiskin	23
The experience of the first biostimulant, based on amino acids and peptides: a short retrospective review on the laboratory researches and the practical results - P. Maini	29
II SESSIONE: Biostimolanti in agricoltura: aspetti analitici e normativi I (Moderatore: N.S. di Pietraganzili)	
Metodi di determinazione dell'attività biostimolante - S. Nardi, A. Ertani, G. Concheri, D. Pizzeghello	47
Alle radici della biostimolazione: indagini scientifiche a supporto - F. Apone, S. Arciello, G. Colucci, L. Filippini, D. Portoso	55
Rizobatteri promotori di crescita: una nuova opportunità per l'agricoltura sostenibile - A. Linser, L. Cazzara, G. Barbieri	65
Valutazione dell'effetto biostimolante dalla camera di coltura al campo - A. Altissimo, L. Peserico, A. Zuin	77
The relationships among mineral nutrition, biostimulation and plant defense mechanisms: an example in citrus plants - JM ^a . Garcia-Mina	83
III SESSIONE: Biostimolanti in agricoltura: aspetti analitici e normativi II - (Moderatori: C. Ciavatta e G. Gagliano)	
Caratterizzazione delle proprietà biostimolanti di fertilizzanti di diversa origine mediante biosaggi - A. Benedetti, F. Baroccio	91
Attività della Commissione per i metodi di analisi dei fertilizzanti alla luce del D.Lgs. 29 aprile 2006: proposta per l'accertamento di frodi nel settore dei biostimolanti - G. Gagliano, R.M. Maestro	103

Presentazione

Nella tarda primavera del 2005 sono stato invitato dal Prof. Cristian Hera nella sua veste di Presidente del CIEC, International Scientific Centre of Fertilizers, ad esaminare la possibilità e l'opportunità di istituire una filiazione italiana dell'Associazione.

Ho considerato subito con interesse questa proposta, dato che in Italia manca una associazione scientifica espressamente dedicata ai fertilizzanti e che nessuna di quelle che più direttamente si occupano di materie affini è specificamente collegata ad una analoga organizzazione internazionale. Anche la IUSS, l'International Union of Soil Sciences, ha inspiegabilmente soppresso i gruppi di lavoro dedicati ai fertilizzanti.

Nell'autunno dello stesso anno l'associazione (Centro Scientifico Italiano dei Fertilizzanti) era formalmente costituita, con l'intento dichiarato non solo di potere esprimere il meglio della scienza nazionale sulla fertilizzazione, ma anche di dare un contributo di rilievo a quella internazionale. Non è davvero fuori luogo sottolineare questo secondo obiettivo: prima di tutto in memoria di un illustre agronomo, il prof. Franco Angelini, che aveva contribuito in misura determinante alla fondazione del CIEC in occasione di un memorabile convegno internazionale, tenutosi a Roma nel lontano 1933 con la partecipazione di delegati di 29 Paesi, ed in secondo luogo tenendo presenti le grandi potenzialità espresse dai ricercatori del nostro Paese negli ultimi decenni.

A distanza di circa un anno, siamo lieti di potere presentare il primo numero della rivista che rappresentava uno degli obiettivi ambiziosi e tutt'altro che segreti che ci eravamo proposti. La rivista, fin dall'inizio, è stata concepita on-line per risolvere una serie di problemi che hanno afflitto me personalmente insieme a tutti i collaboratori dell'associazione nelle loro precedenti esperienze del genere. Senza dovere ricapitolare questi sofferti problemi, devo subito dichiarare che con la pubblicazione on-line ci aspettiamo anche di ottenere una più ampia diffusione della rivista e delle informazioni in essa contenute.

Alla rivista sono ammessi contributi sia in lingua italiana che nelle altre lingue ufficiali del CIEC, con preferenza dichiarata per la lingua inglese. Anche se nella sua veste iniziale, come nel primo numero che trovate oggi disponibile, è destinata ad ospitare soprattutto lavori che derivano dai primi congressi dell'associazione italiana, la rivista nutre ben altre ambizioni e ritiene di potere presto esprimere almeno una buona parte di contributi internazionali di alto livello scientifico.

E' certamente opportuno ricapitolare nella presentazione della rivista anche alcune informazioni sull'attività del CIEC e della sua filiazione italiana fondata l'anno scorso.

Per quanto concerne l'attività internazionale del CIEC, quella congressuale comprende simposi internazionali e congressi mondiali. Essa solo episodicamente era stata seguita da ricercatori italiani prima del 2005, come nel simposio internazionale di Pretoria immediatamente precedente alla costituzione dell'associazione nazionale ed al quale aveva partecipato il dr. Francesco Montemurro. La situazione è cambiata subito dopo l'istituzione, con il 14mo Congresso Mondiale dei Fertilizzanti di Chiang Mai in Thailandia. Come è noto agli specialisti del settore il Congresso aveva per tema "Fertilizers and Fertilization: Stewardship for Food Security, Food Quality, Environment and Nature Conservation", ed ha avuto luogo dal 22 al 27 gennaio 2006, con una significativa partecipazione nazionale ed internazionale, oltre che con eccellenti manifestazioni pre e post-congressuali. E' importante ricordare l'impegno non comune degli organizzatori, che si sono anche prodigati per agevolare la partecipazione dei nostri rappresentanti, tutti in ritardo per la cronaca rispetto alle scadenze ufficialmente previste. Il prossimo congresso internazionale è previsto a Gent in Belgio dal 16 al 19 settembre 2007 ed avrà per tema "Mineral versus Organic Fertilization: Conflict or Synergism?"; c'è da aspettarsi che riscuota un vero successo.

Le iniziative pubbliche nazionali comprendono l'organizzazione di seminari e di convegni. Fra i seminari organizzati non si può non citare quelli tenuti l'8 e 9 maggio 2006 a Roma dal Prof. Ewald Schnug e dalla Prof.ssa Silvia Haneklaus, rispettivamente Direttore e Senior Scientist dell'Istituto per la Nutrizione delle Piante e la Scienza del Suolo di Braunschweig del FAL (Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft), oltre che vice Presidente e Segretario dell'International Scientific Centre of Fertilizers (CIEC), sui temi "Issues of sustainability in fertilization – a critical review", "Is there a future for soil fertility research?" e "Interaction between sulphur and plant disease", i primi due dal prof. Schnug ed il terzo dalla dr.ssa Haneklaus.

Fra i convegni nazionali il decollo è avvenuto proprio con quello sui biostimolanti tenutosi a Montegridolfo (Rimini) il 7 e 8 luglio 2006, le cui comunicazioni formano l'oggetto di questo primo numero della rivista. Un secondo convegno ha avuto per oggetto "Il compost in Italia e nel bacino del Mediterraneo: l'evoluzione delle politiche europee ed i criteri di qualità del prodotto", e si è tenuto a Roma presso la sala riunioni dell'UCEA il 21 e 22 settembre 2006. Il prossimo convegno è previsto a Milano presso la Sala Napoleonica del Rettorato dell'Università degli Studi il 18 e 19 gennaio 2007 sul tema "I substrati culturali: sviluppi qualitativi, tecnici, legislativi e commerciali".

Fra le altre iniziative previste dal Centro Scientifico Italiano dei Fertilizzanti c'è la pubblicazione di notiziari e manuali di particolare interesse per il settore: il primo, un testo coordinato dei Metodi di Analisi dei Fertilizzanti, è già in stampa e sarà presto pubblicato con il contributo finanziario determinante del Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali e immediatamente disponibile per la distribuzione fra tutti gli esperti del settore. C'è da dire che l'Associazione intende privilegiare il più possibile iniziative di diffusione on-line piuttosto che a stampa o comunque su supporto cartaceo.

Come la rivista, questa rivista che come è stato detto poco fa rappresenta uno degli obiettivi prioritari e più ambiziosi e che viene realizzata, come auspicavamo, contemporaneamente al sito web. La rivista nasce con lo scopo di pubblicare lavori scientifici e tecnici originali nel campo dei fertilizzanti, riguardanti in particolare la nutrizione delle piante, i cicli degli elementi nutritivi, le metodologie di analisi dei fertilizzanti e di determinazione della fertilità, le tecnologie di produzione e di impiego, il riciclo delle biomasse e dei rifiuti.

Obiettivo prioritario della rivista è quello di promuovere l'interazione tra i ricercatori e i tecnici del settore, nell'ottica di un miglioramento dei processi produttivi e di utilizzazione dei fertilizzanti.

Il tipo di contributi pubblicati sarà vario e comprenderà non solo pubblicazioni scientifiche, che dovranno riportare risultati di ricerche originali, ma anche rassegne e note su tecniche sperimentali. Potranno essere oggetto di pubblicazione sia lavori estesi che brevi note; gli articoli dovranno essere originali, non già pubblicati o in fase di pubblicazione su altre riviste.

Fertilitas Agrorum sarà provvista di un comitato scientifico ed è prevista una cadenza inizialmente trimestrale. Il mio ringraziamento va a tutti coloro che si sono prodigati per la Società e per la Rivista, a partire per quanto riguarda la Società dalla Dr.ssa Elvira Rea che ne cura la Segreteria Scientifica, con la collaborazione diretta di Anna Salerno e di Simona Rinaldi, alla Dr.ssa Rosa Francaviglia che si occupa della parte editoriale con la collaborazione di Eleonora Lombardi per la grafica e l'impaginazione e di Filippo Ilardi per la segreteria di redazione. Benvenuta, rivista, e buona fortuna editoriale!

Paolo Sequi

Introduction

One year ago or something more, late spring 2005, I was invited by my old friend Professor Cristian Hera, as President of CIEC, the International Scientific Centre of Fertilizers, to found an Italian branch of the Society.

I have immediately considered with a great interest this suggestion. In Italy there was no scientific association devoted to fertilizer science. Furthermore, no scientific association devoted to the topic is actually linked to any international organization. Even the IUSS, i.e. the International Union of Soil Sciences, has inexplicably cancelled from its internal structure the working groups related to fertilizers.

During the fall of the same year the Italian national branch (Centro Scientifico Italiano dei Fertilizzanti – Italian Scientific Fertilizer Centre) was formally established with the official aim not only to express the best of the national knowledge, but to give a contribution to international advances in the field. We cannot forget such last objective. This, first of all, in memory of professor Franco Angelini, an Italian agronomist whose contribution was essential during the foundation of CIEC in occasion of an unforgettable international congress held in Rome in the remote year 1933, with the participation of scientists from 29 different countries. Secondly, the institution of the Italian branch was important taking into account the peculiar evolution of Italian research in the field during the last decades.

After about one year, I am proud to introduce the first issue of the journal which is one among the several ambitious aims the new scientific society had declared to pursue. Our journal, right from the start, was conceived on-line to be able to solve a series of problems which troubled the society fellows and myself in similar previous experiences. Even without summarizing such problems, I should like to mention that we expect a wider diffusion of the journal and the related information by a publication on-line.

Scientific contributions will be hosted in the journal if written in Italian and in the other official languages of CIEC, but English will be recommended in the future. Initially, as in this first issue, the journal will be often intended for hosting contributions from the first meetings of the Italian society. However, it aims to further targets, and foresees to be able soon to express high scientific level international papers.

It seems advisable in this introduction to outline a draft of the activities of CIEC and its Italian national branch.

CIEC activity includes international symposia and world fertilizer congresses. An attendance by Italian scientists was only episodically recorded before 2005, as in the international symposium held in Pretoria, South Africa. The situation changed after the institution of the Italian national branch at the 14th World Fertilizer Congress held in Chiang Mai, Thailand, held from 22nd to 27th January 2006. The Congress theme was “Fertilizers and Fertilization: Stewardship for Food Security, Food Quality, Environment and Nature Conservation”; the Italian and international participation were noteworthy, and the general organisation excellent. The next international Symposium will take place in Ghent, Belgium, from 16th to 19th September 2007 on the general theme “Mineral versus Organic Fertilization: Conflict or Synergism?”.

The activities of the Italian national branch include organization of seminars and meetings. Among the seminars some of them remain memorable for me: those held in Rome on 8th and 9th May 2006 by Professors Ewald Schnug (“Issues of sustainability in fertilization – a critical review“, “Is there a future for soil fertility research?“ and Silvia Haneklaus (“Interaction between sulphur and plant disease“). As known, they are Director and Senior Scientist of the Institute for Plant Nutrition and Soil Science of Braunschweig, FAL (Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft), as well as vice-President and Secretary of CIEC, respectively. Among the national meetings, the first was held at Montegrifoglio (Rimini) on 7th and 8th July 2006, and the communications presented at the same meeting are reported here, on the first issue of the journal. A second meeting was held in Rome on 21st and 22nd September 2006 on the theme “Compost in Italy and in the Mediterranean basin: the evolution of related European legislation and quality criteria”. The next meeting will be held in Milan on 18th and 19th January.

Among the other activities the most important could be this journal. It aims to promote exchanges among the scientists in the field. Submission of scientific papers is solicited, both as research notes and as reviews.

Only original contributions will be considered for publication.

Welcome, Fertilitas Agrorum!

Paolo Sequi

I SESSIONE: Biostimolanti in agricoltura: problemi e prospettive

(Moderatore: Paolo Sequi)

Problematiche per l'inserimento dei biostimolanti nella legislazione dei fertilizzanti

Claudio Ciavatta *, Luciano Cavani

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Italy

*Corresponding author: Claudio Ciavatta, viale Fanin, 40 - 40127 Bologna (Italy);

Tel. +39 051 2096201, Fax +39 051 2096203; e-mail: claudio.ciavatta@unibo.it

Riassunto

Le piante possono migliorare la nutrizione, superare stati temporanei di stress biotici e abiotici attraverso l'assorbimento radicale o l'azione a livello della rizosfera di sostanze, ad esempio, umiche che possono migliorare la struttura e la consistenza degli apparati radicali. Anche gli apparati fogliari possono assorbire molecole organiche di piccole dimensioni come amminoacidi, peptidi a bassa massa molecolare che possono migliorare, favorire o regolare l'assorbimento degli elementi nutritivi o correggono determinate anomalie di tipo fisiologico. A queste azioni, di tipo ormono-simile (hormone-like), può essere attribuito il termine di "biostimolazione" e ai fertilizzanti che, oltre ad apportare elementi della fertilità, esplicano tali azioni accessorie "fertilizzanti ad azione biostimolante".

Il mercato offre numerosi prodotti che dichiarano "attività biostimolante". La maggior parte dei quali attribuisce dette proprietà alla presenza di acidi umici, amminoacidi e peptidi.

La normativa in materia aveva completamente trascurato questi prodotti, ma con il Decreto Legislativo 29 aprile 2006 n. 217 "Revisione della disciplina in materia di fertilizzanti" (G.U. n. 141 del 20 giugno 2006 --Suppl. Ord. n. 152), è stato finalmente colmato questo vuoto. Nell'Allegato 6 "Prodotti ad azione specifica" sono stati inseriti anche i "Biostimolanti": "Prodotti che apportano ad un altro fertilizzante e/o al suolo e/o alla pianta, sostanze che favoriscono o regolano l'assorbimento degli elementi nutritivi o correggono determinate anomalie di tipo fisiologico".

E' opportuno ricordare che l'attività biostimolante non deve derivare dall'aggiunta di sostanze ad azione fitormonale (All. 6, comma 4.1). In altri termini, un fertilizzante con "attività biostimolante" deve contribuire positivamente al miglioramento della nutrizione e allo sviluppo delle specie vegetali, indipendentemente dalla presenza degli elementi nutritivi, con l'esclusione dei fitoregolatori, la cui presenza è vietata, e dei prodotti con dichiarata e specifica funzione fitosanitaria.

Il riconoscimento di tale attività, ai sensi del D.Lgs. 217/06, necessita di metodi di analisi ufficiali per la completa caratterizzazione fisico-chimica dei singoli prodotti, nonché per il controllo dell'attività biostimolante dichiarata, oltre che di prove agronomiche che ne provino l'efficacia in campo.

Il corretto inserimento dei prodotti "biostimolanti" nella legislazione dei fertilizzanti è alla base per la massima tutela del consumatore e del produttore.

Parole chiave: Biostimolanti, Attività biostimolante, Fertilizzanti, D.Lgs. n. 217/06

Abstract

Some organic molecules such as humic substances, amino acids, peptides can improve the root system, absorption of nutrients and consequently positively affect plant growth. Temporary biotic and abiotic stress can be exceeded by means of such molecules spread on foliar apparatus. Such hormone-like actions can be called "biostimulation" and to the mineral or organic fertilizers amendments characterized by those additional actions respect their content of nutrients "fertilizers with biostimulant effect".

In the market there are many products that declare "biostimulant activity". The greater part of which attributes such a property to the presence of humic acids, amino acids and peptides.

In the recent past the Italian and European law rules had completely neglected these products. Recently the Italian Legislative Decree 29th April, 2006 N° 217 "Revisione della disciplina in materia di fertilizzanti - Review of the discipline in fertilizer matter" (G.U. n. 141 of the 20th June, 2006 - Suppl. Ord. N° 152), has finally overwhelmed this lack. In Attached 6 "Prodotti ad azione specifica - Products with specific action" they have been inserted also the "Biostimolanti - Biostimulants": "Products that brings to other fertilizer and/or to the soil and/or to the plant, substances that favour or regulate the absorption of the nutrients or correct some physiological anomalies".

It must be remind that the biostimulant activity does not have to derive from the addition of phytohormones (Attached 6, codicil 4.1). In other words, a fertilizer with "biostimulant activity" must contribute positively to the improvement of the nutrition and the development of the plants, independently from the presence of the nutrients, with the exclusion of the phytohormones, whose presence is prohibited, and of the products with declared and specific phytosanitary function.

The measurement of such activity, according to of the Legislative Decree 29th April, 2006 N° 217, needs official methods of analyses for the complete physical and chemical characterization of the single product, such as for the control of the declared biostimulant activity, together with agronomic tests demonstrating the biostimulant action in field conditions.

The corrected insertion of the “biostimulant products” in the legislation of fertilizers is the absolute condition for the maximum protection of the consumer and the producer.

Key words: Biostimulants, Biostimulant activity, Fertilizers, D.Lgs. n. 217/06

Il passato

L’inserimento dei biostimolanti nella legislazione dei fertilizzanti ha da sempre presentato tutta una serie di problematiche, talora insuperabili, a cominciare da quelle di ordine legislativo, fino al 5 luglio 2006, data dell’entrata in vigore del Decreto Legislativo 29 aprile 2006 n. 217 (D.Lgs. 217/06) “Revisione della disciplina in materia di fertilizzanti”, pubblicato sulla G.U. n. 141 del 20 giugno 2006 – Suppl. Ordinario n. 152. Fino a quella data, come tutti ricorderanno, la Legge 19 ottobre n. 748 (Legge 748/84, contestualmente abrogata) non prevedeva alcuna categoria merceologica specifica per i “Biostimolanti” e quindi un loro inserimento negli allegati era da sempre risultato quanto mai problematico. Appare superfluo ricordare che neppure nessun aiuto poteva arrivare dalla legge europea.

Dell’esigenza di normare ai sensi della legge sui fertilizzanti questo settore si era iniziato a parlare dai primi anni ’90, ma solo con la costituzione del Gruppo di Lavoro “Chelanti e Biostimolanti” in seno alla Commissione Tecnico Consultiva per i Fertilizzanti, di cui all’Art. 10 della Legge 748/84, era stato formalmente dato l’incarico di verificarne la fattibilità, individuando il possibile percorso per l’inserimento negli Allegati.

Il compito che si presentò al Gruppo di Lavoro Chelanti e Biostimolanti il 12 luglio 1995, data della prima riunione, apparve da subito ostico non solo per la materia tecnica in sé, ma anche per la scarsa apertura d’inserimento negli allegati che la Legge 748/84 permetteva.

Innanzitutto occorre stabilire 1) quali fossero i prodotti in questione, 2) quale termine fosse più appropriato per descriverne le proprietà nella cornice della Legge 748/84, 3) quale fosse la definizione migliore, 4) quali modalità occorreva percorrere per l’inserimento in legge e soprattutto 5) quali metodi analitici occorre per il loro controllo.

Nel corso delle riunioni apparve sin da subito che il termine migliore potesse essere quello di “Biostimolante” e nel 1999 si arrivò alla seguente definizione “Per biostimolante si intende qualsiasi

prodotto naturale o sintetico, minerale od organico caratterizzato da diverse azioni e modalità d’uso in grado di contribuire positivamente al miglioramento della nutrizione e allo sviluppo delle specie vegetali” che apparve abbastanza esaustiva e completa. Si ritenne inoltre necessario ribadire che nei fertilizzanti con proprietà biostimolanti “Non rientrano in questa categoria i fitoregolatori ed i prodotti con dichiarata e specifica funzione fitosanitaria”.

Con il Decreto Ministeriale (D.M.) 7 dicembre 2001 vi fu il primo atto legislativo dove apparve ufficialmente nelle Premesse degli Allegati I.B. e I.C. della Legge 748/84 il termine “Biostimolante”. Infatti, il citato D.M. stabilì che “I prodotti ad attività biostimolante sono inseriti nell’elenco dei concimi nazionali o concimi, previa approvazione da parte della competente autorità del relativo metodo di analisi. Per tali prodotti è obbligatorio descrivere in etichetta dosi di impiego e modalità d’uso”.

Lo scoglio che ha di fatto bloccato in questi anni l’inserimento di qualsiasi prodotto in legge è stato la mancanza di un metodo ufficiale per l’accertamento e la determinazione (quali-quantitativa) dell’attività biostimolante. La normativa non poteva consentire l’inserimento di prodotti senza la possibilità di controllo delle proprietà biostimolanti da parte dell’autorità competente.

Il presente

Con la pubblicazione del D.Lgs. 217/06 molti degli ostacoli relativi alla normativa precedente sono stati superati, anche se altri ne sono rimasti.

Innanzitutto l’Art. 2. del decreto recante “Definizioni” recita:

“1. Ai sensi del presente decreto si intendono per «fertilizzanti» qualsiasi prodotto o materiale di seguito definito: omissis

cc) «prodotti ad azione specifica»: i prodotti che apportano ad un altro fertilizzante e/o al suolo e/o alla pianta, sostanze che favoriscono o regolano l’assorbimento degli elementi nutritivi o correggono determinate anomalie di tipo fisiologico, i cui tipi e caratteristiche sono riportati nell’allegato 6.

Pertanto all'Allegato 6 si riportano tipi e caratteristiche dei "prodotti ad azione specifica" fra i quali anche i Biostimolanti: "Prodotti che apportano ad un altro fertilizzante e/o al suolo e/o alla pianta, sostanze che favoriscono o regolano l'assorbimento degli elementi nutritivi o correggono determinate anomalie di tipo fisiologico".

In particolare, al comma 4. si fa riferimento ai "Prodotti ad azione su pianta" e al punto 4.1 proprio ai "Biostimolanti" (tab. 1).

La legge, molto opportunamente, impone che "Per tali prodotti è obbligatorio descrivere in etichetta dosi da impiegare e modalità d'uso". Essendo prodotti che esplicano la loro attività a dosi molto più basse rispetto ai tradizionali concimi e le modalità d'uso possono cambiare in relazione alla specie vegetale, allo stato fenologico della pianta, al clima, e così via, è assolutamente necessario fissare dosi e modalità d'uso al fine di ottimizzarne l'impiego.

Un altro aspetto importante che è stato fissato riguarda la questione della presenza di fitormoni. A tale riguardo il decreto 217/06 stabilisce che "L'attività biostimolante non deve derivare dall'aggiunta di sostanze ad azione fitormonale al prodotto". Si tratta di una precisazione molto importante in quanto, sebbene è del tutto chiaro che non si possono in alcun modo aggiungere principi attivi riconducibili a fitormoni, è d'altro canto ragionevole avere utilizzato l'allocuzione "dall'aggiunta" piuttosto che "dalla presenza", in quanto estratti di origine vegetale possono contenere naturalmente fitormoni.

Per quanto riguarda la possibilità di procedere a miscele di prodotti con attività biostimolante con altri fertilizzanti, decreto 217/06 è altrettanto chiaro: Salvo approvazione della Commissione tecnico consultiva di cui all'Art. 9, non è consentito dichiarare proprietà biostimolanti alle miscele dei prodotti di questa sezione con altri fertilizzanti. In altri termini, le proprietà biostimolanti di un fertilizzante non possono essere trasferite sic et simpliciter ad una miscela, ma devono essere comprovate da prove sperimentali ex novo. In questo senso poi sarà compito della Commissione tecnico consultiva procedere ad esaminare la nuova istanza.

All'atto dell'entrata in vigore del decreto 217/06 le proprietà biostimolanti sono dichiarabili solo per 2 prodotti: N. 1 - Idrolizzato proteico di erba medica e N. 2 - Eptelio animale idrolizzato (solido e fluido), le cui specifiche tecniche ed agronomiche di legge sono riportate nella tabella 1.

Il futuro

Il lavoro da farsi sarà sicuramente notevole, certamente non sempre agevole, e interesserà fondamentalmente le aziende e la commissione Tecnico-consultiva per i fertilizzanti (Art. 9 del D.Lgs. 217/06) e la

Commissione Metodi di analisi per i fertilizzanti (Art. 44 della legge 20 febbraio 2006, n. 82).

Le aziende saranno impegnate a preparare i dossier per le istanze d'introduzione di nuovi prodotti nell'allegato 6 del D.Lgs. 217/06, ovvero per la modifica degli allegati stessi. A tale fine le istanze per l'inserimento di nuovi fertilizzanti dovranno essere istruite secondo quanto previsto nell'Allegato 10 (art. 10, comma 1, D.Lgs. 217/06)¹. In questo senso risulteranno fondamentali:

la caratterizzazione fisico-chimica dei prodotti ad azione biostimolante, per l'indicazione dei parametri da determinare ai fini della completa individuazione (una sorta di carta d'identità del prodotto);

le prove agronomiche, volte a dimostrare la reale efficacia biostimolante del prodotto: dovranno possibilmente fare riferimento a situazioni pedo-agronomico-climatiche nazionali e condotte da Enti e strutture terze (pubbliche e private) con provata esperienza nel settore della sperimentazione in agricoltura;

la presentazione di uno o più metodi analitici per la determinazione dell'attività biostimolante in laboratorio. Si dovrà trattare di metodi convalidati (normati o meno) dei quali sono stati studiati: la specificità, la linearità, l'accuratezza, la precisione, l'intervallo di lavoro, il limite di determinazione, il limite di quantificazione e la robustezza.

Si tratta di punti chiave da osservare per l'inserimento di nuovi prodotti. A questo proposito si ricorda che qualsiasi pubblicazione scientifica, soprattutto se su riviste a diffusione internazionale, a supporto dell'istanza è oltremodo gradita.

La completa conoscenza dei prodotti è alla base della tracciabilità dei fertilizzanti, così come chiaramente descritto all'Art. 8 del D.Lgs. 217/06 "Tracciabilità", dove vengono istituiti 2 Registri:

1. Ai fini della tracciabilità dei prodotti di cui al presente decreto, sono istituiti presso il Ministero delle politiche agricole e forestali, Direzione generale per la qualità dei prodotti agroalimentari, il «**Registro dei fertilizzanti**» di cui all'allegato 13, che contiene una sezione specifica per quelli consentiti in agricoltura biologica, ed il «**Registro dei fabbricanti di fertilizzanti**» di cui all'allegato 14. L'iscrizione al Registro dei fabbricanti di fertilizzanti deve essere richiesta dal fabbricante prima dell'immissione del fertilizzante sul mercato. L'iscrizione al Registro dei fertilizzanti deve essere richiesta dal fabbricante prima dell'immissione del fertilizzante sul mercato limitatamente ai fertilizzanti di cui agli allegati 1, 2, 3, 4, 5 e 6.
2. Fatto salvo quanto previsto dall'articolo 7, commi 2 e 3, il fabbricante per garantire la tracciabilità dei concimi CE e degli altri fertilizzanti,

conserva registrazione sull'origine dei concimi. Essa è messa a disposizione degli Stati membri per fini ispettivi, fintantoché il concime è immesso sul mercato e per altri due anni dopo che il fabbricante ne ha cessato l'immissione sul mercato.

3. Il Ministero delle politiche agricole e forestali, sentita la Commissione tecnico-consultiva per i fertilizzanti di cui all'articolo 9, provvede alle iscrizioni nel Registro dei fertilizzanti e nel Registro dei fabbricanti di fertilizzanti.
4. L'istituzione, la gestione e la conservazione dei Registri di cui al comma 1, si effettuano da parte del Ministero delle politiche agricole e forestali con le risorse umane e strumentali già disponibili a legislazione vigente e senza nuovi o maggiori oneri a carico del bilancio dello Stato.

Dalla qualità del lavoro che si riuscirà a fare a livello nazionale, dipenderà anche la possibilità di avanzare la legittima richiesta di chiedere l'inserimento di questa categoria di prodotti anche nella legislazione europea sui fertilizzanti.

Conclusioni

L'entrata in vigore del Decreto Legislativo 29 aprile 2006 n. 217 "Revisione della disciplina in materia di fertilizzanti" è l'atto indispensabile per fare chiarezza nel mercato dei prodotti ad azione biostimolante. L'Allegato 6 "Prodotti ad azione specifica" e per quei "Prodotti che apportano ad un altro fertilizzante e/o al suolo e/o alla pianta, sostanze che favoriscono o regolano l'assorbimento degli elementi nutritivi o correggono determinate anomalie di tipo fisiologico" rappresenta il necessario contenitore da utilizzare per l'inserimento dei "biostimolanti". Le aziende che intenderanno procedere in tale senso dovranno produrre la documentazione che a) dimostri l'efficacia agronomica del prodotto, b) riporti la caratterizzazione fisico-chimica, c) alleghi i

necessari metodi analitici sia per la caratterizzazione fisico-chimica, sia del test per la misura dell'attività biostimolante. Il settore analitico rappresenterà uno dei punti chiave dell'intero iter: nessun prodotto potrà essere inserito in legge se non sarà corredato dai metodi di analisi che dovranno rispondere agli standard minimi di ripetibilità e riproducibilità al fine della loro ufficializzazione. Si tratta di un percorso obbligato senza il quale non si potrà dare il giusto riconoscimento né ai prodotti con azione biostimolante, né ai prodotti fertilizzanti più in generale. Solo così il settore potrà acquisire ulteriore credibilità a livello nazionale e guardare con fiducia verso l'Europa e i mercati internazionali.

Note

1. **Art. 10.** Inserimento di nuovi fertilizzanti e modifiche degli allegati.

1. All'inserimento di nuovi concimi nazionali, ammendanti, correttivi, substrati di coltura, matrici organiche, prodotti ad azione specifica, rispettivamente negli allegati 1, 2, 3, 4, 5 e 6, alla definizione di nuovi tipi di fertilizzanti ed alle altre modifiche degli allegati 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14 si provvede con decreto del Ministro delle politiche agricole e forestali, previo parere della Commissione tecnico-consultiva per i fertilizzanti di cui all'articolo 9.

2. La domanda di inserimento di nuovi prodotti o la richiesta di definizione di nuovi tipi deve essere inoltrata al Ministero delle politiche agricole e forestali, corredandola della necessaria documentazione tecnica, di cui all'allegato 10, nonché della specifica indicazione dei metodi di analisi. I metodi presentati a corredo della domanda devono essere visionati dalla Commissione di cui all'articolo 44 della legge 20 febbraio 2006, n. 82, al fine di verificarne l'applicabilità al prodotto in corso di inserimento ed iniziare o meno l'attività necessaria per la successiva ufficializzazione.

Tabella 1. Specifiche tecniche ed agronomiche per i prodotti biostimolanti attualmente in legge.

Table 1. Technical and agronomical properties of the biostimulants actually regulated by the D.Lgs. 217/06 (Italy).

4 Prodotti ad azione su pianta

4.1 Biostimolanti

Le proprietà biostimolanti sono dichiarabili solo per i prodotti sottoelencati. Per tali prodotti è obbligatorio descrivere in etichetta dosi di impiego e modalità d'uso.

L'attività biostimolante non deve derivare dall'aggiunta di sostanze ad azione fitormonale al prodotto.

Salvo approvazione della Commissione tecnico consultiva di cui all'Art. 9, non è consentito dichiarare proprietà biostimolanti alle miscele dei prodotti di questa sezione con altri fertilizzanti.

N.	Denominazione del tipo	Modo di preparazione e componenti essenziali	Titolo minimo in elementi e/o sostanze utili. Criteri concernenti la valutazione. Altri requisiti richiesti	Altre indicazioni concernenti la denominazione del tipo	Elementi e/o sostanze utili il cui titolo deve essere dichiarato. Caratteristiche diverse da dichiarare. Altri requisiti richiesti	Note
1	2	3	4	5	6	7
1.	Idrolizzato proteico di erba medica	Prodotto ottenuto per idrolisi enzimatica di un estratto proteico di erba medica a base di amminoacidi e peptidi	15% C organico 4,5% N organico 28% amminoacidi totali 3,5% amminoacidi liberi		C organico di origine biologica N organico Amminoacidi totali Amminoacidi liberi	Il rapporto: (Alanina + Glicina)/(Prolina + acido glutammico) non deve discostarsi sensibilmente dall'unità(*) Il prodotto presenta proprietà biostimolanti
2.	Epitelio animale idrolizzato (solido o fluido)	Residui di epitelio animale provenienti da concerie e da macelli, idrolizzati con acidi minerali	4% N Azoto valutato come azoto organico, di cui almeno 1% azoto organico solubile 15% C organico Rapporto C/N: non superiore a 6		Azoto organico Azoto organico solubile C organico Rapporto C/N	Peso molecolare medio degli idrolizzati proteici. Rapporto glicina/(prolina+idrossiprolina)=1,1 Grado di idrolisi sul secco > 330(**) Amminoacidi liberi > 10% Il prodotto presenta proprietà biostimolanti



linea Speed

Migliora la qualità delle tue produzioni

Prodotti fogliari a base di Aminoacidi, microelementi e sostanze nutritive ideali per sostenere la pianta nei momenti di stress ed aumentarne le potenzialità produttive.



I prodotti hanno un'azione specifica in funzione della fase fenologica.

- **Sinergon 2000**
Universale
Contro gli stress da trattamenti antiparassitari
- **Ert 23**
Fioritura
Favorisce la fecondazione e l'allegagione dei frutti
- **Cifamin BK**
Ingressamento frutti
Favorisce lo sviluppo e l'accrescimento
- **Biolight**
Invaletatura frutti
Favorisce la colorazione, l'aroma e il contenuto zuccherino
- **Algacifo 3000**
Universale
Estratti vegetali e alghe brune utili per ogni situazione
- **Macys BC 28**
Ingressamento frutti
Le alghe verdi che migliorano la pezzatura di frutta e ortaggi



www.cifo.it info@cifo.it

Al vostro fianco per un'agricoltura ragionata

I biostimolanti: uno strumento per migliorare la qualità delle produzioni

Paolo Vernieri ^{1*}, Antonio Ferrante ², Eva Borghesi ¹, Sergio Mugnai ³

1: Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie - Università di Pisa

2: Dipartimento di Produzione Vegetale - Università di Milano

3: Dipartimento di Ortoflorofrutticoltura - Università di Firenze

* Corresponding Author: Viale delle Piagge 23, 56124 Pisa, Tel. +39 050 2216522, e-mail: pvernier@agr.unipi.it

Riassunto

I biostimolanti sono mezzi tecnici che possono incrementare la produzione delle colture agrarie in termini qualitativi, migliorando l'efficienza d'uso degli elementi nutritivi e, in taluni casi, aumentando la resistenza agli stress di natura biotica e abiotica. Questi prodotti possono quindi rappresentare un valido strumento per ridurre l'impatto ambientale delle colture ortofloricole coltivate in ambiente protetto. Il meccanismo di azione di questi composti è basato sull'aumento dell'attività metabolica delle piante e il risultato della loro applicazione è spesso un aumento della produzione e della qualità del prodotto. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di verificare l'effetto del biostimolante Actiwave (Valagro S.p.A.) sulla crescita di tre specie floricole da bordura: *Coleus blumei*, *Impatiens wallerana* e *Salvia splendens*.

Le piante sono state mantenute per tutta la durata della prova in una serra in ferro e vetro, con una temperatura di 25°/18°C giorno/notte. Sono stati effettuati i seguenti trattamenti: concimazione al momento del ripicchettamento, aggiungendo al substrato: (g m⁻³) Nitrato-NO₃ 70, Ammonio-NH₄ 50, Fosforo-P₂O₅ 208, Potassio-K₂O 240, MgO 24, microelementi 50, (Controllo); trattamento a cadenza settimanale con una soluzione nutritiva contenente le stesse concentrazioni di macro e microelementi presenti nel biostimolante, senza la concimazione iniziale; trattamento a cadenza settimanale con biostimolante, senza la concimazione iniziale; trattamento a cadenza settimanale con biostimolante, con concimante iniziale come per le piante di controllo. Il biostimolante è stato distribuito per aspersione alla concentrazione di 2,5 mL L⁻¹, a partire dalla settimana dopo il ripicchettamento fino alla fioritura delle piante (8 settimane).

I risultati ottenuti hanno mostrato una crescita decisamente più veloce delle piante trattate, che si è tradotta in un aumento dell'area fogliare, del peso fresco e secco. L'accumulo di biomassa nella parte epigea è risultato quasi doppio rispetto ai controlli. Dal punto di vista qualitativo, le piante trattate con il biostimolante hanno presentato una fioritura più precoce e più abbondante rispetto al testimone. I dati vengono discussi cercando di discriminare l'effetto biologico (biostimolante) del prodotto da quello nutrizionale.

Parole chiave: *Coleus*, *Impatiens*, *Salvia*, piante da bordura, Actiwave.

Biostimulants: a tool for improving quality and yield

Abstract

Biostimulants can be used in agriculture for improving yield, quality of crops or growing techniques. Floricultural crops have to face with a global and highly competitive market. Therefore, external quality, visual appearance and performance are extremely important. In the meantime these crops are grown in protect environments, with high input of chemicals that lead to air and water pollution. Biostimulants can be an useful tool for a more sustainable agriculture, even for floriculture items, which are always classified as intensive and with high environmental impact.

The aim of this work was to evaluate the effect of the biostimulant Actiwave (Valagro S.p.A., Piazzano di Atessa, Chieti, Italy), product covered by an international patent EPA (European patent Application) on yield and quality of three bedding plants: *Coleus blumei*, *Impatiens wallerana* and *Salvia splendens*.

Trials were performed in a commercial nursery (Az. Agr. Biricotti, Livorno, Italy) during Spring 2005, on seedlings transplanted into polyethylene pots (8 cm diameter) filled with a commercial peat-based substrate. Treatments were: plants grown in substrate fertilized by adding (g m⁻³) Nitrate-NO₃ 70, Ammonium-NH₄ 50, Phosphorus-P₂O₅ 208, Potassium-K₂O 240, MgO 24, microelements 50 (control); plants treated with nutrient solution containing only the same concentration of macro and microelements present in the biostimulant; plants treated with Actiwave without any further fertilization; plants grown in fertilized substrate plus biostimulant. Actiwave was applied weekly as foliar spray at the concentration of 2.5 mL L⁻¹.

The nutritional and biological effects of Actiwave were investigated. The growth analysis showed that the biostimulant significantly increased the leaf area, fresh and dry weight of all the investigated species. In particular in *Impatiens wallerana* a three-fold increase in leaf area values was observed, and the dry matter accumulation was almost doubled. Moreover, in *Impatiens* and *Salvia*, the biostimulant induced earlier and abundant flowering. Though the responses

appeared to be, in a certain extent, species-dependent, the application of Actiwave induced an activation of the metabolism that in the presence of adequate mineral nutrients availability significantly enhanced the rate of plant growth.

Moreover, our data showed that the mineral nutrition provided by the biostimulant itself was not significant, since plant growth resulted lower than in Actiwave treated plants. These data confirm the biostimulant properties of Actiwave.

Key words: *Coleus*, *Impatiens*, *Salvia*, bedding plants, Actiwave

Introduzione

L'attività di ricerca nel settore agricolo è stata per anni concentrata sul miglioramento delle rese produttive delle colture, mentre poca attenzione è stata prestata alla qualità del prodotto. In questi ultimi anni, tuttavia, la produzione in termini quantitativi ha assunto un ruolo secondario per molte specie d'interesse agrario e, contemporaneamente, è stata attribuita una maggiore importanza alla salvaguardia ambientale ed alla riduzione dei costi di produzione. Questi aspetti risultano molto importanti per la coltivazione protetta di colture orticole e floricole che sono molto esigenti in termini di tecnica colturale e di fabbisogni nutrizionali.

Le colture floricole rientrano in un mercato fortemente competitivo, dove il successo è dettato prevalentemente dalla qualità estetica del prodotto e da un'attenta programmazione della produzione (Ferrante *et al.*, 2003). La coltivazione di piantine ornamentali da bordura è caratterizzata da cicli colturali brevi, rigidamente programmati e spesso effettuati su superfici limitate. Per tale motivo, la crescita deve essere veloce al fine di migliorare l'impiego della manodopera e della distribuzione del lavoro per unità di superficie.

L'ampia disponibilità di fertilizzanti, regolatori di crescita e biostimolanti frequentemente disorienta gli operatori del settore nella scelta e nell'impiego razionale di queste risorse che, spesso, possono risultare inefficienti o addirittura controproducenti per la qualità del prodotto e del processo produttivo (Vernieri *et al.*, 2005a; 2006). I biostimolanti, se razionalmente utilizzati, possono aumentare l'efficienza d'uso degli elementi nutritivi riducendo le perdite per lisciviazione e garantendo una produzione maggiormente eco-compatibile (Vernieri *et al.*, 2005b).

I biostimolanti sono attualmente riconosciuti ed inseriti nella legislazione corrente che regola la commercializzazione dei fertilizzanti. In particolare, la normativa che disciplina questi mezzi tecnici, aggiornata con il D.L. del 29 aprile 2006, riporta nell'allegato 6 i "Prodotti ad azione specifica", tra i quali sono inseriti i biostimolanti. Questi sono prodotti di origine naturale che stimolano molte attività metaboliche delle piante e, in taluni casi, aumentano la resistenza agli stress di natura biotica e abiotica

(Russo e Berlyn, 1990; Morando *et al.*, 1999; Vernieri e Mugnai, 2003; Richardson *et al.*, 2004; Burnett *et al.*, 2005; Tucker *et al.*, 2006).

I biostimolanti hanno anche un effetto sulla microflora presente nel terreno che può svolgere un'azione positiva sulla crescita delle colture (Chen *et al.*, 2003).

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di verificare l'effetto del biostimolante Actiwave (Valagro S.p.A.) sulla produzione e la qualità di piante ornamentali da bordura. Inoltre si è cercato di isolare l'effetto stimolante del prodotto da quello prettamente nutrizionale.

Materiali e metodi

La prova è stata condotta presso l'azienda agricola F.lli Biricotti, a Livorno, nella primavera 2005.

Materiali vegetale

Semenzali di *Coleus blumei* Benth., *Impatiens wallerana* L. e *Salvia splendens* Sellow ex Schult sono stati ripicchettati in vasetti di polietilene nero Ø 8 cm (1 litro), riempiti con un substrato commerciale a base di torba, addizionato all'origine degli elementi nutritivi riportati in tabella 1.

Le piante sono state mantenute per tutta la durata della prova in una serra in ferro e vetro, con una temperatura di 25°/18°C giorno/notte.

Tabella 1. Contenuto in macro e microelementi presenti nel substrato utilizzato per la prova (dichiarati dal produttore)

Table 1. Macro and microelements content in the substrate used for the trial (declared by the manufacturer)

Elemento	Quantità (g m ⁻³)
Nitrato-N	70
Ammonio-N	50
Fosforo-P ₂ O ₅	208
Potassio-K ₂ O	240
Magnesio-MgO	24
Microelementi	50

Tesi a confronto

Il biostimolante è stato testato sia su piante concimate secondo la normale pratica aziendale, sia su piante cresciute senza alcuna fertilizzazione aggiuntiva; per queste ultime, ritenendo che gli elementi

nutritivi contenuti nel biostimolante, pur essendo presenti in minime quantità, potessero esercitare un effetto sulla crescita delle piante tale da mascherare l'attività biostimolante, la tesi di controllo prevedeva un trattamento a cadenza settimanale con una soluzione contenente le stesse concentrazioni di macro e micro elementi presenti in Actiwave alla diluizione di impiego. Ciò non è stato fatto per le piante di controllo nelle tesi che prevedevano la concimazione in quanto, data la più abbondante disponibilità di nutrienti, l'incidenza dei macro e micro elementi contenuti nel biostimolante appariva decisamente trascurabile. Pertanto le tesi a confronto erano le seguenti:

- concimazione al momento del ripicchettamento, aggiungendo al substrato: (g m⁻³) Nitrato-NO₃ 70, Ammonio-NH₄ 50, Fosforo-P₂O₅ 208, Potassio-K₂O 240, MgO 24, microelementi 50, (**Controllo**);
- trattamento a cadenza settimanale con biostimolante, su piante concimate inizialmente come descritto per le piante di controllo (**C+Actiwave**).
- trattamento a cadenza settimanale con una soluzione nutritiva contenente le stesse concentrazioni di macro e microelementi presenti nel biostimolante, senza la concimazione iniziale (**CCA**);
- trattamento a cadenza settimanale con biostimolante, senza la concimazione iniziale (**Actiwave**);

Per tutte le tesi, durante il periodo della prova non è stata effettuata alcuna ulteriore somministrazione di fertilizzanti.

Il biostimolante Actiwave[®] (Valagro S.p.A., Piazzano di Atessa, CH), prodotto coperto da brevetto internazionale EPA (*European Patent Application*), veniva distribuito per aspersione alla concentrazione di 2,5 mL L⁻¹, a partire dalla settimana dopo il ripicchettamento fino alla fioritura delle piante (8 settimane). Le piante di controllo venivano innaffiate con sola acqua.

Determinazione del contenuto in macro e microelementi del biostimolante

L'azoto organico è stato determinato con il metodo Kjeldahl; il contenuto in nitrati è stato misu-

rato mediante il metodo dell'acido salicil-solforico e successiva determinazione spettrofotometrica. La determinazione del fosforo, potassio, calcio, magnesio e sodio è stata eseguita previa mineralizzazione tramite digestione per via umida (1 h a 150 °C) in presenza di una miscela di acido nitrico ed acido perclorico. Il fosforo è stato determinato mediante misure spettrofotometriche con il metodo del molibdato di ammonio; il potassio ed il sodio mediante fotometro a fiamma ed il calcio e magnesio mediante spettrofotometro ad assorbimento atomico. I risultati delle analisi sono riportati in tabella 2.

Rilievi di crescita

A distanza di 8 settimane dall'inizio dei trattamenti (maturità commerciale), cinque piante per tesi sono state prelevate e sottoposte ad analisi distruttiva. Sono stati misurati il peso fresco, il peso secco (mediante stufa termoventilata alla temperatura di 70°C fino a peso costante) e l'area fogliare (utilizzando un planimetro elettronico, MK2, Delta-T Devices, Cambridge, U.K.).

Analisi statistica

Le prove sono state effettuate ponendo i trattamenti in blocchi completamente randomizzati all'interno del vivaio dove sono state svolte le prove. Per ogni trattamento i rilievi distruttivi sono stati effettuati su 5 piante per ogni specie. I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza e le differenze statistiche tra le medie sono state determinate col test di Bonferroni.

Risultati

L'effetto dei trattamenti è stato valutato al termine della prova, quando le piante avevano raggiunto la maturità commerciale.

Nelle tesi concimate (*controllo* e *C+Actiwave*) l'effetto del biostimolante si è tradotto in tutte e tre le specie in una maggiore crescita, come testimoniato dalle differenze statisticamente significative nei valori di area fogliare, peso fresco e secco (fig. 1, 2 e 3). Durante l'arco del periodo sperimentale le piante trattate con Actiwave, in presenza di adeguata disponibilità di nutrienti, hanno fatto registrare un accumulo di biomassa che è risultato da due a tre volte superiore rispetto ai controlli.

Tabella 2. Contenuto (mg Kg⁻¹) di macro e microelementi nel biostimolante Actiwave alla concentrazione d'uso (2,5 mL L⁻¹). Valori medi di 5 analisi.

Table 2. Macro and microelements content (Kg⁻¹) in the biostimulant Actiwave at the dilution employed (2.5 mL L⁻¹). Mean values of 5 replicate analyses.

NO ₃ -N	NH ₄ -N	Ntot	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	Zn	B
Assente	0,63	68,7	0,32	193,4	Assente	Assente	1,575	Assente	Assente	2,46	Assente

Nelle tesi non concimante (CCA e *Actiwave*), l'effetto del biostimolante è risultato meno evidente, causando tuttavia un aumento nei valori dei parametri misurati, visibile soprattutto in *Impatiens* (fig. 2) e *Salvia* (fig. 3) dove, anche nei casi in cui le differenze

non sono risultate significative, si sono comunque osservati valori medi più elevati nelle piante trattate con *Actiwave* rispetto ai controlli (CCA). In *Coleus blumei*, invece, l'uso del biostimolante sulle piante non concimate non ha fatto registrare differenze di rilievo (fig. 1).

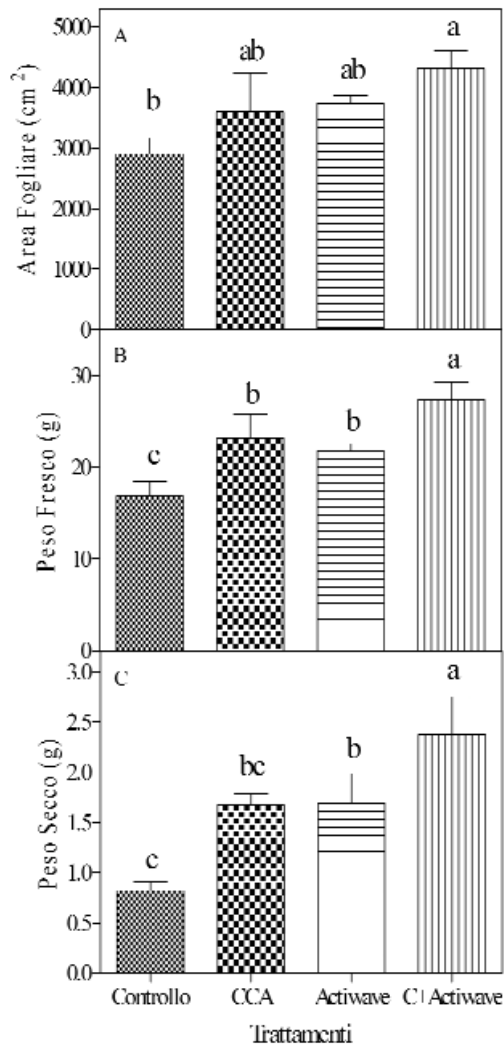


Figura 1. Area fogliare (A), peso fresco (B), peso secco (C) di piantine di *Coleus blumei* al termine della prova (8 settimane). Trattamenti: concimate all'impianto (controllo); irrigate con soluzione nutritiva costituita esclusivamente dagli elementi nutritivi contenuti nel biostimolante (CCA); trattate con il biostimolante in assenza di ulteriore concimazione (Actiwave); concimate all'impianto e, successivamente, trattate con Actiwave (C+Actiwave). Medie \pm SE (n = 5). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative per $P < 0,05$ (ANOVA test). La differenza tra le medie è stata determinata con il test di Bonferroni.

Figure 1. Leaf area (A), fresh weight (B), dry weight (C) of *Coleus blumei* plants at the end of the trial (8 weeks). Treatments: grown in fertilized substrate (control); treated with nutrient solution containing only the same concentration of nutrients present in the biostimulant (CCA); treated with biostimulant without any further fertilization (Actiwave); grown in fertilized substrate plus biostimulant (C+Actiwave). Means \pm SE (n = 5). Different letters indicate statistical differences for $P < 0.05$ (ANOVA test). Differences among means were determined by Bonferroni's post-test.

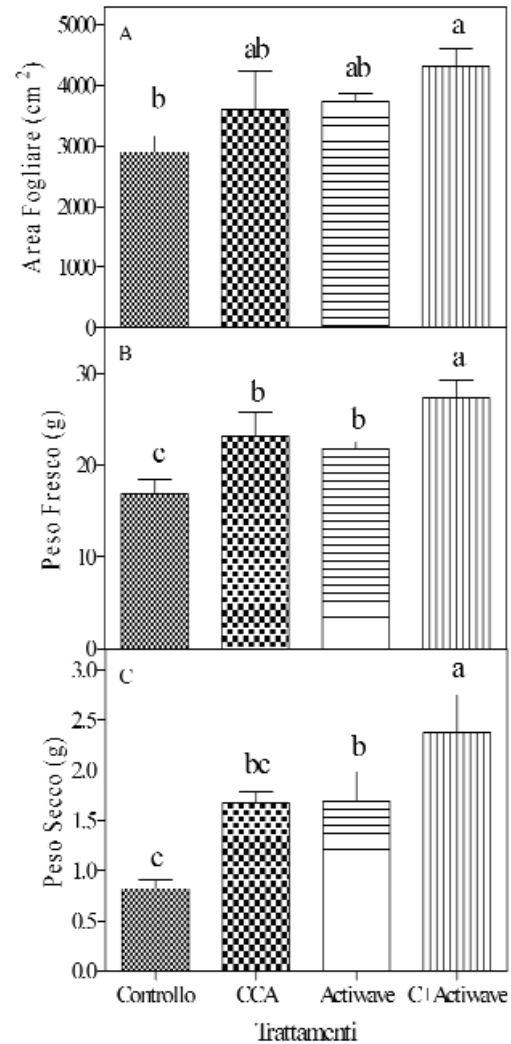


Figura 2. Area fogliare (A), peso fresco (B), peso secco (C) di piantine di *Impatiens wallerana* al termine della prova (8 settimane). Trattamenti: concimate all'impianto (controllo); irrigate con soluzione nutritiva costituita esclusivamente dagli elementi nutritivi contenuti nel biostimolante (CCA); trattate con il biostimolante in assenza di ulteriore concimazione (Actiwave); concimate all'impianto e, successivamente, trattate con Actiwave (C+Actiwave). Medie \pm SE (n = 5). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative per $P < 0,05$ (ANOVA test). La differenza tra le medie è stata determinata con il test di Bonferroni.

