



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE NATURALI
E AMBIENTE (DAFNAE)

Corso di laurea triennale in Scienze e Tecnologie Agrarie

Promozione della crescita di piante di mais tramite la concia del seme con rizobi

Relatore

Prof. Lorenzo Favaro

Laureando

Matteo Passarini

Matricola n. 2007828

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Indice

RIASSUNTO	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUZIONE	7
1.1. <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	9
1.1.1 Classificazione e descrizione	9
1.1.2 Utilizzi in agricoltura	10
1.1.3 Azoto	12
1.1.4 Fosforo	13
1.1.5 Ferro	14
1.1.6 Processo di nodulazione	15
1.2 Mais	18
1.2.1 Morfologia	20
1.2.2 Principali avversità parassitarie	22
1.2.3 Concia seme di mais	23
1.3 Tecnica di batterizzazione artificiale	24
1.3.1 Risultati esperimento di concia del seme di mais con <i>B.japonicum</i>	24
1.3.2 Tecniche di inoculo	28
1.3.3 Tipologie di rivestimento del seme	30
1.3.4 Formulazione	32
1.3.5 Sopravvivenza	33
2. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	34
3. BIBLIOGRAFIA.....	35
4. SITOGRAFIA	35
5. RINGRAZIAMENTI	36

RIASSUNTO

Negli ultimi anni la ricerca di soddisfare il fabbisogno alimentare dell'umanità senza penalizzare la sostenibilità ambientale ha portato ad una rivalutazione del metodo di coltivazione in modo da limitare l'utilizzo di prodotti fitosanitari e concimi di sintesi. Tra le colture più diffuse al mondo in termini di superficie, come il mais, si stanno verificando cali di produzione a causa di attacchi sempre più frequenti di funghi patogeni. Questa caratteristica ha portato, negli ultimi anni, e soprattutto nei Paesi dove la produzione di mais è elevata, alla ricerca di soluzioni. Una delle principali cause della riduzione di produttività è la progressiva diminuzione di biodiversità nel suolo a favore di una concentrazione sempre maggiore di microbi dannosi per le colture a causa dell'utilizzo di prodotti chimici e un ristretto se non nullo avvicendamento colturale. Per contrastare i patogeni del suolo in modo ecologico e sostenibile, si sta studiando l'utilizzo di un batterio del genere *Rhizobium*, che offre numerosi benefici alle piante, come la produzione di ormoni della crescita, la protezione da agenti patogeni e la solubilizzazione di minerali. A tal proposito è stata proposta la tecnica della batterizzazione artificiale per la coltivazione del mais, pratica già efficientemente impiegata in passato nella soia. Questa tecnica consiste nell'inoculazione di spore batteriche di microrganismi simbiotici direttamente su seme. In questo esperimento è stato utilizzato *Bradyrhizobium japonicum*, batterio ampiamente impiegato per studiare la genetica molecolare, la fisiologia vegetale e l'ecologia vegetale grazie alla sua attività simbiotica di fissazione dell'azoto relativamente superiore con soia rispetto ad altre specie di rizobio. Visto il suo potenziale sono stati fatti alcuni test di inoculazione del batterio su altre piante, ad esempio mais, dove sono emerse alcune caratteristiche interessanti come il significativo aumento della lunghezza delle radici e dello stelo, un aumento del peso fresco e un cambiamento di concentrazioni di microrganismi dannosi nella rizosfera ad esempio la diminuzione di funghi del genere *Fusarium*.

Questi risultati portano a prendere in considerazione il rivestimento microbico dei semi come buona tecnica colturale da adottare per la coltivazione del mais.

ABSTRACT

In recent years, the search to satisfy humanity's food needs without penalizing environmental sustainability has led to a reevaluation of the cultivation method in order to limit the use of plant protection products and synthetic fertilizers. Among the most widespread crops in the world in terms of surface area, such as corn, production drops are occurring due to increasingly frequent attacks by pathogenic fungi. This characteristic has led, in recent years, and especially in countries where corn production is high, to the search for solutions. One of the main causes of the reduction in productivity is the progressive decrease in biodiversity in the soil in favor of an ever-increasing concentration of microbes harmful to crops due to the use of chemical products and limited if not zero crop rotation. To combat soil pathogens in an ecological and sustainable way, the use of a bacterium of the *Rhizobium* genus is being studied, which offers numerous benefits to plants, such as the production of growth hormones, protection from pathogens and the solubilization of minerals. In this regard, the technique of artificial bacterization has been proposed for the cultivation of corn, a practice already efficiently used in the past in soybeans. This technique consists in the inoculation of bacterial spores of symbiotic microorganisms directly onto seeds. *Bradyrhizobium japonicum* was used in this experiment, a bacterium widely used to study molecular genetics, plant physiology and plant ecology thanks to its relatively higher symbiotic nitrogen fixation activity with soybean compared to other rhizobia species. Given its potential, some inoculation tests of the bacterium were carried out on other plants, for example corn, where some interesting characteristics emerged such as the significant increase in the length of the roots and stem, an increase in fresh weight and a change in concentrations of harmful microorganisms in the rhizosphere, for example the decrease in fungi of the genus *Fusarium*.

These results lead to considering microbial seed coating as a good cultural technique to adopt for maize cultivation.

1. INTRODUZIONE

L'agricoltura convenzionale si basa sull'utilizzo di fertilizzanti artificiali, erbicidi e pesticidi. In alternativa, l'agricoltura sostenibile è fissata su piani di gestione che affrontano le principali preoccupazioni della società sulla qualità del cibo e sulla protezione dell'ambiente. Questo tipo di agricoltura pone al centro della questione la conservazione e il rispetto delle risorse produttive, come il mantenimento della fertilità del suolo, la protezione delle acque sotterranee, lo sviluppo delle energie rinnovabili e le soluzioni di rilevamento per l'adattamento dei sistemi agricoli alle variazioni climatiche.

L'agricoltura convenzionale ha diverse conseguenze tra cui il depauperamento organico e microbico del suolo a causa del metodo di coltivazione che comporta un alto consumo energetico e il ricorso all'utilizzo di prodotti chimici per la difesa e la concimazione delle piante, questo ha portato allo studio di nuove pratiche utili a mantenerne fertilità e biodiversità.

La biodiversità del suolo comprende organismi viventi microscopici come batteri, funghi, oomiceti, nematodi, protozoi, alghe, archaea e artropodi. Il suolo della rizosfera delle piante contiene molti microrganismi coinvolti in processi importanti, principalmente regolando la fisiologia e la morfologia delle piante, promuovendone la crescita attraverso la produzione di ormoni vegetali e agendo come agenti protettivi contro i patogeni delle piante.

Con il termine biodiversità si intende la differenziazione biologica tra gli individui di una stessa specie, in relazione alle condizioni ambientali.

Nella biodiversità si distinguono tre ordini gerarchici di diversità che rappresentano aspetti differenti:

- La diversità genetica, o diversità intraspecifica, che consiste nella variabilità dei genotipi all'interno delle specie e può essere considerata l'unità fondamentale della biodiversità.
- La diversità specifica detta anche interspecifica, si riferisce alla presenza di specie diverse in un territorio e alle relazioni che si instaurano tra esse.
- La diversità degli ecosistemi, o diversità ecosistemica, che si riferisce alla differenziazione di ambienti fisici, di raggruppamenti di organismi, piante, animali e microrganismi e di processi e interazioni che si stabiliscono tra loro. (Spigarolo et al. 2016)

In questo studio andremo a parlare in particolar modo del terzo tipo di biodiversità cioè dei rapporti che si instaurano tra pianta e microrganismo.

Al giorno d'oggi, i sistemi agricoli dovrebbero applicare input e risorse minime per ottenere vantaggi economici e sicurezza alimentare, senza ridurre la resa e la qualità delle colture. Per aumentare e/o mantenere la loro resa, gli agricoltori possono beneficiare di nuovi prodotti sostenibili, come i microrganismi benefici per le piante, che vanno a sostituire gli apporti di fosforo e azoto come fertilizzanti e l'utilizzo di pesticidi come agenti di biocontrollo per erbe infestanti, patogeni e insetti.

