



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE**

**DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA, ANIMALI,  
ALIMENTI, RISORSE NATURALI e AMBIENTE**

**CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE  
PER L'AMBIENTE**

**Effetti di diverse frequenze sonore  
sullo sviluppo morfo-fisiologico di  
plantule di *Beta Vulgaris L.***

**Relatore:** Prof. Giuseppe Concheri

**Correlatore:** Dott. Giovanni Bertoldo

**Laureanda:** Lisa Tasso  
1201897

Anno Accademico 2022/2023



## Indice

Abstract	1
1. Introduzione	3
2. Materiali e metodi	7
2.1 Trattamento con frequenze sonore	7
2.2 Preparazione materiale vegetale	8
2.3 Preparazione della soluzione Hoagland	11
2.4 Analisi morfologiche effettuate	12
2.5 Analisi statistica	14
3. Risultati	15
3.1 Sviluppo delle piante dopo esposizione a timing differenti e trattamenti con musica registrata da strumenti accordati a 432 e 440 Hz	15
3.2 Sviluppo delle piante in ambiente ottimale e in carenza nutrizionale dopo trattamento musicale a 432 Hz e 440 Hz	19
4. Discussione e Conclusioni	22
Bibliografia	25



## **Abstract**

Lo studio è stato condotto su plantule giovani di *Beta Vulgaris* al fine di validare l'effetto morfo-fisiologico di due diverse frequenze sonore distribuite seguendo 4 differenti tempistiche di esposizione alle frequenze sonore stesse. Il trattamento sonoro è stato eseguito mediante specifica apparecchiatura di diffusione sonora.

Le plantule sono state allevate in idroponica per 10 giorni e al termine della crescita in idroponica sono stati valutati diversi parametri di sviluppo radicale, mediante utilizzo del software di analisi immagini WinRHIZO Pro (Reagent instrument Inc.). Sono stati valutati anche gli effetti delle frequenze sonore a livello molecolare, mediante lo studio dell'espressione di alcuni geni legati alla crescita e allo sviluppo della pianta di *Beta Vulgaris L.*

Le analisi hanno evidenziato un effetto positivo delle piante sottoposte a trattamento sonoro, riscontrando un incremento della crescita radicale delle piante trattate, così come dell'attività genica. Nel loro insieme, questi risultati dimostrano un effetto positivo significativo sullo sviluppo delle giovani plantule di *Beta Vulgaris L.*



## 1. Introduzione

L'analisi dei sistemi biologici di percezione degli stimoli fisici ambientali da parte dei vegetali è un campo di studi relativamente giovane, sviluppatosi negli ultimi decenni grazie allo sviluppo di diverse tecnologie in grado di condurre analisi più approfondite, rispetto al passato (Ratnesh et al 2016; Gagliano et al., 2012; Appel et al., 2014).

Le piante in generale, oltre a possedere sistemi complessi di comunicazione di natura chimica, sono anche in grado di tradurre stimoli di natura meccanica, come le vibrazioni prodotti da suoni, e di emettere a loro volta vibrazioni a diversa frequenza, impercettibili all'orecchio umano e in risposta a diversi stimoli ambientali ( Gagliano et al., 2012).

Un numero crescente di prove dimostra che le piante sono in grado percepire suoni di diversa natura e origine (Chowdhury et al., 2014; Mishra et al., 2016).

Tuttavia, a differenza degli animali che sono in grado di esprimere la loro risposta al suono in maniera rapida, le piante reagiscono in un modo molto differente e a volte impercettibile agli occhi degli esseri umani.

È risaputo che la musica apporta rilevanti benefici agli esseri umani e ad alcune specie di animali, ma studi recenti sono stati condotti anche su piante di diverse specie, anche se ci sono diversi pareri contrastanti sull'efficacia della musica nei confronti delle piante (Gullino e Serrano, 2011).

Quello che in genere si osserva è l'aumento delle loro dimensioni, l'incremento del tasso di crescita e una interessante azione di supporto delle risposte immunitarie della pianta, specialmente nei confronti di patogeni fungini (oidio, peronospora, botrite)(Creath e Schwartz, 2004).

Un interessante studio ha dimostrato che la musica tradizionale indiana, ha comportato un incremento colturale in termini di biomassa rispettivamente tra il 25% e il 60% rispetto alle colture non trattate (Gullino e Cerrano, 2017). Nello specifico, sono stati condotti esperimenti su piante di pomodoro esposte a queste melodie ed in termini di crescita, hanno avuto uno sviluppo doppio rispetto a quelle non trattate; si è visto infatti, che le frequenze musicali conferivano una risposta positiva alle piante, andando a stimolare le proteine responsabili dello sviluppo delle stesse, (tra cui il citocromo c).

La ricerca negli ultimi secoli, ha stabilito che le piante sono in grado di rispondere, in maniera differente, a diversi fattori ambientali quali luce, umidità, temperatura e movimenti di natura meccanica (vento, pioggia ecc.).

In particolare, la temperatura viene vista come un fattore ambientale in grado di fornire segnali induttivi e di manutenzione in fase di sviluppo. È in grado di indurre la dormienza dei semi, la vernazione e la germinazione. Molte vie di sviluppo regolate dalla temperatura presentano anche uno stretto legame con l'intensità luminosa. In un ambiente mutevole è fondamentale essere in grado di adattarsi e di acquisire capacità di reagire a complessi ambientali; I recenti progressi hanno dimostrato che all'interno delle cellule vegetali è presente una rete meccanosensoriale specifica per le piante; questa rete è costituita da fitormoni, particolari meccanismi recettivi cellulari, i quali fungono da controller di sviluppo. Tutto ciò può spiegare come le piante sono in grado di percepire numerosi segnali

meccanici tra cui tensioni di crescita, pressione di turgore, potenziale di pressione xilematica e suono.

(Heggie and Halliday, 2005; Telewski, 2006).

Nonostante l'ampia conoscenza biologica di sistemi recettivi chimico-fisici nelle piante, presenti nella cellula vegetale, ad oggi non ci sono conoscenze approfondite sulle proprietà fonorecettive delle cellule vegetali stesse, ma quello che si ipotizza più frequentemente è la presenza di particolari recettori meccanici presenti sulle membrane vegetali che possono essere stimolati da particolari vibrazioni sonore prodotte da diverse fonti sonore presenti nell'ambiente di crescita della pianta. Una volta percepita la vibrazione sonora, il recettore può generare una serie di risposte metaboliche all'interno delle cellule della pianta, che può condizionarne lo sviluppo e la crescita. (Ratnesh et al., 2016)

Le vibrazioni sonore intese come stimolo fisico percepibile della pianta, come già ribadito, sono diventate oggetto di studio solo recentemente. Ciò grazie alle possibili ricadute in agricoltura, per migliorare i rendimenti delle piante coltivate con il minimo impatto ambientale. Molto spesso gli studi in questo giovane settore sono volti a dimostrare che le vibrazioni sono in grado di aumentare l'accrescimento di diverse colture e di conferire una resistenza maggiore contro stress biotici e abiotici.

Uno degli esempi più significativi, studiato da De Luca e Vallejo-Marin, (2013) è il fenomeno della "buzz pollination" : in pratica il polline delle antere viene rilasciato solo attraverso una particolare frequenza prodotta da uno specifico impollinatore mediante il rapido sbattimento delle ali.

Recentemente, è stato pubblicato un report di Appel and Cocroft (2014) che ha dimostrato l'importanza e l'efficacia della comunicazione acustica nelle piante. Nel report pubblicato si è osservato come le piante di *Arabidopsis thaliana* (L.) diventassero più resistenti all'attacco di *Pieris rapae*(L.) (cavolaia minore, insetto dannoso per diverse colture agricole), al quarto stadio larvale grazie all'esposizione di frequenze sonore in risposta all'attività trofica dell'insetto dannoso.

Nell'esperimento si è visto come le piante siano in grado di distinguere differenti tipologie di vibrazione (quali della masticazione, del vento e del canto degli insetti) e per ciascuna reagiscono in maniera differente.

In particolare, si è visto che le vibrazioni causate dalla masticazione degli insetti inducevano la pianta a produrre difese chimiche al fine di difendersi.

Queste tipologie di vibrazioni prodotte dagli insetti rappresentano un nuovo meccanismo di segnalazione a lunga distanza nelle interazioni pianta-insetto .