Figure 2. Leaf area (A), fresh weight (B), dry weight (C) of *Impatiens wallerana* plants at the end of the trial (8 weeks). Treatments: grown in fertilized substrate (control); treated with nutrient solution containing only the same concentration of nutrients present in the biostimulant (CCA); treated with biostimulant without any further fertilization (Actiwave); grown in fertilized substrate plus biostimulant (C+Actiwave). Means \pm SE (n = 5). Different letters indicate statistical differences for $P < 0.05$ (ANOVA test). Differences among means were determined by Bonferroni's post-test.

Questi risultati appaiono confermati dal confronto visivo tra le tesi trattate con il biostimolante e i rispettivi controlli, nel caso di piante concimate e non concimate (Foto 1), che evidenzia un effetto notevole di stimolo alla crescita indotto da Actiwave, soprattutto in presenza di una appropriata disponibilità di elementi nutritivi.

In *Impatiens* e *Salvia*, inoltre, l'applicazione di Actiwave a piante sottoposte ad una opportuna concimazione, ha indotto una sensibile precocità di fioritura ed una maggior presenza di fiori per pianta (dati non riportati).

Discussione

I risultati ripostati nel presente lavoro indicano che il biostimolante Actiwave è in grado di esercitare una consistente azione di stimolo alla crescita in *Coleus blumei*, *Impatiens wallerana* e *Salvia splendens*, che riescono ad accumulare, durante lo stesso tempo di coltivazione, quantitativi di sostanza secca due-tre volte superiori rispetto ai controlli, mostrando maggiore precocità e abbondanza di fioritura. Ciò conferma precedenti osservazioni su altre specie annuali da fiore (Vernieri *et al.*, 2005b) e dimostra che Actiwave può migliorare anche le caratteristiche qualitative del prodotto.

I dati relativi all'utilizzo di Actiwave su piante non concimate indicano che l'azione del prodotto è indipendente dall'apporto di macro e micro elementi contenuti nel formulato e suggeriscono che la capacità biostimolante si esplica attraverso un'attivazione del metabolismo ed un migliore utilizzo dei nutrienti. D'altra parte, l'osservazione che gli effetti più evidenti del biostimolante si sono manifestati sulle piante opportunamente concimate sembra rafforzare questa ipotesi ed evidenzia l'importanza che, al fine di ottenere consistenti aumenti nel ritmo di crescita delle piante, l'attivazione del metabolismo sia supportata da una buona disponibilità di elementi nutritivi.

Conclusioni

Dai risultati delle prove effettuate in questa sperimentazione sull'uso del biostimolante Actiwave in tre specie da bordura, è emerso che, nelle condizioni sperimentali in cui si è operato, il prodotto è in grado di esercitare una decisa azione di stimolo alla crescita e allo sviluppo delle piante.

Le piante trattate hanno fatto registrare un aumento della superficie fogliare ed un accumulo di sostanza secca nella parte epigea significativamente maggiore rispetto ai controlli.

Dal punto di vista della qualità della produzione è stato evidenziato un positivo effetto del biostimolante sulla precocità e l'abbondanza della fioritura.

L'efficacia di Actiwave è risultata molto più marcata in presenza di un'adeguata disponibilità di elementi nutritivi, indicando che l'azione del prodotto si esplica attraverso l'attivazione dei processi metabolici legati

all'assimilazione e all'utilizzo degli elementi nutritivi.

I dati relativi al confronto tra le piante trattate solo con gli elementi nutritivi presenti in Actiwave e quelle trattate col biostimolante in assenza di ulteriore concimazione sembrano confermare le qualità propriamente biostimolanti del prodotto.

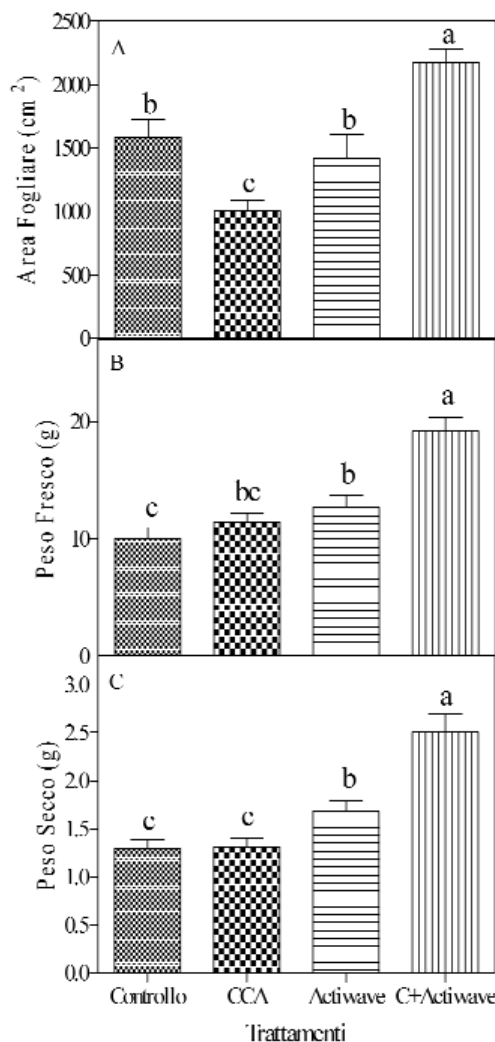


Figura 3. Area fogliare (A), peso fresco (B), peso secco (C) di piantine di *Salvia splendens* al termine della prova (8 settimane). Trattamenti: concimate all'impianto (controllo); irrigate con soluzione nutritiva costituita esclusivamente dagli elementi nutritivi contenuti nel biostimolante (CCA); trattate con il biostimolante in assenza di ulteriore concimazione (Actiwave); concimate all'impianto e, successivamente, trattate con Actiwave (C+Actiwave). Medie \pm SE (n = 5). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative per $P < 0,05$ (ANOVA test). La differenza tra le medie è stata determinata con il test di Bonferroni.

Figure 3. Leaf area (A), fresh weight (B), dry weight (C) of *Salvia splendens* plants at the end of the trial (8 weeks). Treatments: grown in fertilized substrate (control); treated with nutrient solution containing only the same concentration of nutrients present in the biostimulant (CCA); treated with biostimulant without any further fertilization (Actiwave); grown in fertilized substrate plus biostimulant (C+Actiwave). Means \pm SE (n = 5). Different letters indicate statistical differences for $P < 0.05$ (ANOVA test). Differences among means were determined by Bonferroni's post-test.

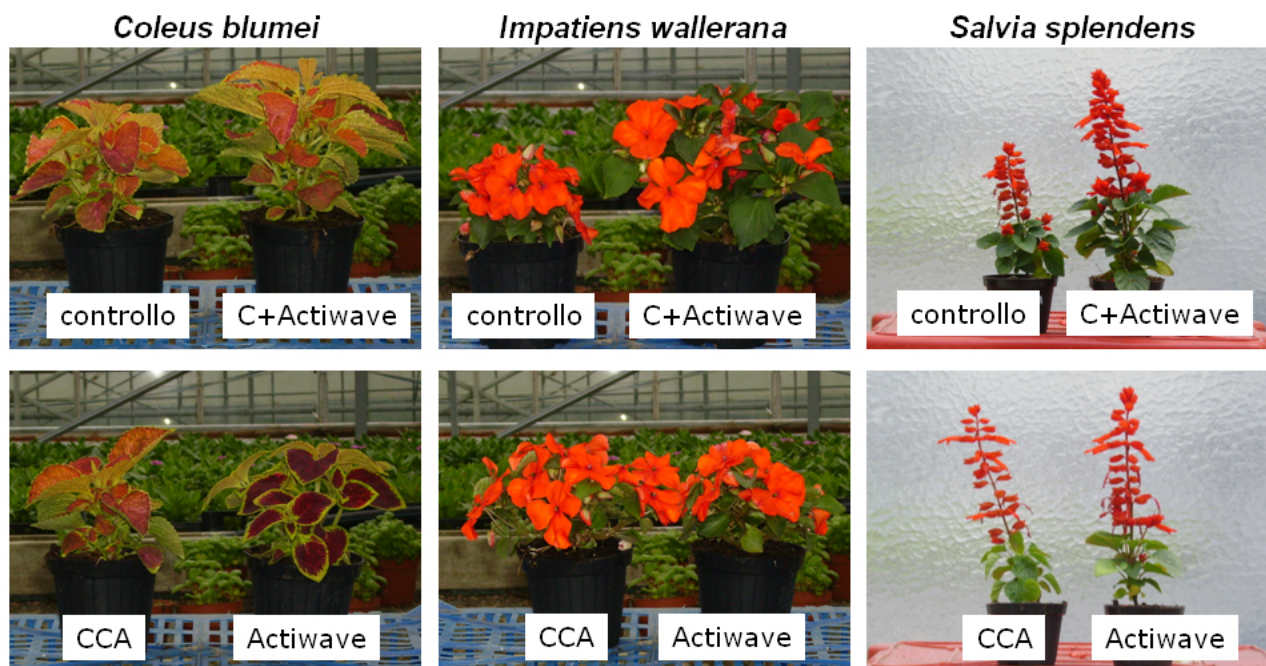


Foto 1. Effetto del biostimolante Actiwave sulla crescita e lo sviluppo delle piante al termine della prova (8 settimane). Tesi a confronto: concimate all'impianto (controllo); concimate all'impianto e, successivamente, trattate con Actiwave (C+Actiwave); irrigate con soluzione nutritiva costituita esclusivamente dagli elementi nutritivi contenuti nel biostimolante (CCA); trattate con il biostimolante in assenza di ulteriore concimazione (Actiwave).

Photo 1. Effect of the biostimulant Actiwave on the growth of plants at the end of the trial (8 weeks). Treatments: grown in fertilized substrate (control); grown in fertilized substrate plus biostimulant (C+Actiwave); treated with nutrient solution containing only the same concentration of nutrients present in the biostimulant (CCA); treated with biostimulant without any further fertilization (Actiwave).

Ringraziamenti

Gli Autori sono grati al Dott. Alberto Piaggese, *Business Innovation Director*, Valagro S.p.A., per i preziosi suggerimenti e per aver fornito il biostimolante.

Bibliografia

- Burnett S.E., Pennisi S.V. Thomas P.A., van Iersel M.W. 2005. Controlled drought affects morphology and anatomy of *Salvia splendens*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130:775-781.
- Chen S.K., Edwards C.A., Subler S. 2003. The influence of two agricultural biostimulants on nitrogen transformations, microbial activity, and plant growth in soil microcosms. *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 9-19.
- Ferrante A., Mensuali-Sodi A., Serra G., Tognoni F. 2003. Treatment with thidiazuron for preventing leaf yellowing in cut tulips, and chrysanthemum. *Acta Horticulturae*, 624: 357-363.
- Morando A., Lembo S., Valgussa P., Morando P., Bevione D. 1999. Innovazioni contro la peronospora della vite. *L'Informatore Agrario*, 55: 71-75.
- Richardson A. D., Aikens M., Berlyn G. P., Marshall P. 2004. Drought stress and paper birch (*Betula papyrifera*) seedlings: effects of an organic biostimulant on plant health and stress tolerance, and detection of stress effects with instrument-based, noninvasive methods. *Journal of Arboriculture*, 30 (1): 52-61.
- Russo R.O., Berlyn G.P. 1990. The use of organic biostimulants to help low input sustainable agriculture. *Journal of Sustainable Agriculture* 1, 19-43.
- Tucker B.J., McCarty L.B., Liu H.B., Wells C.E., Rieck J.R. 2006). Mowing height, nitrogen rate, and biostimulant influence root development of field-grown 'TifEagle' bermudagrass. *HortScience*, 41 (3): 805-807.
- Vernieri P., Mugnai S. 2003. L'uso di biostimolanti nella produzione di piante fiorite annuali da bordura. *L'Informatore Agrario*, 24: 51-54.
- Vernieri P., Borghesi E., Ferrante A., Magnani G., 2005a. Application of biostimulants in floating system for improving rocket quality. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 3(3&4): 86-88.
- Vernieri P., Ferrante A., Borghesi E., Magnani G. 2005b. Piante fiorite di qualità con l'impiego di biostimolanti. *L'Informatore Agrario*, 16: 57-60.
- Vernieri P., Ferrante A., Borghesi E., Tognoni F., Serra G., Piaggese A. 2006. Use of biostimulants for reducing nutrient solution concentration in floating system. *Acta Horticulturae*, 718: 477-784.

Effetti della biostimolazione in ortofrutticoltura: alcune esperienze a confronto

Stefano Tagliavini*, Carlo Kubiskin

CIFO S.p.A. - S. Giorgio di Piano, Bologna, Italy

* Corresponding author: via Oradour, n. 6/8, 40016 S. Giorgio di Piano - Bologna (Italy);

Tel. +39 051 66.55.511, Fax +39 051 66.50.435; e-mail:info@cifo.it; www.cifo.it

Riassunto

I biostimolanti: con questo termine vengono indicati, comunemente, formulati che aiutano la pianta a migliorare le prestazioni senza l'utilizzo di ormoni di sintesi. La definizione di concime-ammendante in grado di contribuire positivamente al miglioramento della nutrizione e allo sviluppo delle specie vegetali indipendentemente dalla presenza di elementi nutritivi, con l'esclusione di fitoregolatori e dei prodotti con dichiarata funzione fitosanitaria, offre un quadro ben preciso delle proprietà di tali formulati. Largamente utilizzati nel campo orto-frutticolo hanno come matrici di base degli estratti vegetali o idrolizzati animali.

La funzione principale di questi prodotti è legata al miglioramento dello sviluppo delle piante, a favorire l'incremento produttivo e all'aiutare la pianta a superare situazioni di stress, agendo direttamente o indirettamente sulla fisiologia vegetale.

La metodica nutrizionale impostata da CIFO, basata su una tipologia di concimazione razionale prevede anche l'apporto di formulati a base di matrici organiche con applicazioni fogliari, per migliorare lo sviluppo della pianta e la produttività finale. Il primo formulato messo a punto è stato Sinergon 2000, seguito da prodotti di 2^a generazione dove si sono messi in evidenza le azioni dei singoli aminoacidi sulla fisiologia vegetale: ERT 23, CIFAMIN BK, BIOLIGHT. L'ultima novità è Algacifo 3000 fertilizzante contenente alghe marine rispondente alle recenti indicazioni di legge.

L'attività della ricerca CIFO è finalizzata al miglioramento produttivo e alla razionalizzazione delle concimazioni. Nel presente lavoro saranno illustrati i risultati ottenuti in varie prove sperimentali, effettuate da Università ed Enti di ricerca con i formulati prima menzionati, evidenziando, infine la necessità di direttive e metodiche chiare per identificare i prodotti "con attività biostimolante" nell'interesse degli utilizzatori e di tutta la filiera.

Parole chiave: Amminoacidi, Alghe, Triptofano, Metionina, Betaine

Abstract

Biostimulants: this term commonly identifies formulations supporting the plant in the improvement of its performances without using synthesis hormones.

The definition fertiliser-conditioner as something able to give positive contributions to the improvement of nutrition and development of vegetal species aside from the presence of nutrients, with the exception of phyto-regulators and phyto-sanitary products, offers a clear picture of the properties of these formulations.

Widely used in vegetable and fruit growing, they have as matrix vegetal extracts or animal hydrolysates.

The main function of these products is connected with the improvement of plant development, yield increase and support to the plant to overcome stress situations acting directly or indirectly on the plant physiology.

Cifo, biostimulation-quality-research: since 1965, year of foundation of the company, Cifo set out a methodology based on a rational fertilisation. All the formulations are manufactured according to strict quality and legislative procedures and developed with the cooperation of prestigious research bodies.

In the years Cifo, developed products based on organic matrix that applied through foliar treatments improved the growth of the plants and increased final yields. The first formulation was "Sinergon 2000", followed by a second generation of formulations, where attention was focused on the action of single amino-acids on vegetal physiology: ERT 23, Cifamin BK, Biolight.

The latest novelty is "Algacifo 3000", a fertiliser containing seaweeds and complying with the recent provisions of Law 748/84 amendments.

The research activity of Cifo has the aim to improve yield quality and to make fertilisation more rational. During today meeting, we'll discuss the positive results obtained in several trials carried out by Universities and research bodies with above mentioned formulations, pointing out, at the same time, the need of clear regulations and methods able to identify and regulate the products "with biostimulating activity" and this, in the interest of end users and of the entire sector.

Key words: Amino acids, Seaweeds, Thryptophan, Methionine, Betaines

Introduzione

La crescita delle piante è condizionata principalmente dalla disponibilità di elementi nutritivi presenti nel terreno. Nel settore agricolo risultano determinanti le fertilizzazioni date al suolo o in misura più contenuta tramite applicazioni fogliari, con concimi a base di N, P, K, meso e microelementi. E' noto (Nardi *et al.*, 2005) che nel settore ortofrutticolo la produttività di una pianta può trovare giovamento anche da apporti di formulati "biostimolanti". Generalmente con quest'ultima categoria di prodotti si tende a identificare una gamma di formulati in grado di contribuire positivamente al miglioramento della nutrizione e allo sviluppo delle specie vegetali indipendentemente dalla presenza di elementi nutritivi, con l'esclusione di fitoregolatori e dei prodotti con dichiarata funzione fitosanitaria. Questa definizione offre un quadro sufficientemente preciso delle proprietà dei formulati a base di estratti vegetali, sostanze umiche, idrolizzati di origine animale e/o alghe marine.

La funzione principale di questi prodotti è legata al miglioramento dello sviluppo delle piante, a favorire l'incremento produttivo e ad aiutare la pianta a superare situazioni di stress, agendo direttamente o indirettamente sulla fisiologia vegetale.

Fin dal 1965, anno di fondazione della società, Cifo ha impostato la metodica aziendale su una tipologia di concimazione razionale, basata anche sull'apporto fogliare di microelementi e formulati con matrici organiche, con l'obiettivo di favorire la produttività finale delle colture. Bisogna sottolineare che tutti i formulati Cifo sono prodotti seguendo rigide procedure qualitative e legislative, e le certificazioni ISO 9001- 14001 e 18001 sono una conferma dell'attenzione aziendale verso questi temi. Importante risulta la sperimentazione, eseguita in collaborazione con enti di ricerca che, nel corso degli anni, ha portato a sviluppare vari prodotti a base di matrici organiche. Il primo formulato messo a punto negli anni '70 è stato il Sinergon, in seguito sono arrivati i prodotti di 2^a generazione (ERT 23, Cifamin BK, Biolight) che hanno messo in evidenza le azioni di singoli amminoacidi sulla fisiologia vegetale. L'ultima novità è Algacifo 3000, fertilizzante contenente alghe marine, rispondente alle recenti indicazioni degli allegati della legge sui fertilizzanti.

Scopo del presente lavoro è quello di evidenziare i risultati ottenuti con alcuni prodotti a matrice organica amminoacidica (tab. 1) su colture ortofrutticole, quali esempi dell'attività di ricerca e sperimentazione recentemente effettuata.

Tabella 1. Caratterizzazione dei prodotti utilizzati nelle prove sperimentali.

Table 1. Law classification and composition of the products used during experimental trials

Prodotto	Definizione di legge	Composizione
ERT 23	Concime organo-minerale NK 5-5 in sospensione con B	Azoto (N) totale 5% di cui : organico 1%, nitrico 1%, ureico 3% Carbonio (C) organico totale di origine biologica 3% Ossido di potassio (K ₂ O) solubile in acqua 5% Boro (B) solubile in acqua 0,3%
CIFAMIN BK	Concime organico azotato fluido - epitelo animale idrolizzato fluido con B, Mn, Zn.	Azoto (N) totale 8% di cui : azoto (N) organico 8% Carbonio (C) organico totale di origine biologica 20% Boro (B) solubile in acqua 0,01% Manganese (Mn) solubile in acqua 0,1% Zinco (Zn) solubile in acqua 0,01%
BIOLIGHT	Concime organico azotato - miscela di concimi organici azotati contenente MgO, Fe, Mn, Zn.	Azoto (N) organico 7% Ossido di magnesio (MgO) solubile in acqua 2% Ferro (Fe) solubile in acqua chelato con DTPA 0,5% Manganese (Mn) solubile in acqua chelato con EDTA 0,2% Zinco (Zn) solubile in acqua chelato con EDTA 0,2%
ALGACIFO 3000	Concime organico azotato fluido - estratto fluido di lievito contenente alghe brune	Azoto (N) organico 2% Carbonio (C) organico totale di origine biologica 10% pH 7,5-8,5 Sostanza organica con peso molecolare nominale <50KDa 50%

Esperienza su Uva da tavola

La prima prova illustrata è stata eseguita in collaborazione con l'Istituto Sperimentale per la Frutticoltura SOP di Bari. La sperimentazione aveva l'obiettivo di valutare l'influenza di prodotti a base amminoacidica sulla produttività finale di uva da tavola. Il piano sperimentale prevedeva il confronto fra ERT 23 con un testimone e un controllo a base di gibberellina, sostanza largamente utilizzata su questa coltura. L'obiettivo primario era di verificare se ERT 23, formulato a base di amminoacidi, contenente triptofano, precursore naturale dell'acido indolacetico, arricchito con boro, sullo sviluppo dei germogli e di frutti formati. A questo scopo sono stati concentrati i rilievi sugli aspetti quanti-qualitativi dell'uva da tavola, in particolare sulla distensione del rachide, per ottenere grappoli meno compatti, sull'incremento della dimensione e del peso delle bacche, sulla colorazione degli acini uniforme e del tipo richiesto dal mercato.

L'azienda, sede della prova, era localizzata nel Sud-Est Barese, in agro di Noicattaro, zona tipica di coltivazione dell'uva da tavola.

Sono stati confrontate 4 tesi: non trattato, Ert 23, Cifamin BK e Gibberellina (Gibresol) con modalità

di applicazione illustrate nella tabella 2.

I trattamenti previsti in pre-fioritura, sono stati effettuati quando sono stati ritrovati nel vigneto i primissimi fiori aperti. Per la distribuzione è stata utilizzata una pompa a spalla, somministrando una quantità di soluzione pari a circa 500 l/ha per Cifamin BK e per l'ERT 23, orientando il getto su tutta la vegetazione. Nel caso della Gibberellina, la soluzione, alla concentrazione prevista per le diverse tesi, è stata distribuita orientando il getto sui grappoli.

I risultati sono stati molto positivi (tab. 3). Le tesi Cifo hanno evidenziato un miglioramento produttivo quanti-qualitativo rispetto al testimone, anche se ERT 23 e Cifamin BK hanno fornito risposte diverse.

ERT 23, come era nelle aspettative, ha fornito un maggior numero di acini per grappolo e una lunghezza del rachide superiore, con la conseguente minore compattezza del grappolo, mentre Cifamin BK ha influenzato maggiormente lo sviluppo dell'acino-grappolo.

Questi dati hanno permesso di creare una adeguata sequenza applicativa (metodologia) ottimale per l'uva da tavola che prevede la somministrazione in fioritura di ERT 23 e successivamente, post-allegagione, di CIFAMIN BK.

Tabella 2. Tesi a confronto nella prova su uva da tavola.

Table 2. Thesis compared in the trial on table grape.

Tesi	Trattamento	Data	Stadio Fenologico	Dose	Concentrazione soluzione
1	Test non trattato				
2	1° trattamento ERT 23	19-mag	pre-fioritura	3 litri/ha	600 ml/100 l
	2° trattamento ERT 23	6-giu	allegagione	3 litri/ha	600 ml/100 l
	3° trattamento ERT 23	13-giu	post-allegagione	3 litri/ha	600 ml/100 l
3	1° trattamento Cifamin BK	19-mag	pre-fioritura	f.c 0,5 litri /ha	100 ml/100 l
	2° trattamento Cifamin BK	6-giu	allegagione	f.c 0,5 litri /ha	100 ml/100 l
4	1 trattamento Gibresol	13-giu	post-allegagione	p.a. 60 mg/kg	6 g/hl

Tabella 3. Risultati ottenuti su uva da tavola.

Table 3. Results obtained on table grape

Tesi	Trattamenti	Peso medio acino (g)	Numero acini/grappolo	Peso medio grappolo (g)	Lunghezza rachide (cm)	Zuccheri (%)	Acidità totale (g/l)	Colore (*)
1	Test	4.44	110	510	21.8	14.45	4.42	1.5
2	ERT 23	4.18	141	612	27.4	13.42	4.75	1.87
3	Cifamin BK	4.76	130	619	25.6	14.97	3.65	1.87
4	60 mg/l Gibberelline	5.05	137	745	27.8	13.07	4.41	2.06

(*) Colore: 1 = giallo; 2 = giallo-verde; 3 = verde-giallo.

Esperienza su Patata

La prova è stata realizzata in collaborazione con l'Ufficio Tecnico di ASSOPA (Associazione Produttori Patate) con lo scopo di valutare l'incremento di produzione ottenibile con fertilizzanti fogliari e di specialità a base di aminoacidi.

E' stata valutata l'influenza degli apporti di Cifamin BK sulla pezzatura dei tuberi.

Cifamin BK è un formulato a base organica, ricco in aminoacidi, contenente microelementi, specifico per la fase di accrescimento e lo sviluppo uniforme del frutto/tubero.

La sperimentazione è stata svolta in un'azienda con terreno tendenzialmente limoso, mediamente dotato di sostanza organica e con un pH sub-alcalino, tipico suolo di zona vocata alla pataticoltura (pianura bolognese). In pre-semina sono state distribuite 150 unità di azoto, 50 unità di P₂O₅ e 200 unità di K₂O.

Sono state confrontate 2 tesi: la prima a base di concime fogliare NPK 20-20-20 e la seconda con un fertilizzante fogliare (Floral 20-20-20, concime minerale NPK 20-20-20 con microelementi) associato a Cifamin BK, applicati nelle modalità illustrate nella tabella 4.

Tabella 4. Tesi a confronto nella prova su patata.

Table 4. Thesis compared in the trial on potato.

Tesi	Prodotto fogliare titolo 20-20-20	Dose	Epoca d'intervento
1	Testimone		
	Prodotto fogliare titolo 20-20-20	2.5 kg/ha	Inizio tuberificazione
	prodotto fogliare titolo 20-20-20	2.5 kg/ha	Dopo 12 giorni
2	CIFAMIN BK+	750 ml/ha	Inizio tuberificazione
	FLORAL 20-20-20	2.5 kg/ha	
	CIFAMIN BK+	750 ml/ha	Dopo 12 giorni
	FLORAL 20-20-20	2.5 kg/ha	

I risultati ottenuti (tab. 5) evidenziano che la tesi Cifo con Cifamin BK ha indotto un aumento della produzione commerciale di circa 1,15 t/ha rispetto al testimone, nonostante fosse stato a sua volta anch'esso trattato con un 20-20-20 fogliare a 2,5 kg/ha. Questi dati indicano l'influenza positiva degli aminoacidi apportati insieme al concime NPK fogliare, e nel caso specifico, Cifamin BK ha determinato una superiorità della resa commerciale grazie alla pezzatura maggiore e più omogenea dei tuberi che ha comportato una ridotta percentuale di scarto. Non ci sono state invece influenze significative nel contenuto in sostanza secca dei tuberi.

Tabella 5. Risultati produttivi su patata.

Table 5. Results obtained on potato

Tesi	Produzione totale q/ha	Produzione commerciale q/ha	Scarto %	Sostanza secca %
Controllo	509	483	5.01	19.5
CIFO	517	495	4.03	19.4

Esperienza su Melone

In collaborazione con il CRPV (Centro Ricerche Produzioni Vegetali di Cesena) è stata impostata una prova per valutare gli effetti delle applicazioni fogliari di concimi minerali e a base di aminoacidi, sugli aspetti produttivi e qualitativi di melone coltivato in pieno campo.

Il formulato saggiato è stato il Biolight, prodotto in polvere solubile, contenente matrici organiche che forniscono un concentrato di aminoacidi. La presenza di metionina, precursore naturale dell'etilene, avrebbe lo scopo di favorire una maturazione fisiologica ottimale, sostenuta dalla presenza di magnesio e di microelementi.

La prova è stata eseguita nell'azienda sperimentale del C.I.S.A. "Mario Neri" di Imola su Melone varietà Proteo, ibrido di tipologia tradizionale (a frutto retato-solcato, giallo a maturazione) coltivato a ciclo estivo in pieno campo.

In pre-impianto su tutte le parcelle in prova sono state distribuite 60 unità di N, 80 di P₂O₅ e 150 di K₂O. Le tecniche colturali sono state eseguite secondo i disciplinari di "Produzione Integrata" della Regione Emilia Romagna.

L'impostazione sperimentale prevedeva una tesi non trattata con fertilizzanti fogliari, una trattata con il concime NPK fogliare (Floral K, ad alto tenore in potassio e microelementi chelati) e infine una con l'associazione del concime fogliare con Biolight nelle modalità riportate nella tabella 6.

Tabella 6. Tesi a confronto nella prova su melone.

Table 6. Thesis compared in the trial on melon.

Tesi	Prodotto	Dose	Epoca d'intervento
1	Testimone		
2	Floral K	3 g/l	somministrato per via fogliare, con applicazioni settimanali (con un totale di 4 interventi per tesi) a partire dalla fase di accrescimento dei frutti.
3	Floral K + Biolight	3 g/l + 0,2 g/l	somministrati per via fogliare, con applicazioni settimanali (con un totale di 4 interventi per tesi) a partire dalla fase di accrescimento dei frutti.

I risultati ottenuti (tab. 7) hanno evidenziato un'azione positiva degli apporti nutrizionali per via fogliare sul melone. La produttività della tesi Floral K + Biolight ha fornito i parametri migliori evidenziando un 32,9% in più della tesi non trattata.

Anche a livello qualitativo Biolight ha permesso di ottenere una maggiore formazione di zuccheri (+ 1° Brix), caratteristica fondamentale per i frutti di melone e del colore della polpa. L'insieme di questi parametri ha consentito di avere un minore scarto e una maggior quantità di "prodotto commerciale", apprezzato e valorizzato dal mercato.

Tabella 7. Dati produttivi su melone.

Table 7. Results obtained on melon

Tesi	Prodotto commerciale t/ha	Totale scarto t/ha	Produzione pianta kg
Testimone	31.40	8.60	6.50
Floral K	38.60	0.00	7.70
Biolight + Floral K	41.80	0.00	7.90

Esperienza su Pesco

Sempre con la collaborazione del CRPV (Centro Ricerche produzioni Vegetali di Cesena) è stata eseguita una sperimentazione per definire la metodologia applicativa più adeguata per apportare gli estratti di alghe marine su piante da frutto.

Il prodotto saggiato è stato Algacifo 3000, concime a base di estratti di origine totalmente vegetale e contenente Betaine, potenti antistress naturali, che favorisce uno sviluppo ottimale delle piante e di conseguenza una maggiore produttività finale.

Tabella 8. Tesi a confronto nella prova su pesco.

Table 8. Thesis compared in the trial on peach.

Tesi	Prodotto	Dose	Date dei trattamenti				
1	Testimone	-	-	-	-	-	-
2	Algacifo 3000 x 3	3 g/l	-	-	29-giu	16-lug	14-ago
3	Algacifo 3000 x 5	3 g/l	15-mag	15-giu	29-giu	16-lug	14-ago

Tabella 9. Dati produttivi su pesco.

Table 9. Results obtained on peach.

TESI	Colore foglia	Produzione (kg/pianta)	Peso medio frutto (g)	Numero frutti per pianta	AAA	AA	A
Non trattato	4	45.4	236	192	26%	62%	12%
Algacifo 3000 x 3	4	46.2	253	183	28%	61%	11%
Algacifo 3000 x 5	4.5	48.9	254	193	47%	46%	8%

La prova si è svolta presso l'azienda sperimentale Martorano 5 di Cesena, su Pesco var. Sweet Lady, allevato a vasetto ritardato, con un sesto d'impianto di 5 m tra la fila e 3,7 m sulla fila (540 piante/ha). Il frutteto era dotato di impianti di microirrigazione a goccia con due erogatori per pianta. Le tecniche colturali sono state eseguite secondo i disciplinari di "Produzione Integrata" della Regione Emilia Romagna.

Per valutare la miglior modalità applicativa sono state messe a confronto le seguenti tesi: applicazioni continue durante il ciclo colturale, applicazioni solo nella fase finale e senza applicare il formulato (tab. 8).

Il positivo andamento climatico del periodo primaverile-estivo dell'anno 2005 ha favorito lo sviluppo vegetale e produttivo di tutte le piante, compreso il testimone.

Nonostante questo aspetto si è potuto notare come l'apporto di Algacifo 3000 abbia evidenziato una risposta positiva rispetto al controllo.

Nella tabella 9 sono riportati i dati nella totalità, dove emerge la tesi con i 5 trattamenti che ha fornito indubbiamente i risultati migliori in tutti i parametri presi in considerazione.

Nel complesso si può dire che la produzione è aumentata in proporzione crescente con il numero di trattamenti di Algacifo 3000. Analogo andamento anche per il peso medio dei frutti. Inoltre, è stato notato come l'aumento produttivo possa essere attribuibile al miglioramento della loro pezzatura, fattore di fondamentale importanza nell'agricoltura moderna, poiché solo ed esclusivamente le produzioni di qualità superiore (maggiore calibro, frutti sani) riescono a trovare una remunerativa collocazione sul mercato.

Pertanto, proprio per le componenti vegetali che agiscono sulla fisiologia della pianta, è stata osservata una azione positiva del formulato.

Conclusioni

Alla luce dei risultati ottenuti nelle varie sperimentazioni e dalle esperienze di campo, appare evidente che l'apporto di formulati a matrice organica con attività biostimolante sulla fisiologia vegetale, apporta reali vantaggi quanti-qualitativi sulle produzioni ortofrutticole.

Anche a livello applicativo si hanno dei benefici. In primo luogo questi prodotti si possono apportare con tecniche che si integrano pienamente con le attività agronomiche aziendali (trattamenti fogliari), in secondo luogo si nota che l'incidenza del costo del concime è ampiamente ripagata dall'incremento produttivo ottenibile.

Infine si vuole sottolineare l'importanza di una normativa chiara e di una metodologia efficace per creare una reale categoria di prodotti con proprietà biostimolanti, al fine di tutelare gli utilizzatori e valorizzare le aziende che investono in ricerca, in qualità, nel rispetto dei termini legislativi.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Comitato Scientifico del

Convegno e i revisori del lavoro per i consigli e il prezioso aiuto fornito.

Bibliografia

- Antonacci D., A. Coletta. 1996. "Risposta dei vitigni di uva da tavola Regina e Regine dei Vigneti alla somministrazione di gibberelline". Rivista di Viticoltura e di Enologia, n. 3, 57-64.
- Ciavatta C. 2003. I biostimolanti aspetti tecnici-normativi e sperimentali. Sintesi delle relazioni Convegno Fertilizzanti Fogliari e i Biostimolanti in Orticoltura. Ortomac, Cesena (FC) 05/12/2003.
- Fregoni C. Coordinatore. Phytomagazine 11 "Speciale Biostimolanti". Phytoline, Verona, 68 pp.
- Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plant, 2th edition. Academic press, London, 899 pp.
- Nardi S., Pizzeghello D., Tosoni M. 2005. "I biostimolanti: azione e proprietà agronomiche". Phytomagazine.com n° 36 del 31 gennaio 2005
- Scarponi L. 2003. Biochimica agraria. Patron Editori, Bologna, 1064 pp.
- Schiapparelli A., Schreiber G., Bourlot G. 1995. Fitoregolatori in agricoltura, Edagricole, Bologna, 319 pp.

The experience of the first biostimulant, based on amino acids and peptides: a short retrospective review on the laboratory researches and the practical results

Paolo Maini

SICIT 2000 SpA, Via Arzignano, 80 - 36072 Chiampo (VI), Italy
Tel.: +39 0444 450946; e-mail: sicit2000@sicit2000.it, author: alboran@fastmail.it

Abstract

The first biostimulant product, based on amino acids and short chain peptides (Siapton®), was born in Italy more than 35 years ago. Along with the very positive results obtained in the practice, many laboratory researches have been carried out to explain its main mechanisms of action. The absorption through the leaves and the subsequent translocation have been shown in different researches, using radiolabelled aminoacids. Also the main mechanisms were demonstrated: a) positive action on some enzyme systems (among them: Nitrate Reductase, GDH-NAD dependent; Malate dehydrogenase, Leucino-amino peptidase, Phosphorilase, Phosphatase); b) strong effect toward biotic and abiotic stress, due to the same enzyme systems, as well as to the high content of proline and hydroxyproline; c) positive action on the endogenous and exogenous plant growth regulators and on the flower fertility and fruit setting; d) indirect biostimulant mechanism due to the chelate and complex formation with the main nutrients and microelements.

Key words: Amino acids, Siapton,, hormon-like, enzyme systems, fruit-set, antistress.

L'esperienza del primo biostimolante a base di amminoacidi e peptidi: una breve rassegna retrospettiva su ricerche di laboratorio e risultati pratici

Riassunto

Nel 1969 venne immesso sul mercato nazionale e internazionale un "concime organico" per uso fogliare (Siapton®) a base di amminoacidi (aa) e peptidi, proveniente da idrolisi chimica di epitelio animale. Contemporaneamente a lusinghieri risultati in campo, iniziarono ricerche per chiarire alcuni dei meccanismi d'azione. Mediante l'uso di aa radiomarcati, fu dimostrato che gli aa del Siapton potevano essere assimilati e utilizzati dalla pianta per via fogliare e che assimilazione e traslocazione sono differenti per i diversi aa e dipendono dalla specie vegetale, dallo stato fisiologico e dall'età della foglia. Sono stati poi evidenziati diversi importanti meccanismi di azione del Siapton, tutti strettamente collegati tra loro. Le applicazioni di Siapton hanno evidenziato *effetti positivi sull'attività di numerosi sistemi enzimatici* quali nitrato reductasi, glutammato deidrogenasi e malato deidrogenasi (quest'ultimo sistema molto importante nella resistenza agli stress), con possibilità di ridurre la fertilizzazione azotata di copertura e con un minor contenuto di nitrati nelle foglie. Sono state influenzate positivamente anche le attività di fosforilasi, leucino-amino-peptidasi e fosfatasi. Sia l'azione sui sistemi enzimatici che l'elevato contenuto di prolina e idrossiprolina, portano ad una generale azione antistress (siccità, gelate, trattamenti errati, malattie da virus, nematodi, ecc.). Un test specifico per la moltiplicazione cellulare e il test per le auxine hanno messo in luce l'*azione ormono-simile* o, meglio, un'attività di regolazione dei fitoregolatori endogeni ed esogeni. E' stata evidenziata anche un'azione antisenescenza e sulla formazione del callo e delle radici oltre ad effetti di tipo gibberellinico nel riequilibrio della GA₃ in frumento trattato con brachizzanti e a sinergie con la maggior parte dei PGR di sintesi. E' stata messa in luce anche un'*azione positiva sull'allegagione*, dovuta alla maggior percentuale di germinabilità e velocità di allungamento dei tubi pollinici ed al prolungamento del periodo di fertilità dell'ovario. Infine il Siapton è attivo nella *complessazione di microelementi*, meccanismo che indirettamente si può considerare come biostimolante, con la formazione di chelati con i microelementi e facilitandone l'assimilazione e il trasporto.

Parole chiave: Amminoacidi, Siapton,, ormono-simile, sistemi enzimatici, allegagione, antistress.

Foreword

“Italian developed compound could open new era in vegetable crop nutrition” headed a British agricultural magazine in 1974 (Krause, 1974) and a similar headline was in a German specialised journal (Schrader, 1977) (fig. 1). A few years before, in 1969, the Italian Company SIAPA (today Isagro SpA), in collaboration with the manufacturer of the product, the chemical company SICIT SpA of Chiampo (Vicenza), launched on the Italian agrochemical market, for the first time in the world, a foliar “organic fertiliser”, based on free amino acids (aa) and pep-

tides. The product was marketed with the brand name Siapton.

Siapton derives from natural substances of animal origin (epithelial tissues), chemically hydrolysed through a specifically studied industrial process. Today the new factory of SICIT 2000 SpA (fig. 2) can reach a whole production capacity of 70 (or 40) tons per day of liquid (or powder) products. A summarised description of the special composition based on free aa and short chain peptides in a well balanced ratio among them, is described in another paper presented at this same Meeting (Filippini, 2006).



Figure 1. Headlines of popular European magazines in the seventies.

A: Bibliografic reference: Krause (1974)

B: Bibliografic reference: Schrader (1977)



A



B



Figure 2. The new SICIT 2000 S.p.A. manufacturing plant, where Siapton 10 L is produced

A: General view. B: Reactors for the thermal treatment under pressure, according to the Reg. 1774/2002/EC.

Other than the direct influence on the nitrogen balance in plants, Siapton acts also indirectly improving the activity of some enzyme systems and regulating some plant growth regulators (PGR) functions and biochemical processes. Moreover, Siapton makes easier the absorption and the transport of the nutritional macro- and micro-elements. These statements allow to define the product as a real **“organic biostimulant”** and natural nutritional equilibrant for plants, more than a simple foliar organic fertiliser.

The product has been used by Italian and European farmers since more than 35 years and therefore the references about the practical results obtained in the field are many and for the majority of the agricultural crops. Some of them have been already reviewed previously (Maini, 1983; Bytniewska, 1985; Maini *et al.*, 1991). The multiple function showed by Siapton such as a nutritional and a general biostimulant effect, the specific antistress action, and a PGR-like action, induced many researchers from different international academic institutions, other than the same researchers of the company, to investigate on its mechanisms of action and to try to understand the secrets of its sometime exceptional effects on the crops.

The present review has the main goal to give an historic and, at the same time, a scientific information about Siapton by means of a retrospective evaluation of the experiences carried out by different Researchers at international level during more than 35 years of experimental work, both in the field and laboratory.

Historic profile

Siapton was born and applied for the first time in the practice in 1969 at the SIAPA (today ISAGRO SpA) “Centro Esperienze e Ricerche” (Research and Experimental Centre), following some experiments which clearly showed the usefulness and the possible mechanisms of free amino acids (aa) and peptides in plant physiology. The product was in absolute the first product in the world, based on aa and peptides, to be used in agriculture. At present, it is marketed with success in all Europe, Middle and Far East and South and Central America.

Starting from the first years of use on different crops and in different environmental conditions, Siapton reached a very good success in the practice amongst the farmers, the technicians and the scientists engaged in its research.

The yield of crops increase, both in quality and quantity, together with the idea to apply a product able to integrate the fertilising activity (complementary to the ground fertilisation, too) directly to the leaves as to avoid the interaction with the soil (Krause, 1974) rose, in these first years, the interest

of many researchers. In that way, a long series of studies began, aimed to the individuation of the roles and the mechanisms of action of the product. After the first years of research and the first interesting results, Siapton was officially presented to the agrochemical scientists at the international level (Maini, 1980).

Positive effects were found on many crops such as sugar beet, potato, strawberry, cereals, citrus, horticultural crops, tomato, grapevine, fruits, cotton, olive, mushrooms, etc. Potato, tomato, cucurbits, strawberry and olive are the crops where, in every case, situation or Country, the results were and are always positive as far as the quantity and quality are concerned. Nevertheless, many of these works, as evidenced along the following text, were not published or have been presented as internal reports or private communications. The majority of these positive field results were published in the years 1970-1985, in local or popular journals. The following are only some selected results, as for example.

Celery treated with Siapton showed qualitative characteristics and yield clearly higher than untreated check. But the most important action was the complete elimination of the negative effects of an unspecified kind of virus, reaching the market in a normal aspect (Mallegni, 1971). A review of the many results obtained on grapevine in Italy, Germany and other Countries was published (Maini, 1983): in more than 80 trials carried out, many of them by German official Institutions, a general increase in sugar degree, was obtained. A quite special application with good results was carried out on cultivated mushrooms (Branzanti *et al.*, 1986). Garlic, when treated by immersion before the sowing of the bulblets, gave very interesting results, with an increase of the vitamin C content as well (Nadolny and Rogozinska, 1985). When applied to sugar beet the product generally improved the sugar content other than the yields, in different European Countries. In cereals, positive yields were always obtained, with small, but always present, increases in well managed fields, and with very important increases (more than 25%) in poor soils or in bad environmental conditions.

The product, due to its natural origin and final composition is accepted by the Organic Farming and by the Biodynamic Farmers, too. Two books edited in Germany by a biodynamic author report the positive effects of Siapton when applied in vineyards (Snoek, 1981) and when used in soil, in mixture with rock meals (Snoek and Wulfrath, 1983).

A very interesting result using Siapton in mixture with an iron chelate in fertigation, has been obtained in a pear orchard in Spain in 1994-1995. Soil injection of a mixture of Siapton and iron chelate produced an increase of the total yield, much more sensitive in

the second year (> 45%), than in the first one (>6%) (Sandoz SAE, 1995, unpublished report). An important result was also obtained in the earliness of the fruit harvest, other than a better homogeneity of the fruit size.

Generally, the different crops, treated with Siapton, increased yields per hectare. These results could not be explained by the simple fertilising action due to the organic nitrogen (N) content of Siapton. It was evident that the capacity to increase yields in quality and quantity was due to its complexity (amino acid quality and ratio, length of peptide chains, different molecular weight ratio of peptides etc.). Really, the true and positive mechanisms of action of the product are due to the very specific and well studied ratio between free amino acids and short chain peptides. This statement means that the organic matter is formed by 17,3 % free aa and 82,7% peptides with an average molecular weight lower than 2000 daltons. This 17/83 ratio can be reached only through the very controlled industrial hydrolysis process used to manufacture Siapton.

Absorption and translocation

When the first researches about Siapton began, the international literature on plant physiology did not report any work on the application of amino acids or peptides through the leaves. On the contrary, quite a lot papers reported academic laboratory works on the absorption of amino acids in solution, through the roots.

Therefore, absorption, translocation and subsequent transformation of the most representative aa of Siapton through the leaves have been investigated in order to evaluate their fate and their biological function.

The first experiment has been carried out by means of a simple method of forced absorption into bean leaves, followed by thin layer chromatography of the aa (Maini, 1976). It was shown that aa behave very differently, once absorbed, as far as their transformation and persistence are considered: e.g.: glycine is totally transformed in a few minutes, on the contrary, tryptofan remains unaltered during more than 48 h. Subsequent experiments have been carried out by means of ^{14}C -radiolabeled aa. In an experiment carried out in Belgium, at the University of Gembloux (Ferauge and Smal, 1977), radiolabeled proline and glycine have been added to Siapton in very low amount in order to not change its composition. The added product was applied on a cherry leaf and, by means of autoradiographies, the radioactivity distribution of the two aa and their derivatives into the plant, has been examined. It has been noted that the ^{14}C from the radiolabeled aa could quickly penetrate and spread into the other leaves. About 7 days

after the application, the translocated ^{14}C reached all the parts of the branch remaining there more than 2 months and reaching the new flowers (fig. 3) and the roots. This means that the same aa and the new-formed compounds, derived from the aa metabolism, have a good mobility and have a tendency to be transported. Another part of the same study showed that the penetration into the leaves is very different according to the fruit species: stone fruits show a more quick penetration than pome fruits and the speed of penetration follows this order: the quickest is plum, then cherry, peach, pear, apple and quince.

In a similar experiment carried out at the Sandoz Laboratories, Basle, Switzerland, it has been considered the penetration and translocation of ^{14}C radiolabeled glycine and glutamic acid mixed with Siapton in bean plants (Sauer, 1973, unpublished internal report). The experiment gave a confirmation that aa contained in Siapton can be absorbed and used in different ways, depending on the physiological development of the plant. It seems that the plant can make a choice among the amino acids according to its own necessities.

In the same years, German researchers were able to confirm that the absorption and subsequent translocation of aa occurs at a rate dependent from the same aa, but also that it is generally quite high (Schiller and Martin, 1975).



Figure 3. Autoradiography of a cherry shoot treated with C^{14} radiolabel amino acids, University of Gembloux, Belgium (Ferauge and Smal, 1977)

To make an evaluation of the possible compounds formed following the aa application, a study has been carried out at the Phytotron Laboratory of INRA-CNRS, Gif-sur-Yvette (France), where radio-labeled glycine was applied to a leaf of a tomato plantlet (Barbe, 1975, internal report). The extracts from the different parts of the tomato plantlets have been checked for the different substances of transformation. The highest portion of the applied glycine had been quickly metabolised, mainly into sugars, in the same treated leaf. The leaf next to the treated one contained the higher part of the radioactivity, under form of free aa. The remaining part of the assayed organs (stem, new buds, roots) contained a lower amount of the radiocarbon and mainly in form of sugars, proteins and organic acids. It is therefore probable that, due to the active metabolism, the new-formed metabolites are transported rather than the applied aa. Another research carried out at Gembloux was carried out on Belgian endive plants (witloof) submitted to different irrigation conditions. The results showed that the radioactivity from glycine and proline, applied in mixture with Siapton, is distributed also in the chlorophyll, the cellulose, the lignine and the waxes (Hugé, 1982) and that the distribution into these different compounds depends not only upon the age but also on the water status of the plant.

Activity in plants

Many vital plant mechanisms are stimulated after the absorption, translocation and transformation of aa and peptides contained in Siapton. This fact characterises the product as a real biostimulant, able to equilibrate the nutritional functions.

All the various mechanisms and effects shown by Siapton after its assimilation and transport are strictly connected amongst them and it is practically impossible to say which is the main and which is the first one. A tentative schema drawn to show all the actions and effects is reported in the Figure 4.

1. Effects on enzyme systems

Amongst the various physiological mechanisms affected by the product, the activity of some enzyme systems, fundamental to the plant biochemistry, is one of the most important. This kind of action has been experimentally observed and demonstrated for the first time on the NAD-dependent glutamate dehydrogenase (GDH-NAD) in different genotypes of maize plants (Mladenova, 1978). The GDH enzyme system catalyses the incorporation of inorganic ammonium N into the molecule of glutamic acid, from which the majority of other aa is formed through transaminase reactions.

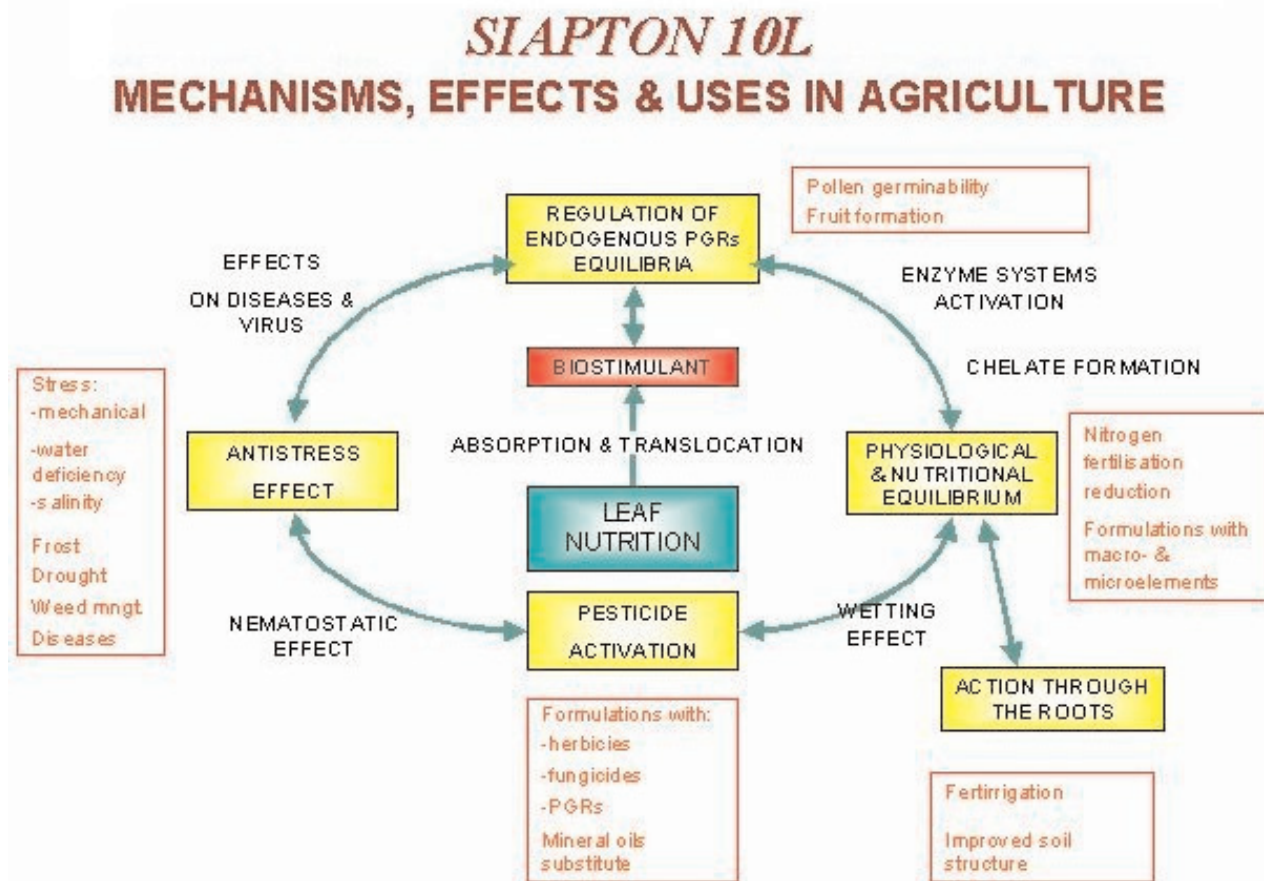


Figure 4. The various interconnected mechanisms of action of Siapton 10L.

