

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

TESAF
Dipartimento Territorio
e Sistemi Agro-Forestali
Università di Padova

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI TERRITORIO E SISTEMI AGRO-FORESTALI

Dipartimento di Agronomia, Alimenti, Risorse naturali,
Animali e Ambiente (Relatore)

CORSO DI LAUREA IN TECNOLOGIE FORESTALI E AMBIENTALI

**VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI DIVERSI PRODOTTI
BIOSTIMOLANTI NELL'AUMENTARE LO SVILUPPO RADICALE
SU PIANTE DI BARBABIETOLA**

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF DIFFERENT BIOSTIMULANT
PRODUCTS IN INCREASING ROOT DEVELOPMENT ON BEET PLANTS

RELATORE:

Prof.ssa Nardi Serenella

CORRELATORE:

Dott.ssa Della Lucia Maria Cristina

Laureando:

Caldon Dennis

Matricola n.
1221350

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

SOMMARIO

ABSTRACT	5
RIASSUNTO	6
1. INTRODUZIONE	7
1.1. Perché i biostimolanti	7
1.1.1. Agricoltura Sostenibile.....	7
1.1.2. Economia Circolare	8
1.1.3. Certificazioni.....	8
1.2. Tipologie ed effetti principali	8
1.2.1. Sostanze Umiche	8
1.2.2. Estratti di alghe	9
1.2.3. Idrolizzati Proteici	9
1.2.4. Lignoumati.....	10
1.2.5. Altre tipologie	10
1.3. Applicazioni	10
1.3.1. Orticoltura	10
1.3.2. Gestione forestale	11
1.3.3. Fitorisanamento	12
1.3.4. Riduzione del Carbon Footprint.....	12
1.4. Mercato e Regolamentazione.....	12
1.4.1. Mercato	12
1.4.2. Regolamentazione	13
2. SCOPO DEL LAVORO	14
3. MATERIALI E METODI.....	14
3.1. Germinazione.....	14
3.1.1. Prodotti.....	14
3.1.2. Design Sperimentale	14
3.2. Coltivazione Idroponica	15
3.2.1. Prodotti.....	15
3.2.2. Design Sperimentale	16
4. RISULTATI	18
4.1. Germinazione.....	18
4.1.1. Tasso di germinazione.....	18
4.1.2. Presenza di Foglie e Marciame radicale.....	19
4.1.3. Lunghezza radici (cm).....	19
4.1.4. Tabella dei Risultati	20

4.2. Coltivazione Idroponica	21
4.2.1. Lunghezza radici (cm)	21
4.2.2. Numero di apici (n)	22
4.2.3. Lunghezza radichette (cm)	24
4.2.4. Tabella dei Risultati	25
5. CONCLUSIONI	27
6. BIBLIOGRAFIA	28

ABSTRACT

Biostimulants are products with great potential recently introduced in the field of plant production, they are still little known. Their first application on plant species dates back to 1994 with the publication of Hervé who defined them as “bio-rational products” reporting their peculiar characteristics: environmental compatibility, high reproducibility of useful effects on field scale and low doses sufficient to stimulate plant growth.

The beneficial effects of these products involve improved absorption and assimilation efficiency of the nutritive elements, increased resistance to biotic and abiotic stress and reduced quantity of other products used to obtain the same results, such as fertilizers and pesticides. These effects determined a qualitative and quantitative increase in plant production and, at the same time, in a reduction of the environmental impact.

The following thesis, after providing an overview of the state of the art of biostimulants in agriculture and forestry, reports the experimental work carried out to evaluate the efficacy of some humic substances in terms of germination and root development on plants of *Beta vulgaris L.*. Plants were treated with humic substances at seeding and after transplanting in hydroponics, then scanned. The results obtained demonstrated how the products induced positive effects on all the parameters considered: germination rate, root length and number of root tips. The beneficial effects were also found with treatments at low doses and in many cases with increases greater than 30% compared to the control (considered a valid agronomic improvement).

RIASSUNTO

I biostimolanti sono prodotti dalle grandi potenzialità nell'ambito delle produzioni vegetali di recente introduzione e ancora poco conosciuti. La loro prima applicazione su specie vegetali risale al 1994 con la pubblicazione di Hervé che li definì "bio-rational products" riportandone le caratteristiche peculiari: la compatibilità ambientale, l'alta riproducibilità degli utili effetti in campo e i ridotti dosaggi sufficienti a stimolare la crescita delle piante.

Gli effetti benefici di questi prodotti riguardano il miglioramento dell'efficienza di assorbimento e assimilazione degli elementi nutritivi, l'aumento della resistenza agli stress di natura biotica e abiotica e la riduzione della quantità di altri prodotti impiegati per ottenere gli stessi risultati, come ad esempio fertilizzanti e fitofarmaci. Ciò si traduce in un aumento qualitativo e quantitativo della produzione vegetale e allo stesso tempo in una riduzione dell'impatto ambientale.

La seguente tesi, dopo aver fornito una panoramica sullo stato dell'arte dei biostimolanti in ambito agrario e forestale, riporta il lavoro sperimentale svolto per valutare l'efficacia di alcuni prodotti a livello di germinazione e sviluppo radicale su piante di *Beta vulgaris L.*. Le piante sono state trattate con sostanze umiche al momento della semina e dopo il trapianto in idroponica per poi essere scannerizzate. I risultati ottenuti hanno dimostrato come i prodotti siano in grado di indurre effetti positivi su tutti i parametri considerati: tasso di germinazione, lunghezza delle radici e numero di apici radicali. In particolare, gli effetti benefici si sono riscontrati anche a dosaggi bassi e in molti casi con incrementi superiori al 30% rispetto al controllo (considerati un valido miglioramento agronomico).

1. INTRODUZIONE

1.1. Perché i biostimolanti

Nell'ambito delle produzioni vegetali, la sostenibilità è ormai un requisito fondamentale per raggiungere e mantenere un alto livello di salubrità dei prodotti e un basso impatto ambientale riducendo la quantità di agrofarmaci, concimi e fertilizzanti impiegati.

Tra le innovazioni tecnologiche volte a raggiungere gli attuali standard richiesti dal mercato e dal legislatore spiccano i biostimolanti, sostanze o microrganismi che anche a ridotti dosaggi sono in grado di produrre effetti benefici come: stimolazione della crescita delle piante, migliorare l'efficienza nell'uso delle risorse (naturali e da input antropici), incrementare la resistenza agli stress ambientali (Colla et al., 2015)

Il Regolamento UE 1009 del 2019, all'articolo 47 comma 2, definisce questi prodotti come segue:

“Biostimolante delle piante qualunque prodotto che stimola i processi nutrizionali delle piante indipendentemente dal suo tenore di nutrienti, con l'unica finalità di migliorare una o più delle seguenti caratteristiche della pianta o della rizosfera della pianta:

- efficienza dell'uso dei nutrienti;
- tolleranza allo stress abiotico;
- caratteristiche qualitative;
- disponibilità di nutrienti confinati nel suolo o nella rizosfera.”

Proprio perché, come emerge dalla definizione, questi prodotti non devono avere effetti diretti su parassiti e patogeni ed apportare quantità significative di elementi nutritivi, non rientrano nelle categorie dei concimi e dei pesticidi.