In natura, è bene ricordare che una delle fonti più significative di energia acustica nell'ambiente di una pianta è la presenza di artropodi associati alla stessa, inclusi parassitoidi, erbivori e predatori (Cocroft e Rodriguez 2005 ).

Questo ha dimostrato l'importanza delle frequenze sonore in chiave adattativa per le piante.

In un altro studio condotto dal Centro di Ricerca Fisico Ingegneria Agraria di Qingdao in Cina, i ricercatori hanno sviluppato una tecnologia a frequenza acustica (AFT) generatrice di vibrazioni sonore a otto livelli, variabili, di frequenza, per migliorare la produzione agricola delle piante trattate con questo sistema.



In particolare, hanno osservato che le piante trattate di cotone esposte al AFT hanno mostrato aumento della crescita e delle dimensioni delle foglie, aumento complessivo dei rami portanti e delle palle di cotone

I risultati dell'esperienza hanno mostrato che rispetto ai siti di controllo, utilizzando la tecnologia a frequenza acustica, l'altezza della pianta trattata di cotone, la larghezza della quarta foglia, rami contenenti le palle di cotone, numero di palle di cotone ed singolo peso di una pallina sono stati aumentati del 1,71%, 5,25%, 1,14%, 9,22% e 3,34%, rispettivamente. Ciò denota un aumento significativo in termini di resa del cotone, con resa media annuale del 12,7% negli ultimi tre anni.(Hou et al., 2010).

È stato condotto un importante esperimento, il quale evidenzia l'applicazione del suono in risposta allo stress da calore e la sua applicazione nell'apprendimento emotivo e associativo per la tolleranza allo stress in *Arabidopsis*.

L'esperimento di condizionamento difensivo ha dimostrato che la pianta impara ad associare la musica allo stress (calore).

HSFA3 e ATCTL1 sono due geni sensibili al calore che hanno un ruolo chiave nella regolazione di una serie di proteine che inducono lo shock termico; essi sono stati utilizzati nell'apprendimento associativo per stress da calore.

L'apprendimento associativo è una forma di apprendimento che agisce in funzione dell'esperienza, in cui diversi elementi sono combinati insieme per produrre un'azione.

Il fine ultimo dietro l'esperimento era quello di dimostrare se le piante fossero in grado di imparare a ricordare ed associare la musica allo stress da calore e ottenere una risposta appropriata misurabile in termini di cambiamenti espressivi nei geni termo-reattivi (Abhishek Bhandawat et al. (2020)).

Gagliano et al.(2012) in un interessante studio su *Zea mais* L., hanno dimostrato una risposta della radice in termini di fototropismo, a diverse frequenze. Hanno osservato che le radici del mais allevato in idroponica sono in grado di crescere verso una sorgente acustica se poste nelle condizioni migliori.

Sempre Mishra et al. (2016) hanno raccolto in una review tutti gli effetti fisiologici principali sulla pianta dopo l'esposizione ad una sorgente sonora.

Gli effetti fisiologici delle vibrazioni sonore a livello cellulare sono così riassunte:

- Alterazione attività antiossidante
- Alterazione flusso di  $Ca^{2+}$
- Modulazione ormonale
- Modificazione del plasmalemma

Il  $Ca^{2+}$  rappresenta uno delle principali vie di trasduzione del segnale all'interno delle piante. In seguito ad uno stimolo, la concentrazione citoplasmatica di  $Ca^{2+}$  aumenta per un breve periodo, facilitando la generazione di risposte ( Hepler, 2005). È stato dimostrato che a seconda della frequenza delle vibrazioni sonore, l'impatto varierebbe, influenzando i canali del  $Ca^{2+}$  e generando specifiche firme del  $Ca^{2+}$ . Questo denota che le piante sono in grado di distinguere tra diversi segnali acustici e nel farlo generano risposte diverse.

I fitormoni sono composti organici sintetizzati da piante e sono in grado di regolare le risposte di crescita nelle piante, che derivano da una rapida divisione/allungamento cellulare. Wang et al. (2003 b) hanno dimostrato attraverso vari studi su *Chrysanthemum* che le vibrazioni sonore sono in grado di accelerare la divisione cellulare modificandone il ciclo cellulare. Oltre ai fitormoni, aumentano anche i livelli di zuccheri solubili e la concentrazione proteica. Il trattamento con vibrazioni sonore è in grado di imitare gli stimoli ambientali che apportano cambiamenti positivi nello stato molecolare-fisiologico delle piante, favorendo così la crescita.

Le proteine costituiscono la maggior parte dei recettori. Per suscitare un evento di trasduzione si può procedere anche attraverso l'alterazione del potenziale di membrana, cioè la tensione attraverso la membrana plasmatica (Trewavas e Malho, 1997) vengono fatti fluire gli ioni all'interno o all'esterno della cellula attraverso canali situati nella membrana plasmatica (Pandey et al., 2007). Devono esserci presenti uno o più recettori associati alla membrana o un meccanismo basato sul potenziale di membrana in maniera tale che una cellula vegetale sia in grado di percepire le vibrazioni. I recenti progressi hanno dichiarato l'esistenza di una rete mecano-sensoriale nelle piante, simile a quella presente nelle cellule animali.

Nel nostro lavoro di tesi, la specie *Beta vulgaris* L. è stata utilizzata come coltura modello su cui condurre lo studio sugli effetti delle frequenze sonore in giovani plantule.

*Beta Vulgaris* L. o Barbabietola da zucchero, è una pianta dicotiledone con ciclo biennale, che nel primo anno di crescita rimane solo allo stadio vegetativo ed accumula zucchero nella radice fittonante, per questo viene coltivata annualmente per la produzione di saccarosio, ma può avere anche altri indirizzi produttivi, in particolare per suoi sottoprodotti, che vengono usati come alimenti per il bestiame e concime.

Predilige un clima prevalentemente temperato; nelle regioni settentrionali italiane la semina avviene in primavera e viene raccolta verso la fine di agosto.

Presenta una radice a fittone con coda del fittone in grado di esplorare verticalmente il suolo per diversi centimetri di profondità (anche fino a 2 metri in condizioni favorevoli), caratteristica che le conferisce una certa tolleranza alla siccità. Generalmente la barbabietola predilige terreni di medio impasto, profondi, permeabili, anche se spesso è coltivata in terreni meno favorevoli.

L'apparato fogliare di barbabietola, specialmente nella fase vegetativa del primo anno, presenta foglie disposte in rosette, direttamente sulla testa della radice. Hanno un picciolo molto sviluppato e lembi fogliari cuoriformi alla base, tondeggianti o affusolate e di color verde intenso.

In questo studio è stato approfondito il comportamento di giovani plantule di *Beta Vulgaris* L. allevate in idroponica in relazione all'esposizione a due diverse frequenze sonore. Lo scopo di questa tesi è stato quello di dimostrare gli effetti positivi o negativi delle vibrazioni sonore sullo sviluppo delle giovani plantule di barbabietola e la loro utilità nel migliorare l'adattabilità della pianta nelle prime fasi di sviluppo, in condizioni di stress abiotico.

Per fare ciò, è stata somministrata ai semi musica eseguita con strumenti accordati a 432 Hz e 440 Hz, e per vagliare meglio gli effetti fisiologici del trattamento musicale si è studiato

anche l'effetto sulla crescita delle stesse plantule esposte a condizioni di carenza nutrizionale di zolfo, elemento essenziale nello sviluppo delle plantule di *Beta Vulgaris L.*

## **2. Materiale e metodi**

### **2.1 Trattamento con frequenze sonore**

Per il trattamento musicale si è predisposto un ambiente, separato ed isolato dall'ambiente circostante, al fine di evitare contaminazioni tra le varie tesi in esperimento.

Il sistema di distribuzione musicale è avvenuto mediante vibrotrasduttore connesso ad un amplificatore audio alimentato a batteria, con sistema lettore di file .mp3.

Il vibrotrasduttore è un particolare strumento e quando riceve degli impulsi elettrici vibra e fa vibrare il materiale su cui è appoggiato, trasmettendogli la sua vibrazione stessa e facendo riprodurre un suono alla superficie stessa.

Nel trattamento musicale applicato ai semi sono state scelte musiche composte da E. Toso utilizzando il pianoforte principalmente, accordato a 432 Hz e 440 Hz. Queste registrazioni musicali sono state controllate e fornite dal compositore stesso, al fine di verificare l'esatta accordatura degli strumenti nella frequenza di riferimento. Il trattamento musicale prevedeva la somministrazione di musica in forma di diverse tracce musicali in formato .mp3 suonate e riprodotte dal vibrotrasduttore per un tempo determinato.