An increase of the activity of this enzyme system means a parallel increase of the protein synthesis and therefore of the biomass. The activity of the NAD-dependent GDH resulted more than doubled in comparison with the untreated plants. It is obvious that this action is directly correlated with the yields.

Nitrate reductase (NR), another enzyme system which represents the preceding step in the biochemistry of N in plants, is positively influenced by Siapton (Mladenova *et al.*, 1989; Mladenova *et al.*, 1998). NR catalyses the reduction of the nitrate ion absorbed through the soil, to ammonium ion which, in turn, is embodied into the molecule of glutamic acid and then of the other aa by means of the above-mentioned mechanisms. The improvement of the activity of these two enzymes seems positively correlated to the plant ability to counteract towards the water stress, as it increases the N absorption rate from soil and its utilisation (Mladenova *et al.*, 1998). This mechanism is particularly interesting in agricultural areas where normally there are drought conditions or crops are particularly stressed such as in saline soils. A similar action is exerted by Siapton also on the activity of malate dehydrogenase (MDH): this enzyme is involved in the Krebs cycle and in the regulation of respiratory metabolism. The positive effects of Siapton action on these very important enzyme systems has been observed on various physical, physiological and biochemical parameters in water stressed (salt treated) maize plants in different researches carried out at the Institute of Plant Genetics of the Bulgarian Academy of Sciences. The positive results,

presented in different papers and at various international meetings (Mladenova *et al.*, 1989; 1991; 1993; 1998; Mladenova and Vladova, 1991; Mladenova and Maini, 1991; Mladenova, 1992) can be observed in the structural status of the cells, say particularly the ultrastructure of chloroplast grana (fig. 5); in the change in light curves of chlorophyll delayed fluorescence in mesophyll leaf tissues and the parallel rate of photosynthesis; in the fresh weights of roots and shoots; the rate of N assimilation; the relative growth ratio of the shoots; the tissue water retention (turgidity) (Mladenova and Maini, 1991; Maini and Mladenova, 1992; Mladenova *et al.*, 1998) (fig. 6).

The effect on GDH and NR could be involved in the great biomass increase, together with a clear and dose-correlated antisenescence effect, found in a study carried in the Polish University of Łódź on the aquatic plant *Spyrodela polyrrhiza* grown in a medium containing Siapton (Bytniewska, 1990, unpublished paper) (fig. 7). The interesting conclusion was the possible use of this technique to improve the production of a protein rich biomass to be used as a fodder for animals.

The effects of Siapton on enzyme activities has been verified also in the Research Institute for wine and grapevine of Neustadt (LandesLehr-und Forschungsanstalt für Wein-und Gartenbau) in Germany. It has been shown that Siapton has an effect on the activities of three very important enzyme systems: the leucino-amino-peptidase (which regulates the protein hydrolysis), the acid phosphatase (it presides to the sugar transport and metabolism) and the



Figure 5. Salt stressed induced changes in ultra structure of chloroplasts (x 16,300) from mesophyll leaf tissue of (14+2)-day-old seedlings of *Zea mays* LF₁ single-cross Sofia-2 (Genotype H3). Chloroplasts (I); Grana (II). From: Mladenova *et al.* (1998).

phosphorylase (which acts on the starch synthesis and hydrolytic process) (Schaefer, 1979, private communication; Maini, 1983). Grapevine plants treated along the year with different products and which had suffered a tremendous stress from winter frost were analysed for these enzymes and the results were very different from treated and untreated plants. It must be pointed out that the influence on the enzyme activity can probably regulate, in turn, the PGRs activity, because the biochemical reactions to synthesise PGRs are

catalysed by enzymes. The same could be hypothesised also for the formation of phytoalexins (self-made substances by plants to protect them from fungal, virus or insect attack). In fact, crops treated with Siapton often show a better resistance against diseases (Mallegni, 1971; Kovacs *et al.*, 1986; Maini *et al.*, 1985; Betti *et al.*, 1992). The Systemic Acquired Resistance (SAR) theory, or the acquired internal resistance in response to some protein stimuli, could be involved in this mechanism (Norrie and Hiltz, 1999).

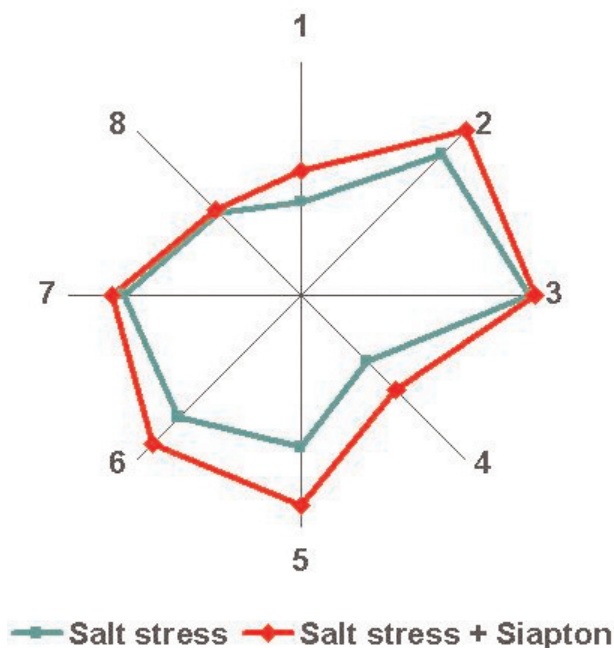


Figure 6. Salt stress alleviation (from: Mladenova *et al.* (1998):

- 1 = Relative growth rate, dry wt., shoots
- 2 = Photosynthetic rate, mesophyll
- 3 = Fresh wt., roots
- 4 = Rate of NO₃ assimilation
- 5 = Relative growth rate, dry wt., shoots
- 6 = Total *in vitro* activity of NR from leaf tissues
- 7 = Fresh wt., shoots
- 8 = rate of NO₃ assimilation, shoots

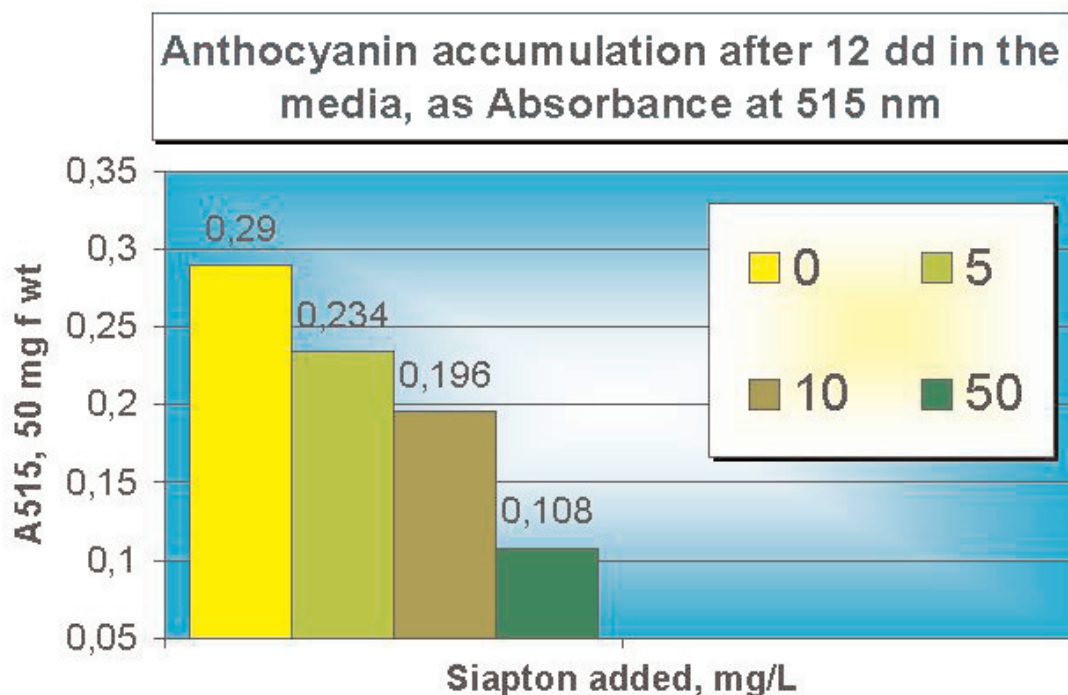


Figure 7. Effect on *Spirodela polyrrhiza* properties by K. Bytniewska, University of Łódź, Poland (1990)

2. Antistress effect

The anti-stress effect of Siapton was observed under drought, high and low temperature, frost, mechanical and chemical stresses as well as in conditions of virus infection (Jacob, 1992; Betti *et al.*, 1992; Maini and Bertucci, 1999; Maini and Sgattoni, 1999).

2.1 Action against water deficiency

The aa proline and hydroxyproline, two of the most representative compounds of Siapton, show a peculiar mechanism of action on biochemical processes interested in the plant resistance to the water deficiency stress. Together with the above mentioned mechanisms due to the enzyme system activation and the consequent better resistance to the water deficiency stress, the presence of these aa and also of the serine, which shows anti wilting effect, gives the product its main characteristic of biostimulant with anti-stress action.

All the experimental works carried out at the Bulgarian Academy of Sciences were aimed at that effect, studying also its dependence from genetic aspects in maize (Mladenova *et al.*, 1989; 1991; 1993; 1998; Maldenova and Vladova, 1991; Mladenova and Maini, 1991; Mladenova, 1992).

In an unpublished experiment on sunflowers grown in special soil chambers (Agronomy Department of the Pisa University) the root length and development were measured showing that the plants under water stress treated with Siapton were characterised by a longer root hair. Some other experiments on eggplant seedlings showed a positive

action of Siapton when applied prior to the transplant or even two days after.

2.2. Action against cold and frost

The physiological mechanisms involved in the response of stress caused by cold and ice action are very similar to those involved in water deficiency and drought stress. Therefore the actions on the same enzyme system activity and the specific effect of proline and hydroxyproline on the wall cell resistance, could explain the positive effects of Siapton in case of frost.

Very specific tests in that direction have been made in Germany, at the Bonn University, using special refrigerated containers where potted small trees of cherry and apple have been submitted to different frost condition, in presence or absence of previous applications with Siapton. The overall and averaged results were very favourable with the Siapton applications, even in comparison with similar treatments with potassium nitrate, commonly used to prevent frost damages (Henze, 1984, unpublished report). The experiments carried out under controlled conditions found experimental confirmations in the field. In an experimental efficacy trial performed in Germany, a vineyard treated during the previous season with Siapton and with another foliar fertiliser in comparison with an untreated control suffered a terrible winter: only the plots treated with Siapton showed a certain resistance, on the contrary, the untreated or treated with the other product plots were much affected (fig. 8) (Schaefer, 1981, Landes Lehr-und Forschungsanstalt fur Wein-und Gartenbau, Neustadt, private communication).

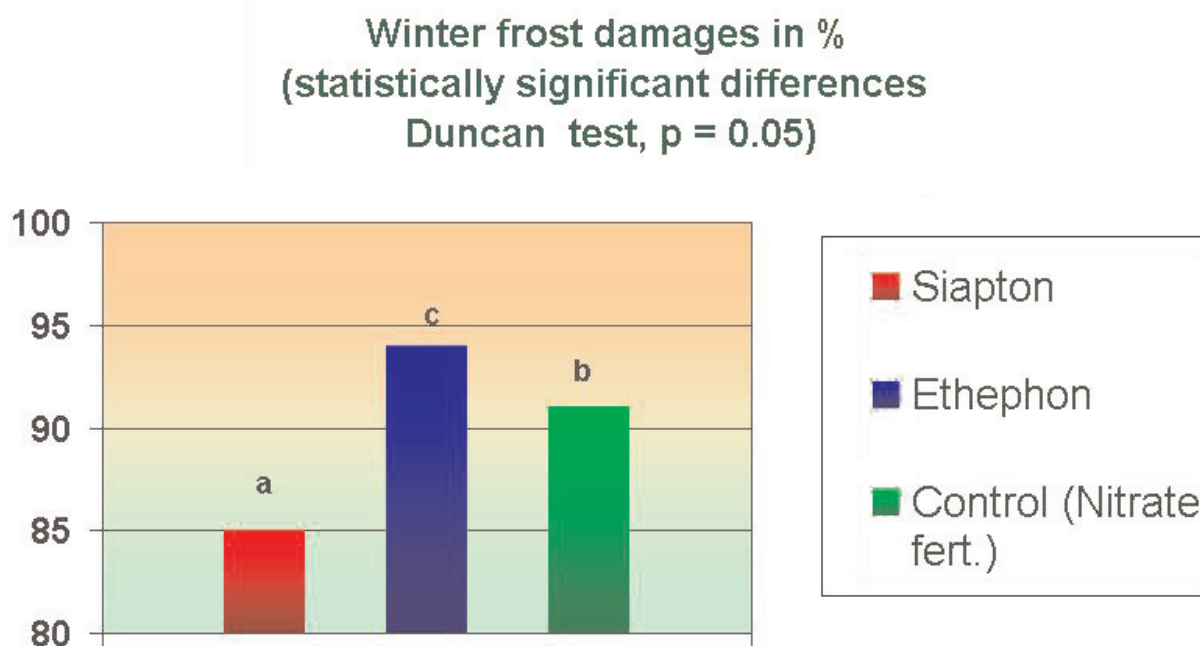


Figura 8. Winter frost damages in a vineyard in Germany, treated along the previous season with different products. Statistically significant differences (Schaefer, 1981).

Similarly, during the 1985 winter in Northern Italy, polar temperatures were reached. Nectarine trees, which fate would have been the death, because of extremely low temperatures (until -23°C) for a week, were soon directly treated on the bark with concentrated Siapton, when the snow was still present in the field. Some branches taken from treated and control plants were submitted to a histological analysis, before springtime, at the Bologna University: the only surviving flowers and green buds were found in branches from treated trees; moreover, in the field, the only very few flowers appeared in treated trees. During the same 1985 winter frost, similar positive results with the use of Siapton have been obtained also in Spain, in the heavily damaged citrus orchards of the Mediterranean coast (Soro, 1985a; 1985b).

Therefore, Siapton is able to prevent, as well as to reduce, the damages caused by winter cold and springtime frosts by recovering the suffering plants (Maini, 1985, unpublished results). The action of the product is displayed through its capacity of positively modifying many biochemical parameters of the plant cells.

3. PGR-like effects

3.1. Laboratory bio-assays

Siapton shows an hormon-like effect due to its influence on some enzyme systems which regulate the activity of endogenous PGRs and due to the synergic effect with the exogenous synthetic PGRs.

A positive effect of Siapton on the cell multiplication has been demonstrated and confirmed by means of a specific *in vitro* test using explants of *Helianthus tuberosus* tubers and a less strong effect on the cell distension by means of the wheat coleoptyle test (Scoccianti *et al.*, 1981; Scoccianti and Maini, 1981). In fact it is well acknowledged that the cell multiplication, stopped during the period of winter dormancy, can be restarted exclusively by substances with PGR activity such as auxines (natural or synthetic) or cytokinins or even polyamines (Bagni *et al.*, 1981), which can break the dormancy of these cells and start their multiplication, as if the dormancy had naturally ended. The results of the experiments showed that Siapton has a very similar effect to the IAA, whereas similar aa products or even artificial mixtures of free aa in the same proportions of Siapton do not show this effect. Because Siapton does not contain auxines or cytokinins nor synthetic PGRs, it is evident that it has an influence on the biochemical systems that regulate the biosynthesis of natural PGRs in plants (Scoccianti *et al.*, 1981, Scoccianti and Maini, 1981).

3.2. Pollen Germinability and fruit-set

The effect of Siapton on cell growth and on the start-up of hormone-like mechanisms is clearly dis-

played also in fruit-setting. Siapton treatments on fruit trees at blossom has been experimented with good results in terms of fruit-setting and yield, not only by hundreds of fruit, citrus and olive growers, but also by qualified Research Institutes. Fruit setting, a phenomenon highly influenced by the stimulation of pollen germinability is strongly and positively influenced by Siapton, which efficacy is mainly due to the positive action on the pollen germination (Marcucci 1984; Viti *et al.* 1986a; 1986b). Scientific experiments in the lab (fig. 9) and in the field have been carried on pear, apple, plum, apricot, almond, peach, grapevine and olive (Filiti *et al.*, 1990a; 1990b; Viti *et al.*, 1986a; 1986b; 1990; 1992a; 1992b). The same effects can be found also in many other fruit crops, as reported by many growers on their tomatoes, peppers, eggplants, citrus, kiwis, mangoes, etc.

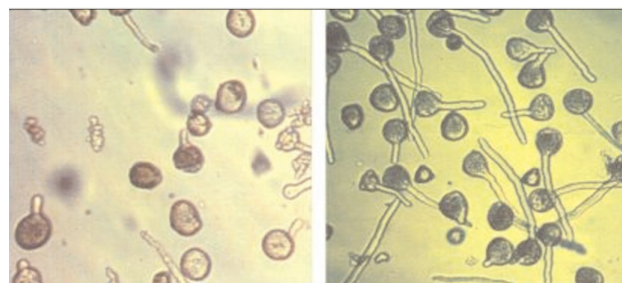


Figure 9. Apple pollen collected from field treated flowers and germinated *in vitro*. On the left : pollen from untreated flowers. On the right: pollen from Siapton treated flowers.

All the tests made *in vivo* and *in vitro* in pear, apple, plum, peach, apricot, almond and olive, demonstrate that the germinability of granules and the lengthening of pollen tube are strongly stimulated by Siapton treatments. In that way, with the same number of granules on the stigma, the probability of fecundating is enhanced. Moreover, in some of the tested fruits, it has been noted a remarkable effect on the lengthening rate of the pollen tube, which can earlier reach the bottom of the stylus (Viti *et al.*, 1992a) and a contemporaneous increase in the ovary viability and longevity (Filiti *et al.*, 1990 b). This can explain the better fecundity and the consequent better fruit-set induced by Siapton under difficult environmental conditions, which could lead to scarce fruit-setting in consequence of the phase displacement between the pollen fertility and the ovary ripening (Filiti *et al.*, 1990b).

All these positive effects of Siapton can be likely explained with its content of free aa and oligopeptides, which show a stimulating and nutritional action like the similar compounds naturally produced and set free by the same pollen granules.

Moreover, it must be pointed out that Siapton has a relatively high concentration of proline, an amino acid contained in high amount in pollen.

Siapton enhances also the absorption and the utilization of many mineral elements by the roots or the leaves, improving the nutritional status of the whole plant. This is particularly important during the fruit-setting process when boron is essential to have a regular pollen fertility. Siapton is able to form complexes with the boron salts, so it can be more easily and readily assimilated and transported improving the pollen fertility and therefore the fruit-setting.

Finally, it must be pointed out that Siapton is not a true fruit-set inducer or promoter product, such as the PGRs. Therefore, it can be active and efficient only in presence of the suitable conditions to reach the fruit-setting, that is: presence of genetically compatible pollen and ovules and/or presence of pollinator insects. In any case, it highly improves that situation when the germinability or the fertility would be scarce because of unfavourable environmental conditions.

3.3. Flower induction

In some experiments, it has been observed also an increase in the number of flowers on the subsequent year of Siapton applications. This is due not only to the better nutritional conditions when the flower induction occurs, but mainly to the regulation effect on the endogenous hormone equilibrium. This effect has been observed in many occasions and in many different situations when Siapton had been applied. The work carried at the Bologna Institute of CNR (Filiti *et al.*, 1986, 1990a; 1990b) on apples and pears, as well as the work carried at the Pisa University on olive trees (Viti *et al.*, 1992 a), showed that Siapton applications at blossom, other than to improve the fruit-set, increased also the number of normal and natural seeds as well as their nutritional status and firmness.

3.4. Rooting

The PGR-like effect of Siapton has been observed also in root formation. It has been noted most of all in direct treatments the rootstocks observing the callus formation or measuring the percentage of viability and the qualitative result in the field. The effect of the product on callus formation has been observed for the first time in Germany (Schaefer, 1979, Landes Lehr-und Forschungsanstalt fur Wein-und Gartenbau, Neustadt, private communication), on grapevine rootstocks.

The treatment was made by means of direct immersion of the stocks in rather concentrated

solution of Siapton and the positive effect on the callus formation was observed only in the grapevine variety that naturally shows difficulty in root formation. Therefore, once again, it has been demonstrated the efficacy of the product in case of physiological or genetic problems which can reduce the normal growth.

Similar results have been obtained also in field trials on wood trees rootstocks (Maini, 1990). In this case Siapton treatment gave the best results in comparison with the untreated and the synthetic PGR treated rootstocks, as far as the survival percentage is concerned.

3.5. Synergistic effect with exogenous PGRs

Field trials carried out with table tomato (Scoccianti, 1982; Paolini *et al.*, 1990) showed that Siapton, in mixture with a synthetic PGR for fruit-set (β -naphtoxyacetic acid), not only increased the yield in comparison to the PGR alone, but also promoted the production of qualitatively better fruits, more homogeneous in size, more fleshy and mainly without the problems caused by the PGRs. On the contrary, Siapton alone did not stimulate fruit-set because it is not a PGR and therefore cannot provoke the parthenocarpy.

The dwarfing PGR chlormequat (CCC or Cycocel) was widely used in cereals, mainly in Northern and Eastern European Countries. Chlormequat, applied on wheat in mixture with Siapton, improves its action as a dwarfer with other positive side effects such as the increase of gluten content of durum wheat (Giordani and Rapparini, 1989). Other than the effects of the mixture chlormequat- Siapton obtained in the field on four varieties of wheat (Giordani and Rapparini, 1989), more deepened studies were carried out on the same specimens coming from the above treatments, by means of the analysis of some biochemical parameters (Maini *et al.*, 1991).

The most interesting results were found in the content of chlorophyll as well as of gibberellin GA_3 in the wheat plants sampled 25 days after the application. Generally, the chlormequat application caused a different content of chlorophyll and GA_3 in comparison to the controls: higher or lower according to the wheat variety. In every case and more evidently in the GA_3 contents, the samples treated with the mixture showed a general trend bringing the levels closer to the control levels (fig. 10). The conclusion is that the plants, after the dwarfing effect of chlormequat which inevitably provokes a stress, are more ready to recover their normal levels of GA_3 and of chlorophyll, with obvious beneficial action on the yield and the quality at harvest.

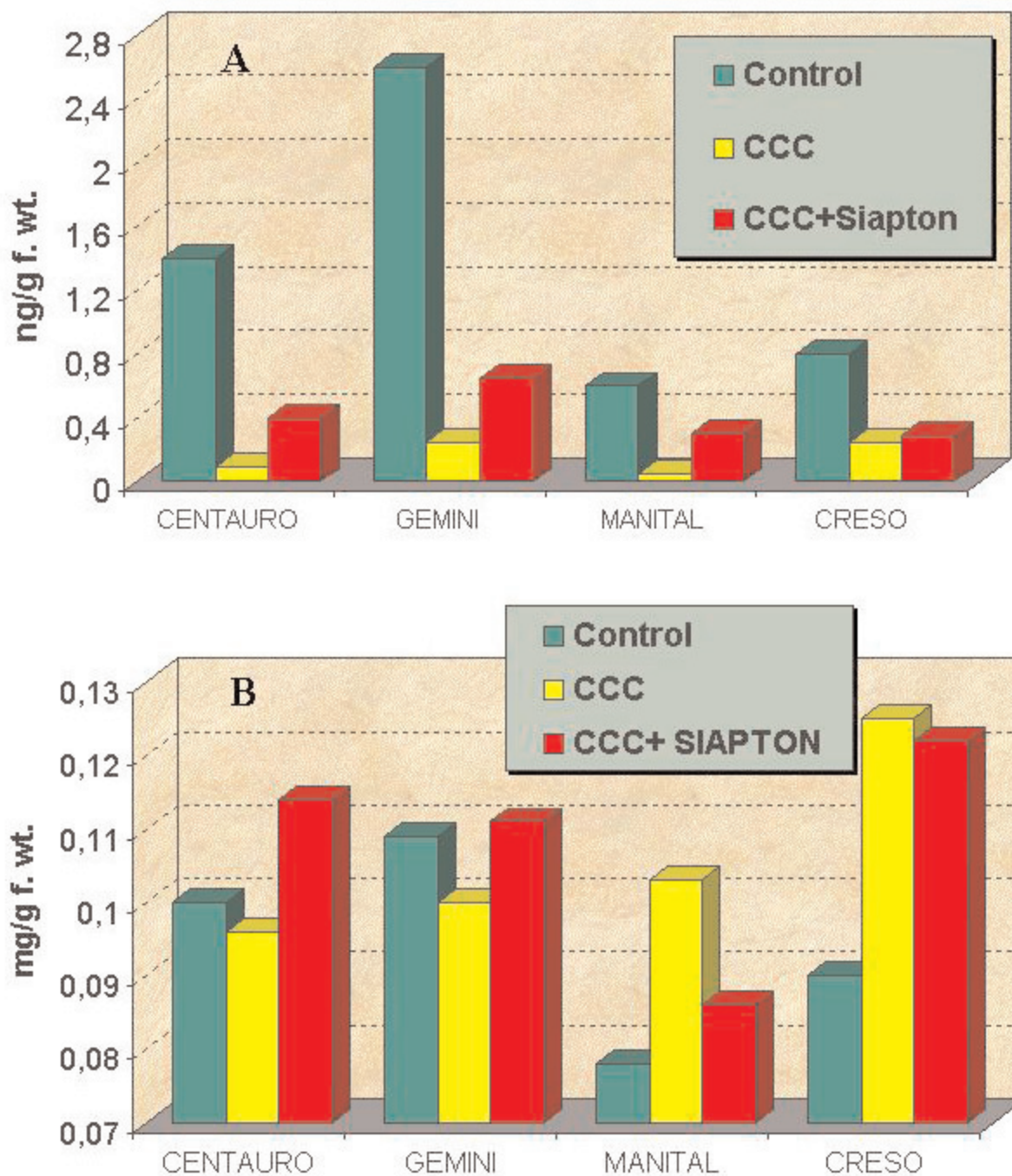


Figure 10. Different contents of GA3 (A) and of total chlorophyll (B) in plants of 4 wheat varieties 20 days after the application of CCC or CCC + Siapton.

4. Use of the macronutrients

It is rather evident that, due to the stimulation of the main enzyme systems, Siapton improves the utilisation of the nutrients in plants. The direct action of the product on GDH and on NR allows a better exploitation of the N from the soil with a consequent better growth of the crop, mainly in case of nutrition deficiency situations.

An experiment carried out in Bulgaria with maize plants submitted to artificial Mg starvation

and then treated with Siapton and $MgSO_4$, in comparison with $MgSO_4$ alone, showed a better utilisation of N, P and K, other than Mg (fig. 11) (Stoyanov, 1981). Calcium too can be better utilised by plants when applied in mixture with Siapton: in fact such kind of mixture is normally applied to reduce the Ca deficiencies such as, for example, the bitter pit in apples or black rotting in tomatoes. Special formulations have also been prepared, on that basis.

Thanks to the mentioned enzyme activation and consequent possibility to reduce the N amount in soil, Siapton application has also the useful possibility to reduce the risk of polluting the groundwater with nitrates and/or their accumulation in plants, particularly in the green leaf vegetables. After preliminary trials carried out in Germany on lettuce and radishes, in an experiment carried out in Italy, spinach plants coming from plots with reduced ground N and treat-

ed with Siapton by foliar spray, contained a lower nitrate amount in the leaves, in comparison with plants coming from plots treated with the full dosage of ground N (fig. 12) and without any yield reduction (Maini, 1984, unpublished report). The nitrate content reduction in edible vegetables is very important, because they are dangerous to babies, forming nitroso-haemoglobin, as well as they are precursors of the nitrosamines, highly carcinogenic compounds.

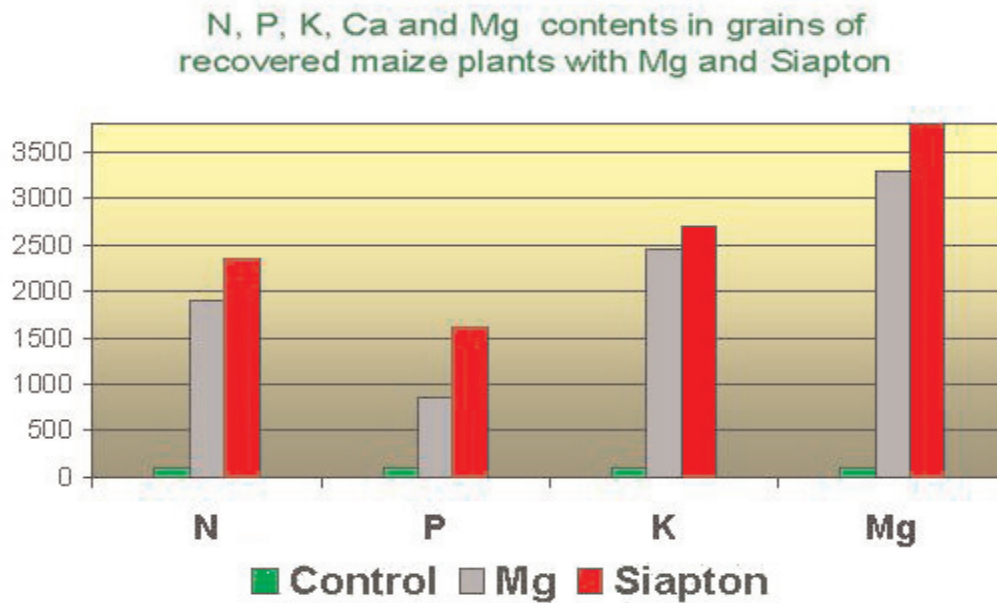


Figure 11. N, P, K, and Mg contents in grains from maize plants under starvation due to a Mg deficiency. Control check = 100. From: Stoyanov (1981).

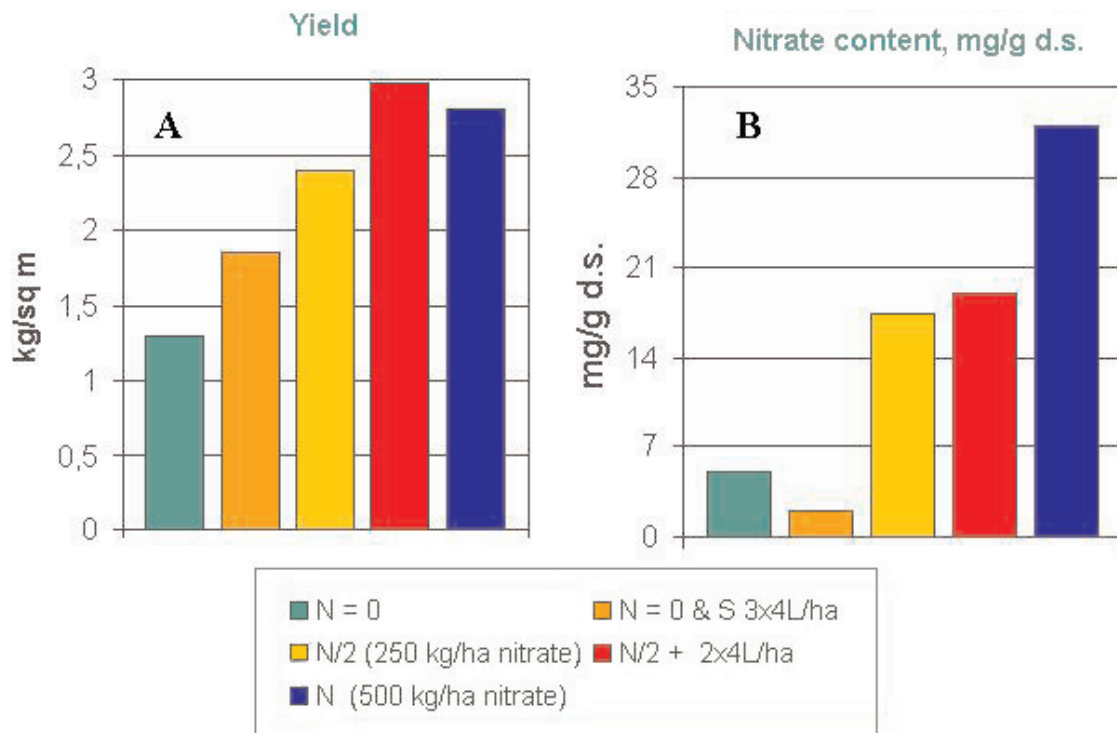


Figure 12. Field trial carried out on spinach to evaluate the possibility to reduce the N fertilisation obtaining a good yield and a reduction of NO₃ content into the leaf tissues (Maini, 1984).

6. Utilisation of micronutrients

It is well known that aa and short chain peptides are able to form chelates with the metals.

Siapton, being particularly rich in free aa and short chain peptides, shows a particular affinity to micronutrients. These last, when chelated by organic compounds such as the aa and peptides, can penetrate more easily through the cell membrane because in the new chelated molecular form they display a different physiological mechanism of penetration. In fact, instead of the normal ion mechanism implying electric charges exchange, the chelated metals can be introduced through an organic molecular way (Ashmead, 1986). Therefore, in this way the microelements enter the plant tissues through a "smuggling" effect and, once the interior of the plant is reached, they are also easier transported.

The practical results have been observed in hundreds of field applications using mixtures with different micronutrients. Other than the above mentioned experiment with Mg in maize, many other meso- and micronutrients have been used in the practice with positive results. As for example, applications of iron sulphate (FeSO_4) alone against chlorosis are very rarely used, due to the scarce effects obtained. On the contrary, applications of the FeSO_4 in mixture with Siapton can afford positive results. Some years ago an Organism for the Plant Protection in Bavaria, officially suggested the application of Siapton in mixture with FeSO_4 to prevent and treat the chlorosis in grapevine (Amtlicher Rebschutzdienst für Bayern, 1980). These suggestions derived from various positive trials carried in the practice. A German Researcher also published very positive results (Rasp, 1986) obtained to correct the Fe deficiency in grapevine by the use of Siapton in mixture with FeSO_4 . It must be pointed out that quite good results were obtained also with the use of the biostimulant alone. This can be explained by the displacement and subsequent better transport of the Fe, immobilised at the interior of the plant. In the same experiments, another aa based product did not show the same positive effect.

Interactions with soil

Siapton was born as a product to be applied through the leaves. Anyway, many attempts have been made during time to use it also as soil fertiliser. The first encouraging results, however, arrived only when the applications began to be carried out through fertigation systems where a continuous flow of the product can be assured.

Very simple studies carried out in the laboratory showed that aa and peptides of Siapton are very quickly breakdown by the bacteria and microflora, when brought to the soil in a unique application and

so they cannot reach the roots. On the contrary, a continuous flow in water solution, makes easier the penetration into the soil, reaching the root depth without considerable microbial breakdown (Maini and Collina, 2000, unpublished paper).

Moreover, the presence of long chain peptides in Siapton makes easier the deepening of the aa into the soil, because they act either as wetting agents and they can form short chain peptides and free aa through their breakdown. Therefore, in the last years, the Siapton use in soil application skyrocketed. At present, at least 50% or more of the product is used in this way, not only in horticultural crops, but also in fruit, citrus and olive trees.

This special utilisation found also a very good background in some complete experimental works carried out in Spain by the CEBAS of Murcia, Institute pertaining to the National Scientific Investigation Council (CSIC). The work (CEBAS, 1990, unpublished report), carried out on potted tomatoes grown with drip irrigation system, showed the positive effect of Siapton on various parameters, in comparison with untreated controls or treated with humic acids. The yield, the utilisation of N, P and K, the quality of the fruits, and in particular the red colour, were positively affected. Moreover, a special positive effect was found on the same soil structure, with an increase of its porosity.

Acknowledgement

The precious collaboration of Dr. Fabio Agnolon, of SICIT 2000 SpA, in the revision of this paper is greatly and cordially appreciated.

References

- Amtlicher rebschutzdienst für Bayern 1980. Bulletin (hinweis) no 8.
- Ashmead H.D. 1986. The absorption mechanism of amino acid chelates by plant cells. In: Foliar Feeding of Plants with Amino acid Chelates (Ashmead H.D., Ashmead H.H., Miller G.W., Hsu H.H., Noyes Publications, Park Ridge, New Jersey, U.S.A.), pp. 219-235.
- Bagni N., Serafini Fracassini D., Torrigiani P. 1981. Polyamines and growth in higher plants. In: Advances in Polyamine Research. (Caldarera C.M., Raven press, ed., New York, U.S.A.), Vol. 3, pp. 377-388.
- Betti L., Canova A., Maini P., Merendino A., Paolini M. 1992. Effects of foliar application of an amino-acid based biostimulant on the response of pepper seedlings to PepMV infection. Advances in Hortic. Sci., 2: 97-103.
- Branzanti B., Filiti N., Innocenti G. 1986. Influenza di regolatori di crescita sulla produzione di *Agaricus bisporus*. Riv. Micol. Ital., 15: 17-22.
- Bytniewska K. 1985. Siapton: Dolistny nawóz. Postępy Nauk Rolniczych, 5: 27-35.

- Ferauge M.T., Smal J.P. 1977. Dix Années de Recherche sur le pommier. IRSIA, Gembloux (B), 5: 35-53.
- Filippini L. 2006. Alle radici della biostimolazione: aspetti scientifici a supporto. Convegno Biostimolanti in agricoltura: aspetti agronomici, analitici, normativi. 7-8 luglio 2006, Montegridolfo (RN).
- Filiti N., Cristoferi G., Maini P. 1986. Effects of biostimulants in fruit trees. *Acta Hort.*, 179: 277-278.
- Filiti N., Cristoferi G., Righetti B. 1990. The effects of biostimulants and growth substances on fruit set and yield of pear. XXIII Int. Horticult. Congr. Firenze. Vol. II: Abstr. no. 4219.
- Filiti N., Righetti B., Merendino A. 1990. Biostimulant effects on red delicious apple fruiting. XXIII Int. Horticult. Congr. Firenze. Vol. I: 396,(Abstr. No.1871).
- Giordani G., Rapparini L. 1989. Influenza della concimazione azotata e dei trattamenti fitoregolatori su varietà di frumento tenero e duro. *L'Informatore Agrario*, 45: 83-90.
- Hsu H.H. 1986. Chelates in Plant Nutrition. In: Foliar Feeding of Plants with Amino acid Chelates (Ashmead H.D., Ashmead H.H., Miller G.W., Hsu H.H., Noyes Publications, Park Ridge New Jersey, U.S.A.), pp. 209-217.
- Hugé P. 1982. Influence de composés chimiques organiques sur le développement des plantes. *Compte Rendu Rech. 1980-1982. (C.R. 1/12)*, Station Chim. Phys. Agric. Gembloux (B), § 5.4.
- Jacob H. 1992. Sharkabedingte Fruchtschäden und Zwetschensorten. Wirkung eines Pflanzenstärkungsmittels. *Obstbau*, 7: 349-351.
- Kovacs A.I., Maini P., De Leonardis A. 1986. Effetto nematostatico del biostimolante Sipton. *Atti Giornate Fitopatol.*, Riva del Garda, CLUEB Ed. BO, pp. 415-424.
- Krause, W. 1974. Italian developed compound could open new era in vegetable crop nutrition. *The Grower*, January 26: 156.
- Maini P. 1976. Foliar infiltration of some amino acids and their subsequent changes in bean plants. *Fiziol. Rastenii. (Sofia)*, 2: 3-7 (in Bulgarian, with English summary).
- Maini P. 1980. Aspectos científicos y aplicaciones prácticas de la fertilización foliar con Sipton a base de amino ácidos. III Congr. Nacional Químicos de España, Sevilla. pp.8
- Maini P. 1983. Ricerche di Laboratorio e di campo con un prodotto naturale organico complesso ad applicazione fogliare. *Vignevisini*, 10: 58-62.
- Maini P., De Leonardis A., Kovacs A. 1985. Effetto sui nematodi galligeni di applicazioni fogliari con alcuni aminoacidi e con Sipton (2° Congr. Soc. Ital. Nematologia). *Redia*, 68: 257-266.
- Maini P. 1985. Possibile recupero degli olivi colpiti dalle gelate. *Terra e Vita*, 30: 77.
- Maini P. 1990. Rooting improvement for cuttings in tree nurseries with the organic biostimulant Sipton. XXIII Int. Horticult. Congr. Firenze, Vol II: Abstr. No.4259.
- Maini P. 1990. Nutrire e stimolare le piante con aminoacidi e peptidi. *Terra e Vita*, 22: 72-73.
- Maini P., Collina A., Paolini M., Giordani G., Detroux Ph. 1991. Effet d'une formulation spéciale de Chlormequat sur la GA₃ endogène et d'autres paramètres biochimiques chez quatre variétés de blé. ANPP. Troisième Coll. sur les substances de croissance et leur utilisation dans les productions végétales, Paris, pp. 39-48.
- Maini P., Mladenova Y.I. 1992. Biostimolante Sipton contro gli stress abiotici. *Il Giornale del Maiscoltore*, 6: 26-27.
- Maini P., Bertucci B.M. 1999. Possibility to reduce the effects of the viruses with a biostimulant based on amino acids and peptides. *Agro-Food Ind. Hi-Tech.*, 10: 26-28.
- Maini P., Sgattoni P. 1999. Possibilità di ridurre gli effetti delle virosi con un biostimolante a base di amino acidi e peptidi. *Inform. Fitopatol.*, 10: 11-15.
- Mallegni C. 1971. La concimazione fogliare del sedano. *Inform. Ortoflorofrutticol.*, 12: 3-5.
- Marcucci M.C. 1984. The influence of storage and of organic nutrients on the germination of pollen and fruit set of apple and pear. *Acta Hort.*, 149: 117-122.
- Mladenova Y. I. 1978. Effect of L-glutamic acid and Sipton leaf organic fertilizer on oxidized Nicotinamide Adenine Dinucleotide dependent Glutamate Dehydrogenase of different maize genotypes. *J. Agr. Food Chem.*, 26: 1274-1276.
- Mladenova Y.I., Rotcheva S., Vinarova K. 1989. Changes of growth and metabolism of maize seedlings under NaCl stress and interfering effect of Sipton leaf organic fertilizer on the stress responses. In: 20th Ann. ESNA Meeting, Lunteren (NL), Oct. (poster).
- Mladenova Y.I., Vladova R. 1991. Cytoplasm-dependent NaCl-stress responses of NAD⁺-malate dehydrogenase isoenzymes in F₁ single crosses of *Zea mays* L. 4th Intl. Symp. Genetic aspects of Plant mineral Nutrition, Canberra, Australia. Abstract.
- Mladenova Y.I., Yordanov, I., Popov O., Rotcheva S. 1991. Sipton leaf organic fertilizer mitigates NaCl-induced changes of growth and metabolism of *Zea mays* L. F₁ single crosses. Symp. Bioch. Genetics of Plants '91, Sofia, Bulgaria, Abstracts, 27.
- Mladenova Y.I., Maini P. 1991. Foliar application of Sipton leaf organic fertilizer and alleviation of abiotic stress effects in cultivated plants. *Ecology Conf.: "Stable Development and Ecology"*, Sofia, Oct. Abstracts of the reports, 49.
- Mladenova Y.I. 1992. A protein hydrolysate as exogenic protecting agent of plant growth and metabolism against stress-induced changes. 9th Balkan Bioch. Biophys. Days, Thessaloniki, Greece, Abstract.

- Mladenova Y.I., Goltsev V.N., Vinarova K., Markova M., Antcheva M. 1993. Primary metabolic enzyme changes in *Zea mays* L. seedlings under short-term salt stress. XXIII Annual Meeting ESNA, Halle (Saale), Germany. Working group 3, Abstract.
- Mladenova Y.I., Maini P., Mallegni C., Goltsev V., Vladova R., Vinarova K., Rotcheva S. 1998. Siapton. An amino-acid-based biostimulant reducing osmotic stress metabolic changes in maize. *Agro- Food-Ind. Hi-Tech.*, 9: 18-22.
- Nadolny M., Rogozinska J. 1985. Effect of Siapton on garlic crop and protein and vitamin C content. *Akad. Tech. Rolnicza, Bydgoszcz*, 21: 43-50.
- Norrie J., Hiltz D.A. 1999. Seaweed extract research and applications in agriculture. *Agro-Food Ind. Hi-Tech.*, 10: 15-18.
- Paolini N., Stracciari R., Maini P. 1990. Flower and overall sprayings with SA-100/NOA for fruit setting in greenhouse tomato. XXIII Int. Horticult. Congr. Firenze. Vol. I: 425, Abstr. No. 1224.
- Rasp H. 1986. Control of grape chlorosis through nutrient applications on leaves. In: *Foliar Fertilization* (Alexander A., ed.). *Development in Plant and Soil Sciences*, 22: 242-254.
- Schiller R., Martin P. 1975. Untersuchungen zum Langstreckentransport einiger ¹⁴C-markierter Aminosäuren nach Applikation auf das Blatt. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 167: 427- 428.
- Schrader Th. 1977. Blattdüngung in neuer Form. *Der Deutsche Weinbau*, 10: 1-2.
- Scoccianti V. 1981. Come migliorare la qualità del pomodoro da mensa. *Lotta Antiparassitaria*, 24: 12-13.
- Scoccianti V., Maini P. 1981. Siapton, an amino acid based foliar spray with effects on multiplication and elongation of plant cells. *Proc. 3rd. Int. Symp. Plant Growth Regulators, Varna, Bulgaria, (B.A.S., Sofia, ed. publ. 1985)*, pp. 789-791.
- Scoccianti V., Maini P., Bagni N. 1981. Effetti del Siapton, idrolizzato proteico per uso fogliare, sulla moltiplicazione e distensione di cellule vegetali. *Atti Congr. "I Fitoregolatori in Agricoltura"* (CNR), Firenze, 509-514.
- Snoek H. 1981. *Das Buch von Biologischen Weinbau, Rebbau und Weinbereitung mit naturgemässen Methoden*, Pietsch Verlag, Stuttgart (D), pp. 1-132
- Snoek H., Wulfrath H. 1983. *Das Buch von Steinmehl.*, Pietsch Verlag, Stuttgart (D), pp. 1-144.
- Soro R. 1985 a. Recuperación de los cítricos afectados por las heladas. *Valencia-fruits*, Febr.: 9.
- Soro R. 1985 b. Estimulación de naranjos. *Agrícola Vergel*, 4: 166-169.
- Stoyanov I. 1981. Restoration of maize plants after Magnesium starvation with the help of Magnesium and Siapton. *Proc. 3rd Int. Symp. Plant Growth Regulators, Varna, Bulgaria, (B.A.S., Sofia, ed. publ. 1985)*, pp. 602-606.
- Viti R., Vitagliano C., Bartolini S. 1986 a. Influenza di diversi trattamenti ad azione fitoregolatrice sulla germinabilità ed attitudine fecondativa del polline. *Atti Giornata di studio su: "Controllo della fruttificazione delle piante da frutto"*, Bologna, 18 giugno.
- Viti R., Vitagliano C., Bartolini S. 1986 b. Influenza di diversi trattamenti ad azione fitoregolatrice sulla germinabilità ed attitudine fecondativa del polline. *Riv. Ortoflorofrutt. Ital.*, 70: 53-63.
- Viti R., Bartolini S., Vitagliano C. 1990. Effects of some growth regulators on the pollination and fertilization process in fruit trees species. XXIII Int. Horticult. Congr. Firenze. Vol. II: Abstr. No. 3200.
- Viti R., Vitagliano C., Bartolini S. 1992 a. Effects of some growth regulators on fruit-set in olive. *7th Intl. Symp. on PGRs in Fruit production, Jerusalem, Israel, Abstract*.
- Viti R., Bartolini S., Vitagliano C. 1992 b. La Fécondation, action des régulateurs de croissance. *L'arboriculture Fruitière*, 446: 25-30.

DIAMO ENERGIA
ALLE COLTURE



AGROTECNOLOGIE

www.ilsagroup.com - ilsa@ilsagroup.com

ILSA

II SESSIONE: Biostimolanti in agricoltura: aspetti analitici e normativi I

(Moderatore: Narciso Salvo di Pietraganzili)

Metodi di determinazione dell'attività biostimolante

Serenella Nardi ^{1*}, Andrea Ertani ^{1,2}, Giuseppe Concheri ¹ e Diego Pizzeghello ¹

¹ Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Università di Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD)

² ILSA S.p.a., Via Quinta Strada 28, 36071 Arzignano (VI)

* Corresponding Author: tel. 049 8272911; fax 049 8272929, e-mail: serenella.nardi@unipd.it

Riassunto

I biostimolanti sono prodotti generalmente di natura organica in grado di incrementare l'attività microbica del suolo e la crescita delle piante. Tali prodotti possono contenere, separatamente o in combinazione, batteri del suolo, funghi, actinomiceti o alghe, amminoacidi, sostanze umiche, silicati di potassio, e acido salicilico. Dalle ricerche degli ultimi anni risulta che l'utilizzo dei biostimolanti in campo porta ad un aumento della biomassa della coltura e della resa in produzione attraverso meccanismi anche molto diversi. I meccanismi d'azione più frequenti appaiono essere la stimolazione dell'attività microbica, l'aumento dell'attività di diversi enzimi del suolo e vegetali, l'incremento della produzione nel suolo di ormoni e/o di regolatori la crescita delle piante e l'attivazione di numerosi parametri del metabolismo vegetale.

Gli studi chimici e biochimici sulle sostanze umiche, biostimolanti naturali, ci forniscono oltre vent'anni di esperienza. Per verificare e quantificare l'attività biostimolante di molecole complesse sulla pianta, un valido strumento è rappresentato dai biosaggi. Un biosaggio è un metodo standard di laboratorio che, utilizzando porzioni di pianta, o piante intere, consente di valutare la qualità e l'intensità degli effetti indotti da una sostanza, allo scopo di consentirne l'inclusione in una classe di composti capaci di stimolare risposte simili. Questi test, che si basano su risposte fisiologiche semplici, permettono di confrontare i comportamenti indotti da sostanze di origine e caratteristiche chimiche diverse con sostanze di comprovata attività biostimolante.

Uno dei biosaggi per la verifica e la quantificazione dell'attività auxino-simile di una sostanza è il test di inibizione della crescita delle radici di crescione (*Lepidium sativum* L.). Per la valutazione di una possibile attività gibberellino-simile si può misurare la stimolazione di un composto chimico sulla crescita dell'epicotile di cicoria (*Lactuca sativa* L.). Confrontando gli effetti della sostanza da testare con quelli degli ormoni di riferimento, si evidenziano le possibili attività di tipo biostimolante.

Parole chiave: biostimolante, sostanze umiche, metabolismo vegetale, biosaggio, riproducibilità e ripetibilità

Methods to measure the biostimulant activity

Abstract

Biostimulants are product generally of organic nature which increase the soil microbial activity and/or plant growth. They may contain, separately or in combination, soil bacteria, fungi, actinomyces or algae, aminoacids, humic substances, silicate of potassium, and salicylic acid. Recent field studies showed that biostimulants can increase plant biomass and yield through different mechanisms. The most frequent mechanisms of action appear stimulation of soil microbial activity, increase of several soil and plant enzymes, increase of the content of soil hormones and plant growth regulator, and influence on many metabolic pathways in plant.

Twenty years of experience in the chemical and biochemical studies on humic substances, the most abundant natural biostimulants, have helped to understand the properties of synthetic biostimulants. Bioassays are quick and very indicative ways to verify and quantify the biological activity of complex molecules. A bioassay is a laboratory standard method which, by utilizing portions of plants, tests the effect of a substance and its intensity. These tests compare physiological responses induced by substances with known effect with those induced by novel compounds.

To verify and quantify auxin-like activity we measure the growth reduction of watercress (*Lepidium sativum* L.) roots, while for gibberellin-like activity we assess the length of lettuce (*Lactuca sativa* L.) epicotyls. For both tests 10 seeds are placed on a sterile filter paper in a sterile Petri dish. For watercress, the filter paper is wetted with 1.2 ml of 1 mM CaSO₄ as control, or different concentrations of indoleacetic acid for the calibration curve, or different concentrations of the biostimulant tested. For lettuce, the experimental design is the same as for watercress except that the sterile filter paper is wetted with 1.4 ml and the calibration curve is based on gibberellic acid. After 48 h for watercress and 72 h for lettuce, the seedlings are removed and the root or epicotyl lengths measured. Our results suggest that these two bioassays satisfy the requirements of reproducibility and repeatability.