1.1.1. Agricoltura Sostenibile

Il termine sostenibilità, usato per la prima volta durante la prima conferenza ONU sull'ambiente nel 1992, viene definito come segue: “Condizione di un modello di sviluppo in grado di assicurare il soddisfacimento dei bisogni della generazione presente senza compromettere la possibilità delle generazioni future di realizzare i propri.” (ONU, 1992).

L'obiettivo è quindi quello di promuovere una gestione agricola e forestale che soddisfi il fabbisogno dei prodotti delle sue filiere contribuendo, nel lungo periodo, al mantenimento degli equilibri ecologici, economici e sociali (ESG 360, 2021).

Per quanto riguarda l'aspetto sociale, ci si riferisce ad un concetto di equità, quindi della capacità di far fronte alla domanda globale, anche dei paesi in via di sviluppo, mentre l'aspetto economico si concentra sulla qualità di vita degli operatori del settore, favorendo aspetti come la tutela della salute dei lavoratori e il reddito equo. Infine, con sostenibilità ambientale (più nota negli ultimi anni) si intende il rispetto delle risorse naturali (acqua, suolo, biodiversità), degli equilibri ecologici e dei tempi della natura, minimizzando ad esempio l'utilizzo di sostanze (naturali o di sintesi) inquinanti e dannose per la biosfera (Corrado, 2021). In sintesi, l'approccio sostenibile in ambito agricolo e forestale si muove in direzione opposta rispetto ai metodi intensivi tipicamente impiegati in questi settori (Briamonte et al., 2010).

Nel 2018 la FAO ha definito i 5 principi dell'agricoltura sostenibile per raggiungere un modello di produzione che, coniugando i tre aspetti sopra citati, risulti economicamente vantaggioso per i lavoratori e l'intera società:

1. Migliorare l'efficienza nell'uso delle risorse è fondamentale per una produzione sostenibile;
2. La sostenibilità richiede un'azione diretta per conservare, proteggere e valorizzare le risorse naturali;
3. Una gestione agricola e forestale che non riesce a proteggere e migliorare i mezzi di sussistenza rurali, l'equità e il benessere sociale è insostenibile;

4. Una maggiore resilienza delle persone, delle comunità e degli ecosistemi è fondamentale per uno sviluppo sostenibile;
5. L'alimentazione e l'agricoltura sostenibili richiedono meccanismi di governance responsabili ed efficaci (FAO, 2018).

In questo contesto si inseriscono i biostimolanti come importante fattore per l'aumento dell'efficienza nell'uso delle risorse, i bassi dosaggi richiesti e l'alta biocompatibilità che permettono di rispettare tutti i principi di una produzione sostenibile (ESG 360, 2021).

1.1.2. Economia Circolare

La sostenibilità dei biostimolanti riguarda non solo la loro applicazione, ma può riguardare anche la loro produzione. Infatti, un aspetto peculiare di alcuni prodotti è la possibilità di essere ottenuti con pratiche tipiche dell'economia circolare (un modello economico basato sulla rigenerazione delle risorse) a partire da residui delle filiere agro-forestali.

Ad esempio, gli acidi umici sono tipicamente prodotti a partire da leonardite presente in giacimenti di lignite, una risorsa esauribile, ma intensamente sfruttata per motivi economici. Questi composti organici possono però essere ricavati anche da altre fonti come biomasse da residui vegetali di coltivazione o da scarti di RSU (rifiuti solidi urbani), valide alternative (talvolta più economiche) che permettono di ridurre il consumo delle risorse naturali e l'impatto ambientale nelle zone di estrazione, riutilizzando completamente gli scarti delle produzioni agricole (Fascella et al., 2015). Uno studio di Fascella et al. (2015) indica come acidi umici a base di digestato da rifiuti solidi, residui verdi di coltivazioni locali e fanghi di depurazione applicati per via radicale a specie ornamentali (*Euphorbia x lomi*) possano migliorare la qualità della pianta in alternativa ai prodotti commerciali a base di leonardite, provocando effetti positivi su diversi parametri fisiologici (infiorescenze e foglie per pianta, area fogliare, contenuto in clorofilla delle foglie, peso secco delle foglie e dell'intera pianta).

1.1.3. Certificazioni

Per quanto riguarda la sostenibilità, negli ultimi anni è crescente la richiesta da parte dei consumatori di prodotti *green* e sempre più produttori scelgono di certificarsi per ottenere un marchio distintivo. Tuttavia, ancora non esiste una vera e propria certificazione istituzionale (un marchio basato su una normativa unificata), anche se si stanno sviluppando diverse proposte a livello europeo. Attualmente le possibilità per i produttori sono certificazioni private da enti e organizzazioni non governative con criteri propri oppure l'adozione di una gestione interna che preveda regole e procedure autoprodotte per garantire una produzione sostenibile. Entrambe le soluzioni sono valide, ma possono lasciare spazio a zone d'ombra e scarsa possibilità di verifica (Gelasio, 2022).

1.2. Tipologie ed effetti principali

Attualmente, nell'ambito della letteratura scientifica si distinguono varie tipologie di biostimolanti di cui tre principali: sostanze umiche, estratti d'alghe e idrolizzati proteici (prodotti contenenti amminoacidi).

1.2.1. Sostanze Umiche

Le sostanze umiche sono macromolecole organiche eterogenee e complesse. Diversificate per solubilità e peso molecolare, sono classificate come acidi umici (solubili in acqua a pH alcalino), acidi fulvici (solubili in acqua a qualsiasi pH) e umine (insolubili in acqua). Provenienti dall'attività metabolica di microrganismi e dalla decomposizione di sostanza organica, per la loro estrazione vengono impiegati alcali (es. idrossido di potassio) e la

separazione di acidi umici e fulvici si ottiene per acidificazione. Per produrre in particolare i biostimolanti, le fonti principali sono compost, torba e giacimenti di humus fossile (es. leonardite).

L'azione stimolante di questo tipo di sostanze è di due tipi:

- Diretta: stimolano lo sviluppo radicale (Atiyeh et al., 2002), aumentano l'attività degli enzimi coinvolti nell'assimilazione dell'azoto nitrico e dei trasportatori deputati all'assorbimento dell'azoto nitrico (fino ad un incremento del 89% (Nardi et al., 2000)), migliorano il metabolismo secondario favorendo la difesa da stress ossidativo.
- Indiretta, nel suolo: stabilizzano gli aggregati di particelle inorganiche, aumentano la capacità di scambio cationico, incrementano la biodisponibilità dei nutrienti, riducono l'attività di alcuni ioni fitotossici (es. Na⁺, Cl⁻), esercitano un effetto tampone sul pH, riducono le perdite per lisciviazione (Colla et al., 2015).

Le sostanze umiche permettono quindi alla pianta di tollerare meglio gli stress biotici e abiotici, in particolare se provenienti da compost e torba. Gli effetti migliori si registrano in applicazioni radicali ripetute durante il ciclo colturale in suoli con bassa fertilità e scarsa quantità di sostanza organica, inoltre le monocotiledoni reagiscono meglio rispetto alle dicotiledoni (Colla et al., 2015).

1.2.2. Estratti di alghe

Gli estratti di alghe sono alla base di numerosi prodotti biostimolanti presenti nel mercato, ottenuti con diverse modalità di estrazione e solventi partendo da alghe verdi, brune o rosse la cui scelta determina le caratteristiche chimiche e le proprietà finali. Il metodo di estrazione più utilizzato prevede l'utilizzo a freddo di acqua ad alta pressione.