La musica è stata distribuita direttamente ai semi di *Beta Vulgaris L.*; Inizialmente sono stati testati 4 differenti durate di esposizione alla vibrazione sonora, per capire se esisteva un effetto legato alla durata dell'esposizione. Sono stati usati i seguenti timing: 10 minuti, 19 minuti, 28 minuti e 60 minuti.

I timing sono stati scelti confrontando le durate di esposizione testate in altre specie e nell'uomo. I semi di barbabietola sono stati divisi in gruppi e sono stati posti sopra delle garze sterili e distribuiti, attorno al vibrotrasduttore per il tempo prestabilito.

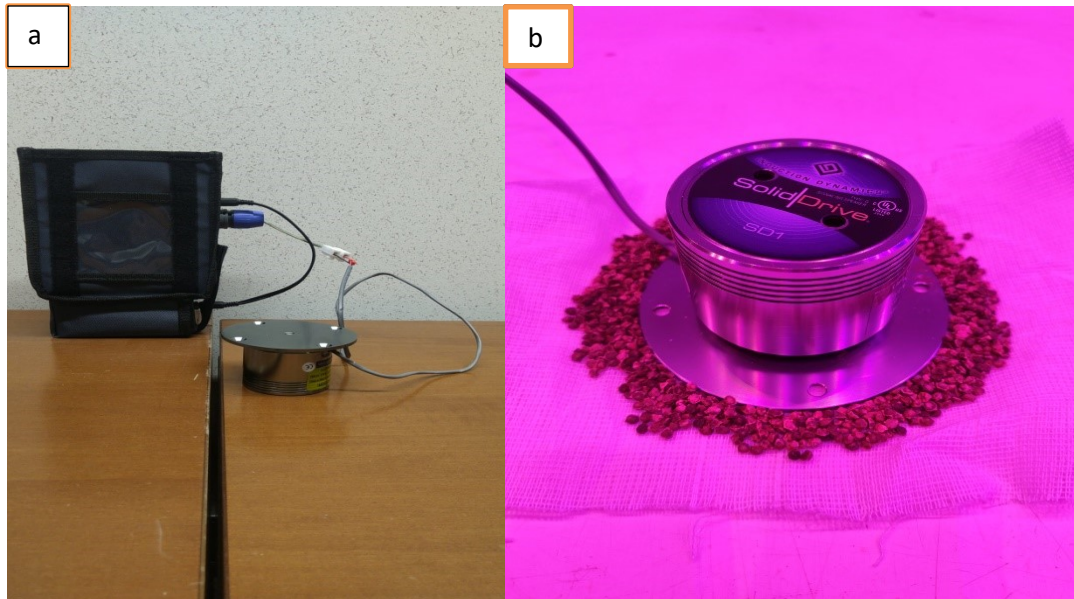


Figura 1- (a) sistema “MAMI VOICE” con relativo vibrotrasduttore e amplificatore. (b) semi di *Beta Vulgaris L.* sottoposti a vibrazione.

## 2.2 Preparazione del materiale vegetale

Una volta eseguito il trattamento musicale, i semi sono stati trasferiti all'interno di un becker da 100 mL ed è stato eseguito un lavaggio con etanolo 75% per 5 minuti.

Una volta terminato il lavaggio è stato rimosso l'etanolo in eccesso e con l'ausilio di una pinzetta sterile sono stati trasferiti 150 semi su carta filtrante pieghettata disposta in apposite vaschette di germinazione: la carta filtrante è stata successivamente inumidita con 50 mL di acqua per vaschetta.

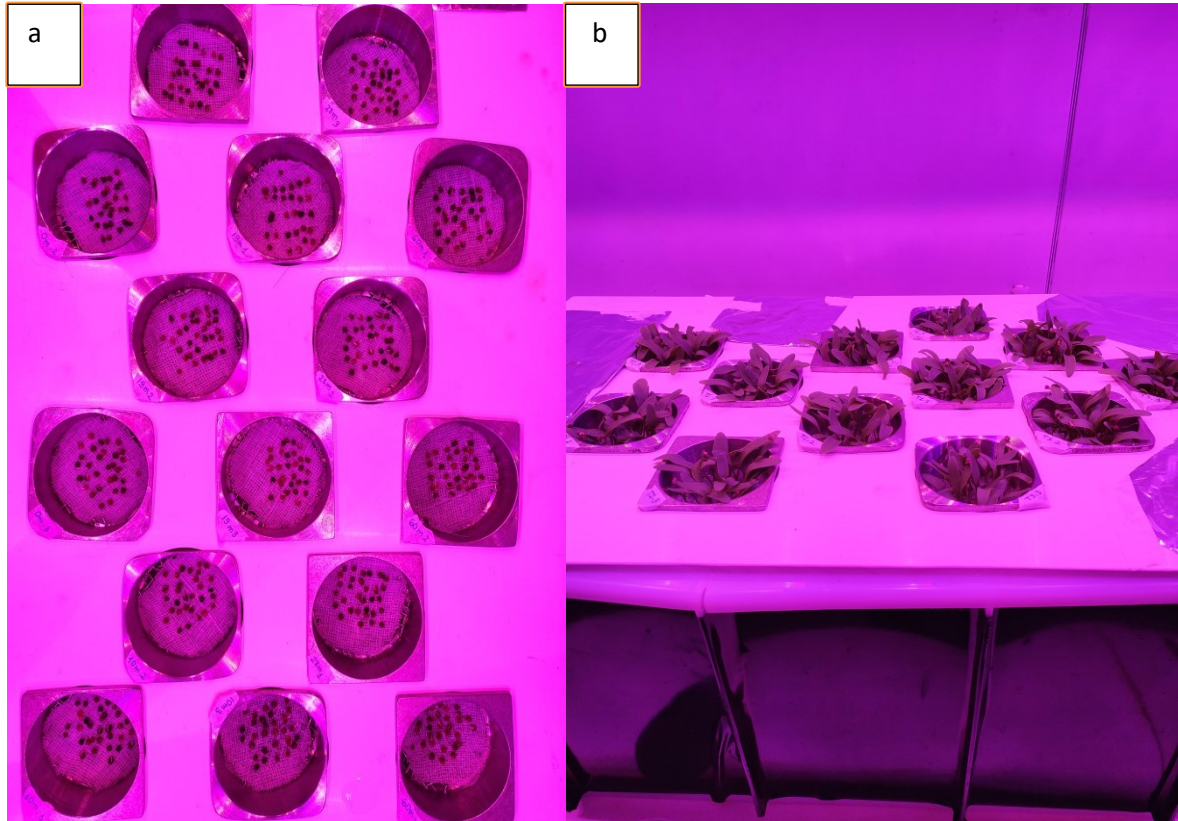
Il tutto è stato riposto in un luogo buio a 24° C per 48h al fine di favorire la rapida germinazione (Figura 2).



*Figura 2- (a) Vaschetta con semi di Beta Vulgaris L.*

Trascorse le 48h si è proceduto con il rimuovere le vaschette dall'ambiente buio e successivamente si è andati a selezionare i semi germinati con radichette di lunghezza omogenea.

Con l'ausilio di una pinzetta sterile sono stati poi collocati in file ordinate all'interno di moduli metallici con griglie metalliche e posti a contatto con la soluzione idroponica per 7 giorni, all'interno di una camera di crescita illuminata con luci LED, seguendo un fotoperiodo di 15 ore di luce e 9 ore di buio, con 24° C costanti e 60% di umidità relativa.



*Figura 3- (a) gerogli all'interno di moduli metallici (b) foto cella climatica con vasca idroponica.*

### 2.3 Preparazione della soluzione Hoagland

La coltivazione in idroponica è una tipologia di coltura che prevede di non utilizzare il terreno come substrato dove far crescere le piante, utilizza bensì soluzioni acquose arricchite con minerali ed elementi nutritivi utili allo sviluppo e alla crescita delle stesse.

Questa tecnica era già conosciuta e praticata, ma è andata ad affinarsi con il tempo.

Nel 1940 Arnon e Hoagland misero a punto una soluzione nutritiva idroponica, conosciuta oggi come soluzione Hoagland, che è una delle più popolari soluzioni artificiali per lo sviluppo delle specie vegetali.

Attraverso le opportune modificazioni alla composizione è possibile ottimizzare la soluzione Hoagland per la crescita di diverse specie vegetali coltivate.