A tal proposito, negli ultimi decenni molti ricercatori hanno iniziato a studiare nello specifico le interazioni che si vengono a creare nel terreno tra pianta e microbo, sperimentando nuove pratiche per incrementare l'utilizzo di questi microrganismi nelle coltivazioni agrarie.

Lo scopo di questo studio è quello di indagare la relazione tra la crescita e lo sviluppo del mais imbevuto di *Rhizobium* e i cambiamenti dei microrganismi che si osservano nella rizosfera del mais. I risultati dei test hanno spiegato in via preliminare il meccanismo attraverso il quale *Bradyrhizobium japonicum* ha promosso la crescita del mais e hanno fornito nuove intuizioni per l'applicazione dei rizobatteri in altre colture.

1.1 *Bradyrhizobium japonicum*

1.1.1 Classificazione e descrizione

Il batterio *Bradyrhizobium japonicum* è un organismo Gram-negativo, a forma di bastoncino, azotofissatore aerobico libero. È noto per la sua importante funzione di fissazione dell'azoto sulle leguminose, in particolare sulla soia. I rizobi sono un gruppo di batteri che vivono in simbiosi con le leguminose. Il termine "rizobio" si riferisce a diversi generi, tra cui il più noto è il *Rhizobium*. Le prime specie di *Rhizobium* furono identificate nel 1889, e la loro classificazione è stata oggetto di numerose revisioni. Una recente riclassificazione (Tabella 1.), basata sull'analisi delle sequenze dei geni, ha individuato la famiglia Rhizobiaceae come un insieme di batteri azotofissatori che generano noduli radicali simbiotici nelle leguminose. Questa famiglia è stata suddivisa in 12 generi e 62 specie, tra cui il genere *Bradyrhizobium* con 5 specie: *B. japonicum* (ex *Rhizobium japonicum*), *B. elkanii*, *B. liaoningense*, *B. yuanmingense*, *B. canariense*. È importante ricordare che esistono altri batteri azotofissatori che non producono noduli radicali simbiotici. Questi batteri possono essere aerobi, anaerobi, simbiotici o non simbiotici, come ad esempio i generi *Azospirillum*, *Azotobacter* e *Clostridium*.

CLASSIFICAZIONE SCIENTIFICA	
Dominio:	<i>Bacteria</i>
Classe:	<i>Alphaproteobacteria</i>
Ordine:	<i>Hyphomicrobiales</i>
Famiglia:	<i>Nitrobacteraceae</i>
Genere:	<i>Bradyrhizobium</i>
Specie:	<i>B. japonicum</i>

Tabella 1. Classificazione scientifica *B. japonicum*

1.1.2 Utilizzi in agricoltura

Il *B. japonicum* viene aggiunto ai semi di leguminose per migliorare la resa dei raccolti, in particolare nelle aree in cui il batterio non è nativo. Spesso l'inoculato viene fatto aderire ai semi prima della semina utilizzando una soluzione zuccherina. Il *B. japonicum* rientra nella classificazione di PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria - Rizobatteri promotori della crescita delle piante) sono batteri in grado di migliorare le capacità di crescita delle piante grazie ad associazioni simbiotiche con esse. Questi batteri colonizzano un sottile strato del suolo che circonda le radici delle piante, la rizosfera. Questa è una zona molto ricca di risorse e attività microbiologica, dunque con condizioni ideali per l'instaurarsi di relazioni simbiotiche tra batteri e pianta.

I PGPR, secondo le loro proprietà funzionali (Figura 1.), possono essere classificati in quattro gruppi principali:

- Biofertilizzanti, che aumentano la disponibilità di nutrienti nel suolo;
- Fitostimolatori, che stimolano la crescita delle piante attraverso meccanismi specifici o non specifici;
- Rizobatteri capaci di risanare siti contaminati, che modulano la concentrazione di inquinanti (come metalli pesanti) attraverso, ad esempio, processi di solubilizzazione di questi;
- Biopesticidi, che controllano eventuali patogeni e malattie della pianta attraverso la secrezione di enzimi litici e composti metabolici secondari.

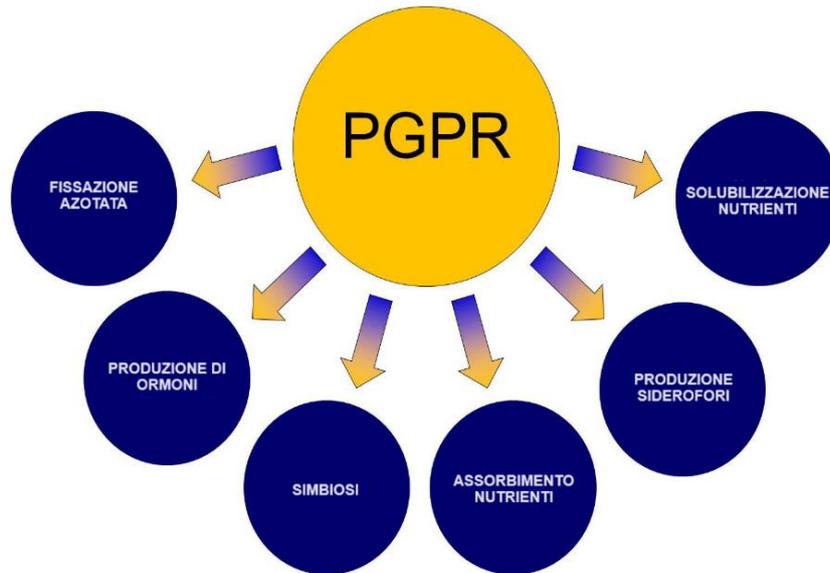


Figura 1. Principali proprietà funzioni dei PGPR

I microrganismi benefici del suolo possono essere utilizzati come biofertilizzanti per aumentare la disponibilità di nutrienti per le piante, stimolare la crescita delle piante e ridurre l'uso di fertilizzanti chimici.

I nutrienti essenziali per le piante includono azoto, fosforo e ferro. I microrganismi benefici del suolo possono fornire questi nutrienti alle piante in diversi modi:

- Fissazione dell'azoto: alcuni microbi, come *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Achromobacter*, *Rhizobium* e *Klebsiella*, possono fissare l'azoto atmosferico, rendendolo disponibile per le piante.
- Solubilizzazione del fosfato: altri microbi, come *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* e *Azospirillum*, possono solubilizzare il fosfato insolubile nel suolo, rendendolo disponibile per le piante.
- Produzione di siderofori: i siderofori sono molecole prodotte da alcuni microbi in grado di legarsi con il ferro. Questo può aiutare le piante a ottenere il ferro necessario per la crescita, e può anche inibire i patogeni delle piante, che hanno bisogno di ferro per sopravvivere.

I microrganismi benefici del suolo possono essere utilizzati in diversi modi, come l'inoculazione dei semi o delle radici, o la distribuzione nel suolo. L'utilizzo di questi microrganismi come biofertilizzanti può essere un modo sostenibile per migliorare la produttività agricola e ridurre l'impatto ambientale dell'agricoltura.