Gli effetti biostimolanti degli estratti di alghe sono diversi e riconducibili alle principali sostanze benefiche presenti:

- Fitormoni: stimolano la crescita delle piante e non solo, ad esempio le auxine possono produrre effetti positivi sullo sviluppo radicale e le citochinine possono rallentare la senescenza. In particolare, la stimolazione dipende dall'attivazione delle vie biosintetiche degli ormoni contribuendo, inoltre, a migliorare velocità di germinazione, allegagione, produzione e qualità delle colture.
- Polisaccaridi: aumentano la resistenza a stress biotici (ad esempio peronospora, sclerotinia, acari, afidi, nematodi, ecc.) e la tolleranza a stress abiotici (ad esempio siccità, salinità, temperature estreme), stimolando meccanismi come l'attività degli enzimi di difesa da stress ossidativo, l'accumulo di osmoliti, l'aumento del rapporto radici/parte aerea e migliorando lo stato nutrizionale della pianta.
- Altri possibili effetti benefici dipendono dalla presenza di ulteriori sostanze come polifenoli e altre molecole organiche.

Il tipo di applicazione preferito è quello fogliare grazie ai bassi dosaggi necessari e alla rapidità d'azione, registrando effetti più marcati su suoli poco fertili e con applicazioni ripetute durante il ciclo colturale (Colla et al., 2015).

1.2.3. Idrolizzati Proteici

Gli idrolizzati proteici sono prodotti contenenti una miscela di aminoacidi e peptidi solubili di origine vegetale (biomasse di leguminose) o animale (residui di lavorazione del cuoio o dell'industria ittica). La produzione avviene generalmente per idrolisi chimica o enzimatica o mista, in particolare la metodologia prevalente è l'idrolisi chimica del collagene (di origine animale) in ambiente fortemente alcalino o acido e ad alte temperature. Naturalmente il processo di produzione e l'origine della materia prima determinano diverse caratteristiche chimiche e composizioni aminoacidiche:

- Gli idrolizzati prodotti a partire da collagene presentano maggiori livelli di salinità, aminoacidi liberi, azoto organico e contengono glicina e prolina come aminoacidi dominanti.
- Gli idrolizzati prodotti per idrolisi enzimatica di biomasse vegetali presentano peptidi solubili, diverse molecole bioattive e contengono acido glutammico e acido aspartico come aminoacidi dominanti.

Le proprietà biostimolanti di questo tipo di prodotti influenzano positivamente caratteristiche come la resistenza agli stress ambientali, l'assorbimento e l'assimilazione dei nutrienti e la qualità del prodotto, quest'ultima ottenuta grazie ad un aumento del contenuto di antiossidanti e proteine insieme a una diminuzione dei nitrati nella pianta. Altri possibili effetti benefici comprendono la stimolazione della flora tellurica e un'azione auxino-simile (specifici peptidi contenuti attivano i geni della biosintesi), andando così a influenzare indirettamente la crescita della pianta.

L'applicazione può avvenire a livello radicale o fogliare, comportando rispettivamente enfasi sulla stimolazione della rizogenesi o sul sostentamento di ritmi di crescita elevati. Gli effetti più marcati si ottengono su suoli poco fertili e con applicazioni ripetute durante il ciclo colturale (Colla et al., 2015).

1.2.4. Lignoumati

I lignoumati sono composti organici contenenti molecole ad alto e basso peso molecolare. Alcune caratteristiche interessanti sono la solubilità e la loro elevata attività biologica dimostrata, in grado di stimolare attività ormonali (di tipo auxinico e gibberellico), enzimi del metabolismo dell'azoto e la RuBisCO determinando nella pianta un incremento della biomassa e di diversi composti fondamentali (es. clorofille, proteine, zuccheri, acidi fenolici) (Colla et al., 2019).

Ma la loro peculiarità sta nella possibilità di essere ottenuti a partire da lignina pura attraverso la degradazione fungina di scarti legnosi. Questo processo di sintesi in laboratorio è privo di scarti, non prevede sostanze inquinanti (quindi non sono richiesti lavaggi) e produce un composto granulare formato per il 90% da sostanze umiche. I vantaggi di questo tipo di produzione riguardano la possibilità di ottenere una qualità costante (e quindi una produzione industriale standardizzata), i ridotti dosaggi richiesti per ottenere gli effetti biostimolanti e l'approvvigionamento della materia prima da scarti del settore agro-forestale che permette di ridurre l'estrazione della sostanza organica di origine naturale. Risultano quindi essere dei prodotti sostenibili sotto tutti i punti di vista (ecologico, economico e sociale) e un buon esempio di economia circolare (Colla et al., 2019).

1.2.5. Altre tipologie

- materiali organici complessi;
- elementi chimici benefici (es. silicio);
- sali inorganici (es. biocarbonati);
- chitina e derivati del chitosano;
- antitraspiranti (es. caolino).

1.3. Applicazioni

1.3.1. Orticoltura

Una delle applicazioni più diffuse dei prodotti biostimolanti è quella in orticoltura. I vantaggi principali sono di tipo agronomico con aumenti di qualità, resa e resistenza agli stress biotici e abiotici (Bulgari et al., 2015). Molti sono gli studi che riportano risultati positivi con diversi prodotti e su diverse specie: Kunicki et al. (2010) hanno testato un prodotto biostimolante a

base di aminoacidi su piante di spinacio (*Spinacia oleracea* L.) e dimostrato la sua capacità di aumentare resa, contenuto di clorofilla e diminuire il contenuto di nitrati nelle foglie grazie alla stimolazione dell'attività della nitrato reductasi; dal trattamento con un estratto di alghe di una coltura in campo di broccolo, Mattner et al. (2013) hanno riportato al contempo un aumento della biomassa generale delle piante e una diminuzione totale del 23% dell'incidenza di *Albugo candida* (ruggine bianca); De Lucia e Vecchietti (2012) hanno osservato come l'utilizzo di tre idrolizzati proteici di origine diversa (alghe, residui di alfa-alfa, epitelio di origine animale) abbiano accorciato la durata del ciclo produttivo, migliorato l'espansione e la colorazione delle foglie, aumentato la lunghezza delle radici e il diametro delle gemme fiorali grazie al trattamento su piante di giglio (*Lilium spp.*) coltivato fuori suolo. Uno studio sull'applicazione di acidi umici è stato pubblicato nel 2008 da Nikbakht et al. con trattamenti su piante di gerbera (*Gerbera jamesonii* L.) che hanno indotto incrementi alla crescita radicale e al contenuto di micronutrienti e macronutrienti ma anche una maggiore durata dei fiori dopo la raccolta e una minore incidenza della rottura degli steli.

Un'altra azione determinata dall'utilizzo dei biostimolanti, applicati in orticoltura, è la capacità di aumentare il contenuto di composti nutraceutici nelle piante trattate (Bulgari et al., 2015). I nutraceutici sono sostanze generalmente derivate dalle piante (dette fitonutrienti), ma anche da diversi alimenti e fonti microbiche, che hanno effetti benefici sulla salute dell'uomo (Stephen De Felice, 1989). Lo studio di questo gruppo eterogeneo di composti, spesso metaboliti secondari, ha dimostrato l'efficacia di questi prodotti e i risultati ottenuti sono stati riportati in diversi lavori scientifici. Ad esempio, Abdalla (2013) ha osservato come il trattamento di fogliare con estratto di *Moringa oleifera* su piante di rucola sia in grado di raddoppiare il contenuto di clorofilla e carotenoidi; in un articolo del 2014 pubblicato da Pardo García et al. è stato dimostrato l'effetto di estratti di quercia nell'incrementare la sintesi, e quindi il contenuto, di vari composti fenolici in piante di uva; uno studio di Schiavon et al. (2010) mostra l'aumento di fenoli e fenilpropanoidi dovuto all'applicazione di sostanze umiche su una coltura di *Zea Mays*.