La soluzione idroponica di Hoagland usata in questo esperimento contiene :

- Nitrato di potassio,  $\text{KNO}_3$  5,000 mL
- Nitrato di calcio tetraidrato,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  5,000 mL
- Magnesio solfato eptaidrato,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5,000 mL
- Potassio diidrogeno fosfato,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  o 5,000 mL
- Ammonio diidrogeno fosfato,  $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$
- Acido borico,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,500 mL
- Cloruro di manganese tetraidrato,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,500 mL
- Solfato di zinco eptaidrato,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Solfato di rame pentaidrato,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- Acido molibdico monoidrato,  $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  o
- Sodio molibdato diidrato,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,500 mL
- Tartrato ferrico o Ferro (III)-EDTA o Chelato di ferro ( $\text{Fe-EDDHA}^-$ ) 5,000 mL

Nell'esperimento di allevamento delle giovani plantule di barbabietola in condizioni di carenza di zolfo, quest'ultimo, apportato inizialmente da  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , è stato sostituito da cloruro di magnesio esaidrato ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )

La vasca idroponica utilizzata nel nostro esperimento è rappresentata da un contenitore in polietilene, rivestito di materiale oscurante, correttamente sterilizzato e pulito all'interno al fine di non alterare la soluzione che si sarebbe creata in seguito.

Per l'allevamento delle plantule di barbabietola le vasche idroponiche sono state riempite con 35 litri di soluzione Hoagland.

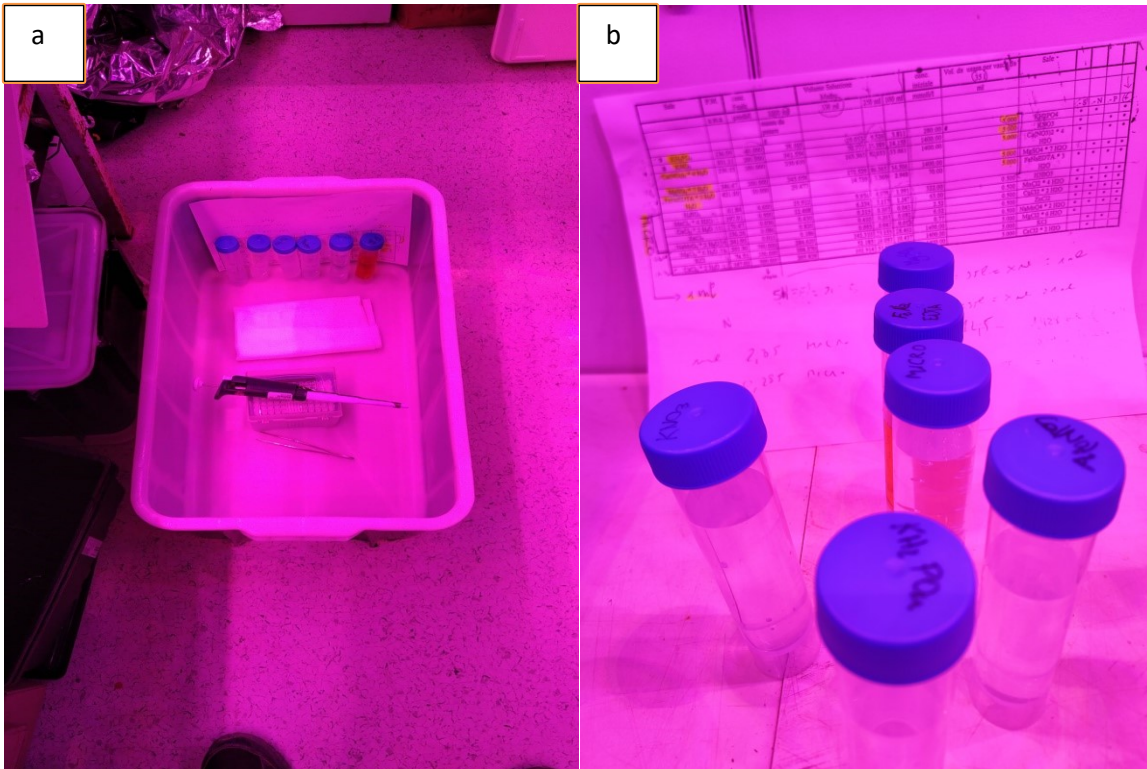


Figura 4- (a) foto vasca idroponica (b) soluzioni madri per la preparazione dell' idroponica di Hoagland

## 2.4 Analisi morfologiche effettuate

I parametri che sono stati valutati nella selezione delle plantule di *Beta Vulgaris L.* sono prettamente di natura morfologica, nello specifico le caratteristiche delle radici.

In particolare, sono stati valutati i parametri di lunghezza radicale totale (cm), lunghezza delle radici fini (cm) e numero totale di apici radicali.

Per fare questo sono state raccolte delle immagini delle radici delle plantule con uno scanner professionale modello STD 1600 ( Regent Instruments, Canada) e analizzate con software di analisi di immagini Winrhizo Pro ver. 2.0.

Tutti i dati raccolti sono stati elaborati statisticamente.



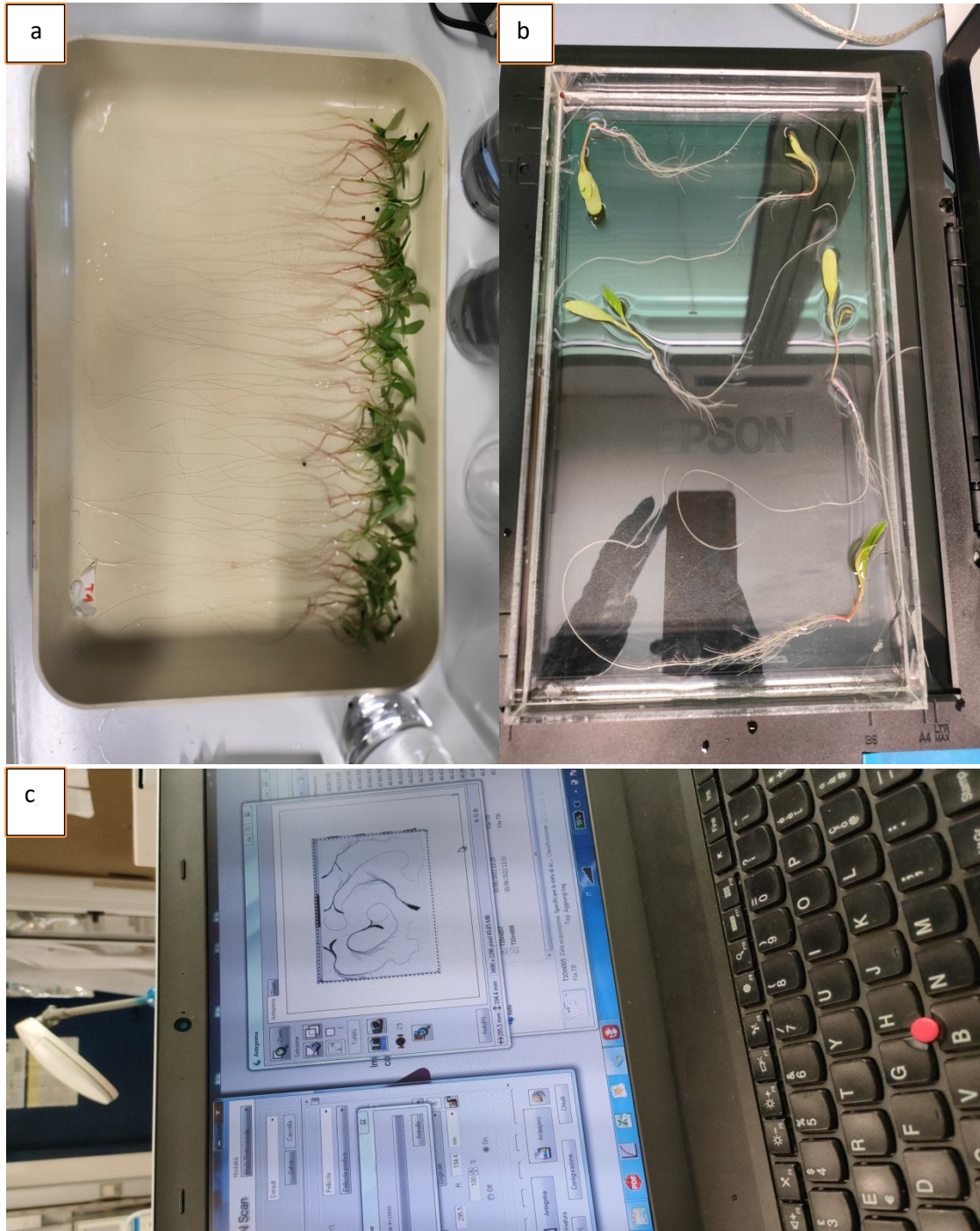
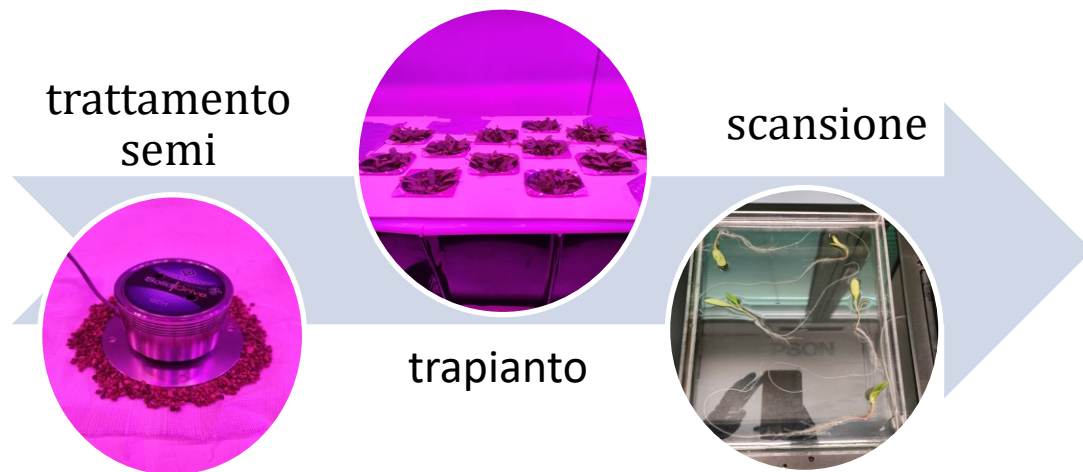