Key words: biostimulant, humic substances, plant metabolism, bioassay, reproducibility and repeatability

I biostimolanti

In questi ultimi anni nella letteratura internazionale sono stati descritti numerosi prodotti per l'agricoltura che ricadono nella larga categoria dei biostimolanti (Miller, 1990). I biostimolanti sono generalmente prodotti di natura organica che possono contenere, separatamente o in combinazione, batteri del suolo, funghi, attinomiceti o alghe, amminoacidi, sostanze umiche, silicati di potassio, e acido salicilico. Dalle ricerche degli ultimi anni risulta che l'utilizzo dei biostimolanti in campo porta ad un aumento della biomassa della coltura e della resa in produzione attraverso meccanismi anche molto diversi. Gli effetti più frequenti appaiono essere la stimolazione dell'attività microbica, l'aumento dell'attività di diversi enzimi del suolo e vegetali, l'incremento della produzione nel suolo di ormoni e/o di regolatori la crescita delle piante e l'attivazione di numerosi parametri del metabolismo vegetale (Chen *et al.*, 2002, 2003).

I biostimolanti agiscono in modo diverso rispetto ai fertilizzanti in quanto non basano la loro azione sull'apporto di elementi nutritivi pur agendo sul metabolismo microbico e vegetale. Sono difatti stati definiti anche attivatori del metabolismo. Le numerose ricerche documentano come i biostimolanti, per esplicitare la loro azione, debbano essere distribuiti a basse concentrazioni rispetto ai normali nutrienti (Zhang *et al.*, 2003a,b,c).

Da un punto di vista nutrizionale promuovono la crescita delle piante, modificando l'architettura radicale, aumentando lo sviluppo delle radici e predisponendo così le piante ad un maggior assorbimento dei nutrienti. Inoltre, i biostimolanti favoriscono le piante a superare gli stress ambientali dovuti all'uso eccessivo di diserbanti, alle infestazioni da nematodi, alla salinità del suolo, ai colpi di calore e alle radiazioni UV troppo intense (Schmidt and Lui, 1993; Schmidt *et al.*, 1999).

Le sostanze umiche: biostimolanti naturali. Valutazione del loro effetto sulla fisiologia vegetale

Le sostanze umiche, biostimolanti naturali, sono dotate di attività biologica molto complessa (Vaughan e Malcom, 1985; Nardi *et al.*, 1996, 2002). Molti studiosi hanno dimostrato che le sostanze umiche sono in grado di migliorare le proprietà fisiche e chimiche del suolo, favorire una maggiore concentrazione di ioni nella soluzione del suolo e agire come fonte di nutrienti quali P, N e K (Stevenson, 1994; Tan, 1998). Nella rizosfera l'interazione tra la radice e le sostanze umiche è possibile quando le sostanze umiche presenti nella soluzione del suolo hanno delle dimensioni sufficientemente piccole tali da poter penetrare nell'apoplasto e raggiungere la membrana plasmatica (Vaughan, 1986; Muscolo e Nardi, 1999). Questo

evento avviene in vicinanza della superficie radicale, dove il simultaneo rilascio di protoni e di acidi organici, sia da parte della radice che da parte dei microrganismi, rende possibile la dissociazione delle macrostrutture umiche e il rilascio di frazioni bioattive altrimenti non disponibili (Dell'Agnola e Nardi, 1987; Piccolo *et al.*, 1992). Queste frazioni a bassa dimensione molecolare (LMS) possono penetrare nella pianta ed influenzare il metabolismo vegetale inducendo e/o reprimendo la sintesi proteica (Vaughan e MacDonald, 1971; Dell'Agnola *et al.*, 1981), attivando e/o inibendo l'attività di diversi enzimi (Butler e Ladd, 1969) e modificando l'architettura radicale (Figg. 1 e 2 e 3) (Nardi *et al.*, 1996, Canellas *et al.*, 2002). L'azione di sostanze umiche LMS sull'assorbimento degli ioni (nitrato, solfato e fosfato) appare essere selettiva e quantitativamente legata alla concentrazione delle sostanze umiche e al pH del mezzo (Vaughan e Malcom, 1985; Chen e Aviad, 1990; Varanini e Pinton, 2001; Clapp *et al.*, 2001).

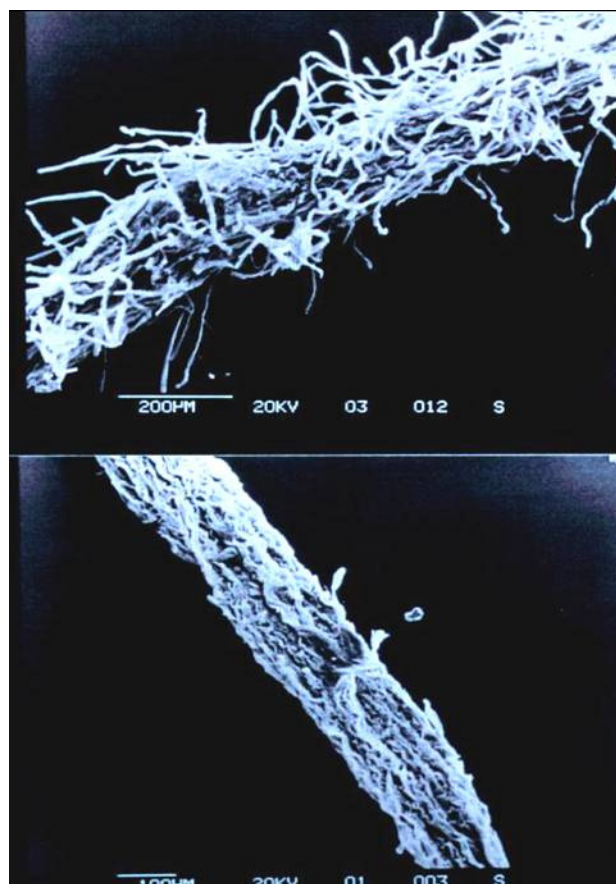


Figura 1. Fotografie al SEM della superficie di radici di piantine di frumento trattate e non con sostanze umiche. È evidente la grande proliferazione di peli radicali nelle piante trattate (sopra) rispetto alle non trattate (sotto) (Nardi *et al.*, 1996).

Figure 1. SEM micrographs of seedling surface roots. Note the higher development and abundance of hairs in the humic substances treated sample (on top) compared to the control (below) (Nardi *et al.*, 1996).

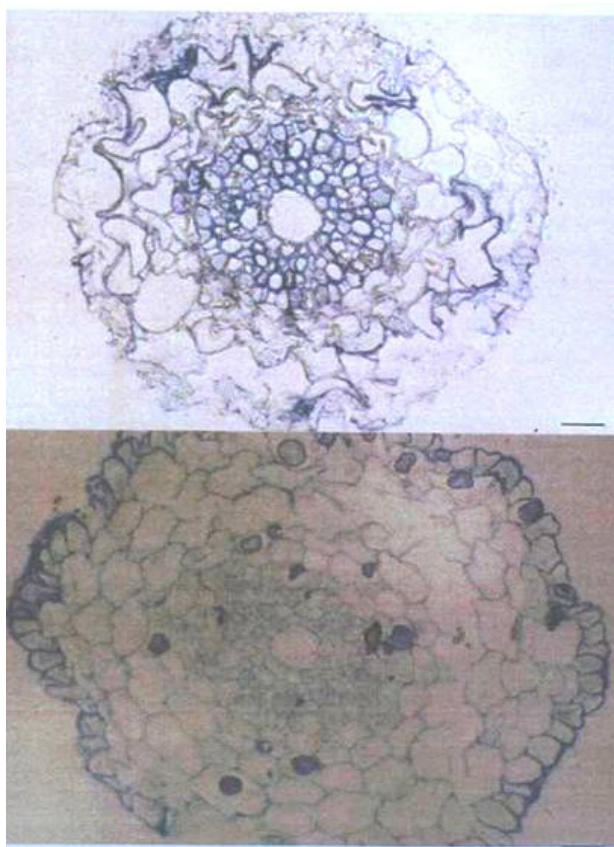


Figura 2. Fotografie al microscopio ottico di sezioni di radici di piantine di frumento trattate (sopra) e non (sotto) con sostanze umiche. Il trattamento con sostanze umiche porta ad una maggior differenziazione dei vasi rispetto alle piante controllo (Nardi *et al.*, 1996).

Figure 2. In LM photographs, the central cylinder of wheat root treated with humic substances (on top) showed a differentiation higher than the control (below) (Nardi *et al.*, 1996).

Questi effetti sono lontani dall'essere compresi pienamente sia a causa della complessità della struttura chimica delle sostanze umiche, non ancora completamente definita, sia dell'azione biologica che agisce a molteplici livelli metabolici.

È stato inoltre evidenziato che le sostanze umiche esibiscono elevata attività ormonale e in particolare attività di tipo auxino-simile (per una review vedere Nardi *et al.*, 2002). Utilizzando due inibitori dell'auxina (TIBA=2,3,5-triiodobenzoic acid and PCIB=4-chlorophenoxy-isobutyric acid), Nardi *et al.* (1994) hanno dimostrato in *Nicotiana plumbaginifolia* che la frazione LMS è quella maggiormente dotata di attività auxino-simile, sebbene il *pathway* seguito dall'auxina e dalla frazione LMS nell'indurre i loro effetti sia leggermente diverso (Fig. 4). Nel 1999 Pinton *et al.* hanno dimostrato che sostanze umiche a basso peso molecolare solubili in acqua (WEHS) sono in grado di influenzare l'assorbimento

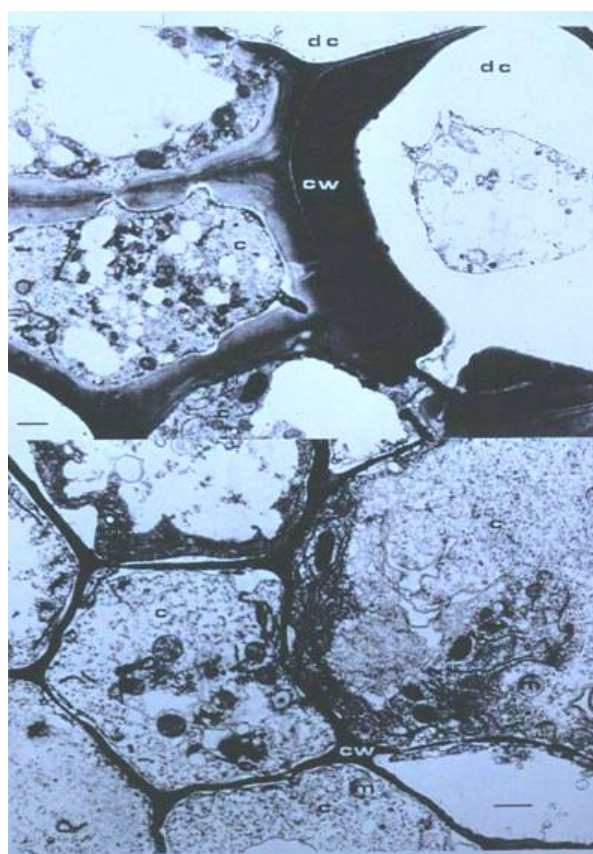


Figura 3. Sezioni di radici di piantine di frumento fotografate al TEM. Il trattamento con sostanze umiche (sopra) induce una maggior differenziazione cellulare rispetto alle piante non trattate (sotto). Nel trattato si nota infatti una parete cellulare molto spessa e la presenza di un grosso vacuolo nella cellula (Nardi *et al.*, 1996).

Figure 3. TEM micrographs of roots treated with humic substances (on top) and control (below). In the treated samples cell with cell walls highly thickened can be already seen. On the contrary, in the control, the cell less differentiated, have very thin cell walls (Nardi *et al.*, 1996).

del nitrato e l'attività dell' H^+ -ATPase della membrana plasmatici in radici di mais. Gli stessi autori hanno dimostrato che piantine di mais esposte alle WEHS hanno una maggior capacità di assorbire il nitrato e una maggior induzione nell'uptake di questo ione. Lo stesso pattern era stato osservato per l'attività dell' H^+ -ATPase di membrana, e questo ha permesso di supporre il possibile ruolo delle WEHS nella modulazione dell'uptake del nitrato mediante un'interazione con la H^+ -ATPasi di membrana. Più recentemente Canellas *et al.*, (2002) hanno evidenziato che acidi umici isolati da compost di lombrichi, inducono l'attività della H^+ -ATPase mediante l'aumento del contenuto dell'enzima. La stimolazione dell'uptake del nitrato da parte di sostanze umiche LMS era già stato visto in orzo (Albuzio *et al.*, 1986) e in mais (Sessi *et al.*, 2000), assieme alla stimolazione dell'attività della nitrato riduttasi e della glutammica sintetasi. Recentemente lo studio del-

l'espressione di geni codificanti per due putativi trasportatori del nitrato (*ZmNrt2.1* e *ZmNrt1.1*) e per due isoforme di H⁺-ATPasi (*Mha1* e *Mha2*) (Quaggiotti *et al.*, 2004) ha dimostrato in mais che sostanze umiche LMS possono esercitare un effetto diretto sulla trascrizione di geni in radici e, a lunga distanza, anche su foglie (Fig. 5). Ancora più recente è lo studio sullo sviluppo radicale in piantine di *Arabidopsis thaliana* wilde-type Col-0 incubate con sostanze umiche LMS o con la corrispondente putativa concentrazione di auxina (Pizzeghello *et al.*, 2006 b). Per cercare di capire meglio il meccanismo di azione è stato impiegato anche il sistema reporter DR5-GUS, un marker della distribuzione endogena

dell'auxina, e un inibitore del carrier dell'influsso dell'auxina (1-NOA). I risultati hanno confermato l'azione auxino-simile della frazione umica nello stimolare la formazione dei primordi laterali. L'effetto può essere spiegato mediante un uptake da parte della pianta dell'auxina contenuta nelle sostanze umiche e/o mediante un'azione sul trasporto polare dell'auxina endogena. L'auxina e la frazione LMS hanno evidenziato la stessa azione anche sul meccanismo di apertura degli stomi in foglie di pisello (Fig. 6) (Russel *et al.*, 2006). Questo effetto è mediato dalla fosfolipasi A₂ (PLA₂) e da un kinasi (PKC), enzimi entrambi coinvolti nel segnale di trasduzione alla risposta all'auxina.

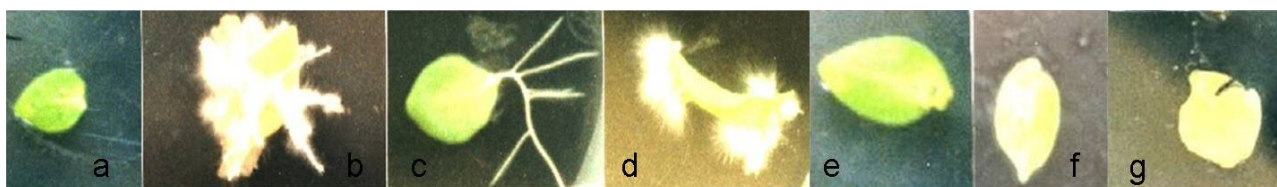


Figura 4. Effetto sulla differenziazione in espianti fogliari di tabacco non trattato (a) e trattato con acido indolacetico (AIA) (b), sostanze umiche a basso peso molecolare (LMS) (c), AIA + LMS (d), un inibitore della traslocazione dell'auxina (TIBA) (e), TIBA + AIA (f), TIBA + LMS (g). L'effetto di radicazione indotto dalle sostanze umiche LMS e dall'auxina è in entrambi i casi bloccato quando è presente anche l'inibitore della traslocazione (Nardi *et al.*, 1994).

Figure 4. Photographs of leaf explants of *Nicotina plumbaginifolia* treated with low molecular size (LMS) humic substances, auxin (IAA), and an inhibitor of the auxin translocation (TIBA) (a = control, b = IAA, c = LMS, d = IAA + LMS, e = TIBA, f = TIBA + IAA, g = TIBA + LMS. Root induction induced by IAA and LMS is inhibited by the presence of TIBA (Nardi *et al.*, 1994).

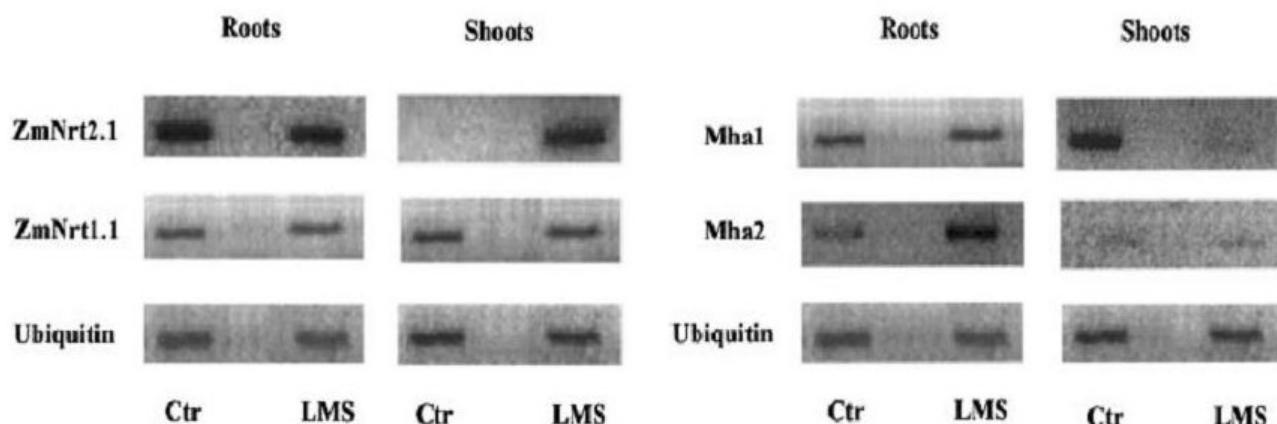


Figura 5. Analisi dell'accumulo di trascritti di putativi trasportatori del nitrato (*ZmNrt2.1* e *ZmNrt1.1*) e di geni dell'H⁺ATPasi (*Mha1* e *Mha2*) in radici e foglie di piantine mais trattate con sostanze umiche a basso peso molecolare (LMS) (Quaggiotti *et al.*, 2004).

Figure 5. Analysis of accumulation of transcripts of maize putative nitrate transporters *ZmNrt2.1* and *ZmNrt1.1* and H⁺ATPase genes *Mha1* and *Mha2* in roots and leaves of control and LMS humic substances treated seedlings (Quaggiotti *et al.*, 2004).

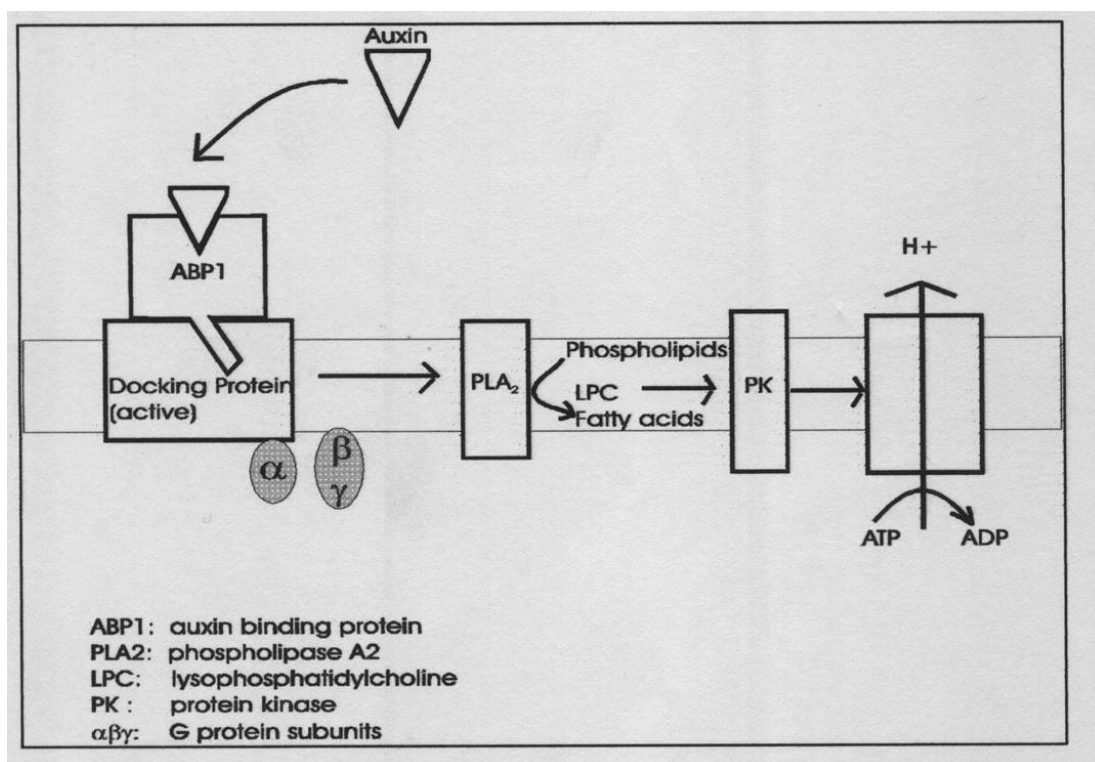


Figura 6. Schema riportante il pathway metabolico che regola l'apertura e chiusura degli stomi in foglie di pisello (Russel *et al.*, 2006).

Figure 6. Metabolic pathway of the mechanism for the opening of leaf stomata in *Pisum sativum* (Russel *et al.*, 2006).

Metodi veloci per valutare l'attività di un biostimolante

Studi complessi come quelli sopraesposti non sempre sono fattibili dalle aziende o dagli organismi di controllo visto che richiedono strumentazione costosa come armadi di crescita, cappe a flusso laminare, microscopi, personale altamente specializzato e, ovviamente, tempo. Ciononostante, per verificare e quantificare l'attività biostimolante di molecole più o meno complesse sulla pianta, un valido strumento è rappresentato dai biosaggi. Un biosaggio è un metodo standard di laboratorio che, utilizzando porzioni di pianta, o piante intere, consente di valutare la qualità e l'intensità degli effetti indotti da una sostanza, allo scopo di consentirne l'inclusione in una classe di composti capaci di stimolare risposte simili (Audus, 1972). Questi test, che si basano su risposte fisiologiche semplici, permettono di confrontare i comportamenti indotti da sostanze di origine e caratteristiche chimiche diverse con sostanze di comprovata attività biostimolante (Audus, 1972). Tra i diversi biosaggi utilizzabili il test di inibizione della crescita delle radici di crescita (*Lepidium sativum* L.) e il test sulla crescita dell'epicotile di cicoria (*Lactuca sativa* L.) sono sicuramente tra quelli più affidabili anche in termini di ripetibilità e riproducibilità (tab. 1). Per la verifica e determinazione di una possibile attività auxino-simile di una sostanza si può misurare la ridu-

zione dell'ipocotile di crescita causata dalla presenza del prodotto da saggiare rispetto a piante controllo allevate in soluzioni nutritive. Per la valutazione di una possibile attività gibberellino-simile si può misurare la stimolazione di un composto chimico sulla crescita dell'epicotile di cicoria. Confrontando gli effetti delle sostanze da testare con quelli degli ormoni di riferimento, si evidenziano le possibili attività di tipo biostimolante (Subler *et al.*, 1998; Nardi *et al.*, 2003; Pizzeghello *et al.*, 2001, 2006 a).

Tabella 1. Risultati dei test di ripetibilità e riproducibilità applicati ai biosaggi per la determinazione dell'attività auxino (*L. sativum* L.) e gibberellino-simile (*L. sativa* L.)

Table 1. Results of reproducibility and repeatability tests on bioassays to determine the auxin- (*L. sativum* L.) and gibberellin-like activity (*L. sativa* L.)

	Biosaggio	
	<i>L. sativum</i> L.	<i>L. sativa</i> L.
Ripetibilità* %	8.9	5.4
Riproducibilità* %	0.0	2.2

* <10%, soddisfacente; 10-30% può essere soddisfacente; >30% insoddisfacente

* <10%, satisfactory; 10-30% may be satisfactory; >30% unsatisfactory

Bibliografia

- Albuzio A., Ferrari G., Nardi S. 1986. Effects of humic substances on nitrate uptake and assimilation in barley seedlings. *Canadian Journal of Soil Science* 66:731-736.
- Audus L.J. 1972. *Plant Growth Substances*. Vol. 1. Chemistry and Physiology. Leonard Hill, London, 533 pp.
- Butler J., Ladd J.N. 1969. The effect of methylation of humic acids on their influence on proteolytic enzyme activity. *Australian Journal of Soil Research* 7:229-239.
- Canellas L.P., Olivares F.L., Okorokova-Facanha A.L., Facanha A.R. 2002. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺ ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology* 130:1951-1957.
- Chen Y., Aviad T. 1990. Effects of humic substances on plant growth. In: *Humic substances in soils and crop science: selected readings* (MacCarthy P., Clapp C.E., Malcom R.L. and Bloom P.R., Soil Science Society of America ed., Madison, WI), pp. 161-186.
- Chen S-K., Subler S., Edwards C.A. 2002. Effects of agricultural biostimulants on soil microbial activity and nitrogen dynamics. *Applied Soil Ecology*, 19:249-259.
- Chen S-K., Edwards C.A., Subler S. 2003. The influence of two agricultural biostimulants on nitrogen transformations, microbial activity and plant growth. *Soil Biology & Biochemistry*, 35:9-19.
- Clapp C.E., Chen Y., Hayes M.H.B., Cheng H.H. 2001. Plant growth promoting activity of humic substances. In: *Understanding and managing organic matter in soils, sediments, and waters* (Swift R.S. and Sparks K.M., International Humic Science Society ed., Madison, WI), 243-255.
- Dell'Agnola, G., Nardi, S. 1987. Hormone-like effect of enhanced nitrate uptake induced by depolycondensed humic fractions obtained from *Allolobophora rosea* and *A. caliginosa* faeces. *Biology and Fertility of Soils* 4:115-118.
- Dell'Agnola, G., Ferrari, G., Nardi, S. 1981. Antidote action of humic substances on atrazine inhibition of sulphate uptake in barley roots. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 15:101-104.
- Miller R.H. 1990. Soil microbiological inputs for sustainable agricultural systems. In: *Sustainable Agricultural Systems* (Edwards C.A., Lal R., Madden P., Miller R.H. and House G., Soil Water Conservation Society ed., Ankeny, IA, USA), pp. 614-623.
- Muscolo, A., Nardi, S. 1999. Effetti di due frazioni umiche sul metabolismo azotato di cellule di *Daucus carota*. In: *IV Le ricerche di base e le applicazioni delle sostanze umiche alle soglie del 2000* (Convegno Nazionale della Sezione Italiana dell'International Humic Substances Society, Alghero), pp. 103-106.
- Nardi S., Concheri G., Dell'Agnola G. 1996. Biological activity of humic substances. In: *Humic substances in terrestrial ecosystems* (Piccolo A., Elsevier ed., Amsterdam, The Netherlands), pp. 361-406.
- Nardi S., Panuccio M.R., Abenavoli M.R., Muscolo A. 1994. Auxin-like effect of humic substances extracted from faeces of *Allolobophora Caliginosa* and *Allolobophora Rosea*. *Soil Biology and Biochemistry* 23:833-836.
- Nardi S., Pizzeghello D., Muscolo A., Vianello A. 2002. Physiological effects of humic substances in higher plants. *Soil Biology & Biochemistry*, 34:1527-1537.
- Nardi S., Pizzeghello D., Bragazza L., Gerdol R. 2003. Low-molecular-weight organic acids and hormone-like activity of dissolved organic matter in two forest soils of N Italy. *Journal of Chemical Ecology*, 29(7):1523-1538.
- Piccolo A., Nardi S., Concheri, G. 1992. Structural characteristics of humus and biological activity. *Soil Biology & Biochemistry* 24:273-380.
- Pinton R., Cesco S., Iacoletti G., Astolfi S., Varanini Z. 1999. Modulation of NO₃⁻ uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma H⁺ATPase. *Plant and Soil* 215: 155-161.
- Pizzeghello D., Nicolini G., Nardi S. 2001. Hormone-like Activity of Humic Substances in *Fagus sylvaticae* L. Forests. *New Phytologist*, 151:647-657.
- Pizzeghello D., Zanella A., Carletti P., Nardi S. 2006a. Chemical and biological characterization of dissolved organic matter from silver fir and beech forest soils. *Chemosphere*, 65:190-200.
- Pizzeghello D., Trevisan S., Quaggiotti S., Ruperti B., Palme K., Nardi S. 2006b. Effetto di sostanze umiche sullo sviluppo della radice in *Arabidopsis thaliana*. In: *Convegno Nazionale Società Italiana di Chimica Agraria*. Alghero.
- Quaggiotti S., Ruperti B., Pizzeghello D., Francioso O., Tugnoli V., Nardi S. 2004. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*, 55:803-813.
- Russell L., Stokes A.R., Macdonald H., Muscolo A. and Nardi S. 2006. Stomatal Responses to Humic Substances and Auxin are Sensitive to Inhibitors of Phospholipase A2. *Plant and Soil*, 283:175-185.
- Schmidt R.E., Lui W-J. 1993. Pendimethalin influence on seedling Kentucky bluegrass developed from plant growth regulator-treated seed. *International Turfgrass Society Research Journal* 7:708-714.
- Schmidt R.E., Zhang X., Chalmers D.R. 1999. Response of photosynthesis and superoxide dismutase to silica applied to creeping bentgrass grown under two fertility levels. *Journal of Plant Nutrition* 22:1763-1773.
- Sessi E., Nardi S., Gessa C. 2000. Effects of low and high molecular weight humic substances from two differ-

- ent soils on nitrogen assimilation pathway in maize seedlings. *Humic Substances in the Environment* 2 (1/4):39-46.
- Stevenson F.J. 1994. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd edn. Wiley & Sons, New York, 380 pp.
- Subler S., Dominguez J., Edwards C.A. 1998. Assessing biological activity of agricultural biostimulants: bioassays for plant growth regulators in three soil additives. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 29(7&8):859-866.
- Tan K.W. 1998. *Principles of Soil Chemistry*, 3rd ed. Marcel Dekker, New York.
- Vaughan D. 1986. Effetto delle sostanze umiche sui processi metabolici delle piante. In: *Sostanze Umiche effetti sul terreno e sulle piante* (Burns R.G., Dell'Agnola G., Miele S., Nardi S., Savoini G., Schnitzer M., Sequi P., Vaughan D., Visser S.A., Ramo Editoriale degli Agricoltori ed., Roma), pp. 59-81.
- Vaughan D., MacDonald I.R. 1971. Effects of humic acid on protein synthesis and ion uptake in beet discs. *Journal of Experimental Botany* 22:400-410.
- Vaughan D., Malcolm R.E. 1985. Influence of humic substances on growth and physiological processes. In: *Soil Organic Matter and Biological Activity* (Vaughan D. and Malcolm R.E., Martinus Nijhoff ed., Boston, MA), pp. 37-75.
- Varanini Z., Pinton R. 2001. Direct versus indirect effects of soil humic substances on plant growth and nutrition. In: *The rhizosphere* (Pinton R., Varanini Z. and Nannipieri P., Marcel Dekker ed., Basel, Switzerland), pp. 141-158.
- Zhang X., Ervin E.H., Schmidt R.E. 2003a. Seaweed extract, humic acid, and propiconazole enhance tall fescue sod recovery following heating. *HortSci.* 38:440-443.
- Zhang X., Ervin E.H., Schmidt R.E. 2003b. Enhancement of Kentucky bluegrass sod recovery following heating by selected plant growth regulators. *Crop Science* 43:952-956.
- Zhang X., Ervin E.H., Schmidt R.E. 2003c. Effects of liquid application of a seaweed extract and a humic acid on creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds. A.). *J. Amer. Soc. HortSci.* 128:492-496.

Pseudomonas

PRORADIX®

... per chi vuole il **MASSIMO** dalle sue **COLTURE** !

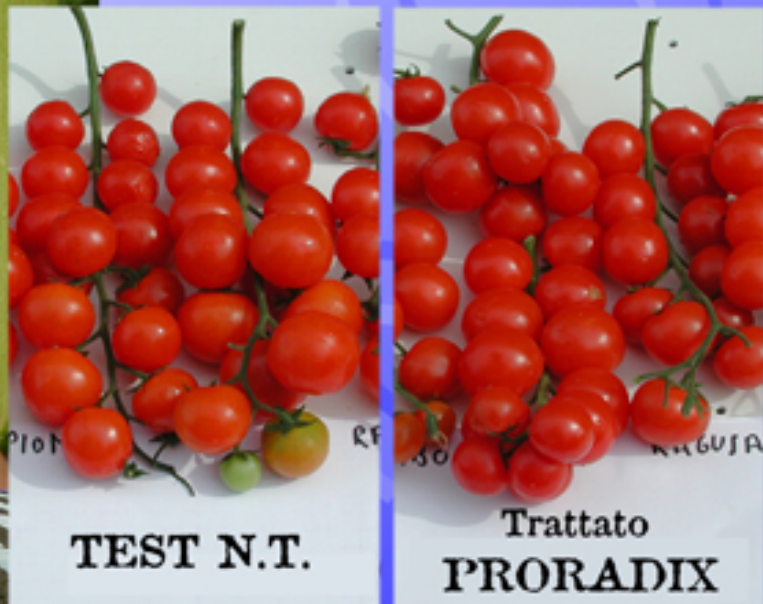
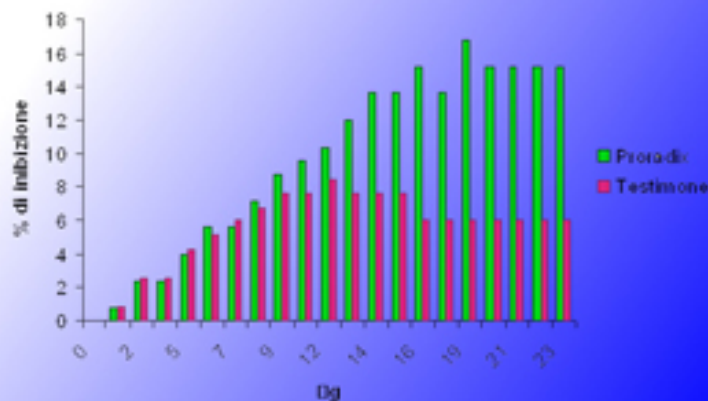


- Aumenta PRODUZIONE e QUALITA'

- Aumenta le DIFESE della PIANTA

- Incrementa la PEZZATURA COMMERCIALE

VALUTAZIONE CAPACITA' ANTIOSSIDANTE TOTALE POMODORO CILIEGINO - SICILIA



- Accresce SALUBRITA' e PROPRIETA' ORGANOLETTICHE

Kwizda

Alle radici della biostimolazione: indagini scientifiche a supporto

Fabio Apone ¹, Stefania Arciello ¹, Gabriella Colucci ¹, Lucio Filippini ^{2*}, Domenico Portoso ²

¹ Arterra Bioscience s.r.l., CEINGE, Via comunale Margherita 482, 80145 Napoli

² Isagro Ricerca, via Fauser 4, 28100 Novara

* Corresponding author: tel.: +39 0321 693 660, fax: +39 0321 693 887;

email: lpfilippini@isagro.it, website: www.isagro.com

Riassunto

I biostimolanti contribuiscono efficacemente all'ottenimento di produzioni agricole di qualità. La loro azione è spesso associata ad un'incrementata resistenza della pianta a stress abiotici, quali quelli climatici ed ambientali. Anche le fasi fenologiche della coltura che forzano l'attività biosintetica (ad esempio, la fioritura e la formazione del frutto) possono essere convenientemente assimilate a una condizione di stress.

Le moderne tecnologie di indagine scientifica permettono di evidenziare i meccanismi biochimici e le espressioni geniche che sono alla base degli effetti fisiologici derivanti dall'applicazione dei biostimolanti. Pertanto, diventa possibile caratterizzare un biostimolante associandolo ad un definito meccanismo d'azione.

Il Siapton[®] 10L, ad esempio, è un idrolizzato proteico che presenta proprietà biostimolanti in grado di mitigare gli effetti negativi sulla crescita delle piante provocati da stress abiotici, quali la salinità, la siccità e le temperature estreme. Il Siapton, per esempio, è in grado di normalizzare lo sviluppo di piante coltivate in suoli ad elevata salinità, come confermato visivamente da un maggiore accrescimento radicale ed, analiticamente, dai valori di alcuni parametri fisiologici (contenuto di ioni potassio, sodio, rame, zinco e ferro; respirazione stomatica; assorbimento di CO₂, traspirazione), altrimenti fortemente alterati dall'elevata presenza salina. L'analisi condotta su piantine di *Arabidopsis thaliana* trattate con varie concentrazioni di Siapton[®] ha permesso di evidenziare l'incremento d'espressione di un pool di geni noti per essere correlati al rafforzamento delle difese vegetali contro gli stress di natura abiotica, consentendo di dare una base molecolare agli effetti osservati. Le informazioni ottenute hanno anche rafforzato l'ipotesi di un'induzione delle difese innate in piante di peperone trattate con Siapton responsabili della riduzione degli effetti causati dal virus del mosaico.

Analogamente sono stati condotti esperimenti d'espressione su *Arabidopsis* con l'acido N-acetiltiazolidin-4-carbossilico, uno dei componenti del biostimolante Ergostim[®] XL, per verificare la sua capacità d'induzione di geni in grado di contrastare gli effetti di agenti stressanti ossidativi (accumulo di glutazione nei tessuti vegetali).

Parole chiave: Biostimolanti, Stress abiotici, Salinità, Espressione genica.

An in-depth investigation to provide scientific bases to the biostimulant activity

Abstract

Single compounds or mixtures of compounds which mitigate the effects caused by abiotic stress agents, through the induction of innate plant defence responses, are classified as "biostimulants". They are an important tool for yield stability and high quality production, especially when climatic conditions become critical for crop growth. The plant developmental stages, such as flowering and fruit growth, which normally require consistent energy investments, can also bring to stress conditions and therefore benefit of biostimulant applications.

Modern technologies can definitively help in the understanding of the mechanisms of action as well as the detection of the genes expressed in the plant after the biostimulant application.

Siapton[®], an amino acidic solution derived from hydrolysed animal proteins, is a well known bio-stimulant which significantly mitigates the damages caused by abiotic stresses (salinity, pollutions, extreme temperatures, drought, etc.) if applied either on the leaves or roots. For example, root application of Siapton on plants grown in high salinity soil completely rescues the growth inhibition caused by the salt. Siapton produces also an effect of normalization of the physiological parameters (contents of potassium, sodium, copper, zinc and iron in vegetal tissues; stomatic conductance; CO₂ absorbance; transpiration) usually altered in all the untreated plants.

A molecular analysis of gene expression in *Arabidopsis thaliana* has shown that many of those genes normally over-expressed in response to innate plant defence against abiotic stress are induced after Siapton treatment. This analysis agrees with some previous data suggesting a faster and complete recovery of green pepper plants damaged by mosaic virus infection.

Moreover, the gene expression induced in *Arabidopsis* leaves by foliar application of the N-acetyl-thiazolidin-4-car-

boxylic acid (an active ingredient of Ergostim® XL) was investigated, recording the over-expression of genes involved in glutathione biosynthesis.

Key words: Biostimulants, Abiotic stress, Salinity, Gene expression.

Introduzione

L'attuale evoluzione climatica sta comportando situazioni sempre più critiche per le coltivazioni agricole, causando una significativa diminuzione della quantità e della qualità dei raccolti, nonché un impatto fortemente negativo sulla redditività dell'agricoltore.

I biostimolanti, grazie alla loro capacità di normalizzare lo sviluppo delle piante sottoposte a stress abiotici causati da agenti climatici (temperature estreme, siccità, eccessi di umidità) ed ambientali (salinità, ma anche sostanze inquinanti), possono contribuire efficacemente all'ottenimento di produzioni agricole con gli attesi parametri qualitativi e quantitativi. La loro azione è spesso associata ad un'incrementata risposta delle difese naturali della pianta nei confronti degli stress abiotici. Anche le fasi fenologiche della coltura che forzano l'attività biosintetica (ad esempio, la fioritura e la formazione del frutto) possono essere convenientemente assimilate ad una condizione di stress abiotico e trovare vantaggio dall'applicazione di un biostimolante.

A fronte delle evidenze visive che testimoniano la reale efficacia di questi prodotti, è oggi possibile applicare tecnologie d'indagine scientifica per definire gli effetti fisiologici, i meccanismi biochimici e le espressioni geniche che sono alla base degli effetti morfologici registrati dall'applicazione dei biostimolanti. Pertanto, questo approccio consente di classificare un biostimolante in base al proprio meccanismo d'azione e di escludere l'intervento di sostanze altrimenti regolamentate, quali i fitormoni.

Il Sipton® è un idrolizzato proteico che presenta proprietà biostimolanti in grado di mitigare gli effetti negativi sulla crescita delle piante provocati da stress abiotici, quali la salinità, la siccità e le temperature estreme. Nel Sipton sono presenti 18 amminoacidi, sia come amminoacidi liberi, sia come componenti di oligopeptidi a diverso peso molecolare (fig. 1). Glicina, prolina, idrossiprolina, acido glutammico, acido aspartico e alanina sono tra quelli più rappresentativi per quantità presente o per ruolo nell'espressione delle proprietà biostimolanti.

Il Sipton, per esempio, è in grado di normalizzare lo sviluppo di piante coltivate in suoli ad elevata salinità, come provato da numerose sperimentazioni condotte sia presso i laboratori di Isagro Ricerca sia

presso numerosi centri di ricerca universitari (Mladenova, 1998). L'effetto positivo di queste applicazioni può essere immediatamente apprezzato attraverso la ricognizione dell'apparato radicale di piante di pomodoro, cv. Marmande, cresciute in condizioni di elevata salinità e trattate con Sipton, a confronto di piante non trattate e di piante cresciute in condizioni non saline; la normalizzazione delle dimensioni appare evidente (fig. 2).

Analogamente, una prova condotta dal Consejo Superior de Investigaciones Científicas della Murcia nel 2003 su piante di limone ha evidenziato che l'applicazione di Sipton 10L alla dose di 90 L/ha è in grado di normalizzare la crescita dei getti (fig. 3) e dei livelli di sodio, cloro (fig. 4), potassio (fig. 5), rame, zinco e ferro (fig. 6) presenti nelle foglie.

Altri parametri sono stati misurati dall'Istituto Valenciano de Investigaciones Agrícolas, Spagna, mediante l'utilizzo di uno spettrometro infrarosso portatile (fig. 7). In particolare, sono stati determinati l'assorbimento fogliare di CO₂, la conduttanza stomatica, la concentrazione di carbonio intracellulare e la traspirazione fogliare di piante di limone invase e cresciute in terreno salino e di piante cresciute nelle medesime condizioni, ma trattate con Sipton 10L per fertirrigazione, alla dose di 90 L/ha (fig. 8). Il confronto con i dati ottenuti su piante non trattate e cresciute in condizioni non saline evidenzia, anche in questo caso, un netto recupero delle alterazioni causate dallo stress salino, con scarti minimi rispetto ai valori registrati nelle condizioni di crescita in assenza di salinità.

Un altro effetto positivo ottenuto mediante l'applicazione di composti biostimolanti in grado di mitigare gli effetti causati da stress abiotici è rappresentato dal contenimento della necrotizzazione fogliare ottenuta in condizioni di stress ossidativi. Per esempio, mediante un'applicazione di una soluzione contenente gli acidi N-acetiltiazolidin-4-carbossilico e tiazolidin-4-carbossilico Ergostim XL, è in grado di contenere le necrosi, altrimenti provocate da un agente ossidante preventivamente applicato alle foglie di fagiolo (fig. 9). Queste proprietà antiossidanti coincidono con un significativo incremento di gruppi tiolici nel tessuto vegetale, in seguito all'applicazione di ciascun componente del biostimolante (fig. 10).

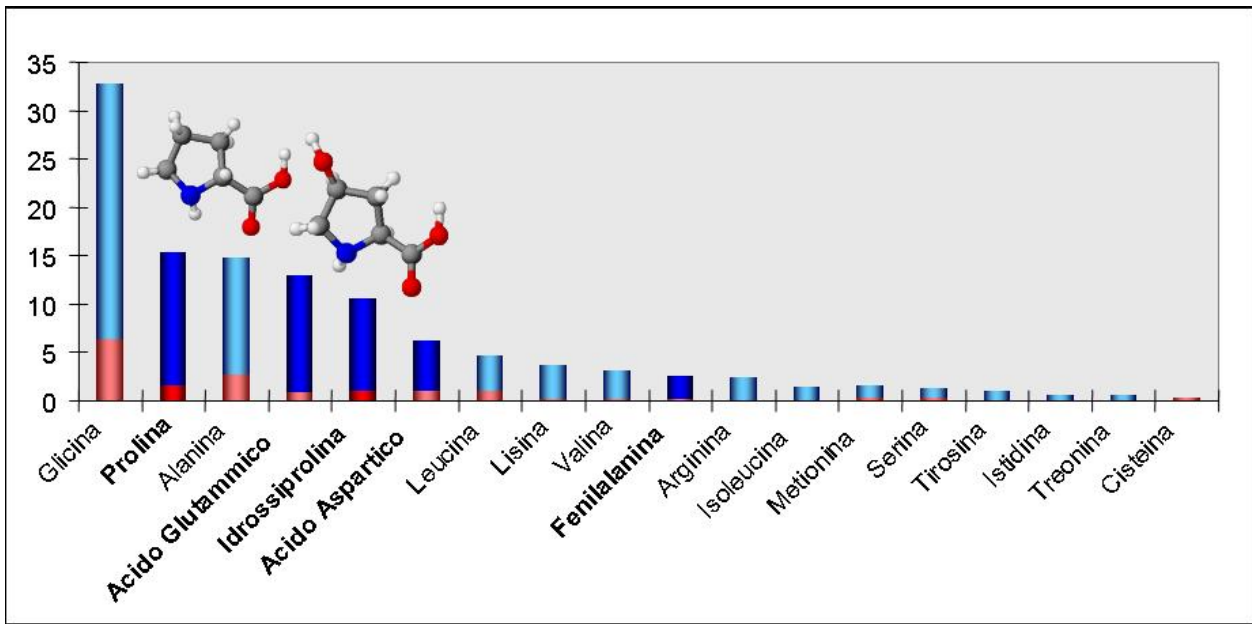


Figura 1. Composizione percentuale del contenuto aminoacidico totale (blu) e degli aminoacidi liberi (rosso) presenti nel biostimolante Sipton® 10L e struttura molecolare della prolina e della 4-idrossiprolina. Gli aminoacidi in grassetto, sono stati utilizzati per l'analisi dell'espressione dei geni indotti dal Sipton e da alcuni suoi componenti in piante di *Arabidopsis thaliana*.

Figure 1. Percentage composition of Sipton® 10L, as total content of amino acids (blue) and free amino acids (red), and the molecular structures of proline and 4-hydroxyproline. Amino acids applied for comparative tests of gene expression on *Arabidopsis thaliana* with Sipton are in bold.

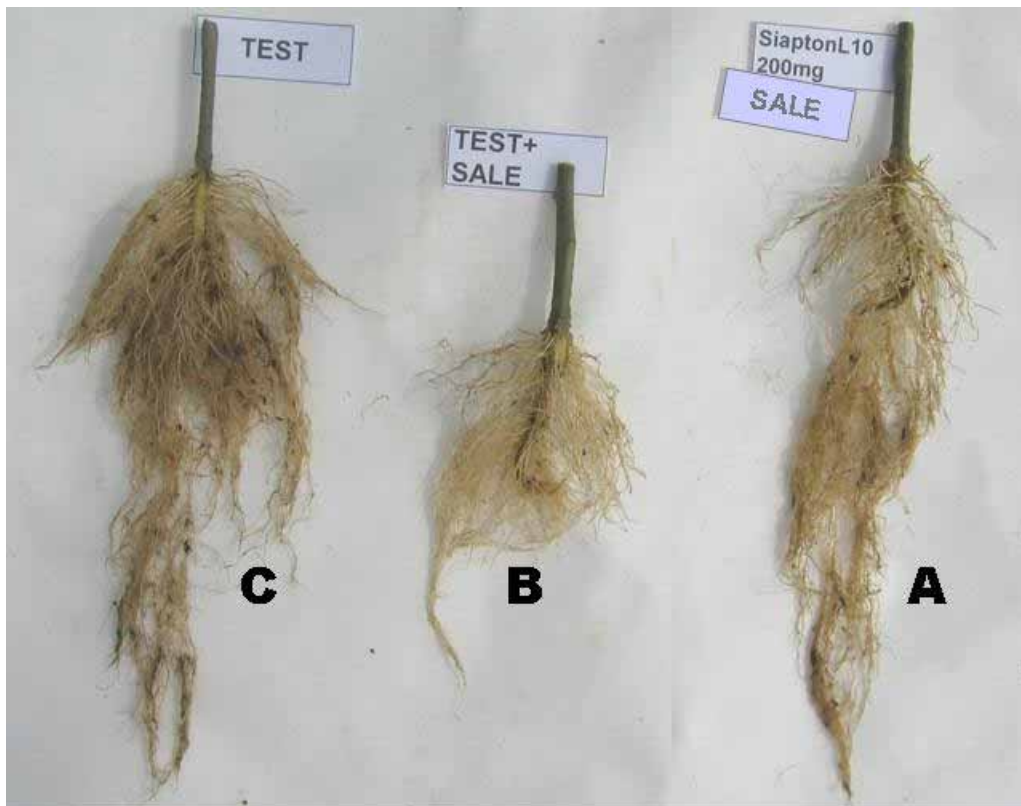


Figura 2. Radici di piantine di pomodoro cv. Marmande cresciute in suolo ad elevata salinità e trattate con Sipton 10L per applicazione al suolo (A), confrontate con piantine non trattate e cresciute nelle stesse condizioni (B) e con piantine coltivate in assenza di salinità (C).

Figure 2. Roots of a tomato potted plant grown in high salinity conditions and treated with Sipton 10L as a root application (A), compared to roots of an untreated plant growth in the same challenging conditions (B) and roots of a plant grown in absence of salinity (C).

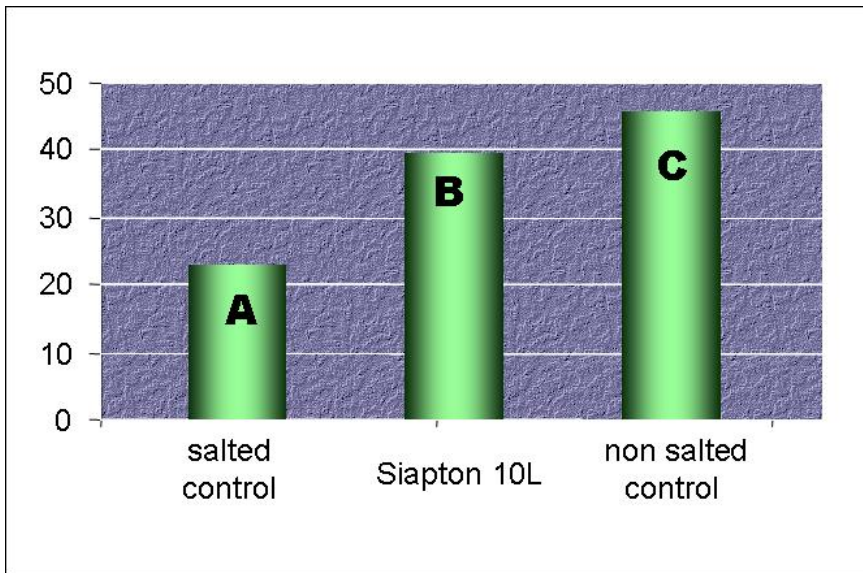


Figura 3. Lunghezze media dei getti (cm) di piante di limone invasate e cresciute in terreno salino (A) e di piante cresciute nelle medesime condizioni, ma trattate con Siapton 10L per fertirrigazione, alla dose di 90l/ha (B), confrontate con dati ottenuti su piante non trattate e cresciute in condizioni non saline.

Figure 3. Shooting length (cm) of potted lemon plants grown in a soil at a high salinity, untreated (A) and treated (B) with Siapton 10L (90l/ha), compared to data obtained from untreated plants grown in standard conditions (C).

Figura 4. Contenuto medio (mg/kg, come peso secco) di Cl^- (indaco) e di Na^+ (blu) in foglie di piante di limone invasate e cresciute in terreno salino (A) e di piante cresciute nelle medesime condizioni, ma trattate con Siapton 10L alla dose di 90l/ha (B), confrontate con dati ottenuti su piante non trattate e cresciute in condizioni non saline /C).

Figure 4. Average content (mg/kg, as dry matter) of Cl^- (indigo) and Na^+ (blue) of potted lemon plants grown in a soil at a high salinity, untreated (A) and treated (B) with Siapton 10L (90l/ha), compared to data obtained from untreated plants grown in standard conditions (C).