1.3.2. Gestione forestale

Lo studio dei biostimolanti riguarda agenti per l'incremento di crescita, produttività e resistenza agli stress in ambito forestale (Kelting et al., 1997; Ferrini et al., 2002; Fraser et al., 2003; Soliman & Shanan, 2017; Ozyhar et al., 2020).

Uno studio di Santacruz-García (2022) riporta un buon esempio di applicazione di biostimolanti da estratti vegetali in Argentina su *Prosopis alba*, una specie nativa dall'alto valore economico ed ecologico regionale, essenziale per la riforestazione e il ripristino di aree degradate locali. Sulle piante trattate a livello fogliare con estratti di *Ilex paraguariensis* e *Larrea divaricata* sono stati misurati parametri fisiologici, biochimici e morfologici sia in vivaio che in campo. I risultati mostrano significativi effetti di stimolazione della crescita, aumentando altezza, diametro e biomassa radicale, ma anche dell'attività antiossidante in condizioni di stress (misurando i livelli di specifici biomarcatori dell'attività ossidativa).

L'articolo propone quindi che, procedendo con ulteriori sperimentazioni, l'applicazione di questi prodotti potrebbe contribuire alla protezione e resilienza delle foreste riducendo i costi di produzione, generando valore aggiunto e favorendo la catena produttiva regionale (Santacruz-García, 2022).

Diversi altri studi hanno dimostrato che l'applicazione di questo tipo di prodotti su varie specie arboree native riesce a migliorare diversi parametri nelle varie fasi della piantumazione. Qualche esempio: Ozyhar (2020) mostra come l'utilizzo di idrolizzati proteici su *Eucalyptus globulus* migliori la crescita e l'allocazione della biomassa lungo il tronco dopo il trapianto; Soliman e Shanan (2017) indicano i significativi effetti positivi dovuti all'applicazione di estratti da foglie di *Moringa oleifera* sulla crescita e sulle caratteristiche chimiche su piante di *Lagerstroemia indica* L. esposte a stress salini.

1.3.3. Fitorisanamento

Recenti studi hanno documentato la capacità dei biostimolanti di migliorare l'efficienza di alcune specie vegetali nel rimediare a siti contaminati contrastando gli effetti deleteri dei composti tossici inquinanti sulle piante impiegate, specialmente nel caso dei metalli pesanti (Bartucca *et al.*, 2022). Qualche esempio: lo studio di Canellas *et al.* (2020) ha mostrato l'effetto di sostanze umiche su piante di mais nell'incrementare la loro capacità di resistere durante il recupero di un sito contaminato da cromo; Alharby *et al.*, in un articolo del 2021, indicano come l'applicazione fogliare di un prodotto biostimolante arricchito in silimarina minimizzi l'effetto tossico del cadmio in piante di mais riducendo lo stress ossidativo grazie all'aumento della sintesi di enzimi antiossidanti.

Gli stessi benefici potrebbero essere sfruttati anche in un'ottica di prevenzione aumentando la resistenza contro gli stress abiotici associati al cambiamento climatico in atto, tuttavia gli studi attualmente disponibili dimostrano che questi effetti sono spesso inconsistenti (Fadiji *et al.*, 2022).

1.3.4. Riduzione del Carbon Footprint

I biostimolanti possono essere applicati anche come strumento per la riduzione del Carbon Footprint, indice che quantifica le emissioni di CO₂ equivalente di un processo o prodotto a supporto della scelta di tecniche agronomiche in linea con gli obiettivi di sviluppo sostenibile. Il primo studio ad aver testato dei biostimolanti concentrandosi su questo aspetto è stato pubblicato nel 2020, (Hamedani *et al.*) e ha condotto una valutazione ambientale dell'applicazione di *Glomus intraradices* (fungo micorrizico arbuscolare) e di un idrolizzato proteico a base di origine vegetale (trattamento fogliare) su due colture orticole in serra, spinaci e zucchine, sotto diversi regimi di fertilizzazione. È stata utilizzata la metodologia LCA (life cycle assessment), considerando tutti i processi dalla coltivazione alla raccolta, e i risultati hanno dimostrato che entrambi i prodotti hanno portato ad una riduzione delle emissioni di CO₂ equivalenti, rispettivamente del 7-12% con *Glomus intraradices* e del 7-24% con l'idrolizzato proteico di origine vegetale.

Chiaramente saranno necessari altri studi che valutino l'impatto dei biostimolanti sulla riduzione delle emissioni per comprenderne a pieno le potenzialità, testando anche su diverse condizioni e specie (Hamedani *et al.*, 2020).

1.4. Mercato e Regolamentazione

1.4.1. Mercato

Il mercato dei prodotti biostimolanti è in continua crescita, soprattutto in Europa (Gallo, 2020), fino al 10% in più ogni anno. Con un valore superiore ai 3,5 miliardi di dollari (2022), secondo le stime è destinato ad aumentare (potrebbe raggiungere i 6,9 miliardi nel 2027) insieme al numero di aziende produttrici e al numero di pubblicazioni scientifiche, con l'Italia al primo posto in quest'ultimo aspetto (Image Line Network, 2023 - Sito).

La questione è stata trattata nel dettaglio durante la Biostimolanti Conference 2023 in due giorni di interventi tra relatori accademici e istituzionali oltre a referenti di aziende produttrici multinazionali allo scopo di far luce sulle potenzialità dei biostimolanti. Dalle valutazioni fatte, questi prodotti possono essere considerati "strategici" perché in grado di integrare ed efficientare i trattamenti con fitofarmaci e fertilizzanti tradizionali. Il valore aggiunto riguarda aspetti:

- agronomici: miglioramento di diversi parametri fisiologici della pianta (stimolano in particolare il metabolismo primario), della resa totale per ettaro e dell'efficienza di input idrici e chimici (Lasorella, 2021);
- ambientali: riduzione dello sfruttamento di risorse naturali finite (compreso il suolo) e del carbon footprint (calcolato come emissioni di CO₂ equivalente);

- economici: con indicatori di redditività, dalle analisi emerge che mediamente da ogni euro speso in biostimolanti si ottiene un guadagno di 2,78€;
- nutrizionali, nel caso dell'orticoltura: aumento di diversi composti nutritivi (es. proteine totali, metaboliti secondari) e diminuzione dell'accumulo di sostanze dannose come i nitrati (Biostimolanti Conference 2023).