Figura 5- (a) selezione delle plantule di beta vulgaris (b) plantule e scanner (c) utilizzo programma Winrhizo.

## Timeline esperienze



## 2.5 Analisi statistica

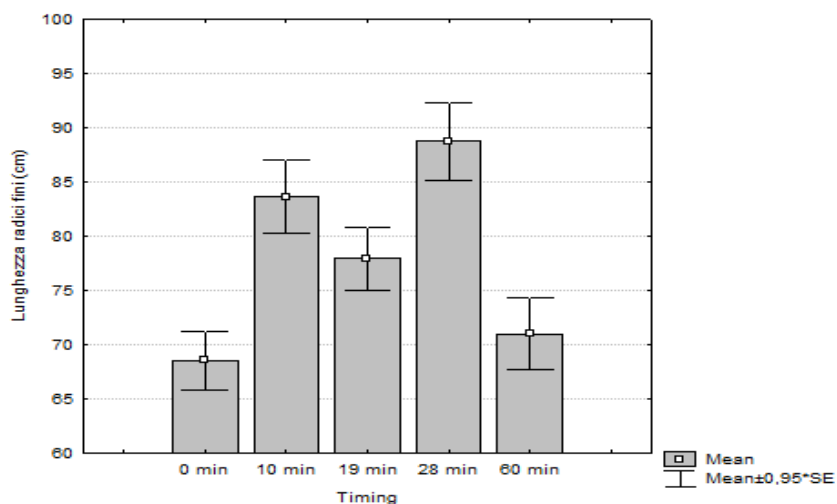
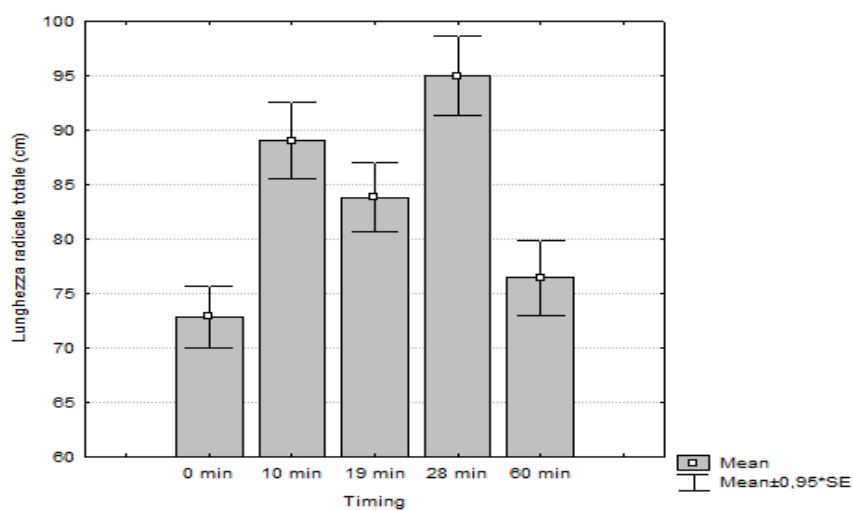
Per ciascuna tesi analizzata morfologicamente, sono stati realizzate 3 repliche biologiche consistenti praticamente in 3 moduli metallici sopra descritti. In ciascun modulo metallico sono state inserite 30 plantule. Ogni tesi sperimentale è stata testata due volte, consecutivamente. I dati staticistici morfologici derivano dall'analisi complessiva di 60 individui. Per le analisi statistiche si è utilizzato Microsoft Excel 365 e Statistica Pro v 13.0 (Tibco software). Ogni parametro morfologico è stato elaborato per media ed errore standard, ed sono state testate differenze significative mediante test ANOVA e post hoc test di Duncan.

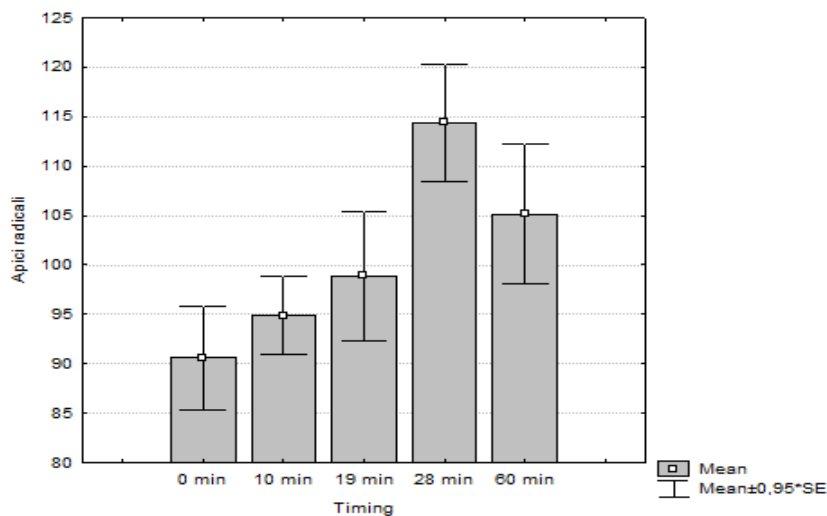
### 3. Risultati

#### 3.1 Sviluppo delle piante dopo esposizione a timing differenti e trattamenti con musica registrata da strumenti accordati a 432 e 440 Hz

Nei grafici di fig.6 sono riportati i risultati del confronto di semi esposti a diversi timing di musica registrata con strumenti accordati a 432 Hz. I grafici riportano i dati morfologici rilevati dopo 8 giorni dal trapianto.

Quello che si nota è che a 28 minuti si ha una maggiore sviluppo delle radici, sia in termini di lunghezza radicale totale che di lunghezza delle radici fini.





**Fig. 6:** Barplots di lunghezza radicale totale (cm), lunghezza delle radici fini (cm) e di numero totale di apici vegetativi per i confronti di esposizione a diversi timing a 432 Hz di semi di piante di barbabietola allevate in idroponica. Ogni barplots rappresenta la media e l'errore standard di ciascun trattamento differente di timing.

Interessante è notare come, rispetto al timing di 0 minuti, che corrisponde al non trattato, tutti gli altri timing sono ben sviluppati, con incrementi significativi. Lo sviluppo si riduce nettamente quando si raggiungono i 60 minuti di esposizione (tab 1).

