

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE NATURALI E
AMBIENTE
TERRITORIO E SISTEMI AGRO-FORESTALI

Corso di laurea magistrale in Scienze e Tecnologie Agrarie

Effetti dell'applicazione di biostimolanti fogliari sulla tolleranza allo stress idrico in *Arabidopsis thaliana* e *Vitis vinifera* cv. Sauvignon Blanc

Relatore

Dott. Franco Meggio

Correlatore

Prof.ssa Silvia Quaggiotti

Prof. Benedetto Ruperti

Laureando

Pierluca Balsamo

Matricola n. 2014630

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Sommario

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUZIONE.....	3
1.1. Cambiamenti climatici e impatto sulle colture agrarie	3
1.2. Biostimolanti: definizioni e normativa europea.....	8
1.3. Idrolisati proteici (PHs) e derivati di lieviti inattivati	10
1.4. Casi studio sull'utilizzo di biostimolanti su <i>Arabidopsis thaliana</i> e altre specie modello.....	14
1.5. Casi studio sull'utilizzo di biostimolanti in <i>Vitis vinifera</i>	20
2. SCOPO DELLO STUDIO	22
3. MATERIALI E METODI.....	23
3.1. Caso studio su <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
3.1.1 Descrizione schema sperimentale e obiettivi	23
3.1.2 Materiale vegetale adoperato	24
3.1.3 Protocollo di fenotipizzazione	25
3.1.4 Quantificazione della distribuzione del perossido di idrogeno	25
3.1.5 Valutazione espressione genica di RAB18	25
3.2. Caso studio su <i>Vitis vinifera</i> (Legnaro)	26
3.2.1 Descrizione schema sperimentale e obiettivi	26
3.2.2 Trattamenti effettuati	27
3.2.3 Materiale vegetale adoperato	28
3.2.4 Misurazione del potenziale idrico	29
3.2.5 Misurazione della conduttanza stomatica	31
3.2.6 Determinazione del contenuto dei pigmenti fogliari.....	33
3.2.7 Monitoraggio della crescita e area fogliare.....	34
3.2.8 Rilevazione indici di maturazione delle bacche.....	35
3.3. Caso studio su <i>Vitis vinifera</i> (Az. Cescon, Chiarano).....	35
3.3.1 Descrizione schema sperimentale e obiettivi	35
3.3.2 Contenuto idrico volumetrico del suolo.....	36
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	36
4.1. Caso studio Legnaro	36
4.1.1 Area fogliare	36
4.1.2 Lunghezza germogli	37
4.1.3 Conduttanza stomatica ed efficienza del PSII.....	39
4.1.4 Potenziale idrico	41
4.1.5 Peso unitario bacca e peso grappoli	43
4.1.6 Maturazione.....	43
4.2. Caso studio di Chiarano.....	44
4.2.1 Contenuto idrico volumetrico (VWC)	44
4.2.2 Pigmenti e indici fogliari	45
4.2.3 Conduttanza stomatica e PSII.....	50
4.2.4 Potenziale idrico fogliare di mezzogiorno (MIDDAY) e dello stelo (STEM)	52
4.2.5 Peso 100 bacche e peso totale grappoli	53
4.2.6 Maturazione.....	54
5. CONCLUSIONI.....	55
6. BIBLIOGRAFIA	56

Riassunto

Questo studio ha avuto come principale obiettivo l'osservazione degli effetti di alcuni biostimolanti ad applicazione fogliare nella specie modello *Arabidopsis thaliana* ed in *Vitis vinifera*, varietà Sauvignon-Blanc e Glera. Lo schema messo a punto per le analisi sulla tolleranza allo stress idrico è stato calibrato su *A. thaliana* e poi adattato per la successiva sperimentazione su vite. L'esperimento sulla specie modello è stato condotto in camera di crescita ed ha previsto l'uso di 5 differenti trattamenti fogliari a base di formulati di derivati di lieviti inattivati. Lo stress idrico è stato indotto utilizzando il metodo gravimetrico, mantenendo il contenuto idrico del substrato di crescita al target del 30% della sua capacità di campo (CC). Le tesi di controllo, invece sono state mantenute al di sopra del 80% della CC. Le risposte fisiologiche delle piante sono state monitorate tramite misurazione della conduttanza stomatica (g_s). L'attività di crescita è stata quantificata con la piattaforma di fenotipizzazione Phenotiki. I potenziali danni ossidativi a carico delle foglie sono stati determinati tramite la determinazione della distribuzione del perossido di idrogeno. Infine, è stata condotta una valutazione dell'espressione genica di RAB18, un gene conosciuto la cui attività è correlata agli stress abiotici. Per quanto riguarda l'esperimento su vite, condotto nell'az. Agraria Lucio Toniolo, un numero di 160 viti in vaso sono state poste in condizioni semi-controllate (tunnel) e cresciute verticalmente con due soli germogli. Le viti sono state suddivise in 4 tesi, utilizzando uno schema a 4 blocchi randomizzati e trattate con due prodotti biostimolanti forniti dalla ditta Lallemand, Lalvigne™ Resiliens e Lalvigne™ ProHydro. Le altre due tesi sono state composte dal trattamento combinato dei due prodotti prima menzionati e da un controllo non trattato. Dopo il germogliamento, la crescita delle viti è stata monitorata mediante misure settimanali della lunghezza dei germogli e dell'area fogliare. In pre-invasatura, invece, è stato impostato un esperimento di stress idrico controllato: per ogni tesi, 4 blocchi da 5 viti sono state sottoposte a condizioni di graduale riduzione del contenuto idrico del substrato a partire dalla condizione di controllo (WW) superiore all'80% della CC fino al 30% della CC. Le risposte fisiologiche in risposta allo stress idrico sono state valutate mediante misurazione della conduttanza stomatica e del potenziale idrico fogliare. Nelle fasi della vendemmia, è stato indagato il potenziale impatto dei prodotti sulla qualità delle bacche, determinando il contenuto zuccherino (°Brix) e l'acidità titolabile. Le analisi si sono completate con il peso unitario bacca, il peso dei grappoli ed il numero delle bacche prodotte dalla tesi a confronto, per un riscontro sulla percentuale di allegagione. In entrambi i casi studio le misurazioni sono avvenute prima, durante e dopo (recovery) l'induzione dello stress idrico. Nel caso studio di pieno campo, sono state valutate le performance delle tesi trattate esclusivamente con il prodotto Lalvigne™ ProHydro. Per quanto concerne il potenziale idrico, è stato possibile valutare sia il potenziale di midday che dello stem, ed è stato eseguito il monitoraggio dei pigmenti fogliari (clorofille totali, flavonoli, antocianine) e dell'indice fogliare NBI. Dai risultati ottenuti, si è avuto riscontro di come lo stress idrico incida sui parametri di accrescimento delle piante e di come, in certi casi, i prodotti possano contribuire a mitigarne parzialmente gli effetti negativi. Risultati incoraggianti sono invece emersi sullo stimolo allo sviluppo dell'area fogliare, sulle prestazioni nelle fasi successive al periodo di *recovery* e sul bilanciamento del tenore di zuccheri e dell'acidità titolabile delle piante trattate. Tuttavia, è necessario effettuare nuove indagini, cercando di limitare la variabilità ambientale, che spesso ha inciso fortemente sulle analisi statistiche condotte.

Abstract

The main objective of this study was to observe the effects of some biostimulants with foliar application in the model species *Arabidopsis thaliana* and in *Vitis vinifera*, variety Sauvignon-Blanc and Glera. The scheme developed for water stress tolerance analysis was calibrated on *A. thaliana* and then adapted for subsequent experimentation on grapevine. The experiment on the model species was conducted in the growth chamber and involved the use of 5 different foliar treatments based on inactivated yeast derivative formulations. Water stress was induced using the gravimetric method, maintaining the water content of the growth medium at the target of 30 percent of its field capacity (CC). Control theses, on the other hand, were maintained above 80% of CC. Physiological responses of the plants were monitored by measurement of stomatal conductance (gs). Growth activity was quantified with the Phenotiki phenotyping platform. Potential oxidative damage to leaves was determined by determination of hydrogen peroxide distribution. Finally, an evaluation of gene expression of RAB18, a known gene whose activity correlates with abiotic stresses, was conducted. As for the experiment on grapevine, conducted in the az. Agraria Lucio Toniolo, a number of 160 potted vines were placed in semi-controlled conditions (tunnel) and grown vertically with only two shoots. The vines were divided into 4 theses using a randomized 4-block scheme and treated with two biostimulant products supplied by the company Lallemand, Lalvigne™ Resiliens and Lalvigne™ ProHydro. The other two theses consisted of the combined treatment of the two products mentioned before and an untreated control. After budding, vine growth was monitored by weekly measurements of shoot length and leaf area. In pre-sprouting, on the other hand, a controlled water stress experiment was set up: for each thesis, 4 blocks of 5 vines were subjected to conditions of gradual reduction of substrate water content starting from the control condition (WW) above 80% CC to 30% CC. Physiological responses in response to water stress were evaluated by measuring stomatal conductance and leaf water potential. At harvest stages, the potential impact of products on berry quality was investigated by determining sugar content (°Brix) and titratable acidity. The analyses were completed with berry unit weight, bunch weight and number of berries produced by the thesis being compared, for feedback on fruit set percentage. In both case studies, measurements were taken before, during and after (recovery) the induction of water stress. In the open field case study, the performance of theses treated exclusively with the product Lalvigne™ ProHydro was evaluated. With regard to water potential, both midday and stem potential could be evaluated, and monitoring of leaf pigments (total chlorophylls, flavonols, anthocyanins) and leaf NBI index was performed. From the results obtained, there was evidence of how water stress affects plant growth parameters and how, in some cases, products can help to partially mitigate its negative effects. Encouraging results, on the other hand, have emerged on stimulating leaf area development, performance in the stages following the *recovery* period, and balancing the sugar content and titratable acidity of treated plants. However, new investigations need to be carried out, trying to limit environmental variability, which often greatly affected the statistical analyses conducted.

1. Introduzione

1.1. Cambiamenti climatici e impatto sulle colture agrarie

I fattori del cambiamento climatico che maggiormente possono avere un impatto sulla produttività delle colture, sia a livello globale, quanto a livello locale, sono molto diversificati e l'approccio di studio complesso. Se infatti si è solito pensare al cambiamento climatico come ad un evento negativo e preoccupante per i possibili danni all'agricoltura e alla *food security*, in letteratura la posizione è stata sempre critica e spesso si sono ipotizzati effetti positivi in controtendenza, anche se questa evidenza si è osservata soprattutto nelle economie maggiormente sviluppate. Infatti ci sono pubblicazioni in cui, tramite costruzione di modelli statistici che mettono in relazione le variazioni delle rese osservate di dieci colture economicamente rilevanti con dati climatici annuali registrati dagli anni 1974 al 2008, si sono proposte oscillazioni negli anni più recenti che rientrano in un range dal -13.4% (palma da olio), fino ad un +3.5% (soia). Il trend più preoccupante però è stato l'osservazione in un decremento globale annuale delle calorie disponibili derivate da riso, frumento e mais pari ad un 0.4%, 0.5% e 0.7% rispettivamente, andando a delineare uno scenario in cui il clima abbia già impattato sulla produttività dei sistemi agricoli (Ray et al., 2019). Modelli di previsione della metà dello scorso decennio, illustravano come fosse necessario adottare sempre una metodologia integrativa quando si applicano stime sulla *food security* e sugli impatti ambientali sulla produttività delle colture, nel caso specifico considerando l'interazione tra modelli di agricoltura globali, scenari di cambiamento climatico standardizzati e modelli produttivi per le principali colture che garantiscono il soddisfacimento dei consumi.

Effetti negativi sulla produttività dovuti al cambiamento climatico causerebbero aumenti di prezzi, ricerca di nuovo suolo arabile, riallocazione delle risorse nel mercato e contrazioni nei consumi, impattando maggiormente sulle zone rurali e più povere (Nelson et al., 2014). Anche la maggiore variabilità del clima e la superiore frequenza di eventi meteorologici estremi quali ondate di calore, siccità, inondazioni, tempeste, deve essere monitorata in un'ottica globale. Sono proprio questi, infatti, i parametri che influenzano direttamente *la food security* e sono proprio le regioni del mondo in via di sviluppo e con economie soprattutto basate sull'attività agricola che dovranno fronteggiare le sfide maggiori, in quanto sono quelle che presentano il tasso di crescita della popolazione più elevato. In questo scenario, è necessario ampliare i sistemi di previsione degli eventi meteorologici estremi e dei loro impatti sul tessuto sociale e produttivo, implementare sistemi di monitoraggio a livello locale e promuovere l'aggiornamento tecnico, pianificare sistemi di protezione della sicurezza alimentare e delle economie più vulnerabili, potenziare il flusso di conoscenza e comunicazione tra mondo scientifico e decisori politici a livello locale e nazionale (Thornton et al., 2014). In uno studio pubblicato da Vogel et al. (2019), si mostra come l'impatto globale del cambiamento del clima su quattro colture molto importanti per il mercato come soia, mais, riso e frumento, spieghi dal 20% al 49% della variabilità delle anomalie di resa, in base alla coltura considerata, e che il 18-43% sia attribuibile agli eventi di temperature estreme che si verificano durante le stagioni di crescita. La variazione delle temperature e delle precipitazioni sono importanti variabili da considerare, nelle proiezioni di lungo termine, anche in zone particolarmente avanzate e produttive come le grandi pianure degli Stati Uniti d'America, dominate dalle coltivazioni di mais, soia e sorgo. In questo scenario, l'impatto del clima, pur essendo sito specifico e coltura

specifico, si è rilevato sempre significativo, spiegando la variabilità delle rese per l'8% nelle coltivazioni irrigate e per il 41% per quelle non irrigate, testimoniando la maggiore resilienza delle prime rispetto alla grande suscettibilità delle seconde (Kukal e Irmak., 2018). L'attenzione che i lavori scientifici rivolgono a queste tematiche rimane giustamente sempre molto alta, dovendo considerare parallelamente grandi cambiamenti nel prossimo futuro come l'aumento della popolazione mondiale, la distribuzione della ricchezza, la gestione delle risorse idriche e gli evidenti effetti relativi all'incremento delle aree urbane, con la conseguente perdita di suolo. Alcune proiezioni dello scorso decennio tendevano a rassicurare sul fatto che la produttività a scala globale avrebbe continuato a crescere come nei decenni passati (Lobell e Gourdi., 2012), pur ponendo sempre attenzione sul fatto che le più grandi variazioni si sarebbero osservate a livello locale e nelle zone a maggiore rischio. Uno studio approfondito della situazione globale esula dalle finalità del presente lavoro, all'interno del quale saranno affrontate maggiormente le implicazioni sulla produttività agricola e le conseguenze sulla viticoltura mediterranea.

Nell'approccio alla questione è bene suddividere i principali fattori in base alla relativa dipendenza dai cambiamenti climatici. Ci sono dunque fattori ambientali diretti, fattori indiretti e fattori determinati dall'aumento stimato della CO₂ atmosferica (Gornall et al., 2010). Tra i fattori indiretti sono raggruppati fenomeni il cui impatto può essere complesso da studiare poiché essi stessi vengono direttamente modificati e influenzati dal cambiamento climatico. Questi riguardano possibili nuove implicazioni tra piante e agenti fitopatogeni, l'impatto indiretto del clima sulle risorse esterne che vengono integrate nei processi agricoli e l'innalzamento del livello del mare, che può determinare danni difficilmente contrastabili nel breve periodo come la salinizzazione dei suoli e delle acque di falda. Al contrario, i fattori diretti che maggiormente influiscono sulla produttività delle colture sono l'innalzamento delle temperature medie, ondate di calore, siccità, tempeste, precipitazioni estreme ed allagamenti.

Molti sistemi produttivi sono da lungo tempo adattati al clima locale e l'aumento della frequenza di eventi meteorologici estremi pone a serio rischio soprattutto le zone del pianeta meno avanzate a livello tecnico, per via dell'intrinseca difficoltà a disporre di sistemi di mitigazione, monitoraggio e previsione. L'innalzamento delle temperature medie, indipendentemente dalle regioni geografiche prese in considerazione, causa una maggiore evapotraspirazione e potenziali danni alle colture. Negli scorsi decenni, tuttavia, si era proposto come questa tendenza potesse determinare aumenti di rese nelle regioni a latitudini più elevate per effetti di mitigazione del clima, di un allungamento del ciclo produttivo e di un aumento della disponibilità di suolo che prima non poteva essere utilizzato a scopo agricolo (Easterling et al., 2007). Infatti, nelle latitudini più elevate, sono le temperature basse a rappresentare il maggiore vincolo per le rese, caratterizzando periodi di crescita più brevi, contrariamente alle regioni più meridionali e mediterranee dove invece sono i fenomeni di siccità, di stress termico e di scarsa disponibilità idrica che impattano maggiormente. Questa ipotesi era stata avvalorata già da numerose osservazioni in letteratura, inoltre in sondaggi sulla percezione del rischio sulla produttività delle maggiori colture di tutto il territorio europeo dello scorso decennio, si è evidenziata una sostanziale stagnazione della produttività generale, ma un aumento progressivo nelle regioni del nord ed un parallelo decremento nelle regioni del sud, soprattutto per le colture cerealicole, segnalando come spesso

fossero la poca prevedibilità del clima e gli eventi estremi a creare maggiori problematiche, tra tutti la maggiore frequenza delle gelate e della siccità, anche in zone ambientali storicamente poco soggette (9).

Sebbene ci siano delle risposte differenti in base alle colture, soprattutto nelle risposte delle piante C3 e C4, la temperatura è uno dei principali fattori che influenza le performance produttive, infatti può determinare variazioni dell'attività fotosintetica e della foto-respirazione, per via dell'esposizione a maggiori danni ossidativi e da stress termico, implicando così cambiamenti nei tassi di crescita. Inoltre è il parametro che fa variare il deficit di pressione di vapore (VPD) tra l'ambiente esterno ed il mesofillo portando così ad una diminuzione dell'efficienza d'uso dell'acqua (WUE) (Lobell e Gourdi, 2012). Quest'ultima problematica potrebbe essere mitigata e superata dall'effetto di "fertilizzazione del carbonio" che potrebbe determinarsi con l'aumento progressivo ed ininterrotto delle concentrazioni della CO₂ nel corso degli anni. Infatti è stato proposto che sia le piante C3 che le C4 potrebbero avvantaggiarsi da un aumento delle concentrazioni di CO₂, le prime sfruttando pressioni parziali di CO₂ del mesofillo più idonee alle attività riduttive della Rubisco e le seconde aumentando la WUE, riuscendo a mantenere buoni livelli di assimilazione netta riducendo tuttavia la conduttanza stomatica (Gornall et al., 2010).

Le implicazioni sulla crescita delle colture, dovute all'interazione tra temperatura e CO₂, devono tuttavia essere legate all'analisi del contesto ed in particolare alla distinzione tra colture irrigate o meno, e all'impatto che il cambiamento climatico può avere sulle disponibilità idriche. Se da una parte l'atteso aumento della concentrazione della CO₂ atmosferica, in prove specifiche condotte su diverse colture, ha evidenziato una diminuzione della conduttanza stomatica, l'aumento della WUE, l'incremento di biomassa e una maggiore conservazione del contenuto idrico del suolo, a temperature nella norma, la tendenza si inverte a temperature critiche per la corretta funzionalità fisiologica (> 35°C), determinando anche situazioni in cui i potenziali effetti positivi vengono ridimensionati o annullati. Infatti se al contestuale abbassamento della conduttanza stomatica, si combinano incrementi marcati delle temperature, scarsa disponibilità idrica e inadeguati sistemi di compensazione della coltura, l'aumento della VPD e della domanda evapo-traspirativa conducono a impatti negativi sia sulle rese che sulla qualità del prodotto (Hatfield et al., 2011).

L'aumento della media delle temperature annuali e la maggior frequenza di eventi estremi come le ondate di calore, creano delle conseguenze negative anche per il comparto della viticoltura, in special modo per quella mediterranea. In questo contesto, in letteratura vengono prospettati degli importanti cambiamenti nelle strategie di coltivazione delle zone mediterranee per cercare di contrastare il fenomeno in essere e garantire sostenibilità economica del settore mantenendo livelli adeguati di qualità e di produttività, secondo le necessità del mercato. Pertanto, sarà prevedibile osservare adattamenti di breve termine che coinvolgeranno l'utilizzo di nuove tecniche di gestione agronomica del vigneto e un progressivo aumento di interesse verso trattamenti protettivi e prodotti eco-compatibili che stimolino la tolleranza delle piante agli stress abiotici, quali per esempio fitormoni, osmo-protettori e biostimolanti. Gli adattamenti di lungo periodo invece determineranno un impulso alla selezione di cultivar più resilienti e una riallocazione dei vigneti, che sicuramente porterà ad uno spostamento del settore verso zone meno critiche dal punto di vista climatico e la fruizione di suoli collocati ad altitudini maggiori (Bernardo et al., 2018). Se in certe regioni dell'Europa centrale e dell'est

potrebbe verificarsi un allargamento delle aree destinate alla viticoltura, per via di un clima più mite che permetterà di allungare il ciclo produttivo e anche di ridurre la severità delle gelate, così non sarà per le regioni dell'Europa meridionale, specialmente nei contesti più critici in cui oltre all'innalzamento delle temperature medie si verificano anche con maggiore frequenza fenomeni di siccità grave. In questo scenario, senza poter attuare interventi di mitigazione efficaci, sembra difficile poter controbilanciare gli effetti negativi del cambiamento climatico di lungo periodo, che minacciano le zone storicamente e tradizionalmente ad alta vocazione, dove dopo centinaia di anni si è ottimizzato il concetto di *terroir* (Santos et al., 2020).

L'impatto degli stress termici sulla vite genera delle problematiche a livello di qualità del vino e innesca dei meccanismi fisiologici e molecolari che permettono alla pianta di controbilanciare i possibili danni all'apparato fotosintetico che vengono ascritti nelle risposte che riguardano la capacità di indurre termo-tolleranza. Il riscaldamento globale ha avuto e continua ad avere come conseguenza quella di modificare la durata del ciclo vegetativo e di alterare i periodi di tempo che intercorrono tra una fase fenologica e la seguente, conducendo spesso ad uno scadimento della qualità delle bacche e conseguentemente del vino.

Temperature elevate, in particolare sopra i 35-40°C, alterano il metabolismo delle bacche durante le fasi di maturazione, determinando alti contenuti di zuccheri solubili, producono maggiore degradazione termica dell'acido malico sbilanciando il rapporto di concentrazione con l'acido tartarico, con una conseguente diminuzione dell'acidità titolabile del succo, e peggiorano le caratteristiche aromatiche, in quanto le concentrazioni dei composti fenolici e i loro precursori, come antocianine e flavonoli, sono fortemente dipendenti dagli andamenti termici (Venios et al., 2020).

L'impatto degli stress idrici moderati può invece migliorare certe caratteristiche qualitative del vino, infatti nel caso dei vini rossi può indurre nelle bacche una maggiore pigmentazione dovuta all'accumulo di antocianine e di altri composti del gruppo dei tannini, in quelli bianchi può favorire l'accumulo di molecole aromatiche e volatili che contribuiscono a strutturare l'aroma, come i flavonoli ed i terpenoidi. Tuttavia queste implicazioni positive potrebbero non verificarsi se durante le fasi precedenti all'invasatura le piante fossero sottoposte a stress abiotici severi, poiché dopo questa fase vengono alterate le connessioni idrauliche e metaboliche tra fusto e frutti, rendendo così poco sostanziali, in termini di dimensione e di caratteristiche fenologiche delle bacche, gli eventuali interventi di irrigazione (Gambetta et al., 2020). L'aumento progressivo delle temperature medie, sia massime che minime, porterà pertanto inevitabilmente ad un anticipo delle fasi fenologiche della vite. In uno studio (Gashu et al., 2020) che aveva l'obiettivo di mostrare le differenze varietali in uno scenario di questo genere, le cultivar a bacca bianca hanno mostrato una maggiore rapidità a completare il ciclo produttivo rispetto a quelle a bacca rossa, anticipando la raccolta in media di due settimane. Gli autori hanno sottolineato che sarebbero le varietà a bacca rossa a poter essere maggiormente suscettibili ai danni dovuti alle ondate di calore, per via del fatto che le bacche in invasatura e maturazione verrebbero a trovarsi nei periodi più critici esponendosi di più a peggioramenti qualitativi, rispetto a quelle a bacca bianca nelle stesse condizioni, e per via di questo sia necessario puntare su cultivar che mostrano più spiccate caratteristiche di termo-tolleranza.

Le risposte della vite ai deficit idrici e agli stress termici sono inizialmente legate alla regolazione dell'apertura stomatica e alla conseguente modulazione della conduttanza stomatica e idraulica. Questo comportamento è

necessario nei periodi particolarmente caldi e secchi, che possono determinare alte domande evapotraspirative, in cui le viti devono bilanciare la necessità di aumentare il potenziale idrico, per far fronte agli abbassamenti del contenuto idrico del suolo, senza tuttavia rischiare danni ai vasi conduttori.

La regolazione della traspirazione conduce inoltre a variazioni nel tasso di fotosintesi netta, infatti, se il periodo di stress si prolunga nel tempo, la riduzione della conduttanza stomatica ridurrà le pressioni parziali di CO₂ nel mesofillo abbassando così l'assimilazione del carbonio (Gambetta et al., 2020). Pertanto esiste una relazione molto stretta tra la fotosintesi netta, la conduttanza stomatica e l'aumento del potenziale idrico della pianta in risposta al deficit idrico, tuttavia è auspicabile un miglioramento della WUE. I minori tassi di crescita registrati in queste fasi sarebbero da attribuire allo stimolo dell'attività di foto-respirazione e a meccanismi fisiologici che adattano la capacità fotosintetica delle foglie all'effettiva disponibilità di CO₂ nel mesofillo (Tzortzakis et al., 2020). La progressiva chiusura degli stomi può condurre a peggiorare i danni inferti dalle alte temperature alle cellule del mesofillo ed in particolare all'apparato fotosintetico. L'abbassamento della conduttanza stomatica a seguito di stress abiotici di lungo periodo determina rallentamenti della capacità di rigenerazione della Rubisco, favorisce la degradazione delle clorofille ed è il preludio alla graduale foto-inibizione del fotosistema II, con la contestuale inattivazione dei complessi proteici deputati al trasporto degli elettroni (Venios et al., 2020). Questo espone le cellule a possibili danni strutturali dovuti alle specie reattive dell'ossigeno (ROS), infatti si osserva un aumento di meccanismi protettivi e di detossificazione nelle piante sotto stress, che includono stimolo della sintesi di enzimi come le perossidasi (POD), le catalasi (CAT) e le super-ossido dismutasi (SOD). La capacità di reagire agli stress abiotici, regolando rapidamente l'apparato antiossidante di cui dispone la vite, definisce il grado di adattamento all'ambiente e la tendenza a tollerare meglio questi fattori. Questi meccanismi sono finemente regolati a livello genetico e la loro caratterizzazione permette di delineare le cultivar che meglio si adattano a condizioni severe (Tzortzakis et al., 2020). Se il suddetto sistema antiossidante, al quale si aggiungono molecole osmo-protettive e pigmenti antiossidanti, il cui accumulo nelle cellule è stimolato dalla percezione di severi stress abiotici, non riesce a controbilanciare l'aumento dei danni ai foto-sistemi, si verifica uno shock ossidativo per l'accumulo delle ROS che conduce gradualmente ad una degradazione dei pigmenti, delle clorofille e delle componenti lipidiche, fino alla necrosi fogliare.

Questi meccanismi possono verificarsi anche a carico delle bacche, specialmente nelle fasi successive all'invasatura, e portare al deterioramento delle cellule dell'epicarpo e di quelle immediatamente sottostanti determinando il fenomeno delle scottature, un ulteriore pericolo per le rese e per la qualità delle uve e del vino (Gambetta et al., 2021).

Considerando integralmente l'impatto del cambiamento climatico sulla produttività delle colture e sulle performance della vite, non sorprende come, oltre alla ricerca di affidabili sistemi di mitigazione e di gestione agronomica, in questi ultimi anni ci sia stato un crescente interesse verso l'utilizzo di nuove strategie per ridurre l'impatto degli stress abiotici come i prodotti biostimolanti. Questa tendenza è stata sospinta anche dalle recenti e stringenti politiche europee sull'utilizzo dei fitofarmaci e di molecole come il rame, che hanno spostato il mercato verso la scelta di prodotti maggiormente eco-compatibili e sostenibili per far fronte alle avversità in viticoltura (Monteiro et al., 2022).

In letteratura sono noti gli effetti di questo vasto gruppo di prodotti sull'incremento del vigore delle piante, sull'aumento della tolleranza a stress biotici ed abiotici, sul miglioramento dell'efficienza di assorbimento dei nutrienti ed anche sull'impatto positivo sulla qualità del prodotto. A tal riguardo ci sono studi che hanno indagato sulle possibili interazioni tra applicazione fogliari di biostimolanti e processi di vinificazione, andando a valutare l'effetto in termini di composti azotati assimilabili dai lieviti enologici ed anche sulle ricadute positive in termini di composizione dei polifenoli delle bacche. Quest'ultima osservazione è derivata dal fatto che molti biostimolanti si comportano da elicitori e potrebbero condurre all'aumento delle concentrazioni di antocianine, stilbeni e flavonoli in molti comparti della pianta, comprese le bacche, stimolando gli enzimi correlati al pathway della fenil-alanina e quelli di molti composti fenolici con funzioni utili per aumentare la tolleranza ai patogeni e agli stress ossidativi (Gutiérrez-Gamboa et al., 2021). Per questa ragione è molto utile indagare sugli effetti di questi prodotti nelle più svariate condizioni ambientali e di crescita, per comprendere al meglio i metodi di applicazione e per caratterizzare la risposta delle piante, in un'ottica futura nella quale gli obiettivi chiave saranno la sostenibilità ambientale e la resilienza.