1.4.2. Regolamentazione

Dal punto di vista legislativo, la situazione è stata armonizzata a livello europeo dal Regolamento (Ce) 1009 del 2019. Quest'ultimo ha introdotto nuove tipologie di prodotti, tra cui concimi organici e biostimolanti con relativa definizione, e relative nuove regole di conformità riguardo i requisiti essenziali di qualità, sicurezza ed etichettatura. Così dal 16 luglio 2022, data di entrata in vigore, dovrà essere effettuata una valutazione di conformità dei prodotti con autocertificazione o, se necessario, con la certificazione di organismi notificati per assicurare il rispetto dei limiti in merito a materiali costituenti utilizzabili (come quantità di metalli pesanti, assenza di contaminanti) e processi adottati (Regolamento UE 1009/2019). Inoltre, il Regolamento riconosce la distinzione tra biostimolanti microbici e non microbici. Quelli non microbici sono varie tipologie di formulazioni organiche divisi a loro volta in biostimolanti con azione sul suolo, come gli estratti umici, e biostimolanti ad azione sulla pianta, come estratti di varie specie vegetali (compresi gli estratti di alghe) e idrolizzati proteici ed enzimatici (Banzato, 2019). Questi sono i prodotti più utilizzati e coprono più del 60% del mercato globale, nello specifico il 20% è occupato da acidi umici e fulvici (MarketsandMarkets, 2019). I biostimolanti microbici, invece, sono costituiti da microrganismi (singoli o in consorzio) in cellule vive, essiccate o liofilizzate insieme a dei residui delle loro colture (Banzato, 2019). Ad oggi quelli consentiti sono *Azotobacter spp.*, funghi micorrizici, *Rhizobium spp.* e *Azospirillum spp.* e per il momento rappresentano una fetta più piccola di mercato, circa il 10% (MarketsandMarkets, 2019). Tuttavia, il Regolamento europeo è facoltativo e non ostacola la possibilità dei paesi membri di immettere sul proprio mercato interno dei prodotti non armonizzati. In Italia è in vigore il Decreto Legislativo n.75 del 29 aprile 2010 per i prodotti immessi sul mercato come concimi CE, i concimi nazionali, ammendanti, correttivi, substrati di coltivazione e prodotti ad azione specifica. Stanno predisponendo un nuovo decreto per modificare alcuni aspetti anche alla luce delle novità portate dal Regolamento UE (Image Line Network, 2023 - Sito).

2. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro è di verificare l'effetto biostimolante di diversi prodotti sulla germinazione e lo sviluppo radicale di *Beta vulgaris L.*

3. MATERIALI E METODI

3.1. Germinazione

3.1.1. Prodotti

E' stato analizzato l'effetto sulla germinazione del trattamento con quattro diversi prodotti ad azione biostimolante su semi di *Beta vulgaris L.*

I prodotti, denominati Force-Sol (FSOL), Force-One (F1), Pro-Advance (PADV) e Pro-Action (PACT), sono sostanze umiche con diversi contenuti di macro e microelementi riportati in Tabella 3.1.

Tabella 3.1: Composizione dei prodotti per la germinazione.

	Sostanza Secca (%)	C Totale (% di s.s.)	C Organico (% di s.s.)	N Totale (mg/Kg di s.s.)	N Organico (mg/Kg di s.s.)	pH
Force-One (F1)	86,3	7,6	7,4	7.600	5.946	3,7
Pro-Advance (PADV)	90,6	5,4	5,0	3.417	1.480	2,8
Pro-Action (PACT)	88,6	16,8	15,1	52.017	48.952	6,0
Force-Sol (FSOL)	90,1	1,0	0,8	2.784	687	6,2

Tabella 3.2: Contenuto minerale dei prodotti per la germinazione.

	S (mg/Kg s.s.)	Mg (mg/Kg s.s.)	K (mg/Kg s.s.)	Na (mg/Kg s.s.)	Ca (mg/Kg s.s.)	P (mg/Kg s.s.)
Force-One (F1)	194.851	154.620	15.228	16.320	5.429	2.862
Pro-Advance (PADV)	207.937	165.742	7.139	492	2.279	501
Pro-Action (PACT)	165.400	129.498	8.144	1.822	7.009	965
Force-Sol (FSOL)	225.206	180.811	4.628	257	1.563	429

3.1.2. Design Sperimentale

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando i prodotti in tre diverse dosi: 0,5 mL/L, 1 mL/L, 2 mL/L. Ogni trattamento è stato eseguito in duplicato, inoltre è stato effettuato un test di controllo in triplicato senza alcuna aggiunta di prodotto (NT, *not treated*).

Ciascuna tesi consiste in una scatola contenente coppie di semi in carta pieghettata bagnata con 100 mL di acqua distillata per un totale di 100 semi a scatola, il tutto precedentemente disinfettato con alcool al 90% (semi compresi). In totale sono state preparate 24 scatole trattate e 3 scatole di controllo per un totale di 2700 semi.

Foto 3.3: Semina in 24 scatole con carta pieghettata, ciascuna con 100 semi.



La germinazione è stata condotta in cella climatica con una temperatura media di 23°C e un'escursione di 3°C tra il giorno e la notte.

Gli effetti dei prodotti sono stati valutati analizzando il tasso di germinazione di ciascun trattamento a diverse dosi in relazione al tasso di germinazione delle tesi di controllo. I risultati sono stati ottenuti considerando il numero di semi germinati dopo tre diversi intervalli di tempo: 48 ore, 72 ore, 96 ore.

Foto 3.4: Valutazione del tasso di germinazione dopo 48 ore, 72 ore e 96 ore.



Dopo le 96 ore sono stati considerati anche altri parametri: numero di semi con marciame radicale, numero di semi con foglie presenti, lunghezza delle radichette (cm).

La scansione delle radici è avvenuta tramite lo scanner WinRHIZO e la successiva analisi delle immagini è avvenuta con il programma RhizoScan. Dopo aver ottenuto tutti i dati, si è calcolato la media tra i test di ogni trattamento e i relativi tassi di incremento nel tempo.

3.2. Coltivazione Idroponica

3.2.1. Prodotti

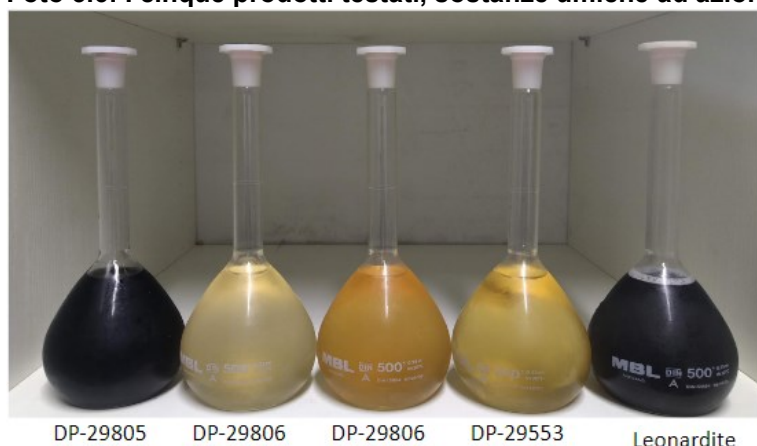
E' stato analizzato l'effetto sulla crescita, in particolare sullo sviluppo radicale, del trattamento con cinque diversi prodotti ad azione biostimolante su semi di *Beta vulgaris L.*

I prodotti, quattro forniti da Borregaard USA Inc. (DP-29805, DP-29806, DP-29807, DP-29553) e uno fornito da Sipcam Oxon SpA (Leonardite), sono sostanze umiche con diverse composizioni e concentrazioni riportate in Tabella 3.5.

Tabella 3.5: Composizione dei prodotti per la coltivazione idroponica.