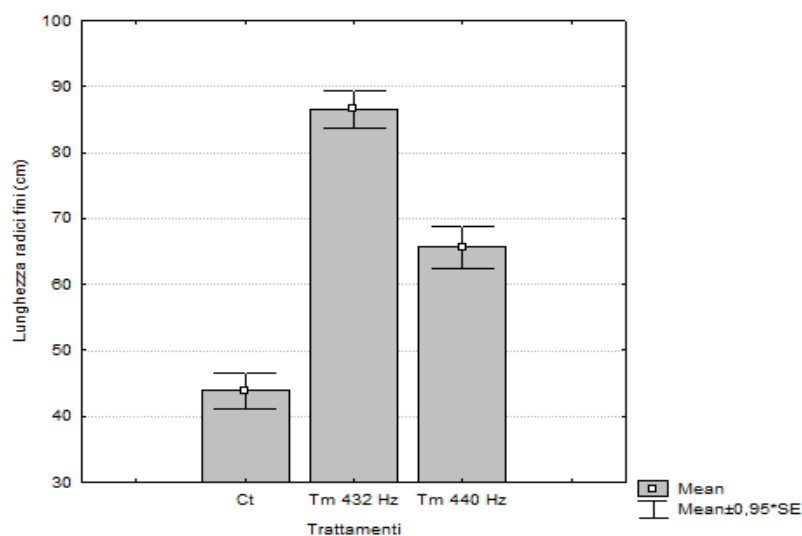
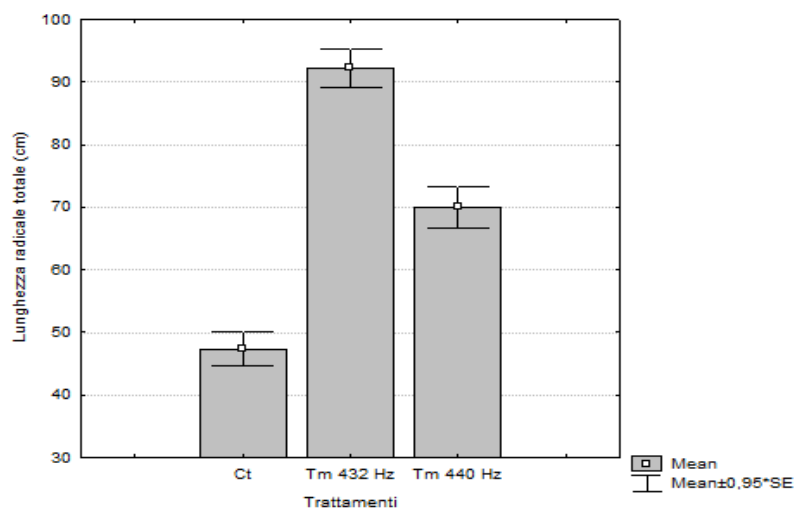
Un altro dato interessante è il numero di apici vegetativi radicali, che ancora una volta si confermano più numerosi dopo 28 minuti di trattamento musicale (+22%).

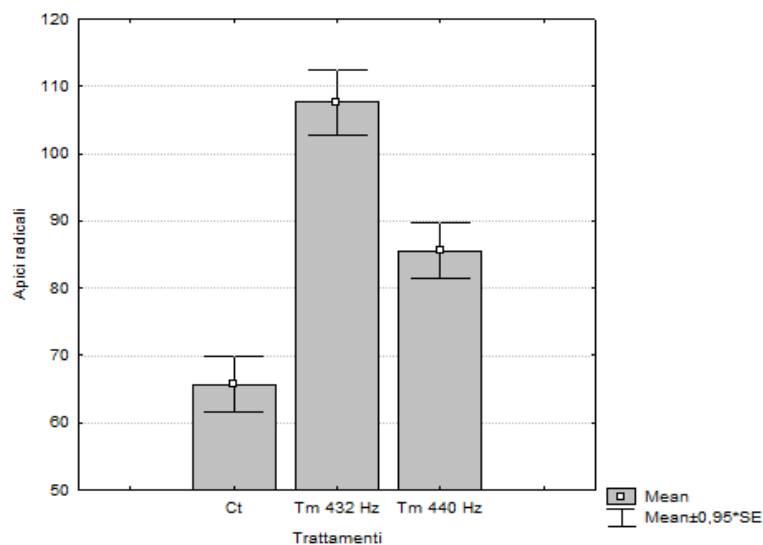
Questi dati, complessivamente, indicano che il miglior sviluppo radicale delle giovani piantine si può ottenere dopo soli 28 minuti di trattamento musicale alla semente, con musica a 432 Hz.

Percentuali di incremento			
Trattamento	Lunghezza radicale totale (cm)	Lunghezza radici fini (cm)	Apici radicali
0 min	-	-	
10 min	22,18	22,04	1,28
19 min	15,02	13,70	11,23
28 min	30,28	29,46	22,08
60 min	4,91	3,59	20,62

**Tab 1.** Percentuali di incremento rispetto al non trattato (0 minuti) dei parametri morfologici valutati nell'esperienza di esposizione della semente a diversi timing.

A seguito di questi risultati, sono stati successivamente condotti esperimenti per confrontare l'effetto di esposizione della semente per 28 minuti, con musica rispettivamente registrata con strumenti accordati a 432 Hz e 440 Hz, usando sempre la stessa sequenza musicale. Nella figura 7 sono riportati i risultati di questo confronto, dal punto di vista morfologico. Come si può estrapolare dai grafici, sia il trattamento a 432 Hz che a 440 Hz hanno avuto effetti positivi sulla morfologia radicale, per i 3 parametri morfologici valutati, con accrescimenti mediamente superiori rispetto al non trattato. Si è riscontrato però uno sviluppo superiore nelle piante derivanti da semente trattata con la musica a 432 Hz rispetto a quelle trattate con 440 Hz, con sviluppo quasi duplicati nei 432 Hz, per quanto riguarda lunghezza radicale totale e lunghezza delle radici fini. Entrambe le frequenze alla fine hanno incrementato lo sviluppo radicale, con un effetto più significativo della frequenza (tab. 2).





**Fig. 7:** Barplots di lunghezza radicale totale (cm), lunghezza delle radici fini (cm) e di numero totale di apici vegetativi per i confronti di esposizione di semi di piante di barbabietola allevate in idroponica, a musica registrata con strumenti accordati a 432 e 440 Hz. Ogni barplots rappresenta la media e l'errore standard di ciascun trattamento.

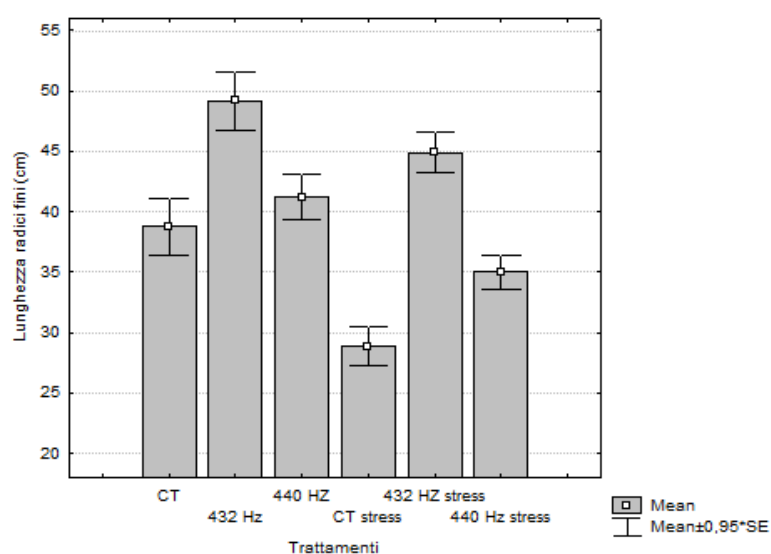
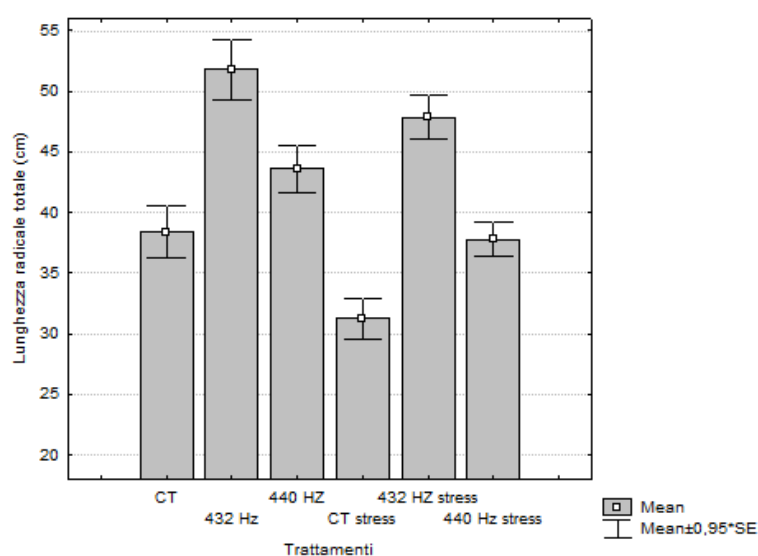
Percentuali di incremento			
Trattamento	Lunghezza radicale totale (cm)	Lunghezza radici fini (cm)	Apici radicali
Ct	-	-	-
Tm 432 Hz	94,65	97,57	64,12
Tm 440 Hz	47,73	49,76	29,79