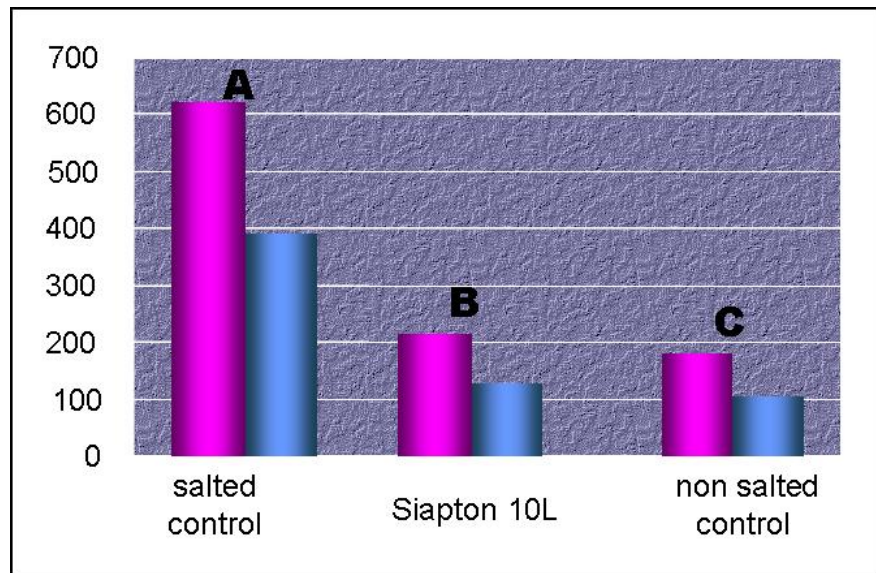


Figura 5. Contenuto medio (mg/kg, come peso secco) di K^+ in foglie di piante di limone invasate e cresciute in terreno salino (A) e di piante cresciute nelle medesime condizioni, ma trattate con Siapton 10L alla dose di 90l/ha (B), confrontate con dati ottenuti su piante non trattate e cresciute in condizioni non saline /C).

Figure 5. Average content of K^+ in leaves of potted lemon plants grown in a soil at a high salinity, untreated (A) and treated (B) with Siapton 10L (90l/ha), compared to data obtained from untreated plants grown in standard conditions (C).

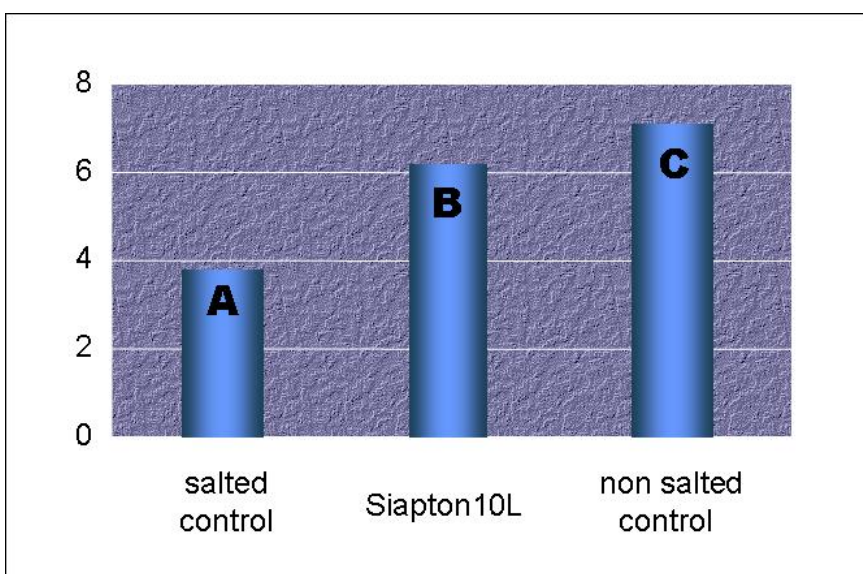


Figura 6. Contenuto medio (mg/kg, come peso secco) di $Fe^{2+/3}$ (blu), Zn^{2+} (indaco) e Cu^{2+} (giallo) in foglie di piante di limone invasate e cresciute in terreno salino (A) e di piante cresciute nelle medesime condizioni, ma trattate con Siapton 10L alla dose di 90l/ha (B), confrontate con dati ottenuti su piante non trattate e cresciute in condizioni non saline /C).

Figure 6. Average content (mg/kg, as dry matter) of $Fe^{2+/3}$ (blue), Zn^{2+} (indigo) and Cu^{2+} (yellow) of potted lemon plants grown in a soil at a high salinity, untreated (A) and treated (B) with Siapton 10L (90l/ha), compared to data obtained from untreated plants grown in standard conditions (C).

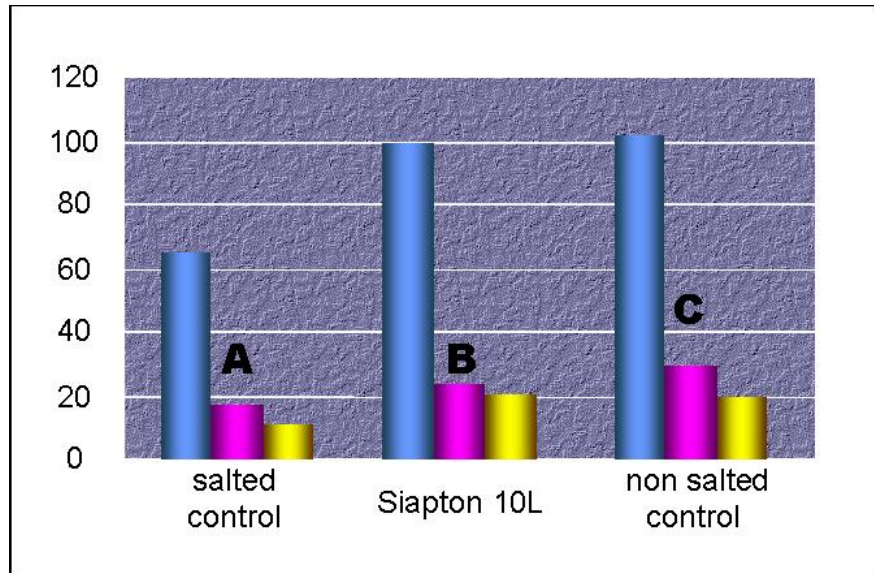


Figura 7. Spettrometro infrarosso portatile per l'analisi quantitativa di gas sulla superficie fogliare

Figure 7. Infra Red Gas Analyser for quantitative analyses on the foliar surface

Figura 8. Misure di assorbimento fogliare di CO_2 , di conduttanza stomatica, della concentrazione di carbonio intracellulare e di traspirazione fogliare, ottenute con l'utilizzo di uno spettrometro infrarosso portatile sulle superficie fogliare di piante di limone invasate e cresciute in terreno salino (salted control) e di piante cresciute nelle medesime condizioni, ma trattate con Siapton 10L alla dose di 90l/ha (Siapton), confrontate con dati ottenuti su piante non trattate e cresciute in condizioni non saline /non salted control).

Figure 8. CO_2 absorbance, stomatic conductance, intracellular carbon concentration and transpiration misured with a Infra Red Gas Analyser on the leaf surface of potted lemon plants grown in a soil at a high salinity, untreated (salted control) and treated (Siapton) with Siapton 10L (90l/ha), compared to data obtained from untreated plants grown in standard conditions (non salted control).

	CO_2 Absorption $\mu l/cm^2/sec$	Stomatic con- duc- tance	Intracellular Carbon concentration	Trans- piration
Non salted control	6,43	0,24	378,2	100%
Salted control	4,63 72%	0,16 67%	397,47 95%	75,8%
Siapton	6,18 96%	0,20 83%	388,43 97%	97,9%

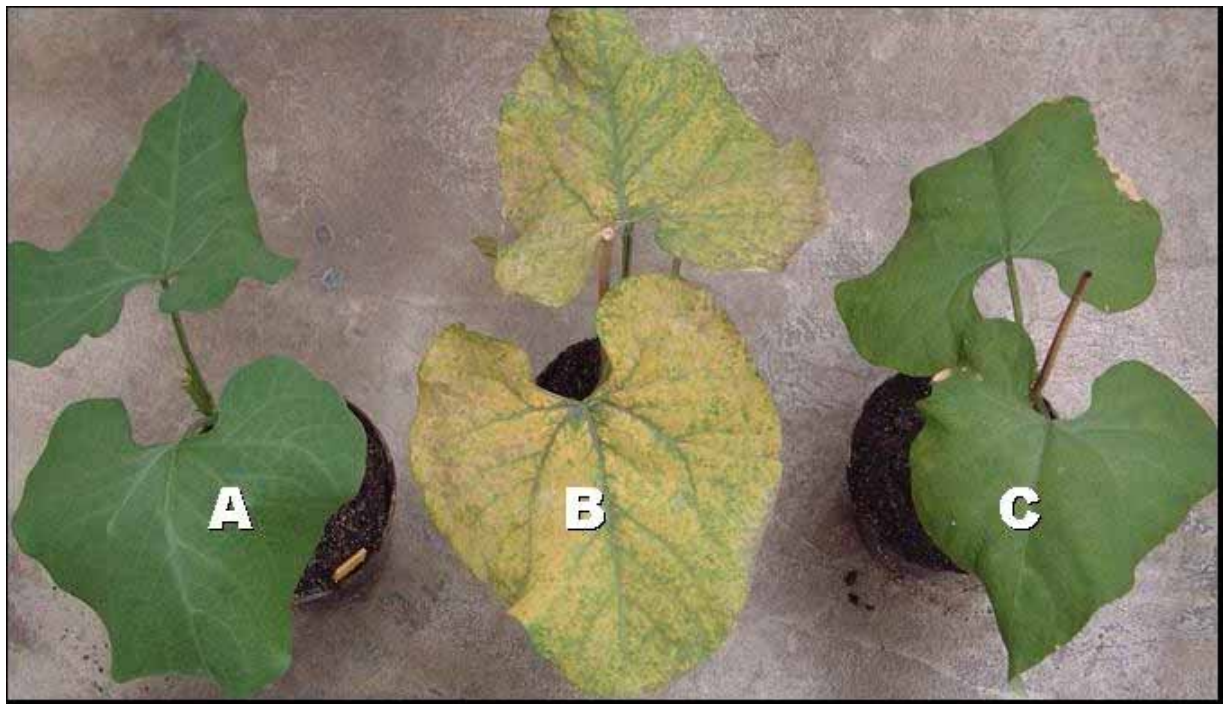


Figura 9. Pianta di fagiolo sottoposta a stress ossidativo per trattamento con un agente chimico (B) a confronto con una pianta di fagiolo trattata analogamente, ma anche con Ergostim XL (C) e con una pianta allevata senza alcun trattamento (A).

Figure 9. A bean plant treated with a chemical inducing an oxidative stress (B), compared to a plant analogously treated, but later sprayed with Ergostim XL (C) and to an untreated plant (A).

Figura 10. Concentrazione micromolare di gruppi tiolici in tessuto secco di foglie di mais, trattate con acido N-acetiltiazolidin-4-carbossilico (ATCA) ed acido tiazolidin-4-carbossilico (TCA).

Figure 10. Concentration of thiolic groups in dry tissue of leaves treated with N-acetyl-thiazolidin-4-carboxylic acid (ATCA) and thiazolidin-4-carboxylic acid (TCA).

	$\mu\text{moli/g dry tissues}$
UTC	0,108
TCA 1 mM	1,516
ATCA 1 mM	0,192

Parte sperimentale

Allo scopo di associare le evidenze visuali, fisiologiche e biochimiche sopra riportate a specifiche espressioni geniche indotte o rafforzate dall'utilizzo dei prodotti indicati, è stata avviata una sperimentazione in grado di evidenziare lo stato di geni correlati a risposte indotte da stress di natura abiotica e biotica su piante di *Arabidopsis thaliana*, utilizzando sia il Siapton 10L che l'acido N-acetiltiazolidin-4-carbossilico, uno degli ingredienti attivi dell'Ergostim XL.

Il Siapton 10L è stato utilizzato per verificare, a livello molecolare, la sua capacità di indurre l'espressione di geni noti per essere naturalmente "up-regolati" dalla pianta in risposta a stress di natura abiotica. Il livello d'espressione di questi geni a seguito del-

l'applicazione di Siapton 10L è stato anche confrontato con quello degli stessi geni, in seguito al trattamento delle piante con alcuni degli amminoacidi che compongono il Siapton. Esperimenti preliminari sono stati condotti per mettere a punto le condizioni d'induzione. Le concentrazioni di Siapton utilizzate per questi esperimenti d'espressione (0,01 e 0,1%) sono sempre state inferiori alle dosi riportate in etichetta (0,3%). In figura 11 è riportata la RT-PCR semiquantitativa relativa al trattamento delle piante con le due diverse concentrazioni di Siapton.

L'acido N-acetiltiazolidin-4-carbossilico è stato invece usato per verificare l'eventuale espressione di geni coinvolti nella biosintesi del glutatone e supportare così, a livello genico, quanto già rilevato biochimicamente.

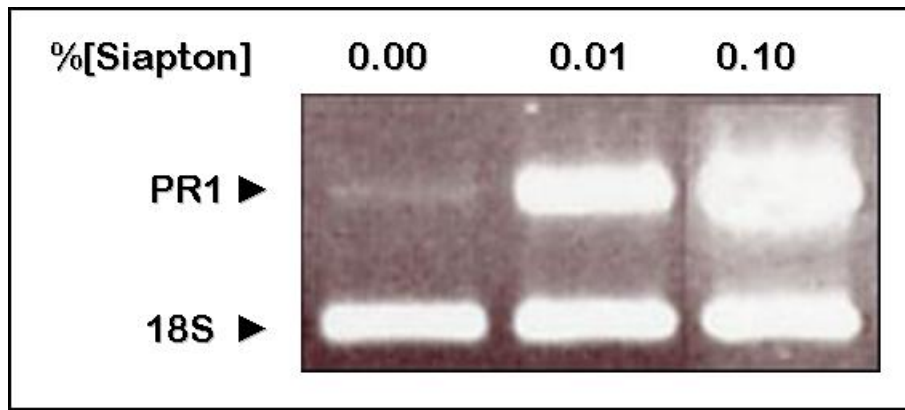


Figura 11. RT-PCR semiquantitativa dell'espressione del gene PR1 in Arabidopsis, dopo trattamento con Buffer (lane 1), Siapton 0,01% (lane 2) e Siapton 0,1% (lane 3).

Figure 11. Semi-quantitative RT-PCR of PR1 expression in Arabidopsis, after a treatment with, respectively, Buffer (lane 1), Siapton 0,01% (lane 2) and Siapton 0,1% (lane 3).

Materiali e Metodi

Trattamenti delle piante

Le piante di *Arabidopsis*, ecotipo Columbia, usate per gli esperimenti di spray sono state allevate in terreno per 3-4 settimane in camera di crescita ad una temperatura costante di 24 °C con il 70% di umidità ed esposte ad un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio.

I composti utilizzati per tali esperimenti (Siapton 0,1%, Prolina 0,014%, Idrossiprolina 0,011%, Fenilalanina 0,002%, Acido Glutammico 0,009%, Acido Aspartico 0,005%) sono stati solubilizzati in 4 mL di mezzo MS 0,25% (Murashige and Skoog Basal Medium with Gamborg's Vitamins) e spruzzati sulla superficie fogliare delle piante. Dopo 24 ore dal trattamento, 3 foglie da 4 piante diverse per ciascun trattamento sono state prelevate per l'estrazione dell'RNA totale.

Analogamente si è operato per testare l'effetto di una soluzione 50 mM dell'acido N-acetilglucosaminidico sull'espressione del gene GSTF7 in *Arabidopsis*.

Estrazione di RNA e RT-PCR quantitativa

L'RNA totale è stato estratto da circa 0,05 g di tessuto vegetale utilizzando il kit GenElute Mammalian Total RNA MiniPrep (SIGMA).

10 µg di RNA totale sono stati retrotrascritti con 200 unità di RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase M-MLV (Fermentas) utilizzando come innesco 0,2 µg di Random primer (Promega).

Gli esperimenti di PCR semi-quantitativa sui vari geni analizzati sono stati effettuati con il kit QuantumRNA™ 18S Internal Standards (Ambion), in cui vengono utilizzate due coppie di primer per l'amplificazione del gene dell'RNA ribosomiale 18S, che

costituisce lo standard di controllo. La sequenza dei primers specifici utilizzati per l'amplificazione dei gene in analisi e le condizioni di amplificazione sono di seguito elencati:

GENE PR1:

Primer Fw: 5'GTAGCTCTTGTAGGTGCTCT 3'

Primer Rev: 5'CATCCTGCATATGATGCTCC 3'

$T_{\text{annealing}} = 48 \text{ °C}$ Rapporto Standard interni 18Sprimer /competimers= 8/2

Cicli di amplificazione= 30

GENE PDH:

Primer Fw: 5'TGCTTGTCTATGGCGTTCGAA 3'

Primer Rev: 5'TTACGCAATCCCGGCGATTA 3'

$T_{\text{annealing}} = 52 \text{ °C}$ Rapporto Standard interni 18Sprimer /competimers= 3/7

Cicli di amplificazione= 30

GENE GSTF7:

Primer Fw: 5'ATGGCAGGAATCAAAGTTTT 3'

Primer Rev: 5'TTAAAGAACCTTCTTAGCAG 3'

$T_{\text{annealing}} = 55 \text{ °C}$ Rapporto Standard interni 18Sprimer /competimers= 5/5

Cicli di amplificazione= 35

GENE KIN2:

Primer Fw: 5'GAGACCAACAAGAATGCCTTC 3'

Primer Rev: 5'GGTAAAACAAGTTCTTAGAAC 3'

$T_{\text{annealing}} = 52 \text{ °C}$ Rapporto Standard interni 18Sprimer /competimers= 5/5

Cicli di amplificazione= 30

GENE SAG12:

Primer Fw: 5'GCACATCGAGTGGATGCTAA 3'

Primer Rev: 5'GGGACATCCTCATAACCTGTA 3'

$T_{\text{annealing}} = 55 \text{ °C}$ Rapporto Standard interni 18Sprimer /competimers= 5/5

Cicli di amplificazione= 40

Risultati e discussione

Il Siapton è risultato indurre notevolmente il gene PR1 già allo 0,01%. L'effetto d'induzione della trascrizione del gene PR1 è dose-dipendente, infatti i livelli d'espressione aumentano proporzionalmente quando il Siapton è utilizzato allo 0,1%.

La concentrazione degli aminoacidi utilizzata negli esperimenti d'espressione è quella riferita allo 0.1% di Siapton (come riportato nella figura 1, nella soluzione oligoproteica denominata Siapton, gli aminoacidi sono presenti in una diversa composizione percentuale).

Oltre all'espressione del gene PR1 e' stata analizzata anche quella di geni strettamente correlati alla risposta a stress abiotici: PDH, GSTF7, KIN2, e SAG12, ottenendo i dati riassunti nella figura 11. Dall'analisi RT-PCR risulta evidente che il Siapton ha indotto significativamente la trascrizione di tutti i geni analizzati ad eccezione di SAG12 la cui espressione è strettamente correlata all'induzione di senescenza e morte cellulare (Quirino *et al.*, 1999). Il Siapton, quindi, utilizzato allo 0,1% è in grado di attivare in modo significativo la trascrizione dei geni correlati alla risposta a stress abiotici. Infatti i geni PDH e GSTF7 attivati da stress osmotici/siccità (Oono *et al.*, 2003; Sappl *et al.*, 2004) risultano maggiormente espressi rispetto al trattamento con il solo buffer (B) (fig. 12). I livelli d'espressione relativi al trattamento con il Siapton sono superiori rispetto a quelli registrati con il trattamento con i singoli aminoacidi che compongono il biostimolante. Anche il gene KIN2, la cui espressione è "up-regolata" da condizioni di bassa temperatura (Kim *et al.*, 2003) e contribuisce ad aumentare la tolleranza della pianta al freddo, risulta essere maggiormente attivato dal Siapton.

Poiché nei casi riportati, l'intensità della banda relativa al Siapton risulta maggiore della somma delle espressioni dei singoli componenti, è possibile ipotizzare un effetto sinergico della composizione risultante.

L'acido N-acetiltiazolidin-4-carbossilico è risultato chiaramente indurre l'espressione del gene GSTF7, rafforzando l'ipotesi di una sovraespressione del glutatione come effetto mitigante stress ossidativi (fig. 13).

Conclusioni

Per i dati molecolari ottenuti e per l'assenza di fenotipi alterati osservabili in seguito al trattamento di *Arabidopsis* con il Siapton 10L, possiamo concludere che a livello molecolare tale composto induce la risposta endogena di difesa a stress biotici ed abiotici della pianta.

Analogamente, l'effetto inducente dell'acido N-acetiltiazolidin-4-carbossilico rafforza in modo significativo l'ipotesi di una sovraespressione del glutatione quale effetto indotto dall'Ergostim XL ed in grado di mitigare gli effetti degli stress ossidativi.

Le informazioni ottenute ed, in particolare, l'espressione del gene PR1 hanno anche rafforzato l'ipotesi di un'induzione delle difese innate in piante di peperone trattate con Siapton in grado di contenere gli effetti causati dal virus del mosaico, per spiegare le evidenze sperimentali già registrate nel passato (Betti *et al.*, 1992; Jacob, 1992; Maini e Sgattoni, 1999).

Le stesse metodologie utilizzate per evidenziare il meccanismo d'azione possono essere vantaggiosamente utilizzate per ottimizzare i prodotti ad effetto biostimolante già esistenti oppure per individuare nuovi ingredienti attivi e/o composizioni sinergiche.

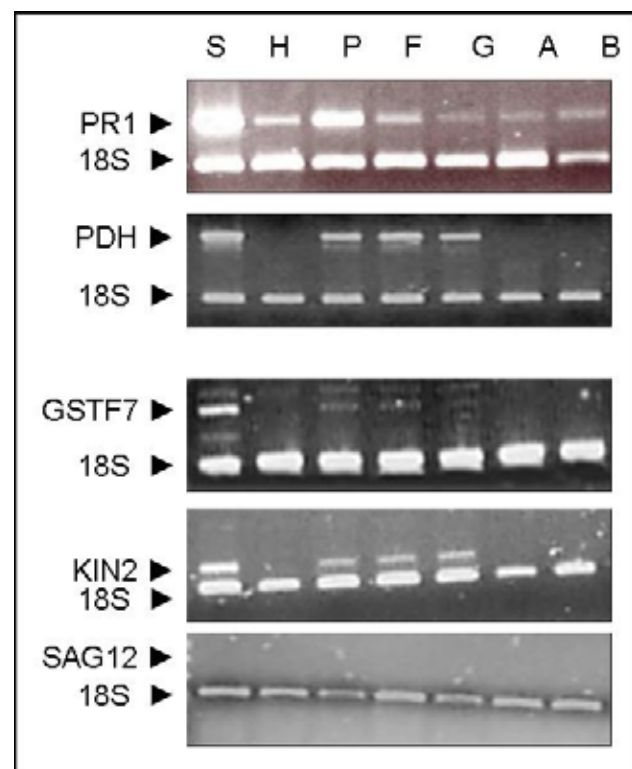


Figura 12. RT-PCR semiquantitativa dei geni PR1, PDH, GSTF7, KIN2 e SAG12 in seguito ad un trattamento di *Arabidopsis* con Siapton 0.1% (S), Proline 0.014% (P), Idrossiprolina 0.011% (H), Fenilalanina 0.002% (F), Acido Glutammico 0.009% (G), Acido Aspartico 0.005% (A) e Buffer (B).

Figure 12. Semi-quantitative RT-PCR of the expression of PR1, PDH, GSTF7, KIN2 e SAG12 in *Arabidopsis*, after a treatment with, respectively, Siapton 0.1% (S), Proline 0.014% (P), 4-hydroxyproline 0.011% (H), Phenylalanine 0.002% (F), Glutamic acid 0.009% (G), Aspartic acid 0.005% (A) and Buffer (B).

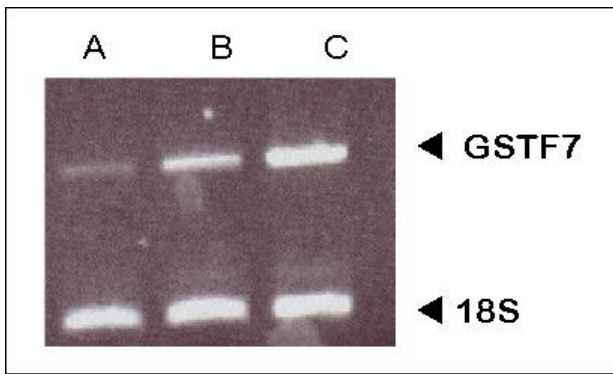


Figura 13. RT-PCR semiquantitativa del gene GSTF7, in seguito ad un trattamento di *Arabidopsis* con soluzioni di acido N-acetiltiazolidin-4-carbossilico 20 mM(B) e 50 mM(C), e di un Buffer (A).

Figure 13. Semi-quantitative RT-PCR of GSTF7 expression in *Arabidopsis*, after a treatment with a solution of N-acetyl-thiazolidin-4-carboxylic acid @ 20 mM(B) or 50 mM(C), or after having sprayed Buffer (A).

Ringraziamenti

Si ringraziano il dott. Mauro Bonfiglioli di Isagro Italia ed il dott. Javier Boned di Isagro Espana per i contributi di pensiero ed operativi che hanno reso possibile la stesura di questa comunicazione.

Bibliografia

Betti L., Canova A., Maini P., Merendino A., Paolini M. 1992. Effects of foliar application of an amino-acid-

based biostimulant on the response of pepper seedling to PepMV infections. *Advanced Horticultural Science*, 6:97-103.

Jacob H. 1992. Scharkabendingte Fruchtschaden an Pflaumen und Zwetschensorten. *Ostbau*, 7:349-351.

Kim K-M., Cheong Y.H., Grant J.J., Pandey G.K., Luan S. 2003. CIPK3, a Calcium Sensor-Associated Protein Kinase that regulates Abscisic acid and cold signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 15:411-423.

Mladenova Y.I. 1998. Effect on the ultrastructure of chloroplasts in maize seedlings under salt stress. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 9: 18-22.

Maini P., Sgattoni P. 1999. Possibile riduzione degli effetti delle virosi con un biostimolante a base di aminoacidi e peptidi. *Ricerca e Divulgazione*, 2:6-7.

Oono Y., Seki M., Nanjo T., Narusaka M., Fujita M., Satoh R., Satou M., Sakutai T., Ishida J., Akiyama K., Lida K., Maruyama K., Satoh S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 2003. Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA microarray. *The Plant Journal*, 34:868-887.

Quirino B.F., Normanly J., Amasino R.M. 1999. Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant Molecular Biology*, 40:267-279.

Sappl P.G., Onate-Sanchez L., Singh K.B., Millar A.H. 2004. Proteomic analysis of glutathione S-transferases of the plant-specific phi and tau classes. *Plant Molecular Biology*, 54:205-219.

SIAPTON[®] 10L

PRODOTTO AD AZIONE SPECIFICA
EPITELIO ANIMALE IDROLIZZATO (FLUIDO) N-C 8,5-25

PRODOTTO AD AZIONE SU PIANTA - **BIOSTIMOLANTE**

**LA GOCCIA CHE BIOSTIMOLA
LA FERTIRRIGAZIONE**

efficace, miscibile, sinergico con idrosolubili e chelati di ferro



- *Risolve le situazioni di stress*
- *Equilibra la nutrizione*
- *Veicola i microelementi*
- *In fertirrigazione migliora il terreno, l'assorbimento e la traslocazione degli elementi nutritivi*

Siapa

Alle radici dello sviluppo

Rizobatteri promotori di crescita, una nuova opportunità per l'agricoltura sostenibile

Arnold Linser, Luca Cazzara *, Giovanni Barbieri

Kwizda Agro Italia S.r.l., via Nazionale, 206/B - 40051 Altedo (Bo); e-mail: l.cazzara@kwizda.it

Riassunto

All'interno della rizosfera i rapporti fra pianta e microrganismi sono fondamentali per un buon sviluppo dell'apparato radicale e dell'intera pianta. Occorre ricordare che la perdita di fertilità dei terreni agrari è dovuta principalmente al degrado della microflora edafica causata dalle moderne pratiche agronomiche.

Fra i microrganismi della rizosfera che hanno un ruolo fondamentale per lo sviluppo e la sanità della pianta ricordiamo varie specie di batteri, funghi micorrizici e funghi saprofiti. E' documentato che alcuni rizobatteri sono in grado di accrescere le difese naturali e di stimolare la crescita delle piante.

In questo lavoro vengono presentati tre anni di esperienze pratiche di campo effettuate su colture industriali ed orticole con *Pseudomonas fluorescens proradix*, batterio appartenente alla classe PGPR (plant growth promoting rizobacteria). Su tale batterio, isolato dalla naturale microflora della rizosfera di patata, sono stati compiuti studi a livello molecolare per fare luce sui meccanismi alla base dei rapporti batterio/radici. E' emerso che, oltre alla produzione di sostanze ormonosimili, il batterio stimola la produzione di acido salicilico e jasmonico, sostanze alla base dei meccanismi di induzione di resistenza sistemica.

Una presenza costante di *P. fluorescens proradix* nella rizosfera delle colture oggetto della prova ha garantito risultati incoraggianti in termini di incrementi produttivi, miglioramento delle caratteristiche qualitative e riduzione dei danni derivanti da fisiopatie e fitopatie.

Argomento innovativo, affrontato in collaborazione con l'Istituto di Fisiologia Clinica del CNR di Pisa, è l'incremento della salubrità delle produzioni agricole tramite l'inserimento di microrganismi nella rizosfera di colture agrarie. E' stato osservato che l'applicazione di *P. fluorescens proradix* sulle radici aumenta il contenuto di sostanze antiossidanti.

Parole chiave: rizobatteri PGP, effetto biostimolante, induzione di resistenza sistemica enzimi detossificanti, sostanze antiossidanti.

Plant growth promoting rhizobacteria: a new opportunity for a sustainable agriculture

Abstract

The rhizosphere, a term introduced by Hiltner in 1904, is defined as the area influenced by root systems. The rhizosphere forms a nutrient rich niche for bacteria as a result of release compounds by the root systems such as organic acid, sugars, and amino acids. The interactions between roots and microorganisms in the rhizosphere has a fundamental importance for the good development of the roots. Schipper in 1987 showed that inadequate colonization leads to decreased biocontrol activity. It's important to remember that the loss of fertility in agricultural soil isn't only caused by the reduction of organic mass, but mainly the loss of the microorganisms caused by the use of big quantities of synthetic products (fertilizers, pesticides, soil disinfectants, etc.) heavy metals and the modern agronomical practises.

The principal microorganisms in the rhizosphere are: mycorrhizas, fungi and bacteria. The importance of the mycorrhizas in plant nutrition and water adsorption is well known. It's also known that some rhizobacteria have the capacity to stimulate the growth and the natural resistance in plants (PGPR).

In this study the results of three years of PGPR (*Pseudomonas fluorescens proradix*) application are described. *P. fluorescens proradix* produces hormones (for example indol acetic acid IAA) able to stimulate root and plant development. This bacteria increase the level of salicylic acid and jasmonic acid activators of systemic resistance (ISR and SAR).

The presence of this bacteria in the rhizosphere of crops has increased plant quality, harvest yield and there are less problems controlling fungus diseases and physiological disorders.

Another useful characteristic of this bacteria is the capacity to increase the antioxidant substances.

Research in this area is ongoing and the focus now isn't so much on the traditional concerns of:

- improving soil structure;
 - growth promotion with increase harvest and pathogen resistance;
- but on

- reducing of chemicals;
- lowering the level of residues and pollution;
- improving food quality with more antioxidant;
- increase shelf life.

Key words: rhizobacteria PGP, bio stimulant effect, systemic resistance, reduction of toxic components in food, antioxidant substances.

Introduzione

La rizosfera, termine introdotto da Hiltner nel 1904, è definita come area di suolo influenzata dal sistema radici. Essa rappresenta una vera e propria nicchia ecologica ricca di elementi nutritivi, essudati radicali, microflora e microfauna. Nel corso dell'evoluzione i rapporti di simbiosi, parassitismo, competizione e predazione sono divenuti così complessi ed importanti da far assurgere questa piccola porzione di terreno a vero e proprio ecosistema. Al suo interno i rapporti fra microrganismi e radici sono complessi tanto da influenzare la vita stessa delle piante.

Già nel 1987 Schippers notava che un inadeguato livello di colonizzazione microbica della rizosfera portava ad un netto aumento dell'incidenza delle malattie.

Del resto occorre ricordare che la perdita di fertilità dei terreni agrari è dovuta non solo al depauperamento in sostanza organica, ma soprattutto al degrado della microflora edafica. Questa riduzione di biodiversità all'interno della popolazione microbica sposta gli equilibri verso gli organismi dannosi a scapito di popolazioni utili. Tali fenomeni hanno per causa principale le monosuccessioni colturali, l'impiego massiccio di prodotti di sintesi e la presenza sempre crescente di metalli pesanti nel terreno (per es. il Rame). Fattori derivanti dalla moderna agricoltura che deve trovare sempre nuove vie per semplificare la gestione agronomica delle colture al fine di contenere i costi di produzione.

Fra i microrganismi della rizosfera che hanno un ruolo importante per lo sviluppo della pianta ricordiamo funghi micorrizici, varie specie di rizobatteri ed alcuni generi di funghi saprofiti. L'importanza delle micorrize nella nutrizione minerale delle piante è nota da tempo (Branzanti *et al.* 1992), esse sono fondamentali nei complessi sistemi che governano l'assorbimento degli elementi nutritivi e svolgono la funzione di vero e proprio interfaccia suolo-radice. Alcuni funghi saprofiti del terreno hanno la capacità di ridurre la presenza di patogeni che colpiscono le radici delle piante (Harman *et al.* 1998) inibendone lo sviluppo con vari meccanismi di azione (competizione, iperparassitismo, antibiotici).

Argomento di questo lavoro è l'associazione radici - rizobatteri, i benefici che ne derivano per le colture agrarie e, soprattutto, le potenziali ricadute pratiche nella gestione economica di un'azienda agraria. Kloepper e Schroth (1978) introdussero il termine "plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)" per indicare i batteri in grado di avere un effetto benefico sulle piante stimolando la crescita di radici e parte aerea o riducendo il danno derivante da patogeni del terreno. I meccanismi di azione attraverso i quali i rizobatteri PGP sono in grado di influenzare la sanità, la nutrizione e la fisiologia della pianta sono estremamente complessi e variabili da specie a specie.

Fra essi ricordiamo esclusivamente i più importanti:

Produzione di sostanze siderofore: in caso di carenza di Ferro nel substrato di crescita, alcuni rizobatteri producono sostanze in grado di legarsi al Ferro (Weller 1988). Fra le principali sostanze prodotte ricordiamo l'acido salicilico, pyochelina, pseudobactina fluorescente, pyoverdina. La presenza di queste sostanze nel suolo da una parte rendono il Ferro maggiormente disponibile con un miglioramento dello stato micronutrizionale delle piante, dall'altro lo sottraggono ai patogeni del terreno inibendone lo sviluppo (Kloepper *et al.* 1980; Bakker *et al.* 1986).

Metaboliti fungitossici: molti batteri del terreno producono sostanze fungitossiche in grado di controllare le malattie del terreno. *Pseudomonas chlorophis MA 342* controlla con un'efficienza paragonabile ai migliori confronti chimici le patologie che affliggono il piede di frumento ed orzo (*Fusarium spp.*, *Tilletia fetida*, *Septoria nodorum*, Elmitosporiosi, ecc.). Questo grazie alla produzione di una molecola fungitossica detta DDR (2,3-deepoxy-2,3-didehydro-ryzoxin) che lega la proteina tubulina impedendo la formazione del fuso mitotico (A. Linser *et al.* 2006).

Sostanze ormonosimili: Vari ceppi di Pseudomonadi fluorescenti producono acido indolacetico (IAA) in grado di stimolare l'allungamento delle radici primarie e lo sviluppo delle radici secondarie (Loper and Schroth 1986). È stato dimostrato che l'acido salicilico, precursore della pyocelina, considerato alla stregua di una sostanza ormonosimile

(Raskin 1992), è coinvolto nell'induzione di resistenza sistemica acquisita (SAR) nelle piante (Gaffney *et al.* 1993). Attualmente l'induzione di resistenza sistemica mediata da vari ceppi di *Pseudomonas fluorescens* è studiata intensamente dai ricercatori di tutto il mondo. Essa potrebbe rappresentare in futuro un utile strumento per ridurre la gravità degli attacchi sia dei patogeni del terreno che della parte aerea.

In questo lavoro vengono presentati i primi tre anni di esperienze pratiche di campo con *Pseudomonas fluorescens proradix*, batterio appartenente alla classe PGPR (plant growth promoting rizobacteria). Queste esperienze sono state effettuate in collaborazione con aziende agricole leader del proprio settore e con enti ufficiali interessati a verificare l'applicabilità pratica su colture industriali ed orticole di tecnologie innovative. Su tale batterio, isolato dalla naturale microflora della rizosfera di patata, sono stati pubblicati recentemente studi a livello molecolare per fare luce sui meccanismi alla base dei rapporti batterio/radice. Oltre alla produzione di sostanze ad effetto biostimolante su radici e parte aerea, il batterio è dotato di un notevole effetto di induzione di resistenza sistemica. Esso agisce principalmente sulla SAR (induzione di resistenza sistemica acquisita) mediata dall'acido salicilico. *P. fluorescens proradix* ha un discreto effetto anche sull'acido jamonico mediatore dell'altra via di induzione di resistenza sistemica: ISR (induzione di resistenza sistemica indotta) (Uta Von Rade *et al.* 2005). Una presenza di questo batterio nella rizosfera delle colture oggetto di prova ha garantito risultati incoraggianti in termini di aumenti produttivi, miglioramento delle caratteristiche qualitative e riduzione di danni derivanti da fitopatie e fisiopatie.

La molteplicità degli effetti che tale batterio ha sulla fisiologia della pianta, è evidenziata da un progetto affrontato in collaborazione con l'Istituto di Fisiologia Clinica del CNR di Pisa: l'incremento della salubrità delle produzioni agricole tramite l'inserimento di microrganismi nella rizosfera di colture agrarie. È stato indagato se l'applicazione di *P. fluorescens proradix* è in grado di aumentare il contenuto di sostanze antiossidanti.

Materiali e metodi

Per le prove effettuate è stato utilizzato un formulato stabilizzato altamente concentrato (5×10^{10} CFU g⁻¹) di *P. fluorescens proradix*.

Il dosaggio per tutte le colture è stato sempre identico: 60 g/ha.

Prima di procedere all'applicazione, il formulato contenente il batterio è stato disperso in circa 1/8 dell'acqua prevista utilizzando acqua tiepida. Seguendo la procedura standard si è atteso circa 60 min. agitando la sospensione circa ogni 10 min., tale procedura è

indispensabile per riportare i batteri in fase esponenziale di crescita prima dell'applicazione.

Per ottenere la massima significatività in termini di potenziale ricaduta pratica tutte le esperienze sono state effettuate presso aziende leader del settore, esse hanno inserito l'applicazione di *P. fluorescens proradix* all'interno delle loro normali pratiche agronomiche, avendo sempre cura di tenere il testimone non trattato in porzioni di terreno limitrofe al trattato.

Applicazione su patata

In questo caso 60 g/ha di formulato sono stati dispersi in un volume finale di 80 litri di acqua. La metodologia di applicazione è stata per bagno o atomizzazione dei tuberi in pre semina. Dopo l'applicazione del prodotto e prima della semina i tuberi sono stati tenuti in magazzino, evitando la luce diretta del sole, per circa 2 - 3 giorni.

Applicazione su pomodoro e peperone:

Sia per pomodoro che per peperone, l'applicazione è stata eseguita in pre trapianto utilizzando un volume di acqua di circa 100 cc per pianta tramite innaffiatoio.

Valutazione dei parametri produttivi e qualitativi tradizionali:

Per la valutazione dei risultati, si sono considerati i parametri che normalmente vengono considerati dal mercato.

Per la patata, a seconda dei casi, oltre alla produzione ettaro di è valutata: l'uniformità di pezzatura, l'eventuale riduzione dello scarto e la presenza di fisiopatie del tubero.

Per il pomodoro ciliegino le prove sono state eseguite presso l'azienda Piombo di Ragusa e seguite dal prof. Mario Davino che ha messo a punto il protocollo sperimentale e seguito la raccolta dei dati.

Per il peperone è stato inserito come confronto un prodotto microbiologico a base di micorrize, funghi del terreno e rizobatteri. I rilievi hanno preso in considerazione l'incremento in peso ed il numero di frutti rispetto al testimone.

Valutazione incremento sostanze antiossidanti

Le verifiche sono state compiute su campioni di pomodoro provenienti dalla prova coordinata dal Prof. Davino presso l'azienda Piombo di Ragusa. L'analisi è stata eseguita dal dott. Longo dell'Istituto di Fisiologia Clinica del CNR di Pisa. La metodologia di analisi utilizzata è stata la seguente:

La determinazione della capacità antiossidante dei pomodori è stata eseguita secondo un metodo spettrofotometrico.

Inizialmente nella cuvetta di reazione viene indotta la formazione del radicale ABTS·(2,2'-azino-

bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) aggiungendo ABTS, perossido di idrogeno e perossidasi; in seguito viene aggiunta alla cuvetta di reazione, nel tempo, una quantità crescente di estratto di pomodoro. Per determinare la capacità antiossidante di ciascun estratto viene seguita nel tempo, a 730 nm (che corrisponde al punto di massimo assorbimento del radicale ABTS \cdot), la capacità di ciascun estratto di inibire la reazione radicalica indotta inizialmente nella cuvetta di reazione.

Risultati e discussione

Patata

Nel corso dell'annata 2002-2003 nella zona di Granarolo Emilia (Bo) è stato effettuato un test su varietà Primura per valutare le potenzialità di *P. fluorescens proradix* per il mercato italiano (Tab. 1). I risultati ottenuti da questa prima esperienza sono stati molto incoraggianti con un incremento produttivo, rispetto al testimone non conciato, del 44,1%. Come parametro qualitativo è stato valutato il contenuto di sostanza secca, anche in questo caso *P. fluorescens proradix* ha fornito un risultato positivo con un aumento del 5,3%.

Viste le premesse, per l'annata successiva (2003-2004) è stato deciso di ripetere l'esperienza anche su patata da seme nella zona di Brunico (Bz). In questa prova, oltre all'effetto sull'incremento produttivo totale (Fig. 1), è stato misurato l'incremento produttivo per classe di calibro. Anche in questo caso si sono avuti incrementi produttivi totali medi di circa il 25% e, per la pezzatura a più alto valore commerciale (30-45 mm), del 40% (Fig. 2).

Nell'annata 2004-2005 si è deciso di estendere la sperimentazione, 8 aziende della zona di Colonia Veneta (Vr) (Fig. 3) ed 8 aziende della zona di Budrio (Bo) (Fig. 4) sono state coinvolte nell'esperienza. I risultati hanno confermato, in termini di incrementi produttivi totali, quanto ottenuto negli anni precedenti.

Per valutare l'effetto di *P. fluorescens proradix* negli areali del sud, nell'annata 2005-2006 sono state impostate due verifiche su patata primaticcia in Sicilia (Tab. 2, Tab. 3) su varietà Mondial ed Arinda. Oltre agli incrementi produttivi rispettivamente del 12,1% e del 15%, i tecnici delle aziende hanno osservato un generale aumento dell'uniformità di pezzatura dei tuberi ed una minore incidenza di Rizoctonia.

In base ad un'esperienza di 3 anni maturata negli areali più importati d'Italia si è notato un miglioramento costante dei parametri qualitativi e quantitativi con: incremento della produzione totale, maggiore uniformità di pezzatura, riduzione dei tuberi di scarto, riduzione dei danni derivanti da fitopatie e patologie dei tuberi ed un non trascurabile miglioramento generale dell'aspetto con buccia più chiara e più liscia (Fig. 5).

Tabella 1.

PROVA ESEGUITA PRESSO: Az. Agr. F.lli Moscato Granarolo (Bologna)
VARIETÀ: Primura
RACCOLTA: 23-07-03;
Dimensione parcella: 7,5 m²

Table 1.

FARMER: Moscato (Granarolo - Bologna - Italy)
CV: Primura
HARVEST: 23-07-03
Parcel : 7,5 m²

Tesi	Peso totale (Kg)	Sostanza secca
PRORADIX	49	20
TESTIMONE	34	19
INCREMENTO (%)	44.1	5.3

Tabella 2.

ANNO 2006 - Patata primaticcia Sicilia;
PROVA ESEGUITA PRESSO: Az. Agr. Colle D'Oro (Ispica)
VARIETÀ: Arinda
DATA RILIEVO: 12-04-06
Dimensione parcella: 1500 m²

Table 2.

2006 - Early Potato "primaticcia" Sicily (Italy)
FARMER: Colle D'Oro (Ispica - Ragusa)
CV: Arinda
HARVEST: 12-04-06
PARCEL: 1500 m²

Tesi	Produzione totale (Kg)	Valutazioni Qualitative
PRORADIX	3326	No rizoctonia
		Maggiore uniformità calibri
TESTIMONE	2964	presenza Rizoctonia
		Calibri meno uniformi
INCREMENTO (%)	12.1	

Tabella 3.

ANNO 2006 - Patata primaticcia Sicilia
PROVA ESEGUITA PRESSO: Az. Agr. Colle D'Oro (Ispica)
VARIETÀ: Arinda
DATA RILIEVO: 12-04-06
Dimensione parcella: 1500 m²

Table 3.