DP-29805		
Acidi umici, Sali di potassio $\geq 90\%$		Acqua $\leq 10\%$
DP-29806		
Calcio lignosolfonato $\geq 92\%$		Acqua $\leq 8\%$
DP-29807		
Ammonio lignosolfonato $\geq 60\%$	Sodio lignosolfonato $\geq 33\%$	Acqua $\leq 10\%$
DP-29553		
???		
Leonardite		
Carbonio Organico $\geq 30\%$ *percentuale su peso secco	Azoto totale $\geq 0,5\%$ *percentuale su materia organica	Acqua $\leq 10\%$

Foto 3.6: I cinque prodotti testati, sostanze umiche ad azione biostimolante.



3.2.2. Design Sperimentale

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando i prodotti in due diverse dosi: 2 mg/L, 4 mg/L. Ogni trattamento è stato eseguito in triplicato, inoltre è stato effettuato un test di controllo in quadruplicato senza alcun trattamento (NT, *not treated*).

La germinazione è stata effettuata in 20 scatole contenenti terne di semi in carta pieghettata con acqua distillata (senza nessun trattamento) per un totale di 150 semi a scatola (3000 semi complessivi), il tutto precedentemente disinfettato con alcool al 90% (semi compresi). La germinazione è stata condotta in cella climatica con una temperatura media di 23°C e un'escursione di 3°C tra il giorno e la notte.

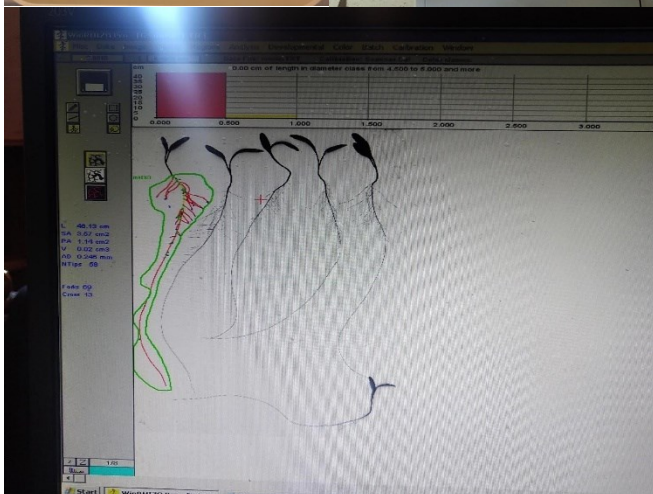
Dopo 48 ore, i semi germinati sono stati trapiantati in 36 becker contenenti 30 piante ciascuno (1080 piante complessive) per la coltivazione idroponica. Ogni becker è stato riempito con 490 mL di soluzione *Hoagland* (Hoagland e Arnon, 1938) ed è stato mantenuto in cella climatica con una temperatura media di 23°C e un'escursione di 3°C tra il giorno e la notte. Il trattamento è avvenuto dopo quattro giorni dal trapianto con l'aggiunta in soluzione dei prodotti ad azione biostimolante.

Foto 3.7: Le piante germinate e trapiantate in 36 becker, ciascuno contenente 30 piante.



Dopo 48 ore dal trattamento è stata effettuata la scansione delle piante con lo scanner WinRHIZO e la successiva analisi delle immagini con il programma RhizoScan. Diversi parametri sono stati analizzati: lunghezza delle radici (cm), numerosità degli apici (n), lunghezza delle radichette (cm) con diametro compreso tra 0 e 0,5 cm.

Foto 3.8: Estrazione, scansione e analisi parametri con scanner WinRHIZO e programma RhizoScan.



L'analisi statistica dei dati è stata condotta con il programma R (versione: R-4.1.0) calcolando la media dei valori ottenuti da ogni test e i relativi tassi di incremento rispetto ai test di controllo. Per ogni parametro analizzato sono stati sviluppati dei grafici descrittivi ed è stata valutata la significatività statistica tramite t-test.

4. RISULTATI

4.1. Germinazione

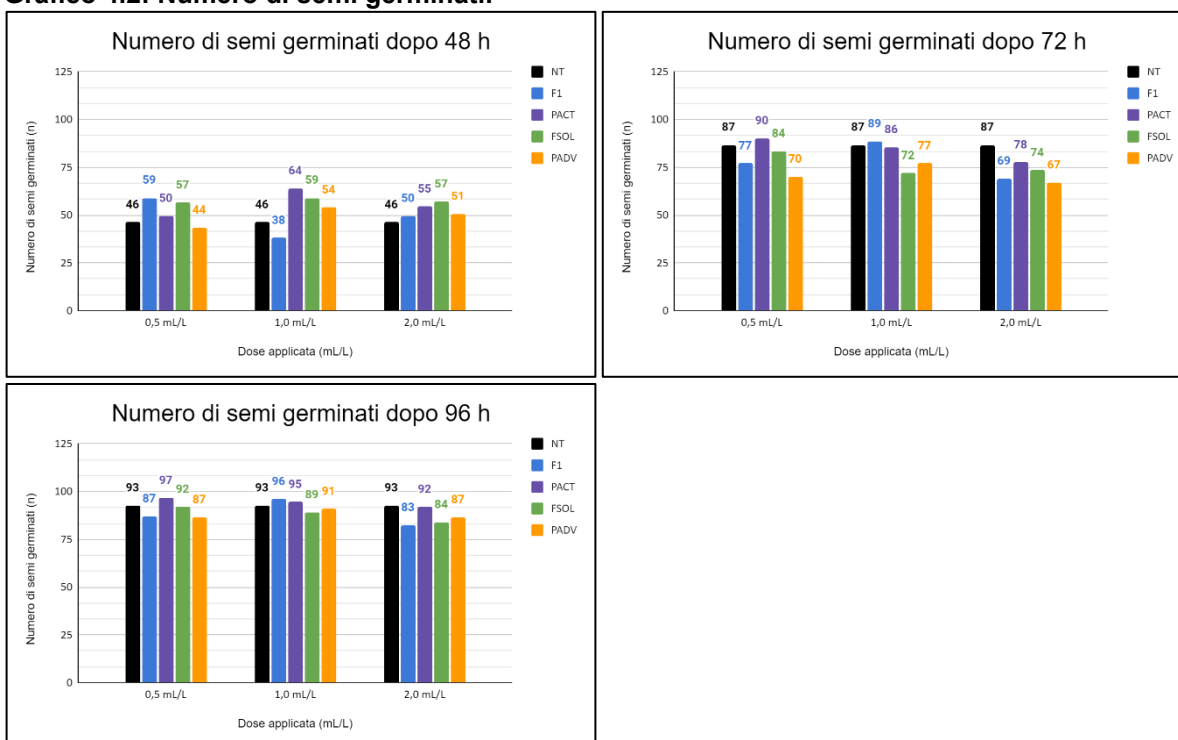
4.1.1. Tasso di germinazione

Tabella 4.1: Tasso di germinazione.