1.2 Biostimolanti: definizioni e normativa europea

I biostimolanti delle piante (PBs) sono prodotti, di derivazione biologica o non biologica, che vengono comunemente utilizzati nelle applicazioni agrarie per migliorare la produttività delle colture, innescare risposte di difesa contro patogeni del suolo e dell'apparato fogliare, aumentare l'assorbimento e migliorare l'efficienza di utilizzo dei nutrienti (NUE) e mitigare gli stress da fattori abiotici. Alcune categorie di questi input agronomici vengono adoperate nel miglioramento delle relazioni suolo-pianta, andando a rafforzare le comunità microbiche utili e a potenziare la biodisponibilità dei nutrienti. Questi processi vengono attribuiti all'interazione tra prodotti biostimolanti ed il suolo, in particolare andando a modificare e arricchire la biomassa microbica utile e la composizione enzimatica della rizosfera favorevole alla pianta (Sible et al., 2021). Possono essere prodotti caratterizzati da sostanze estratte da organismi viventi, oppure prodotti a base di microrganismi attivi, si pensi ad esempio ai batteri azoto-fissatori e alle micorrizze, da somministrare alla pianta o al terreno in varie metodologie. Possono influenzare le caratteristiche qualitative dei prodotti agricoli e particolare interesse a tal proposito è stato posto nelle possibilità dei biostimolanti di aumentare il valore aggiunto delle colture arboree da frutto, migliorando le caratteristiche organolettiche e le performance produttive, stimolando la produzione di molecole antiossidanti, agendo positivamente nei processi post-raccolta e nel prolungamento della *shelf-life* (Afonso et al., 2022). A moltissime categorie di questi prodotti viene attribuita la capacità di modificare la fisiologia delle piante trattate, stimolando la germinazione, la crescita e l'architettura radicale, l'aumento dell'attività fotosintetica e la produzione di specifiche molecole del metabolismo primario e secondario. Ormai è noto che questi prodotti influenzano la regolazione dell'espressione genica, si comportano da elicitori, alterano l'attività enzimatica e contribuiscono a rafforzare i rapporti tra pianta e microrganismi utili (Rouphael e Colla, 2020). In particolare, i meccanismi legati all'induzione di difesa riguardano le risposte che la pianta aziona per cercare di contrastare l'attacco di patogeni o di insetti e consistono nella sintesi di metaboliti secondari che danneggiano direttamente (tossicità o repellenza) o indirettamente (attraendo nemici naturali) l'attività degli organismi dannosi. Tipicamente le

reazioni sono sistemiche e si basano sul riconoscimento, da parte di proteine recettrici delle cellule vegetali, di specifiche molecole con funzione di elicitori associate all'attacco dei patogeni, le cosiddette DAMP (damage associated molecular pattern) e alla conseguente trasmissione di un messaggio d'allarme guidato da variazioni dei livelli ormonali. I biostimolanti spesso innescano questi meccanismi e aumentano la tolleranza e la resilienza delle colture proprio perché l'applicazione preventiva di questi consente di applicare uno stato di allerta nelle piante, il priming, che, qualora si dovesse verificare un attacco effettivo, provocherebbe una risposta di difesa molto più rapida e incisiva (Pereira et al., 2021).

L'interesse per questa tipologia di prodotti è aumentato molto nell'ultimo decennio, anche in particolare per le disposizioni recenti dell'UE che impongono di ridurre l'utilizzo dell'agrochimica tradizionale, il continuo accrescimento del numero di aziende ad indirizzo biologico nel territorio europeo e la maggiore attenzione dell'opinione pubblica su temi quali la sostenibilità delle produzioni agrarie. I prodotti biostimolanti infatti sono stati progressivamente accettati per l'utilizzo in agricoltura biologica e ritenuti idonei per le esigenze di aziende biologiche, in cui per obbligo si deve ricorrere a soluzioni sempre più distanti da quelle tradizionali ed è richiesta una gestione maggiormente oculata delle risorse, in considerazione dell'impatto ambientale. Inoltre, come noto dalla letteratura a riguardo, molto spesso le rese delle produzioni biologiche sono più basse rispetto a quelle tradizionali e le soluzioni per far fronte a problematiche fitopatologiche, ritenute le principali cause del gap di produzione menzionato, sono sempre più stringenti e limitate. Per questa ragione le aspettative riposte in questa nuova tipologia di prodotti sono andate crescendo negli anni (Pylak et al., 2019).

Da un punto di vista del quadro normativo europeo, i biostimolanti sono stati esclusi dall'ambito di applicazione del Reg. (CE) 1107/2009 che ne indicava l'assimilazione a prodotti fitosanitari e attualmente sono stati inseriti nel complesso dei prodotti fertilizzanti, come indicato dal Regolamento (UE) 2019/1009. L'attuale definizione fornita dal Regolamento (UE) 2019/1009 recita: *“Tali sostanze, miscele e microrganismi, denominati prodotti biostimolanti delle piante, non rappresentano di per sé un apporto di nutrienti ma stimolano comunque i processi nutrizionali naturali delle piante. Laddove tali prodotti siano intesi unicamente a migliorare l'efficienza dell'uso dei nutrienti delle piante, la tolleranza allo stress abiotico, le caratteristiche qualitative o l'aumento della disponibilità di nutrienti confinati nel suolo e nella rizosfera, sono per loro natura più simili ai prodotti fertilizzanti che non alla maggior parte delle categorie di prodotti fitosanitari. Agiscono in aggiunta ai concimi, con lo scopo di ottimizzare l'efficienza di tali concimi e di ridurre il tenore di apporto di nutrienti”*. Sebbene potenzialmente possano essere molto numerosi i microrganismi con funzioni che rientrino nella definizione apportata dal regolamento, attualmente, oltre alle micorrizze del phylum Glomeromycota (AMF), possono essere commercializzati alla stregua di prodotti fertilizzanti esclusivamente tre generi di PGPR che rientrano tra gli Azospirillum, gli Azotobacter e i Rhizobium. Questi organismi rientrano nel regolamento per via delle loro caratteristiche specifiche di azoto-fissazione e di incremento della solubilizzazione dei composti a base di fosforo, che impattano positivamente sulla riduzione dei fertilizzanti di sintesi e sul miglioramento dell'efficienza di uso delle risorse (RUE). Si ritiene auspicabile che nel prossimo futuro la lista possa essere ampliata per via di uno studio più approfondito sulle interazioni, sinergie e simbiosi dei microrganismi utili su specifiche colture al fine di massimizzare gli effetti positivi (Fusco et al., 2022). I

biostimolanti possono essere divisi in macro categorie come indicato nella maggior parte della letteratura a riguardo. Le categorie più largamente conosciute e utilizzate risultano essere: estratti di alghe marine, acidi umici e fulvici, batteri azoto fissatori e promotori della crescita (PGPR), microrganismi solubilizzanti fosforo (PSM), micorrizze arbuscolari (AMF), biochar, idrolisati proteici, chitosano, altri biopolimeri e composti inorganici (Sible et al., 2021; Rouphael e Colla., 2020). La lista probabilmente verrà ampliata negli anni, ma tutt'ora c'è particolare perplessità sulla metodologia da adottare per la divisione in gruppi. In particolare non è ancora delineabile una divisione solida e ben definita per meccanismi di azione per via dell'incertezza data dalla composizione variabile dei prodotti venduti e di cui si è fatta sperimentazione, dei presunti effetti sinergici e dell'interazione con i fattori ambientali e climatici. A tal proposito le industrie sono riuscite a migliorare l'efficacia delle loro formulazioni tramite la miscela di biostimolanti di tipo non microbico e microbico, di fatto avendo molto spesso un approccio empirico che non si è basato su un'analisi approfondita sulle possibili interazioni tra le varie componenti, come l'antagonismo, gli effetti sinergici o additivi. Questo rappresenta un vuoto di conoscenza che deve essere colmato, lasciando il posto a definizioni sui meccanismi di azione via via più rigorose (Rouphael e Colla., 2018). Attualmente la ricerca sta cercando di trovare risposte a queste domande per poter giungere alla progettazione di biostimolanti con funzionalità e meccanismi ben definiti e ripetibili, definiti biostimolanti di seconda generazione. I biostimolanti, come brevemente descritto e indicato, rappresentano un insieme eterogeneo di materiali, composti, sostanze e miscele che sono accomunate dalla caratteristica funzione di fornire dei benefici alla crescita e allo sviluppo delle piante. Le necessità e le richieste di produrre in modi più sostenibili e maggiormente eco compatibili hanno anche portato ad indagare la possibilità di ottenere sostanze utili direttamente dai rifiuti agricoli, industriali e urbani, nell'ottica di una ormai prossima transizione a forme di economia circolari. Si è osservato in letteratura che molte molecole utili possono essere ricavate da residui di biomassa delle piante, come composti fenolici, fitormoni, proteine e amino acidi (Puglia et al., 2021). Queste possibilità di riutilizzo di materiali potrebbero inoltre contribuire a ridurre le ingenti richieste di input quali i fertilizzanti e contestualmente mitigare l'impatto sulle falde e sugli ambienti acquatici. Per gli scopi del presente studio verranno presi in oggetto i principali meccanismi di azione di due categorie specifiche di biostimolanti: gli idrolisati proteici (PHs) e i lieviti, sia in forma di microrganismo attivo che nel caso dei derivati inattivati, per poi passare a casi specifici in cui vengono valutati gli effetti di contrasto agli stress abiotici su colture modello e sulla vite.

1.3 Idrolisati proteici (PHs) e derivati di lieviti inattivati

I PHs rientrano nel gruppo dei biostimolanti di origine non microbica e sono tra quelli maggiormente conosciuti ed utilizzati. Questo gruppo si compone di peptidi e di amminoacidi liberi, di origine vegetale o animale, comunemente ottenuti da scarti dell'industria conciaria, dell'industrie ittiche, da piume, caseine, biomassa vegetale di leguminose per fare alcuni esempi, tramite processi di idrolisi acida o enzimatica, che vengono direttamente somministrati alla pianta solitamente per via fogliare. I PHs si sono dimostrati dei potenti biostimolanti. Per quanto concerne le loro caratteristiche principali, ci sono degli effetti diretti e degli effetti indiretti. Gli effetti diretti riguardano il miglioramento della germinazione e della crescita, la produttività e la qualità finale del raccolto. Significativa è anche la capacità di alleviare gli stress abiotici, come stress da salinità

e da metalli pesanti. Interagiscono direttamente con il metabolismo del carbonio e dell'azoto e contribuiscono a migliorare l'assorbimento dei nutrienti. La loro azione sembra essere legata ad una regolazione dei pathways metabolici che includono l'attività dei fitormoni (auxine e gibberelline) che a loro volta modulano l'architettura degli apparati radicale (in termini di numero e lunghezza di radici laterali) e di quello fogliare (lunghezza dei germogli). Gli effetti indiretti sono legati all'azione positiva sul microbioma presente sul filloplano, di cui modulano l'attività e la composizione. Si presume inoltre che il microbioma presente sulle foglie sia più efficace a sequestrare gli aminoacidi somministrati per via fogliare e che pertanto gli effetti rilevati possano essere frutto di meccanismi più spiccatamente sinergici (gli effetti diretti potrebbero venire parzialmente riconsiderati in funzione di questo). I loro meccanismi di azione tuttavia devono essere ancora ben delineati (Colla et al., 2015; Colla et al., 2017). La composizione dei PHs varia in base alla fonte proteica da cui derivano e dal processo chimico utilizzato (idrolisi acida o enzimi proteolitici). I PHs derivati da collagene presentano alte percentuali di glicina e prolina. Allo stesso modo, prodotti derivati da residui o scarti di leguminose o prodotti ittici presentano alti contenuti di acido aspartico e glutammico (Ertani et al., 2013; Chalamaiah et al., 2012). La caratterizzazione chimica dei PHs viene alterata in base all'idrolisi utilizzata. Il processo di idrolisi acida tende a degradare molto più duramente le proteine e pertanto il contenuto di aminoacidi liberi è superiore rispetto all'idrolisi enzimatica. Inoltre si registra anche un cambiamento della conformazione degli aminoacidi (dalla forma L a quella D), che potrebbe influire sulla funzionalità biologica degli stessi. Viceversa l'idrolisi enzimatica tenderebbe a mantenere un discreto contenuto di peptidi e oligopeptidi e a mantenere invariata la struttura degli L-aminoacidi (Colla et al., 2015). Come stato anticipato i PHs favoriscono la crescita delle piante e ciò è ben delineato in letteratura. Alcuni autori segnalano che l'azione diretta di questi prodotti sia simile a quella ormonale (in special modo alle auxine e alle gibberelline. Per esempio l'azione para-ormonale del triptofano sembra essere dovuta al fatto che questo aminoacido sia un importante precursore nella biosintesi dell'acido indolacetico (IAA). In altri casi viene attribuita a certi PHs un effetto più simile a quello delle gibberelline e le evidenze sembrano ormai confermare questa tendenza (Colla et al., 2014). I PHs modulano anche l'attività dei trasportatori di membrana dell'azoto, probabilmente fungendo da regolatori dell'espressione trascrizionale dei geni correlati; la conseguenza di queste alterazioni fisiologiche è l'aumento di biomassa osservato nelle piante trattate. L'aumento di produttività è stato registrato in numerose colture ed è ormai noto, così come le evidenze sul maggiore sviluppo radicale e fogliare. In pomodoro, per fare un esempio concreto, lo stimolo dell'assorbimento e dell'assimilazione dell'azoto incrementa l'attività fotosintetica e la conseguente traslocazione di zuccheri solubili negli organi in attiva crescita. Questo sembra essere legato all'incremento dell'attività di due enzimi importanti quali la nitrato reductasi e la glutamina sintetasi. Queste evidenze devono sempre essere connesse alla contestuale spinta all'accrescimento in volume dell'apparato radicale che consente alla pianta di sfruttare meglio la presenza di minerali nel suolo, in particolare aumentare l'assorbimento di ulteriore azoto presente, mostrando una vigoria superiore (Ertani et al., 2009). In un caso studio interessante su pomodoro (Paul et al., 2019), in cui si è impostata una piattaforma di fenotipizzazione per il monitoraggio dell'attività morfo-fisiologica e una seguente analisi metabolomica, si è cercato di chiarire i meccanismi di azione di alcuni trattamenti fogliari di PHs derivati da semi di leguminose.

Si sono riscontrati aumenti del tasso di crescita e di biomassa di alcune piante trattate rispetto al controllo e si è messo in luce come i PHs studiati abbiano riprogrammato l'assetto metabolico delle foglie, andando a modulare il network di segnalazione correlato alle ROS (specie reattive dell'ossigeno); sono apparse evidenti le stimolazioni alla produzione di poliammine (molecole correlate alla biosintesi e ai processi regolati dall'etilene) e dall'alterazione dei profili lipidici che rientrano nei pathways di biosintesi di classi di molecole antiossidanti come i fenoli e i carotenoidi. Lo studio segnala come l'aumento in biomassa sarebbe maggiormente determinato dalla regolazione dell'attività stomatica e dei processi legati alla difesa della pianta dagli stress ossidativi, piuttosto che ad un aumento del tasso di fotosintesi netta. In letteratura si illustra come dei lavori basati su un approccio di tipo trascrittomico abbiano indagato su quali fossero i principali geni regolati dai PHs a seguito del trattamento ([González-Morales et al., 2021](#)). Si è rilevato come in diverse colture agrarie i PHs regolino geni deputati alla risposta a condizioni di stress abiotico, come elevati livelli di salinità, di temperatura e di carenza idrica, vengano alterati i processi modulati dall'acido abscissico (ABA), la programmazione dell'attività di enzimi del metabolismo dell'azoto e in altri casi la regolazione dei trasportatori ad alta e a bassa affinità dell'azoto e dell'enzima fenilalanina ammonio liasi (PAL), enzima centrale nei processi di biosintesi dei fenilpropanoidi, importanti classi di molecole di difesa come lignine, flavonoidi, isoflavonoidi, cumarine e stilbeni ([Huang et al., 2010](#)). Queste osservazioni hanno fatto maggiore chiarezza sull'utilizzo dei PHs come induttori di difesa nei confronti degli stress abiotici. Altre osservazioni infatti rilevano come la glicin betaina e la prolina (oltre ad essere esse stesse molecole segnale che si accumulano nelle piante sottoposte a stress abiotico) possano venire considerate dei primer contro gli stress abiotici, cioè sostanze in grado di incidere direttamente sul sistema di percezione dei segnali esterni inducendo risposte difensive; nel caso specifico modifiche nel metabolismo secondario e accumulo di osmoprotettori nelle piante trattate ([Nephali et al., 2020](#)). Per quanto riguarda gli effetti indiretti, legati al potenziamento dei microrganismi utili, sembra esserci meno chiarezza. I PHs, essendo composti da una elevata percentuale di peptidi e aminoacidi liberi, dovrebbero fornire una fonte di sostentamento aggiuntiva al microbioma del suolo, così come a quello presente sull'apparato fogliare. Infatti i microrganismi sono spesso maggiormente competitivi della pianta ad assimilare gli aminoacidi liberi. Sono ormai note le relazioni che possono sussistere tra microrganismi utili e pianta, di cui le più importanti sono l'azione antagonistica e antibiotica contro potenziali patogeni e la produzione di molecole che possono giovare alla crescita delle piante, come certi fitormoni (IAA) ed enzimi extracellulari che contribuiscono a migliorare la biodisponibilità dei nutrienti. Non è ancora chiaro tuttavia se si possa parlare di una vera e propria induzione di resistenza (ISR) nel caso del microbioma del filloplano, ma certamente il ruolo di promotori della crescita è assodato. Pertanto, la somministrazione di PHs al suolo potrebbe stimolare lo sviluppo del microbioma della rizosfera ed in letteratura comincia ad essere sempre più evidenziata la rilevanza e la capacità dei phs di modificare anche la struttura del microbioma del filloplano, tuttavia si ritiene che i meccanismi di azione che permettano alla pianta di trarne giovamento siano molteplici e pertanto complessi da scindere ([Colla et al., 2017](#)).

Sempre più di recente si osserva l'aumento di interesse verso l'utilizzo dei lieviti in agricoltura per via delle loro capacità di promotori della crescita delle piante. In letteratura sono sempre più frequenti studi che stanno

chiarendo i meccanismi di azione specifici, sia nei casi in cui vengano utilizzati come PGPMs (plant growth-promoting microorganisms), che nel caso vengano utilizzati come prodotti derivati o in forma inattivata. Attualmente i principali meccanismi di azioni diretti sono quelli ascrivibili alla capacità di migliorare la fertilità del suolo e lo stimolo alla crescita, aumentando la disponibilità per le piante dei principali macronutrienti, degradando composti tossici che garantirebbero maggiore biodiversità del suolo e producendo fitormoni, soprattutto auxine ed etilene. Gli effetti indiretti riguardano la possibilità di contrastare potenziali patogeni, tramite antagonismo e produzione di molecole tossiche o con funzione di inibizione per gli organismi nocivi, soprattutto verso quelli di origine fungina. Sono stati evidenziati anche degli effetti positivi sulla mitigazione dei danni da stress abiotici, in particolare grazie all'attività di certe specie di lieviti di produrre poliammine, composti fortemente coinvolti nelle risposte di difesa inducibili contro avversità ambientali (Hernández-Fernández et al., 2021). Il controllo biologico dei patogeni tramite l'utilizzo dei lieviti attivi si è dimostrato efficace in situazioni trasversali. Quest'attività è dovuta alla funzionalità di svariate molecole, composti e proteine derivate dal metabolismo primario e secondario dei lieviti e rilasciate nell'ambiente come i composti organici volatili (VOCs), tossine prodotte da alcuni ceppi specifici e gli enzimi litici che degradano le pareti cellulari di molti fito-patogeni. In particolare i VOCs sono dei composti prodotti comunemente da batteri, funghi e lieviti che svolgono una funzione di segnalazione e comunicazione sia intracellulare che tra organismi differenti presenti nell'ambiente, per modulare le attività di crescita e moltiplicazione. Questi segnali ambientali pertanto inibiscono e deprimono la crescita di molti patogeni, svolgendo così un'azione di contenimento specialmente utile nel contesto della rizosfera dove le competizioni tra vari microrganismi sono più evidenti. Alla luce di queste capacità i lieviti attivi si sono dimostrati agenti di controllo efficaci contro molti organismi fungini, come *Alternaria*, *Botrytis*, *Monilia* e *Penicillium*, che possono provocare perdite di prodotto nelle fasi del pre e del post raccolta (Kowalska et al., 2022). I lieviti inattivati e i loro derivati invece presentano delle applicazioni molto più specifiche, in particolar modo per la viticoltura. Questi infatti sono dei biostimolanti che provengono direttamente dagli stessi lieviti della specie *Saccharomyces cerevisiae*, fondamentale per i processi di fermentazione nella produzione del vino. Essendo dei derivati, i formulati commerciali sono ricchi di composti come mannoproteine, chitine, lipidi, steroli e proteine ottenute dalla degradazione delle membrane e delle componenti cellulari dei lieviti, che stimolano e inducono risposte di difesa nella pianta svolgendo il ruolo di elicitori esogeni, come ormai ben descritto in letteratura. Tuttavia recentemente iniziano ad essere adoperati come stimolatori della maturazione delle bacche, per arricchirne la composizione fenolica e migliorare le qualità tecnologiche del vino. Particolare interesse hanno suscitato le evidenze sul miglioramento del contenuto delle antocianine totali nei tessuti dell'epicarpo delle bacche, garantendo un miglioramento del colore del vino e delle sue componenti aromatiche. A tal riguardo, applicazioni fogliari di prodotti a base di lieviti inattivati in ibridi di *Vitis vinifera* americani hanno determinato incrementi significativi dell'elasticità delle bacche trattate e dei livelli delle antocianine totali rispetto ai controlli, mantenendo inalterati i quantitativi di zuccheri solubili, il pH e l'acidità titolabile (Mayfield et al., 2021). Risultati simili sono stati ottenuti in prove di campo su 3 cultivar a bacca rossa da tavola, in cui dalla caratterizzazione dei profili di 7 antocianine rilevate è emerso che il trattamento è sempre risultato significativo

nella capacità di aumentarne il contenuto alla raccolta, soprattutto in una cultivar che presentava una concentrazione media di pigmenti nei controlli inferiore rispetto alle altre (Crupi et al., 2021). In letteratura si concorda sul fatto che l'applicazione fogliare di questi prodotti è percepita dalla pianta come un potenziale stress biotico, scatenando un accumulo di antocianine e di altre molecole di difesa, che può essere sfruttato nelle fasi che intercorrono dall'inizio dell'invasatura alla raccolta per sopperire al sempre più frequente effetto negativo delle alte temperature che invece favoriscono il rallentamento della biosintesi di questi pigmenti. Un altro studio (Pastore et al., 2020) conferma che l'applicazione fogliare di lieviti inattivati, su cultivar a bacca rossa, induce accumuli di antocianine nelle bacche tramite una regolazione positiva dei geni coinvolti nelle fasi precoci e tardive del pathway di biosintesi, ma che questi meccanismi siano fortemente correlati all'andamento delle temperature medie diurne e notturne durante le fasi di maturazione del grappolo e della suscettibilità varietale. Infatti si è osservato che se le temperature medie superano i 35-40°C per alcune giornate consecutive gli effetti positivi del trattamento potrebbero essere resi trascurabili, probabilmente per effetto di un blocco dell'induzione genica coinvolta nella biosintesi delle antocianine, testimoniando ancora una volta il forte vincolo del riscaldamento globale per certe varietà sensibili. Infine gli autori fanno notare, che prescindere dall'andamento climatico, ci sia sempre un incremento dell'espressione di UFGT (UDP-glucose:flavonoid 3-O-glu-cosyl transferase), un gene che si attiva nelle fasi più avanzate della biosintesi delle antocianine, nelle piante trattate e che quindi questo dato possa essere utilizzato come indicatore di efficacia dei trattamenti. In un altro caso studio (Gutiérrez-Gamboa et al. (2018)) infine si è concentrata l'attenzione sull'impatto dei trattamenti fogliari di lieviti inattivati sul contenuto di altri pigmenti oltre le antocianine, come clorofille e carotenoidi, riportando come gli effetti siano fortemente legati all'interazione con le differenti varietà prese in esame, dimostrandosi molto significativi in certi casi o per nulla in altri. In particolare si è messo in luce come il fattore dominante nella variazione rispetto ai controlli dei contenuti di clorofille, luteine e β -carotene nel mosto sia stato determinato esclusivamente dal trattamento e che viceversa nel caso della zeaxantina e del contenuto totale dei carotenoidi sia l'interazione tra trattamento e varietà il fattore più significativo. Pertanto l'utilizzo di prodotti a base di idrolisati proteici e di lieviti inattivati sembra garantire un effetto ormai ben definito nella letteratura a riguardo, ponendosi come innovativo strumento per aumentare le suscettibilità della vite nei periodi più critici, modulando risposte fisiologiche in grado di aumentare la tolleranza agli stress abiotici e permettendo di mantenere la qualità delle bacche necessaria per una proficua vinificazione. Nelle sezioni seguenti la trattazione si concentrerà maggiormente sugli effetti specifici di questa tipologia di input agronomici per fronteggiare il deficit idrico e i danni da temperature estreme.

1.4 Casi studio sull'utilizzo di biostimolanti su *Arabidopsis thaliana* e altre specie modello

In molte specie di piante la tolleranza agli stress abiotici, come siccità, eccessi di salinità, temperature estreme, radiazioni UV, sembra essere correlata all'accumulo di composti che svolgono numerose funzioni nei compartimenti intercellulari e garantiscono l'omeostasi, che vengono spesso denominate osmo-protettori. Queste sostanze solubili ed il loro incremento nei tessuti delle piante cresciute in condizioni climatiche non ottimali garantiscono la corretta stabilizzazione dell'osmosi cellulare, la detossificazione delle specie reattive dell'ossigeno e l'integrità strutturale delle membrane. Le applicazioni esogene di alcuni di questi composti,

come la glicin-betaina e la prolina, ha consentito di migliorare le rese di molte colture in casi di stress abiotici. A tal riguardo, uno studio condotto su pisello (Osman, 2015), ha messo in risalto come applicazioni esogene di glicin-betaina e prolina, in diverse fasi fenologiche e in differenti gradi di deficit idrico, abbia stimolato la crescita e la produzione di foglie rispetto ai controlli in tutti i diversi casi di stress. L'azione combinata delle due molecole si pensa abbia garantito miglioramenti del sistema antiossidante, riduzione dei danni ossidativi, indotto accumuli di composti solubili che riducono il potenziale idrico fogliare mantenendo inalterato il contenuto idrico e favorito la fotosintesi. Anche le rese sono state migliorate per via di un aumento del numero dei baccelli per pianta, sia nel caso dei controlli ben idratati che nei casi delle piante stressate e questo è stato attribuito all'aumento delle superficie fogliare, all'incremento del numero dei nodi produttivi e la maggiore fotosintesi netta. L'applicazione di questi due prodotti ha avuto inoltre un riflesso sulle concentrazioni di aminoacidi e di proteine libere nelle foglie e nei semi, determinando un incremento dei primi ed una riduzione delle seconde e modifiche nella traslocazione di soluti tra source e sink durante le fasi di accrescimento dei baccelli. La prolina è una molecola il cui accumulo nelle piante avviene in risposta alla percezione e segnalazione di stress ambientali, nei quali è coinvolto l'acido abscissico (ABA) che regola l'espressione di molti geni correlati agli stress, e la funzione di stimolo alla crescita è dovuta alla capacità di fungere da tampone redox, di neutralizzare i radicali liberi che vengono prodotti nei casi di deficit idrico ed alte temperature, soprattutto nei cloroplasti, e inoltre di produrre agenti riducenti utili alla fosforilazione ossidativa (Ashraf et al., 2007). La sintesi della prolina avviene solitamente nel citosol a partire dal glutammato, tramite una reazione a due step catalizzata dalla δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) che riduce il glutammato in glutammato semi-aldeide. Dopodiché avviene l'ulteriore riduzione in prolina catalizzata dall'enzima δ 1-pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR). Invece la degradazione della prolina avviene nel mitocondrio, tramite l'azione sequenziale di due enzimi, la prolina deidrogenasi (PDH) e la δ 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (P5CDH) (Gurrieri et al., 2020). In *Arabidopsis thaliana* si è osservato come la prolina abbia funzioni legate alla osmotolleranza, alla morfogenesi e sia un costituente essenziale delle proteine ricche in prolina e in idrossiprolina che garantiscono elasticità e resistenza meccanica alla parete cellulare, soprattutto quando si presentano stress abiotici. Questo è stato messo in risalto da studi in cui sono state utilizzate piante di *A. thaliana* transgeniche, nelle quali la presenza di una mutazione impediva la corretta espressione della proteina P5CS, enzima chiave nella sintesi della prolina dal glutammato. In queste piante l'applicazione di L-prolina esogena permetteva di sopprimere i fenotipi che presentavano ipersensibilità agli stress dovuti al graduale abbassamento dell'umidità relativa e una morfogenesi alterata delle foglie e dell'infiorescenza, dimostrando come l'accumulo di questo aminoacido sia necessario per un'adeguata tolleranza ai mutamenti ambientali (Nanjo et al., 1999). Piante che subiscono stress abiotici, come ondate di calore e deficit idrico, rischiano di subire danni da foto-inibizione del PSII e danneggiamenti alle membrane dei cloroplasti per via dell'azione dovuta ai ROS. In un caso studio a riguardo su *Arabidopsis thaliana*, si è rilevato che l'applicazione fogliare di prolina possa mitigare i danni da stress ossidativo, incrementando la capacità antiossidante dei tessuti. Ciò è stato quantificato osservando l'aumento di concentrazione dei livelli di prolina libera e di zuccheri solubili nei tessuti delle piante trattate e sottoposte a stress idrico, rispetto ai controlli e alle piante esclusivamente

stressate. Il consumo e l'inibizione dei radicali liberi, dovuta all'accumulo di prolina, ha conseguentemente permesso una riduzione delle concentrazioni di malondialdeide (MDA), composto marker della perossidazione lipidica, con un parallelo miglioramento delle performance del tasso di trasporto degli elettroni del PSII e del quenching non-fotochimico (Moustakas et al., 2011). Simili osservazioni sono state riportate da casi studio su barbabietola da zucchero (Ghaffari et al., 2019), in cui piante sottoposte a diversi gradi di deficit idrico sono state valutate in risposta a trattamenti fogliari di prolina. A seguito del trattamento, le piante sottoposte a stress hanno tutte mostrato accumuli di prolina, uno stimolo alla crescita e contenuti idrici fogliari relativi (RWC) più elevati rispetto ai controlli. In accordo alla letteratura sull'argomento, l'applicazione fogliare di prolina ha stimolato l'incremento di enzimi antiossidanti ubiquitari nelle piante, garantendo maggiore protezione alle strutture cellulari lipidiche, quantificata tramite i livelli di MDA nei tessuti e ha prodotto incrementi significativi del contenuto di clorofille, di carotenoidi e di antocianine nelle tesi sottoposte a stress. Gli autori sottolineano dunque l'importanza della prolina come antiossidante ma anche come possibile molecola segnale di stress abiotici, che indurrebbe modifiche nell'osmo-regolazione cellulare, in questo caso determinando accumulo di zuccheri solubili, per far fronte a possibili danni ossidativi ai foto-sistemi e alle membrane degli organelli. Viceversa gli effetti dell'applicazione esogena di prolina in piante di *Arabidopsis thaliana* cresciute in condizioni ottimali possono determinare riduzioni del tasso di trasporto degli elettroni del PSII, conducendo anche alla sua inibizione dovuta all'eccessiva riduzione dei plastochinoni (PQs). La prolina è infatti coinvolta nella regolazione del rapporto $NADP^+/NADPH$, pertanto si evidenzia la sua stretta relazione con il corretto funzionamento della fotochimica dei foto-sistemi e del suo ruolo diretto nella modulazione dello stato ossido-riduttivo dello stroma, da cui dipende il controllo dei livelli di ROS alle soglie ottimali (Sperdouli e Moustakas., 2015). Queste osservazioni tendono ad avvalorare la tesi per cui, oltre alla capacità di indurre tolleranza agli stress abiotici tramite bilanciamento del potenziale osmotico, la prolina sia implicata nelle funzioni di regolazione dei segnali mediati dai ROS e dei flussi di elettroni negli apparati fotosintetici, denotando tuttavia che accumuli eccessivi di questo amminoacido potrebbero portare a conseguenze deleterie. Infatti è stato anche dimostrato che apporti eccessivi di prolina risultano tossici in *A. thaliana* e che l'accumulo in pianta sia dose-dipendente (Nanjo et al., 2003). Ciò si è ottenuto tramite l'utilizzo di mutanti con il gene *AtProDH* difettivo, nei quali non avveniva la corretta sintesi dell'unico enzima funzionale in grado di degradare la prolina regolandone la concentrazione cellulare, la prolina deidrogenasi. Trattamenti sui mutanti inducevano accumuli di prolina a tal punto da causare reazioni di ipersensibilità e una severa inibizione alla crescita dei germogli e delle radici, rispetto alle piante wild-type. Casi studio su senape indiana (*Brassica juncea*) hanno evidenziato che l'effetto della prolina esogena sia dose dipendente e che le piante possano pertanto avere un optimum oltre il quale i benefici vengano resi meno evidenti. In questi lavori si osserva come il trattamento a base di prolina abbia dei benefici sulla crescita delle piante, in termini di accumulo di biomassa, sull'attività di enzimi antiossidanti quali catalasi (CAT), perossidasi (POX) e super-ossido dismutasi (SOD), sulle performance fotosintetiche, in virtù di superiori livelli di conduttanza stomatica e di quantitativi di clorofille rispetto ai controlli posti nelle stesse condizioni. Per gli autori questo comportamento è stato attribuito alla maggiore tolleranza delle piante trattate agli stress ossidativi, che ha garantito una crescita