1.1.3 Azoto

L'azoto è un elemento essenziale per la vita, in quanto è un componente di numerose biomolecole, tra cui proteine, acidi nucleici e clorofilla. È quindi necessario per la crescita e lo sviluppo della maggior parte delle coltivazioni agricole per ottenere una buona resa. L'azoto è presente nell'atmosfera sotto forma di molecola biatomica (N_2), che è molto stabile e difficile da ridurre. (Sequi et al. 2017)

Gli organismi viventi non sono in grado di utilizzare direttamente l'azoto atmosferico, ma necessitano di forme ridotte, come l'ammoniaca o i nitrati. Le piante della famiglia delle Fabaceae sono in grado di fissare l'azoto atmosferico attraverso un processo di simbiosi con i batteri *Rhizobium*. I batteri colonizzano le radici delle piante, formando dei noduli in cui avviene la fissazione dell'azoto. Per garantire una colonizzazione ottimale delle radici da parte dei batteri, viene praticata l'inoculazione dei semi di soia prima della semina. L'inoculazione è particolarmente importante sui terreni dove la soia non è stata precedentemente coltivata e dove le popolazioni di batteri compatibili sono scarse. Grazie all'attenzione crescente per i metodi biologici di miglioramento della fertilità del suolo, sta crescendo l'interesse per l'inoculazione dei batteri non solo nella soia ma anche in altre colture. (Karavidas et al. 2023)

L'inoculazione dei semi di soia con batteri *B. japonicum*, in combinazione con la fertilizzazione ottimale, migliora la fissazione biologica dell'azoto. L'effetto della fertilizzazione con azoto sulla formazione di noduli e sulla fissazione biologica dell'azoto dipende da fattori come la quantità di fertilizzante applicato e il momento dell'applicazione. Elevate concentrazioni di azoto possono inibire la formazione di noduli e la fissazione di azoto, mentre basse concentrazioni di azoto favoriscono la formazione di noduli e della fissazione biologica dell'azoto. L'importanza di questo processo non riguarda solamente il risparmio dell'utilizzo di concimi azotati in un'ottica di agricoltura sostenibile ma è stato confermato che l'azoto fissato biologicamente contribuisce

maggiormente all'accumulo di N nei baccelli dei semi durante la crescita di colture leguminose. I fertilizzanti azotati inorganici sono essenziali per l'agricoltura, ma il loro uso eccessivo può causare danni ambientali. L'eccesso di azoto può essere rilasciato nell'atmosfera o nelle acque sotterranee, con conseguenze negative per la salute umana, l'ambiente e la biodiversità. (Szpunar-Krok et al. 2023)

1.1.4 Fosforo

Il fosforo è un nutriente essenziale per la crescita delle piante. È presente in molti composti vitali, come il DNA, l'RNA, gli enzimi e i fosfolipidi. Il fosforo è necessario per la fotosintesi, lo sviluppo delle radici, la formazione di fiori e semi, la maturità e la qualità del raccolto, la produzione di energia e la divisione e l'ampliamento delle cellule.

La disponibilità di fosforo nel suolo è limitata a causa della sua fissazione sotto forma di composti insolubili ad esempio in fosfato tricalcico nei terreni calcarei oppure in fosfato di alluminio o ferro nei terreni acidi. I fertilizzanti a base di fosforo possono non essere sufficienti a soddisfare le esigenze delle piante a causa di questa fissazione. I batteri solubilizzatori di fosforo (PSB) sono un gruppo di microrganismi che possono convertire i composti organici e inorganici del fosforo non disponibili in forme solubili (anioni fosfato), facilmente assimilabili dalle piante. (Sequi et al. 2017)

I PSB aumentano la disponibilità di fosforo in tre modi:

- Abbassando il pH del suolo
- Secernendo composti che dissolvono i minerali P
- Mineralizzando il fosfato organico

L'uso di PSB promuove un'agricoltura sostenibile, riduce al minimo l'inquinamento dei corsi d'acqua e migliora la fertilità del suolo, aumentando così la produttività delle colture.

1.1.5 Ferro

Il ferro è un elemento vitale per le piante. Esso svolge una serie di funzioni importanti nell'intero processo metabolico della pianta, tra cui la produzione di clorofilla e la formazione di enzimi della catena respiratoria.

In generale il ferro è difficilmente assimilabile per la pianta. Esso può essere assorbito dalle piante soltanto nella forma ridotta (Fe^{2+}) e ossidata (Fe^{3+}), e nelle giuste condizioni.

Nel terreno il ferro è presente in quantità elevate, ma è tuttavia possibile che manchino le forme di ferro assimilabili per la pianta. La disponibilità di ferro dipende fortemente dal pH del terreno; spesso è presente sotto forma di ossidi, idrossidi, silicati e carbonati. I terreni acidi contengono solitamente sufficiente ferro assimilabile. (Sequi et al. 2017)

Una frazione di ferro nel suolo, molto importante sotto il profilo agronomico, è presente nella sostanza organica e nelle sostanze umiche sotto forma di complessi e chelati. I chelati di Fe sono molto stabili e possono restare a lungo in soluzione senza precipitare in forme non disponibili. Alcuni microrganismi come funghi e batteri sono in grado di produrre siderofori (Figura 2.), molecole in grado di complessare il ferro e renderlo disponibile per le piante e i microbi stessi.

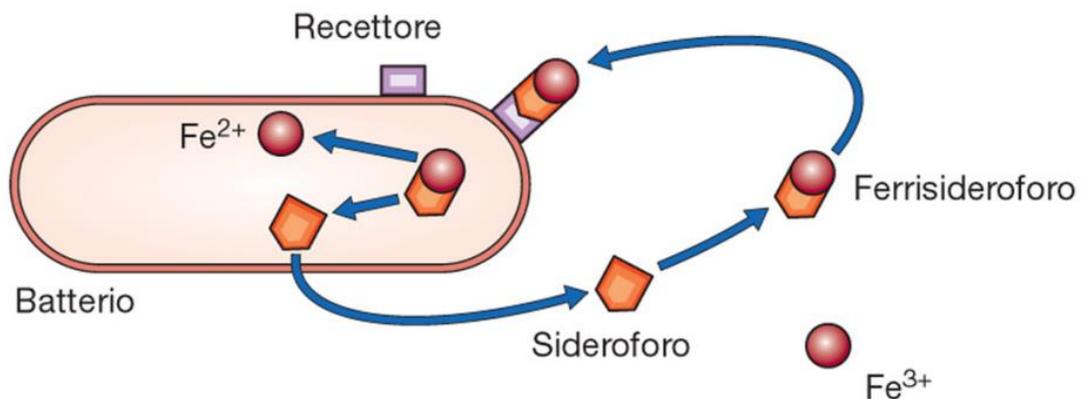


Figura 2. Meccanismo di raccolta del ferro da parte di un batterio tramite sideroforo: Il batterio rilascia i siderofori nell'ambiente, i quali si legano al ferro libero nell'ambiente, il complesso ferro-sideroforo viene trasportato all'interno della cellula batterica dove il ferro viene rilasciato dal sideroforo e utilizzato dalla cellula batterica.

1.1.6 Processo di nodulazione

Le piante leguminose emettono nel terreno delle molecole chiamate flavonoidi che attirano i batteri rizobi, specifici per quel vegetale. I flavonoidi penetrano nella cellula batterica e stimolano la produzione della proteina NodD, che attiva diversi geni di nodulazione. Il fattore Nod, prodotto dal batterio, si comporta da ormone e stimola la divisione cellulare nelle radici e nei peli radicali. I peli radicali crescono asimmetricamente e si arrotolano, formando un canale attraverso cui il batterio può penetrare nel tessuto radicale. Una volta all'interno della pianta, i batteri si nutrono e si riproducono, spostandosi verso il centro della radice. Qui, a partire da cellule meristematiche, formano il nodulo.

Quando la concentrazione di batteri nel nodulo raggiunge un livello critico (15000-20000 batteri per ogni singola cellula vegetale infettata), la pianta inibisce la formazione di nuovi noduli e si formano gli organi per la fissazione dell'azoto. I batteri presenti nel nodulo, chiamati batteroidi (Figura 3.), fissano l'azoto atmosferico attraverso un complesso multi-enzimatico. L'enzima nitrogenasi catalizza la formazione di un composto azotato di facile assimilazione per la pianta. La buona riuscita di questa reazione e la quantità di azoto fissato sono legate alla pressione di ossigeno presente nel nodulo. La leg-emoglobina, una proteina simile all'emoglobina, regola la pressione di ossigeno nel nodulo. La leg-emoglobina è una proteina simbiotica: il gruppo eme, che contiene il ferro responsabile del legame con l'ossigeno, è sintetizzato dal batteroide, mentre la parte "globinica" è prodotta dalla cellula vegetale. In questo modo si instaura un rapporto simbiotico mutualistico: la pianta fornisce ai batteroidi carboidrati e proteine, mentre i batteroidi forniscono alla pianta azoto facilmente assimilabile (NH_3 e/o NH_4^+). (Biavati et al. 2012)