2006 - Early Potato "primaticcia" Sicily (Italy)
FARMER: Colle D'Oro (Ispica - Ragusa)
CV: Arinda
HARVEST: 12-04-06;
PARCEL: 1500 m²

Tesi	Produzione totale (Kg)	Valutazioni Qualitative
PRORADIX	3000	No rizoctonia
		Maggiore uniformità calibri
TESTIMONE	2600	Rizoctonia
		Calibri meno uniformi
INCREMENTO (%)	15	

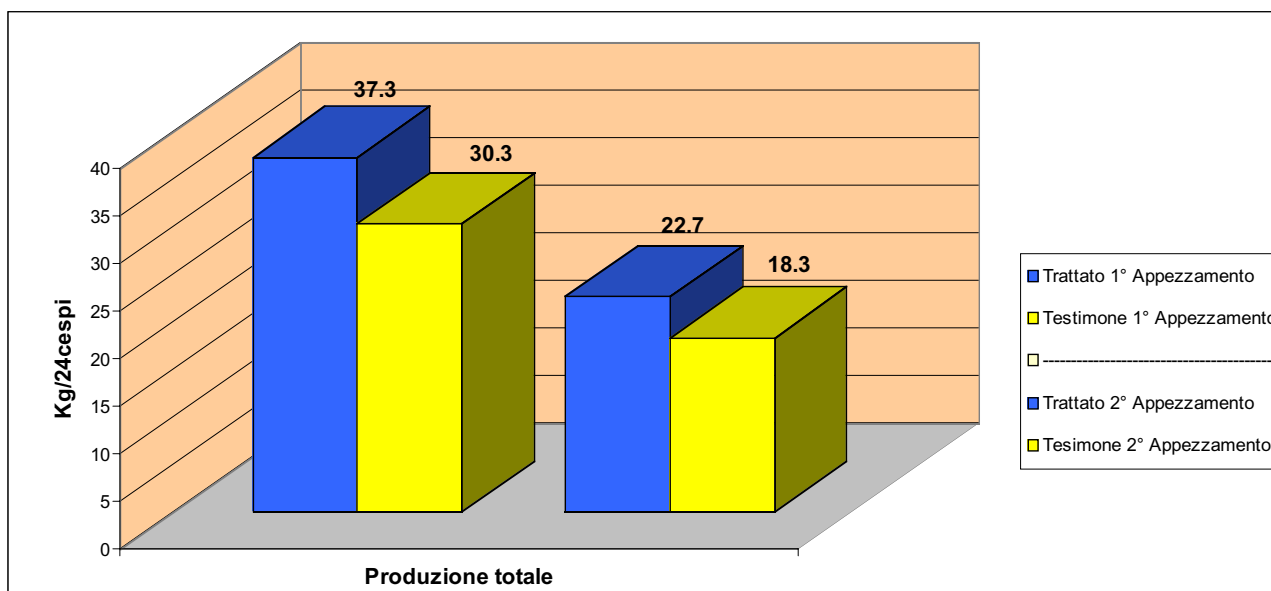


Figura 1.
PATATA DA SEME (Brunico) 2004
Produzione totale
campione di 24 piante prese random sul campo

Figure 1.
seed potatoes (Brunico - Italy) 2004
Total harvest
24 sample plants random in the field

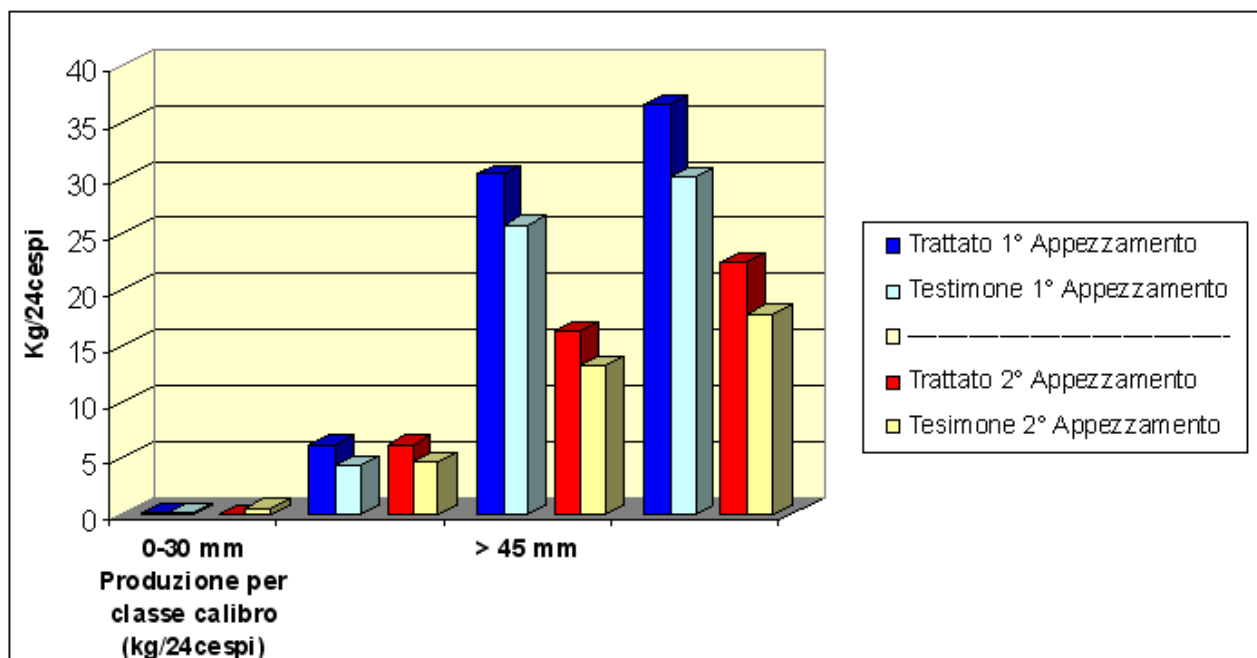


Figura 2.
PATATA DA SEME (Brunico) 2004
Risultati produttivi per classe di calibro
campione di 24 piante prese random sul campo

Figure 2.
seed potatoes (Brunico - Italy) 2004
Harvest different size
24 sample plants random in the field

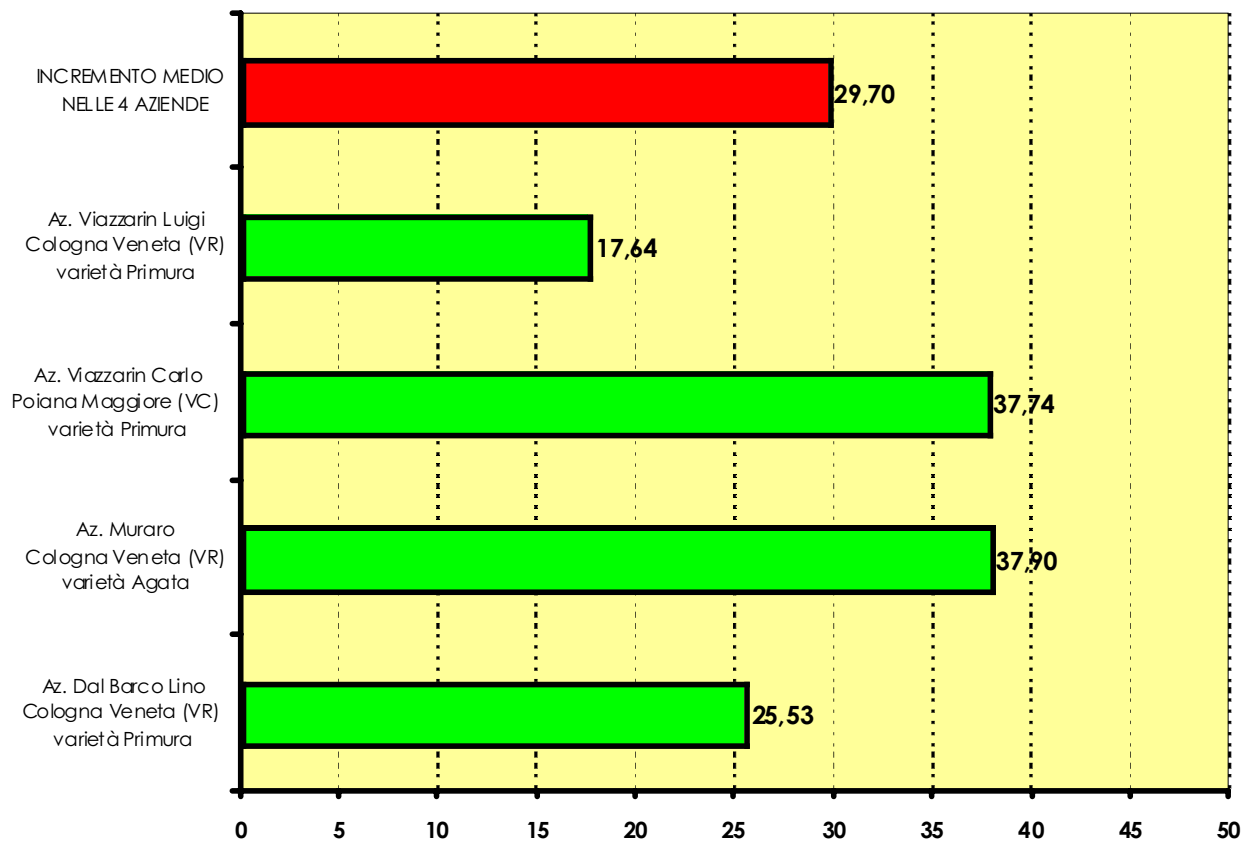
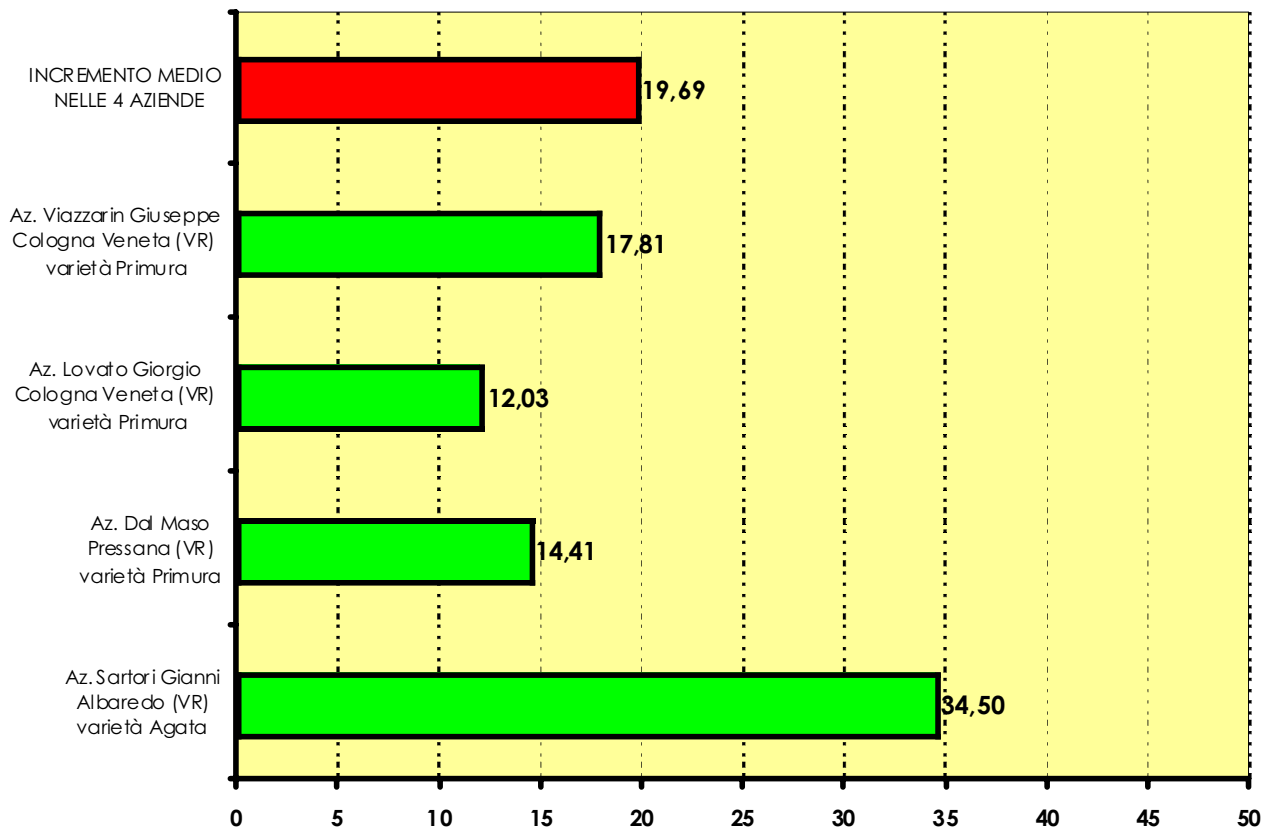


Figura 3.
 Veneto 2005: Campionamenti effettuati in 8 aziende; 24 piante prese random sul campo
 Incrementi produttivi percentuali (rispetto al test non trattato)

Figure 3.
 Veneto (Italy) 2005: Samples in 8 farms; 24 sample plants random in the field
 Harvest increase percentage

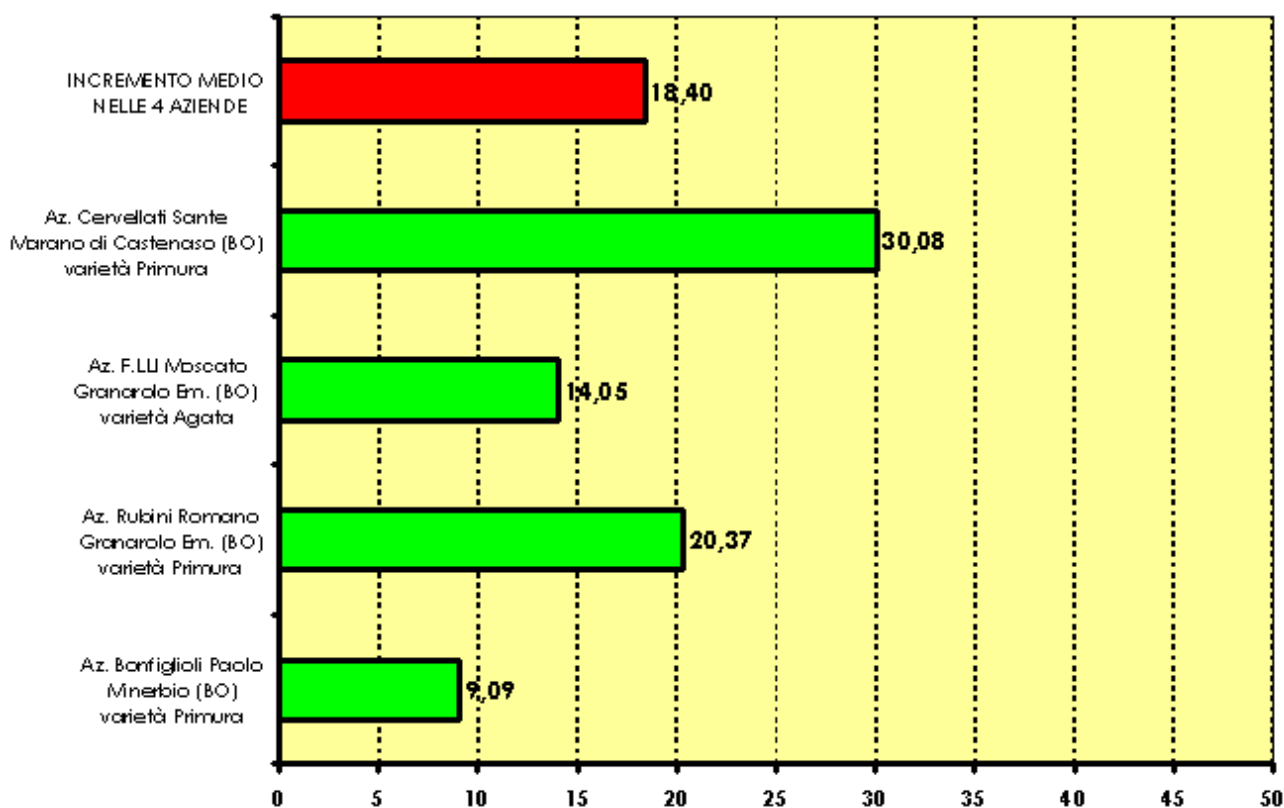
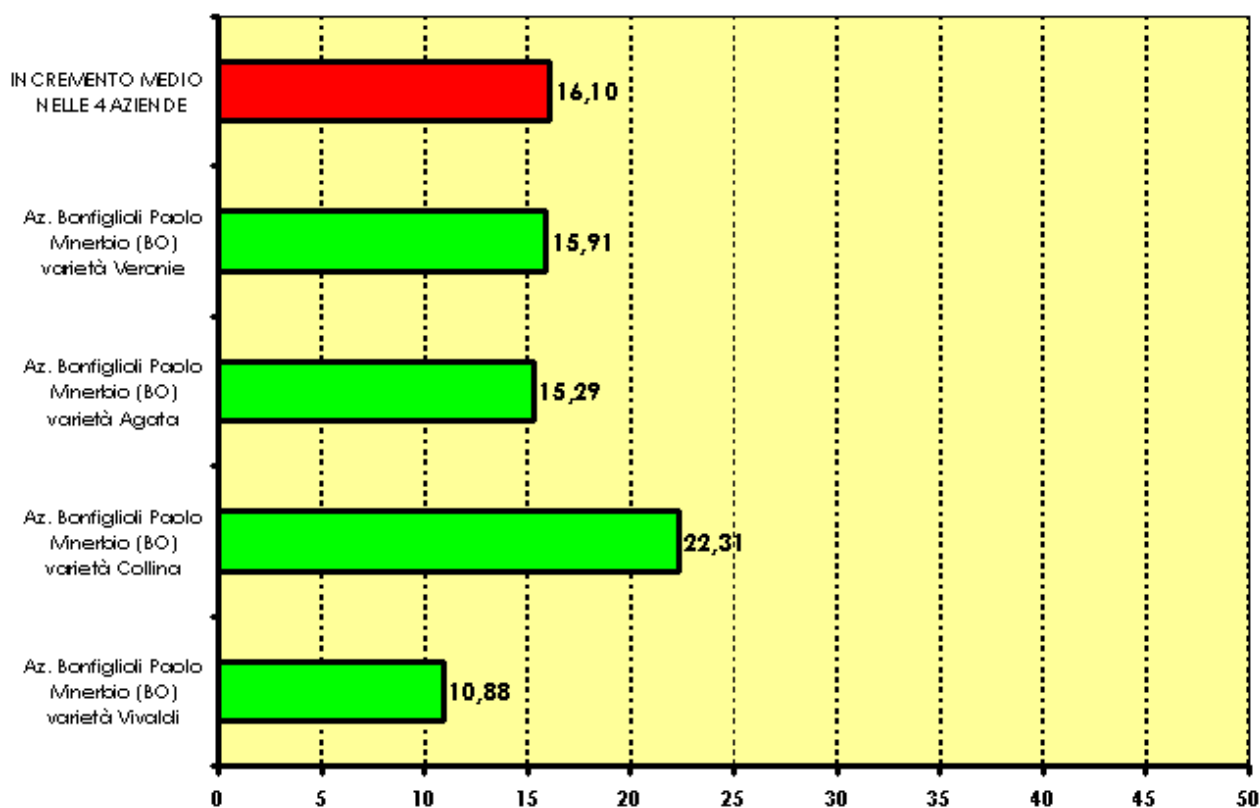


Figura 4.
Emilia 2005: Campionamenti effettuati in 8 aziende; 24 piante prese random sul campo
Incrementi produttivi percentuali (rispetto al test non trattato)

Figure 4.
Emilia Romagna (Italy) 2005: Samples in 8 farms; 24 sample plants random in the field
Harvest increase percentage



Figura 5. Varietà Altess - Zona Polignano a Mare - A sinistra il trattato Proradix a destra il non trattato

Figure 5. CV Altess - Polignano a Mare (Bari Italy) - On the left treated Proradix on the right untreated

Pomodoro ciliegino

Nell’anno 2006 presso l’azienda Piombo nella zona di Ragusa di Catania è stata impostata una prova per valutare gli effetti dell’applicazione di *P. fluorescens proradix* su due varietà di pomodoro ciliegino . Le piantine di pomodoro di ambedue i genotipi trattate con Proradix sin dai primi giorni dal trapianto hanno mostrato una maggiore crescita. Infatti, prima della cimatura, le piantine trattate risultavano in media circa 20-25 cm più alte rispetto a quelle non trattate. Anche la produzione dei genotipi trattati è risultata più elevata. La produzione totale e gli incrementi di produzione in percentuale sono stati, a seconda del genotipo, del 20 e del 29,5% (Tab.4)

Su campioni di pomodoro provenienti dalla prova in Sicilia, in collaborazione con il dott. Longo del CNR di Pisa, è stata valutata la capacità antiossidante totale. Come si può notare dai grafici (Fig. 6) i pomodori provenienti da piante coltivate con Proradix presentano un potere antiossidante quasi doppio rispetto a quelli provenienti da piante non trattate.

Su pomodoro il batterio mostra di avere effetto su parametri quali/quantitativi tradizionali come: incremento di produzione, maggiore crescita vegetativa con anticipo di fioritura, impianti più sani ed equilibrati (Fig. 7). Un effetto notevole si ottiene anche su parametri qualitativi non tradizionali come

il contenuto di sostanze antiossidanti che, attraverso la diminuzione dello stress ossidativo, hanno effetti benefici sulla salute dell’uomo.

Tabella 4.

ANNO 2006 - Pomodoro ciliegino Sicilia
 PROVA ESEGUITA PRESSO: Az. Agr. Piombo (Ragusa)
 IN COLLABORAZIONE CON: Università di Catania (Prof. Mario Davino)
 VARIETA': TYTY, Ashur 2031678
 DATA RILIEVO: 15-05-06
 Dimensione parcella: 24 piante per tesi

Table 4.

2006 - Tomato "ciliegino" Sicily (Italy)
 FARMER: Piombo (Ragusa)
 TECHNICAL SUPPORT: prof. Mario Davino (University of Catania)
 CV: TYTY; Ashur 2031678
 HARVEST: 15-05-06
 PARCEL: 24 plants

Genotipo	Tipo di trattamento	Produzione totale Kg	Incremento %
TYTY	<i>P. proradix</i>	23.1	20
TYTY	non trattato	19.3	-
ASHUR	<i>P. proradix</i>	17.1	29.5
ASHUR	non trattato	13.2	-

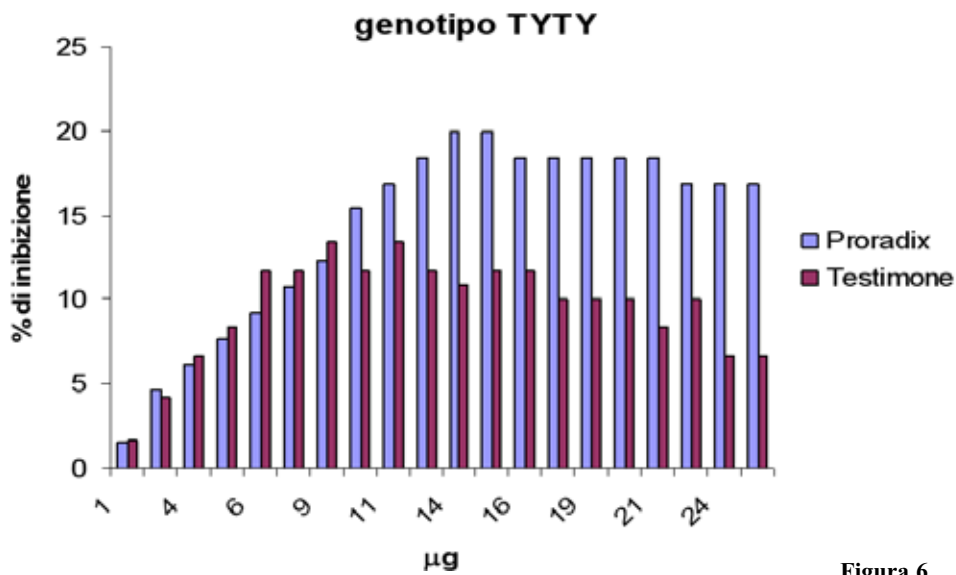


Figura 6.
ANNO 2006 - Pomodoro ciliegino Sicilia
Valutazione capacità antiossidante totale

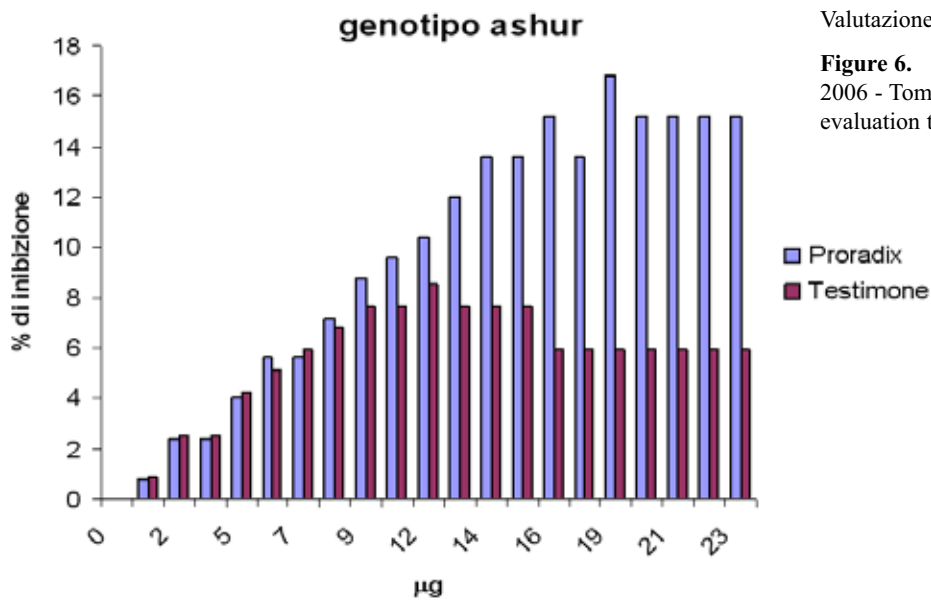


Figure 6.
2006 - Tomato "ciliegino" Sicily (Italy)
evaluation total antioxidant ability



Figura 7. ANNO 2006 - Pomodoro ciliegino Sicilia. Confronto trattato / non trattato genotipo ASHUR

Figure 7. 2006 - Tomato "ciliegino" Sicily (Italy). Comparison treated / untreated CV ASHUR

Peperone

Nel corso dell'anno 2005 è stata impostata una prova presso l'Azienda Callegari di Budrio (Bo), in questo caso come confronto è stato utilizzato un altro prodotto microbiologico nominato EKOpnop 4G (Tab. 5), entrambi i formulati a confronto hanno fornito incrementi sia in termini di numero di frutti che di peso totale. I risultati migliori sono stati ottenuti dalla tesi trattata Proradix con incremento in peso totale del 33,7%, del 26,6% come incremento del numero di frutti.

Buono è risultato l'effetto sulla qualità con un aumento dello spessore della bacca, un riduzione della partenocarpia ed un aspetto più "scatolato" particolarmente apprezzato dal mercato (Fig 8). L'effetto sulla crescita vegetativa si è mostrato soprattutto con un aumento della fogliosità delle piante, questo ha portato ad una riduzione delle bacche scottate in quanto più protette dai raggi diretti del sole; è stato segnalato, come su pomodoro ciliegino, un anticipo di fioritura di circa una settimana.

Tabella 5.

ANNO 2005 - Peperone (Bologna)
PROVA ESEGUITA PRESSO: Az. Callegari (Budrio)
METODO APPLICATIVO: innaffio pre-trapianto (60g/ha)

Table 5.

2005 - Pepper (Bologna - Italy)
FARMER: Callegari (Budrio)
APPLICATION METHOD: irrigation before transplanting (60g/ha)

Tesi	Risultati	Numero frutti	Produzione totale Kg	Peso medio frutti g
EKOpnop 4G	Totale	77	16.8	218.8
Proradix	Totale	81	17.5	215.8
Test	Totale	64	13.1	204.3
Incremento produttivo	EKOpnop 4G	20.3	28.9	7.1
Incremento produttivo	PRORADIX	26.6	33.7	5.6



Figura 8.

ANNO 2005 - Peperone (Bologna)
Azienda agricola Callegari (Budrio)
METODO APPLICATIVO: innaffio pre trapianto (60g/ha)

Figure 8.

2005 - Pepper (Bologna, Italy)
Farmer: Callegari (Budrio)
APPLICATION METHOD: irrigation before transplanting (60g/ha)

Conclusioni

L'introduzione di microrganismi utili selezionati e moltiplicati artificialmente nella rizosfera di colture agrarie, è una possibilità che da molto tempo viene indicata da ricercatori di tutto il mondo quale strumento per migliorare la fertilità microbiologica del suolo. Fino ad oggi le ricadute pratiche di queste ricerche sono state fortemente limitate, ciò soprattutto per la mancanza di conoscenza delle potenzialità di tali applicazioni e per la complessità dei rapporti fra microrganismi e piante. Attualmente l'applicazione delle più moderne tecniche di biologia molecolare hanno permesso di fare luce, almeno parzialmente, sui principali meccanismi di azione e di selezionare i microrganismi più attivi. L'esperienza di campo di Kwizda Italia sull'impiego di *Pseudomonas fluorescens proradix* quale promotore di crescita delle piante, dimostra come il passaggio dalla ricerca all'applicazione pratica sia una via già oggi percorribile. Come dimostrato, le potenzialità dell'applicazioni di microrganismi quali rizobatteri, funghi micorrizici e funghi saprofiti al terreno non riguardano solo l'incremento delle produzioni, l'aumento delle resistenza alle patologie e il miglioramento delle caratteristiche qualitative tradizionali. Tramite la collaborazione con il CNR di PISA è stato dimostrato che l'applicazione di *P. fluorescens proradix* è in grado migliorare anche la salubrità delle produzioni, rispondendo positivamente alle sempre maggiori richieste di "sicurezza alimentare" che provengono dal consumatore finale.

Ringraziamenti

Kwizda Italia desidera ringraziare tutte le aziende che hanno ospitato le prove ed in particolare:

- il prof Mario Davino ed il suo staff della facoltà di Agraria di Catania per la grande disponibilità, l'ottimo supporto tecnico scientifico e l'interesse mostrato su di un progetto così innovativo.
- il dott. Longo del CNR di Pisa per le analisi di laboratorio delle sostanze antiossidanti.
- il dott. Santo Marchese responsabile tecnico della società SIRIAC per il supporto nella raccolta dei dati e l'ottima organizzazione delle prove in Sicilia.

Bibliografia

- Bakker P.A.H.M., Lamers J.G., Bakker A.W., Marugg J.D., Weisbeek P.J., Schippers B. 1986. The role of siderophores in potato yield increase by *Pseudomonas putida* in a short rotation of potato. *Plant Path.* 92, 249-256.
- Brazanti M.P., Gianninazzi-Pearson V., Gianninazzi S. 1992. Influence of phosphate fertilization on the growth and nutrients status of micropropagated apple infected with endomycorrhizal fungi during the weaning stage. *Agronomie* 12, 841-846.

- Gaffney T., Friedrich L., Vernooch B., Negrotto D., Nye G., Uknes S., Word E., Kessmann H., Ryals J. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261, 754-756.
- Harman G.E. and Bjorkman T. 1998. Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement, p. 229-265. In G.E.
- Hiltner L. 1904. Über neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundungen und Brauche. *ARL Dtsch Lasdwrt Ges Berl* 98: 59-78.
- Kloepper and Schoroth. 1978 Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *Proceeding of 4th International Conference on plant Pathogenic Bacteria Vol.2* pp. 876-882. Station de Patologie Végétale et de Phytobactériologie. Tours, France.
- Kloepper J.W., Leong J., Teinze M., Schroth M. N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria - *Nature* 286, 885-886.
- Linsler A., Cazzara L., Barbieri G. 2006. Cedomon (*P. chlororaphis* MA 342) il primo conciante naturale per frumento duro, tenero ed orzo. *Atti Giornate Fitopatologiche* 2006. II, 27-34
- Loper J.E. Schroth M.N. 1986. Influence of bacteria sources of indol-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology* 76, 386-389.
- Raskin I. Role of salicylic acid in plants. 1992. *Ann. Rev. Pl. Mol. Biol.* 43, 439-455.
- Schipper B., Bakker A.W., and Bakker P.A.H.M. 1987. Interaction of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Rev. Phytopathol.* 25: 339-358.
- Uta von Rad, Muller M.J., Durner J. 2005. Evaluation of natural and synthetic stimulants of plants immunity by microarray technology. *New Phytologist.* 165: 191-202.
- Weller D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26, 379-407.



SICIT 2000



VIA ARZIGNANO, 80 – 36072 CHIAMPO (VI) ITALY
TEL. +39 0444 450946 – FAX +39 0444 677180
www.sicit2000.it - sicit2000@sicit2000.it

YOUR IDEAL PARTNER TO DEVELOP A COMPLETE RANGE OF AMINOACID & PEPTIDE BASED PRODUCTS

CONSOLIDATED EXPERIENCE SINCE 1960
INNOVATIVE MANUFACTURING PROCESSES
EXCLUSIVE SALE TO AGRO-CHEMICAL INDUSTRIES
HIGH AND FLEXIBLE PRODUCTION CAPACITY
CUSTOMIZED PRODUCTS

SICIT 2000

the manufacturing and marketing
Company. Two production plants
for a global capacity of 70
tons/day of liquid products and
40 tons/day of powders



SICIT S.p.A.

the financial & holding
Company, founded in 1960

SICIT CHEMITECH

the R. & D. and quality control
Company for lab analyses
and the development of new
products and technologies



Valutazione dell'effetto biostimolante dalla camera di coltura al campo

Adriano Altissimo *, Lisanna Peserico, Alessandra Zuin

LANDLAB studio associato, Quinto Vicentino, Vicenza, Italy

* Corresponding author: Via Quintarello 12/A, 36050 Quinto Vicentino (VI), Italy;

Tel.: +39 0444 357929; fax: +39 0444 357937; e-mail: a.altissimo@landlab.net

Riassunto

Il trasferimento al campo dell'effetto biostimolante che risulta dalle verifiche sperimentali di laboratorio è un capitolo tutto da esplorare.

Malgrado il costo di questi prodotti sia più alto di quello dei fertilizzanti convenzionali ancora non è stato definito quali siano le sostanze attive, le modalità, le epoche e i dosaggi di applicazione. Prove in corso dimostrano che al termine biostimolante corrispondono effetti visibili sulle piante, per esempio per produzione di biomassa e assorbimento di microelementi.

Tuttavia le informazioni disponibili sono frammentarie, derivano da prove gestite con criteri e finalità diverse e poco confrontabili tra loro. In questo contesto abbiamo sentito immediato il bisogno di sviluppare una serie di iter sperimentali che coprano il tratto di distanza dalle piastre petri alla campagna.

Per rispondere alle esigenze dell'agricoltore abbiamo ritenuto necessaria la "costruzione" di un itinerario sistematico di prove che progressivamente avvicina l'affidabilità dei risultati sperimentali alle aspettative in campo.

Per affiancare le aziende produttrici nello sviluppo dei prodotti, abbiamo individuato procedure condivise che aggregano il valore scientifico dei dati a costi accessibili e tempistica contenuta, connotati altrettanto importanti per il sistema industriale.

I contenuti di questo intervento prendono origine dall'attività sviluppata nel corso degli ultimi anni per conto e in collaborazione con ILSA S.p.A. proprio in risposta a questi bisogni.

Parole chiave: biostimolanti organici, metodo di valutazione, idroponica, pomice, microambiente

Assessment of the bio-stimulant effect, from the Petri dish to the field

Abstract

The bio-stimulants for plants are a new category of products, just recently described and not yet fully known. In fact, the definition of standard procedures to evaluate bio-stimulant properties in organic matters is a recent issue in research, while the manufacture sector is still working to adjust extraction and production processes. Laboratory tests are available to verify the bio-stimulant effects of products, measuring the early stages of plant growth (roots and leaves), but for a practical application of the bio-stimulants in the field or greenhouse, many questions are pending. Is the bio-stimulant meaningful for any crop? Which is the effective dose and time of application? How many applications?

This paper describes an evaluation procedure for bio-stimulant products, which, moving step by step from the fully controlled lab environment to the field, adjusts the knowledge to the real growing conditions. The theoretical approach is described at the table 1.

A product, which tested positive in the lab tests, is further tested on gradually more complex media (hydroponics, pumice sand, soil mix, soil). In the meanwhile the same crop, treated with that same bio-stimulant at different doses, grows in different environments (climatic chamber, greenhouse, field). Two model species, the same used during laboratory tests, and one target specie (representative of the potential market for the product) are used.

The results here show that the application dose is a key factor, in fact its slight variation can induce significantly different effects on plant growth. It is important to choose carefully the parameters to measure and, during the trial, always combine measures of different nature, otherwise some bio-stimulant effects could be undetected.

The trials, as set, allow us to verify the results obtained at different stages of the process and detect anomalies. This methodological approach fits the need of gaining reliable applicative results, from scientific theoretical knowledge to the field, in a reasonable span of time.

Key words: organic bio-stimulants, evaluation method, hydroponics, pumice, plot trials, field trials

Introduzione

I biostimolanti per le piante sono una categoria di prodotti solo da poco descritta (Ciavatta, 2005) per la quale le basi di conoscenza sono ancora frammentarie e parziali. Recenti sono le metodiche scientifiche per l'individuazione e lo studio sulle piante in laboratorio delle proprietà biostimolanti nelle matrici organiche (Nardi et al. 2005), mentre le aziende stanno attivamente lavorando alla messa a punto dei processi di estrazione e produzione industriale.

Diversi tests sono disponibili per verificare con attendibilità l'effetto biostimolante in laboratorio, ossia in ambiente altamente controllato, con misurazioni che si riferiscono soprattutto alla biomassa epigea ed ipogea delle piante nella fase precoce del ciclo vegetativo. Ma per proporre l'impiego del biostimolante all'agricoltore, su una coltura in serra o in campo, molte sono le domande cui è necessario dare risposta. Per esempio, su quali colture il prodotto è efficace? Quali sono i dosaggi ed in quale fase fenologica conviene applicare il biostimolante? Quante applicazioni durante il ciclo? Con che tipo di applicazione?

Questo articolo si propone un iter di valutazione dei prodotti biostimolanti suddiviso per stadi, dall'ambiente controllato del laboratorio a quello "libero" del campo. Combinando in passaggi progressivi i tre attori principali del sistema, il substrato, l'ambiente climatico e la pianta, è possibile monitorare, per poi prevedere, gli effetti di biostimolazione nelle condizioni di coltivazione reale. Tali procedure sono pensate per essere applicate dall'industria di settore, ossia tengono conto della necessità di conseguire risultati attendibili a costi accessibili e tempistica contenuta.

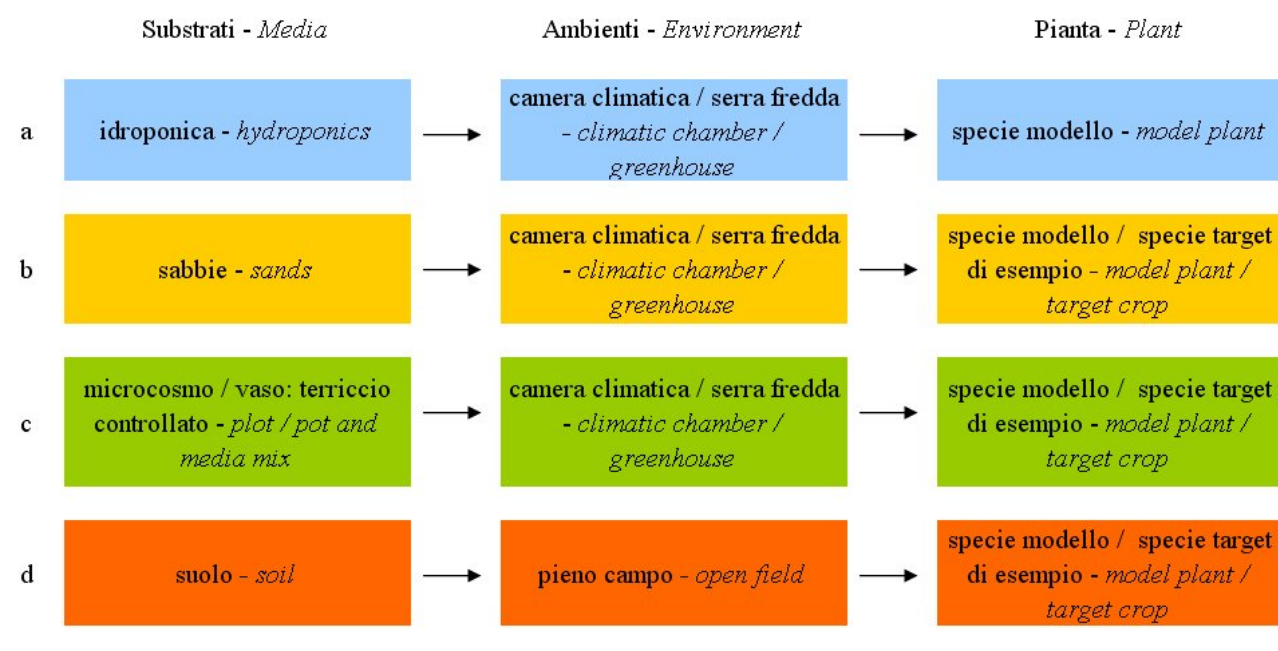
Materiali e metodi

Lo studio delle proprietà biostimolanti di prodotti derivati da matrici organiche prende avvio con tests di laboratorio (test Audus e test in idroponica con soluzione Hoagland). Il prodotto, in varie diluizioni, viene somministrato a piante modello coltivate in idroponica, in cella climatica, per alcune settimane, e messo a confronto con ormoni vegetali (auxine, giberelline). Se un prodotto risulta positivo ai tests preliminari viene inserito nell'iter di validazione di seguito descritto. L'impianto teorico del procedimento è illustrato alla tabella 1. Il medesimo prodotto biostimolante viene testato su substrati via via più complessi, sabbie inerti (pomice), terricci di composizione nota (affini a quelli impiegati nel vivaismo), fino ad arrivare al suolo in campo. Nel contempo la stessa specie, trattata con biostimolanti, viene allevata in condizioni ambientali diverse: camera climatica, serra e/o tunnel freddo, pieno campo.

Il medesimo biostimolante viene testato, a diverse diluizioni, in genere su due specie modello, le medesime impiegate nei test di laboratorio, così da ottenere la successione completa di risultati. Ciò consente interessanti possibilità di confronto e riflessione rispetto a potenzialità e limiti di impiego del prodotto. Le prove si effettuano inoltre su almeno una specie (target di esempio) rappresentativa dell'ambito di potenziale mercato del prodotto in sperimentazione. In questo contesto viene portata ad esempio un'orticola, la melanzana, coltivata contemporaneamente in vaso ed in terra sotto tunnel.

Tabella 1. Schema sperimentale per la valutazione dell'efficacia del biostimolante in condizioni ambientali rappresentative delle tipologie culturali e stagionali.

Table 1. Experimental plan to evaluate the bio-stimulant performances in a significant range of cultural and environmental conditions.



Risultati

I prodotti sottoposti ai tests preliminari di laboratorio (sono in corso di osservazione numerosi estratti da residui animali e vegetali e di seguito si riportano solamente i risultati relativi a due di essi) possono generare nelle piante risposte di tipo biostimolante positivo (incrementi di crescita), negativo (inibente o addirittura *killer*) o nullo con evidenti differenze di reazione sulla parte aerea o su quella radicale. Le risposte sono inoltre dipendenti dalla concentrazione di impiego del prodotto (foto 1).

Rappresentativo è il caso presentato con i grafici 1 e 2. Il primo mostra che il prodotto A impiegato su mais ha effetto biostimolante sull'apparato radicale, dove entrambe le diluizioni $-3 = 1/1000$ e $-4 = 1/10.000$ determinano un incremento significativo del peso secco delle radici rispetto al controllo (sn).

Nel secondo si vede invece che le medesime due diluizioni applicate su frumento, producono effetto antitetico sulla crescita dell'apparato fogliare della pianta.

Su prove con melanzana coltivata in vaso in tunnel il prodotto A non ha effetto significativo sui para-

metri di crescita vegetativa delle piante (altezza, dimensione-area-fogliare, misurazione indiretta di clorofilla con SPAD meter), ma si rivela efficace rispetto al parametro numero di frutti alla prima conta (grafico 3) quando impiegato alla concentrazione più alta. Malgrado l'effetto del biostimolante non si manifesti sul peso medio dei frutti, esso incide positivamente sulla produttività del primo raccolto (grafico 4).

I primi risultati ottenuti da prove su frumento in microplots coltivati in campo e trattati con il prodotto B, biostimolante sperimentale, a varie diluizioni, in aggiunta al solo standard di concimazione per la coltura (FP *farmer's practice*) hanno dato esiti interessanti (grafico 5). Appare infatti che l'impiego del prodotto B, alla diluizione più elevata, aumenta l'indice SPAD (chlorophyll-meter) in modo significativo rispetto alla sola pratica ordinaria di concimazione della coltura e, malgrado il dato non sia significativo, sembra che il medesimo dosaggio di B induca una riduzione della crescita in altezza delle piante. I dati qualitativi e quantitativi della produzione al raccolto non sono ancora disponibili.



Foto 1. L'effetto del medesimo prodotto applicato a diluizioni diverse (-2; -3; -4) può risultare significativamente diverso. Gli ormoni GA-giberelline e AIA-auxine, con il controllo SN- soluzione Hoagland, sono i riferimenti di comparazione per quantificare l'azione biostimolante.

Photo 1. The same product applied at different concentrations can produce significantly different results. The plant hormones GA-gibberellins and AIA-auxins, the control SN- Hoagland solution, are the references to quantify the bio-stimulant effects of the product.

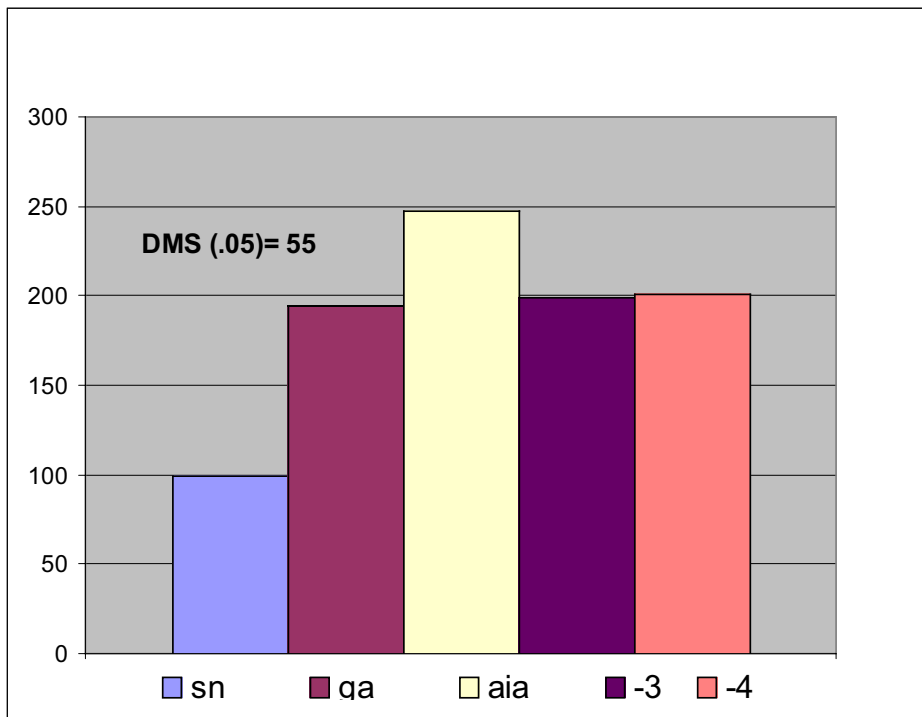


Grafico 1. Effetti del prodotto A sulla crescita radicale di mais (peso secco) coltivato in idroponica. Sn=soluzione Hoagland; ga=giberelline; aia=auxine; -3=1/1000 A;-4=1/10000A. Il prodotto A induce effetti positivi ad entrambe le diluizioni.

Graphic 1. Effects of the product A on root growth of corn (dry weight), cultivated in hydroponics. Sn=Hoagland solution; ga=gibberellins; aia=auxins;-3=1/1000 A; -4=1/10000 A .The product A is positively effective at both dilutions.

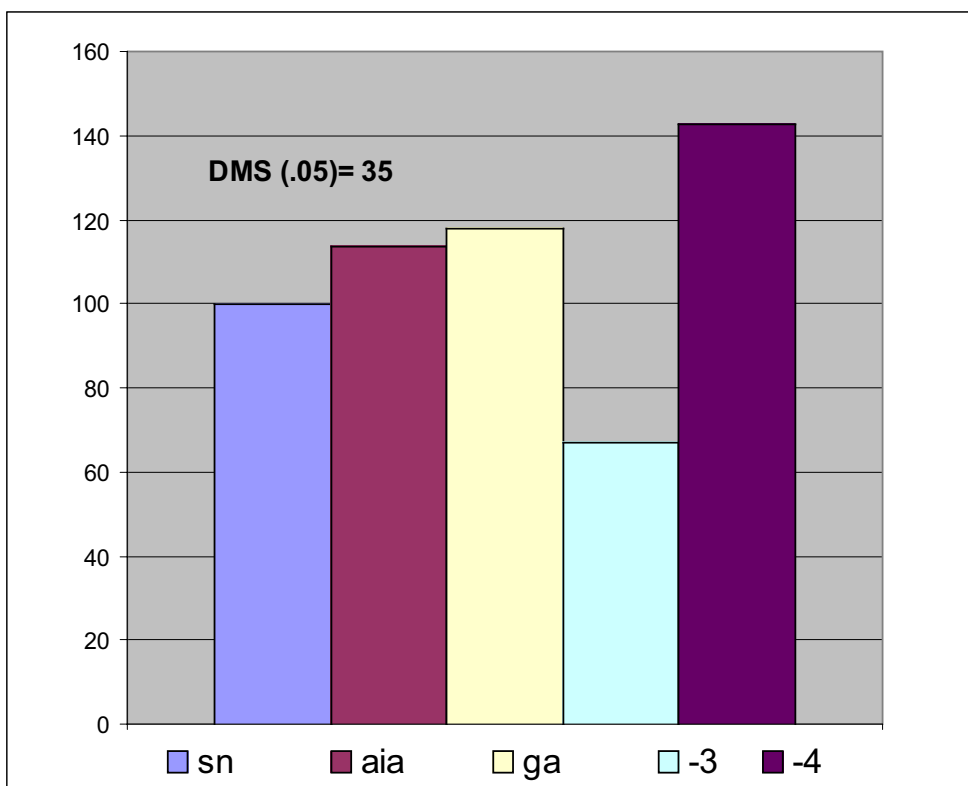


Grafico 2. Effetti del prodotto A sulla crescita fogliare di frumento (peso secco) coltivato in idroponica. Sn=soluzione Hoagland; ga=giberelline; aia=auxine; -3=1/1000 A;-4=1/10000A. Le due diluizioni del prodotto A manifestano effetti opposti sul parametro.

Graphic 2. Effects fo the product A on leaf growth of wheat (dry weight) cultivated in hydroponics. Sn= Hoagland solution; ga=gibberellins; aia=auxins;-3=1/1000 A; -4=1/10000 A. The two dilutions express opposite effects on the parameter.

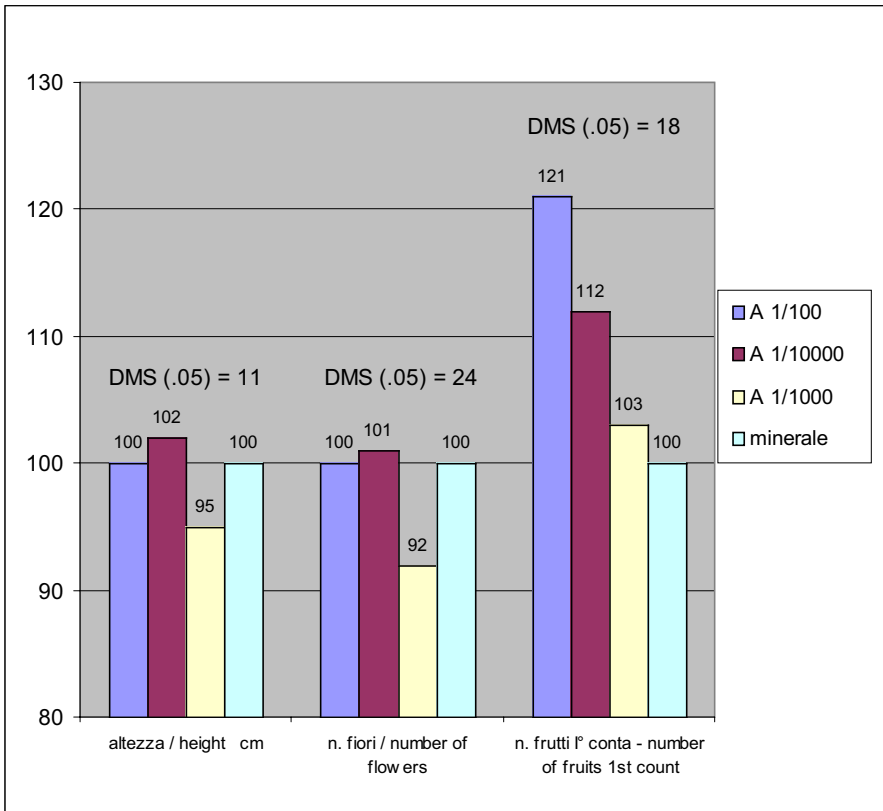
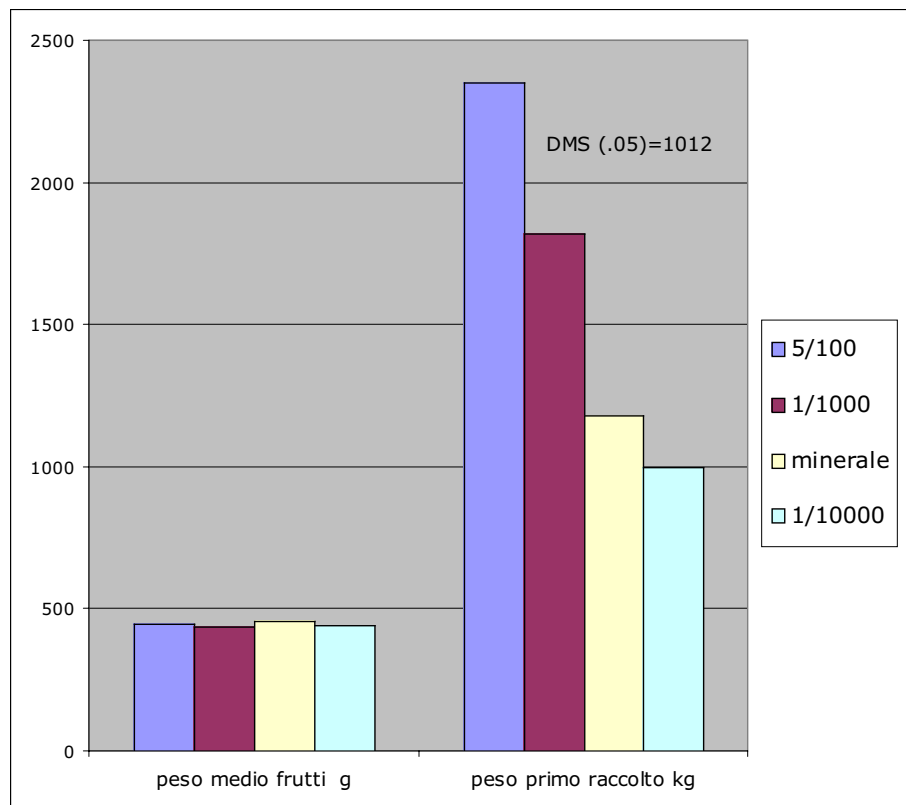


Grafico 3. Melanzana coltivata in vaso in serra. Prodotto A, applicato a 3 diluizioni, a confronto con un concime minerale. Il prodotto A non evidenzia alcun effetto significativo sulla crescita della pianta e sul numero di fiori ma, quando applicato alla diluizione più bassa, risulta positivamente significativo sul numero di frutti alla prima conta.

Graphic 3. Eggplants cultivated in pots in greenhouse. The product A applied at 3 different dilutions in comparison with a mineral fertilizer. The product A do not show any significant effect on plant growth and flowers number but expresses a significant and positive impact on the number of fruits at the first count when applied at its lowest dilution.

Grafico 4. Melanzana coltivata in vaso in serra. Prodotto A, applicato a 3 diluizioni, a confronto con un concime minerale. Il prodotto A non evidenzia alcun effetto significativo sul peso medio dei frutti ma, quando applicato alla diluizione più bassa, ha effetto significativo e positivo sul peso del primo raccolto (produzione media per pianta).

Graphic 4. Eggplants cultivated in pots in greenhouse. The product A applied at 3 different dilutions in comparison with a mineral fertilizer. The product A do not show any significant effect on the average fruit weight but is significantly effective when applied at its lowest dilution on the first yield (total fruit weight per plant).



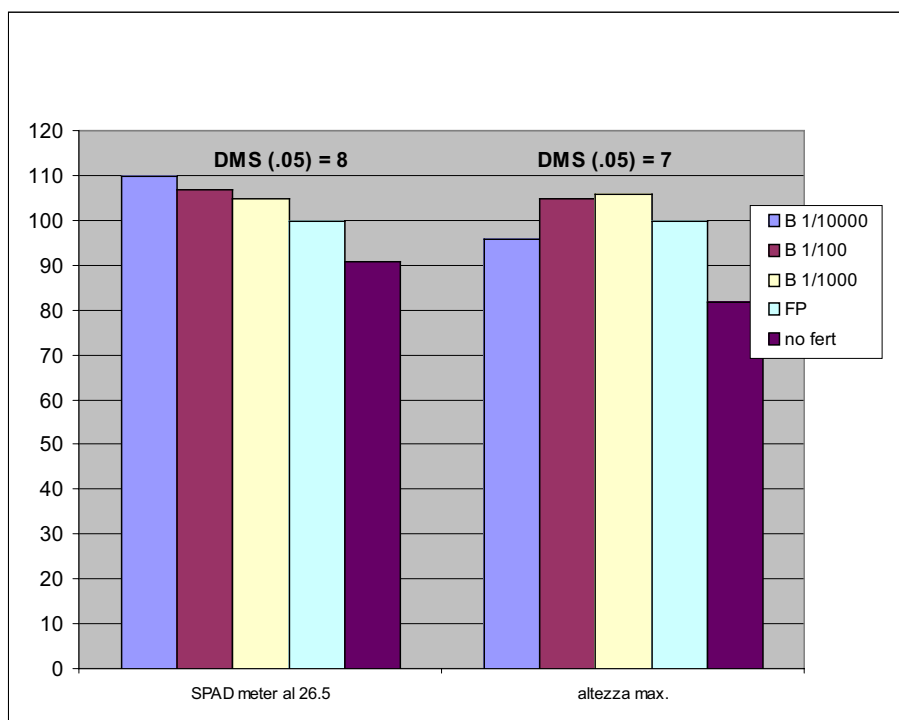


Grafico 5. Micro parcelle di frumento coltivate in campo secondo la pratica agricola ordinaria con e senza il biostimolante B applicato a diverse diluizioni. L'aggiunta di B alla diluizione più bassa aumenta significativamente l'indice SPAD (che è in relazione con lo stato nutrizionale ed il contenuto di clorofilla delle foglie) mentre diminuisce l'altezza media delle piante.

Graphic 5. Wheat micro-plots cultivated in the field following farmer's practice fertilization plan (FP) and farmer's practice plus the experimental biostimulant B applied at different dilutions. The add of B at the lowest dilution increases significantly the SPAD index, which relates to the nutritional status and leaf chlorophyll contents, while reducing the average height of the plants.

Conclusioni

Nel complesso i risultati sembrano confermare che ci sono possibilità di effettiva applicazione dei biostimolanti nell'attività di produzione primaria. Un aspetto chiave, che probabilmente dovrà essere messo a punto coltura per coltura è il dosaggio di impiego dei biostimolanti. Si è visto infatti che il medesimo prodotto applicato in quantità diverse sulla stessa specie (es. piantule di frumento allevate in idroponica) ed in ambienti e substrati differenti, può dare luogo a reazioni anche opposte in termini di accrescimento, oppure della stessa natura ma significativamente diverse (es. altezza del frumento allevato in campo). Per quanto riguarda la conduzione delle prove grande attenzione va posta nella scelta dei parametri da misurare. A tale riguardo si consiglia di procedere combinando misure ed osservazioni di natura diversa durante tutte le fasi di conduzione della prova.