migliore e livelli di fotosintesi netta più elevati (Wani et al., 2017). Gli stessi autori hanno anche evidenziato come la prolina possa agire per alleviare gli stress da eccesso di sale in senape indiana, stimolando l'attività dell'anidrasi carbonica (CA), la cui espressione genica viene modulata negativamente in presenza di eccessi di cloruro di sodio nel substrato di crescita (Wani et al., 2016). Nelle sezioni precedenti sono stati illustrati i possibili danni dovuti alle temperature estreme ed alle ondate di calore. Danni significativi sulla produttività si possono riscontrare anche su mais, in special modo se questi eventi di stress termico si verificano nelle fasi fenologiche maggiormente suscettibili. Si è discusso anche della possibilità dell'uso dei biostimolanti a base di idrolizzati proteici come possibile strumento per far fronte a queste problematiche. A tal proposito sono molti i casi studio che utilizzano il mais come specie modello per analizzare gli effetti dell'applicazione esogena di questa tipologia di prodotti. In uno di questi (Vaseva et al. 2022), un PHs ricco in aminoacidi liberi, tra i quali anche la L-prolina, derivato da proteine vegetali è stato testato su applicazioni fogliari e radicali in condizioni di campo ed in coltura idroponica. Lo studio ha mostrato come il pretrattamento (priming) con questi prodotti, sia nel caso di piante trattate sottoposte a stress, che di quelle cresciute in condizioni standard, abbia inciso sulla mitigazione dello stress termico, andando a stabilizzare i processi metabolici maggiormente suscettibili. Infatti il trattamento ha consentito di stabilizzare a livelli simili a quelli dei controlli i quantitativi delle clorofille, in special modo la clorofilla a che risulta quella più facilmente degradabile e che abbia attutito l'impatto negativo delle ROS, dimostrato dalla minore concentrazione fogliare di enzimi quali SOD e POX. Infine, analisi di espressione genica hanno rilevato come l'effetto del priming alle diluizioni più alte effettuate, abbia stimolato e regolato positivamente la trascrizione dei geni afferenti alle heat shock protein (HSPs), alle deidrine (DHNs) e di alcuni gruppi di proteasi, che rappresentano i meccanismi tipici e ubiquitari che le piante mettono in atto per contrastare gli stress di questa tipologia. Soluzioni arricchite di idrolisati proteici e di aminoacidi liberi sono state testate in altri lavori, cercando di comprendere i possibili effetti sull'accrescimento radicale e la capacità di assorbimento dei nutrienti. L'applicazione di questi biostimolanti ha determinato maggiori concentrazioni di potassio e, nel caso dei PHs, anche di microelementi quali rame, zinco e manganese, ciò è probabile che sia stato determinato da una specifica induzione dei sistemi di trasporto e di effetti chelanti garantiti dalla struttura dei peptidi. Le differenti forme di azoto somministrate regolano in modo differenziale diverse famiglie di fattori di trascrizione correlati alla funzionalità della radice, alla sua crescita ed alla specializzazione di differenti tipi di radice. Sono stati anche modulati positivamente famiglie di fattori di trascrizione che giocano un ruolo centrale nelle risposte agli stress ambientali e alla carenza di nutrienti. In particolare, gli aminoacidi liberi forniti hanno indotto l'espressione di geni correlati alle risposte antiossidanti della pianta mediate dai ROS, come indicato in studi precedentemente esposti, e di specifici trasportatori di membrana di aminoacidi, peptidi, nitrato e ammonio. In particolare, i trattamenti hanno modulato positivamente trascritti coinvolti nei sistemi di assorbimento dell'azoto in forma inorganica, tra cui quelli di trasporto inducibili ad alta affinità (iHATS), mentre siano stati regolati negativamente quelli a bassa affinità sia per il nitrato che per l'ammonio (Santi et al., 2017). Questa tendenza è stata confermata anche in altri studi, in cui germogli di mais sono stati fatti crescere in soluzioni arricchite con PHs a base di aminoacidi liberi e sottoposti a stress abiotici combinati (ipossia, eccessi di salinità e carenza di azoto), evidenziando una chiara

tendenza ad esprimere geni che codificano per membri della famiglia dei trasportatori dell'azoto ad alta intensità (geni NRT2 e NAR), specialmente nelle piante sottoposte a stress combinati ed in situazioni di carenza di azoto; così come è stata rimarcata la capacità di questi Phs di fungere da primer per aumentare in modo preventivo la tolleranza a possibili stress ossidativi, inducendo l'espressione di geni che codificano per l'enzima superossido dismutasi (SOD1A). In questo contesto si è notato inoltre come l'applicazione del prodotto abbia permesso di ripristinare il fenotipo dell'architettura radicale delle piante cresciute in condizioni ottimali, sia in termini di lunghezza, che di peso dell'intera radice che delle radici laterali (Trevisan et al., 2019). Da notare il fatto che in assenza di stress molti degli effetti positivi esposti non si verificano o, in ogni caso, vi siano cambiamenti poco significativi. Sebbene siano tantissimi ormai i lavori in letteratura che riportano effetti positivi dei biostimolanti a base di componenti derivate da basi proteiche, è bene evidenziare ancora una volta il fatto che non si possano generalizzare i meccanismi di azione e non si possano fare assunzioni semplicistiche a riguardo. Nel caso dei PHs è infatti molto importante conoscere le composizioni del prodotto e la provenienza dei substrati proteici destinati all'idrolisi enzimatica. Studi che si basano su approcci metabolomici, come descritto anche nella sezione precedente, hanno il pregio di mostrare proprio le differenze tra prodotti biostimolanti mettendo in risalto profili differenziali di numerosi composti, ottenuti da analisi tissutali, che vengono ritenuti coinvolti e direttamente collegati alle conseguenze di attività biologica innescata da differenti trattamenti. Uno studio su pomodoro a riguardo, ha mostrato come l'applicazione fogliare di cinque differenti PHs derivati da differenti famiglie tassonomiche di vegetali possa condurre a risultati simili in ambiti morfogenetici e opposti in quelli metabolici. In particolare si è confermata la diretta modulazione di tutti i biostimolanti testati sul metabolismo primario, ma che fossero presenti dei profili diversificati nel caso dell'accumulo di sostanze del metabolismo secondario come fenilpropanoidi, alcaloidi e glucosinolati, in base alla famiglia botanica di provenienza del prodotto. Simili tendenze sono state riportate nel caso dell'induzione dei profili ormonali. Tutti i PHs presi in esame hanno mostrato attività simil ormonale, hanno regolato in modo negativo il contenuto dei brassinosteroidi nella radice, determinando cambiamenti nei processi a capo dello sviluppo dell'apparato radicale coordinati dai principali fitormoni (auxine, gibberelline e citochine) e dall'attività dei loro trasportatori, tuttavia si sono riscontrate differenze di rapporti di concentrazione degli ormoni nei profili metabolici, che indicano come composizioni proteiche di biostimolanti distinte agiscano con meccanismi ancora da chiarire (Ceccarelli et al., 2021). Per terminare la breve trattazione degli effetti positivi dei biostimolanti presi in esame, si descriveranno quelli determinati dalle applicazioni fogliari di estratti di lieviti con alcuni esempi su colture modello e di interesse alimentare, con particolare attenzione agli stress dovuti ai deficit idrici. In questo contesto è di particolare rilevanza riportare casi studio in cui si sono effettuate delle prove di campo, su colture in cui i danni abiotici possono impattare molto negativamente sulla produttività. In frumento tenero si riporta un caso (Hammad e Ali., 2014) in cui si è osservato che l'interazione tra stress abiotici, quali deficit idrico da modesto a severo, e applicazioni di biostimolanti fogliari a base di estratti di lieviti ha determinato delle ricadute molto positive in termini di resilienza e tolleranza rispetto ai controlli non trattati. Gli impatti fortemente negativi della carenza idrica sull'altezza dei culmi, sul numero di cariossidi per pianta, sul numero di foglie e area fogliare per pianta, sono

stati significativamente mitigati dai trattamenti e gli autori hanno attribuito ciò, in accordo con la letteratura, anche in virtù del supplemento di fitormoni (auxine e citochinine) naturalmente prodotti dai lieviti e di altre molecole di grande valore nutrizionale, come aminoacidi, alcaloidi, vitamine, enzimi, che hanno permesso di rafforzare le piante nelle fasi di crescita, distensione cellulare e di fioritura. Si riportano ancora effetti significativi sui parametri dello stato idrico della pianta, in particolare un miglioramento del contenuto idrico relativo, delle pressioni osmotiche e dell'integrità delle membrane, che hanno consentito maggior turgore cellulare. La mitigazione degli stress abiotici è stata infine confermata da alcuni parametri molto indicativi come il mantenimento del contenuto delle clorofille totali a livelli più elevati rispetto ai controlli stressati, lo stimolo all'accumulo di sostanza solubili (zuccheri, aminoacidi e fenoli), superiore attività degli enzimi perossidasi e fenol-ossidasi e una riduzione dei livelli di prolina libera. Quest'ultima osservazione determina in modo inequivocabile che il trattamento abbia garantito maggiore resilienza e protezione all'attività di crescita, poiché nelle piante sotto stress l'accumulo di prolina è sempre stato osservato e in generale viene ritenuto un chiaro segnale di cambiamenti metabolici e di regolazioni osmotiche per fronteggiare il deficit idrico, come indicato in articoli su *Arabidopsis thaliana* (Gurrieri et al., 2020). Questa tendenza è stata osservata anche in altre colture. In aglio (Abdelaal et al., 2021), in studi di pieno campo, trattamenti fogliari a base di soli estratti di lieviti ed in combinazione con chitosano, hanno evidenziato gli stessi effetti di mitigazione e di stimolo alla produzione espressi poco prima rispetto a delle tesi di controllo a cui era stato imposto un deficit idrico, riducendo gli interventi di irrigazione. I trattamenti hanno ridotto i danni ossidativi alle strutture cellulari mediati dai ROS, certificate da riduzione marcate della presenza di MDA nei tessuti analizzati, dei livelli più bassi di perossido di idrogeno e super-ossido e della minore attività biologica dei maggiori enzimi con attività antiossidante, quali SOD, POX, CAT. Da rilevare anche in questo caso come i livelli di prolina libera, il cui accumulo è ritenuto un marker di segnalazione ed espressione genica nei casi di percezione di condizioni di stress abiotico potenzialmente dannosi, siano calati a seguito dell'applicazione dei biostimolanti e di come il loro effetto combinato possa indurre un risultato protettivo maggiore contro gli stress da deficit idrico. Applicazioni di prolina libera ed estratti di lievito hanno mostrato effetti simili anche in studi condotti su piante di peperone sottoposte a stress osmotico tramite irrigazione con acqua arricchita in cloruro di sodio a differenti concentrazioni (Abdelaal et al., 2020). Trattamenti fogliari preventivi di prolina pertanto garantiscono un effetto di mitigazione significativo degli stress osmotici e ossidativi determinati da deficit idrico oppure da effetti di salinizzazione. Questo comportamento è supportato dalle evidenze che indicano come questo aminoacido si accumuli naturalmente nelle piante sottoposte a stress abiotici. I trattamenti inducono nella pianta uno stato di allerta che consente di rispondere in modo più rapido a condizioni ambientali o pedologiche avverse. Il mantenimento di buoni livelli del contenuto delle clorofille e la capacità protettiva fornita alle membrane cellulari e ai foto-sistemi permette alle piante di riprendere più prontamente le attività fotosintetiche nelle fasi di recovery (remissione dei vincoli ambientali di stress) ed è dovuto principalmente all'attività di questa molecola di inattivare le ROS e modificare attivamente pathway metabolici utili alla sopravvivenza delle piante, come più volte indicato. Insieme ad altri biostimolanti con funzioni sovrapponibili e più spiccatamente vocate allo stimolo della crescita cellulare, come gli estratti di lieviti, può certamente

essere considerato un valido prodotto e strumento per far fronte all'impatto del cambiamento climatico sulle colture. Infine non è da escludere che i trattamenti fogliari a base di estratti di lieviti possano innescare meccanismi di difesa innata contro i patogeni nelle piante. In uno studio a riguardo su *Arabidopsis thaliana* (Moon et al., 2015), gli autori hanno osservato e dimostrato infatti che frammenti non proteici delle pareti cellulari dei lieviti, composti essenzialmente di polisaccaridi, mannoproteine, β -glucani e chitina, vengano percepiti dalle piante come PAMP (pathogen-associated molecular pattern) inducendo reazioni di immunità legate all'espressione di geni correlati alle risposte di difesa (PR1 ed EDS5) contro potenziali infezioni. Stesse indicazioni sono pervenute da altri studi, sempre condotti su *A. thaliana*, che hanno dimostrato gli effetti protettivi contro patogeni fungini e batterici, scaturiti da meccanismi di resistenza indotta (ISR), ipotizzando ulteriori applicazioni nel campo del controllo delle fitopatie (Narusaka et al. 2015).

1.5 Casi studio sull'utilizzo di biostimolanti in *Vitis vinifera*

In questa sezione tratteremo specificatamente alcuni casi studio di interesse riguardanti gli effetti delle applicazioni fogliari di biostimolanti a base di estratti di lieviti inattivati e di prolina sulle risposte fisiologiche della vite, concentrandoci maggiormente sugli stress abiotici. Considerando gli articoli illustrati nelle sezioni precedenti, si era già anticipato come uno dei meccanismi di azione principali dei lieviti inattivati fosse quello di innescare risposte di difesa correlate agli stress ambientali fungendo da elicitore. Uno studio precedentemente citato (Gutiérrez-Gamboa et al., 2018) infatti mostrava come l'applicazione fogliare di questa tipologia di prodotti potesse determinare concentrazioni più elevate di clorofille e di carotenoidi, rispetto alle viti non trattate, in modo anche molto marcato, in base però a differenze varietali. Gli autori ipotizzano che questo sia dovuto appunto al meccanismo di induzione dei circuiti di difesa contro gli stress ambientali, legati allo stimolo di enzimi direttamente coinvolti nella biosintesi di composti del metabolismo secondario, tra cui i carotenoidi, come la β -carotene ketolasi ed al ciclo della zeaxantina. In letteratura attualmente non sono molti gli studi di pieno campo che hanno indagato l'uso degli estratti di lieviti a scopo di protezione verso specifiche criticità ambientali, in ogni caso in alcuni di questi lavori (Portu et al., 2016) si propende per confermare l'azione di questi ultimi come induttori di resistenza contro patogeni e stress abiotici. Il meccanismo principale è quello appunto di determinare accumuli di composti fenolici, che hanno anche la funzione di fitoalessine. In particolare modo, si è osservato che le applicazioni fogliari di lieviti inattivati possano agire in maniera simile alle conseguenze dell'incremento dell'acido jasmonico (JA) nei tessuti, uno dei composti più rilevanti nella modulazione di risposte difensive contro attacchi patogeni. Sia JA che gli estratti di lieviti inattivati stimolano la biosintesi dei composti fenolici tramite il pathway dei fenil-propanoidi, regolando positivamente l'attività dell'enzima PAL (Phenylalanine ammonia lyase), che catalizza la trasformazione della fenil-alanina in acido cinnamico. Gli autori hanno confermato questa tendenza, rilevando incrementi del contenuto di stilbeni, resveratrolo e di flavonoidi, soprattutto di antocianine, nelle bacche delle piante trattate. Il meccanismo di azione si articola pertanto nelle risposte di difesa legate al riconoscimento di molecole non-self e correlate alle strutture di molte pareti cellulari di patogeni fungini, come chitine, glucani e mannoproteine, che fungono da innesco per l'accumulo di composti antiossidanti ed antimicotici, in grado inoltre di svolgere una funzione protettiva nei confronti degli apparati fotosintetici e delle clorofille (Gutiérrez-Gamboa et al., 2018). Il

meccanismo di resistenza può avere inoltre dei riflessi positivi sulle proprietà meccaniche delle bacche. Infatti, osservazioni a riguardo (Giacosa et al., 2019), hanno evidenziato come applicazioni fogliari di lieviti inattivati su differenti cultivar potessero migliorare la durezza e lo spessore dell'epicarpo dei frutti. Si ipotizza che questi effetti sulla consistenza delle cuticole possano garantire minore suscettibilità ad attacchi fungini, mitigazione dei danni fisici a carico delle bacche ed un migliore affinamento dei vini, per via di una maggiore estrazione delle antocianine e di altri composti fenolici che si accumulano nei tessuti superficiali dei frutti. Considerando questo, l'applicazione degli estratti di lieviti in via preventiva potrebbe garantire un miglioramento delle capacità della vite di tollerare gli effetti deleteri del deficit idrico e degli stress ossidativi, per via di accumuli di pigmenti con una spiccata funzione antiossidante e di foto-protezione, garantendo contestualmente performance di fotosintesi netta migliori nelle fasi di remissione dei vincoli ambientali alla crescita (recovery). Come descritto in precedenza, la prolina è un aminoacido che si accumula nei tessuti delle piante, in particolar modo nelle foglie, a seguito della percezione di stress abiotici in grado di compromettere l'omeostasi cellulare. Questo avviene in tutti i casi in cui l'integrità strutturale delle membrane cellulari può essere danneggiata, dando luogo a disfunzionalità dell'attività di fotosintesi ed alla formazione di ROS. Anche in vite l'accumulo di prolina rappresenta un meccanismo di risposta e di protezione contro i radicali liberi, garantisce una corretta osmo-protezione ed integrità dei diversi comparti cellulari a base lipidica. L'aumento dei livelli di prolina consente alla vite di mantenere il corretto flusso idrico in caso di deficit idrico ed eccessi di salinità, regolando il potenziale osmotico intracellulare ed extracellulare, riducendo così lo stress osmotico. In uno studio condotto su ibridi del genere *Vitis* (Li e Wang., 2021), sottoposti a stress da freddo, che determina in vite risposte assimilabili a quelle date da altri stress da temperature estreme, applicazioni fogliari di acido salicilico (SA) hanno stimolato accumuli di zuccheri solubili e prolina nel mesofillo, testimoniando come questo ormone sia evidentemente correlato al metabolismo di quest'ultima. Il parallelo accumulo dose dipendente di prolina in base all'incremento delle concentrazioni di SA fornite alle viti, conduce ad un netto stimolo dell'attività degli enzimi antiossidanti quali SOD, POD e CAT, alla contestuale riduzione dei danni da stress ossidativi e al mantenimento di livelli di clorofille totali più elevate rispetto ai controlli. In letteratura (Oraei et al., 2019), si è anche osservato che la risposta della vite ad applicazioni esogene di acido salicilico in condizioni di crescita contraddistinte da eccessi di cloruro di sodio, e conseguenti stress osmotici, conduca alle stesse osservazioni esposte prima nei riguardi della prolina, dimostrando inoltre che l'accumulo di questo aminoacido nei tessuti sia proporzionale all'entità dello stress subito, accumulandosi in modo dose-dipendente. Queste osservazioni rappresentano ulteriori conferme sulla stretta relazione tra prolina ed i feedback provenienti dalle variazioni delle concentrazioni cellulari di fitormoni, come l'acido salicilico, che modulano l'espressione dei geni correlati alla tolleranza agli stress ambientali. Con la sua azione di induttore di resistenza, la prolina, innesca dunque un complesso meccanismo di detossificazione dei ROS, all'interno del quale sono coinvolti molti enzimi, la cui attività viene strettamente modulata nelle viti sottoposte a stress. Questo efficiente sistema di protezione consente di rendere inerte il perossido d'idrogeno a diverse concentrazioni tramite l'azione delle catalasi e dell'ascorbato perossidasi (APX) e converte i radicali superossido in perossidi che vengono ulteriormente complessati dalle perossidasi. Il sistema menzionato si completa ulteriormente attraverso lo

stimolo, mediato dall'incremento della concentrazione di prolina nei tessuti fogliari, alla produzione di composti polifenolici, tra i quali le antocianine, che contribuiscono a ridurre gli stress ossidativi e contrastare l'accumulo di radicali liberi, accumulandosi nelle cellule epidermiche (Gohari et al., (n.d.)). Studi comparativi (Irani et al., 2021) sull'azione di differenti biostimolanti su viti sottoposte a deficit idrico controllato hanno mostrato come in tutti i casi in cui alle piante stressate venga fornito un biostimolante ad applicazione fogliare, tra i quali anche mix di aminoacidi, vengano rilevati incrementi significativi di prolina. Questo processo è contestualmente accompagnato da accumuli di carboidrati e proteine con funzione osmo-protettiva, dall'incremento del contenuto di fenoli totali e di acido abscissico (ABA) nei tessuti fogliari, ormone chiave nella regolazione dell'apertura e chiusura stomatica. Lo stress idrico conduce alla riduzione del peso delle bacche e ad alterazioni del contenuto degli zuccheri solubili e dell'acidità titolabile, determinando scadimenti qualitativi del prodotto. Le risposte fisiologiche della vite, nei casi di induzione di resistenza, permettono di mitigare queste conseguenze negative migliorando l'efficienza d'uso dell'acqua (WUE) ed il potenziale idrico, mantenendo contenuti idrici più elevati nelle foglie e nei frutti. Il sistema antiossidante enzimatico e non enzimatico, modulato dalla prolina, permette una diminuzione dei danni dovute alle perossidazioni lipidiche e dalla degradazione dei pigmenti fotosintetizzanti, certificato dai contenuti più elevati delle clorofille totali nelle piante sotto stress idrico rispetto ai controlli. Lo stress idrico induce una forte espressione dei geni correlati alle fasi terminali di biosintesi della prolina, che codificano per l'enzima P5CR (pyrroline-5-carboxylic acid reductase), come osservato in piante transgeniche di *A. thaliana* dotate del gene *VyP5CR* di *Vitis yeshanensis*, omologo al 99% con quello di *V. vinifera* (Chen et al., 2021). In questo studio si è anche osservata la regolazione positiva di questo gene dall'ABA, in seguito ad applicazioni esogene, mostrando come la sovra-espressione in piante di *A. thaliana* garantisca una notevole capacità di contrasto al deficit idrico ed una migliore ripresa della crescita rispetto ai wild-type nelle fasi di recovery. La variazione dei livelli di prolina pertanto, oltre a fungere da marker di stress abiotici in vite, rappresenta, nel caso dell'induzione di resistenza, un meccanismo efficace di contrasto ai vincoli ambientali per la crescita e per la produttività anche in *Vitis vinifera*.

2. Scopo dello studio

Questo studio ha avuto come principale obiettivo l'osservazione degli effetti sulle risposte fisiologiche e produttive di alcuni biostimolanti ad applicazione fogliare nella specie modello *Arabidopsis thaliana* e *Vitis vinifera*, varietà Sauvignon-Blanc, a seguito dell'imposizione di deficit idrico controllato. Nel caso studio su *A. thaliana*, sono stati utilizzati dei formulati in fase di brevetto composti da miscele di derivati di lieviti inattivati (*Saccharomyces cerevisiae*). Nel caso studio su *Vitis vinifera*, sono stati valutati due prodotti recentemente immessi sul mercato: Lalvigne Resiliens e Lalvigne Prohydro. Nell'esperimento eseguito presso l'azienda agraria Lucio Toniolo, oltre ai due prodotti tal quali, è stata anche valutata la risposta delle viti all'effetto combinato dei due, per indagare potenziali effetti additivi o sinergici. Nell'esperimento di pieno campo, presso l'azienda agraria Cescon, si è valutato l'effetto di un unico prodotto, il Lalvigne Prohydro, su cultivar Glera. In tutti i casi i biostimolanti sono stati forniti dalla ditta Lallemand. Lo schema messo a punto per le analisi sulla tolleranza allo stress idrico è stato calibrato su *A. thaliana* e poi adattato per la successiva

sperimentazione su vite, in condizione semi-controllate. L'esperienza sulla specie modello è stato portato avanti in camera di crescita ed ha previsto l'utilizzo di cinque differenti miscele. Lo stress idrico è stato indotto tramite metodo gravimetrico, mantenendo il contenuto idrico del substrato di crescita ad un target del 30%. I rilevamenti strumentali hanno riguardato l'andamento dell'accumulo di biomassa, valutato tramite piattaforma di fenotipizzazione, misurazione della conduttanza stomatica (gs) e della quantificazione della distribuzione del perossido di idrogeno nei tessuti fogliari di *A. thaliana*. Infine è stata condotta un'analisi molecolare per la valutazione dell'espressione genica di RAB18, un gene conosciuto la cui attività è regolata dagli stress abiotici. Il primo caso studio su vite si è caratterizzato di un esperimento fattoriale a 4 blocchi completamente randomizzati, eseguito in condizioni semi-controllate, nel quale le viti sono state suddivise in 4 tesi e trattate secondo le modalità consigliate dall'azienda produttrice. Lo stress idrico controllato è stato avviato durante la fase di pre-invasatura, fissando il contenuto idrico del substrato di crescita al 30% della CC; le tesi sono state divise in sottogruppi definiti well watered (WW) e water stress (WS). Per l'esperimento di pieno campo, sono stati definiti quattro blocchi, da due filari affiancati e consecutivi. Sono state definite per ogni blocco 2 tesi, quella trattata (T) ed il rispettivo controllo (CT). Le risposte fisiologiche della vite sono state monitorate tramite misurazione della conduttanza stomatica (gs), dell'efficienza del foto-sistema II, del potenziale idrico fogliare (LWP) e tramite la quantificazione dei pigmenti fogliari. Le analisi sono state completate da rilevamenti sulla qualità delle bacche (grado zuccherino ed acidità titolabile) e monitoraggio sulla pezzatura degli acini, peso dei grappoli e sul diametro medio bacca. Nell'esperimento in condizioni controllate, è stata monitorata la crescita settimanale di una pianta rappresentativa per sottogruppo, ricavando informazioni sull'incremento dell'area fogliare, della lunghezza del germoglio principale e delle femminelle. Gli obiettivi principali dello studio si sono concentrati sulla possibile induzione di resistenza al deficit idrico imposto e sulla capacità delle piante trattate di riprendere una crescita ottimale alla remissione dei vincoli dati dallo stress idrico (recovery). La maggiore frequenza di eventi critici, come la siccità e le ondate di calore, può determinare gravi conseguenze sulla produttività delle viti, pertanto si ritiene che fare affidamento su formulati che garantiscano maggiore resilienza verso queste problematiche diventerà, nel prossimo futuro, sempre più necessario. Considerando, inoltre, i potenziali effetti negativi sulla qualità delle bacche causate dal cambiamento climatico, lo studio ha permesso di valutare possibili effetti secondari dei biostimolanti in oggetto sui frutti. Questo tipo di indagini rappresenteranno in futuro un ambito di ricerca sempre più rilevante per la caratterizzazione di nuovi prodotti utili per la viticoltura.

3. Materiali e metodi

3.1. Caso studio su *Arabidopsis thaliana*

3.1.1 Descrizione schema sperimentale e obiettivi

Le prove sperimentali effettuate su *Arabidopsis thaliana* sono state condotte in laboratorio presso i locali del dipartimento DAFNAE, nel campus di Agripolis, Legnaro (PD). L'esperimento si componeva di 6 repliche in totale ed è stato progettato per testare delle miscele di biostimolanti a base di estratti di lieviti inattivati (*Saccharomyces cerevisiae*) e di amino acidi liberi, fornite dalla ditta Lallemand, per determinare gli effetti sull'accrescimento in biomassa, sui livelli di traspirazione e sull'espressione di geni coinvolti nella risposta

agli stress abiotici, in piante sottoposte a stress idrico controllato. In aggiunta a questo, nelle ultime due repliche è stata anche effettuata la quantificazione della distribuzione del perossido di idrogeno fogliare. L'impostazione degli esperimenti si è configurata con applicazioni fogliari di 5 prodotti biostimolanti in fase di brevetto e di una tesi di controllo non trattata. I trattamenti sono stati effettuati una prima volta alla fase fenologica di completa formazione della rosetta fogliare ed una seconda volta 4 giorni dopo, su gruppi omogenei di dieci piante, andando a definire così sei tesi differenti (CTR, T1, T2, T3, T4, T5). Contestualmente, metà delle piante di ogni tesi sono state sottoposte a riduzione del contenuto idrico del substrato di crescita fino al 30% della capacità idrica stimata.

Si sono, pertanto, definiti 12 sottogruppi, all'interno dei quali si sono distinte le tesi con contenuto idrico del suolo mantenuto superiore all'80%, definite ben idratate (WW, *well watered*) e quelle sottoposte a stress idrico (WS, *water stress*). L'imposizione dello stress idrico controllato è stata effettuata mediante metodo gravimetrico, procedendo a rifornire il contenuto idrico traspirato dalla pianta in base al peso giornaliero di ogni cilindro di substrato di crescita, proporzionato in base ad una tara standardizzata sia per le tesi WW che per le WS. L'accrescimento della biomassa delle piante è stato ricavato mediante la determinazione della superficie fogliare stimata in pixel, tramite il protocollo di fenotipizzazione Phenotiki. Lo stress idrico imposto si è protratto per una settimana e nell'arco di questo periodo le valutazioni sulla traspirazione sono state effettuate mediante letture della conduttanza stomatica utilizzando un porometro (mod. LI-600, Li-cor. Inc., Nebraska, US), le cui funzionalità e specifiche saranno esposte nelle sezioni seguenti. In questa fase sono state effettuate due letture per piante su due foglie differenti e opposte dello stesso palco al mattino, per verificare lo stato di idratazione massima poche ore dopo aver attivato l'illuminazione nella camera di crescita. La prima lettura è stata fatta il giorno precedente rispetto alla prima applicazione fogliare dei prodotti biostimolanti e l'ultima cinque giorni dopo il termine del periodo di deficit idrico controllato, per osservare il comportamento delle diverse tesi nelle fasi di recupero (*recovery*) dell'attività di crescita, per via del ristabilito contenuto idrico del substrato. La conduttanza stomatica è sempre stata misurata prima della somministrazione dell'acqua necessaria per mantenere il contenuto idrico del substrato alle capacità stabilite. Si ritiene necessario menzionare che le informazioni riportate ed il contributo personale all'esperimento riguardano esclusivamente la replica numero 6, pertanto il lavoro ed i risultati non saranno inseriti integralmente. Lo schema esposto è stato utilizzato come base per la progettazione dell'esperimento successivo sulla vite e per la calibrazione dello stress idrico controllato. Nel caso della replica 6, i trattamenti fogliari sono stati effettuati con un dosaggio 3.34 g/L e di 0.42 g/L per la tesi numero 5.