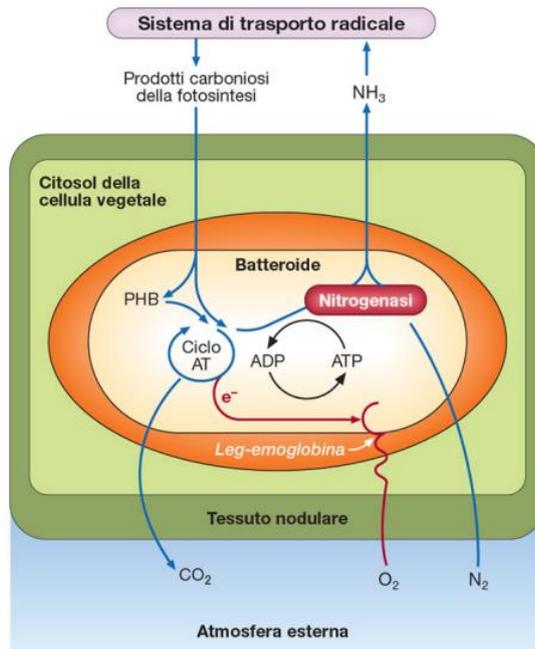


Figura 3. Tessuto nodulare con al suo interno i batteroidi responsabili dell'azoto-fissazione

Il processo industriale per ottenere fertilizzante azotato (Figura 4.) ha dei costi elevati e un grande utilizzo di risorse.

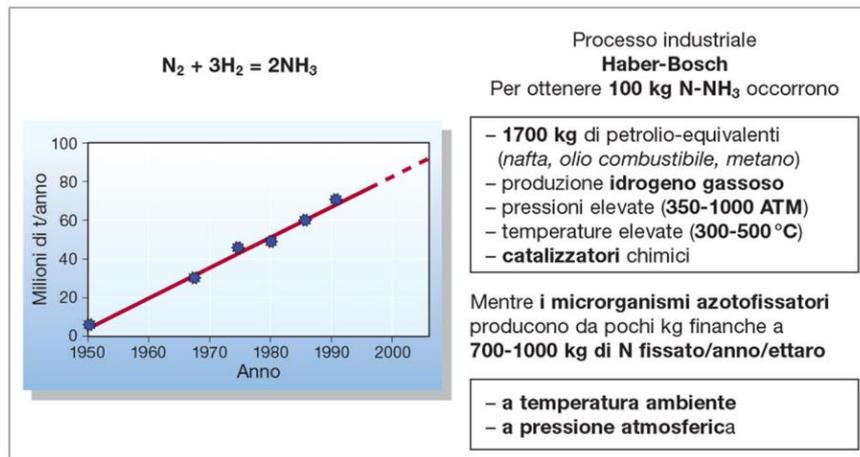


Figura 4. Confronto tra processo industriale e fissazione microbica dell'azoto atmosferico.

Reazione di azotofissazione ad opera del complesso enzimatico nitrogenasi (Figura 5).



Figura 5. Breve descrizione della reazione di azotofissazione

Il complesso enzimatico nitrogenasi (Figura 6.) ha le seguenti proprietà e caratteristiche:

- Composto da due distinte unità
- Contiene Fe e Mo
- Richiede Mg^{++}
- Richiede ATP
- È inibita da ADP o da $\text{ATP}/\text{ADP} \leq 0,5$
- È inibita dalla presenza di azoto combinato NH_4^+ , NO_3^-
- Riduce N_2 a altre molecole a triplo legame (ad esempio acetilene)
- È sensibile all'ossigeno → inattivazione irreversibile
- Riduce H^+ a H_2 gassoso

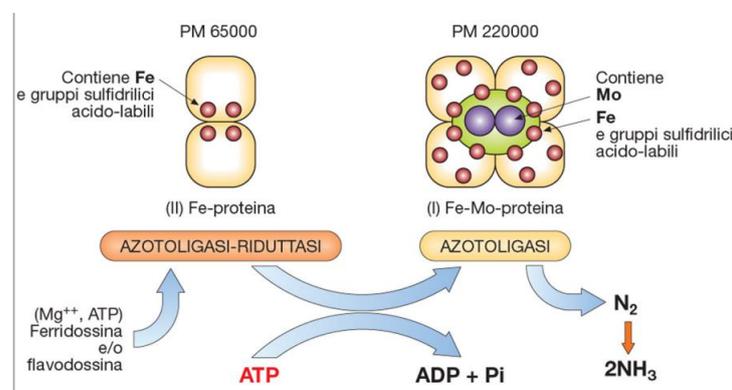


Figura 6. Schema del complesso enzimatico nitrogenasi

1.2 *Zea mays* L.

Il mais (*Zea mays* L.) è una pianta erbacea annuale, appartenente al raggruppamento delle monocotiledoni (ora chiamata Liliopsida), alla famiglia delle *Poaceae* (Tabella 2.), addomesticato dalle popolazioni indigene in Messico. Per quanto riguarda l'origine, numerose prove sembrano indicare che il mais sia il risultato di un processo di selezione iniziato più di settemila anni fa nella zona dell'America Centrale da un progenitore tuttora presente allo stato selvatico, il teosinte.

Fu portato per la prima volta in Europa da Cristoforo Colombo nel 1493 in seguito alla scoperta dell'America.

In termini di graduatoria cerealicola mondiale il mais è al terzo posto come estensione, dopo grano e riso, nelle regioni temperate è principalmente destinato all'alimentazione degli animali domestici, sotto forma di granella, farine, insilato o per la produzione di mangimi, è inoltre destinato a trasformazioni industriali per l'estrazione di amido e olio oppure alla fermentazione anaerobica per la produzione di biogas o energia elettrica.

Si divide in varie sub specie, ovvero:

- *Zea mays indentata* (mais farinoso) è la forma più produttiva a cui appartengono la maggior parte degli ibridi, la cariosside è di dimensioni elevate e l'amido della cariosside contiene il 75-80% di amilopectina e il 20- 25% di amilosio.
- *Zea mays indurata* (mais vitreo) l'endosperma della cariosside è vitreo.
- *Zea mays amilacea* (mais amilosico) mais ad elevato contenuto di amilosio (50-80%) adatto soprattutto per l'impiego in amideria.
- *Zea mays ceratina* (mais cereo) l'endosperma della cariosside contiene solo amilopectina (99%) ed è adatto all'industria tessile e cartaria.
- *Zea mays saccharata* (mais dolce) la cariosside contiene una elevata quantità di zuccheri semplici e poco amido e viene utilizzato per il consumo fresco nell'alimentazione umana.
- *Zea mays everta* (mais da scoppio) produce i pop-corn. (Bocchi et al. 2016)

CLASSIFICAZIONE SCIENTIFICA

Dominio: *Eukaryota*

Regno: *Plantae*

Divisione: *Magnoliophyta*

Classe: *Liliopsida*

Ordine: *Poales*

Famiglia: *Poaceae*

Genere: *Zea*

Specie: *Z. mays*

Tabella 2. Classificazione scientifica del *Zea mays* L.

1.2.1 Morfologia

Il mais è una pianta monoica, diclina, che possiede un apparato radicale formato da radici seminali fascicolate e radici secondarie molto sviluppate che raggiungono una profondità di 1,5-1,7 metri, un culmo chiamato stocco, carnoso distinto in nodi e internodi, che raggiunge un'altezza che va dai 0,90 ai 4 metri e porta dalle 8 alle 24 foglie. Le foglie sono lanceolate con nervatura mediana grossa.

Nella parte apicale della pianta si trova il cosiddetto "pennacchio", è un panicolo (Figura 7a.) che rappresenta l'infiorescenza maschile dove vi sono le antere contenenti il polline, mentre l'infiorescenza femminile è rappresentata da una spiga detta spadice (Figura 7b.) che si inserisce all'ascella della 6-7^a foglia, contenenti solo fiori femminili, senza stigma, con lunghi stili che fuoriescono dalle brattee che proteggono la spiga e sono di colore verdi.