	MEDIE			TASSI DI INCREMENTO		
	DOPO 48 H	DOPO 72 H	DOPO 96 H (72H-48H)/48H	(96H-48H)/48H	(96H-72H)/72H	
NT	46,33	86,67	92,67	87,05%	100,00%	6,92%
0.5 mL/L	43,50	70,00	86,50	60,92%	98,85%	23,57%
PADV 1 mL/L	54,00	77,00	91,00	42,59%	68,52%	18,18%
2 mL/L	50,50	67,00	86,50	32,67%	71,29%	29,10%
0.5 mL/L	59,00	77,00	87,00	30,51%	47,46%	12,99%
F1 1 mL/L	38,00	88,50	96,00	132,89%	152,63%	8,47%
2 mL/L	49,50	69,00	82,50	39,39%	66,67%	19,57%
0.5 mL/L	49,50	90,00	96,50	81,82%	94,95%	7,22%
PACT 1 mL/L	64,00	85,50	94,50	33,59%	47,66%	10,53%
2 mL/L	54,50	77,50	92,00	42,20%	68,81%	18,71%
0.5 mL/L	56,50	83,50	92,00	47,79%	62,83%	10,18%
FSOL 1 mL/L	59,00	72,00	89,00	22,03%	50,85%	23,61%
2 mL/L	57,00	73,50	84,00	28,95%	47,37%	14,29%

*quanti semi sono germinati dopo 48, 72 e 96 ore

Grafico 4.2: Numero di semi germinati.



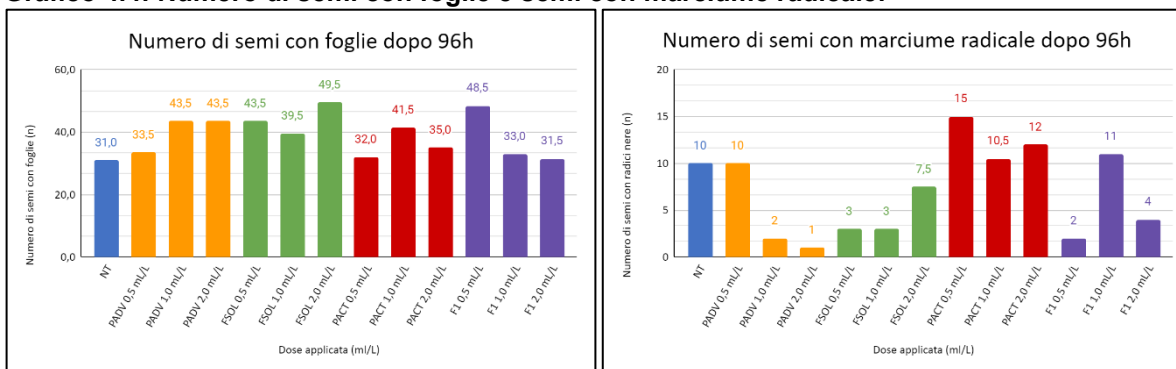
Tutti i prodotti utilizzati, sia nelle prime 48 ore, sia tra le 72 e le 96 ore hanno evidenziato un effetto positivo sulla germinazione. Il livello di incremento è variabile in base a prodotti e concentrazioni, anche se non in modo significativo. In particolare, i risultati migliori sono stati riscontrati nei semi trattati con Pro-Active e Force-Sol a basse concentrazioni.

4.1.2. Presenza di Foglie e Marciume radicale

Tabella 4.3: Numero di semi con foglie e semi con marciume radicale.

*medie dei campioni (n)		FOGLIE	MARCUME RADICALE
NT		31,0	10,0
PADV	0,5 mL/L	33,5	10,0
	1 mL/L	43,5	2,0
	2 mL/L	43,5	1,0
F1	0,5 mL/L	48,5	2,0
	1 mL/L	33,0	11,0
	2 mL/L	31,5	4,0
PACT	0,5 mL/L	32,0	15,0
	1 mL/L	41,5	10,5
	2 mL/L	35,0	12,0
FSOL	0,5 mL/L	43,5	3,0
	1 mL/L	39,5	3,0
	2 mL/L	49,5	7,5

Grafico 4.4: Numero di semi con foglie e semi con marciume radicale.



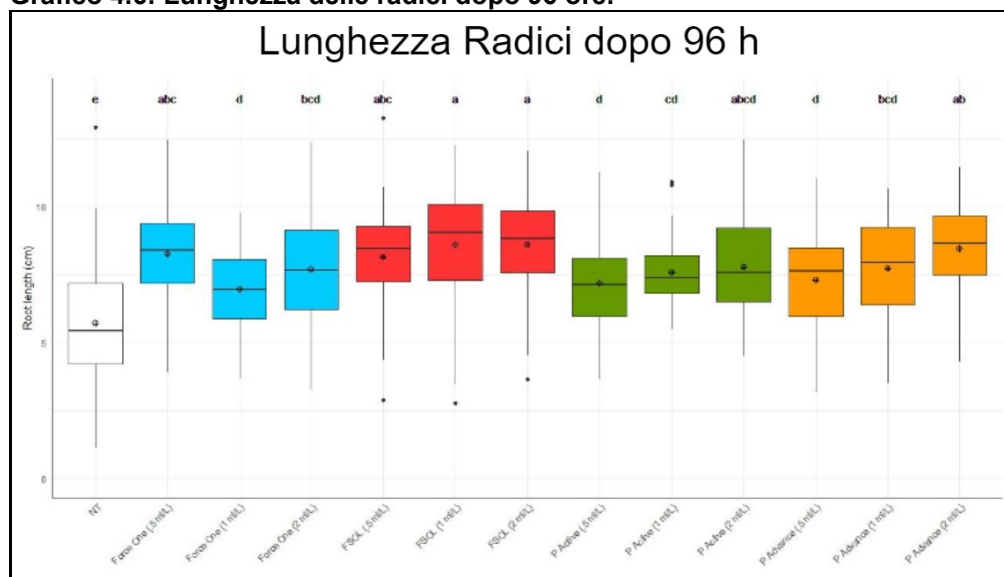
Per quanto riguarda il numero di semi con foglie, gli effetti dovuti ai diversi trattamenti sono stati positivi, seppur con vari livelli di incrementi, mentre, diversamente, i risultati dei semi con marciume radicale dimostrano effetti eterogenei, in particolare i campioni trattati con il prodotto Pro-Active hanno presentato valori peggiori rispetto ai test non trattati. In entrambe le valutazioni le prestazioni più promettenti si registrano nei semi trattati con i prodotti Force-Sol e Pro-Advance, in particolare per quest'ultimo l'aumento del dosaggio da 0,5 mL/L a 1,0 mL/L ha portato un incremento positivo significativo.

4.1.3. Lunghezza radici (cm)

Tabella 4.5: Incremento percentuale della lunghezza delle radici

PADV	0,5 mL/L	37,50%
	1 mL/L	39,29%
	2 mL/L	48,21%
F1	0,5 mL/L	44,64%
	1 mL/L	26,79%
	2 mL/L	35,71%
PACT	0,5 mL/L	28,57%
	1 mL/L	32,14%
	2 mL/L	35,71%
FSOL	0,5 mL/L	46,43%
	1 mL/L	55,36%
	2 mL/L	51,79%

Grafico 4.6: Lunghezza delle radici dopo 96 ore.



I risultati ottenuti hanno mostrato una crescita a livello radicale decisamente maggiore nelle piante trattate, determinando in tutti i test una differenza positiva superiore al 25% rispetto ai campioni non trattati.

Anche in questa valutazione i prodotti più promettenti sono stati Pro-Active e Force-Sol, specialmente con dosaggi di 1,0 mL/L e 2,0 mL/L arrivando fino a radici con dimensioni pari al 150% rispetto alle radici dei semi non trattati.

4.1.4. Tabella dei Risultati

Tabella 4.7: Risultati complessivi della germinazione.