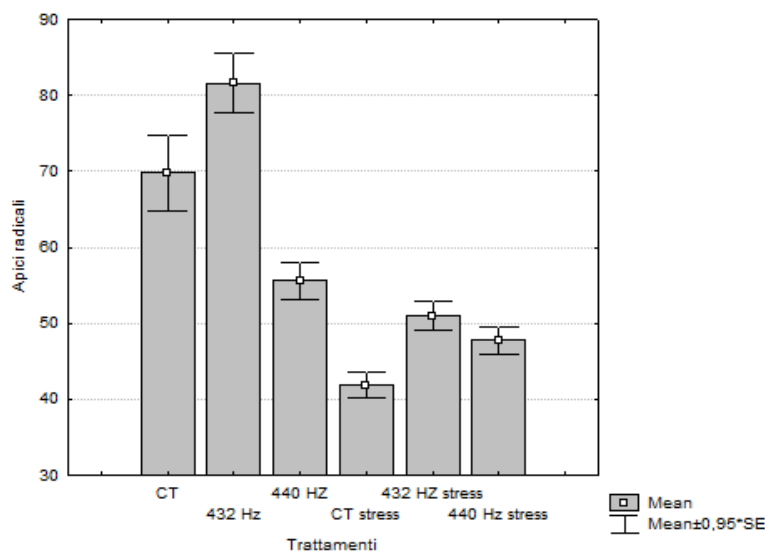
**Tab 2.** Percentuali di incremento rispetto al non trattato ("Ct") dei parametri morfologici valutati nell'esperimento di esposizione della semente a diverse musiche registrate con strumenti accordati rispettivamente a 432 Hz e 440 Hz.

### 3.2 Sviluppo delle piante in ambiente ottimale e in carenza nutrizionale dopo trattamento musicale a 432 Hz e 440 Hz

A seguito dei positivi risultati ottenuti dalla prova di esposizione della semente a diversi timing e a due frequenze diverse (432 Hz e 440), si è proceduto a valutare il comportamento di tali piante trattate in situazioni di carenza nutrizionale.

Nei grafici di fig. 8 sono riportati i risultati del confronto fra piante cresciute per 8 giorni in soluzione idroponica ottimale e di piante sottoposte a carenza nutrizionale nella soluzione idroponica per 48 h.





**Fig. 8:** Barplots di lunghezza radicale totale (cm), lunghezza delle radici fini (cm) e di numero totale di apici vegetativi in risposta all' esposizione di piante di barbabietola, allevate in idroponica, a musica registrata con strumenti accordati a 432 e 440 Hz. Il confronto è stato condotto in piante allevate in condizioni ottimali e in condizioni di carenza di zolfo ("stress"). Ogni barplots rappresenta la media e l'errore standard di ciascun trattamento differente.

I risultati delle piante poste in condizioni ottimali di soluzione idroponica confermano le osservazioni fatte anche negli esperimenti precedenti, dove gli effetti maggiori dal punto di vista dello sviluppo morfologico si hanno nelle piante derivate da semi trattati a 432 Hz. In questo esperimento non si osserva però un aumento importante del numero di apici radicali rispetto agli esperimenti precedenti.

Nella situazione di carenza, è interessante notare come in generale tutti i trattamenti hanno uno sviluppo inferiore rispetto agli omologhi in situazione ottimale. In particolare, si nota il non trattato sottosviluppato in condizioni di carenza rispetto al corrispettivo in condizioni ottimali, che conferma la risposta alla carenza di zolfo delle giovani piantine. Più interessante constatare come i trattati con le due diverse frequenze, in situazione di carenza mantengono comunque uno sviluppo nettamente superiore rispetto al non trattato, sempre in carenza di zolfo.

L'andamento generale dello sviluppo si conferma simile tra le tesi in condizioni ottimali e le tesi in condizione di carenza di zolfo.

In ogni caso, sia il trattamento a 432 Hz che quello a 440 Hz fanno registrare un effetto positivo, anche se l'effetto maggiore si riscontra nel trattamento a 432 Hz.

In condizioni di carenza, l'effetto positivo si attenua se si considera il numero di apici vegetativi radicali, con incrementi percentuali poco vistosi.



Percentuali di incremento			
trattamento	Lunghezza radicale totale (cm)	Lunghezza radici fini (cm)	Apici radicali
CT	-	-	-
432 Hz	34,94	26,85	16,79
440 Hz	13,62	6,32	-20,34
CT stress	-	-	-
432 Hz stress	32,87	33,94	15,62
440 Hz stress	21,04	21,31	14,03

**Tab 3.** Percentuali di incremento rispetto al non trattato (“CT” e “CT stress”) dei parametri morfologici valutati nell’esperimento di comparazione di piante allevate in condizioni ottimali e in condizioni di carenza di zolfo, dopo l’esposizione della semente a diverse musiche registrate con strumenti accordati rispettivamente a 432 Hz e 440 Hz.

#### 4. Discussione e Conclusioni

L'influenza delle vibrazioni sonore, di diversa natura, sullo sviluppo dei vegetali è un campo di studi relativamente recente, dove l'interpretazione degli effetti morfo-fisiologici è ancora oggi oggetto di ampio dibattito tra gli scienziati.

In questa tesi si è tentato di mettere in luce l'effetto delle vibrazioni sonore generate dalla musica registrata con strumenti accordati, rispettivamente, a 432 Hz e 440 Hz.

Gli esperimenti sono stati divisi in 3 parti e ognuno ha messo in evidenza l'influenza positiva di tali vibrazioni sonore sullo sviluppo delle giovani piantine di barbabietola da zucchero, allevate in idroponica.

In particolare, si è visto come ci siano sviluppi morfologici superiori nelle piante trattate sia con 432 Hz che con 440 Hz. Gli incrementi migliori si hanno però con i trattamenti a 432 Hz.

Dal punto di vista biologico e agronomico, risulta estremamente importante avere giovani piantine ben sviluppate nei primi stadi di crescita: questo per consentire alla pianta di affrancarsi bene e di avere la migliore architettura radicale che gli consenta di esplorare in maniera ottimale l'ambiente di crescita, per ricercare i nutrienti. L'aumento degli apici radicali contribuisce a ciò, essendo gli apici radicali la parte della pianta maggiormente coinvolta nell'assorbimento di acqua e nutrienti dal suolo, o dall'ambiente di crescita in cui vengono poste le piantine (*Cochavi et al., 2020; Li et al., 2015*).

Anche il tempo di esposizione risulta importante e nei nostri esperimenti è stato dimostrato che 28 minuti sono sufficienti a creare incrementi anche del 50%. Ci sono altri studi che sostengono che il tempo di esposizione può variare le risposte morfo-fisiologiche, anche se non tutti sono concordi sulle tempistiche. In ogni caso si va da pochi minuti a 24 ore e più ore, con risultati variabili a secondo della specie trattata e del tipo di frequenza sonora. Ad oggi però la comunità scientifica non ha una spiegazione, largamente accettata, sul perché di tale risposta dei vegetali.

In ogni caso è un dato di fatto che nella nostra tesi il tempo di esposizione di 28 minuti a 432 Hz ha sempre provocato una risposta più che positiva. Questo è legato al fatto che il trattamento a 432 Hz induce risposte metaboliche più accentuate rispetto a 440 Hz, anche se occorrono studi più approfonditi per capire effettivamente quale meccanismo fisiologico sta dietro a tali risposte.