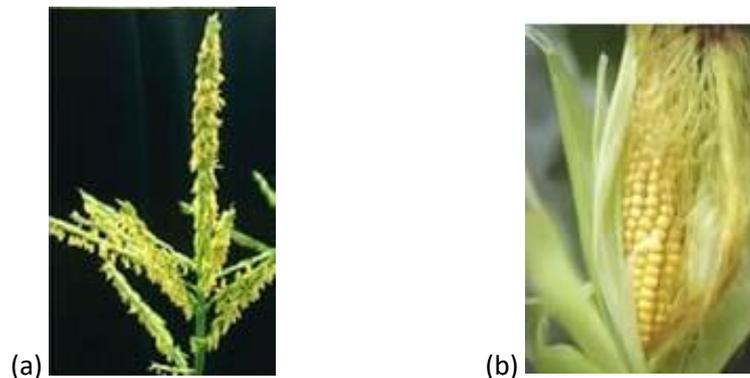


Figura 7. (a) raffigurazione del pennacchio, infiorescenza maschile, (b) raffigurazione spadice, infiorescenza femminile.

La spiga è costituita da un tutolo su cui si inseriscono un numero di ranghi di cariossidi variabile ma sempre pari, da 12 a 22 ranghi; ogni rango è composto da circa 50 spighette sessili; quindi, una spiga contiene un totale che va da 600 a 1100 cariossidi. L'impollinazione del mais è anemofila, cioè il polline viene trasportato dal vento e dalla gravità. Le setole della pannocchia catturano il polline, che aderisce alla superficie umida dello stilo e inizia a germinare, formando un tubo pollinico che arriva fino all'ovario. Il frutto del mais è una cariosside con forma e dimensioni variabili, e presenta un endosperma, che è il tessuto di riserva, e un pericarpo, che è la parte esterna del frutto. L'endosperma può essere vitreo o farinoso, a seconda della varietà di mais.

Il ciclo biologico del mais si divide in due fasi:

- Fase vegetativa: durante questa fase, la pianta cresce e sviluppa le sue foglie, il fusto e le radici, caratterizzata da un'elevata velocità di accumulo di biomassa, dovuta alla capacità fotosintetica elevata del mais.
- Fase riproduttiva: durante questa fase, la pianta fiorisce, si feconda e produce le cariossidi, la durata del ciclo varia in base alla precocità dell'ibrido e alle condizioni climatiche.

Il mais è una pianta annuale macroterma, che ha bisogno di temperature elevate per crescere e svilupparsi. La temperatura cardinale minima del mais è di 8-10 °C, e la temperatura cardinale massima è di 32-34 °C. Il mais ha una bassa resistenza al gelo e le gelate tardive possono essere letali per le piccole plantule appena emerse.

Il mais ha esigenze nutritive elevate. Le dosi di macronutrienti mediamente utilizzate sono le seguenti:

- Azoto: 170 kg/ha
- Fosforo: 80 kg/ha
- Potassio: 80 kg/ha

L'azoto viene distribuito in due fasi: una piccola parte viene distribuita durante la semina (circa il 30%), e la restante parte viene distribuita in copertura con la sarchiatura. Il fosforo e il potassio vengono distribuiti in presemina o localizzati con la seminatrice. La raccolta può avvenire a maturazione della granella con la mietitrebbia ad una umidità che può variare dal 14 al 25 %, per la produzione di pastone, la granella viene raccolta ad una umidità che va dal 30 al 35 %, oppure può essere raccolta l'intera pianta per fare l'insilato, trinciandolo quando si trova allo stadio della maturazione cerosa. (Bocchi et al. 2016)

1.2.2 Principali avversità parassitarie

Le principali avversità parassitarie del mais sono rappresentate dagli insetti e dai funghi. Per gli insetti possiamo distinguere:

- Insetti terricoli come le nottue (*Agrotis spp.*) che attaccano le piccole plantule a livello del colletto; ciò porta all'appassimento di tutta o parte della pianta.
- Piralide (*Ostrinia nubilalis*): lepidottero, le larve causano danni al culmo, tutolo e granella, per cui si interviene sulla seconda generazione con trattamento a base di piretroidi.
- Diabrotica (*Diabrotica virgifera*): coleottero, la cui larva causa danni alle radici portando ad un minor assorbimento e all'allettamento di piante, mentre l'adulto erode le setole fiorali, con scarsa fecondazione, ma provoca anche rosure alle foglie.

Nel caso dei funghi possiamo distinguere:

- Carbone (*Ustilago maydis*): questo fungo si conserva nel terreno sotto forma di spore, in primavera germina; nelle aree colpite si può osservare la formazione di galle, soprattutto nella spiga.
- Marciume dello stocco (*Fusarium graminearum*) il fungo si conserva nei residui infetti della vegetazione dell'anno precedente. Il patogeno causa il rammollimento del fusto per cui le piante colpite possono facilmente piegarsi; per ovviare a questo problema si dovrebbe diminuire la densità di semina, evitare la somministrazione di dosi eccessive di azoto e far ricorso a ibridi resistenti o tolleranti.
- Fusariosi della spiga (*Fusarium verticillioides*): il fungo si conserva nei residui infetti dell'anno precedente o nel terreno. Il problema principale è dovuto al fatto che questo fungo produce le fumonisine che sono tossiche soprattutto per i cavalli e i suini. Più la granella è secca, maggiore sarà la concentrazione di fumonisine nella spiga: per tale motivo è meglio effettuare raccolte anticipate con umidità della granella elevata (>25%). Inoltre, si possono usare ibridi resistenti al *Fusarium*, interrare i residui colturali e ridurre gli attacchi di piralide. Nelle annate più fresche e piovose si può sviluppare anche il *F. graminearum*.
- Marciumi dalla spiga (*Aspergillus flavus*): è patogeno saprofito, il fungo si conserva nei residui della vegetazione dell'anno precedente o nel terreno, e quando le condizioni sono idonee (28-30 °C) il fungo rilascia le spore che vengono trasportate dal vento e arrivano

alla spiga dove penetrano attraverso le sete o attraverso le lesioni causate dalla piralide. Nella spiga si possono notare delle cariossidi con muffa verde, ma il problema principale è che il fungo produce aflatossine, micotossine cancerogene per gli animali e per l'uomo. La produzione di aflatossine è stimolata da annate calde con stress idrico. Anche in questo caso è consigliato anticipare la raccolta ad una umidità inferiore al 32%. È molto utile ridurre gli attacchi di piralide e interrare i residui colturali.

1.2.3 Concia seme di mais

La concia del seme di mais è una pratica agricola che consiste nell'applicazione di sostanze chimiche, fertilizzanti o biostimolanti. Questo processo ha lo scopo di proteggere il seme da agenti patogeni, insetti e condizioni ambientali avverse, migliorando la germinazione e la crescita delle piante. La storia della concia del seme di mais risale a migliaia di anni fa, ma i progressi maggiori sono avvenuti negli ultimi decenni. In passato, la maggior parte delle sementi veniva trattata con prodotti che avevano una durata di protezione limitata. Questi prodotti erano in grado di attenuare il problema dei patogeni e degli insetti, ma non fornivano una protezione totale delle piantine.

Negli ultimi anni, sono stati introdotti prodotti sistemici che hanno fornito una protezione più duratura. Questi prodotti sono stati rapidamente adottati dagli agricoltori, in quanto hanno contribuito ad aumentare le rese e a ridurre le perdite di raccolto. Tuttavia, l'utilizzo sempre più spinto di insetticidi neonicotinoidi nella concia del seme ha portato a gravi effetti sull'ecosistema. È stato dimostrato che questi insetticidi, rilasciati in atmosfera durante la semina, vengono intercettati dalle api mellifere in volo, inducendo effetti acuti letali. L'Unione Europea ha adottato restrizioni nell'uso di questi principi attivi a partire dal 2008.

1.3 Tecnica di batterizzazione artificiale

Il rivestimento del seme è l'applicazione di sostanze esogene per migliorare la forma, le dimensioni e il peso dei semi, proteggendoli da fitopatogeni e migliorando la germinazione e la crescita della pianta. Nel rivestimento artificiale dei semi vengono utilizzati diversi materiali (es: biopolimeri, coloranti, agenti di biocontrollo e microrganismi).