3.1.2 Materiale vegetale adoperato

Semi di *Arabidopsis thaliana* wild type sono stati fatti germinare in vitro e poi trasferiti in substrati di coltura omogenei e posti in camera di crescita. Per tutta la durata dell'esperimento sono stati utilizzati i cilindri di substrato specifico per coltivazione di giovani piante Agropot, forniti dalla ditta Agrochimica. I cilindri avevano uno spessore di 25 mm e sono stati forniti insieme a vassoi di plastica con specifiche alveolature nei quali sono state effettuate e condotte tutte le operazioni di coltura e di analisi.

3.1.3 Protocollo di fenotipizzazione

Il monitoraggio della crescita delle piante è stato condotto tramite la piattaforma di fenotipizzazione Phenotiki. Si basa su di una piattaforma che consente di determinare e analizzare la crescita delle piante tramite l'acquisizione di immagini utilizzando un quadro di rilevamento. L'acquisizione delle foto avviene tramite un dispositivo di imaging e poi queste vengono memorizzate sul dispositivo stesso o scaricate su una workstation locale. Utilizzando il software standalone fornito dall'azienda produttrice, le immagini possono essere esplorate da un pc in locale. Il sistema di analisi consente di delineare il contorno delle piante per determinarne l'area fogliare e calcolare anche il tasso di crescita relativo o il numero di foglie. Le analisi dei tratti fenotipici vengono effettuate dal software proprietario, che consente tuttavia anche un'esportazione dei dati per analisi personalizzate (a).

3.1.4 Quantificazione della distribuzione del perossido di idrogeno

La rilevazione fogliare del perossido di idrogeno (una delle principali ROS) è stata effettuata tramite un protocollo standardizzato (Daudi e O'brien. (2012)). Queste analisi sono state condotte per poter osservare visivamente la distribuzione delle specie reattive dell'ossigeno formatesi nelle foglie mature della rosetta di *Arabidopsis thaliana* a seguito dello stress dato dal deficit idrico. Si tratta di una metodologia di analisi distruttiva ed è stata fissata al termine di tutte le altre procedure dell'esperimento. La caratterizzazione visiva avviene perché il composto 3,3'-diaminobenzidina (DAB) utilizzato nel protocollo, viene ossidato dal perossido di idrogeno presente nel mesofillo e precipita come composto di colore scuro, fungendo da colorante utile per il rilevamento. La procedura si compone di tre fasi specifiche: preparazione della soluzione colorante con il DAB, incubazione delle foglie selezionate nella soluzione ed infine analisi al microscopio ottico, dal quale sono state ricavate delle foto per confrontare i danni subiti dalle tesi WS rispetto a quelle WW. Sono state utilizzate sia foglie più giovani, del secondo palco fogliare, che foglie più mature della rosetta principale. L'incubazione nella soluzione colorante è durata 24h.

3.1.5 Valutazione espressione genica di RAB18

La purificazione e l'estrazione dell'RNA dalle foglie di *Arabidopsis thaliana* sono state completate tramite Spectrum™ Plant Total RNA Kit (b). Questo kit è molto utile soprattutto per tessuti vegetali ricchi di tannini o composti fenolici che potrebbero interferire con il procedimento di estrazione. Il materiale vegetale di partenza è stata tutta la parte epigea delle piante di *Arabidopsis thaliana*, conservata e poi triturrata finemente tramite mortaio in azoto liquido, mantenendo pertanto la catena del freddo. Il prodotto macinato viene degradato in una soluzione di lisi che rilascia l'RNA e inattiva le ribonucleasi. L'RNA viene trattenuto in un legante e successivamente purificato tramite una soluzione di lavaggio, per evitare che polisaccaridi o altre impurità possano alterare le analisi. Le impurità residue e la maggior parte del DNA genomico vengono rimosse dalle soluzioni di lavaggio da uno step specifico in cui vengono aggiunti 10 µL di DNAsi (una nucleasi per la digestione del DNA) per ciascun campione. La procedura consente rese di RNA nell'ordine dei 20-60 µg, in base al tessuto di partenza (c). Una volta purificato, l'RNA è pronto per la RT-PCR. Il gene RAB18 è un gene che codifica per proteine idrofiliche ricche in glicina in *Arabidopsis thaliana*, che rientra nella famiglia dei geni inducibili dall'acido abscissico (ABA). L'esposizione agli stress abiotici, come il deficit idrico,

favoriscono la sintesi delle proteine codificate da questo gene, che svolgono un ruolo di osmo-protezione e si accumulano in risposta ad esposizione al freddo oppure in fasi di graduale disidratazione dei tessuti (L'fing e Tapio, 1992). L'applicazione esogena di ABA ha mostrato la capacità di indurre l'espressione di geni correlati al contrasto degli stress ambientali e ciò è stato evidenziato anche in risposta a sostanze che mostrano struttura chimica simile (Jakab et al., 2005). L'obiettivo dell'esperimento era appunto quello di osservare se alcuni dei biostimolanti utilizzati per i trattamenti potessero svolgere la funzione di primer chimico ed indurre preventivamente risposte di difesa indotte in *Arabidopsis thaliana*, mediate da cambiamenti degli assetti ormonali e dalle variazioni del potenziale idrico, che potessero avere un effetto positivo nel contrasto dello stress idrico indotto. Tuttavia le analisi statistiche condotte sui risultati di quantificazione dell'espressione genica di RAB18, nell'ambito della replica numero 6 dell'esperimento, non hanno mostrato differenze significative dei trattamenti rispetto ai controlli.

3.2 Caso studio su *Vitis vinifera* (Legnaro)

3.2.1 Descrizione schema sperimentale e obiettivi

La prova sperimentale sull'effetto dei prodotti biostimolanti testati su vite (*Vitis vinifera*) è stata condotta all'interno dell'azienda agraria Lucio Toniolo, nella sede del campus universitario di Legnaro (PD). Tutte le operazioni colturali e strumentali relative alla sperimentazione si sono svolte all'interno di un tunnel in film plastico in condizioni di crescita semi-controllate. A disposizione dello studio sono state fornite 177 piante e lo schema sperimentale si è basato sulla progettazione di quattro blocchi randomizzati, da 40 piante ciascuno. Il surplus di 17 viti è stato destinato esclusivamente alle operazioni di taratura dei volumi idrici necessari al mantenimento delle condizioni di stress idrico controllato dell'esperimento principale. Le 160 piante rimanenti sono state pertanto suddivise in quattro gruppi, ognuno dei quali è stato destinato ad un trattamento differente. Lo studio infatti verteva sulla valutazione degli effetti di due prodotti biostimolanti ad applicazione fogliare e della loro combinazione, il Lalvigne Resiliens ed il Lalvigne Prohydro, rispetto ad un controllo non trattato. In questo modo si sono venute a delineare quattro tesi a confronto, così denominate: RESI (tesi trattata con il prodotto Lalvigne Resiliens), PROH (tesi trattata con il prodotto Lalvigne Prohydro), KOMBI (tesi che valutava l'effetto combinato dei due trattamenti) e CTRL (controllo non trattato). Nello schema dell'esperimento descritto, si è programmata un'ulteriore divisione interna ai gruppi, laddove alla metà delle piante di ogni gruppo (dunque 20 piante per gruppo) è stato imposto uno stress idrico controllato, che ha comportato la graduale diminuzione del contenuto idrico del substrato, a partire dalla condizione di buona idratazione (*well watered*, WW) mantenuta superiore all'80% della capacità di campo (CC), fino ad una condizione di crescita fissata al 30%, per un periodo di 10 giorni. Al termine del periodo stabilito di stress idrico tutte le tesi sono state riportate e mantenute sopra la soglia dell'80% della CC e il monitoraggio si è protratto per una settimana seguente, precisamente nel periodo di recovery, per verificare la ripresa dell'attività di crescita. Alle quattro tesi precedentemente descritte se ne sono aggiunte così altre quattro: RS (RESI con stress idrico), PS (PROH con stress idrico), KS (KOMBI con stress idrico) e CS (CTRL con stress idrico). Nelle sezioni seguenti, per rapidità di esposizione, le tesi sotto stress idrico verranno tutte raggruppate con il termine WS (*water stress*), viceversa le tesi non sottoposte a stress saranno indicate come WW (*well watered*).

Per cercare di ridurre la variabilità dell'errore, in fase di analisi statistica, dovuta a possibili gradienti di temperatura e di luminosità che avrebbero potuto diversificare le condizioni di crescita, le tesi sono state definitivamente suddivise in 4 repliche di 5 piante ciascuna e disposte in modo randomizzato lungo due filari. Lo studio si è posto come obiettivo quello di verificare se i biostimolanti in oggetto, applicati come trattamento fogliare, potessero permettere alle piante trattate di tollerare meglio lo stress idrico rispetto al controllo, determinato in base all'incremento di biomassa e allo stato idrico fogliare, e verificare se vi fossero ricadute positive sulla qualità delle bacche, in termini di contenuto di zuccheri solubili, acidità titolabile e resa unitaria. Sono state pertanto condotte analisi morfologiche, con il monitoraggio settimanale dell'aumento di biomassa (lunghezza dei germogli e stima dell'area fogliare) delle tesi a confronto e della determinazione dell'area fogliare totale delle foglie principali e di quelle secondarie (analisi distruttiva effettuata dopo la vendemmia). Le risposte fisiologiche ai trattamenti ed allo stress idrico sono state determinate con il monitoraggio strumentale del potenziale idrico, della conduttanza stomatica e con la determinazione dei pigmenti fogliari (clorofille, antociani, flavonoli e contenuto di azoto fogliare). Le giornate dedicate all'attività di rilevamento sono state condotte prima, durante e alla fine del periodo di induzione dello stress idrico controllato.

3.2.2 Trattamenti effettuati

Lo studio effettuato ha preso in analisi gli effetti di due prodotti biostimolanti forniti dalla ditta Lallemand: Lalvigne Prohydro e Lalvigne Resiliens. Si tratta di due prodotti ad applicazione fogliare che sono stati sviluppati proprio per cercare di far fronte alle costanti e nuove sfide dettate dal cambiamento climatico e dalle ricadute negative, in termini di rese e di qualità, degli stress abiotici, soprattutto idrico e termico, sulla vite. Entrambi i prodotti derivano da lieviti enologici inattivati (*Saccharomyces cerevisiae*) e nel caso del Lalvigne Prohydro, vi è l'aggiunta di un estratto batterico (*Corynebacterium glutamicum*) ricco in L-prolina. Come indicato dall'azienda, il trattamento con quest'ultimo prodotto dovrebbe stimolare la biosintesi di prolina nei tessuti fogliari, migliorare l'osmo-regolazione per mantenere una maggiore idratazione dei tessuti fotosintetizzanti e diminuire i danni da foto-ossidazione. Quest'attività protettiva garantirebbe alle piante trattate di mantenere livelli più elevati di capacità fotosintetica ed evitare il rallentamento dello sviluppo nei periodi in cui si dovesse instaurare uno stress idrico di lungo termine, rispetto ai controlli non trattati e posti nelle medesime condizioni. Applicazioni fogliari, in anticipo ed in previsione di potenziali condizioni di deficit idrico, pertanto dovrebbero aumentare la tolleranza delle piante agli stress abiotici evitando danni permanenti agli apparati fotosintetici e consentendo una migliore resa rispetto alle piante non trattate. Il prodotto è consigliato anche per ridurre l'entità delle scottature sugli acini e per garantire una qualità delle bacche più bilanciata per la vinificazione. L'azienda indica come le piante trattate con Lalvigne Prohydro mantengano potenziali idrici fogliari più elevati (meno negativi) rispetto a quelle che subiscono stress idrico, la presenza di ingiallimenti fogliari e necrosi risulti meno evidente e che ci sia maggiore prontezza a riprendere un livello adeguato di fotosintesi netta nelle fasi successive in cui viene ristabilita una capacità idrica del suolo ottimale (recovery). A questo si aggiunge un miglior peso medio degli acini, dovuto alla minore disidratazione dei grappoli. Ciò dovrebbe essere garantito, in accordo alla letteratura a riguardo, dall'azione positiva della prolina e dalle sue funzioni antiossidanti e foto-protettive, garantite dal suo accumulo nelle fasi di stress, che

consentirebbe l'integrità della funzionalità dei fotosistemi, migliori performance di assimilazione del carbonio nelle fasi di recovery e mantenimento di contenuti idrici superiori nelle foglie. Il trattamento con Lalvigne Resiliens dovrebbe poter ulteriormente potenziare la tolleranza delle piante per tutto il ciclo produttivo agli stress abiotici, garantire un'adeguata ripresa dell'attività di fotosintesi nelle fasi successive agli stress più acuti e migliorare la percentuale di allegagione, se utilizzato in pre-fioritura. Si tratta di un prodotto maggiormente impiegato per la mitigazione di molti eventi climatici avversi (gelate, ondate di calore, temperature estreme, deficit idrico ed eccessi di salinità) alla vite nelle fasi fenologiche più delicate ed in fase di accrescimento e maturazione delle bacche, che favorisce inoltre l'accumulo di amidi nelle foglie e ne migliora la termoregolazione. In una prova di campo (Frioni et al., 2022), si è osservato come viti trattate con entrambi i prodotti abbiano mantenuto livelli di potenziale idrico fogliare e di traspirazione più idonei alle funzionalità fisiologiche fogliari, determinando una maggiore capacità di dissipare il calore, in periodi di particolare deficit idrico. Sempre nel medesimo studio, il trattamento con ProHydro ha ridotto in modo significativo la frequenza delle scottature sui grappoli, dal 54% dei controlli, al 14% dei grappoli trattati, in virtù della riduzione delle temperature rilevate sulle bacche. Per quanto concerne la qualità delle bacche, i rilevamenti sulle viti trattate con entrambi i prodotti hanno mostrato una diminuzione del contenuto di zuccheri solubili, misurati in gradi Brix, e un'acidità titolabile invariata, rispetto ai controlli. Gli autori dunque affermano l'effettiva utilità di questi biostimolanti di nuova concezione per aumentare la resilienza della vite in condizioni di stress, di fatto garantendo una maggiore fotosintesi netta alle piante trattate nelle fasi di ripresa ed un migliore stato idrico fogliare. Come tutti i biostimolanti comunemente utilizzati sul mercato, le applicazioni dovrebbero sempre essere preventive agli eventi di stress più acuti, per garantire la massima capacità di induzione e di stimolo delle risposte di difesa della pianta e per ottenere il migliore effetto sull'attività di crescita e sulla qualità delle bacche. Utilizzando tesi in cui i prodotti sono stati valutati singolarmente ed in combinazione e sottoponendo la metà delle piante all'interno dell'esperimento a stress idrico severo, si sono potuti monitorare gli effetti principali dei singoli trattamenti, l'interazione tra i fattori considerati ed eventuali effetti di sinergia. I trattamenti sono stati effettuati, come da indicazione aziendale, a differenti fasi fenologiche della vite. Sono stati predisposte tre applicazioni fogliari di Lalvigne Resiliens a partire dalla fase fenologica in cui il nuovo germoglio avesse raggiunto una lunghezza superiore ai 20 cm (fissato per la data del 09/05/22) e poi ogni 14 giorni, eseguendo l'ultimo trattamento in pre-fioritura (30/05/22). La dose somministrata è stata di 0.5 kg/ha (1.66 g/l). Anche nel caso del Lalvigne Prohydro sono stati predisposti tre trattamenti, ma in questo caso si è fissato il primo intervento alla fase di fine fioritura/inizio allegagione (fissato alla data del 05/06/22) e i successivi ogni 14 giorni, con l'ultima applicazione eseguita in fase di pre-invaiaitura (30/06/22). La dose somministrata è stata di 1 kg/ha (3.33 g/l). Nel caso delle tesi KOMBI e KS, che avrebbero dovuto valutare gli effetti della combinazione dei due prodotti, i trattamenti sono stati effettuati consecutivamente nel tempo, alle stesse fasi e alle stesse dosi indicate in precedenza.

3.2.3 Materiale vegetale adoperato

Lo studio è stato condotto su piante di vite (*Vitis vinifera*) coltivate in vaso e l'esperimento è iniziato con il completamento dei primi trattamenti effettuati nella seconda settimana di maggio e si è protratto fino all'inizio

della seconda settimana di agosto, momento nel quale sono state effettuate le ultime analisi distruttive sui germogli. Le operazioni di vendemmia e le analisi sulla qualità delle bacche sono state terminate nei primi due giorni del mese di agosto. Le piante sono state coltivate in condizioni semi controllate, sotto tunnel, già a partire dalla ripresa vegetativa e le attività sperimentali si sono sempre effettuate nel medesimo luogo. Le viti, della varietà Sauvignon-blanc e innestate su KB55, sono state coltivate in vaso utilizzando un substrato composto da una miscela di torba, sabbia, perlite e pietra lavica. Per ogni vite sono stati fatti crescere solamente due germogli, in senso verticale e leggermente distanziati l'uno dall'altro in modo da formare una "V" e sono stati assicurati tramite degli spaghi di sostegno. Eventuali germogli, formati a partire da gemme posizionate inferiormente al punto di inserzione dei due germogli principali, venivano regolarmente eliminati tramite potatura. L'irrigazione è stata affidata ad una coppia di micro irrigatori a goccia per vaso, con una portata degli ugelli impostata a 0.5 l/h, per il mantenimento di tutte le tesi in studio al contenuto idrico del substrato a livelli superiori all'80% della capacità di campo calcolata. Si sono impostati due cicli di irrigazione giornalieri da 20 minuti, fissati alle 16:30 e alle 20:00 e questa disposizione è continuata fino al periodo in cui si è imposto lo stress idrico controllato, dal giorno 05/07/22 al giorno 15/07/22. Tale esperimento di stress idrico controllato è stato condotto mediante metodo gravimetrico, mantenendo attivo un solo irrigatore per vaso, regolando la portata idrica giornalmente e pesando i vasi, in modo da controllare l'effettivo contenuto idrico del substrato, ed eventualmente aggiungendo il quantitativo di acqua necessario a mantenere al 30% della CC le tesi sotto stress idrico (water stress, WS). Viceversa le tesi ben irrigate (well watered, WW) hanno sempre disposto di due irrigatori per vaso ed il contenuto idrico dei substrati è stato mantenuto al di sopra dell'80% della CC. Al termine dei dieci giorni di stress, tutte le tesi WS sono state riportate a contenuti idrici prossimi alla saturazione e sono stati effettuati i rilevamenti finali sulla ripresa dell'attività di crescita (recovery) per tutta la settimana seguente.

3.2.4 Misurazione del potenziale idrico

Una delle operazioni strumentali dirette comunemente effettuate per determinare lo stato idrico della vite e per valutare la risposta agli stress abiotici più frequenti è la misura del potenziale idrico fogliare mediante camera a pressione di Scholander ([Scholander et al., 1965](#)) (PMS 600, PMS Instrument Company, US). Questa metodologia è ampiamente utilizzata per effettuare rilevamenti in vigneto andando a prelevare alcune foglie per pianta in diverse ore del giorno per determinare sia lo stato generale di idratazione delle foglie, sia l'andamento del potenziale idrico nel corso della giornata. Il potenziale idrico (ψ) rappresenta la pressione negativa sviluppata all'interno dei tessuti vascolari della pianta e resa effettiva dall'attività di traspirazione, necessaria per poter assorbire l'acqua disponibile nel suolo. Monitorare questo parametro è spesso molto utile per programmare gli eventuali interventi di irrigazione e per poter garantire la migliore idratazione e qualità delle bacche per la vinificazione, in modo particolare nei vigneti sottoposti di frequente a deficit idrico o annate siccitose ([Rienth e Scholash., 2019](#)). Nello studio in esposizione la data di inizio delle misurazioni è stata fatta coincidere con la partenza dell'esperimento dell'induzione dello stress idrico controllato (05/07/22) e sono stati effettuati in totale 5 rilevamenti (2 per le prime tre settimane). L'ultimo rilevamento è stato fissato una settimana dopo il quarto (nel giorno 22/07/22), per verificare se la ripresa vegetativa, che avrebbe dovuto

avvenire nel periodo in cui si ristabilivano contenuti idrici del substrato prossimi alla saturazione, si fosse instaurata in modo ottimale. Pertanto con questa metodologia si è potuto osservare l'andamento del potenziale idrico delle foglie delle tesi sotto stress idrico (WS) e confrontarlo a quello delle tesi in condizioni di contenuto idrico del substrato adeguate (WW), cercando di raggiungere l'obiettivo di mettere in luce l'effetto dei vari trattamenti in analisi e delle ricadute sullo stato fisiologico in due scenari ben definiti. Le misurazioni sono state condotte prelevando foglie mature totalmente espanse a partire dalla quinta-sesta foglia del germoglio, ben esposte all'insolazione e misurando il potenziale idrico a partire dalle ore 13.00 (potenziale di mid-day, MLWP) di ogni giorno di analisi. Infatti era di principale interesse dello studio misurare il potenziale idrico fogliare nel momento del picco dell'evapotraspirazione e del maggiore deficit idrico, per evidenziare possibili differenze nelle tesi. La camera a pressione è uno degli strumenti più affidabili ed utilizzati in viticoltura per la misurazione del potenziale idrico fogliare (Levin, 2019) ed il modello PMS 600, che è stato utilizzato nello studio in esposizione, ne rappresenta solo una delle diverse declinazioni disponibili. Come indicato dall'azienda produttrice, strumenti che monitorano il potenziale idrico sono molto utili perché questo parametro tiene conto di tutti i maggiori fattori che impattano sulla pianta determinando lo stress idrico: contenuto idrico del suolo, umidità relativa, vento, insolazione e carico termico. Ci sono due metodi generalmente utilizzati per misurare lo stress idrico, il primo è il metodo del potenziale idrico fogliare (LWP) ed il secondo è definito potenziale idrico dello stelo (SWP). A sua volta il LWP può essere declinato nel potenziale idrico di *pre-dawn* (PDLWP), molto utile per avere un'indicazione chiara e stabile rispetto alle condizioni climatiche della chioma dello stato idrico del suolo, e nel potenziale idrico di mezzogiorno (MLWP) (Rienth e Scholash, 2019; Deloire et al., 2020). Nel primo metodo (LWP) il potenziale idrico fogliare viene misurato immediatamente dopo il prelievo della foglia dal germoglio, nel secondo (SWP) invece le foglie vengono imbustate all'interno di sacchetti opachi e riflettenti per 1-2h prima della misurazione. Quest'ultima metodologia è generalmente ritenuta valida per far raggiungere un equilibrio tra il potenziale della foglia e quello dello xilema dello stelo, inoltre in letteratura si ipotizza di darle priorità rispetto al LWP in quanto molto più discriminante e meno soggetto all'influenza dell'esposizione e delle condizioni microclimatiche della chioma (Santesteban et al., 2019). Per l'utilizzo della camera a pressione PMS 600 è stato necessario l'ausilio di una bombola portatile per il rifornimento di aria pressurizzata (in alternativa l'azienda consiglia l'utilizzo di azoto pressurizzato). La massima pressione consentita e raccomandata è di 40 bar e lo strumento fornisce scale di lettura in scala PSI-bar. Il range di 40 bar (4 Mpa) si adatta molto bene ad un utilizzo su vite. Infatti la vite è considerata una pianta che controlla il deficit idrico tramite una regolazione dell'apertura stomatica piuttosto che con riduzioni molto marcate del potenziale idrico, infatti viene definita a comportamento isoidrico o 'pessimista'. Sebbene siano presenti delle differenze varietali in termini di prontezza a regolare gli stomi in presenza di deficit idrico, i range del potenziale idrico osservato in diversi genotipi durante fasi di deficit idrico da lieve a severo non superano la soglia di -1.9 Mpa (Chaves et al., 2010). Valori superiori indicano dunque la presenza di uno stress idrico che inizia ad essere molto severo oppure di lungo periodo. Per determinare il potenziale idrico fogliare (LWP), le lamine vengono inserite nel pozzetto a tenuta stagna e le letture vengono effettuate in base al momento in cui la linfa inizia a fuoriuscire dalla superficie tagliata durante il prelievo

(tipicamente si possono osservare delle bollicine). In uno studio recente si è osservato che effettuare un taglio successivo a quello del prelievo delle foglie non implica alcuna differenza significativa del potenziale idrico rilevato rispetto ad un unico taglio ed anzi può agevolare le letture e far diminuire l'errore dell'operatore (Levin, 2019). Non appena si osserva fuoriuscita di linfa il flusso d'aria pressurizzato deve essere bloccato e il valore restituito dal quadro di lettura, definito end-point, rappresenta la pressione esterna da imprimere alla lamina per far fuoriuscire la linfa ritenuta nei vasi conduttori, cioè il valore del potenziale idrico fogliare (LWP) in quel momento della giornata. In altre parole, il potenziale idrico fogliare rappresenta la tensione a cui la linfa è sottoposta all'interno dei vasi conduttori e che di fatto la trattiene all'interno dei tessuti. Il potenziale idrico totale della pianta inciderà direttamente con il potenziale idrico fogliare (LWP), infatti piante sotto stress idrico severo presentano valori rilevati dalla camera a pressione che superano i 14-15 bar (1.4-1.5 Mpa) (Rienth e Scholash, 2019), cosa che infatti è stata osservata nello studio. Visto che il potenziale idrico totale della pianta è determinato dal contenuto idrico del substrato, dall'umidità relativa e da altri fattori abiotici come, la temperatura ed il vento, è ovvio che questo debba variare nell'arco della giornata, tipicamente raggiungendo il massimo (quindi il valore di potenziale idrico fogliare più basso) nel mezzogiorno (potenziale di mid-day, MLWP), per poi calare dopo il tramonto, fino ai valori più alti (cioè più prossimi a zero) della pre-alba che corrisponde alla fase di massima idratazione della vite (Santesteban et al., 2019). Effettuando le analisi sulle tesi in condizioni idriche ottimali (WW) si sono riscontrati spesso valori compresi tra 10-14 bar che indicherebbero invece condizioni di stress idrico lieve o moderato. L'impatto della crescita sotto tunnel deve essere tuttavia sempre tenuta in considerazione se confrontata ad una crescita in pieno campo ed è plausibile supporre che nonostante l'irrigazione adeguata anche le tesi WW abbiamo subito uno stress termico che non possa essere tralasciato nell'analisi dei dati di potenziale idrico ottenuti. Proprio per questa ragione è necessario accostare ai valori di potenziale idrico rilevati tutti i parametri relativi alle risposte fisiologiche di interesse e alle condizioni di crescita delle piante, viceversa le misurazioni potrebbero dare dei risultati poco significativi o scarsamente interpretabili.

3.2.5 Misurazione della conduttanza stomatica

A corredo della determinazione del potenziale idrico fogliare, lo stato fisiologico della vite in risposta allo stress idrico imposto è stato monitorato ulteriormente attraverso la misurazione strumentale della conduttanza stomatica tramite il porometro Licor LI-600 (Li-cor. Inc., US). Nello studio in esposizione, sono state effettuate le letture della conduttanza stomatica gli stessi giorni in cui si è determinato il potenziale idrico. Le letture sono state effettuate la mattina, partendo dalle ore 9.00, analizzando 4 foglie per singolo blocco di 5 piante, dando priorità alle foglie principali e mature disposte nella zona centrale di un singolo germoglio. Il germoglio scelto è lo stesso che era stato destinato alle misurazioni morfologiche e di area fogliare settimanali di ogni blocco specifico. Per ogni foglia sono state rilevate due misure di conduttanza stomatica, una prima lettura nel margine apicale, superiormente alle nervature primarie, e la seconda nel margine inferiore, tra la terza e la quarta nervatura principale, della sezione opposta. Pertanto in ogni giornata di misurazioni sono state effettuate 256 letture della conduttanza stomatica. Il porometro utilizzato (licor li-600) è uno strumento portatile e maneggevole che permette di fare rapide letture della conduttanza stomatica fogliare. L'azienda produttrice

fornisce anche la possibilità di installare un modulo aggiuntivo che permette di quantificare la fluorescenza della clorofilla di tipo a. La conduttanza stomatica e la quantificazione della traspirazione vengono determinate grazie ad una misurazione differenziale a flusso aperto. La traspirazione viene quantificata misurando la portata e la frazione molare di vapore acqueo dell'aria in entrata rispetto a quella che fuoriesce dalla camera. La conduttanza stomatica all'acqua (gsw) viene determinata in funzione della conduttanza totale al vapore acqueo (gtw) e della conduttanza dello strato limite al vapore acqueo (gbw). Utilizzando il modulo aggiuntivo è possibile ottenere informazioni sull'attività di fotosintesi che, combinata alla misurazione della conduttanza stomatica, permette di osservare con maggior dettaglio lo stato fisiologico della pianta (d). La conduttanza stomatica (gs) è un parametro fisiologico determinato dall'apertura stomatica e dalla traspirazione. Viene influenzata da molti fattori abiotici e dalla differenza di pressione di vapore tra ambiente intercellulare ed ambiente esterno. La regolazione dell'apertura stomatica è una delle strategie più impattanti che le viti possono mettere in campo per far fronte al disseccamento delle foglie e ai danni dalle alte temperature, nei periodi più critici. Infatti alte temperature e alti deficit di pressione di vapore influenzano negativamente la conduttanza stomatica, sebbene le risposte fisiologiche siano cultivar-correlate e ci sia sempre più accordo su una divisione tra varietà isoidriche e anisoidriche (Venios et al., 2020). Queste considerazioni sono state importanti nel procedere in una ricerca attiva delle cultivar che possano rispondere meglio alla viticoltura delle zone semi aride e mediterranee nel prossimo futuro, in cui l'alta tolleranza alla siccità e alti valori di water use efficiency (WUE) saranno caratteristiche imprescindibili nel miglioramento genetico (Bota et al., 2016). In letteratura è noto come la conduttanza stomatica sia fortemente correlata a fattori quali la concentrazione di anidride carbonica interna ed esterna alla foglia, il tasso di fotosintesi netta e la necessità di traspirazione. La gs è correlata in modo negativo alle concentrazioni di anidride carbonica esterna, anche nelle piante sotto stress idrico. Infatti, a precise capacità di fotosintesi delle foglie, che dipendono dallo stato nutrizionale generale della pianta, la conduttanza stomatica diminuisce all'aumento delle pressioni parziali di anidride carbonica ambientale. Questo avviene per mantenere costante il gradiente tra la concentrazione parziali della co2 tra esterno e mesofillo. Si è notato inoltre che, a parità di pressione parziale di CO₂ ambientale, se diminuisce la capacità fotosintetica, per esempio in situazioni di carenze nutrizionali, diminuisce anche la conduttanza stomatica (Jarvis e Davies., 1998). Pertanto si nota come la conduttanza stomatica sia fortemente regolata dalla disponibilità dalle pressioni parziali di CO₂ ambientale e dallo stato nutrizionale delle foglie. Inoltre si nota come la gs sia fortemente correlata all'attività fotosintetica delle piante e alla determinazione delle concentrazioni di CO₂ del mesofillo. In esperimenti di campo (Escalona et al., 1999), l'imposizione di uno stress idrico prolungato, ha messo in luce come la variazione della fotosintesi netta dipenda fortemente dalla regolazione della conduttanza stomatica, ma anche da meccanismi non-stomatici legati ai processi coinvolti alla rigenerazione della rubisco e all'incremento della foto-respirazione, che intervengono per modulare le saturazioni della capacità fotosintetica alla effettiva intensità luminosa e alle concentrazioni di CO₂ del mesofillo in progressivo decremento. Questo conduce ad un miglioramento del water use efficiency (WUE) nelle viti sotto stress (Zufferev et al., 2017) e ad un riassetto del comparto fotosintetico che permette di superare le fasi di deficit critiche. La regolazione dell'apertura degli stomi e di conseguenza la variazione della

conduttanza stomatica ormai è chiaro venga regolata dall'acido abscissico (ABA), attraverso segnalazione radice-chioma. Interessante notare come in letteratura ci sia un dibattito sul ruolo dell'ABA nella regolazione della traspirazione. In ogni caso, si inizia a rafforzare la convinzione che la sintesi di ABA inizi nelle fasi conseguenti a deficit idrico del suolo, ma che il picco della concentrazione nelle foglie avvenga solo quando la conduttanza stomatica si approssima a livelli molto bassi (Tombesi et al., 2015), questo per evitare che in seguito alla cessazione dello stress idrico i vasi xilematici possano comprometersi per un repentino aumento della traspirazione. In un caso studio recente (Belfiore et al., 2013), simile a quello in discussione, è stato messo in luce infatti come la conduttanza stomatica sia regolata principalmente da segnali di natura idraulica (passivi) nei primi giorni dall'imposizione di uno stress idrico severo e che viceversa l'aumento della concentrazione di ABA, monitorato nelle foglie delle viti stressate, possa incidere di più sulla graduale riapertura degli stomi nelle fasi di reidratazione (recovery), per assicurare una protezione da possibili eventi di cavitazione del fusto. Considerando unitamente quanto sopra esposto, è molto utile monitorare la conduttanza stomatica nei casi studio in cui si confrontano le potenzialità di prodotti biostimolanti come quelli utilizzati, poiché variazioni significative sulla conduttanza stomatica possono determinare miglioramenti della WUE delle cultivar e una maggiore termo-tolleranza.