L'iter di valutazione dei prodotti biostimolanti dal laboratorio al campo, così come impostato, regge alla prova dei fatti e appare consono agli obiettivi del lavoro. Consente infatti di verificare fase per fase la congruità dei dati e di evidenziare anomalie o spunti da approfondire e raffinare con ulteriori misure o prove.

L'argomento biostimolazione nell'universo vegetale è complesso e come tale ha bisogno di un approccio graduale e sistematico. I risultati qui presentati, benché parziali, cominciano a delineare alcune indicazioni di massima di valore applicativo. Il metodo adottato è un esempio di come sia possibile attingere dalle conoscenze prodotte dalla ricerca di base in laboratorio e tradurle, applicando una

sequenza strutturata di prove, in risultati prossimi all'operatività di campagna nel volgere di qualche anno.

Note

Le prove descritte fanno parte di un programma di attività di ricerca e sviluppo che riguarda i prodotti biostimolanti della ditta Ilsa SpA e coinvolgono numerosi istituti di ricerca.

La documentazione fotografica ed i risultati qui presentati sono stati ottenuti presso i laboratori ed i campi sperimentali del Dipartimento di Biotecnologie Agrarie dell'Università di Padova (Legnaro PD), dell'azienda ILSA SpA (Arzignano VI) e di Landlab studio associato (Quinto VI). I dati riportati si riferiscono solo ad una parte del complesso di prove svolte ed in atto presso queste ed altre strutture nel corso degli ultimi anni sul tema biostimolanti per l'agricoltura.

Ringraziamenti

Si ringrazia la professoressa Serenella Nardi ed il suo gruppo (dott. D. Pizzeghello, dott. A. Ertani) per il costante e fattivo supporto nell'impostazione scientifica e sperimentale, nonché la ditta ILSA SpA, la dott.ssa E. Brandellero per l'impegno, anche finanziario, e l'approccio aperto all'innovazione.

Bibliografia

- Ciavatta P. 2005. Prodotti con proprietà biostimolanti: realtà o fantasia? *Phytomagazine* n. 36: 6-9.
- Nardi S. et al. 2005. Biostimolanti: azione e proprietà agronomiche. *Phytomagazine* n. 36: 2-6.

The relationships among mineral nutrition, biostimulation and plant defense mechanisms: an example in citrus plants

JM^a. Garcia-Mina

Department of Chemistry and Soil Chemistry. University of Navarra 31008, Pamplona, Spain
R&D Department. Inabonos - Roullier Group. 31160 Orcoyen, Spain
Phone: 34948324550, Fax: 34948324032; E-mail: jgmina@inabonos.com

Abstract

The aim of this work is to present those aspects of plant physiology and plant nutrition that are related to the expression of the systemic acquired resistance of plants against pathogens. In this context, and as an example, the specific and integrated effects of a new product (Eurofit) on the development of plant defense mechanisms are also discussed. In Eurofit the action of three different functional complexes is integrated: the elicitor complex containing a singular family of oligosaccharides of vegetal origin; the signal complex containing a singular proportion of natural bio-stimulant compounds, and the mineral complex containing organic-complexed iron, zinc and manganese; and inorganic phosphorous ($\text{PO}_3^{---}/\text{PO}_4^{---}$). A number of comparative greenhouse and field studies, carried out in different countries, on the efficiency of this new strategy in the control of the infection caused by several pathogens in different crops are presented here. In general, results showed both a similar efficiency of this strategy to that of the reference pesticide and a significant improvement with respect to other products also used, such as potassium phosphite. In all studies, a clear anti-stress effect was also observed associated with this new strategy, which was not observed for the other treatments.

Finally, this strategy - which is different from the pesticide strategy due to its nutritional and bioregulatory character - could complement and optimize specific pesticide programs especially in integrated agriculture.

Key words: plant hormones, biostimulants, plant defense mechanisms, mineral nutrition, micronutrients

Interazioni tra nutrizione minerale, bio-stimolazione e meccanismi di difesa delle piante

Riassunto

Obiettivo dello studio è presentare quegli aspetti della fisiologia e nutrizione delle piante che sono relazionati alla resistenza acquisita contro i patogeni da parte delle stesse.

In tale contesto, e come esempio, saranno presentati gli effetti particolari di un nuovo prodotto (Eurofit) sulla stimolazione dei meccanismi di difesa delle piante.

In Eurofit si possono evidenziare le azioni di tre complessi funzionali:

- Il complesso elicitore che consiste in un particolare gruppo di oligosaccaridi di origine vegetale;
- Il sistema segnale composto una particolare proporzione di componenti ad azione fitoregolatrice;
- Un complesso minerale contenente ferro, zinco e manganese organocomplessati e fosforo minerale ($\text{PO}_3^{---}/\text{PO}_4^{---}$);

Sono presentate delle prove realizzate in serra e pieno campo, in alcuni paesi, che mostrano l'efficacia di questa nuova strategia nel controllo delle infezioni causate da alcuni patogeni su diverse colture.

In generale, le prove realizzate hanno mostrato che l'efficacia di questa strategia è comparabile a quella dei fungicidi di sintesi e significativamente migliore rispetto ad alcuni prodotti utilizzati nelle prove (fosfiti di potassio).

Tutte le prove hanno evidenziato un effetto anti-stress dell' Eurofit, totalmente assente con l' utilizzo dei prodotti di riferimento.

Concludendo, questa strategia - che si differenzia dall' utilizzo dei fungicidi grazie al suo carattere nutrizionale e di bio-regolazione - potrebbe complementare e ottimizzare particolari programmi di difesa con fungicidi, specie in agricoltura integrata.

Parole chiave: ormoni delle piante, fitoregolatori, meccanismi di difesa delle piante, nutrizione minerale, micronutrienti

Introduction

A number of studies have shown the capability of certain mineral nutrients to induce the activation of specific defense mechanisms - systemic acquired resistance (SAR) - developed by plants against the attack of pathogens (Reuveni and Reuveni, 1998). Thus, Manandhar *et al.* (1998) reported the ability of ferric chloride and di-potassium hydrogen phosphate to induce resistance to rice blast under greenhouse and field conditions. Reuveni *et al.* (1998 a,b) observed that the foliar application of mono-potassium phosphate (MKP) contributed to control powdery mildew on both apple trees and pepper plants either applied alone or combined with systemic fungicides. Similar results had also been previously observed in cucumbers and maize (Reuveni and Reuveni, 1998). Besides this effect of phosphate, different salts of phosphorous acid have also showed a significant capacity to control the infection caused by *Phytophthora sp* in different plant species (Guest and Grant, 1991). Similarly, this capacity to stimulate SAR in different plant species has also been reported for elements other than P such as K, B, Cu, Mn and Si (Reuveni and Reuveni, 1998)

Likewise there exist in the literature different studies reporting the regulation of the main biochemical pathways (Figure 1) involved in SAR by plant hormones and phyto-regulators (Ohashi and Ohshima, 1992; Goicoechea *et al.*, 2004). In general whereas cytokinins and auxins activated the salicylic pathway and inhibited the jasmonic one, Abscisic acid and ethylene presented the opposite effects. This capacity of certain natural organic molecules to stimulate SAR reactions was also reflected in their capacity to increase plant resistance against different pathogens under greenhouse and field conditions (García-Mina *et al.*, 1993, 1995; Jordana *et al.*, 1994; Iglesias *et al.*, 1999; Goicoechea *et al.*, 2004).

Consequently, new strategies considering the possible synergy between specific mineral nutrients and certain phyto-regulators could permit us to control plant diseases, thus reducing the quantity of pesticides that have to be applied. The Eurofit strategy is an example of this approach.

In Eurofit three different complexes are integrated. The elicitor complex, the mineral complex, and the signal complex (García-Mina *et al.*, 1999). In the elicitor complex two different molecules work together: a oligo-saccharide derived from yeast cellular walls and a nucleotide. In the signal complex three different molecules work together: a cytokinin precursor, an auxin precursor and a polyamine precursor. In the mineral complex three different elements work together: Mn, Zn, and

Fe. In this way, the three complexes of Eurofit affect SAR mechanisms in an integrated form either at the level of elicitation or at the level of protein expression and gene activation, thus stimulating the production of specific molecules with the ability to destroy the pathogen.

In this context, the aim of this work is to present some results related to the application of Eurofit strategy in the control of *Phytophthora Citrophthora* in citrus plants. To this end, we present two different studies on the effect of different formulations – including Eurofit - on the development of several varieties of citrus plants affected by *Phytophthora Citrophthora*, cultivated under either greenhouse or field conditions.

Materials and methods

Two complementary studies are presented here.

Greenhouse experiment. Tuset et al., (2003) study. Young citrus plants (*Citrus sinensis*) cv. *Pineapple* (4-5 months old) cultivated under greenhouse conditions have been used in this study. The different plants were inoculated with zoospores of *P. Citrophthora* isolated from citrus plants affected by this pathogen cultivated under field conditions.

Plants were treated with the different doses of each formulation before and after inoculation as described in Tuset *et al.*, (2003). 24 plants were used for each treatment and dose.

Four different formulations were used in the study: a metal phosphite (a liquid formulation containing an iron salt of phosphorous acid), a solid formulation of potassium phosphite, a solid formulation of Fosetyl-Al 80%, and Eurofit. Two different doses were used for the metal phosphite, the K-phosphite and Eurofit: 0.3 and 0.4 %. Fosetyl-Al was used at 0.3 %. The different products were applied in irrigation. 21 days after treatment the degree of the disease in roots and shoots was evaluated.

Field experiment. Ferrari-Sagea study (2000, 2001). The degree of infection and the evolution of the disease caused by *P. Citrophthora* in citrus trees (gummosis brown rot disease) cultivated under field conditions have been studied. The study was carried out in Basilicata (Southern Italy) in two consecutive years (2000 and 2001).

The main crop data are:

Crop:	<i>Citrus sinensis</i>
Variety:	Navel
Rootstock:	Seville orange
Planting date:	1990
Planting distance:	5 X 6 m
Irrigation:	Sprinkling

Three different formulations were used: Eurofit, Fosetyl-Al and Potassium phosphite. All products were used at 2.5 l per ha and applied as foliar spray. The experimental design was randomized complete blocks, 4 replication per treatment (control-untreated, Eurofit, Fosetyl-Al and potassium phosphite) and 5 trees per replication.

The disease was evaluated using the following parameters: the number of trees presenting cankers (%) and the vigour of the trees expressed as a 0-10 scale according to the biomass development.

Results and discussion

The Tuset study. Some of the results obtained by Tuset et al. (2003) are presented in tables 1 and 2.

As can be observed in Table 1, only the treatments with Eurofit and Fosetyl-Al were associated with the absence of infection in plants inoculated after treatments.

The metal-Phosphite and the K-Phosphite presented a high degree of disease, thus showing the relative inefficiency of phosphorous acid alone to control high intensity cases of gummosis brown rot disease.

The significant ability of Eurofit to adequately control gummosis shows the real efficiency of the associations of the three functional complexes contained in it: the mineral complex (including phosphorous acid), the elicitor complex, and the signal complex.

When plants were treated after inoculation, none of the products had the capacity of controlling the development of the disease (Table 2). This demonstrates the importance (in the case of Eurofit and Fosetyl-Al) of stimulating SAR mechanisms in plants before the pathogen is present.

Table 1. Effect of different products on the development of gummosis brown rot disease in young plants of *Citrus sinensis* cv. Pineapple inoculated with zoospores of *Phytophthora Citrophthora* after product treatment (Tuset et al. 2003).

Tabella 1. Effetto de diversi prodotti sullo sviluppo della malattia gummosis marcescenza bruna nelle piante giovane de *Citrus sinensis* cv. Pineapple inoculate con zoospore de *Phytophthora Citrophthora* dopo il trattamento (Tuset et al. 2003).

Treatment (dose)	Affected plants (%)	Death plants (%)
Control	100	
Fosetyl Al (0.3 %)	0	0
Eurofit (0.3 %)	0	0
Eurofit (0.4%)	0	0
Metal Phosphite (0.3 %)	66.67	0
Metal Phosphite (0.4 %)	57.14	0
K- Phosphite (0.3 %)	83.33	0
K-Phosphite (0.4 %)	85.71	0

Table 2. Effect of different products on the development of gummosis brown rot disease in young plants of *Citrus sinensis* cv. Pineapple inoculated with zoospores of *Phytophthora Citrophthora* before product treatment (Tuset et al. 2003).

Table 2. Effetto de diversi prodotti sullo sviluppo della malattia gummosis marcescenza bruna nelle piante giovane de *Citrus sinensis* cv. Pineapple inoculate con zoospore de *Phytophthora Citrophthora* prima di trattare le piante (Tuset et al. 2003).

Treatment (dose)	Affected plants (%)	Death plants (%)
Control	100	100
Fosetyl Al (0.3 %)	100	88.9
Eurofit (0.3 %)	100	87.5
Eurofit (0.4%)	100	100
Metal Phosphite (0.3 %)	100	100
Metal Phosphite (0.4 %)	100	77.8
K- Phosphite (0.3 %)	100	100
K-Phosphite (0.4 %)	100	100

The Ferrari-Sagea study. Some of the results obtained by Ferrari (2001) are presented in Figures 2-4. As can be observed in Figures 2 and 3, the different treatments were efficient in controlling the development of cankers under field conditions in the two years of experiments. In fact there were not significant differences among treatments, although Eurofit presented slightly better results. The significant efficiency of potassium phosphite under field conditions, much better than in the Tuset study, can be explained as a consequence of the lower intensity of the disease in this condition. In fact, the degree of infection in untreated plants was between 50 and 55 %.

As for crop vigor (Figure 4), Eurofit showed the best evolution of this parameter probably due to the presence of natural molecules with bio-stimulant activity.

In conclusion, the results obtained by Tuset et al. (2003) and Ferrari (2001) demonstrate the efficiency of the integrated work of Eurofit on the different levels of SAR mechanisms. This assures an adequate control of gummosis brown rot disease in citrus plants of different ages, cultivated under either greenhouse-artificial inoculation or field-natural inoculation conditions. Taking into account that the principal difference between the salts of phosphorous acid and Eurofit is the presence in the latter of the signal and elicitor complexes, these results underlay the real efficiency of the synergy of the different components of Eurofit in the activation of SAR mechanisms. This effect, significantly higher than that of phosphites, was similar to that of Fosetyl-Al.

Furthermore, the significant differences in the efficiency of the products with respect to the moment of application, before or after inoculation, in the Tuset study, also indicate that the mode of action of

these products is more related to SAR inducers than direct fungicides. Likewise these results indicate that these products are more efficient when they are used preventively.

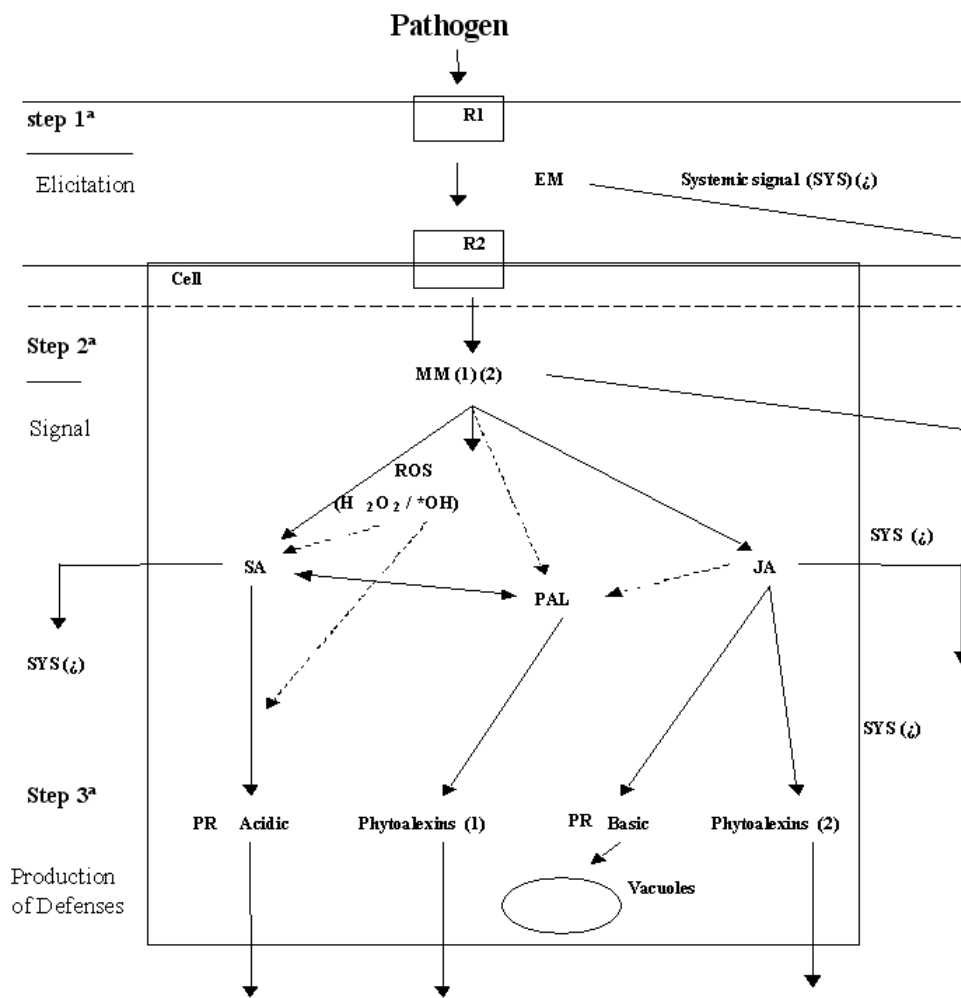


Figure 1. Simplified presentation of SAR mechanisms. (SA: Salicylic acid; JA: Jasmonic acid; MM: messenger molecules; PR: proteins related to pathogenesis; EM: elicitor molecule).

Figure 1. Presentazione semplificata dei meccanismi de SAR. (SA: acido salicilico; JA: acido jasmonico; MM: molecole messaggere; PR: proteine relative alla patogenesi; EM: molecola elicitora).

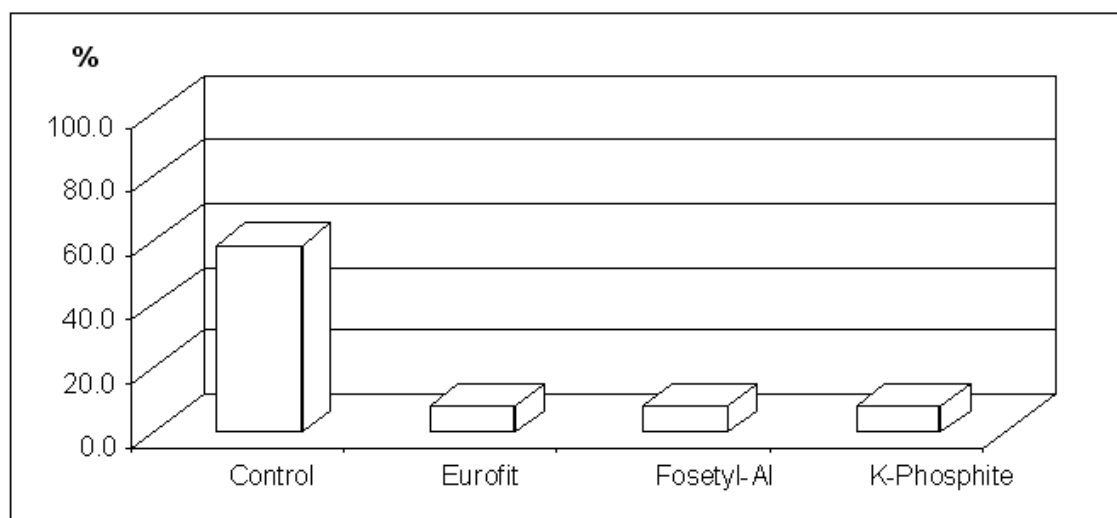


Figure 2. Percentuale di alberi di agrume colpita da gummosis marcescenza bruna in 2000 (Ferrari-Sagea esperimento).

Figure 2. Percentage of citrus trees affected by gummosis brown rot disease in 2000 (Ferrari-Sagea)experiment.

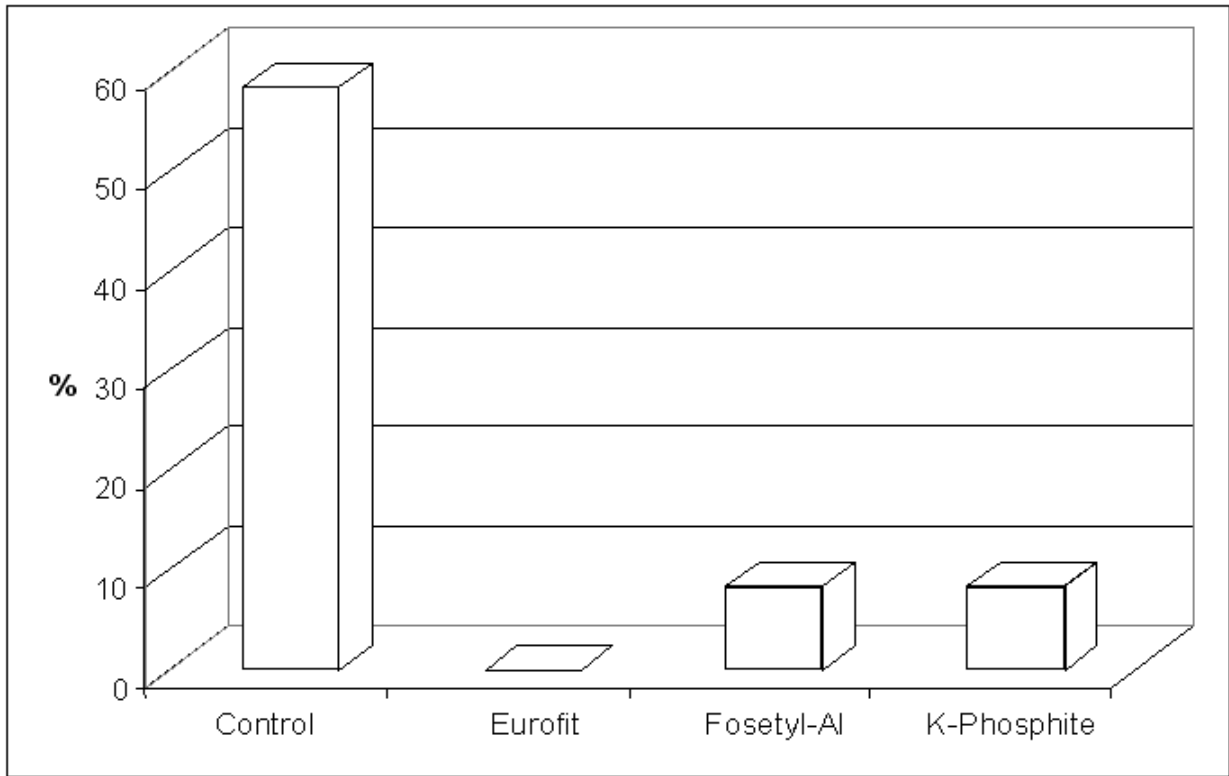


Figure 3. Percentuale di alberi di agrume colpita da gummosis marcescenza bruna in 2000 (Ferrari-Sagea) esperimento.

Figure 3. Percentage of citrus trees affected by gummosis brown rot disease in 2001 (Ferrari-Sagea) experiment.

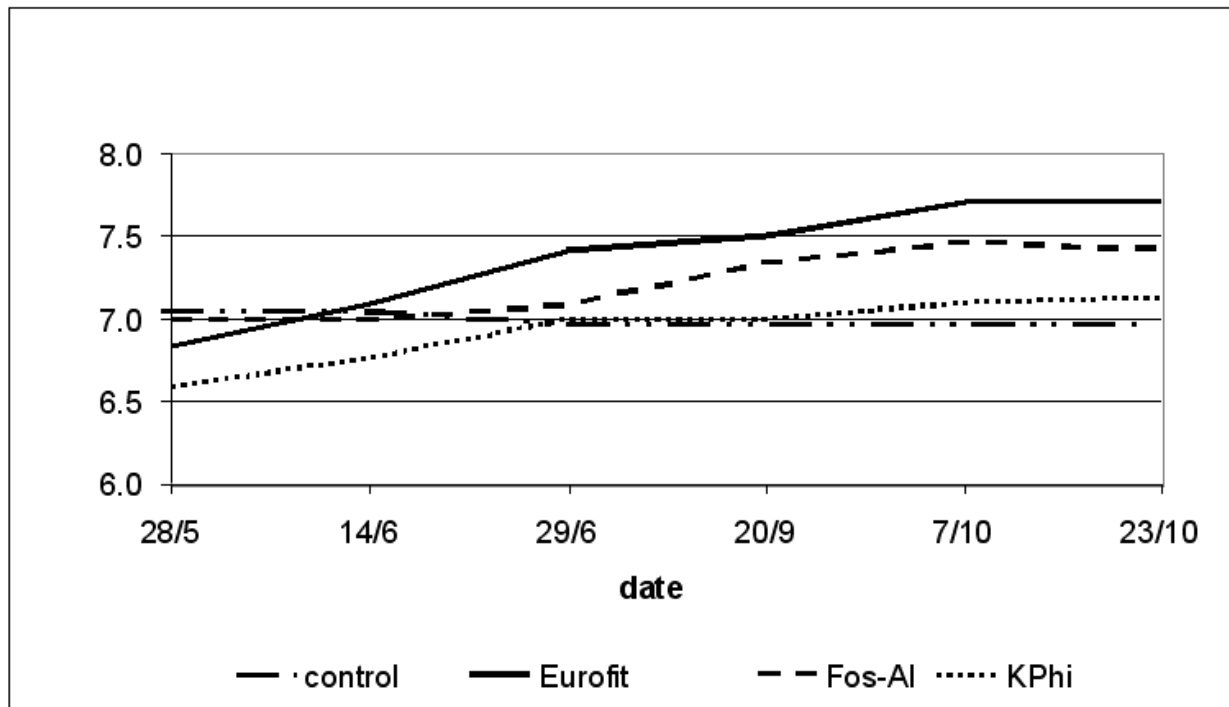


Figure 4. Vigore del culture. I risultati sono espressi a scala 0-10 secondo lo sviluppo della biomassa (Ferrari-Sagea Experiment).

References

- Ferrari D. (Sagea). 2001. Efficacy evaluation of Eurofit viti and Max formulations against *Phytophthora citrophthora* on *Citrus sp.* in southern Italy.
- García-Mina J.M^a., Cenoz S., García Cantera R., Urdániz, A., Zamarréño A.M^a., Lerga J. 1999. Composición capaz de estimular el mecanismo de defensa adquirida de las plantas. S. Patent. 2 134 167.
- García-Mina J.M., Jordana R., Aguirreolea J., Hernández M.A. 1995. The effect of a special organic amendment on the development of pepper plants cultivated in a soil infested with *Verticillium dahliae*, In: Fertilizers and Environment. (R.Barrueco., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Netherlands), pp. 301-304.
- García-Mina J.M., Jordana R., Hernández M.A. 1993. Organic amendment of natural origin capable of protecting plants from the aggression of pathogens and of stimulating plant growth. European Patent n° 0609168B1.
- Goicoechea N., Aguirreolea J., García-Mina J.M^a.(2004). Allevation of verticillium wilt in pepper (*Capcicum annum* L.) by using the organic amendment COA H of natural origin. *Scientia Horticulturae*, 101: 23-37.
- Guest D., Grant B. 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biological Review*, 66: 159-187.
- Iglesias J., García-Mina J.M^a., Hernández M.A., Rodríguez Rodríguez R., Jordana R. 1999. Evaluation of the organic product "Co-Actyl" on yield, plant growth and nematode communities in banana plant in the canary Islands. *International Journal of Nematology*, 9:34-42.
- Jordana, R., García-Mina J.M^a., Hernández-Minguillón M.A., Coello de Portugal D., Ariño A.H. 1994. Effects of an Organic Soil Amendment on the Parasitism of *Meloidogyne sp.* on Tobacco in Spain. *Afro-Asian Journal of Nematology*, 4 : 88-95.
- Manandhar H.K., Jorgensen H., Mathur S.B., Smedegaard-Petersen V. 1998. Resistance to rice blast induced by iron chloride, di-potassium hydrogen phosphate and salicylic acid. *Crop Protection*, 17: 323-329.
- Ohashi Y., Ohshima M. 1992. Stress-induced expression of genes for pathogenesis-relates proteins in plants. *Plant Cell Physiology*, 33: 819-826.
- Reuveni R., Reuveni M. 1998. Foliar Fertilizer Therapy. *Crop Protection*, 17: 111-118.
- Reuveni R., Oppenheim D., Reuveni M. 1998 a. Integrated control of powery mildew on apple trees by foliar spray of mono-potassium phosphate and sterol inhibiting fungicides. *Crop Protection*, 17: 563-568.
- Reuveni R., Dor G., Reuveni M. 1998 b. Local and systemic control of powery mildew (*Leveillula taurica*) on pepper plants by foliar spray of mono-potassium phosphate. *Crop Protection*, 17: 703-709.
- Tuset J.J., Lapeña I., García-Mina J. M. 2003. Efecto fungitoxico del acido fosforoso en naranjo dulce a la infección con zoosporas de *Phytophthora citrophthora*. *Boletín Sanidad Vegetal. Plagas* 29: 413-420.

III SESSIONE: Biostimolanti in agricoltura: aspetti analitici e normativi II

(Moderatori: Claudio Ciavatta e Giacomo Gagliano)

Caratterizzazione delle proprietà biostimolanti di fertilizzanti di diversa origine mediante biosaggi

Anna Benedetti, Francesca Baroccio*

Consiglio per la Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura - Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante
Via della Navicella 2/4 - 00184 Roma

*Corresponding Author: tel:+39 06 7008721, fax: +39 06 7005711; e-mail: francesca.baroccio@entecra.it

Riassunto

I biostimolanti sono prodotti che sia tal quali che miscelati con altri prodotti fertilizzanti contribuiscono a migliorare lo sviluppo delle specie vegetali coltivate, sfruttando meccanismi diversi.

Lo scopo del presente lavoro è quello di individuare metodi di analisi generici e generalizzabili, di semplice applicazione e di basso costo, di facile esecuzione ed interpretazione, in grado di mettere in evidenza le proprietà biostimolanti di prodotti di origine sia vegetale che animale. Tali metodi consentono uno screening preliminare tra prodotti fertilizzanti, biostimolanti ed ormonali, senza esaminare il processo fisiologico specifico su cui essi agiscono (ad es. senescenza, colore, vigoria), per valutare il quale si rendono necessari metodi *ad hoc* e precisi marcatori.

La scelta di avvalersi di biosaggi scaturisce dalla considerazione che i prodotti con proprietà biostimolanti attivano i processi metabolici, e quindi la loro attività viene ricercata misurando l'efficacia del prodotto sul metabolismo di organismi viventi. In particolare sono state seguite le variazioni dell'attività metabolica di organismi indicatori quali ad esempio microrganismi, vegetali, o cellule coltivate in vitro.

In questo lavoro l'efficacia dei prodotti utilizzati è stata determinata avvalendosi di quattro diversi metodi e di quattro diverse dosi di trattamento, combinati in una apposita matrice di valutazione che lega insieme dosi e proprietà. Lo studio è stato fondamentalmente basato sull'individuazione delle dosi di efficacia per i biostimolanti e sulla valutazione della presenza in un prodotto di proprietà ormonali, biostimolanti e fertilizzanti.

Oltre alla metodologia messa a punto verranno presentati in forma sintetica i risultati di caratterizzazione ottenuti per un notevole numero di prodotti di origine vegetale, animale o mista, presenti sul mercato nazionale o europeo o soltanto prototipi.

I risultati ottenuti consentono di affermare che effettivamente i test che utilizzano organismi viventi risultano sensibili ai trattamenti studiati, discriminando risposte diverse in funzione del diverso formulato, delle dosi analizzate e delle proprietà intrinseche.

Parole chiave: biostimolante, ormone, fertilizzante, metodo di analisi

Characterization of biostimulating properties in fertilisers using bioassays

Abstract

Biostimulants are products which, alone or mixed with other fertilizers, contribute to improve plant growth by exploiting different physiological processes.

Aim of this paper is the examination of analytical methods possibly flexible and generic, of brief and easy execution and interpretation, in order to characterise the biostimulating properties of fertilisers of both vegetal and animal origin and to detect the doses necessary for the effectiveness of biostimulants.

These methods permit to achieve a preliminary screening among biostimulants, hormones and fertilisers, with no care to the specific physiological processes they operate (i. e. fruit ripening, vigour or flower senescence).

The study of the detailed physiological processes needs specific methods and precise markers.

The use of bioassays was chosen because biostimulants activate metabolic processes, and their activity can be detected by measuring their action on the metabolism of living organisms. Particularly the metabolic activity of indicators such as micro-organisms, or vegetal, or tissue cultures in vitro, was investigated.

In this paper four different bio-tests and four different doses were selected to check out the efficiency of the products: definitive results are obtained by interpretation of the combination of the outcomes from each test at all the testing doses.

Beside the description of the methodologies, the results of characterization of several products of vegetal, animal or mixed origin of the national or European market are synthetically described.

The results obtained demonstrate that the tests used on living organisms are sensitive to the treatments applied: their results depend on the properties and the doses of the product.

Key words: biostimulant, hormone, fertiliser, analytical method

Introduzione

Una sempre maggiore richiesta di alimenti e di prodotti agricoli di qualità, parallela ad una maggiore attenzione nella conservazione delle risorse ambientali, ha portato a promuovere metodi di miglioramento qualitativo e quantitativo delle coltivazioni.

La tecnologia industriale ha compiuto notevoli progressi per adeguarsi a queste nuove esigenze, orientandosi sempre più verso la produzione di formulati innovativi che soddisfino le nuove richieste di mercato. I biostimolanti rappresentano un buon esempio di questi prodotti. Essi infatti sia tal quali che miscelati con altri fertilizzanti contribuiscono a migliorare lo sviluppo delle specie vegetali coltivate, sfruttando meccanismi diversi. I biostimolanti sono stati inseriti nel recente Decreto legislativo n. 217/06 tra i "Prodotti ad azione specifica", definiti come: "Prodotti che apportano ad un altro fertilizzante e/o al suolo e/o alla pianta sostanze che favoriscono o regolano l'assorbimento degli elementi nutritivi o correggono determinate anomalie di tipo fisiologico".

I processi di immobilizzazione e mobilitazione degli elementi nutritivi sono regolati sia dalle proprietà chimico-fisiche dei suoli (pH, C.S.C., qualità e quantità della sostanza organica, delle argille e degli ossidi e idrossidi) che da quelle microbiologiche (attività dei microrganismi del suolo). Appare quindi di fondamentale importanza, nella caratterizzazione di un prodotto biostimolante da somministrare al suolo anche per fertirrigazione, valutare non solo la composizione chimica del prodotto, ma anche l'effetto che questo ha sulle attività biochimiche e microbiologiche del terreno. I microrganismi del suolo, infatti, se da un lato contribuiscono ad aumentare l'assimilabilità degli elementi nutritivi per i vegetali, dall'altro competono con essi a livello nutrizionale attraverso processi di immobilizzazione.

Questi nuovi fertilizzanti hanno aperto una recente problematica in materia di controllo e caratterizzazione legata alla determinazione di una proprietà (in questo caso biostimolante) piuttosto che di un titolo. Tale aspetto ha imposto l'esigenza di mettere a punto metodi analitici in grado di evidenziare i singoli aspetti legati all'efficacia ed all'innocuità di un fertilizzante.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di individuare metodi di analisi generici e generalizzabili, di semplice applicazione e di basso costo, di facile esecuzione ed interpretazione, in grado di mettere in evidenza le proprietà biostimolanti di prodotti di origine sia vegetale che animale. Tali metodi dovrebbero consentire uno screening preliminare tra prodotti fertilizzanti, biostimolanti ed ormonali, senza esaminare il processo fisiologico specifico su cui essi agiscono (ad es. senescenza, colore, vigoria), per valutare il quale sono necessari metodi *ad hoc* e precisi marcatori.

La scelta di avvalersi di biosaggi scaturisce dalla

considerazione che i prodotti con proprietà biostimolanti attivano i processi metabolici, e quindi la loro attività viene ricercata misurando l'efficacia del prodotto sul metabolismo di organismi viventi. In particolare sono state seguite le variazioni dell'attività metabolica di organismi indicatori quali ad esempio microrganismi, vegetali, o cellule coltivate in vitro.

Materiali e metodi

Sono stati analizzati 48 campioni di fertilizzanti appartenenti alla categoria dei biostimolanti: 27 prodotti di origine vegetale, 16 di origine animale ed anche una miscela vegetale-animale 50:50, presenti sul mercato nazionale od europeo o soltanto prototipi.

Sono stati inseriti nella ricerca anche fitormoni e concimi minerali al fine di verificare gli intervalli di azione delle sostanze con tali proprietà, oltre che i fenomeni di stress, o geno e fitotossicità che si possono verificare in seguito ad un uso non conveniente di detti prodotti. Tutti i campioni sono stati forniti da diverse industrie produttrici di fertilizzanti italiane ed europee, e sono stati analizzati nell'ambito di progetti nazionali ed europei (progetto CRAFT dal titolo "Ensuring the quality of innovative crop growth inputs derived from biological raw materials (Biological Food for Plants)"; progetto "BIOVENUS - Biostimolanti, Veicolanti, Nutrienti"; dottorato di ricerca in "Chimica Agraria" con tesi dal titolo "Individuazione e taratura di metodi di analisi atti ad evidenziare le proprietà biostimolanti di prodotti di origine vegetale ed animale").

In questo lavoro si riportano soltanto alcuni degli esempi più significativi dei risultati ottenuti per la caratterizzazione di prodotti di tipologia diversa di origine sia animale che vegetale.

Le caratteristiche chimiche di base e l'origine di ciascun campione, secondo quanto indicato dalle etichette, vengono riportate nella tabella 1.

In questo lavoro l'efficacia e l'innocuità dei prodotti utilizzati è stata determinata mettendo a punto un sistema di valutazione che si basa sulla combinazione di due elementi: la dose di azione per l'espressione di una determinata proprietà (ormonale, biostimolante, nutritiva) ed alcuni biosaggi efficaci per il rilevamento delle proprietà ormonosimili, biostimolanti e genotossiche. Ci si è avvalsi quindi di quattro diversi metodi e di quattro diverse dosi di trattamento, combinati in una apposita matrice di valutazione che lega insieme dosi e proprietà.

Le dosi di azione tipiche per categorie di principio attivo sono schematizzate nella tabella 2.

I biostimolanti sembrano espletare la loro azione a dosi molto basse, distinguendosi così dai fitoregolatori e dai fertilizzanti, efficaci i primi a dosi notevolmente inferiori, ed i secondi a dosi ben più elevate. Le concentrazioni vengono espresse in mg Kg⁻¹ nel caso delle prove

effettuate sul suolo (determinazione della biomassa microbica e della sua attività), mentre nel caso delle prove sperimentali condotte in idrocoltura (test di accrescimento radicale, test dei micronuclei) le concentrazioni di prodotto vengono riferite alla soluzione (mg L⁻¹).

Le sostanze con effetto ormonale mostrano infatti la loro azione a dosi comprese tra 0,01 e 0,5 mg Kg⁻¹ (o mg L⁻¹), quantità più alte risultano tossiche per gli organismi viventi. L'effetto di biostimolazione si

manifesta invece per aggiunte dell'ordine delle decine di mg Kg⁻¹ (o mg L⁻¹) di preparato, mentre affinché un fertilizzante svolga il proprio compito nutrizionale deve essere addizionato al terreno in quantità più massicce, fino a 1000 mg Kg⁻¹ (o mg L⁻¹).

I diversi prodotti sono stati addizionati alle dosi di 0,1; 1; 10; 1000 mg Kg⁻¹ (o mg L⁻¹). In sintonia con quanto avviene per tutti i fertilizzanti il riferimento è stato fatto al prodotto tal quale.

Tabella 1. Caratteristiche chimiche di base dei prodotti utilizzati nelle prove.

Table 1. Chemical composition of analysed samples.

Campione	Tipologia di prodotto	Composizione chimica	Unità	Valore
1	Fitormone	Acido alfa-naftalenacetico	%	3,16
2	Fitormone	Acido gibberellico (GA3)	%	2
3	Concime minerale	Azoto totale	N %	20
		Azoto ammoniacale	N %	3,9
		Azoto nitrico	N %	5,6
		Azoto ureico	N %	10,5
		Anidride fosforica	P ₂ O ₅ %	20
		Ossido di potassio	K ₂ O %	20
		B	%	0,02
		Mo	%	0,001
		Mn (chelato con EDTA)	%	0,03
		Fe (chelato con EDTA)	%	0,07
		Zn (chelato con EDTA)	%	0,01
		Cu (chelato con EDTA)	%	0,005
4	(NH ₄) ₂ SO ₄	Azoto totale	N %	20-21
5	Idrolizzato proteico di erba medica	Azoto totale	N %	4,5
		Azoto organico	N %	4,5
		Carbonio organico	C %	15,0
		Amminoacidi totali	%	28,0
6	Estratto di aghi di abete rosso	Composti azotati (proteine, amminoacidi)	%	2,8
		Acidi organici	%	20,0
		Carboidrati	%	43-46
		Micro e macroelementi (Cu, Zn, Co, Cr, Ni, Mn, B, Si, Pb, Mg)	%	4,5-5,2
7	Estratto di alghe	Carbonio totale	C %	7,3
		Azoto totale	N %	0,15
8	Carniccio	Azoto organico	N %	8,0
		Azoto organico solubile	N %	8,0
		Carbonio organico	C %	24,0
9	Idrolizzato proteico da matrice animale	Carbonio organico totale	C %	18,7
		Azoto totale	N %	6,3
10	Idrolizzato di farina di carne	Carbonio organico totale	C %	21,6
		Azoto totale	N %	5,5
		Amminoacidi totali	%	28,6
11	Mix animale-vegetale (50:50)	Azoto organico	N %	5,0
		Azoto organico solubile	N %	5,0
		Carbonio organico	C %	22,0
		Proteine, peptidi, amminoacidi	%	31,0

Tabella 2. Concentrazioni alle quali possono esplicarsi le attività ormonosimile, biostimolante e genotossica.**Table 2.** Application doses for observing hormonal-like, biostimulating or nutritional effects.

Tipo di attività	Dosi di azione		
Attività ormonosimile	0,01	0,5	ppm*
Attività biostimolante	1 - 10 ppm*		
Attività genotossica	> 100 ppm*		

*ppm equivalgono a:

- mg di prodotto tal quale per kg di suolo nel caso delle prove effettuate sul suolo (determinazione della biomassa microbica e della sua attività);
- mg di prodotto tal quale per litro di soluzione nel caso di prove condotte in idrocoltura (test di accrescimento radicale, test dei micronuclei).

Il metodo utilizzato per rivelare l'attività ormonosimile è il test di accrescimento radicale (Metodo ISO TC 190, "Soil quality", 1993) su plantule di *Zea mays*, che si basa sulla stima della crescita radicale di semi fatti germinare in condizioni controllate: dopo un periodo di crescita stabilito in base alla specie prescelta è stata misurata la lunghezza radicale delle plantule ad intervalli regolari di tempo. Il metodo dà risultati positivi se viene determinata una differenza statisticamente significativa tra le lunghezze radicali delle plantule appartenenti alle diverse tesi.

Le proprietà biostimolanti vengono invece determinate mediante analisi microbiologiche quali la determinazione della biomassa microbica e della respirazione della biomassa microbica del suolo addizionato di diverse dosi dei prodotti sopra citati.

Il carbonio della biomassa microbica del suolo è stato determinato secondo il metodo di fumigazione-estrazione (Vance *et al.*, 1987). La fumigazione uccide le cellule microbiche provocando la lisi cellulare e il rilascio del citoplasma nell'ambiente del suolo rendendo possibile l'estrazione del materiale cellulare con una soluzione di K_2SO_4 . Sugli estratti si procede alla determinazione del carbonio organico totale della biomassa mediante il metodo dell'ossidazione con bicromato in ambiente acido.

La respirazione della biomassa microbica del suolo è stata determinata con il metodo descritto da Isermeyer (1952) (ambiente chiuso). La biomassa microbica, respirando, produce CO_2 che reagisce con una soluzione di idrossido di sodio a concentrazione nota. La concentrazione di CO_2 viene determinata mediante retrotitolazione dell' $NaOH$ che non ha reagito con HCl . È stato calcolato poi il quoziente metabolico (qCO_2), che esprime la quantità di CO_2 prodotta per unità di biomassa e di tempo. Tale parametro viene calcolato facendo il rapporto tra respirazione di base/biomassa microbica, ed è espresso come respirazione basale per unità di biomassa microbica ($mg\ CO_2-C\ g^{-1}Cmic\ h^{-1}$) (Anderson e Domsch, 1978). La respirazione specifica della biomassa (qCO_2) rappresenta una misura della risposta della biomassa micro-

bica a fenomeni di disturbo.

Infine è importante, se non necessario, valutare se nei materiali che vengono applicati al terreno vi sia una presenza di sostanze mutagene le quali, avendo la capacità di indurre danni al DNA anche in assenza di effetti tossici che possono fungere da campanello di allarme, rappresentano un parametro da non trascurare nella valutazione dell'impatto ambientale di un determinato composto. Ciò è stato fatto utilizzando il test dei micronuclei (Sharma e Sharma, 1972). Gli effetti genotossici di un dato prodotto su cellule isolate dagli apici radicali di piantine di *Vicia faba L. var. minor*, sono stati valutati osservando al microscopio la frequenza di micronuclei in un numero molto elevato di cellule (Ma 1982; De Marco *et al.*, 1990; De Simone *et al.*, 1992). La presenza di sostanze mutagene nel campione provoca nelle cellule danni al DNA cromosomico ed il non corretto svolgimento del processo mitotico, evidenziato dalla presenza di figure anafasiche irregolari o dalla presenza di frammenti di DNA extranucleari (micronuclei).

Per le prove biochimiche è stato utilizzato un suolo proveniente dalla provincia di Foggia, campionato ad una profondità di 0-20 cm. In accordo con le procedure ISO di campionamento stoccaggio e caratterizzazione del suolo utilizzate per la definizione degli standard di qualità di un suolo nell'ambito della commissione tecnica TC 190 "Soil Quality" (1993), sono stati definiti quali parametri di riferimento la tessitura (franca), il pH (≈ 7), il contenuto in sostanza organica (2 /2,5%). Le caratteristiche chimico-fisiche principali, determinate secondo i "Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo" (G. U. n° 131 del 25 Maggio 1992) sono riportate nella tabella 3.

Ciascun campione è stato essiccato all'aria e vagliato a 2 mm, prima delle analisi effettuate in triplo (Allievi *et al.*, 2003). Tutti i valori sono riferiti al peso del terreno seccato in stufa a 105°C.

Il terreno presenta una tessitura franco-argillosa, un pH neutro, un livello di salinità normale e una bassa dotazione calcarea. Il tenore in sostanza organica ed in azoto totale è elevato rispetto alla media italiana. Il terreno presenta una fertilità biologica media.

Tabella 3. Principali caratteristiche del terreno di Foggia impiegato nelle prove.

Table 3. Main characteristics of the utilised soil from Foggia.

Descrizione	Unità di misura	Valore
Sabbia	S %	31
Limo	L %	30
Argilla	A %	39
Tessitura		Franco-Argillosa
Reazione in pH (H ₂ O 1:2,5)	pH	7,2
Conducibilità elettrica (H ₂ O 1:2,5)	dS/m	0,33
Carbonati totale	CaCO ₃ %	8,1
Carbonio organico (Springer-Klee)	C %	1,52
Carbonio organico estraibile (TEC)	C %	1,06
Carbonio umico (HA+FA)	C %	0,83
Azoto totale (Kjeldhal)	N %	0,14
Rapporto C/N		10,9
Fertilità biologica (C0)	mg C-CO ₂ /kg terreno in 14 giorni	299

Tutti i risultati ottenuti sono stati sottoposti ad Analisi della Varianza ANOVA Univariata mediante package statistico SPSS 11.0, il confronto tra le medie è stato effettuato mediante il Duncan-test per $p \leq 0,05$.

Si è quindi proceduto al confronto degli effetti causati dalle medesime dosi di prodotti definiti biostimolanti sugli organismi viventi già citati, al fine di definire le soglie di concentrazione alle quali essi hanno effetto ormonale, biostimolante, o nutritivo.

Risultati

La discussione dei risultati deve necessariamente avvenire in modo integrato, in quanto è fondamentale, per non incorrere in errori di valutazione, utilizzare contemporaneamente più biosaggi. Tale suggerimento per l'uso di indicatori biologici e microbiologici è stato ampiamente discusso in letteratura (Brookes, 1995; Benedetti *et al.*, 2006). I risultati ottenuti sono stati ricapitolati per ciascun prodotto in una tabella riepilogativa in cui si ritrova, oltre ai dati, l'andamento dei diversi parametri misurati, per ogni concentrazione, rispetto al controllo. Le frecce verso l'alto indicano un aumento del valore del parametro misurato per il trattamento rispetto al controllo, mentre le frecce rivolte verso il basso indicano il contrario. Gli esiti della trattazione statistica sono riportati in tabella, dopo le rispettive medie e deviazioni standard.

Nella tabella 4 sono riportati, sulla base del discorso fatto riguardo le dosi di azione, i comportamenti attesi per un ormone, un fertilizzante ed un biostimolante.

I fitormoni danno luogo ad un effetto genotossico quando utilizzati in concentrazioni molto più alte di quelle appropriate. Tale osservazione può risultare importante per rivelare la presenza di sostanze fitormonali od ormone-simili in prodotti definiti biosti-

molanti e quindi utilizzati a dosi superiori a quelle dei fitoregolatori, ai quali in realtà sono state aggiunte sostanze non previste dalla legge dei fertilizzanti.

In genere i test biochimici si sono dimostrati molto efficaci nel discriminare l'attività biostimolante da quella fertilizzante. Tendenzialmente infatti la biomassa microbica cresce ponderalmente per effetto nutritivo, mentre accelera la propria attività per effetto biostimolante. Rispetto al controllo non trattato l'effetto biostimolante si evidenzia con un decremento ponderale della biomassa microbica, alla quale inizialmente dovrebbe corrispondere un aumento dell'attività.

Di seguito sono elencati i risultati ottenuti per la caratterizzazione dei prodotti le cui caratteristiche di base sono già state riportate nella tabella 1.

Per il campione 1 (tab. 5) la crescita delle radici è uguale a quella del controllo a 0,1 ppm, mentre è fortemente rallentata per tutti i dosaggi superiori, praticamente nulla a 1000 ppm.

La biomassa microbica cresce lievemente (non statisticamente significativa) rispetto al campione di riferimento da 10 ppm, mentre la respirazione specifica (qCO₂) è più alta del controllo alle dosi fitormonale (0,1 ppm) e di 1 ppm.

Al microscopio si vede la presenza di molte cellule morte e una discreta e costante presenza di micronuclei aumentando le dosi di applicazione del prodotto, che è fortemente tossico a 1000 ppm.

Il test dei micronuclei si è rivelato determinante nel mettere in evidenza la tossicità del fitormone quando applicato in quantità molto maggiori rispetto a quelle previste per i prodotti fitosanitari.

Anche per l'altra tipologia di fitormone (tab. 6) la crescita delle radici è vicina a quella del controllo a 0,1 ppm, mentre è molto ridotta per tutti i dosaggi superiori.

Tabella 4. Comportamenti attesi per un ormone, un fertilizzante ed un biostimolante.**Table 4.** Results expected for an hormone, a fertiliser and a biostimulant.

ORMONE		0,1 ppm	1 ppm	10 ppm	1.000 ppm
	Allungamento radicale (AR)		↑	=	=
Attività della biomassa microbica (R)		↑	↑/↓	↓	↓
Dosaggio della biomassa microbica (B)		↑	↑/↓	↑/↓	↑/↓
Test dei Micronuclei (M)		=	=	↑	↑
BIOSTIMOLANTE		0,1 ppm	1 ppm	10 ppm	1.000 ppm
	Allungamento radicale (AR)		=	↑	↑
Attività della biomassa microbica (R)		=	↑	↑	↑
Dosaggio della biomassa microbica (B)		=	↓	↓	↓
Test dei Micronuclei (M)		=	=	=	=
FERTILIZZANTE		0,1 ppm	1 ppm	10 ppm	1.000 ppm
	Allungamento radicale (AR)		=	=	=
Attività della biomassa microbica (R)		=	↑	↑	↑
Dosaggio della biomassa microbica (B)		=	↑	↑	↑
Test dei Micronuclei (M)		=	=	=	=

Tabella 5. Risultati ottenuti per il campione 1.**Table 5.** Results obtained for sample n 1.