Il rivestimento microbico del seme viene utilizzato come strumento biologico che segue i principi della sostenibilità agricola, in alternativa al vecchio ma non ancora obsoleto metodo della concia con sostanze chimiche, fertilizzanti e biostimolanti.

1.3.1 Risultati esperimento di concia del seme di mais con *B. japonicum*

Nell'esperimento si sono messi a confronto i risultati ottenuti dalla coltivazione di semi non trattati (UT) con semi immersi in una soluzione di *B. japonicum* (ND-372). Le coltivazioni si sono svolte nelle medesime condizioni luminose e climatiche eseguendo per ogni esperimento tre repliche in modo da poter fare una media dei risultati.

Il trattamento con *B. japonicum* ha favorito la crescita del mais

Per studiare il ruolo di *B. japonicum* nella crescita del mais, i semi di mais sono stati immersi in una soluzione di *B. japonicum* (Figura 8 A), in seguito si sono notate le seguenti differenze:

1. La lunghezza della radice è aumentata di circa 1,45 cm in media nei gruppi di trattamento (ND-372) rispetto ai gruppi di controllo (UT) (Figura 8 B).
2. La lunghezza della piantina è aumentata di 4,30 cm in media negli ND-372 rispetto agli UT (Figura 8 C).
3. Il peso fresco dei gruppi ND-372 è aumentato di 2,00 g in media rispetto ai gruppi UT (Figura 8 D).

Questi risultati indicano che l'ammollo dei semi in *B. japonicum* può favorire la crescita del mais.

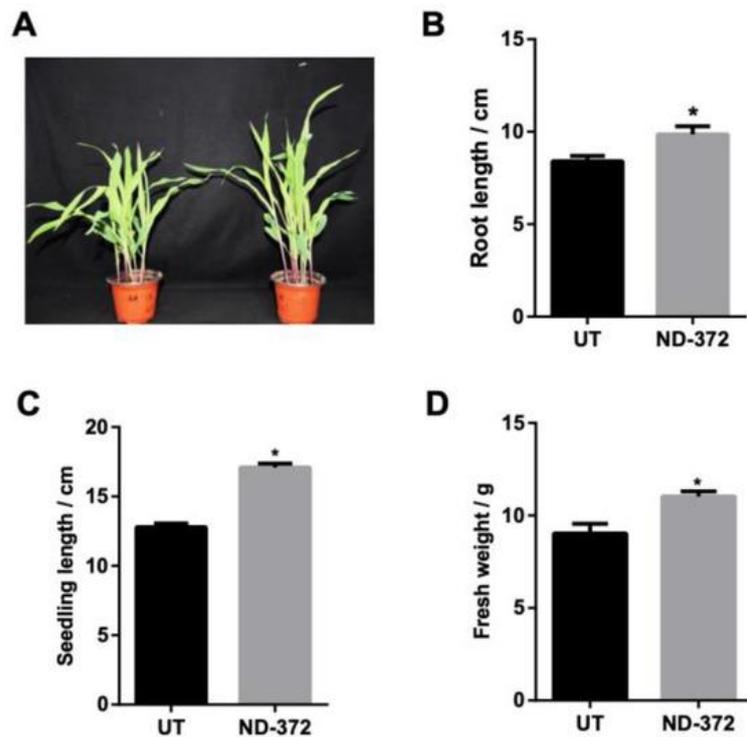


Figura 8. Il trattamento con *B. japonicum* favorisce la crescita del mais.

L'espressione dei geni legati alla crescita del mais è stata indotta da *B. japonicum*

Per capire il ruolo di *B. japonicum* nel promuovere la crescita del mais, è stato eseguito il sequenziamento del trascrittoma e in secondo luogo, l'analisi dell'espressione differenziale genica mostrando che 8782 geni erano espressi in modo differenziale: 5123 erano sovraregolati e 3659 erano sottoregolati (Figura 9). Era ragionevole ipotizzare che il trattamento con *B. japonicum* fosse correlato alla crescita e allo sviluppo del mais.

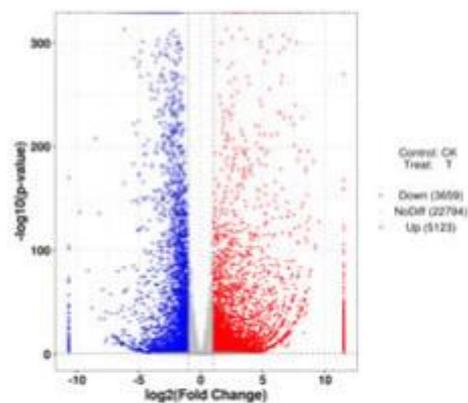


Figura 9. Analisi dei geni espressi in modo differenziale. Mappa vulcanica dei geni differenzialmente espressi. I punti rossi sono i geni sovraregolati, i punti blu sono i geni sottoregolati e i punti grigi indicano geni espressi in modo differenziale non significativo.

Il trattamento con *B. japonicum* ha aumentato l'abbondanza dei batteri della rizosfera del mais

I test hanno rilevato che i gruppi ND_372, in cui i semi erano stati ammollati in *B. japonicum*, presentavano un numero di specie batteriche e un indice di diversità più elevati rispetto ai gruppi UT, in cui i semi non erano stati ammollati. Questo suggerisce che l'ammollo dei semi aumenta la diversità e la ricchezza batterica del suolo, che potrebbe avere un impatto positivo sulla crescita del mais.

Il trattamento con *B. japonicum* ha influenzato la variazione dei funghi della rizosfera del mais

I risultati hanno rilevato che i gruppi ND_372, in cui i semi erano stati ammollati in *B. japonicum*, presentavano una minore abbondanza di funghi patogeni, come *Curvularia*, *Mycocentrospora* e *Fusarium*. Inoltre, l'inoculazione di rizobi potrebbe ridurre significativamente l'infezione da *Fusarium graminearum* sulla radice di mais (Figura 10 A, B). Nel frattempo, la lunghezza della radice era significativamente aumentata nei gruppi di trattamento (ND_372) rispetto ai gruppi di controllo (UT) (Figura 10 C). I risultati suggeriscono che *B. japonicum* ha modificato l'ambiente microbico dei funghi del suolo e che può inibire i funghi patogeni (ad esempio, le specie *Fusarium*). (Li et al. 2023)

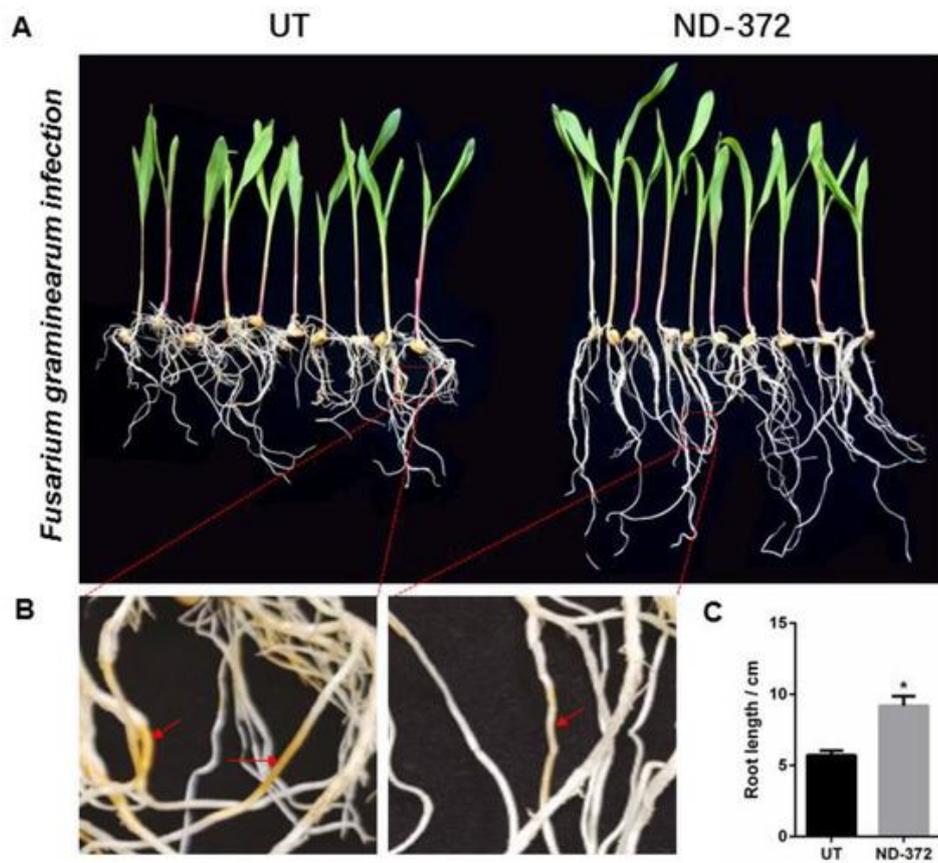


Figura 10. Il trattamento con *B. japonicum* inibisce l'infezione da *Fusarium* sulle radici di mais. (A, B) A sinistra l'infestazione da *Fusarium* delle radici del mais; e a destra un'infestazione da *Fusarium* delle radici del mais con infiltrazione di *B. japonicum*. (C) Lunghezza della radice.