3.2.6 Determinazione del contenuto dei pigmenti fogliari

Il contenuto di pigmenti fogliari è stato condotto mediante strumento ottico mod. Dualex (Force-A, France). Si tratta di uno strumento portatile molto leggero e non distruttivo che per effettuare le letture dispone di un sensore che si aggancia alle foglie tramite una pinza (clipper). Determina il contenuto fogliare di clorofille, antocianine, flavonoli e inoltre fornisce l'NBI (*Nitrogen Balance Index*), che rappresenta un indicatore dello stato del contenuto di azoto della pianta. Come indicato dall'azienda (attualmente non più attiva sul mercato) la determinazione della clorofilla avviene tramite la misurazione del tasso di trasmittanza a due differenti lunghezze d'onda, paragonando l'assorbimento al rosso lontano rispetto ad una lunghezza d'onda NIR (near-infrared). Il contenuto di flavonoli ed antociani cuticolari invece viene misurato mediante un rapporto differenziale della fluorescenza della clorofilla. La fluorescenza della clorofilla viene misurata con una luce di riferimento non assorbita dai polifenoli. Questa viene comparata con una specifica seconda frequenza assorbita dai polifenoli per la determinazione delle antocianine, una luce UV per la determinazione dei flavonoli. Solamente una frazione di questa luce raggiunge la clorofilla nel mesofillo e riesce a generare la fluorescenza. Questa metodologia si basa dunque sull'effetto schermo dei polifenoli sulla fluorescenza della clorofilla (e). Nello studio in esposizione le misurazioni fogliari con il dualex sono state effettuate scegliendo 3 foglie del germoglio selezionato, per il monitoraggio dell'accrescimento e dell'area fogliare totale, per ogni blocco di 5 piante. Le foglie sono state selezionate lungo il germoglio in base alla loro differente esposizione alla luce solare, in modo che questo parametro potesse impattare il meno possibile sulla variabilità tra i trattamenti. Pertanto si sono scelte la quarta, la sesta e la settima foglia e per ognuna di queste sono state condotte tre letture: la prima lettura superiormente alla nervatura primaria, nel lobo laterale, la seconda nel lobo laterale opposto, tra la quarta e la quinta nervatura principale e la terza nel lobo principale, tra la terza e la quarta nervatura. Dunque 288 letture totali per singola giornata di analisi. L'affidabilità di questi strumenti per la

determinazione del contenuto di clorofille nelle foglie mature è stata accertata da analisi comparative con altri lettori ottici per gli stessi indici (Casa et al., 2015). In particolare, disporre di lettori maneggevoli in grado di permettere di valutare in modo indiretto (tramite l'utilizzo di modelli di calibrazione) rapidamente un parametro importante, per la stima della crescita e lo stato nutrizionale delle foglie, come le clorofille e altri pigmenti fogliari, ha permesso di velocizzare e rafforzare l'utilità delle analisi di campo. I primi modelli di calibrazione proposti per cercare di correlare al meglio gli indici adimensionali restituiti dal dualex 4, sostenevano una relazione lineare rispetto al contenuto di clorofille misurato in $\mu\text{g cm}^{-2}$ e si era evidenziato come questo strumento fosse molto indicato per le letture su foglie come quelle di *Vitis vinifera* e *Actinidia deliciosa*, piuttosto che per altre specie nelle quali eterogeneità delle foglie, spessore della cuticola più pronunciato e maggiore sostanza secca per area fogliare (LMA) possono rendere meno affidabili le analisi effettuate (Cerovic et al., 2012). Altri studi hanno avvalorato il modello lineare del Dualex, mostrando però come in alcuni casi ci possano essere delle variazioni significative in base alla coltura agraria presa in analisi (Casa et al., 2015). L'utilità di questi strumenti ottici si estende anche nella possibilità di verificare in campo lo stato nutrizionale delle foglie ed in particolare se vi siano eccessi o carenze di N. La misurazione dei quantitativi di clorofille e di flavonoli è stata utilizzata come metodo per cercare di stimare l'azoto fogliare. A tal proposito, si è iniziato a porre attenzione sul fatto che l'indice NBI, che rappresenta il rapporto tra i quantitativi di clorofille e di flavonoli fogliari, sembra correlarsi meglio allo stato dell'azoto fogliare. Infatti il contenuto delle clorofille varia in base allo stato fenologico della pianta e all'illuminazione ricevuta dalle foglie durante la loro crescita nel tempo, tenendo presente che anche il contenuto di flavonoli tenda ad essere influenzato dalla luce ma che poi rimanga costante nell'arco della vita delle foglie, si è proposto di utilizzare l'indice NBI come stimatore più robusto dello stato azotato delle foglie nelle diverse fasi fenologiche della vite, suggerendo anche dei valori soglia di riferimento (Cerovic et al., 2015). Il monitoraggio dei pigmenti fogliari e del contenuto delle clorofille, durante periodi di stress abiotici, è un utile indicatore di possibili danni derivati dallo sviluppo di ROS nei tessuti del mesofillo fogliare, come noto e più volte esposto in letteratura. L'andamento di questi parametri varia nell'arco di periodi di deficit idrico o stress termico in tutte le piante e i prodotti biostimolanti che garantiscono una buona protezione dei pigmenti determinano una migliore ripresa dell'attività vegetativa nelle fasi di recovery.

3.2.7 Monitoraggio della crescita e area fogliare

Per osservare la crescita delle viti si è deciso di monitorare la progressione settimanale della lunghezza dei germogli principali e dell'area di tutte le foglie primarie sviluppatesi. Le misurazioni sono avvenute settimanalmente, a partire dal 16 maggio e sono terminate il 29 giugno, cioè 12 giorni dopo la data del termine dell'imposizione dello stress idrico controllato. In questo modo si è potuto osservare l'andamento di crescita durante le fasi di stress e al termine della fase di ripresa vegetativa (recovery). Per ogni blocco è stato scelto un germoglio specifico, la cui lunghezza è stata determinata manualmente con un metro da sartoria. L'area fogliare si è determinata in modo indiretto, misurando prima la distanza in cm dal seno peziolare fino al termine della nervatura centrale (n1) e la somma rettificata delle due nervature dei lobi laterali inferiori (n3), per poi moltiplicare questi due valori per un parametro adimensionale di conversione specifico per la cultivar

Sauvignon-blanc, pari a 1,0977846. Come criterio per inserire od escludere le foglie dalle misurazioni è stato deciso di utilizzare un cutoff di 4cm per n1. Nella giornata dell'8 agosto si sono completate le ultime misurazioni distruttive sulle piante monitorate; è stata determinata la lunghezza finale del germoglio principale, il totale della lunghezza dei germogli secondari sviluppati dalle gemme ascellari (femminelle), l'area totale delle foglie primarie e l'area totale delle foglie secondarie. Queste ultime misurazioni sono state strumentali.

3.2.8 Rilevazione indici di maturazione delle bacche

Le rilevazioni strumentali sulla maturazione delle bacche hanno riguardato la determinazione del grado zuccherino, rilevato in °Brix, la misurazione dell'acidità titolabile, il peso medio dei grappoli di ogni blocco trattato ed è stato anche ricavato il peso unitario bacca, per osservare se i trattamenti potessero influenzare le rese. Il grado zuccherino e l'acidità titolabile sono state ricavate tramite lo strumento Atago Hybrid PAL-BXIACID2 (f), un modello di rifrattometro specifico per analisi su vite. I gradi Brix vengono determinati mediante misura della rifrazione della luce, invece la misura dell'acidità viene determinata misurando la conducibilità elettrica del succo. Le analisi vengono effettuate simultaneamente. Oltre alle misure ponderali è stato anche ricercato in modo indiretto il diametro delle bacche. Questo è stato possibile attraverso l'utilizzo del software Open Source ImageJ (g), un programma di elaborazione digitale delle immagini, che permette funzioni di calcolo su fotografie di differente formato per ricavare come output l'area e le dimensioni reali dei frutti sulla base del valore dei pixel ed il tracciamento di linee di profilo.

3.3 Caso studio su *Vitis vinifera* (Az. Cescon, Chiarano)

3.3.1 Descrizione schema sperimentale e obiettivi

A corredo degli studi effettuati in università, sono state condotte delle ulteriori valutazioni sull'effetto del prodotto Lalvigne Prohydro in pieno campo. I rilevamenti sono stati effettuati in un vigneto situato presso la città di Chiarano, in provincia di Treviso, su cultivar Glera. Le analisi sugli effetti del trattamento sono state completate su 8 filari, all'interno dei quali 4 non avevano ricevuto alcuna applicazione fogliare, pertanto hanno rappresentato i controlli non trattati da comparare. Alla stregua dell'esperienza condotta a Legnaro, lo stato idrico delle viti è stato monitorato tramite misurazione del potenziale idrico fogliare di mezzogiorno (MIDDAY), del potenziale idrico dello stelo (STEM) e della conduttanza stomatica. Nelle stesse giornate di monitoraggio, sono stati raccolti i dati sul contenuto dei pigmenti fogliari (antociani, flavonoli clorofille) ed il contenuto di azoto fogliare (NBI), effettuando in questo caso specifico la raccolta dati sia sulla parete esposta ad ovest (Dx), che su quelle esposte ad est (Sx). Per le seguenti letture si sono sfruttati i medesimi strumenti utilizzati nei casi studio precedenti. A questi rilevamenti è stato aggiunto il monitoraggio strumentale del contenuto idrico volumetrico del suolo, per riscontare eventuali diversità pedologiche della disponibilità idrica, che avrebbero potuto impattare sui parametri oggetto di studio. Per ogni filare considerato sono state scelte 5 piante rappresentative, mature e ben sviluppate, con un numero di grappoli adeguato in maturazione e sono state scelte due foglie per pianta per i rilevamenti sullo stato idrico. Le foglie selezionate dovevano essere completamente sviluppate, selezionate nella zona centrale della chioma e ben esposte alla radiazione solare. In totale le giornate di monitoraggio sono state tre, 28/07/22, 04/08/22 e 11/08/22. Nel giorno della vendemmia, fissato per il 30/8/22, è stata effettuata la determinazione degli zuccheri solubili e dell'acidità titolabile delle

bacche, l'analisi sulle rese unitarie per pianta, pesando tutti i grappoli prodotti dalle piante monitorate ed il diametro di 100 acini per pianta.

3.3.2 Contenuto idrico volumetrico del suolo

Il contenuto volumetrico d'acqua è stato determinato con lo strumento MiniTrase (SoilMoisture) (h). Utilizza il metodo della riflettometria nel dominio del tempo (TDR) per determinare i livelli di umidità del suolo in profondità comprese tra 15-70 cm, calcolando la velocità con cui un impulso elettromagnetico viaggia lungo una linea di trasmissione in funzione della costante dielettrica (K_a) del suolo in un preciso momento. I connettori possono essere inseriti nel sito da misurare, anche in modo permanente, per letture periodiche. Nel caso studio in esposizione sono state effettuate tre letture, nel corso delle tre settimane di monitoraggio. I risultati vengono espressi come percentuale del contenuto di umidità del suolo, nel momento della rilevazione.

4. Risultati e discussione

4.1. Caso studio Legnaro

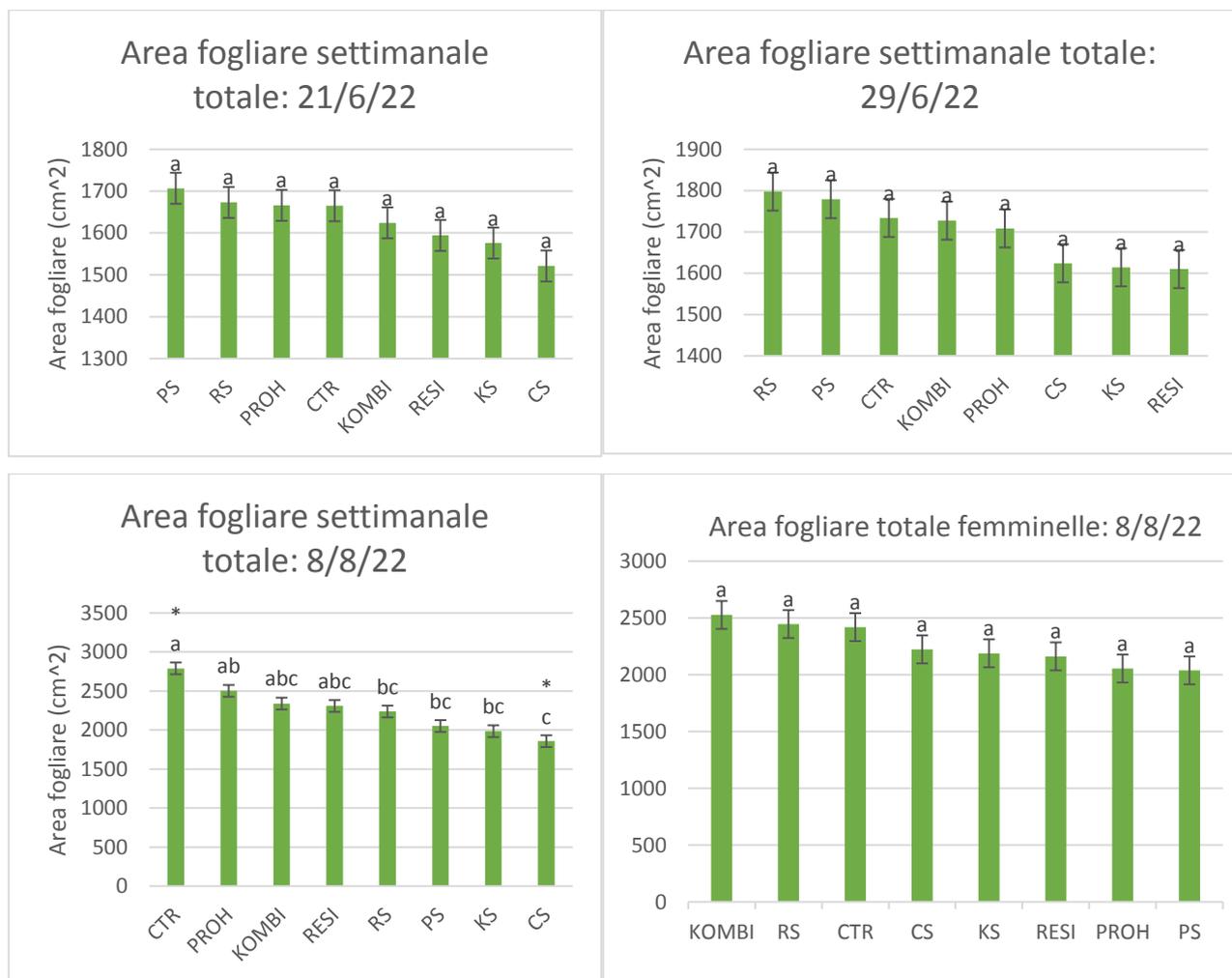
4.1.1 Area fogliare

Come esposto in precedenza, la valutazione dei potenziali effetti dei prodotti biostimolanti in esame, Lalvigne Resiliens e Lalvigne Prohydro, sull'accrescimento in biomassa delle differenti tesi a confronto, prima dell'imposizione dello stress idrico, è avvenuta tramite analisi statistica della varianza (ANOVA) sui dati ottenuti dai rilevamenti effettuati nell'arco di sette settimane consecutive (16/5/22 – 29/6/22) e nella giornata della vendemmia (8/8/22). Per quanto riguarda le analisi sull'area fogliare totale di ogni tesi, si è deciso di effettuare una ANOVA ad una via a blocchi randomizzati. Dai risultati ottenuti, tuttavia, non sono emerse differenze significative tra le medie durante le fasi di crescita in condizioni ottimali, dunque fino al giorno del 29/06/22, ma è possibile notare delle performance leggermente migliori nelle tesi trattate con un unico prodotto, PS, PROH, RESI ed RS, nelle prime quattro settimane rispetto alle tesi combinate (KOMBI) e al controllo. Si potrebbe ipotizzare che nelle prime fasi di trattamento i prodotti agiscano maggiormente come stimolanti della crescita per via del rapido assorbimento dei nutrienti e dei fitormoni forniti dai lieviti inattivati, piuttosto che per effetto della prolina, il cui ruolo come descritto in letteratura viene mascherato nei casi in cui le piante non subiscano uno stress abiotico che possa inficiare le attività di crescita.

Tuttavia, un riscontro positivo sulla capacità di aumentare la tolleranza allo stress idrico lo si può notare indirettamente dai risultati registrati nel giorno 8/8/22, confrontando le medie dell'area fogliare totale rilevate nel giorno della vendemmia, circa dieci giorni dopo la fase di *recovery*. In questo caso si sono osservate differenze significative tra le medie, in particolare tra i controlli stressati e non stressati, CTR e CS, che mostrano rispettivamente l'area fogliare totale più e meno sviluppata dell'esperimento. Si nota inoltre la netta separazione, dovuta al forte rallentamento della crescita, di tutte le tesi sotto stress idrico controllato rispetto alle WW. In questo caso si nota chiaramente l'effetto positivo su questo parametro dovuto ai trattamenti ed è presumibile pensare che gli effetti sulla diminuzione dello stress osmotico e sulla foto-protezione siano stati raggiunti garantendo, come auspicato, una migliore capacità di ripresa dell'attività fotosintetica nelle fasi di *recovery*. Il fatto che i controlli non stressati (CTR) abbiano raggiunto le prestazioni migliori è da imputare al maggior costo energetico che le piante trattate devono sopportare a seguito dell'induzione di 'tolleranza' per

effetto dell'applicazione dei biostimolanti, che di fatto aumentano il metabolismo secondario connesso alla sintesi di enzimi, proteine, pigmenti, composti fenolici ed altre sostanze che rientrano nella difesa attiva.

Lo stesso procedimento di ANOVA si è seguito per l'analisi delle foglie presenti sui germogli secondari sviluppati dalle gemme pronte del germoglio principale (femminelle), nelle ultime fasi della vendemmia. In questo caso non sono state rilevate differenze significative nelle medie, ma si segnala una notevole differenza tra la tesi KOMBI e le tesi RESI e PROH. Da questo punto di vista sarebbe interessante indagare l'effetto differenziale dato dal trattamento combinato sulla possibilità di aumentare l'area fogliare totale, rispetto al singolo uso dei due prodotti. Da questo punto di vista, in letteratura (Colla et al., (2015); Colla et al., (2017)), si ipotizzano possibili effetti secondari e sinergici a seguito di applicazioni di biostimolanti fogliari sull'architettura della chioma.

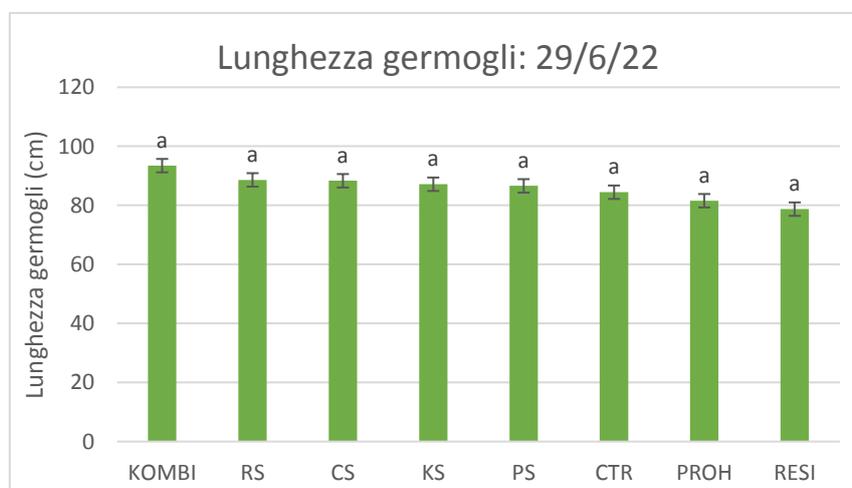
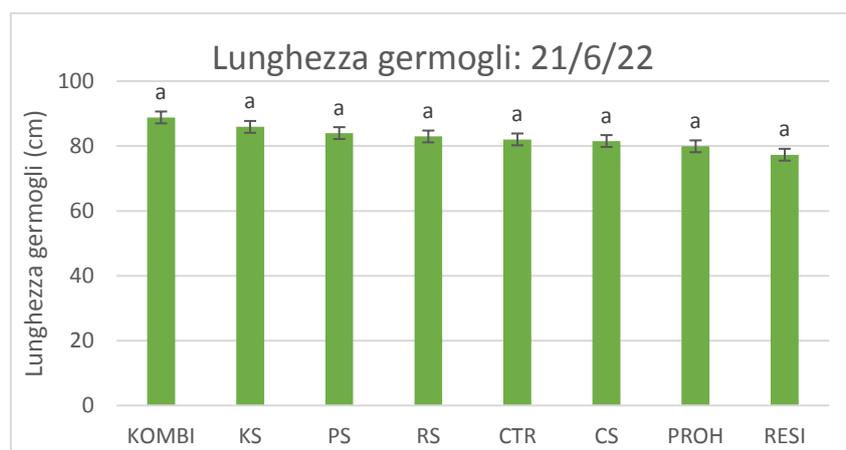


(Nei grafici sopra riportati, a lettere diverse corrispondono differenze significative delle medie di riferimento. L'asterisco indica il grado di significatività: per P<0.05 (*), P<0.01 (**), P<0.001 (***)). I valori riportati dagli istogrammi rappresentano la media ± errore standard, calcolato in questo caso per n=32)

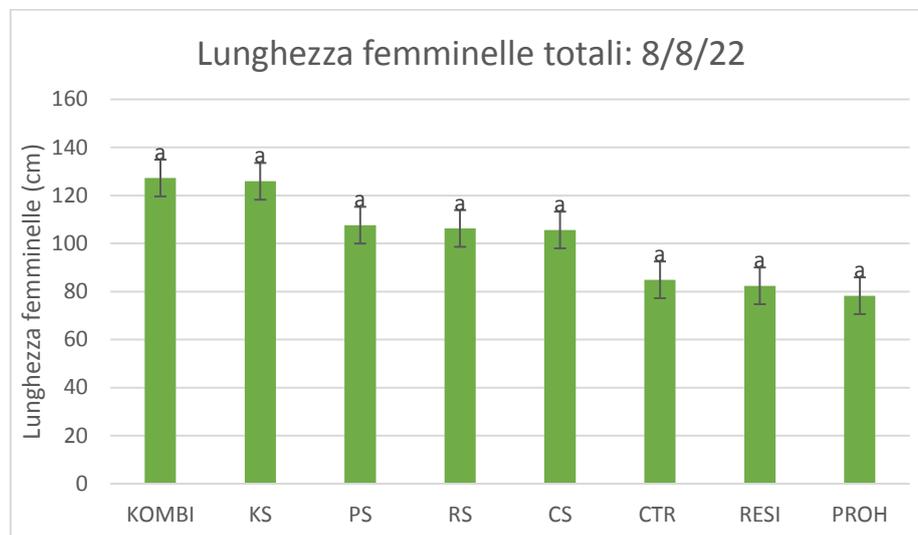
4.1.2 Lunghezza germogli

Alla stregua di quanto descritto per l'area fogliare totale, anche il monitoraggio della lunghezza dei germogli è avvenuto settimanalmente, prima dell'imposizione dello stress idrico controllato, anche in questo caso l'ultimo rilevamento è stato effettuato a vendemmia ultimata per avere un riscontro anche dopo la fase di

recovery. L'analisi statistica effettuata in questo caso non ha mostrato nessuna differenza significativa tra le medie delle tesi a confronto, nemmeno nelle fasi finali. Si notano in ogni caso alcune tendenze. Anche in questo caso l'effetto dello stress idrico deprime la crescita e la distensione cellulare e questo è visibile nella separazione delle tesi WW e WS che si può osservare nel grafico dell'8/8/22. Le piante infatti, a seguito del completo *recovery*, riprendono tutte correttamente la crescita, ma il vincolo allo sviluppo del germoglio principale, a carico delle tesi WS, ha determinato un gap chiaramente osservabile. Nell'arco temporale di monitoraggio si è inoltre osservata una buona capacità di crescita delle tesi trattate con la combinazione dei due prodotti (KOMBI e KS), avvalorando quanto detto in precedenza sull'area totale delle foglie secondarie e suggerendo un possibile effetto additivo. Questa tendenza è visibile anche dalla consultazione dei risultati delle analisi sulla lunghezza dei germogli laterali (femminelle); le differenze delle medie non sono risultate significative, ma si osservano anche in questo caso le migliori performance delle tesi trattate con la combinazione dei due prodotti (KOMBI e KS) rispetto a tutte le altre e soprattutto alle due tesi PROH e RESI, che sono risultate in questo contesto le peggiori. Queste osservazioni cumulate mostrano delle solide evidenze su come i prodotti testati possano sostenere lo sviluppo in biomassa delle viti in situazioni di stress idrico severo e di come possano avere effetti additivi sulla struttura della chioma, che potrebbero essere ulteriormente indagati.



(Nei grafici sopra riportati, a lettere diverse corrispondono differenze significative delle medie di riferimento. L'asterisco indica il grado di significatività: per $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)). I valori riportati dagli istogrammi rappresentano la media \pm errore standard, calcolato in questo caso per $n=32$)

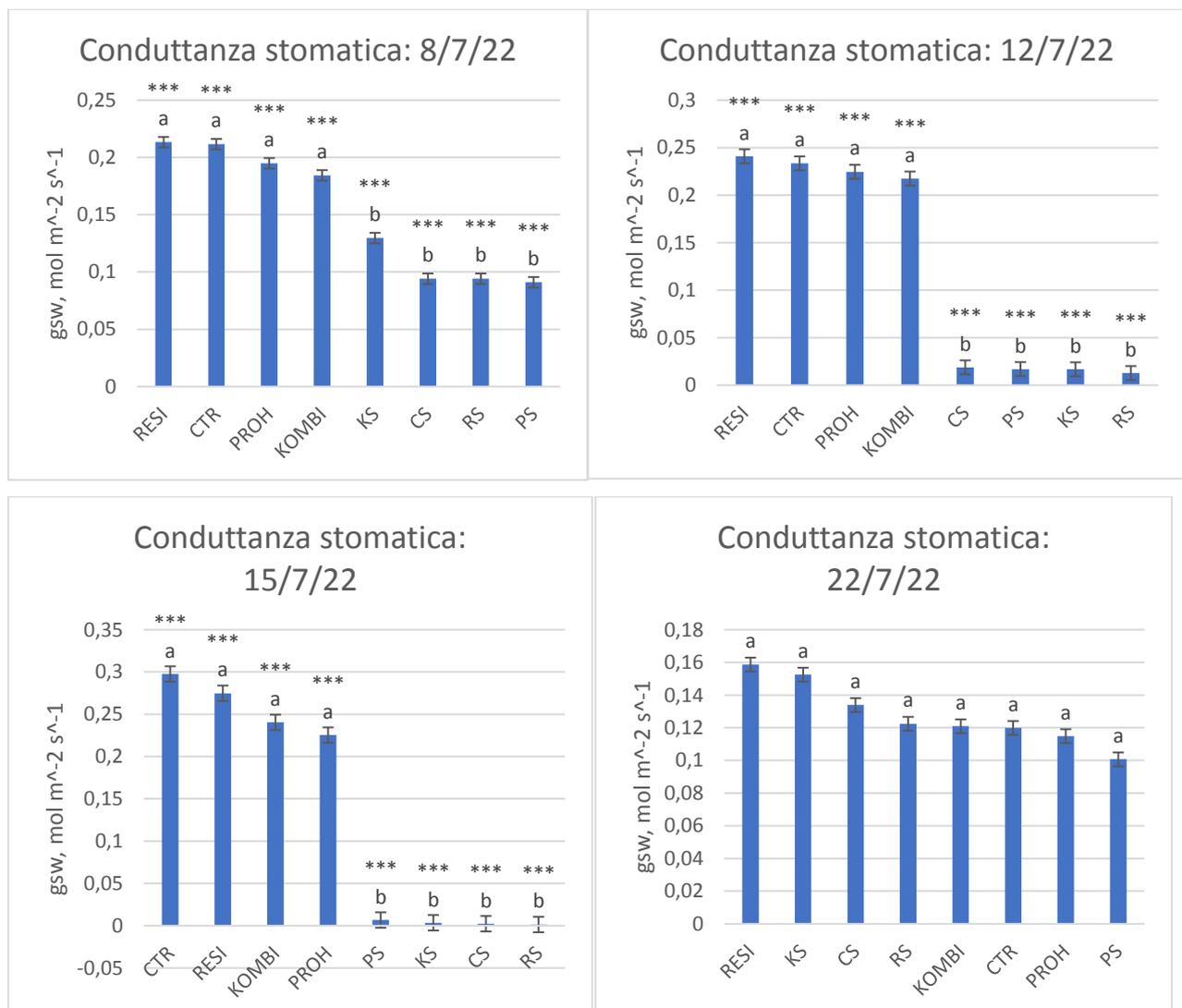


(Nei grafici sopra riportati, a lettere diverse corrispondono differenze significative delle medie di riferimento. L'asterisco indica il grado di significatività: per $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)). I valori riportati dagli istogrammi rappresentano la media \pm errore standard, calcolato in questo caso per $n=32$)