	Controllo	0,1 ppm	1 ppm	10 ppm	1.000 ppm
Allungamento radicale (AR, cm)	10,3 ±1,6 (d)	9,5 ±1,2 (d)	5,1 ±2,4 (c)	2,2 ±0,4 (ab)	0,5 ±0,1 (a)
	Andamento rispetto al controllo	=	↓	↓	↓
Attività della biomassa microbica (qCO ₂ x 10 ³ , mg C-CO ₂ mg ⁻¹ Cmic h ⁻¹)	2,63 ±0,67 (a)	3,25 ±0,81 (ab)	4,73 ±1,67(b)	1,72 ±0,04 (a)	1,89 ±0,41(a)
	Andamento rispetto al controllo	↑/=	↑	↓/=	↓/=
Dosaggio della biomassa microbica (B, mg/kg)	194 ±67 (bc)	132 ±31 (ab)	101 ±6 (a)	254 ±6,4 (c)	252 ±51 (c)
	Andamento rispetto al controllo	↓	↓	↑/=	↑/=
Test dei Micronuclei (M, %)	0,12 ±0,04 (a)	0,11 ±0,11 (a)	0,11 ±0,06 (a)	0,03 ±0,04 (a)	0,37 ±0,18 (a)
	Andamento rispetto al controllo	=	=	=	↑

Tabella 6. Risultati ottenuti per il campione 2.**Table 6.** Results obtained for sample n 2.

	Controllo	0,1 ppm	1 ppm	10 ppm	1.000 ppm
Allungamento radicale (AR, cm)	11,3 ±1,9 (c)	9,9 ±2,3 (c)	6,7 ±1,8 (b)	4,2 ±0,4 (a)	4,5 ±0,3 (a)
	Andamento rispetto al controllo	=	↓	↓	↓
Attività della biomassa microbica (qCO ₂ x 10 ³ , mg C-CO ₂ mg ⁻¹ Cmic h ⁻¹)	1,81 ±0,04 (c)	2,10 ±0,03 (d)	1,85 ±0,05 (c)	1,54 ±0,04 (a)	1,72 ±0,03 (b)
	Andamento rispetto al controllo	↑	=	↓	↓
Dosaggio della biomassa microbica (B, mg/Kg)	234,6 ±10,1 (b)	301,3 ±5,6 (d)	200,9 ±4,9 (a)	219,5 ±7,9 (b)	253,2 ±12,9 (c)
	Andamento rispetto al controllo	-	↓/=	=	↑
Test dei Micronuclei (M, %)	0,04 ±0,06 (a)	0,14 ±0,12 (a)	0,08 ±0,10 (a)	0,20 ±0,16 (a)	0,50 ±0,43 (b)
	Andamento rispetto al controllo	=	=	=	↑

La quantità della biomassa così come la sua attività è superiore al controllo alla dose fitormonale di 0,1 ppm. Il campione mostra una significativa mutagenicità soltanto alla maggiore dose di impiego.

La presenza di cellule micronucleate rilevata suggerisce la possibilità che gli ormoni vegetali esprimano un effetto mutageno sugli organismi vegetali, quando impiegati in dosi molto superiori a quelle consigliate (fino a 0,5 ppm).

Nel caso del campione 3 (tab. 7) l'allungamento radicale è uguale al controllo per tutte le tesi considerate, così come la respirazione, per la quale il trattamento statistico dei dati non rivela differenze significative. I valori della quantità di biomassa microbica sono generalmente superiori al controllo, in modo significativo alla dose più alta. Il prodotto non è genotossico in quanto per nessuna dose si osservano differenze significative rispetto al controllo.

I parametri studiati confermano quindi che i concimi agiscono solamente a partire dalla dose di 1000 ppm.

I risultati ricavati dai trattamenti con il campione 4 (tab. 8) fanno vedere un'aumento della lunghezza delle radici di mais rispetto al controllo a 1 ppm, e la respirazione specifica che aumenta rispetto al controllo a partire da 1 ppm, anche se la trattazione statistica mostra differenze non significative mentre per nessuna dose per entrambi gli indicatori che utilizzano i microrganismi.

Il test dei micronuclei rivela un lieve aumento della quantità di micronuclei a 1000 ppm, effetto che indica una leggera genotossicità e un sensibile stress delle cellule.

Un dosaggio eccessivo del fertilizzante può causare condizioni di stress e divenire nocivo.

Passiamo ora ad esaminare le risposte ottenute per alcuni dei prodotti per i quali sono state segnalate proprietà biostimolanti.

Per il campione 5 (tab. 9) la crescita radicale non mostra differenze statisticamente significative tra i diversi trattamenti.

I dati microbiologici mostrano una forte diminuzione del numero di microrganismi per tutte le quantità di prodotto addizionato al suolo. Allo stesso tempo però la biomassa microbica risulta fortemente stimolata, come dimostrano i valori calcolati della respirazione specifica.

Il trattamento dei semi di *Vicia faba* con le diverse soluzioni non ha comportato alcuna irregolarità nei processi di replicazione cellulare, anzi con l'aumentare delle dosi si è riscontrato una proliferazione della divisione mitotica (anafasi totali).

Tale prodotto è un biostimolante infatti pur determinando una diminuzione della biomassa microbica dovuta a mancanza di nutrimento, accelera notevolmente la respirazione. Inoltre non è genotossico anzi fa aumentare il numero di cellule in divisione.

Anche il formulato 6 (tab. 10) mostra proprietà di biostimolazione perché l'attività specifica (qCO_2) aumenta alle dosi più alte, mentre la biomassa microbica diminuisce ponderalmente rispetto al controllo. L'allungamento radicale inoltre aumenta rispetto al controllo a 1 e 10 ppm ed il test dei micronuclei non mostra alcuna tossicità, anzi le anafasi totali aumentano a 1, 10 e 1000 ppm.

L'allungamento delle radici dei semi di mais fatti crescere nelle soluzioni del prodotto 7 (tab. 11) non mostra differenze significative se paragonato il controllo. Si vede però che la biomassa diminuisce in numero alle dosi di 10 e 1000 ppm mentre l'attività microbica sale in modo statisticamente significativo rispetto al controllo a 10 ppm. Il test condotto per osservare l'eventuale genotossicità del formulato ha dato esito negativo a tutte le dosi. Il comportamento di questo estratto conferma quindi le proprietà biostimolanti dichiarate.

Finora sono stati esaminati prodotti biostimolanti di differente natura e provenienza, ma esclusivamente di origine vegetale. Passiamo ora ad esaminare alcuni di origine animale, anch'essi con dichiarate proprietà biostimolanti.

I risultati delle prove eseguite sul campione 8 (tab. 12) mostrano che non si verifica un significativo allungamento radicale per nessuna dose e che non si vedono micronuclei in quantità interpretabili: l'analisi statistica dimostra che non c'è differenza significativa tra i trattamenti. Anche il dosaggio della biomassa microbica non mostra differenze statisticamente significative rispetto al controllo per nessun trattamento (la tendenza è comunque a diminuire) mentre la respirazione specifica (qCO_2) mostra un'attività dei microrganismi accelerata rispetto al controllo a 1 e 1000 ppm.

L'attività biostimolante del campione 9 (tab. 13) si evince osservando che il numero di microrganismi tende a diminuire rispetto al controllo per tutte le dosi, mentre la loro attività specifica è più alta del controllo. Non mostra genotossicità, anzi le repliche mitotiche (anafasi totali) aumentano a 1 e 10 ppm, dose alla quale c'è anche un allungamento radicale poco superiore al controllo.

Il campione 10 (tab. 14) è un biostimolante perché in seguito ai trattamenti presi in esame il numero di microrganismi diminuisce in modo apprezzabile rispetto al controllo a tutte le dosi tranne che a 1000 ppm, mentre la loro attività è più alta del controllo a tutte le dosi, ma in modo statisticamente significativo a 10 ppm.

Non mostra alcuna tossicità a nessuna dose, anzi le repliche mitotiche (anafasi totali) aumentano a 1 e 10 ppm, concentrazioni alle quali si verifica anche AR rispetto al controllo.

Nella tabella 15 infine sono schematizzati i risultati ottenuti per il campione 11.

L'accrescimento radicale mostra diminuzione rispetto al controllo che diventa statisticamente signifi-

ficativa a 10 e 1000 ppm. I valori della biomassa sono molto vicini al controllo per tutti i trattamenti studiati ed anche la respirazione specifica (qCO_2) aumenta o è uguale al riferimento.

Il test di genotossicità riscontra la presenza di micronuclei costanti alle dosi di 10 e 1000 ppm: il prodotto è lievemente genotossico, anche se fa proliferare l'attività mitotica delle cellule (anafasi totali).

Il formulato è un fertilizzante con proprietà biostimolanti in quanto rileva un aumento della respira-

zione specifica anche quando la biomassa non aumenta ponderalmente, ma causa inibizioni e problemi di tossicità e di genotossicità alle dosi più elevate, forse dovute ad un eccesso di stimolazione.

L'analisi di tale campione è stata inserita in questo studio per testare l'effetto di un prodotto di origine mista (miscela al 50% di origine animale e al 50% vegetale): in questo formulato potrebbero perciò innescarsi sinergie inaspettate e difficilmente diagnosticabili tra le diverse componenti.

Tabella 7. Risultati ottenuti per il campione 3

Table 7. Results obtained for sample n 3.

	Controllo	0,1 ppm	1 ppm	10 ppm	1.000 ppm
Allungamento radicale (AR, cm)	15,4 ±0,9 (a)	15,7 ±0,7 (a)	15,5 ±0,4 (a)	15,1 ±1,9 (a)	15,8 ±1,6 (a)
	Andamento rispetto al controllo	=	=	=	=
Attività della biomassa microbica ($qCO_2 \times 10^3$, mg C-CO ₂ mg ⁻¹ Cmic h ⁻¹)	2,88 ±0,26 (a)	2,68 ±0,35 (a)	2,63 ±0,31 (a)	2,70 ±0,14 (a)	2,80 ±0,51 (a)
	Andamento rispetto al controllo	=	=	=	=
Dosaggio della biomassa microbica (B, mg/Kg)	220,1 ±5,7 (a)	236,9 ±9,2 (ab)	212,0 ±29,8 (a)	251,6 ±21,3 (ab)	275,5 ±50,1 (b)
	Andamento rispetto al controllo	=	=	↑/=	-
Test dei Micronuclei (M, %)	0,15 ±0,10 (a)	0,22 ±0,13 (a)	0,21 ±0,16 (a)	0,14 ±0,10 (a)	0,13 ±0,09 (a)
	Andamento rispetto al controllo	=	=	=	=

Tabella 8. Risultati ottenuti per il campione 4

Table 8. Results obtained for sample n 4.

	Controllo	0,1 ppm	1 ppm	10 ppm	1.000 ppm
Allungamento radicale (AR, cm)	14,6 ±0,2 (a)	14,7 ±1,1 (a)	16,3 ±0,6 (b)	14,6 ±0,8 (a)	15,0 ±0,1 (a)
	Andamento rispetto al controllo	=	-	=	=
Attività della biomassa microbica ($qCO_2 \times 10^3$, mg C-CO ₂ mg ⁻¹ Cmic h ⁻¹)	4,52 ±1,49 (ab)	2,84 ±1,18 (a)	4,74 ±1,73 (ab)	4,54 ±1,27 (ab)	5,72 ±0,85 (b)
	Andamento rispetto al controllo	↓/=	=	=	↑/=
Dosaggio della biomassa microbica (B, mg/Kg)	118,0 ±73,8 (a)	161,1 ±71,6 (a)	109,0 ±23,2 (a)	107,3 ±54,3 (a)	124,1 ±32,3 (a)
	Andamento rispetto al controllo	=	=	=	=
Test dei Micronuclei (M, %)	0,12 ±0,04 (a)	0,15 ±0,06 (a)	0,16 ±0,12 (a)	0,19 ±0,11 (a)	0,31 ±0,13 (b)
	Andamento rispetto al controllo	=	=	=	-

Tabella 9. Risultati ottenuti per il campione 5

Table 9. Results obtained for sample n 5.

	Controllo	0,1 ppm	1 ppm	10 ppm	1.000 ppm
Allungamento radicale (AR, cm)	10,7 ±1,7 (a)	8,3 ±1,9 (a)	8,7 ±1,8 (a)	8,3 ±0,5 (a)	10,1 ±2,2 (a)
	Andamento rispetto al controllo	=	=	↓/=	=
Attività della biomassa microbica ($qCO_2 \times 10^3$, mg C-CO ₂ mg ⁻¹ Cmic h ⁻¹)	3,74 ±0,34 (a)	16,06 ±1,19 (bc)	10,20 ±2,20 (ab)	11,06 ±8,45 (abc)	20,20 ±6,84 (c)
	Andamento rispetto al controllo	↑	↑/=	↑/=	↑
Dosaggio della biomassa microbica (B, mg/Kg)	220,1 ±5,7 (a)	56,8 ±4,1 (b)	88,2 ±33,7 (b)	87,3 ±17,3 (b)	49,1 ±17,2 (b)
	Andamento rispetto al controllo	↓	↓	↓	↓
Test dei Micronuclei (M, %)	0,07 ±0,06 (a)	0,00 ±0,00 (a)	0,17 ±0,04 (a)	0,12 ±0,31 (a)	0,02 ±0,03 (a)
	Andamento rispetto al controllo	=	=	=	=

Tabella 10. Risultati ottenuti per il campione 6

Table 10. Results obtained for sample n 6.

	Controllo	0,1 ppm	1 ppm	10 ppm	1.000 ppm
Allungamento radicale (AR, cm)	14,8 ±1,2 (a)	15,1 ±0,7 (ab)	16,9 ±1,4 (b)	16,0 ±0,1 (b)	13,2 ±1,5 (a)
	Andamento rispetto al controllo	=	↑	↑	=
Attività della biomassa microbica (qCO ₂ x 10 ³ , mg C-CO ₂ mg ⁻¹ Cmic h ⁻¹)	2,11 ±0,09 (a)	2,45 ±0,41 (a)	2,04 ±0,60 (a)	17,02 ±5,20 (b)	4,80 ±1,85 (ab)
	Andamento rispetto al controllo	=	=	↑	↑/=
Dosaggio della biomassa microbica (B, mg/Kg)	245,6 ±10,5 (c)	186,9 ±37,9 (c)	219,1 ±62,8 (c)	26,9 ±9,2 (a)	104,1 ±41,8 (b)
	Andamento rispetto al controllo	↓/=	=	↓	↓
Test dei Micronuclei (M, %)	0,06 ±0,08(a)	0,19 ±0,28 (a)	0,09 ±0,17 (a)	0,04 ±0,07 (a)	0,14 ±0,47 (a)
	Andamento rispetto al controllo	=	=	=	=

Tabella 11. Risultati ottenuti per il campione 7

Table 11. Results obtained for sample n 7.

	Controllo	0,1 ppm	1 ppm	10 ppm	1.000 ppm
Allungamento radicale (AR, cm)	14,3 ±3,0 (a)	14,7 ±2,8 (a)	14,0 ±1,4 (a)	17,5 ±1,6 (a)	14,7 ±1,8 (a)
	Andamento rispetto al controllo	=	=	=	=
Attività della biomassa microbica (qCO ₂ x 10 ³ , mg C-CO ₂ mg ⁻¹ Cmic h ⁻¹)	1,89 ±0,33 (a)	2,52 ±0,68 (a)	1,70 ±0,10 (a)	23,75 ±6,42 (b)	6,33 ±2,06 (a)
	Andamento rispetto al controllo	↑/=	=	↑	↑/=
Dosaggio della biomassa microbica (B, mg/Kg)	201,3 ±12,3 (c)	184,1 ±19,0 (c)	265,8 ±22,6 (d)	17,0 ±2,0 (a)	62,2 ±23,2 (b)
	Andamento rispetto al controllo	=	↑	↓	↓
Test dei Micronuclei (M, %)	0,16 ±0,16 (a)	0,15 ±0,10 (a)	0,10 ±0,10 (a)	0,16 ±0,12 (a)	0,14 ±0,14 (a)
	Andamento rispetto al controllo	=	=	=	=

Tabella 12. Risultati ottenuti per il campione 8

Table 12. Results obtained for sample n 8.

	Controllo	0,1 ppm	1 ppm	10 ppm	1.000 ppm
Allungamento radicale (AR, cm)	13,8 ±3,8 (a)	11,3 ±1,4 (ab)	10,7 ±2,1 (ab)	11,1 ±1,6 (ab)	10,4 ±3,7 (ab)
	Andamento rispetto al controllo	=	=	=	=
Attività della biomassa microbica (qCO ₂ x 10 ³ , mg C-CO ₂ mg ⁻¹ Cmic h ⁻¹)	1,29 ±0,07 (a)	1,26 ±0,94 (a)	2,86 ±0,67 (ab)	1,32 ±0,19 (a)	4,00 ±2,57 (b)
	Andamento rispetto al controllo	=	↑/=	=	↑
Dosaggio della biomassa microbica (B, mg/Kg)	255,8 ±16,9 (ab)	351,5 ±201,0 (b)	176,2 ±36,9 (ab)	295,8 ±73,1 (ab)	141,2 ±83,2 (a)
	Andamento rispetto al controllo	↑/=	=	=	↓/=
Test dei Micronuclei (M, %)	0,09 ±0,07 (a)	0,08 ±0,02 (a)	0,19 ±0,13 (a)	0,06 ±0,02 (a)	0,11 ±0,04 (a)
	Andamento rispetto al controllo	=	=	=	=

Tabella 13. Risultati ottenuti per il campione 9**Table 13.** Results obtained for sample n 9.

	Controllo	0,1 ppm	1 ppm	10 ppm	1.000 ppm
Allungamento radicale (AR, cm)	10,2 ±0,9 (a)	11,7 ±1,3 (a)	10,6 ±2,9 (a)	11,5 ±1,3 (a)	8,7 ±2,6 (a)
	Andamento rispetto al controllo	↑/=	=	↑/=	↓/=
Attività della biomassa microbica (qCO ₂ x 10 ³ , mg C-CO ₂ mg ⁻¹ Cmic h ⁻¹)	1,18 ±0,06 (a)	1,52 ±0,59 (a)	1,53 ±0,42 (a)	1,49 ±0,42 (a)	1,59 ±0,48 (a)
	Andamento rispetto al controllo	↑/=	↑/=	↑/=	↑/=
Dosaggio della biomassa microbica (B, mg/Kg)	361,7 ±48,3 (a)	282,0 ±133,3 (a)	245,0 ±19,6 (a)	258,6 ±94,1 (a)	306,8 ±88,6 (a)
	Andamento rispetto al controllo	↓/=	↓/=	↓/=	↓/=
Test dei Micronuclei (M, %)	0,15 ±0,10 (a)	0,16 ±0,09 (a)	0,19 ±0,13 (a)	0,15 ±0,12 (a)	0,07 ±0,04 (a)
	Andamento rispetto al controllo	=	=	=	=

Tabella 14. Risultati ottenuti per il campione 10**Table 14.** Results obtained for sample n 10.

	Controllo	0,1 ppm	1 ppm	10 ppm	1.000 ppm
Allungamento radicale (AR, cm)	12,2 ±2,1 (a)	14,7 ±1,1 (ab)	15,2 ±1,7 (b)	15,7 ±0,4 (b)	12,2 ±1,2 (a)
	Andamento rispetto al controllo	↑/=	↑	↑	=
Attività della biomassa microbica (qCO ₂ x 10 ³ , mg C-CO ₂ mg ⁻¹ Cmic h ⁻¹)	1,23 ±0,05 (a)	2,37 ±0,49 (ab)	2,54 ±0,74 (ab)	2,97 ±1,33 (b)	1,27 ±0,08 (a)
	Andamento rispetto al controllo	↑/=	↑/=	↑	=
Dosaggio della biomassa microbica (B, mg/Kg)	287,8 ±6,5 (b)	147,7 ±37,1 (a)	133,0 ±45,3 (a)	142,8 ±80,4 (a)	332,4 ±33,4 (b)
	Andamento rispetto al controllo	↓	↓	↓	↑/=
Test dei Micronuclei (M, %)	0,17 ±0,12 (a)	0,10 ±0,15 (a)	0,05 ±0,07 (a)	0,09 ±0,11 (a)	0,07 ±0,06 (a)
	Andamento rispetto al controllo	=	=	=	=

Tabella 15. Risultati ottenuti per il campione 11**Table 15.** Results obtained for sample n 11.

	Controllo	0,1 ppm	1 ppm	10 ppm	1.000 ppm
Allungamento radicale (AR, cm)	13,2 ±0,5 (d)	11,8 ±1,1 (bcd)	11,0 ±1,1 (abcd)	10,7 ±1,0 (ab)	8,9 ±1,3 (a)
	Andamento rispetto al controllo	↓/=	↓/=	↓	↓
Attività della biomassa microbica (qCO ₂ x 10 ³ , mg C-CO ₂ mg ⁻¹ Cmic h ⁻¹)	2,02 ±0,36 (a)	2,28 ±0,24 (ab)	2,10 ±0,34 (ab)	2,31 ±0,17 (ab)	2,61 ±0,27 (b)
	Andamento rispetto al controllo	↑/=	=	↑/=	↑
Dosaggio della biomassa microbica (B, mg/Kg)	221,3 ±27,5 (a)	208,9 ±20,2 (a)	234,0 ±38,3 (a)	218,3 ±15,0 (a)	252,3 ±26,4 (a)
	Andamento rispetto al controllo	=	=	=	↑/=
Test dei Micronuclei (M, %)	0,09 ±0,07 (a)	0,07 ±0,05 (a)	0,23 ±0,22 (a)	0,60 ±0,22 (b)	0,33 ±0,21 (ab)
	Andamento rispetto al controllo	=	=	↑	↑

Conclusioni

I risultati ottenuti hanno dimostrato che effettivamente i biotest prescelti risultano sensibili ai trattamenti studiati e, fatto del tutto innovativo, discriminano risposte diverse in funzione del diverso formulato, delle dosi analizzate e delle proprietà intrinseche. A seconda del prodotto esaminato infatti risultano efficaci le dosi ormonali, quelle biostimolanti o quelle nutritive.

Sono state verificate per tutti i formulati analizzati le ipotesi avanzate in partenza riguardo alla potenziale attività di ciascun prodotto: i campioni di fitormoni hanno dimostrato di essere efficaci a dosi inferiori a 0,5 ppm e fortemente tossici e genotossici se addizionati a dosi superiori a quelle di normale utilizzo. Tale risposta permette di individuare l'eventualità di un'aggiunta di fitormoni al formulato. I concimi hanno agito soltanto alle concentrazioni saggiate più alte, mentre i biostimolanti hanno agito già quando addizionati in concentrazione di pochi ppm e non sono risultati mai genotossici.

Il presente lavoro consente di affermare che la matrice di valutazione combinata tra dosi di efficacia e metodologie analitiche scelte risulta essere un metodo affidabile ed efficace nella caratterizzazione di fertilizzanti al fine di evidenziare contemporaneamente le proprietà biostimolanti e/o nutritive e l'eventuale presenza naturale o sanzionabile di fitormoni o sostanze indesiderate. Per le attività fitormonali infatti i metodi fisiologici su plantule si sono rivelati sensibili soprattutto nelle dosi di efficacia tipiche del fitormone, viceversa i test di genotossicità hanno consentito di rintracciarne la presenza ad alte concentrazioni, alle quali essi sono risultati tossici. Particolarmente efficaci sono risultati i test di biochimica microbica per le proprietà biostimolanti propriamente dette: alla luce anche di quanto adottato nel WG4 dell'ISO TC 190 (1997), la presenza del suolo quale substrato colturale non sembra costituire un limite. Infatti negli standard già adottati vengono definiti i parametri e gli intervalli di valori per la scelta di un suolo da ritenersi di riferimento.

Infine la valutazione incrociata tra i diversi biosaggi conferisce alla procedura analitica la solidità del dato. Singolarmente ogni risultato è scientificamente ed analiticamente ripetibile e statisticamente significativo, come confermato dalla copiosa letteratura in tal senso (Metodi di analisi biochimica del suolo, 2004; metodi ISO, 1997), ed il presente lavoro ha dimostrato che tali caratteristiche permangono nell'interpretazione matriciale dei risultati, anzi le risposte ne vengono potenziate e corrette anche a livello interpretativo.

Ringraziamenti

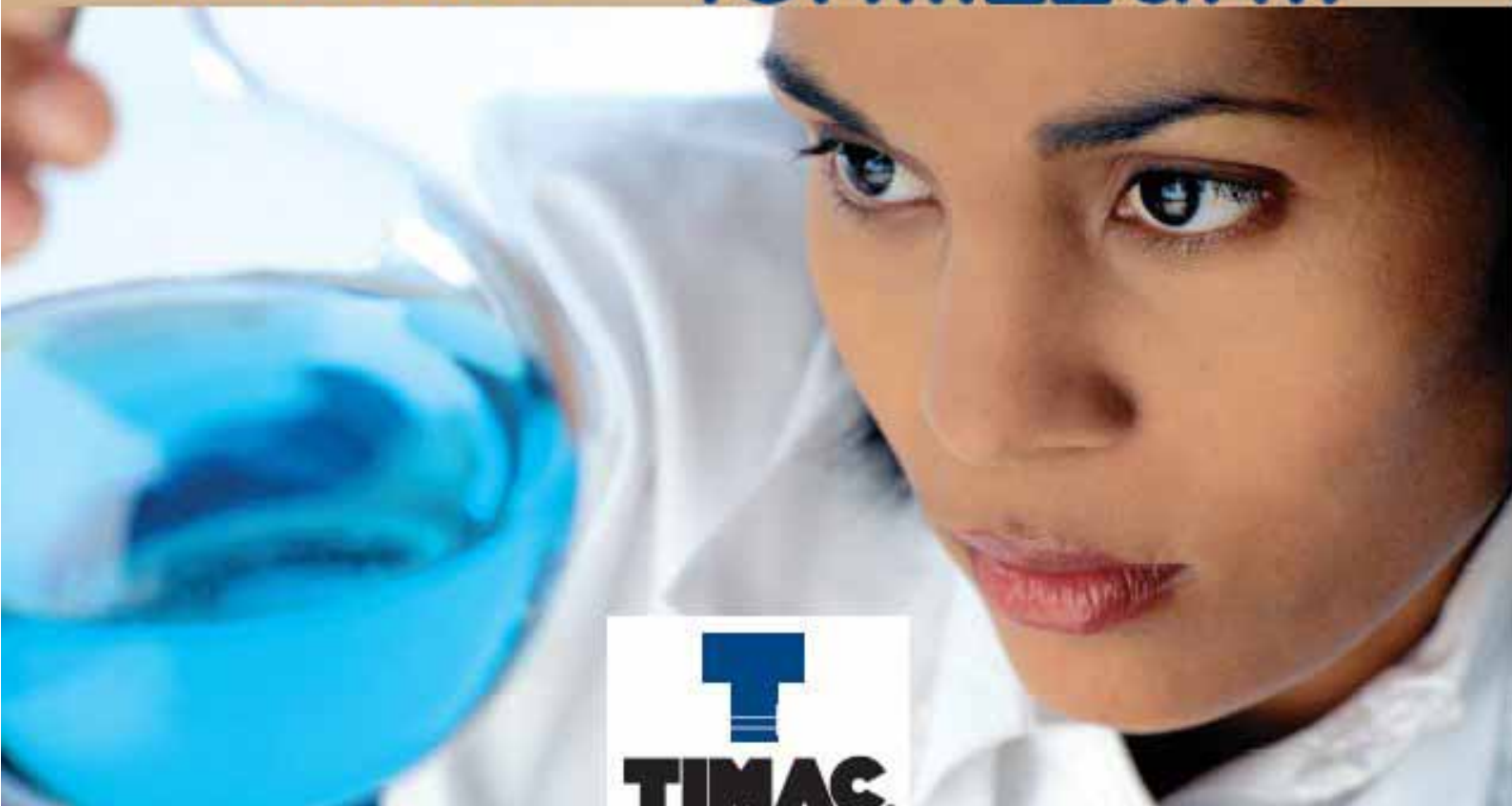
Si ringraziano, la Valagro S.p.A., l'Ilisa S.p.A., la Sicit 2000 S.p.A., la Bonollo S.p.A., la Biolat (LV) e l'Agrobio Products B. V. (NL) per aver gentilmente fornito i prodotti necessari alle analisi.

Bibliografia

- Allievi L., Benedetti A., Pinzari F. 2003. Campionamento, preparazione e conservazione. In: Metodi di Analisi Microbiologica del Suolo (Picci G. e Nannipieri P. Coordinatori). Franco Angeli Ed. Milano pp.1-25.
- Anderson J.P.E., Domsch K.H. 1978. A physiological method for a quantitative measurement of microbial biomass in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 10: 215-221.
- Benedetti A., Brookes P.C., Lynch J.M. 2006. Concluding Remarks. In: *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*. CABI Publishing pp. 63-70.
- Brookes P.C. 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils*, 19: 269-279.
- D.L.vo 29 aprile 2006, n.217. Revisione della disciplina in materia di fertilizzanti. Suppl. ord. alla Gazzetta Ufficiale Serie Generale n. 141 del 20 giugno 2006.
- De Marco A., Boccardi P., De Simone C., Piccolo A., Raglione, M., Testa, A., Trinca, S., 1990. Induction of micronuclei in *Vicia faba* root tips treated in different soils with the erbicide alachlor. *Mutat. Res.*, 241:1-6.
- De Simone C., Piccolo A., De Marco A. 1992. Genotoxic effect induced by erbicides atrazine glyphosate in plants of *Vicia faba* grown in different soil. *The Science of the Total Environment*, 233: 123-124.
- Isermeyer H. 1952. Eine Einfache Methode sur Bestimmung der Bodenatmung und der Karbonate im Boden. *Z Pflanzenernah Bodenkd*, 56: 26-38.
- Ma T. H. 1982. *Vicia* cytogenetic tests for environmental mutagens. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, 99: 257-271.
- Metodi Ufficiali di Analisi Chimica del Suolo 1994. Osservatorio Nazionale Pedologico e per la Qualità del suolo - Ministero delle Risorse Agricole, Alimentari e Forestali - MiRAAF (Roma), Italia.
- Metodi di analisi biochimica del suolo. 2004. Benedetti A. e Gianfreda L. Coordinatori. Franco Angeli Ed. Milano
- Metodo ISO 11269-1 :1993. Soil quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora - Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth.
- Metodo ISO 10381-6 :1993. Soil quality - Sampling - Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- Metodo ISO 14240 - 1 :1997. Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 1: Substrate-induced respiration method.
- Metodo ISO 14240 - 2 :1997. Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2: Fumigation-extraction method



Il futuro dei fertilizzanti



www.timac.it

Attività della Commissione per i metodi di analisi dei fertilizzanti alla luce del D.Lgs. 29 aprile 2006: proposta per l'accertamento di frodi nel settore dei biostimolanti

Giacomo Gagliano*, Rita Maria Maestro

Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali - Ispettorato Centrale Repressione Frodi
Laboratorio Centrale, Via del Fornetto n. 85 – 00149 Roma

* Corresponding author: tel. 06/5534161, Fax 06/55341691; e-mail: icrf.roma.laboratorio@politicheagricole.it

Riassunto

Il Regolamento CE n. 2003/2003 del 13 ottobre 2003 disciplina la commercializzazione e il sistema di controllo ufficiale dei concimi, unificando ed aggiornando le precedenti Direttive CE emanate in materia.

Il Decreto Legislativo 29 aprile 2006, n. 217 (D.Lgs. 217/2006) recante "Revisione della disciplina in materia di fertilizzanti" recepisce tale Regolamento nell'ordinamento giuridico italiano prendendo in esame anche l'attività della Commissione nazionale per l'aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi dei fertilizzanti il cui compito, tra gli altri, è anche quello di validare i metodi di analisi, prima della relativa ufficializzazione.

La validazione è indispensabile poiché il D.Lgs., prevedendo l'uso obbligatorio delle tolleranze di legge in sede di analisi di controllo, stabilisce che le stesse ricomprendano "le variazioni in termini di fabbricazione, campionamento e analisi" e quindi includano le incertezze di misura dei metodi impiegati. Attualmente non è nota l'incidenza delle incertezze di misura dei metodi analitici sulle tolleranze applicate, poiché tutti i metodi di analisi non sono validati e quindi sono sprovvisti di parametri di precisione.

Un'altra novità del D.Lgs., riguarda l'inserimento della categoria merceologica dei "Biostimolanti", per i quali sono ancora allo studio metodi per la valutazione dell'attività di biostimolazione e dei relativi parametri di qualità.

L'ICRF, a tal proposito, ha individuato un metodo analitico per accertare le frodi nel settore dei biostimolanti, che sottoporrà alla Commissione per l'aggiornamento dei metodi ufficiali.

Il metodo prevede la determinazione di p.a. ad azione fitoregolatrice e derivati (13 e più principi attivi) mediante HPLC con detector UV. La conferma strutturale dei p.a. è stata condotta con LC/MS-MS.

Parole chiave: Biostimolante, fertilizzante, fitoregolatore, NAA, NAD.

The activity of new Italian Commission in charge of editing and issuing official methods of fertilizer analysis: a new method of biostimulant check

Abstract

The Regulation 2003/2003/EC of 13 October 2003 deals with fertilizer official control and market, unifying and bringing up to date old issued Directives concerning fertilizers.

Italian law of 20 February 2006, n 82, modifies some prescriptions related to wine market and, at the same time, institutes a new Italian Commission in charge of editing and issuing official methods of analysis that Control Authorities have to apply all over the national territory.

The Legislative Decree n. 217/2006 concerning "New regulation about fertilizers", originates from above-stated new laws, provides renewed tasks for that Commission and establishes changes in updating activities on fertilizers analytical methods. Such new activity involves the validation of these methods, that is the determination of their repeatability and reproducibility.

Testing laboratories can simply assess uncertainty of measurements, when repeatability and reproducibility are known.

This uncertainty is required by testing laboratories for expressing test results and assessing compliance with legal specifications, being requested by legislator for law tolerance assessment.

Another innovation of the Legislative Decree n. 217/2006 consists in the insertion of fertilizer products updating with "Biostimulants", determining new necessity: National Control Bodies need analytical methods able to verify both the absence of added synthetic hormones and the effective biostimulant activity.

Some chemists of Ispettorato Centrale Repressione Frodi Laboratories of Italian Ministry of Agriculture have studied a new analytical method for biostimulant check. This method is based on the research of synthetic phyto-regulators that cannot be added to natural biostimulant composition.

Italian Commission in charge of editing and issuing official methods of analysis will make it official after examination.

This paper describes a simple method for determination of phyto regulators (13 compounds) by High Performance Liquid Chromatography – UV detector. LC/MS-MS has been used to confirm molecular structures of such phyto regulators.

Key words: Biostimulant, fertiliser, phyto regulator, NAA, NAD.

Aspetti normativi e criteri di controllo delle frodi

Il Decreto Legislativo n. 217/2006

Sulla base di quanto espresso dal Regolamento CE 2003/2003 in merito ai concimi CE, il Decreto Legislativo n. 217/2006 riorganizza, aggiornandolo, l'impianto normativo che regola la produzione, la commercializzazione ed il controllo dei fertilizzanti CE e nazionali (concimi, ammendanti e correttivi, prodotti ad azione specifica, substrati di coltura). Con l'entrata in vigore del D.Lgs. 217/2006 (5 luglio 2006), la Legge 19 ottobre 1984 n. 748 è stata abrogata.

Per quanto riguarda i concimi minerali, le differenze normative tra prodotti CE e nazionali è di natura squisitamente legale, in quanto comporta soprattutto alcune differenze nelle regole di etichettatura e, solo in alcuni casi, dichiarazioni aggiuntive rispetto ai corrispondenti concimi CE. Tuttavia, nella sostanza le regole del sistema normativo che gli operatori del settore devono osservare per assicurare l'informazione del consumatore e per consentire la verifica della qualità merceologica da parte degli Organismi di controllo rimangono invariate (a parte quanto espresso nell'articolo 8 relativo alla tracciabilità), sia per i concimi CE che quelli minerali nazionali.

Uno degli elementi di novità del D.Lgs. n. 217/2006 riguarda l'inserimento in legge della categoria merceologica dei "Prodotti ad azione specifica" (Art. 2, comma cc), cioè "i prodotti che apportano ad un altro fertilizzante e/o al suolo e/o alla pianta, sostanze che favoriscono o regolano l'assorbimento degli elementi nutritivi o correggono determinate anomalie di tipo fisiologico", fra i quali sono compresi i prodotti ad azione biostimolante, altrimenti detti semplicemente "biostimolanti". In particolare, all'allegato 6, comma 4. si fa riferimento ai "Prodotti ad azione su pianta" e al punto 4.1 proprio ai "Biostimolanti", la cui funzione agronomica si allontana sensibilmente da quella propriamente conosciuta per un fertilizzante, ed è rappresentata da una numerosa e svariata tipologia di effetti sullo sviluppo vegetativo delle piante, derivanti dalla stimolazione del metabolismo o di non ben specificate funzioni fisiologiche vegetali.

A tale riguardo il D.Lgs. 217/2006, molto opportunamente, impone che "Per tali prodotti è obbligatorio descrivere in etichetta dosi da impiegare e modalità d'uso". Si tratta di una prescrizione molto impor-

tante, tenuto conto che i biostimolanti sono prodotti particolari che esplicano la loro attività a dosi molto più basse rispetto ai tradizionali concimi. Poiché, peraltro, le modalità d'uso possono cambiare in relazione alla specie vegetale, allo stato fenologico della pianta, al clima, ecc., è fondamentale indicare con precisione dosi e modalità d'uso al fine di ottimizzarne il relativo impiego.

Inoltre il D.Lgs. 217/2006 stabilisce che "L'attività biostimolante non deve derivare dall'addizione di sostanze ad azione fitormonale al prodotto". Si tratta di una precisazione chiave in quanto, sebbene sia del tutto chiaro che non si possono in alcun modo aggiungere principi attivi di natura fitormonale, è d'altro canto ragionevole avere utilizzato l'allocuzione "dall'addizione" piuttosto che "dalla presenza", in quanto estratti di origine vegetale possono contenere naturalmente piccole quantità di fitormoni.

I controlli

Il sistema di controllo ufficiale dei prodotti ad azione biostimolante immessi sul mercato, così come per gli altri prodotti fertilizzanti, è basato sulla verifica delle dichiarazioni quantitative e qualitative riportate in etichetta, siano esse obbligatorie o facoltative. Ulteriori controlli sui prodotti riguarderanno la verifica diretta della presenza di fitormoni e la misura dell'attività biostimolante dei prodotti attraverso metodi indiretti.

Le dichiarazioni quantitative consistono nella indicazione della composizione del prodotto (contenuto percentuale di un elemento costitutivo) generalmente espressa, salvo alcuni casi, sul tal quale. Il giudizio di conformità al dichiarato è vincolato all'applicazione della tolleranza di legge specificatamente prevista per ogni dichiarazione quantitativa.

Attualmente sono solo due i biostimolanti previsti dalla legge: l'idrolizzato proteico di erba medica e l'Epitelio animale idrolizzato (Tabella 1). Si tratta di idrolizzati proteici, in un caso di origine vegetale, nell'altro di origine animale, che presentano una caratteristica comune: gli amminoacidi sono i responsabili delle proprietà biostimolanti. Il loro contenuto totale, i contenuti relativi dei diversi amminoacidi, la loro specifica natura chimica e stereochimica condizionano l'efficacia del prodotto.

Tabella 1. Prospetto tecnico dei prodotti ad azione biostimolante riportato nel D.Lgv. n. 217.

Denominazione del tipo	Modo di preparazione e componenti essenziali	Titolo minimo in elementi e/o sostanze utili. Criteri concernenti la valutazione. Altri requisiti richiesti	Altre indicazioni concernenti la denominazione del tipo	Elementi e/o sostanze utili il cui titolo deve essere dichiarato. Caratteristiche diverse da dichiarare. Altri requisiti richiesti.	Note
Idrolizzato proteico di erba medica	Prodotto ottenuto per idrolisi enzimatica di un estratto proteico di erba medica a base di amminoacidi e peptidi	15% C organico 4,5% N organico 28% amminoacidi totali 3,5% amminoacidi liberi		C organico di origine biologica N organico Amminoacidi totali Amminoacidi liberi	Il rapporto: (Alanina + Glicina)/(Prolina + acido glutammico) non deve discostarsi sensibilmente dall'unità Il prodotto presenta proprietà biostimolanti
Epitelio animale idrolizzato (solido o fluido)	Residui di epitelio animale provenienti da concerie e da macelli, idrolizzati con acidi minerali	4% N Azoto valutato come azoto organico, di cui almeno 1% azoto organico solubile 15% C organico Rapporto C/N: non superiore a 6		Azoto organico Azoto organico solubile C organico Rapporto C/N	Peso molecolare medio degli idrolizzati proteici. Rapporto glicina/(prolina+idrossi-prolina)=1,1 Grado di idrolisi sul secco > 330 Amminoacidi liberi > 10% Il prodotto presenta proprietà biostimolanti

I parametri descrittivi della qualità “biostimolante” da riportare in etichetta previsti dalla legge per il momento sono ancora facoltativi e attualmente sono identificabili, nel caso dell'idrolizzato di origine vegetale, esclusivamente nel rapporto di amminoacidi, mentre nel caso dell'idrolizzato di origine animale, nel rapporto di amminoacidi, nel grado di idrolisi, nel contenuto in amminoacidi liberi e nel peso molecolare medio degli idrolizzati proteici. Tutti questi parametri, tuttavia, non descrivono compiutamente il tipo di biostimolazione, né dal punto di vista qualitativo né quantitativo, mentre tale descrizione rappresenterebbe un'informazione utile per il consumatore e per gli Organi di controllo ufficiale, la cui azione è diretta ad assicurare la veridicità di quanto dichiarato in etichetta.

Come è evidente, tra gli elementi e sostanze utili che devono essere dichiarati in via obbligatoria sono riportati i contenuti minimi percentuali degli elementi chimici in forma elementare costitutivi del prodotto che, data la natura del prodotto stesso, un idroliz-

zato proteico, possono assicurare, se rispettati, un'azione nutritiva delle piante, ma non certo una proprietà biostimolante.

L'analisi della situazione normativa attuale sopra descritta denuncia una conoscenza scientifica non ancora consolidata sulla natura dei biostimolanti e sulle categorie di prodotti ad essa riconducibili, ritenendo, probabilmente, della necessità di ulteriori studi ancora molto sentita nei consessi internazionali che si occupano di ricerca nel campo dei fertilizzanti e della fertilizzazione del suolo.

Tenuto conto della complessità dell'attività biostimolante, si ritiene ragionevole potere disporre di metodi indiretti che possano discriminare fra un'azione di tipo ormonale da una di tipo ormono-simile. A tale riguardo sono in fase avanzata d'esame da parte della Sottocommissione Metodi di analisi per i fertilizzanti alcune metodologie molto promettenti per compiere efficacemente tale discriminazione. Tali metodi dovranno rispondere a tutti i parametri di precisione previsti per le tolleranze di legge che devono

essere applicate quando si controllano i titoli di composizione o i parametri di qualità, così come dovranno comprendere le incertezze di misura collegate ai metodi di controllo adottati.

La Sottocommissione Metodi di analisi per i fertilizzanti

In tale contesto tecnico e normativo svolge un ruolo di spicco la Commissione nazionale per l'aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi, e in particolare la Sottocommissione che si occupa dell'emanazione dei metodi analitici per il controllo dei fertilizzanti.

Il D.Lgs. n. 217/2006 rinnova le linee di attività di tale sottocommissione, attribuendole il ruolo di convalida dei metodi di analisi destinati al controllo ufficiale.

Solo metodi validati consentono di assolvere la funzione di emissione del giudizio di conformità alla legge, poiché tali metodi sono corredati dei relativi parametri di precisione, utili per il calcolo dell'incertezza di misura in laboratorio.

L'incertezza di misura applicata al dato analitico riferito, ad esempio, ad un titolo dichiarato in etichetta consente di valutare l'intervallo più probabile (per convenzione al 95%) di variazione del dato analitico stesso.

Se tale intervallo di valori è compreso in quello individuato applicando le tolleranze di legge al valore dichiarato in etichetta, permette di rilevare senza dubbi la regolarità legale o meno di un campione riguardo al parametro analitico controllato, e quindi consente di emettere il relativo giudizio di conformità.

Tale incertezza di misura, inoltre, è un requisito indispensabile per l'accreditamento di un laboratorio di analisi ai sensi della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 ed i laboratori di controllo ufficiale devono essere accreditati nelle prove di loro competenza.

Considerato quanto descritto, la Sottocommissione metodi di analisi dei fertilizzanti potrà ufficializzare un metodo di analisi solo se disporrà dei parametri di precisione del metodo stesso, rappresentando essa stessa un utile strumento per organizzare ed attuare circuiti interlaboratorio aventi il fine di misurare la ripetibilità e la riproducibilità di un metodo di analisi.

I metodi di analisi dei prodotti biostimolanti non si sottraggono all'*iter* sopra descritto prima della relativa ufficializzazione. Analogo discorso vale anche per le sostanze ad azione fitormonale aggiunte fraudolentemente ai prodotti per i quali è dichiarata la relativa proprietà biostimolante. In tal modo, anche se non si verificano tutti gli aspetti merceologici, almeno si realizza una verifica di tipo sostanziale che consente di discriminare con immediatezza i biostimolanti che sicuramente non sono tali, la cui attività dipende unicamente dall'aggiunta di specifici principi attivi non consentiti.

Come è noto, infatti, la legge vieta che detta proprietà biostimolante possa derivare dall'azione di principi attivi non regolati dal D.Lgs. n. 217/2006, ma la cui approvazione e commercializzazione in appositi formulati è soggetta, ai sensi del D.Lgs. n. 194/1995, al regime autorizzativo da parte del Ministero della Salute. L'aggiunta di tali principi attivi simula l'azione biostimolante, che nei prodotti dichiarati come "biostimolanti", invece, dovrebbe essere legata unicamente a meccanismi di azione derivanti dalla natura intrinseca del prodotto, e si configura così come un'adulterazione, se non addirittura come una vera e propria contraffazione del prodotto "genuino", destinato in quanto tale al consumatore finale.

Aspetti analitici

La ricerca dei fitormoni

I principi attivi previsti dal D.Lgs. n. 194/1995 sono compresi in una specifica classe di fitofarmaci, i fitoregolatori, che svolgono un'azione fisiologica di tipo ormonale sulle piante cui sono somministrati, e sono rappresentati da composti quali gli acidi fenossiacetici (2,4 D), fenossipropionici (2,4 DP), indolacetico (IAA), naftalenacetico e relativa ammide (NAA, NAD), naftossiacetico (β NOA), gibberellico (GA3) e altri, tutti elencati nelle liste autorizzate dal Ministero della Salute.

La tecnica analitica più idonea alla separazione e quantificazione di tali principi attivi è la cromatografia ad alta pressione, coadiuvata dalla analisi in Liquido-Massa (LC/MS-MS) per la conferma dell'identità delle molecole in precedenza separate.

L'adozione combinata di tali tecniche consente di ottimizzare i risultati di analisi, sfruttando le potenzialità separative della cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) e la capacità di identificazione dalla spettrometria di massa (MS).

Allo stato attuale è disponibile un metodo di analisi (ICRF, 2006) che sarà sottoposto alla attenzione della Sottocommissione per l'aggiornamento dei metodi di analisi ufficiali, e che consiste nella applicazione dell'HPLC in fase inversa, accoppiata ad un rivelatore UV-Vis, per rivelare la presenza di una serie di molecole fitormoniche: 1-naftolo, acido 3-indoloacetico (IAA), acido 3-indolobutirrico (IBA), diclorprop, thidiazuron, 2-4-5 T (acido 2-4-5 tricloro-fenossiacetico) e paclobutrazol. La fase mobile utilizzata è una miscela acqua acidificata e acetonitrile (55:45 v/v), con un flusso di 1,0 ml/min, attraverso una colonna in fase inversa C18 di lunghezza 25 cm, ID 4 mm, part. size 5 μ m, dotata di precolonna. Il detector, regolato a 220 nm, consente la contestuale individuazione di molteplici fitoregolatori, in quanto caratterizzati dalla presenza di almeno un anello benzenico.

Detti principi attivi si aggiungono alla lista delle sostanze fino ad oggi rilevabili con questa metodologia quali: NAD (ammide dell'acido α -naftalenacetico), NAA (acido α -naftalenacetico), 2,4 D (acido 2,4 diclorofenossiacetico), 2,4 DP (acido 2-(2,4 diclorofenossi) propionico), 2,4 DB (acido 2-(2,4 diclorofenossi) butirrico), MCPA (acido 4-cloro o-tolilossiacetico), β -NOA (acido betanaftossiacetico), 4-CPA (acido 4-cloro fenossiacetico).

Qualora i principi attivi 4-CPA (acido 4-cloro fenossiacetico), MCPA (acido 4-cloro o-tolilossiacetico), 2,4 D (acido 2,4 diclorofenossiacetico), e 4 DB (acido 2-(2,4 diclorofenossi) butirrico) siano presenti in forma esterificata, il metodo consente la loro identificazione come acidi liberi, previa idrolisi basica del campione. I fitoregolatori presenti nel campione da analizzare vengono identificati per confronto con i tempi di ritenzione delle sostanze di riferimento, l'applicazione del metodo delle aggiunte standard, nonché ulteriormente confermati con l'ausilio di un rivelatore LC-MS (ESI, negative mode o positive mode a seconda della molecola da identificare).

Il metodo sopra descritto non è risultato idoneo per rivelare la presenza dell'acido gibberellico e delle gibberelline a causa dell'equilibrio tra la forma dissociata ed indissociata della molecola in funzione del pH del mezzo. È stato pertanto sviluppato un secondo metodo basato sempre sulla cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) in fase inversa, accoppiata però ad un rivelatore UV-Vis PDA, utilizzando come fase mobile una soluzione H₂O:MeOH 70:30 tamponata a pH 3.

Ai fini della quantificazione del fitoregolatore nei formulati commerciali è stata costruita una curva di taratura a 203 nm (λ max dell'acido gibberellico) utilizzando differenti concentrazioni di acido gibberellico standard disciolto nella fase mobile. La curva di taratura ottenuta in seguito a tali diluizioni è risultata soddisfare pienamente la legge di Lambert-Beer.

I prossimi studi sono orientati nella verifica dell'applicazione del metodo per l'identificazione e la conseguente quantificazione dell'acido gibberellico e delle gibberelline nei prodotti "biostimolanti" esistenti in commercio, per i quali l'aggiunta di tali principi attivi non è consentita.

Conclusioni

In conclusione il primo metodo descritto, quello messo a punto in HPLC-RP con detector UV rappresenta una tecnica veloce ed efficiente per rilevare la presenza contemporanea di una molteplicità di principi attivi ad attività fitoregolatrice nei fertilizzanti ad attività biostimolante. Esso infatti non richiede pretrattamento del campione, né step di derivatizzazione

post-colonna e si realizza mediante l'uso di un'apparecchiatura molto diffusa e relativamente economica, prestandosi quindi ad analisi di routine.

Tale metodo si presta ad essere ulteriormente ottimizzato, includendo nuovi principi attivi alla lista delle sostanze che possono essere rivelate.

Le stesse considerazioni possono essere effettuate anche riguardo al secondo metodo, quello messo a punto in HPLC-RP con detector UV-Vis PDA che impiega una tecnica analitica di uso comune nei laboratori di analisi e non presenta rispetto al primo metodo, problemi particolari nella preparazione del campione da analizzare, né particolari accorgimenti da adottare nella fase separativa, se non il cambio di eluente, o nella fase di rivelazione, quali potrebbero essere ad esempio, eventuali derivatizzazione pre- o post-colonna.

In sostanza, i due metodi sopra illustrati nelle linee essenziali, sono stati studiati in accordo con i criteri che la Commissione per l'aggiornamento metodi di analisi dei fertilizzanti generalmente adotta per l'individuazione dei metodi di analisi da ufficializzare: semplicità e velocità di esecuzione, tecniche analitiche di uso comune, chiarezza di interpretazione dei risultati, ed infine costi ragionevoli anche per quanto riguarda l'acquisto dei materiali di consumo.

L'attenzione rivolta verso tali aspetti di natura economica, assume particolare importanza per i Laboratori ufficiali di controllo, quali sono quelli dell'Ispettorato Centrale Repressione Frodi (ICRF), che devono operare in regime di accreditamento in conformità alle regole della UNI CEI EN ISO/IEC 17025.

Il regime di accreditamento, di fatto, comporta differenti costi, a seconda della complessità e della natura delle tecniche analitiche adottate e nello stesso tempo rappresenta una componente non trascurabile dei costi complessivi a carico di un Organismo di controllo ufficiale, le cui operazioni istituzionali di vigilanza presuppongono costantemente un impiego diffuso e diversificato di risorse non solo umane, ma anche tecniche e strumentali.

Bibliografia

- Decreto Legislativo 29 aprile 2006, n. 217. Revisione della disciplina in materia di fertilizzanti. Gazzetta Ufficiale Repubblica Italiana n. 141 del 20 giugno 2006, Supplemento Ordinario n. 152/L.
- Regolamento CE 2003/2003 - Gazzetta Ufficiale UE n. L 304 del 21.11.2003.
- ICRF (2006). Progetto di Ricerca "Individuazione e quantificazione di aggiunte fraudolente di fitormoni e di fitoregolatori nei biostimolanti" - ICRF - Laboratorio di Catania.

ACTIWAVE®

INNOVAZIONE ALLO STATO PURO

- Incrementa la produttività della coltura
- Aumenta l'utilizzo degli elementi nutritivi disponibili nel terreno
- Ottimizza la concimazione minerale
- Favorisce il recupero di piante deboli o stressate



Numero Verde
800-259328

 **Valagro®**
Passion to Advance