1.3.2 Tecniche di inoculo

L'inoculo dei semi è il metodo più comune per applicare i microrganismi benefici alle piante. I vantaggi e gli svantaggi di ciascun metodo di inoculazione dipendono da diversi fattori, tra cui la disponibilità degli strumenti, il tipo di microrganismo, il tipo di seme, la presenza di sostanze inibitorie nel seme e i costi (Tabella 3).

Metodo	Tecnica	Vantaggio	Svantaggio
a) Inoculazione del suolo	Granulare/polvere; inoculo liquido; cellule microbiche immobilizzate	Previene danni a semi e cotiledoni/ Riduce gli effetti distruttivi di fungicidi e pesticidi	Necessita di strumenti specializzati per l'utilizzo e maggiori quantità di inoculanti; ha bisogno di più area di stoccaggio e trasporto; metodo costoso
b) Inoculazione delle radici	Spray fogliare; immersione delle radici	Inoculazione microbica in alta concentrazione	Richiede molta inoculazione microbica ed è dispendioso in termini di tempo e denaro
c) Inoculazione dei semi	Rivestimento del seme	Economico, accurato e utile per migliorare le proprietà dei semi	Riduzione della sopravvivenza all'inoculazione microbica

Tabella 3. Metodi di inoculazione dei microrganismi nelle piante ospiti.

a) Inoculazione del suolo

Il metodo di inoculazione del suolo è un processo che consiste nell'introduzione di microrganismi benefici, noti come PGPR, nel suolo. Questo processo può essere effettuato in diversi modi, tra cui:

- Miscelazione: i PGPR vengono miscelati con acqua e poi applicati al suolo.
- Incorporazione del suolo: i PGPR vengono miscelati con il suolo.
- Microcapsule: i PGPR vengono avvolti in capsule protettive che vengono poi applicate al suolo.

Ogni metodo di inoculazione ha i suoi vantaggi e svantaggi. L'inzuppamento è il metodo più semplice e veloce, ma non è sempre efficace. L'incorporazione del suolo è più efficace dell'inzuppamento, ma può essere più laboriosa. Le microcapsule sono il metodo più efficace, ma sono anche il più costoso.

b) Inoculazione delle radici

In questo metodo, le radici delle piantine vengono immerse in una soluzione contenente microrganismi benefici. Dopo l'inoculazione, le piantine vengono coltivate su un substrato adatto per il loro sviluppo.

Questo metodo offre diversi vantaggi:

- Standardizzazione delle dimensioni delle piante: Le piantine vengono coltivate su un substrato standard, il che garantisce che abbiano tutte le stesse dimensioni. Questo è importante per gli studi che confrontano diversi microrganismi o condizioni di coltivazione.
- Relazione diretta tra radici e inoculanti: L'inoculazione avviene direttamente sulle radici, il che consente di studiare la relazione diretta tra i microrganismi e le radici. Questo è importante per comprendere come i microrganismi interagiscono con le piante e come possono migliorare la loro crescita.
- Miglioramento della colonizzazione delle radici: L'inoculazione diretta sulle radici può aiutare a migliorare la colonizzazione delle radici.

c) Inoculazione dei semi

L'inoculazione delle sementi con PGPR è un'alternativa migliore, perché è più sostenibile e sicura.

In questo metodo, i semi vengono immersi in una soluzione contenente microrganismi benefici. I microrganismi sono concentrati in una soluzione nota, in modo da garantire che siano presenti in quantità sufficienti per colonizzare le radici delle piante.

Durante il processo di germinazione, il seme rilascia carboidrati e amminoacidi negli essudati. I microrganismi utilizzano questi nutrienti per crescere e colonizzare le radici.

I PGPR possono fornire diversi benefici alle piante, tra cui:

- Miglioramento della crescita e della produttività
- Resistenza alle malattie
- Tolleranza alle condizioni avverse

L'inoculazione delle sementi con PGPR è una pratica promettente per ridurre l'uso di prodotti chimici in agricoltura.

1.3.3 Tipologie di rivestimento del seme

a. Verniciatura a polvere secca

La verniciatura a polvere secca è un metodo di applicazione di una polvere secca a un seme. La polvere secca può essere utilizzata per scopi diversi, tra cui la protezione dei semi da malattie e insetti, il miglioramento della germinazione e l'aumento della produttività.

Il processo di verniciatura inizia con la pesatura del seme. Il seme viene quindi posto in una macchina che applica la polvere secca, questa viene applicata tramite una spazzola rotante in acciaio inossidabile che setaccia un materiale in polvere utilizzando un setaccio dosatore. Le polveri secche più comuni utilizzate per la verniciatura a secco dei semi sono il talco e la grafite. Il talco è una polvere bianca che viene utilizzata per proteggere i semi da malattie e insetti. La grafite è una polvere nera che viene utilizzata per migliorare la germinazione e l'aumento della produttività. Il dosaggio della polvere secca varia a seconda del tipo di polvere e del peso del seme. In generale, il dosaggio è compreso tra lo 0,06 e l'1,0% del peso del seme.

Ecco una spiegazione più dettagliata di ogni passaggio del processo:

- Pesatura del seme: Il seme viene pesato per determinare la quantità di polvere secca necessaria.

- Applicazione della polvere secca: La polvere secca viene applicata al seme tramite una spazzola rotante in acciaio inossidabile che setaccia un materiale in polvere utilizzando un setaccio dosatore.
- Asciugatura: Il seme viene essiccato per fissare la polvere secca.

La verniciatura a polvere secca è un metodo efficace per proteggere i semi da malattie e insetti, migliorare la germinazione e aumentare la produttività. È un metodo relativamente semplice e può essere eseguito a livello industriale o su piccola scala.

b. Condimento di semi

La concia del seme è un processo che consiste nell'applicazione di un sottile strato di sostanze attive, in particolare protettivi chimici, sulla superficie del seme. Questo strato di sostanze attive può aiutare a proteggere il seme da malattie, insetti e altri fattori abiotici. L'attrezzatura più comune per la concia del seme è la spalmatrice rotativa. La spalmatrice rotativa dispone i liquidi su un disco rotante e li nebulizza sui semi che ruotano all'interno di un cilindro metallico. I semi vengono quindi scaricati, pronti per la semina. Il dosaggio delle formulazioni liquide per la concia del seme varia tipicamente da <0,05 a 1,0% in peso. Questo significa che solo una piccola quantità di sostanze attive è necessaria per proteggere il seme.

c. Rivestimento in pellicola

Il rivestimento del film è un metodo di applicazione di un sottile strato di materiale, come pigmenti, fungicidi o polimeri, sulla superficie di un seme. Questo strato di materiale può aiutare a proteggere il seme da danni, migliorare la germinazione e aumentare la produttività. Il rivestimento del film è modellato sulla base delle industrie farmaceutiche e dolciarie, dove viene utilizzato per proteggere i prodotti da danni e migliorare la loro presentazione. Nel rivestimento del film per le sementi, la dimensione del seme non cambia e il materiale di rivestimento rappresenta meno del 10% del peso del seme. Questo processo è efficiente e rispettoso dell'ambiente.