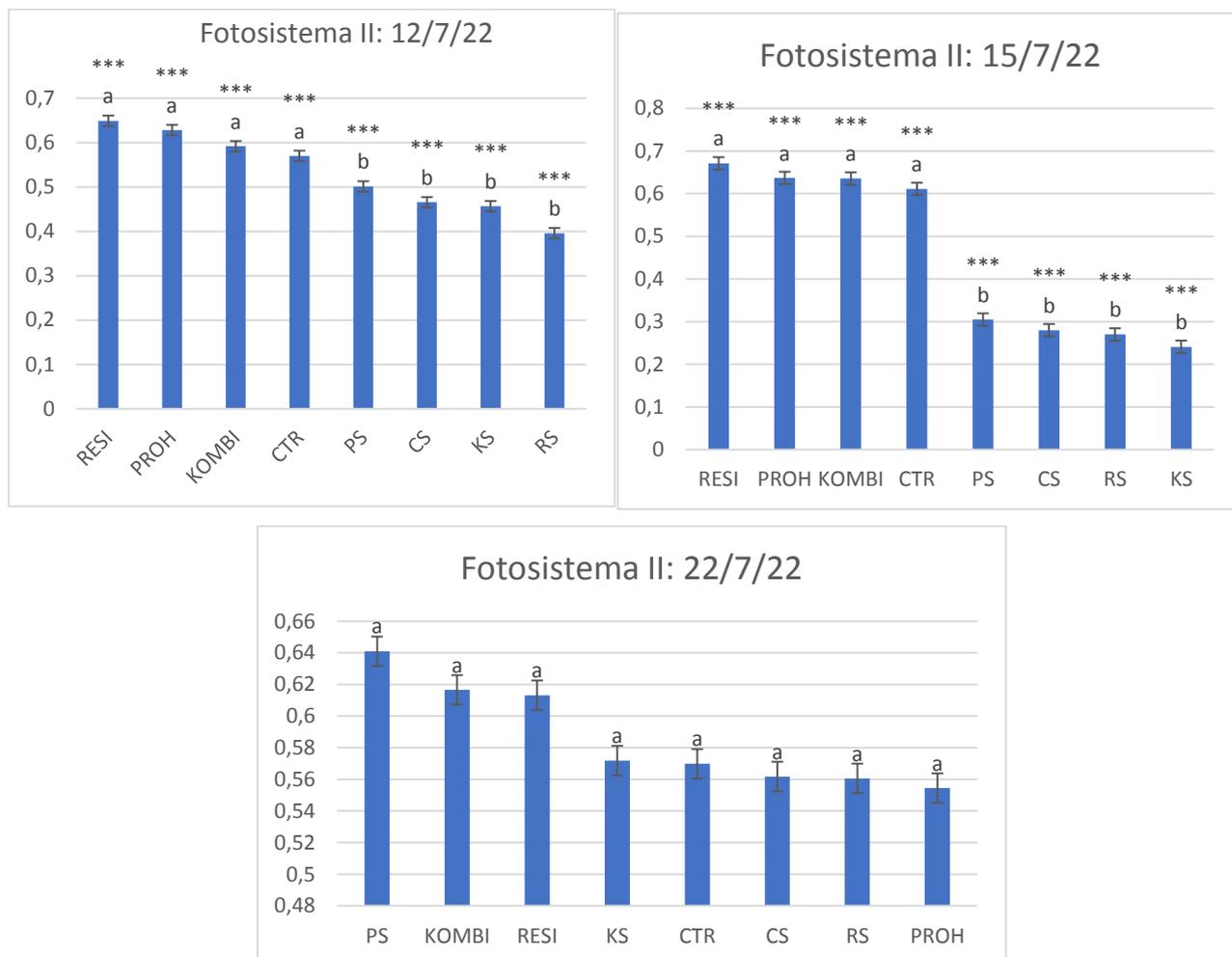
4.1.3 Conduttanza stomatica ed efficienza del PSII

Per l'analisi statistica di questi due parametri si è dapprima effettuata l'ANOVA ad una via e secondariamente quella a due vie, per cercare di ridurre la variabilità dell'errore considerando l'effetto dei blocchi. Le misurazioni della conduttanza stomatica (gs) e dell'efficienza del PS II sono state effettuate nel periodo di inizio dell'imposizione dello stress idrico controllato e si sono concluse nel periodo del completo *recovery*, precisamente dal 5/7/22 al 22/7/22. Le analisi statistiche hanno rilevato differenze significative nella media dei trattamenti, così come, nel caso della ANOVA a 2 vie, una forte significatività ($P < 0.01$) dell'effetto blocchi, informazione che indica come anche in condizioni semi-controllate ci possa sempre essere variabilità ambientale che condiziona l'esperimento. In termini di conduttanza stomatica, si osserva dall'analisi delle medie come avvenga già a partire dal primo giorno di stress una evidente separazione delle tesi WW da quelle WS. Come esposto in precedenza, la principale risposta fisiologica della vite allo stress idrico è quella di diminuire drasticamente l'apertura degli stomi, regolando così negativamente la traspirazione e la conduttanza stomatica. Il risultato è che le piante stressate mostrano una riduzione della conduttanza di oltre un ordine di grandezza rispetto alle WW, questo rappresenta un fattore che condiziona fortemente l'attività assimilativa e di crescita. Considerando le piante stressate sottoposte ai rispettivi trattamenti, non si notano pertanto differenze significative rispetto ai controlli WS, anche se si ritiene utile notare che al termine del periodo di stress imposto, le tesi PS (trattate con Lavigne Prohydro) sono risultate quelle più tolleranti nel gruppo delle WS, avendo fatto registrare i migliori livelli di conduttanza stomatica.

Le analisi sull'efficienza del PS II secondo ricalcano gli andamenti descritti per la conduttanza stomatica. Le tendenze indicano che al progressivo aumento del deficit idrico e al parallelo crollo della conduttanza stomatica, l'attività del PSII delle tesi WS diminuisce in modo conseguente. Le cause principali, sono i danni ossidativi a carico del sistema di trasporto degli elettroni, il danneggiamento delle membrane dei tilacoidi a causa del proliferare delle ROS e a meccanismi di senescenza innescati durante i periodi critici, che portano alla riduzione di tutta la funzione dell'apparato fotosintetico. Sebbene non ci siano nemmeno in questo caso differenze all'interno del gruppo delle tesi WS, anche in questo caso il trattamento con Lalvigne Prohydro consente di mitigare meglio degli altri gli effetti negativi descritti in precedenza e al termine del periodo di recovery, sono proprio le tesi PS a mostrare le performance migliori. Queste osservazioni sono in accordo con le ipotesi descritte nel presente lavoro e con le indicazioni aziendali della ditta produttrice. È probabile che il prodotto arricchito in prolina garantisca una corretta induzione delle strategie di foto-protezione dei pigmenti e di difesa contro lo stress ossidativo, riuscendo a riprendere l'attività di crescita in modo più marcato rispetto ai controlli.



(Nei grafici sopra riportati, a lettere diverse corrispondono differenze significative delle medie di riferimento. L'asterisco indica il grado di significatività: per $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)). I valori riportati dagli istogrammi rappresentano la media \pm errore standard, calcolato in questo caso per $n=256$)

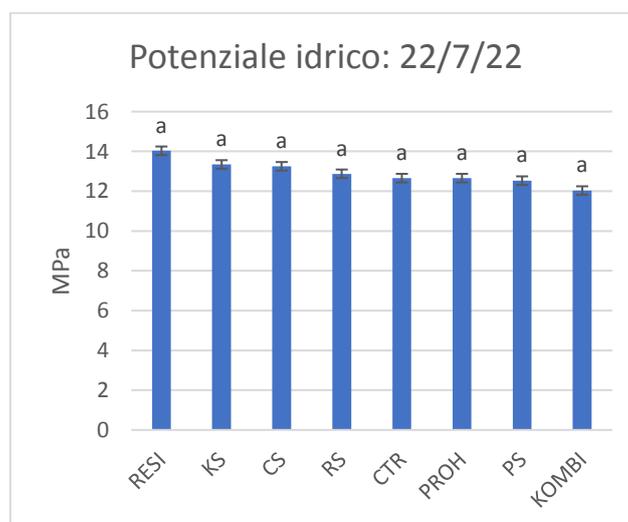
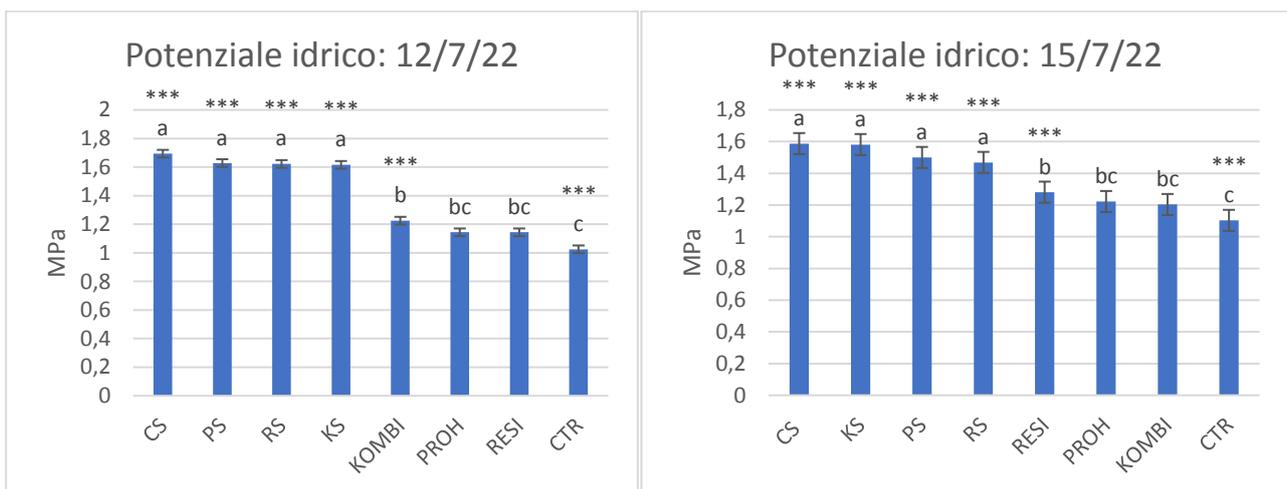


(Nei grafici sopra riportati, a lettere diverse corrispondono differenze significative delle medie di riferimento. L'asterisco indica il grado di significatività: per $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)). I valori riportati dagli istogrammi rappresentano la media \pm errore standard, calcolato in questo caso per $n=256$)

4.1.4 Potenziale idrico

Il potenziale idrico fogliare (LWP) è un altro parametro fondamentale per determinare lo stato idrico delle viti in situazioni di stress idrico. Il monitoraggio è avvenuto negli stessi giorni in cui si sono effettuate le letture della conduttanza stomatica. Anche in questo si è effettuata una ANOVA ad una e a due vie, per includere la variabilità dei blocchi. Nell'analisi con la prima metodologia, sono emerse in modo molto significativo ($P < 0.01$) le evidenti differenze tra le medie delle tesi sotto stress idrico rispetto ai rispettivi controlli WW. Si può notare come al progredire del deficit idrico le tesi WS rispondano con un graduale peggioramento del rispettivo stato idrico, raggiungendo nelle fasi più critiche, valori del potenziale idrico fogliare (LWP) inferiori a -1.6 Mpa, che indicano una condizione di forte carenza idrica. Sebbene all'interno del gruppo delle tesi WS non vi siano differenze significative, è bene notare come siano state le piante non trattate (CS) quelle a soffrire

maggiormente della diminuzione del contenuto idrico del substrato. In accordo con la trattazione precedente, le tesi trattate hanno mostrato performance più simili in questo contesto, testimoniando un effetto comparabile. Interessante notare come al termine della recovery, le tesi PS presentino la seconda media più bassa dell'esperimento, suggerendo che il contenuto idrico fogliare si sia ristabilito correttamente. In questo caso non ci sono differenze significative, ma è possibile integrare questo risultato con quello della conduttanza stomatica e dell'attività del PS II per sostenere l'ipotesi che il prodotto Lalvigne Prohydro abbia consentito alle piante trattate di sostenere meglio la carenza idrica imposta e di riprendere in modo adeguato l'attività di crescita. Gli stessi risultati emergono dalla seconda metodologia di analisi statistica, in cui si nota anche la forte incidenza dell'effetto blocchi sui risultati registrati. Questo dato non sorprende poiché il potenziale idrico fogliare è un parametro fortemente influenzato dalle variazioni del microclima della chioma, dalla radiazione incidente e dal carico termico, oltre chiaramente allo stato idrico della pianta e del contenuto idrico del suolo. L'esperimento testimonia come i trattamenti possano incidere sulla fisiologia della vite in casi di stress idrico transitorio e di breve periodo, in cui si osserva in ogni caso, dal comportamento delle tesi di controllo, la naturale resilienza e adattamento di *Vitis vinifera* verso le alte temperature e gli eventi siccitosi severi.



(Nei grafici sopra riportati, a lettere diverse corrispondono differenze significative delle medie di riferimento. L'asterisco indica il grado di significatività: per $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)). I valori riportati dagli istogrammi rappresentano la media \pm errore standard, calcolato in questo caso per $n=192$)

4.1.5 Peso unitario bacca e peso grappoli

Sia per le analisi sul peso unitario bacca che per il peso dei grappoli, è stata condotta una ANOVA ad una via. Inoltre si è indagato un possibile effetto dei trattamenti sull'allegagione, misurando il numero totale delle bacche prodotte di ogni pianta del blocco di riferimento. In tutti i casi non si sono osservate variazioni significative delle medie, pertanto si conclude che nel presente esperimento non si sono osservate implicazioni evidenti tra i prodotti biostimolanti e i parametri produttivi indagati.

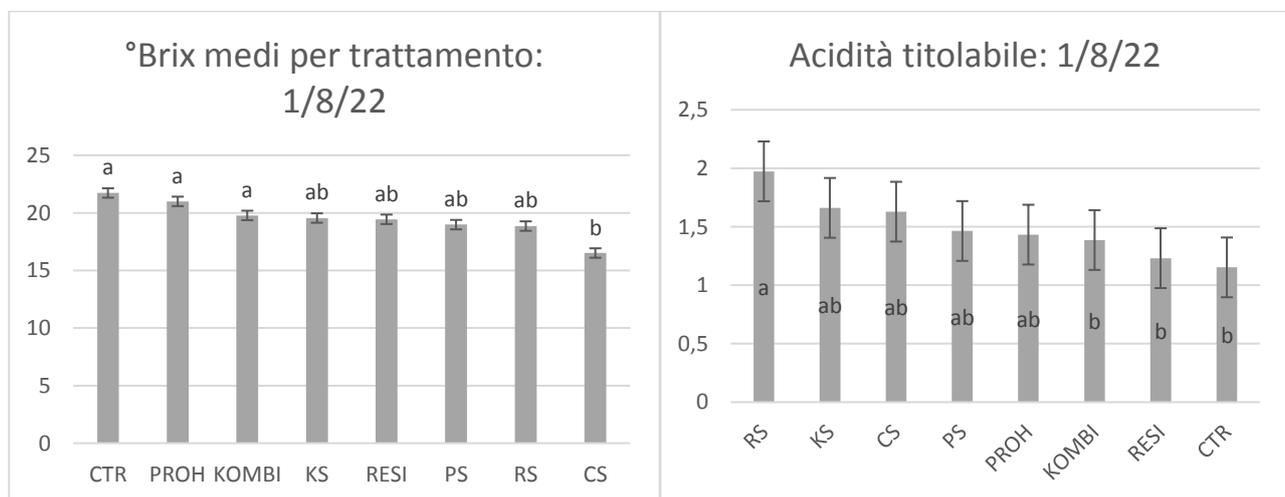


(Nei box plot a e b sopra riportati, a lettere diverse corrispondono differenze significative delle medie di riferimento. L'asterisco indica il grado di significatività: per $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)). In entrambi i casi riportati non si è rilevata significatività)

4.1.6 Maturazione

I rilevamenti sui parametri qualitativi delle bacche hanno compreso la determinazione del grado zuccherino delle bacche ($^{\circ}$ Brix) e dell'acidità titolabile. Il monitoraggio è stato eseguito estraendo il succo proveniente

dagli stessi 50 acini utilizzati in precedenza per la registrazione ponderale. Le analisi statistiche eseguite sono state ANOVA ad una via e successivamente ANOVA a due vie. Nel caso delle analisi del grado di zuccherino non si è raggiunta la significatività statistica, ma è molto interessante notare come la probabilità dell'errore di I tipo (α) sia stata di 0.0735. Per questa ragione si è cercato di ridurre la variabilità dell'errore dovuta ad un potenziale effetto blocchi, che tuttavia si è rilevato non significativo. In ogni caso è utile notare come il grado zuccherino delle tesi di controllo (CS e CTR) sia stato di perfetta antitesi. Questo comportamento può essere interpretato in due modi differenti. Le tesi CTR e CS hanno mostrato rispettivamente il più alto ed il più basso valore del grado zuccherino, separandosi in modo netto. Come descritto nelle sezioni introduttive, eccessi di zuccheri solubili nel mosto possono essere registrati in casi in cui le viti abbiano attraversato periodi di stress abiotici severi oppure in annate particolarmente critiche dal punto di vista termico. Inoltre lo stress idrico severo nelle fasi di critiche di maturazione delle bacche (in special modo nelle fasi dell'invaiaura) può alterare le relazioni tra source/sink, determinando uno scadimento della qualità dei frutti che nel caso dell'esperimento potrebbe non essere stato ristabilito nelle fasi di recovery. Pertanto è possibile ritenere che i prodotti biostimolanti siano riusciti a mitigare l'effetto negativo dato dall'eccessivo carico termico e del deficit idrico, mantenendo un grado di zuccheri più bilanciato, in considerazione che lo scarto tra le medie delle tesi WS e le tesi WW trattate non si dimostra così ampio ed evidente come per le tesi CS e CTR. Riguardo all'acidità titolabile, l'analisi statistica si è avvalsa delle stesse metodologie e si è rilevato esclusivamente un effetto significativo dei blocchi ($P < 0.0245$). Si può in ogni caso osservare la tendenza delle viti stressate a mostrare una maggiore acidità titolabile rispetto alle tesi non stressate. Interessante notare che le tesi PS presentano uno scarto della media minimo rispetto ai corrispettivi controlli.



(Nei grafici sopra riportati, a lettere diverse corrispondono differenze significative delle medie di riferimento. L'asterisco indica il grado di significatività: per $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)). I valori riportati dagli istogrammi rappresentano la media \pm errore standard, calcolato in questo caso per $n=64$)

4.2 Caso studio di Chiarano

4.2.1 Contenuto idrico volumetrico (VWC)

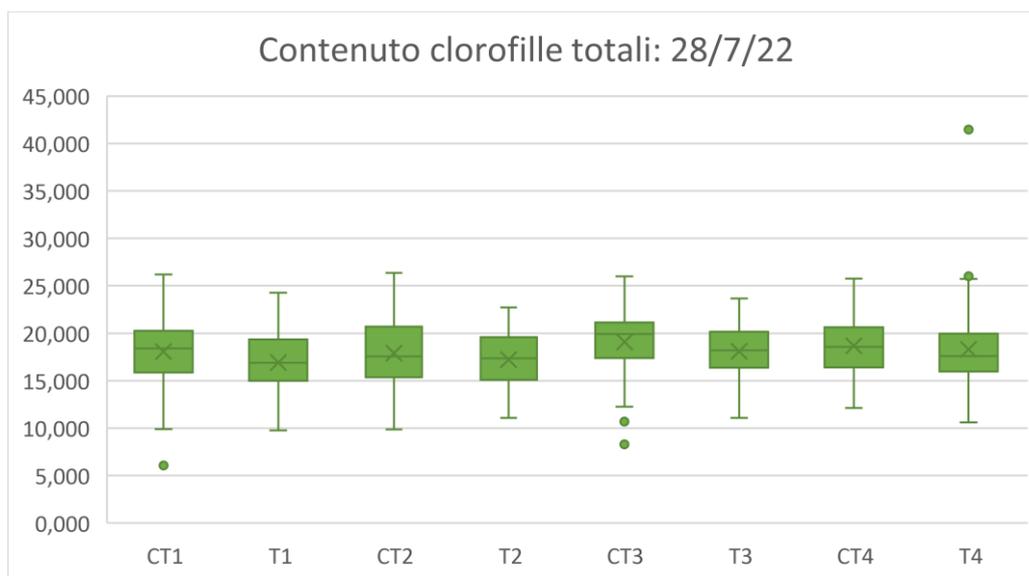
Nel caso studio di Chiarano, il contenuto idrico volumetrico del suolo (VWC) è stato misurato per ognuno degli otto filari di monitoraggio durante le tre settimane di raccolta dei dati. L'ANOVA ad una via effettuata

non ha rilevato differenze significative delle medie dei blocchi trattati rispetto a quelle dei controlli. Questa osservazione è positiva, in quanto indica una buona omogeneità del contenuto idrico del suolo dell'area indagata e consente così di ridurre la variabilità dell'errore per le analisi sui parametri fisiologici e qualitativi.

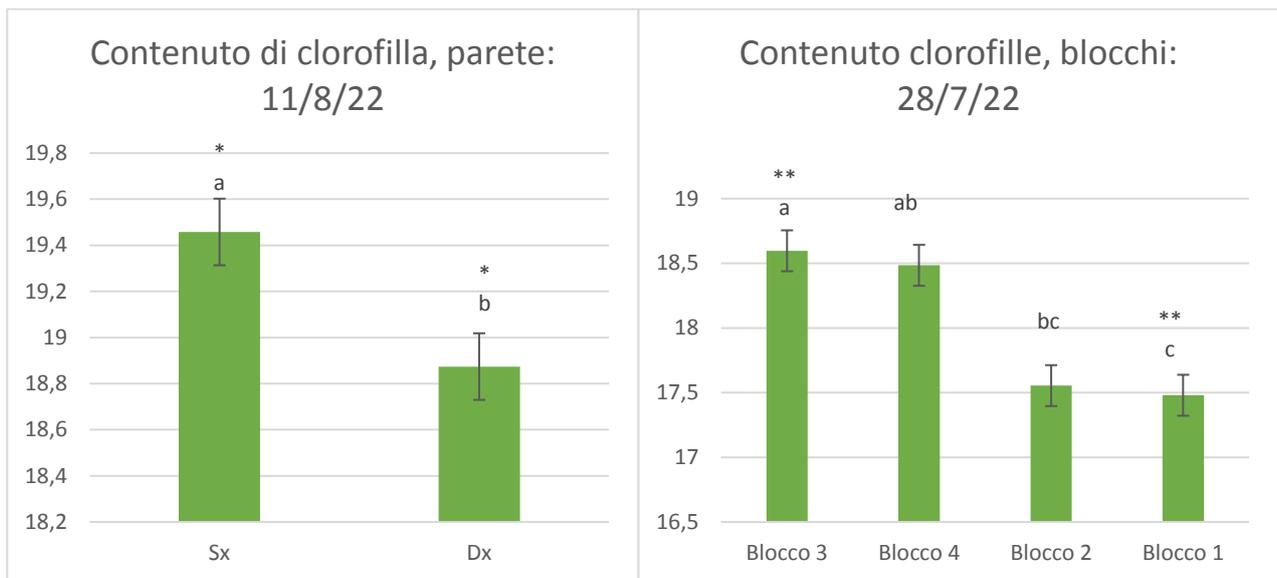
4.2.2 Pigmenti e indici fogliari

Clorofille totali

La determinazione dei pigmenti fogliari è stata effettuata in due giornate distinte, nel 28/7/22 e nell'11/8/22. Le misurazioni si sono effettuate per entrambe le pareti dei filari, tenendo conto che la parete di destra (Dx) era esposta ad ovest e quella di sinistra (Sx) ad est. L'analisi statistica iniziale è stata condotta con una ANOVA a due vie ed è stata valutata la possibile interazione tra trattamento e parete (Tesi*parete). Nella prima giornata si rileva una differenza significativa esclusivamente per il comportamento dei filari e si è iniziato ad ipotizzare una tendenza, per la quale le clorofille totali aumentassero la loro concentrazione a partire dal primo blocco e progressivamente fino al terzo. Non si è osservato inizialmente né un effetto parete, né un effetto di interazione. Nella seconda settimana si rinviene una tendenza opposta, l'effetto parete risulta significativo così come l'effetto di interazione tra trattamento e parete ($P < 0.082$). A questa analisi è seguita l'ANOVA a due vie "Nested", nella quale si è ricercato anche il potenziale effetto dei blocchi. Nella prima settimana l'effetto blocchi si è rilevato significativo ($p < 0.0135$), confermando la tendenza ipotizzata, cioè che nelle fasi più ravvicinate a quelle del trattamento le differenze osservate siano maggiormente legate alla variabilità ambientale. L'analisi dei dati dell'ultima settimana ha rilevato solo la significatività dell'effetto parete. Nel caso delle clorofille totali pertanto si ritiene che il prodotto non abbia inciso sulla variabilità osservata, che è stata maggiormente dipesa da variazioni ambientali e dalla radiazione incidente. Evidentemente le piante monitorate non hanno subito stress abiotici differenziali che avrebbero potuto metter in risalto l'azione del trattamento. La metodologia descritta per le clorofille totali è stata seguita anche per gli altri pigmenti e per l'indice NBI.



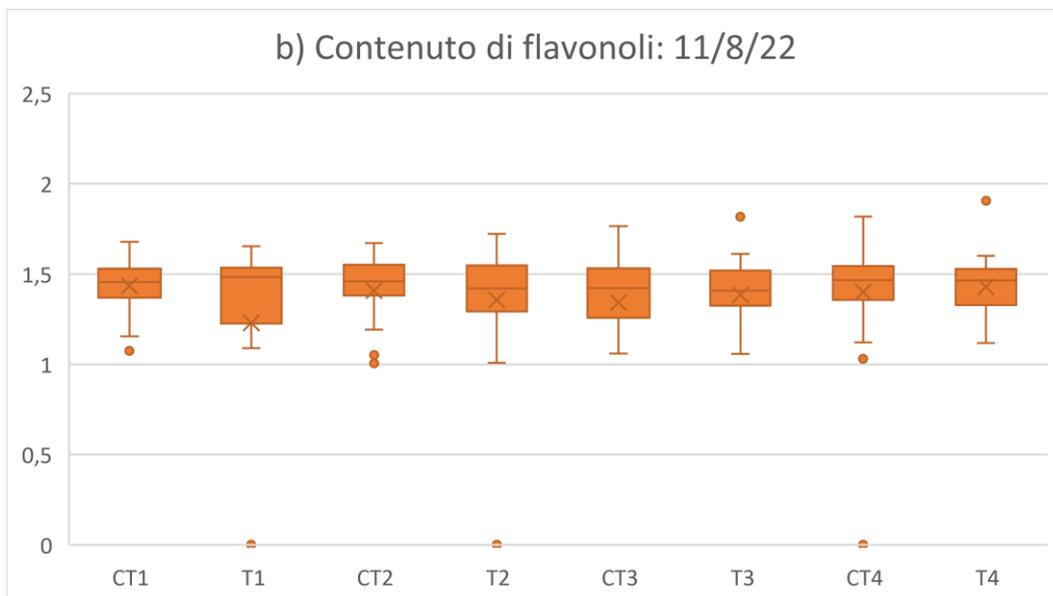
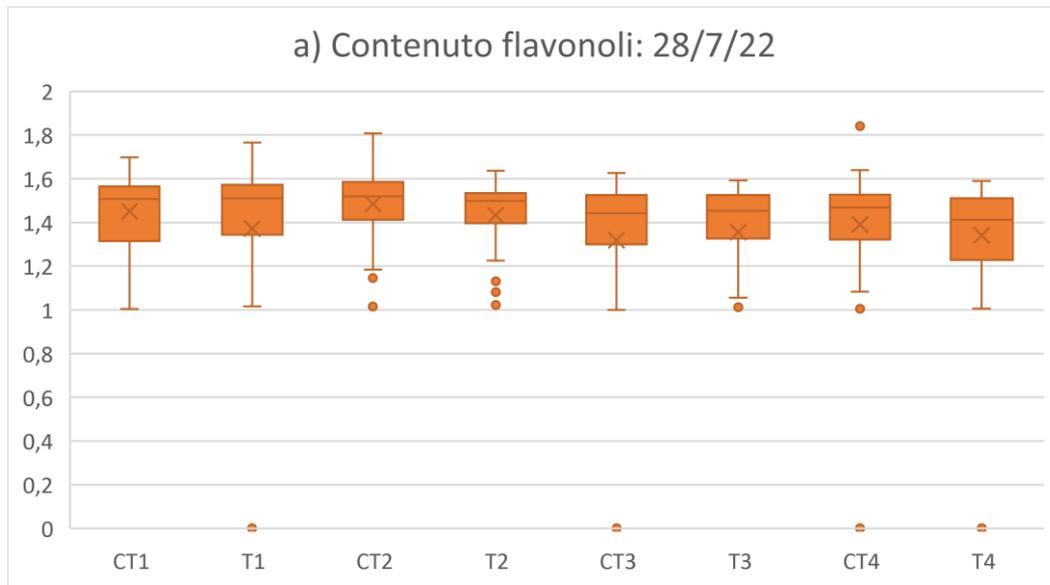
(Nel box plot sopra riportato, a lettere diverse corrispondono differenze significative delle medie di riferimento. L'asterisco indica il grado di significatività: per $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)). In questo caso non si è osservata significatività)



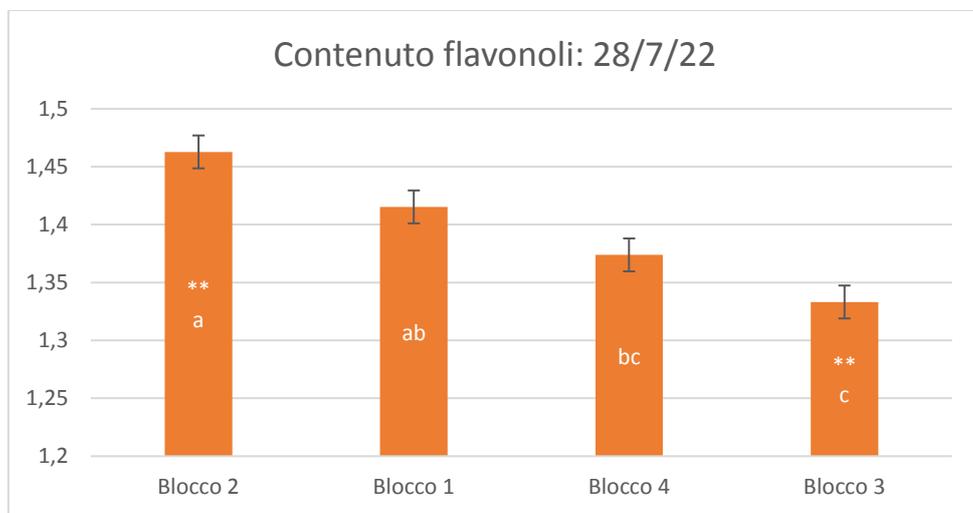
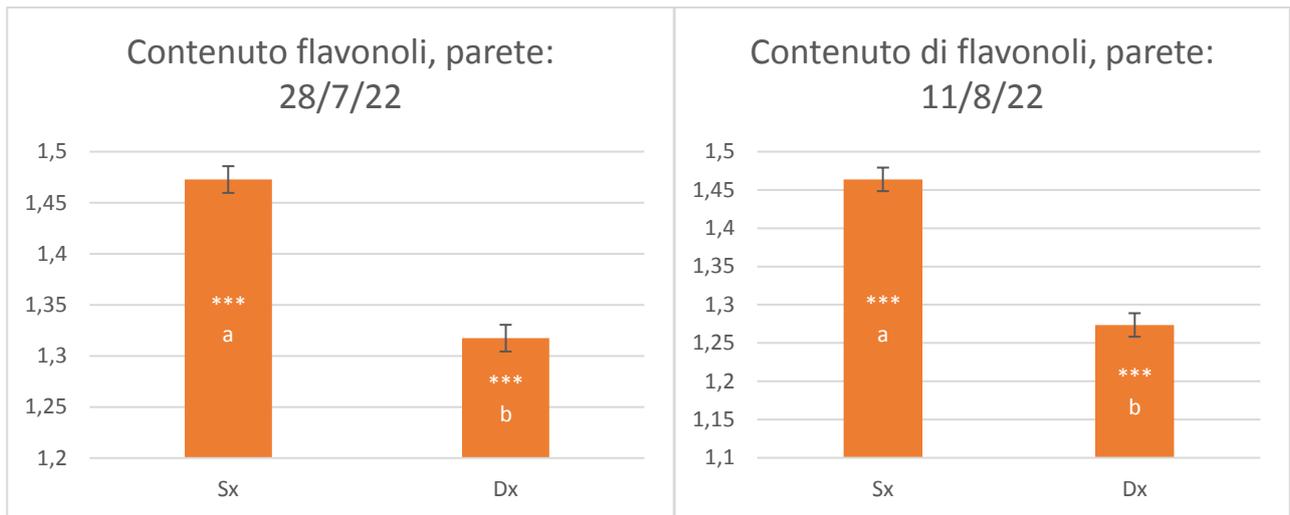
(Nei grafici sopra riportati, a lettere diverse corrispondono differenze significative delle medie di riferimento. L'asterisco indica il grado di significatività: per $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)). I valori riportati dagli istogrammi rappresentano la media \pm errore standard, calcolato in questo caso per $n=480$)

Flavonoli e antocianine

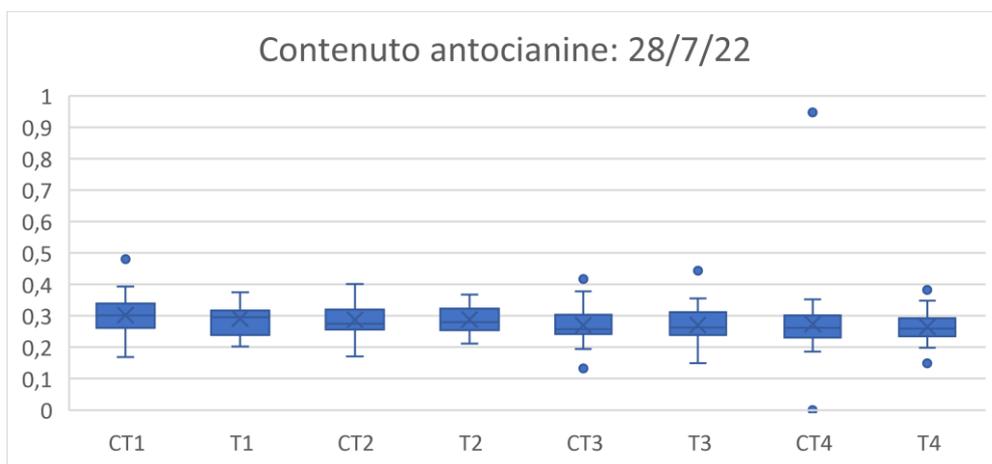
Nel caso dei flavonoli non si riscontrano differenze significative indotte dai trattamenti, si rinvengono delle differenze date dall'effetto dei blocchi e soprattutto della parete, il cui effetto è risultato sempre significativo. Le stesse osservazioni si riportano per il contenuto delle antocianine. Questi pigmenti fogliari, come riportano in letteratura, variano le loro concentrazioni in funzione di stimoli ambientali, soprattutto in funzione del carico termico fogliare, dell'esposizione e nel caso di induzione di resistenza date dall'azione di elicitatori fogliari. Conseguentemente, non stupiscono le differenze riscontrate tra le due pareti della chioma. Tuttavia è plausibile ritenere che in questo esperimento di pieno campo le condizioni di stress idrico non siano state severe a tal punto da innescare i meccanismi di difesa indotti dai trattamenti e che pertanto i livelli di questi pigmenti siano risultati indifferenti al prodotto. Da questo punto di vista la variabilità ambientale e soprattutto l'esposizione ha determinato le variazioni più evidenti nei blocchi.