Nel nostro studio abbiamo anche osservato le risposte della barbabietola da zucchero allevata in carenza di zolfo, e trattata a 432 Hz e 440 Hz.

Lo zolfo nella barbabietola è importante per garantirne il corretto sviluppo e l'ottimale qualità tecnologica in fase di estrazione dello zucchero. Carenze di zolfo possono comportare perdite di resa molto significative, anche maggiori del 50 % ed avere effetti importanti sia a livello morfologico che molecolare (*Stevanato et al., 2018; Thomas et al., 2003*).

Nel nostro caso, la carenza di zolfo in idroponica ha indotto delle risposte significative in termini di rallentamento dello sviluppo, legate alla diminuita concentrazione nei tessuti di questo elemento, che ne ha provocato il rallentamento della crescita.

Questo però non è avvenuto nelle piante trattate, sia a 432 Hz che a 440 Hz, anche se il trattamento a 432 Hz ha dato dei risultati più importanti. È interessante notare comunque come una stimolazione mediante vibrazioni sonore, anche di diversa natura, sia in grado di dare una risposta positiva anche ad uno stress nutrizionale.

Non ci sono molti studi con cui comparare questi risultati, anche se di recente, in uno studio condotto da *Wang et al. (2022)*, i ricercatori hanno affermato che un trattamento prolungato, di alcune ore, con vibrazioni sonore su *Ipomoea aquatica* (spinacio d'acqua, vegetale diffuso nel sud-est asiatico) hanno ridotto l'accumulo di cadmio, un metallo pesante, a causa delle modificazioni all'architettura radicale indotte dal trattamento musicale.

Nel nostro caso, è probabile che le modifiche positive nella morfologia radicale, indotte dal trattamento musicale, abbiano consentito alla pianta in situazioni di carenza, di mantenere un livello di assorbimento di nutrienti maggiore rispetto al non trattato, garantendo uno sviluppo sufficientemente maggiore, ma comunque non comparabile al corrispettivo trattato in condizioni ottimali. Sono necessarie ulteriori analisi per capire in che modo l'assorbimento degli elementi nutritivi è influenzato da un eventuale trattamento musicale, e se esiste una risposta specie-specifica relativamente a ciò.

In conclusione, questa tesi rappresenta uno studio approfondito sugli effetti morfologici legati a trattamenti con vibrazioni sonore sui vegetali. Lo studio effettuato ha evidenziato l'importanza funzionale di questi trattamenti, non solo in chiave morfologica, ma anche in chiave ecofisiologica, dimostrando pure una certa valenza nell'indurre, in barbabietola di zucchero allevata in idroponica, una certa tolleranza a carenze nutrizionali.

Possiamo affermare, dunque, che questa tesi può aggiungere ulteriore conoscenza pratica sugli effetti morfo-fisiologici delle vibrazioni sonore emesse da strumenti accordati a 432 Hz e 440 Hz, che sono le più comuni frequenze di riferimento per l'accordatura, in ambito musicale.

Comunque, lo studio degli effetti biologici delle vibrazioni sonore sui vegetali, e le implicazioni pratiche di essi, sono una materia relativamente giovane, soggetta ancora ad un ampio dibattito nella comunità scientifica. Sono necessari ulteriori studi, anche con tecniche di indagine molecolare sempre più raffinate, per indagare quali sono gli effetti conclamati delle vibrazioni sonore sui vegetali e da cosa dipendono, per poter poi mettere a punto tecnologie che possano rendere funzionali, anche in ambito agronomico, tali conoscenze.



## Bibliografia

1. Ratnesh C. M., Ritesh G., Hanhong B., “Plant acoustics: in the search of a sound mechanism for sound signaling in plants”, *Journal of Experimental Botany*, **2016**, 67, 4483–4494
2. Gagliano M., Mancuso S., Robert D. “Towards understanding plant bioacoustics”. *Trends in Plant Science June*, **2012**, Vol. 17, No. 6
3. Appel, H.M., Cocroft, R.B. “Plants respond to leaf vibrations caused by insect herbivore chewing”. *Oecologia*, **2014**, 175, 1257–1266
4. Chowdhury, M.E.K., Lim, H.-S., Bae, H., “Update on the effects of sound wave on plants”. *Res. Plant Dis.* **2014**, 20, 1–7
5. P. Gullino, S. Cerrano. “Piante Edibili, Piante Incredibili, Piante innovative”, **2017**, Vol. II
6. Creath k. & G. E. Schwartz. “Measuring effects of music, noise, and healing energy using a seed germination bioassay”, *J. Alt. And Complementary Medicine*, **2004**, vol. 10(1), pp. 113-122
7. Heggie I Halliday KJ . “Gli alti e bassi della vita vegetale: temperatura e interazioni luminose in fase di sviluppo” . *Giornale internazionale di biologia dello sviluppo* , **2005** , 49 , 675 – 687
8. Telewski FW. “A unified hypothesis of mechanoperception in plants”. *Am J Bot.*, **2006**, Oct;93(10):1466-76
9. De Luca PA, Vallejo-Marín M. “What’s the ‘buzz’ about? The ecology and evolutionary significance of buzz-pollination”, *Current Opinion in Plant Biology*, **2013**, 16:1–7
10. Cocroft RB, Rodríguez RL ,“L'ecologia comportamentale della comunicazione vibrazionale degli insetti”, *Bioscienze* ,**2005**, 55: 323–334
11. Hou TZ, Li BM, Wang W, Teng GH, Zhou Q, Qi LR, Li YF. “Influence of acoustic frequency technology on cotton production”. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, **2010**, 26, 170–174
12. Abhishek Bhandawat , Kuldip Jayaswall , Himanshu Sharma & Joy Roy , “Sound as a stimulus in associative learning for heat stress in Arabidopsis”, *Communicative & Integrative Biology*, **2020**, 13:1, 1-5
13. Hepler PK , “Calcio: un regolatore centrale della crescita e dello sviluppo delle piante” . *Cellula vegetale*, **2005**, 17 , 2142 – 2155
14. Jia Y Wang AVANTI CRISTO Wang XJ Duano CR Yang XC. “Effetto della stimolazione sonora sulla crescita delle radici e sull'attività del plasmalemma H<sup>+</sup>-ATPasi del crisantemo ( *Gerbera jamesonii* )” . *Colloidi e Superfici B-Biointerfacce*, **2003**, 27 , 65 – 69

15. Trewavas AJ Malho R. “Percezione e trasduzione del segnale: l'origine del fenotipo” . *Cellula vegetale*, **1997**, 9 , 1181 – 1195
16. Pandey S Zhang W Assmann SM . “Ruoli dei canali ionici e dei trasportatori nella trasduzione del segnale delle cellule di guardia” . *Lettera FEBS* , **2007**, 581 , 2325 – 2336
17. Beta vulgaris, “The Plant List”, **2010**, Version 1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/>; accesso in rete 01/01/2023
18. Arnon, D.; Hoagland, D. « Crop production in artificial culture solutions and in soils with special reference to factors influencing yields and absorption of inorganic nutrients”. *Soil Science*, **1940**, 50, 463–485.
19. Thomas, S.G.; Hocking, T.J.; Bilsborrow, P.E. “Effect of Sulphur Fertilisation on the Growth and Metabolism of Sugar Beet Grown on Soils of Differing Sulphur Status”. *Field Crops Research*, **2003**, 83, 223–235
20. Li, X.; Zeng, R.; Liao, H. “Improving Crop Nutrient Efficiency through Root Architecture Modifications”. *Journal of Integrative Plant Biology*, **2016**, 58, 193–202
21. Stevanato, P.; Broccanello, C.; Moliterni, V.M.C.; Mandolino, G.; Barone, V.; Lucini, L.; Bertoldo, G.; Bertaggia, M.; Cagnin, M.; Pizzeghello, D.; et al. “Innovative Approaches to Evaluate Sugar Beet Responses to Changes in Sulfate Availability”. *Frontiers in Plant Science* ,**2018**, 9
22. Cochavi, A.; Cohen, I.H.; Rachmilevitch, S. “The Role of Different Root Orders in Nutrient Uptake”. *Environmental and Experimental Botany*, **2020**, 179, 104212
23. Wang, S.; Shao, Y.; Duan, J.; He, H.; Xiao, Q. Effects of Sound Wave and Water Management on Growth and Cd Accumulation by Water Spinach (*Ipomoea Aquatica* Forsk.). *Agronomy* **2022**, 12, 2257