1.3.4 Formulazione

La formulazione di inoculanti microbici è un processo che consiste nella combinazione di tre elementi fondamentali: il microrganismo selezionato, un vettore adatto e diversi additivi. La formulazione è importante perché determina la sopravvivenza dei microrganismi durante la lavorazione, la conservazione e l'applicazione del prodotto, la sua efficienza una volta applicata sulla pianta bersaglio e la fattibilità economica dell'applicazione. Mantenere la vitalità del microrganismo rivestito sui semi è essenziale per le applicazioni commerciali. Tuttavia, la durata di conservazione dei semi rivestiti con inoculanti microbici è ancora un argomento trascurato in letteratura. Nonostante i risultati promettenti ottenuti in laboratorio, il rivestimento dei semi con microrganismi benefici presenta ancora alcune sfide da superare prima di poter essere utilizzato su larga scala. Una sfida è rappresentata dal passaggio dal laboratorio al campo. I risultati ottenuti in laboratorio devono essere confermati in condizioni reali, come il terreno e le condizioni meteorologiche. Un'altra sfida è rappresentata dalla formulazione corretta del rivestimento. La formulazione deve essere in grado di proteggere i microrganismi benefici del suolo dai fattori ambientali e di garantire la loro sopravvivenza e efficacia. In particolare, è necessario individuare combinazioni microbiche efficienti e materiali di rivestimento che possano portare a una maggiore durata di conservazione sia dei semi che dei microrganismi rivestiti. Per superare queste sfide, è necessario continuare la ricerca e lo sviluppo di nuove tecnologie e strategie di rivestimento.

1.3.5 Sopravvivenza

La sopravvivenza microbica è una questione essenziale per il rivestimento dei semi, poiché è necessario che i microrganismi benefici rimangano vivi e attivi per essere in grado di svolgere la loro funzione.

Diversi fattori possono influenzare la sopravvivenza dei microrganismi benefici, tra cui:

- Il tipo di rivestimento: alcuni rivestimenti sono più efficaci nel proteggerli dagli stress ambientali.
- Gli inoculanti: il ceppo, il tipo, la purezza, la sterilità o meno, lo stato di umidità e l'età degli inoculanti.
- Il processo di essiccazione: l'essiccazione rapida e uniforme è importante per preservare la vitalità dei microrganismi.
- Le condizioni di conservazione: la temperatura, l'umidità e l'esposizione a contaminanti.

In particolare, l'essiccazione è uno dei fattori più importanti che influenzano la sopravvivenza dei rizobi sui semi. Per migliorare la sopravvivenza dei microrganismi benefici, è possibile utilizzare adesivi polimerici o materiali di rivestimento che includono pigmenti, sostanze nutritive e agenti protettivi dei semi. I polimeri possono anche aumentare la capacità di proteggere le cellule dei microbi da diversi stress ambientali.

2. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

I microrganismi hanno avuto un'influenza profonda sul pianeta per miliardi di anni. Oggi, sappiamo che i microbi sono molto diversi e hanno un'ampia gamma di capacità. I batteri e i funghi, in particolare, possono svolgere un ruolo importante nella sostenibilità agricola.

Il rivestimento microbico dei semi è una strategia promettente per aumentare la produzione agricola, migliorare l'efficienza nell'uso delle risorse e proteggere le piante da condizioni biotiche (ad es. parassiti e malattie) e ambientale (ad es. siccità, salinità e temperature estreme). È un metodo che può migliorare l'indice di germinazione e l'insediamento della piantina, riducendo lo spreco di semi. Può anche migliorare le proprietà fisiche dei semi, facilitando la semina e l'uniformità dell'emergenza della piantina. Inoltre, può proteggere i semi da insetti e altri animali.

Tuttavia l'applicazione di questo metodo di coltivazione dipende dalle formulazioni che siano adattate alle condizioni locali e alle pratiche agricole (come l'applicazione di pesticidi, fertilizzanti e gestione dell'irrigazione), c'è bisogno di ulteriori ricerche per gli ostacoli legati a parametri come la sopravvivenza dei microbi, la selezione dell'ingrediente e il costo di produzione.

In passato, la tecnologia della concia dei semi utilizzava sostanze chimiche dannose per la salute umana e per l'ambiente, ora i nuovi metodi di rivestimento microbico che utilizzano microrganismi benefici come il *B. japonicum* possono migliorare la salute delle piante e ridurre l'uso di pesticidi.

Il cambiamento climatico e il degrado ambientale stanno creando nuove sfide per l'agricoltura. I microrganismi benefici possono aiutare ad affrontare queste sfide, ma è importante garantire che vengano applicati con successo. Il rivestimento dei semi è un potenziale strumento per la consegna di microrganismi benefici alle piante. Ulteriori sviluppi e investimenti possono consentire la sua più ampia applicazione e integrazione nelle strategie di gestione agricola, sia nei paesi sviluppati che in quelli in via di sviluppo.

3. BIBLIOGRAFIA

- Li, Z., Chi, Y., Su, X., Ye, Z., & Ren, X. (2023). Rhizobium Soaking Promoted Maize Growth by Altering Rhizosphere Microbiomes and Associated Functional Genes. *Microorganisms*, 11(7), 1654.
- Karavidas, I., Ntatsi, G., Ntanasi, T., Tampakaki, A., Giannopoulou, A., Pantazopoulou, D., ... & Savvas, D. (2023). Hydroponic Common-Bean Performance under Reduced N-Supply Level and Rhizobia Application. *Plants*, 12(3), 646.
- Szpunar-Krok, E., Bobrecka-Jamro, D., Pikuła, W., & Jańczak-Pieniążek, M. (2023). Effect of Nitrogen Fertilization and Inoculation with Bradyrhizobium japonicum on Nodulation and Yielding of Soybean. *Agronomy*, 13(5), 1341.
- B. Biavati, C. Sorlini. *Microbiologia generale e agraria*. Milano. Casa Editrice Ambrosiana, 2012 seconda edizione
- P. Sequi, C. Ciavatta, T. Miano. *Fondamenti di chimica del suolo*. Bologna. Pàtron Editore, 2017 terza edizione
- R. Spigarolo, S. Bocchi, S. Ronzoni, G. Altamura. *Agronomia generale e meccanizzazione*. Milano. Mondadori Education, 2016 seconda edizione
- S. Bocchi, R. Spigarolo, S. Ronzoni. *Coltivazioni erbacee*. Milano. Mondadori Education, 2016 seconda edizione

4. SITOGRAFIA

- https://en.wikipedia.org/wiki/Bradyrhizobium_japonicum
- <https://www.biopills.net/pgpr/>
- <https://www.biostimulant.com/it/blog-33-phosphate-solubilizing-bacteria-as-plant-biostimulants/>
- https://www.canna-it.com/info-courier_iron
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215017X23000012>

5. RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questo elaborato, desidero menzionare tutte le persone che hanno contribuito, con il loro supporto, alla realizzazione dello stesso.

In primis, un ringraziamento al mio relatore Relatore Favaro Lorenzo, per la disponibilità nel seguirmi, per i suoi consigli, per le conoscenze trasmesse durante tutto il percorso di stesura dell'elaborato.

Mamma Antonella e papà Stefano, vi ringrazio di cuore per il vostro sostegno. Avete sempre creduto in me e mi avete dato la possibilità di proseguire con gli studi universitari. So che a volte vi ho fatto innervosire con le mie lamentele, ma avete sempre avuto pazienza e comprensione. Non smetterò mai di ringraziarvi per avermi aiutato a raggiungere questo traguardo.

Voglio ringraziare tutti i miei amici Adele, Alessia, Alessio, Annalisa, Diletta, Edoardo, Elisa, Giacomo, Giada, Giulia, Gregorio, Letizia, Lorenzo, Maddalena, Manuela, Mattia, Riccardo per i momenti speciali che abbiamo vissuto insieme. Ognuno di voi ha contribuito a rendere la mia vita più ricca e felice. Vi ringrazio per essere sempre stati presenti per me, per avermi ascoltato quando ne avevo bisogno e per aver condiviso con me momenti di spensieratezza e gioia.

Un ringraziamento sentito e profondo a tutti.