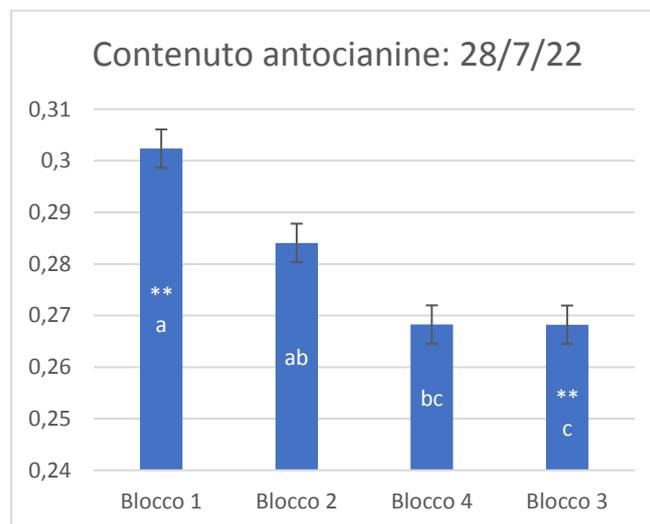
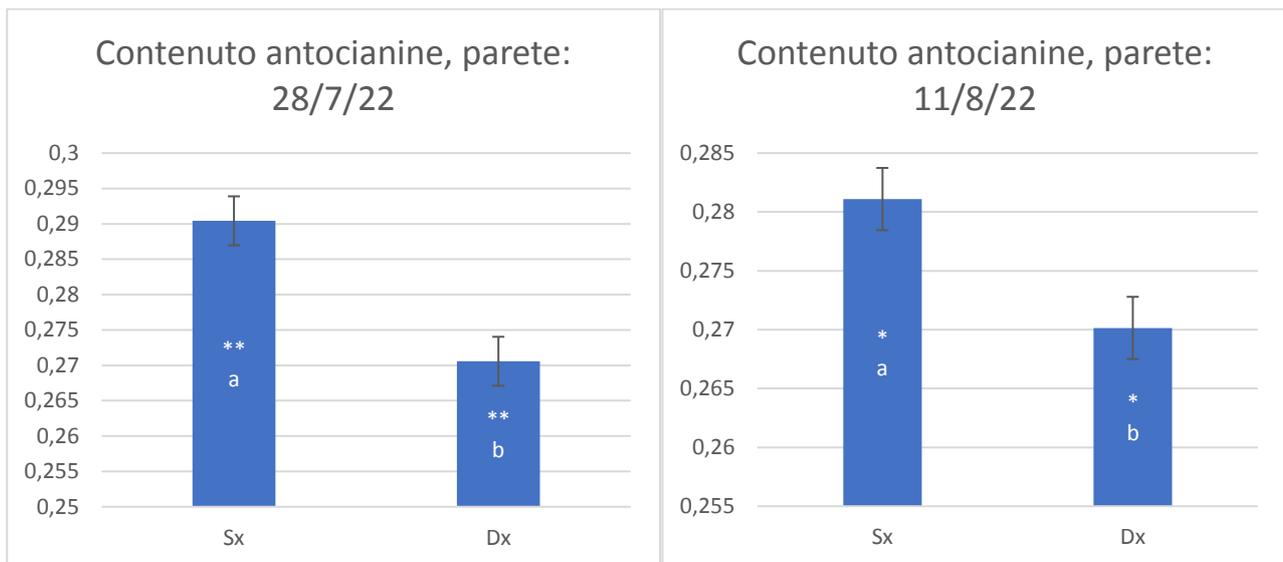
(Nei box plot sopra riportati, a lettere diverse corrispondono differenze significative delle medie di riferimento. L'asterisco indica il grado di significatività: per $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)). In questo caso non si è rilevata alcuna significatività)



(Nei grafici sopra riportati, a lettere diverse corrispondono differenze significative delle medie di riferimento. L'asterisco indica il grado di significatività: per $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)). I valori riportati dagli istogrammi rappresentano la media \pm errore standard, calcolato in questo caso per $n=480$)



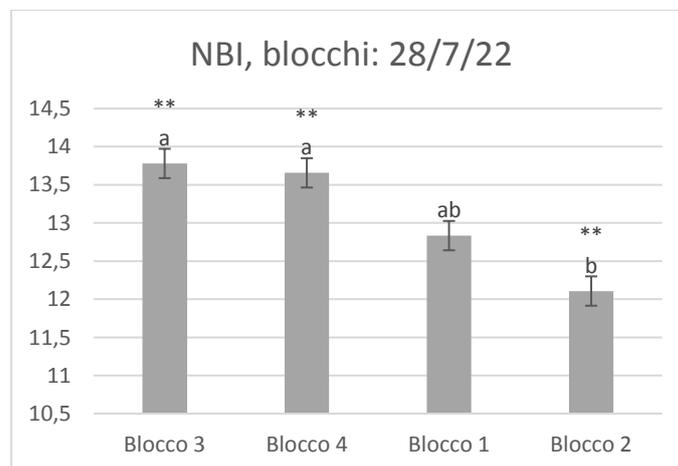
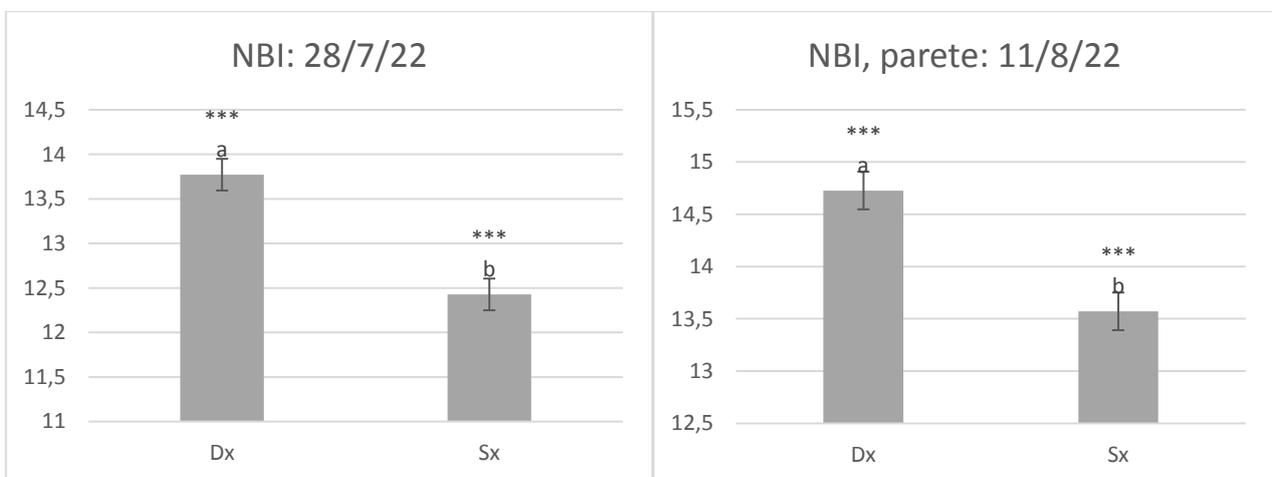
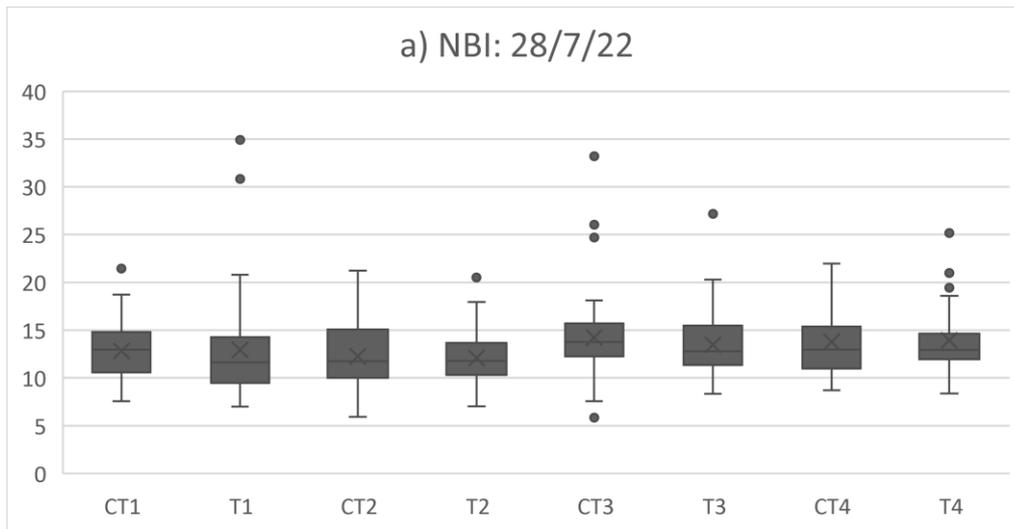
(Nel box plot sopra riportato, a lettere diverse corrispondono differenze significative delle medie di riferimento. L'asterisco indica il grado di significatività: per $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)). In questo caso non si sono osservate differenze significative)



(Nei grafici sopra riportati, a lettere diverse corrispondono differenze significative delle medie di riferimento. L'asterisco indica il grado di significatività: per $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)). I valori riportati dagli istogrammi rappresentano la media \pm errore standard, calcolato in questo caso per $n=480$)

NBI

L'indice NBI non può che riflettere gli andamenti dei livelli di clorofille totali e di flavonoli nei tessuti fogliari, essendo calcolato in base al rapporto tra i due quantitativi. Pertanto anche in questo caso l'effetto del trattamento non è stato rilevante nell'indurre variazioni significative di questo parametro. Viceversa si è riscontrato un effetto significativo dato dall'esposizione della parete vegetale. In sintesi, il prodotto Lalvigne Prohydro, non ha mostrato in questo caso studio una particolare rilevanza sui livelli dei pigmenti fogliari. Si ritiene pertanto che nell'area studiata le viti non abbiano subito particolari stress idrici, che avrebbero potuto mettere in risalto differenze date dal trattamento.

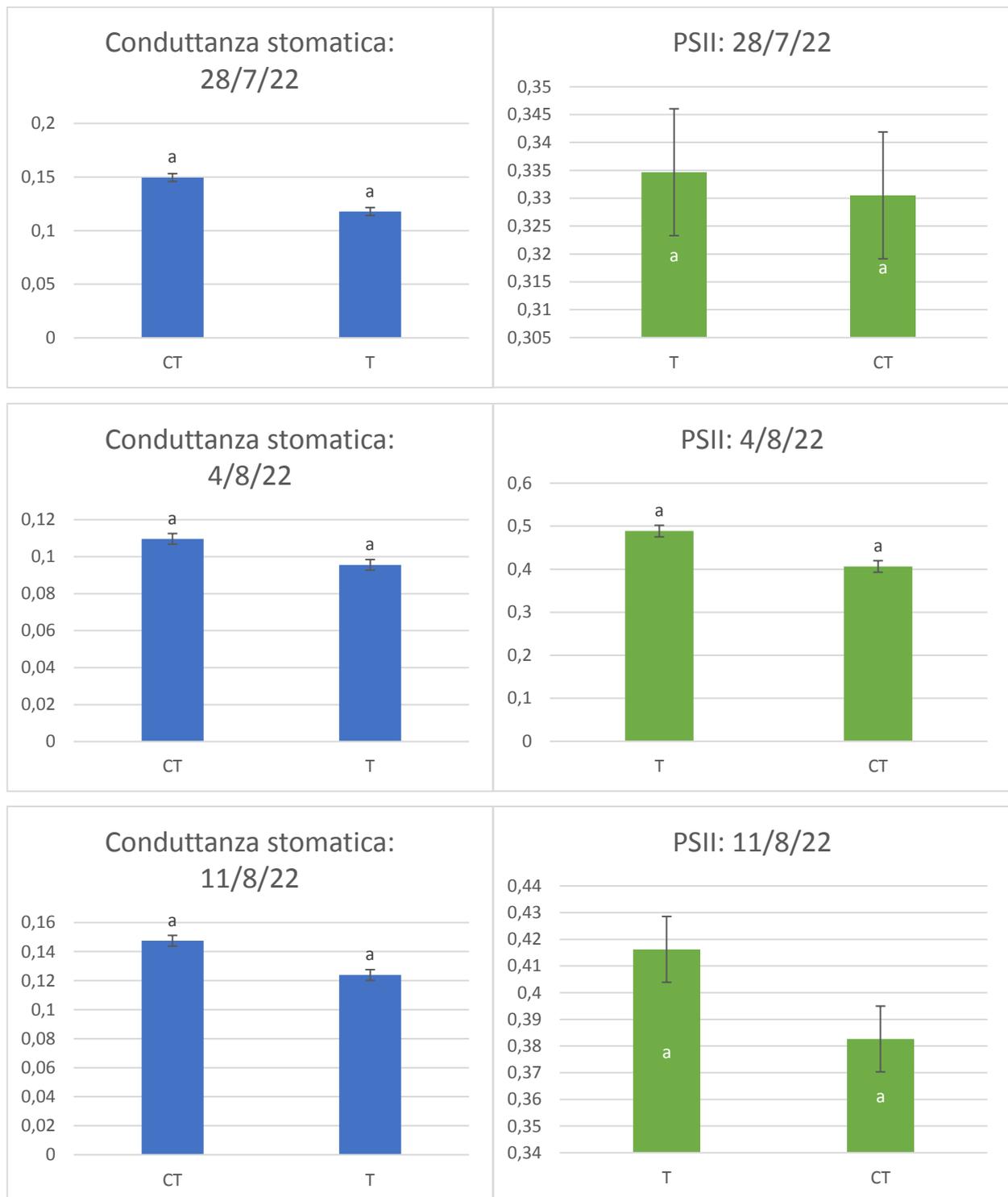


(Nel box plot in figura a e nei grafici sopra riportati, a lettere diverse corrispondono differenze significative delle medie di riferimento. L'asterisco indica il grado di significatività: per $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)). I valori riportati dagli istogrammi rappresentano la media \pm errore standard, calcolato in questo caso per $n=480$)

4.2.3 Conduttanza stomatica e PSII

Le analisi statistiche condotte non hanno mostrato livelli di significatività accettabili sia nel caso della conduttanza stomatica che nelle variazioni dell'attività del PSII. Lo svolgimento dell'ANOVA a due vie "Nested" ha rilevato l'esclusiva significatività dell'effetto dei blocchi sulla differenza delle medie, di entrambi

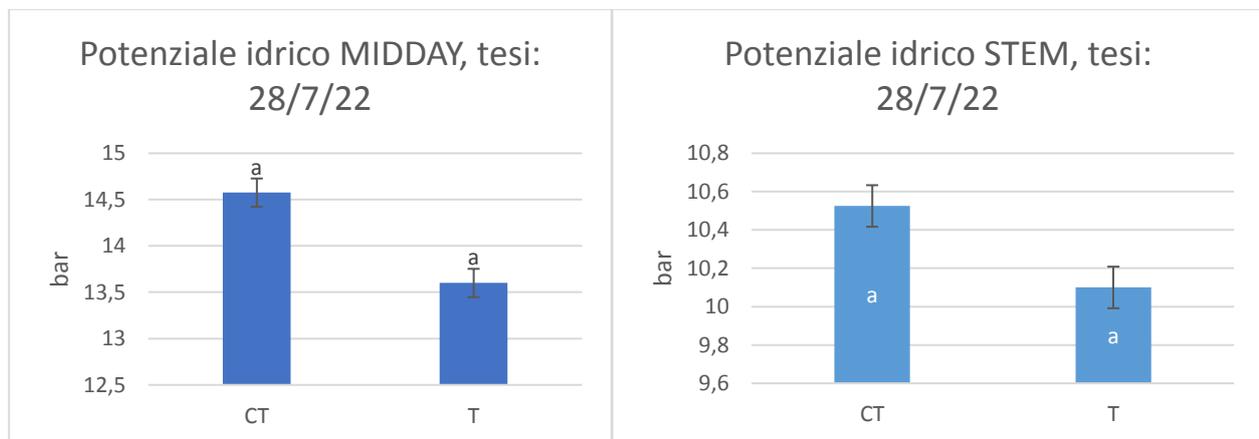
i parametri. Alla luce del caso studio precedente, queste osservazioni rafforzano l'ipotesi per cui l'effetto potenziale dei trattamenti sia stato poco evidente poiché non si sono verificati eventi di deficit idrico e stress ossidativi di particolare rilievo.



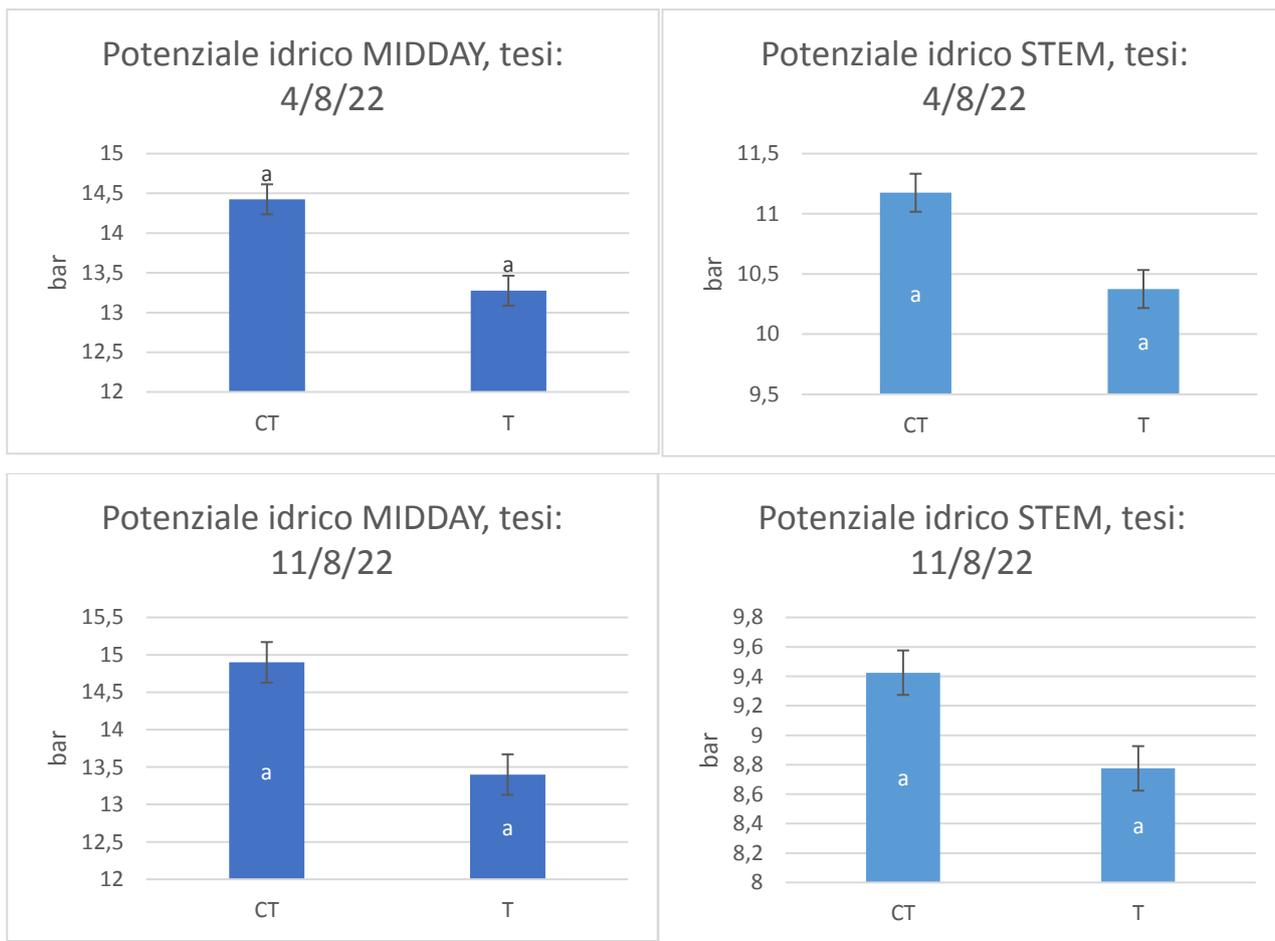
(Nei grafici sopra riportati, a lettere diverse corrispondono differenze significative delle medie di riferimento. L'asterisco indica il grado di significatività: per $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***). I valori riportati dagli istogrammi rappresentano la media \pm errore standard, calcolato in questo caso per $n=240$)

4.2.4 Potenziale idrico fogliare di mezzogiorno (MIDDAY) e dello stelo (STEM)

La raccolta dei dati su questi due parametri e le successive analisi statistiche eseguite, anche in questo caso, parallele a quelle già illustrate, ha chiaramente indicato l'assenza di stress idrico severo nel periodo di monitoraggio. Durante le tre settimane di monitoraggio le tesi di controllo non hanno mai mostrato in media un potenziale idrico fogliare di mezzogiorno (MIDDAY) inferiore a -1,5 MPa. Le relative analisi della varianza non hanno permesso di evidenziare differenze significative tra le tesi trattate e le tesi di controllo, indicando esclusivamente differenze significative dei blocchi, ciò può essere spiegato adducendo gli stessi ragionamenti del precedente caso studio. Grazie alle misurazioni del potenziale di STEM è possibile osservare lo stato idrico delle viti in maniera più accurata, riducendo in modo sensibile la variabilità ambientale. Infatti a differenza del potenziale di midday, l'influenza ambientale data dalla variabilità dei blocchi, nell'ANOVA a due vie, si è osservata esclusivamente nella prima settimana di monitoraggio per poi risultare non significativa. Sebbene il trattamento non abbia mostrato differenze significative, è molto utile notare come l'applicazione del prodotto abbia in tutti i casi contribuito a ridurre il potenziale idrico fogliare e dello stelo, testimoniando la capacità di stabilizzare il potenziale idrico a valori meno negativi rispetto al controllo. L'osservazione sul potenziale di STEM conferma indirettamente quanto rilevato con le misure del contenuto idrico volumetrico del suolo, rendendo palese che tutte le viti monitorate si sono trovate in condizioni di contenuto idrico del suolo del tutto omogenee.



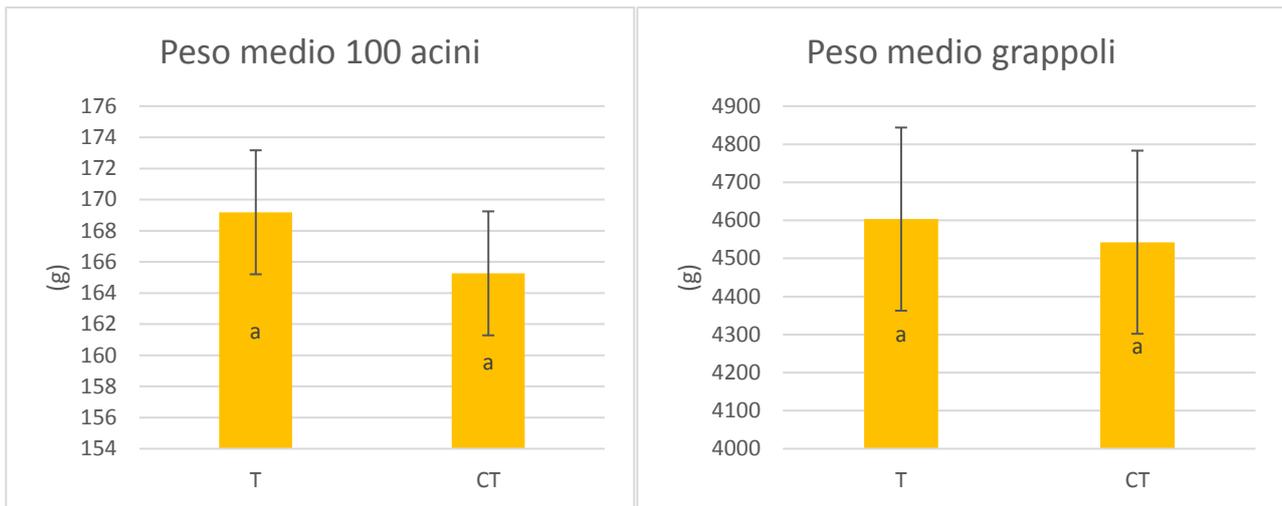
(Nei grafici sopra riportati, a lettere diverse corrispondono differenze significative delle medie di riferimento. L'asterisco indica il grado di significatività: per $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)). I valori riportati dagli istogrammi rappresentano la media \pm errore standard, calcolato in questo caso per $n=40$)



(Nei grafici sopra riportati, a lettere diverse corrispondono differenze significative delle medie di riferimento. L'asterisco indica il grado di significatività: per $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***). I valori riportati dagli istogrammi rappresentano la media \pm errore standard, calcolato in questo caso per $n=40$)

4.2.5 Peso 100 bacche e peso totale grappoli

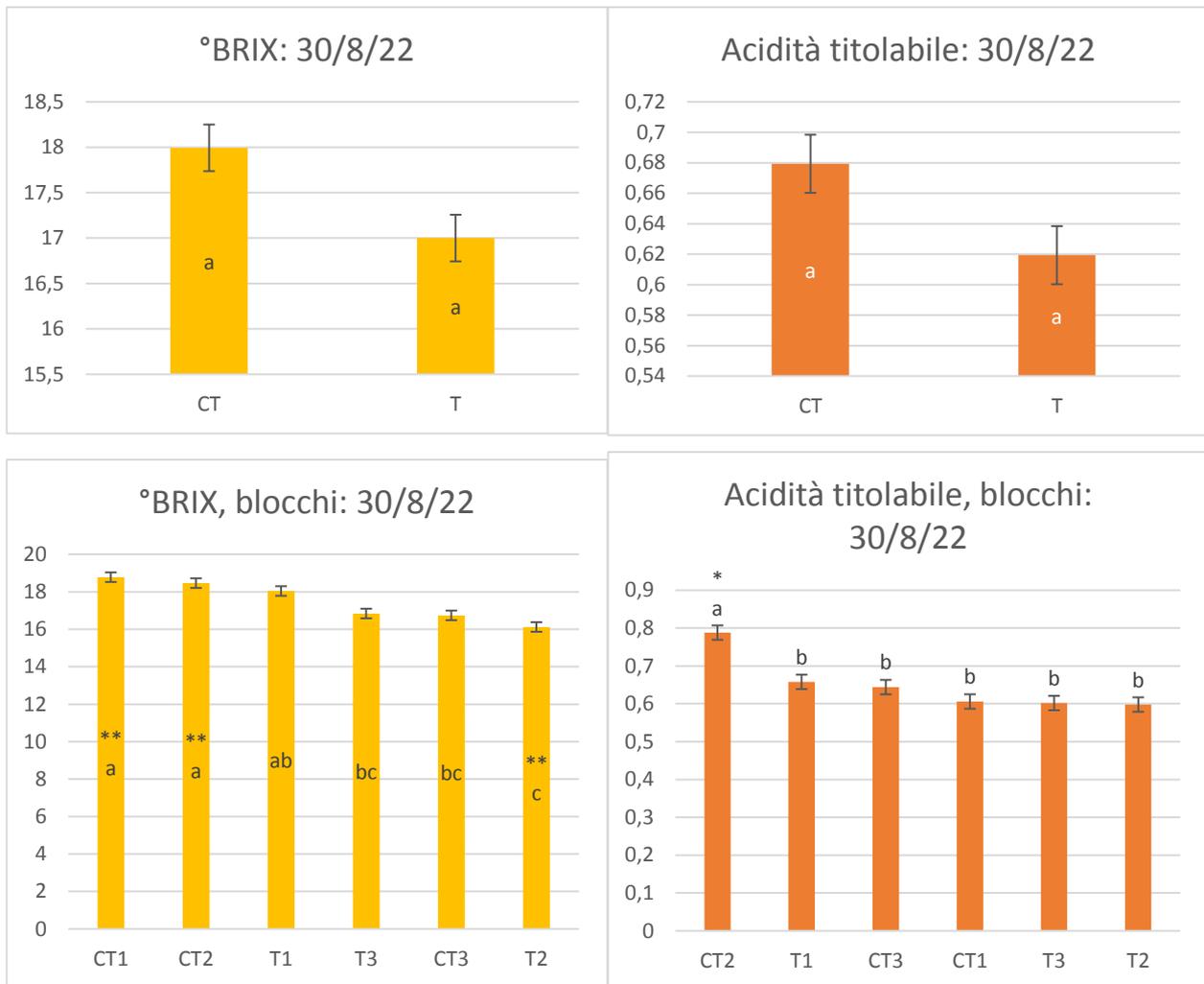
Dalle analisi effettuate si conferma quanto valutato e discusso nel caso studio precedente, per cui il trattamento con Lalvigne Prohydro non incide in maniera significativa sui parametri di resa delle viti monitorate.



(Nei grafici sopra riportati, a lettere diverse corrispondono differenze significative delle medie di riferimento. L'asterisco indica il grado di significatività: per $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)). I valori riportati dagli istogrammi rappresentano la media \pm errore standard, calcolato in questo caso per $n=30$)

4.2.6 Maturazione

Le tesi di controllo hanno mostrato contenuti zuccherini, misurati in gradi °Brix, più elevati rispetto alle piante trattate. Questa tendenza si osserva anche per quanto riguarda l'acidità titolabile. Tuttavia l'ANOVA a due vie, in entrambi i casi non ha mostrato differenze significative tra le medie delle tesi trattate rispetto ai controlli, ma ha evidenziato un effetto significativo dell'effetto dei blocchi. Anche in questo caso la variabilità ambientale ha giocato un ruolo più marcato nella differenziazione dei risultati.



(Nei grafici sopra riportati, a lettere diverse corrispondono differenze significative delle medie di riferimento. L'asterisco indica il grado di significatività: per $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)). I valori riportati dagli istogrammi rappresentano la media \pm errore standard, calcolato in questo caso per $n=30$)

5. Conclusioni

Il cambiamento climatico si prospetta come una grande minaccia per l'attività agricola e per la viticoltura, rappresentando la causa principale dell'aumento della frequenza di eventi critici, come le ondate di calore e la siccità. Questi fenomeni possono causare stress, che, se prolungati durante il ciclo produttivo delle colture, inducono degli evidenti vincoli allo sviluppo delle colture e alla produttività. Da questo punto di vista, anche specie naturalmente adattate a sostenere vincoli di questo tipo, come la vite, saranno sempre più suscettibili all'innalzamento delle temperature globali. Il vino rappresenta una produzione tradizionale e tipica di molte regioni che si affacciano sul Mediterraneo, le quali si sono dimostrate purtroppo le più soggette agli effetti deleteri indotti dal cambiamento climatico. L'adattamento delle cultivar locali, ha permesso negli anni, di garantire produzione fortemente legate al territorio e alle caratteristiche peculiari del clima nelle varie regioni. Si ritiene pertanto che la viticoltura mediterranea dovrà affrontare nel prossimo futuro sfide impegnative. L'interesse attuale per prodotti biostimolanti in grado di mitigare gli effetti deleteri dell'innalzamento delle temperature e dello stress idrico, parte proprio dalle precedenti constatazioni. Sono state principalmente queste

le motivazioni che hanno definito gli obiettivi del presente studio. Cioè valutare nuovi input agronomici che potrebbero fungere da valido strumento di supporto nella progettazione di strategie integrate di mitigazione e contrasto al cambiamento climatico. A tal riguardo, l'esperienza in condizioni controllate ha permesso di mettere solo parzialmente in risalto le potenzialità di stimolo alla crescita e di induzione di risposte fisiologiche di tolleranza allo stress idrico. Per quanto riguarda l'accrescimento, sono emerse tendenze interessanti soprattutto nelle fasi successive al periodo di *recovery*, in cui si sono rilevate performance che potrebbero essere indagate in altri studi, soprattutto per quanto riguarda le implicazioni sull'area fogliare delle tesi combinate. Le risposte fisiologiche della vite allo stress idrico hanno determinato sempre una netta separazione dei parametri rilevati sul potenziale idrico fogliare (LWP) e sulla conduttanza stomatica (g_s), tra le tesi WW e quelle WS. Da questo punto di vista, tenendo presente anche i risultati ottenuti in pieno campo, si può ipotizzare che il processo di induzione delle risposte di tolleranza al deficit idrico non si renda così palese ed evidente se non si concretizzano condizioni di stress prolungate nel tempo e non solo di entità severa. Si ritiene pertanto che siano necessarie ulteriori ricerche, programmando stress idrici controllati che vengano protratti per un periodo superiore. Le considerazioni sulla qualità delle bacche, si prestano invece ad un'analisi più attenta. Se, come osservato nel presente caso studio, i prodotti in esame non hanno influenzato in modo significativo i parametri ponderali e quelli relativi alle percentuali di allegagione, non è da escludere un potenziale effetto positivo sul bilanciamento del contenuto zuccherino e dell'acidità titolabile a valori meno estremi rispetto alle tesi non trattate. In entrambi i casi su vite, infatti, con una maggiore numerosità campionaria sarebbero potute emergere con più chiarezza queste supposizioni. In conclusione, l'interesse per questa tipologia di prodotti di origine biologica condurrà di certo nel prossimo futuro a numerose osservazioni sui possibili effetti di contrasto al cambiamento climatico e permetterà di mettere in luce con maggiore chiarezza i meccanismi di azione. Tenendo conto del basso dosaggio richiesto e dalla facile reperibilità, biostimolanti a base di idrolisati proteici e derivati di lieviti inattivati saranno sempre maggiormente utilizzati in viticoltura, non solo per fronteggiare l'impatto negativo dell'imprevedibilità del clima sul ciclo vegetativo, ma anche come valido strumento per proteggere la qualità delle uve e del vino.

6. Bibliografia

1. Abdelaal, K. A., EL-Maghraby, L. M., Elansary, H., Hafez, Y. M., Ibrahim, E. I., El-Banna, M., El-Esawi, M., & Elkelish, A. (2020). Treatment of sweet pepper with stress tolerance-inducing compounds alleviates salinity stress oxidative damage by mediating the physio-biochemical activities and antioxidant systems. *Agronomy*, *10*(1). <https://doi.org/10.3390/agronomy10010026>
2. Abdelaal, K., Attia, K. A., Niedbała, G., Wojciechowski, T., Hafez, Y., Alamery, S., Alateeq, T. K., & Arafa, S. A. (2021). Mitigation of drought damages by exogenous chitosan and yeast extract with modulating the photosynthetic pigments, antioxidant defense system and improving the productivity of garlic plants. *Horticulturae*, *7*(11). <https://doi.org/10.3390/horticulturae7110510>
3. Afonso, S., Oliveira, I., Meyer, A. S., & Gonçalves, B. (2022). Biostimulants to Improved Tree Physiology and Fruit Quality: A Review with Special Focus on Sweet Cherry. In *Agronomy* (Vol. 12, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030659>

4. Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 206–216. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.006>
5. Belfiore, N., Nerva, L., Fasolini, R., Gaiotti, F., Lovat, L., & Chitarra, W. (2021). Leaf gas exchange and abscisic acid in leaves of Glera grape variety during drought and recovery. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 33(3), 261–270. <https://doi.org/10.1007/s40626-021-00211-3>
6. Bernardo, S., Dinis, L. T., Machado, N., & Moutinho-Pereira, J. (2018). Grapevine abiotic stress assessment and search for sustainable adaptation strategies in Mediterranean-like climates. A review. In *Agronomy for Sustainable Development* (Vol. 38, Issue 6). Springer-Verlag France. <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0544-0>
7. Bota, J., Tomás, M., Flexas, J., Medrano, H., & Escalona, J. M. (2016). Differences among grapevine cultivars in their stomatal behavior and water use efficiency under progressive water stress. *Agricultural Water Management*, 164, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2015.07.016>
8. Casa, R., Castaldi, F., Pascucci, S., & Pignatti, S. (2015). Chlorophyll estimation in field crops: An assessment of handheld leaf meters and spectral reflectance measurements. *Journal of Agricultural Science*, 153(5), 876–890. <https://doi.org/10.1017/S0021859614000483>
9. Ceccarelli, A. V., Miras-Moreno, B., Buffagni, V., Senizza, B., Pii, Y., Cardarelli, M., Roupheal, Y., Colla, G., & Lucini, L. (2021). Foliar application of different vegetal-derived protein hydrolysates distinctively modulates tomato root development and metabolism. *Plants*, 10(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/plants10020326>
10. Cerovic, Z. G., Ghazlen, N. ben, Milhade, C., Obert, M., Debusson, S., & le Moigne, M. (2015). Nondestructive Diagnostic Test for Nitrogen Nutrition of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Based on Dualex Leaf-Clip Measurements in the Field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(14), 3669–3680. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00304>
11. Cerovic, Z. G., Masdoumier, G., Ghazlen, N. ben, & Latouche, G. (2012). A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids. *Physiologia Plantarum*, 146(3), 251–260. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01639.x>
12. Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R., & Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. In *Food Chemistry* (Vol. 135, Issue 4, pp. 3020–3038). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.100>
13. Chaves, M. M., Zarrouk, O., Francisco, R., Costa, J. M., Santos, T., Regalado, A. P., Rodrigues, M. L., & Lopes, C. M. (2010). Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. In *Annals of botany* (Vol. 105, Issue 5, pp. 661–676). <https://doi.org/10.1093/aob/mcq030>
14. Chen, C., Cui, X., Zhang, P., Wang, Z., & Zhang, J. (2021). Expression of the pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) gene from the wild grapevine *Vitis yeshanensis* promotes drought resistance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 168, 188–201. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.10.004>
15. Colla, G., Roupheal, Y., Canaguier, R., Svecova, E., and Cardarelli, M.(2014). Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. *Front. Plant Sci.*5:448. doi: 10.3389/fpls.2014.00448
16. Colla, G., Hoagland, L., Ruzzi, M., Cardarelli, M., Bonini, P., Canaguier, R., & Roupheal, Y. (2017). Biostimulant action of protein hydrolysates: Unraveling their effects on plant physiology and microbiome. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02202>

17. Colla, G., Nardi, S., Cardarelli, M., Ertani, A., Lucini, L., Canaguier, R., & Roupshael, Y. (2015). Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. In *Scientia Horticulturae* (Vol. 196, pp. 28–38). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.037>
18. Crupi, P., Palattella, D., Corbo, F., Clodoveo, M. L., Masi, G., Caputo, A. R., Battista, F., & Tarricone, L. (2021). Effect of pre-harvest inactivated yeast treatment on the anthocyanin content and quality of table grapes. *Food Chemistry*, 337. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128006>
19. Daudi, A., & O'brien, J. A. (2012). Detection of Hydrogen Peroxide by DAB Staining in Arabidopsis Leaves. In *Iss* (Vol. 2). <http://www.bio-protocol.org/e263>
20. Deloire, A., Pellegrino, A., & Rogiers, S. (2020). A few words on grapevine leaf water potential. *IVES Technical Reviews, Vine and Wine*. <https://doi.org/10.20870/ives-tr.2020.3620>
21. Easterling, W. E. et al. 2007 Food, fibre and forest products. In *Climate change 2007: impacts, adaptation and vulner-ability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (eds M. L. Parry, O. F. Canziani, J. P. Palutikof, P. J. v. d. Linden & C. E. Hanson), pp. 273–313. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
22. Ertani, A., Cavani, L., Pizzeghello, D., Brandellero, E., Altissimo, A., Ciavatta, C., et al. (2009). Biostimulant activities of two protein hydrolysates on the growth and nitrogen metabolism in maize seedlings. *J. Plant. Nutr. Soil Sci.* 172, 237–244. doi: 10.1002/jpln.200800174
23. Ertani, A., Schiavon, M., Muscolo, A., & Nardi, S. (2013). Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. *Plant and Soil*, 364(1–2), 145–158. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1335-z>
24. Escalona, J. M., Flexas, J., & Medrano, H. (1999). Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis under water stress in field-grown grapevines. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26(5), 421–433. <https://doi.org/10.1071/PP99019>
25. Escalona, J. M., Flexas, J., & Medrano, H. (1999). Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis under water stress in field-grown grapevines. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26(5), 421–433. <https://doi.org/10.1071/PP99019>
26. Frioni, T., Del Zozzo, F., Pagani, S., Battista, F., Palliotti, A., Stress multipli estivi: nuovi trattamenti fogliari a base di derivati microbici, <<VVQ>>, 2022; (03): 30-33 (<http://hdl.handle.net/10807/196165>)
27. Fusco, G. M., Nicastro, R., Roupshael, Y., & Carillo, P. (2022). The Effects of the Microbial Biostimulants Approved by EU Regulation 2019/1009 on Yield and Quality of Vegetable Crops. *Foods*, 11(17), 2656. <https://doi.org/10.3390/foods11172656>
28. Gambetta, G. A., Herrera, J. C., Dayer, S., Feng, Q., Hochberg, U., & Castellarin, S. D. (2020). The physiology of drought stress in grapevine: Towards an integrative definition of drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 71(16), 4658–4676. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa245>
29. Gambetta, J. M., Holzappel, B. P., Stoll, M., & Friedel, M. (2021). Sunburn in Grapes: A Review. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.604691>
30. Gashu, K., Sikron Persi, N., Drori, E., Harcavi, E., Agam, N., Bustan, A., & Fait, A. (2020). Temperature Shift Between Vineyards Modulates Berry Phenology and Primary Metabolism in a Varietal Collection of Wine Grapevine. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.588739>
31. Ghaffari, H., Tadayon, M. R., Nadeem, M., Cheema, M., & Razmjoo, J. (2019). Proline-mediated changes in antioxidant enzymatic activities and the physiology of sugar beet under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(2). <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2815-z>
32. Giacosa, S., Ossola, C., Botto, R., Río Segade, S., Pissoni, M. A., Pollon, M., Gerbi, V., & Rolle, L. (2019). Impact of specific inactive dry yeast application on grape skin mechanical

- properties, phenolic compounds extractability, and wine composition. *Food Research International*, 116, 1084–1093. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.051>
33. Gohari, G., Panahirad, S., Sepehri, N., Akbari, A., Seyed, &, Zahedi, M., Jafari, H., Mohammad, &, Dadpour, R., & Fotopoulos, V. (n.d.). *Enhanced tolerance to salinity stress in grapevine plants through application of carbon quantum dots functionalized by proline*. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13794-w/Published>
 34. González-Morales, S., Solís-Gaona, S., Valdés-Caballero, M. V., Juárez-Maldonado, A., Loredó-Treviño, A., & Benavides-Mendoza, A. (2021). Transcriptomics of Biostimulation of Plants Under Abiotic Stress. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.583888>
 35. Gornall, J., Betts, R., Burke, E., Clark, R., Camp, J., Willett, K., & Wiltshire, A. (2010). Implications of climate change for agricultural productivity in the early twenty-first century. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 365, Issue 1554, pp. 2973–2989). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0158>
 36. Gurrieri, L., Merico, M., Trost, P., Forlani, G., & Sparla, F. (2020). Impact of drought on soluble sugars and free proline content in selected arabidopsis mutants. *Biology*, 9(11), 1–14. <https://doi.org/10.3390/biology9110367>
 37. Gutiérrez-Gamboa, G., Marín-San Román, S., Jofré, V., Rubio-Bretón, P., Pérez-Álvarez, E. P., & Garde-Cerdán, T. (2018). Effects on chlorophyll and carotenoid contents in different grape varieties (*Vitis vinifera* L.) after nitrogen and elicitor foliar applications to the vineyard. *Food Chemistry*, 269, 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.019>
 38. Gutiérrez-Gamboa, G., Romanazzi, G., Garde-Cerdán, T., & Pérez-Álvarez, E. P. (2019). A review of the use of biostimulants in the vineyard for improved grape and wine quality: effects on prevention of grapevine diseases. In *Journal of the Science of Food and Agriculture* (Vol. 99, Issue 3, pp. 1001–1009). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9353>
 39. Hammad, S. A. R., & Ali, O. A. M. (2014). Physiological and biochemical studies on drought tolerance of wheat plants by application of amino acids and yeast extract. *Annals of Agricultural Sciences*, 59(1), 133–145. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2014.06.018>
 40. Hatfield, J. L., Boote, K. J., Kimball, B. A., Ziska, L. H., Izaurralde, R. C., Ort, D., Thomson, A. M., & Wolfe, D. (2011). Climate impacts on agriculture: Implications for crop production. *Agronomy Journal*, 103(2), 351–370. <https://doi.org/10.2134/agronj2010.0303>
 41. Hernández-Fernández, M., Cordero-Bueso, G., Ruiz-Muñoz, M., & Cantoral, J. M. (2021). Culturable yeasts as biofertilizers and biopesticides for a sustainable agriculture: A comprehensive review. In *Plants* (Vol. 10, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/plants10050822>
 42. Huang, J., Gu, M., Lai, Z., Fan, B., Shi, K., Zhou, Y. H., et al. (2010). Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology*, 153, 1526–1538. doi: 10.1104/pp.110.157370
 43. Irani, H., ValizadehKaji, B., & Naeini, M. R. (2021). Biostimulant-induced drought tolerance in grapevine is associated with physiological and biochemical changes. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s40538-020-00200-9>
 44. Jakab, G., Ton, J., Flors, V., Zimmerli, L., Métraux, J. P., & Mauch-Mani, B. (2005). Enhancing Arabidopsis salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. In *Plant Physiology* (Vol. 139, Issue 1, pp. 267–274). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1104/pp.105.065698>
 45. Jarvis, A. J., & Davies, W. J. (1998). The coupled response of stomatal conductance to photosynthesis and transpiration. In *Source: Journal of Experimental Botany* (Vol. 49). <https://about.jstor.org/terms>
 46. Kowalska, J., Krzywińska, J., & Tyburski, J. (2022). Yeasts as a Potential Biological Agent in Plant Disease Protection and Yield Improvement—A Short Review. *Agriculture*, 12(9), 1404. <https://doi.org/10.3390/agriculture12091404>

47. Kukal, M. S., & Irmak, S. (2018). Climate-Driven Crop Yield and Yield Variability and Climate Change Impacts on the U.S. Great Plains Agricultural Production. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21848-2>
48. Levin, A. D. (2019). Re-evaluating pressure chamber methods of water status determination in field-grown grapevine (*Vitis* spp.). *Agricultural Water Management*, 221, 422–429. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2019.03.026>
49. Lfing, V., & Tapio Palva, E. (1992). The expression of a tab-related gene, *rab18*, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. In *Plant Molecular Biology* (Vol. 20).
50. Li, B., & Wang, W. (2021). Salicylic acid induces tolerance of *Vitis riparia* × *V. labrusca* to chilling stress by altered photosynthetic, antioxidant mechanisms and expression of cold stress responsive genes. *Plant Signaling and Behavior*, 16(11). <https://doi.org/10.1080/15592324.2021.1973711>
51. Lobell, D. B., & Gourджи, S. M. (2012). The influence of climate change on global crop productivity. *Plant Physiology*, 160(4), 1686–1697. <https://doi.org/10.1104/pp.112.208298>
52. Mayfield, S. E., Threlfall, R. T., & Howard, L. R. (2021). Impact of Inactivated Yeast Foliar Spray on Chambourcin (*Vitis* Hybrid) Wine Grapes. *ACS Food Science and Technology*, 1(9), 1585–1594. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.1c00156>
53. Monteiro, E., Gonçalves, B., Cortez, I., & Castro, I. (2022). The Role of Biostimulants as Alleviators of Biotic and Abiotic Stresses in Grapevine: A Review. In *Plants* (Vol. 11, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants11030396>
54. Moon, H., Lee, G., Yun, H. S., & Kwon, C. (2015). Non-proteinaceous yeast extract induces *Arabidopsis* defense responses independently of salicylic acid. *Journal of Plant Biology*, 58(1), 38–43. <https://doi.org/10.1007/s12374-014-0430-5>
55. Moustakas, M., Sperdouli, I., Kouna, T., Antonopoulou, C. I., & Therios, I. (2011). Exogenous proline induces soluble sugar accumulation and alleviates drought stress effects on photosystem II functioning of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Growth Regulation*, 65(2), 315–325. <https://doi.org/10.1007/s10725-011-9604-z>
56. Nanjo, T., Fujita, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., & Shinozaki, K. (2003). Toxicity of Free Proline Revealed in an *Arabidopsis* T-DNA-Tagged Mutant Deficient in Proline Dehydrogenase. In *Plant Cell Physiol* (Vol. 44, Issue 5). <https://academic.oup.com/pcp/article/44/5/541/1834733>
57. Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Sanada, Y., Wada, K., Tsukaya, H., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1999). Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 18(2), 185–193. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00438.x>
58. Narusaka, M., Minami, T., Iwabuchi, C., Hamasaki, T., Takasaki, S., Kawamura, K., & Narusaka, Y. (2015). Yeast cell wall extract induces disease resistance against bacterial and fungal pathogens in *Arabidopsis thaliana* and Brassica crop. *PLoS ONE*, 10(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115864>
59. Nelson, G. C., Valin, H., Sands, R. D., Havlík, P., Ahammad, H., Deryng, D., Elliott, J., Fujimori, S., Hasegawa, T., Heyhoe, E., Kyle, P., von Lampe, M., Lotze-Campen, H., Mason D’Croz, D., van Meijl, H., van der Mensbrugge, D., Müller, C., Popp, A., Robertson, R., ... Willenbockel, D. (2014). Climate change effects on agriculture: Economic responses to biophysical shocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(9), 3274–3279. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222465110>
60. Nephali, L., Piater, L. A., Dubery, I. A., Patterson, V., Huyser, J., Burgess, K., & Tugizimana, F. (2020). Biostimulants for plant growth and mitigation of abiotic stresses: A metabolomics perspective. In *Metabolites* (Vol. 10, Issue 12, pp. 1–26). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/metabo10120505>

61. Olesen, J. E., Trnka, M., Kersebaum, K. C., Skjelvåg, A. O., Seguin, B., Peltonen-Sainio, P., Rossi, F., Kozyra, J., & Micale, F. (2011). Impacts and adaptation of European crop production systems to climate change. In *European Journal of Agronomy* (Vol. 34, Issue 2, pp. 96–112). <https://doi.org/10.1016/j.eja.2010.11.003>
62. Oraei, M., Gohari, G., Panahirad, S., Zareei, E., & Zaare-Nahandi, F. (2019). Effect of salicylic acid foliar application on vitis vinifera L. cv. ‘sultana’ under salinity stress. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 18(2), 159–169. <https://doi.org/10.24326/asphc.2019.2.15>
63. Osman, H. S. (2015). Enhancing antioxidant–yield relationship of pea plant under drought at different growth stages by exogenously applied glycine betaine and proline. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(2), 389–402. <https://doi.org/10.1016/j.aogas.2015.10.004>
64. Pastore, C., Allegro, G., Valentini, G., Pizziolo, A., Battista, F., Spinelli, F., & Filippetti, I. (2020). Foliar application of specific yeast derivative enhances anthocyanins accumulation and gene expression in Sangiovese cv (Vitis vinifera L.). *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68479-0>
65. Paul, K., Sorrentino, M., Lucini, L., Roupshael, Y., Cardarelli, M., Bonini, P., Reynaud, H., Canaguier, R., Trtílek, M., Panzarová, K., & Colla, G. (2019). Understanding the biostimulant action of vegetal-derived protein hydrolysates by high-throughput plant phenotyping and metabolomics: A case study on tomato. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00047>
66. Pereira, R. V., Filgueiras, C. C., Dória, J., Peñaflor, M. F. G. V., & Willett, D. S. (2021). The Effects of Biostimulants on Induced Plant Defense. In *Frontiers in Agronomy* (Vol. 3). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fagro.2021.630596>
67. Portu, J., López, R., Baroja, E., Santamaría, P., & Garde-Cerdán, T. (2016). Improvement of grape and wine phenolic content by foliar application to grapevine of three different elicitors: Methyl jasmonate, chitosan, and yeast extract. *Food Chemistry*, 201, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.086>
68. Puglia, D., Pezzolla, D., Gigliotti, G., Torre, L., Bartucca, M. L., & del Buono, D. (2021). The opportunity of valorizing agricultural waste, through its conversion into biostimulants, biofertilizers, and biopolymers. In *Sustainability (Switzerland)* (Vol. 13, Issue 5, pp. 1–26). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/su13052710>
69. Pylak, M., Oszust, K., & Fraç, M. (2019). Review report on the role of bioproducts, biopreparations, biostimulants and microbial inoculants in organic production of fruit. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 18, Issue 3, pp. 597–616). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11157-019-09500-5>
70. Ray, D. K., West, P. C., Clark, M., Gerber, J. S., Prishchepov, A. v., & Chatterjee, S. (2019). Climate change has likely already affected global food production. *PLoS ONE*, 14(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217148>
71. Rienth, M., & Scholasch, T. (2019). State-of-the-art of tools and methods to assess vine water status. *Oeno One*, 53(4), 619–637. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2019.53.4.2403>
72. Roupshael, Y., & Colla, G. (2018). Synergistic biostimulatory action: Designing the next generation of plant biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 871. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01655>
73. Roupshael, Y., & Colla, G. (2020). Editorial: Biostimulants in Agriculture. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00040>
74. Santesteban, L. G., Miranda, C., Marín, D., Sesma, B., Intrigliolo, D. S., Mirás-Avalos, J. M., Escalona, J. M., Montoro, A., de Herralde, F., Baeza, P., Romero, P., Yuste, J., Uriarte, D., Martínez-Gascueña, J., Cancela, J. J., Pinillos, V., Loidi, M., Urrestarazu, J., & Royo, J. B. (2019). Discrimination ability of leaf and stem water potential at different times of the day through a meta-analysis in grapevine (Vitis vinifera L.). *Agricultural Water Management*, 221, 202–210. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2019.04.020>

75. Santi, C., Zamboni, A., Varanini, Z., & Pandolfini, T. (2017). Growth stimulatory effects and genome-wide transcriptional changes produced by protein hydrolysates in maize seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00433>
76. Santos, J. A., Fraga, H., Malheiro, A. C., Moutinho-Pereira, J., Dinis, L. T., Correia, C., Moriondo, M., Leolini, L., Dibari, C., Costafreda-Aumedes, S., Kartschall, T., Menz, C., Molitor, D., Junk, J., Beyer, M., & Schultz, H. R. (2020). A review of the potential climate change impacts and adaptation options for European viticulture. In *Applied Sciences (Switzerland)* (Vol. 10, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/app10093092>
77. Scheda tecnica e informativa fornita dall'azienda per i relativi prodotti
78. Scholander PF, Bradstreet ED, Hemmingsen EA, Hammel HT. Sap Pressure in Vascular Plants: Negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science*. 1965 Apr 16;148(3668):339-46. doi: 10.1126/science.148.3668.339. PMID: 17832103.
79. Sible, C. N., Seebauer, J. R., & Below, F. E. (2021). Plant biostimulants: A categorical review, their implications for row crop production, and relation to soil health indicators. In *Agronomy* (Vol. 11, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/agronomy11071297>
80. Sperdouli, I., & Moustakas, M. (2015). Differential blockage of photosynthetic electron flow in young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* by exogenous proline. *Photosynthetica*, 53(3), 471–477. <https://doi.org/10.1007/s11099-015-0116-3>
81. Thornton, P. K., Ericksen, P. J., Herrero, M., & Challinor, A. J. (2014). Climate variability and vulnerability to climate change: A review. In *Global Change Biology* (Vol. 20, Issue 11, pp. 3313–3328). <https://doi.org/10.1111/gcb.12581>
82. Tombesi, S., Nardini, A., Frioni, T., Soccolini, M., Zadra, C., Farinelli, D., Poni, S., & Palliotti, A. (2015). Stomatal closure is induced by hydraulic signals and maintained by ABA in drought-stressed grapevine. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep12449>
83. Trevisan, S., Manoli, A., & Quaggiotti, S. (2019). A novel biostimulant, belonging to protein hydrolysates, mitigates abiotic stress effects on maize seedlings grown in hydroponics. *Agronomy*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/agronomy9010028>
84. Tzortzakis, N., Chrysargyris, A., & Aziz, A. (2020). Adaptive response of a native mediterranean grapevine cultivar upon short-term exposure to drought and heat stress in the context of climate change. *Agronomy*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/agronomy10020249>
85. Vaseva, I. I., Simova-Stoilova, L., Kostadinova, A., Yuperlieva-Mateeva, B., Karakicheva, T., & Vassileva, V. (2022). Heat-Stress-Mitigating Effects of a Protein-Hydrolysate-Based Biostimulant Are Linked to Changes in Protease, DHN, and HSP Gene Expression in Maize. *Agronomy*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/agronomy12051127>
86. Venios, X., Korkas, E., Nisiotou, A., & Banilas, G. (2020). Grapevine responses to heat stress and global warming. In *Plants* (Vol. 9, Issue 12, pp. 1–15). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/plants9121754>
87. Vogel, E., Donat, M. G., Alexander, L. v., Meinshausen, M., Ray, D. K., Karoly, D., Meinshausen, N., & Frieler, K. (2019). The effects of climate extremes on global agricultural yields. *Environmental Research Letters*, 14(5). <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab154b>
88. Wani, A. S., Ahmad, A., Hayat, S., & Tahir, I. (2016). Is foliar spray of proline sufficient for mitigation of salt stress in Brassica juncea cultivars? *Environmental Science and Pollution Research*, 23(13), 13413–13423. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6533-4>
89. Wani, A. S., Faraz, A., Faizan, M., Ahmad, A., Hayat, S., & Tahir, I. (2017). Foliar spray of proline enhanced the photosynthetic efficiency and antioxidant system in Brassica juncea. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 45(1), 112–119. <https://doi.org/10.15835/nbha45110375>
90. Zufferey, V., Spring, J. L., Verdenal, T., Dienes, A., Belcher, S., Lorenzini, F., Koestel, C., Rösti, J., Gindro, K., Spangenberg, J., & Viret, O. (2017). Influence of water stress on plant

hydraulics, gas exchange, berry composition and quality of pinot noir wines in Switzerland. *Oeno One*, 51(1), 37–57. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2017.51.1.1314>

- a. <http://phenotiki.com/>
- b. https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/substance/spectrumplanttotalrnakit1234598765?gclid=EAIaIQobChMIfzWlq-c-wIVmeR3Ch1wVAtyEAAYASAAEgI0vPD_BwE&gclidsrc=aw.ds
- c. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/885/605/strn10bul.pdf> - Spectrum™ Plant Total RNA Kit User Guide
- d. <https://www.licor.com/env/products/LI-600/>
- e. <https://www.force-a.com/wp-content/uploads/2019/09/BROCHURE-DUALEX-1.pdf>
- f. <https://www.atago.net/en/products-bx-acid-top.php>
- g. <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>
- h. <https://www.ecosearch.info/mini-trase>