		Media Germinati dopo 48h (n)	Media Lunghezza Radici (cm)	Media Semi con Foglie (n)	Δ Media Germinati dopo 48h	Δ Media Lunghezza Radici	Δ Media Semi con Foglie
NT		46,33	5,6	31,0	-	-	-
Force-One (F1)	0,5 mL/L	43,50	8,1	33,5	-6,12%	+44,64%	+8,06%
	1 mL/L	54,00	7,1	43,5	+16,55%	+26,79%	+40,32%
	2 mL/L	50,50	7,6	43,5	+8,99%	+35,71%	+40,32%
Pro-Advance (PADV)	0,5 mL/L	59,00	7,7	43,5	+27,34%	+37,50%	+40,32%
	1 mL/L	38,00	7,8	39,5	-17,99%	+39,29%	+27,42%
	2 mL/L	49,50	8,3	49,5	+6,83%	+48,21%	+59,68%
Pro-Action (PACT)	0,5 mL/L	49,50	7,2	32,0	+6,83%	+28,57%	+3,23%
	1 mL/L	64,00	7,4	41,5	+38,13%	+32,14%	+33,87%
	2 mL/L	54,50	7,6	35,0	+17,63%	+35,71%	+12,90%
Force-Sol (FSOL)	0,5 mL/L	56,50	8,2	48,5	+21,94%	+46,43%	+56,45%
	1 mL/L	59,00	8,7	33,0	+27,34%	+55,36%	+6,45%
	2 mL/L	57,00	8,5	31,5	+23,02%	+51,79%	+1,61%

Nella Tabella 4.7 sono riportate le medie dei parametri considerati e la differenza percentuale tra i risultati dei semi non trattati e le performance ottenute dai trattamenti con i diversi prodotti.

Gli incrementi superiori al 30% sono marcati in rosso perché tali effetti positivi sono considerati un valido miglioramento agronomico.

4.2. Coltivazione Idroponica

4.2.1. Lunghezza radici (cm)

Grafico 4.8: Analisi della distribuzione per Lunghezza radici (cm).

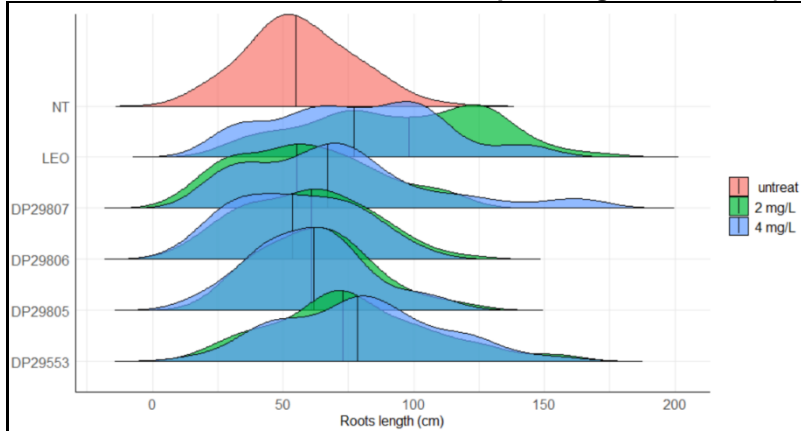


Grafico 4.9: Statistica descrittiva per Lunghezza radici (cm).

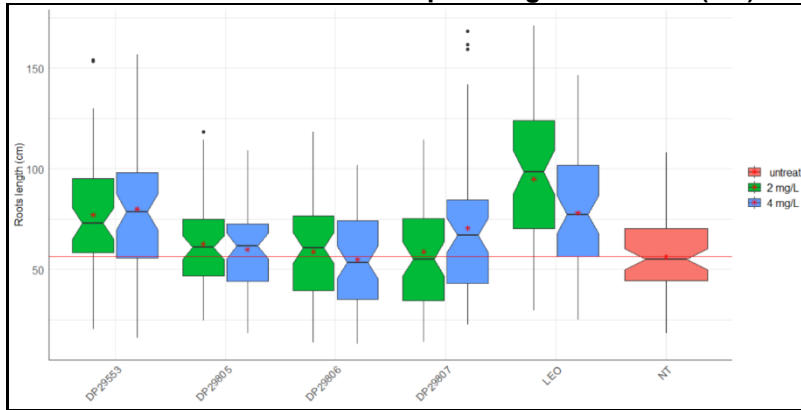


Grafico 4.10: Barplot per Lunghezza radici (cm).

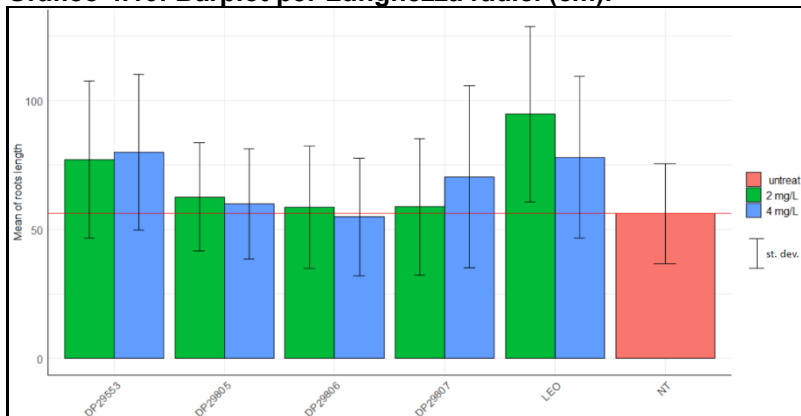


Tabella 4.11: Risultati t-test per Lunghezza radici (cm).

		t-test		
		comparison	p-value	significance
DP29553	2 mg/L vs 4 mg/L		0,612	
	2 mg/L vs NT		3,44E-05	***
	4 mg/Lvs NT		2,72E-06	***
DP29805	2 mg/L vs 4 mg/L		0,502	
	2 mg/L vs NT		0,08684	
	4 mg/Lvs NT		0,3445	
DP29806	2 mg/L vs 4 mg/L		0,372	
	2 mg/L vs NT		0,5291	
	4 mg/Lvs NT		0,7326	
DP29807	2 mg/L vs 4 mg/L		0,0471	*
	2 mg/L vs NT		0,5548	
	4 mg/Lvs NT		0,00862	**
LEO	2 mg/L vs 4 mg/L		0,006	**
	2 mg/L vs NT		2,74E-11	***
	4 mg/Lvs NT		1,36E-05	***

Per quanto riguarda la lunghezza delle radici, è stato fatto un t-test (Tabella 4.11) sui risultati per verificare la presenza di differenze significative tra i semi trattati e non, inoltre è stata considerata la presenza di un eventuale effetto dosaggio.

I prodotti DP29553 e Leonardite ad entrambi i dosaggi hanno evidenziato incrementi significativi, mentre il prodotto DP29807 ha determinato incrementi significativi meno intensi e manifestati solo alla dose più alta di 4 mg/L. Inoltre, è stato rilevato un effetto dosaggio statisticamente rilevante con i trattamenti a base di DP29807 e Leonardite.

Diversamente, i prodotti DP29805 e DP29806 hanno dimostrato prestazioni non lontane da quelle dei campioni non trattati.

4.2.2. Numero di apici (n)

Grafico 4.12: Analisi della distribuzione per Numero di apici (n).

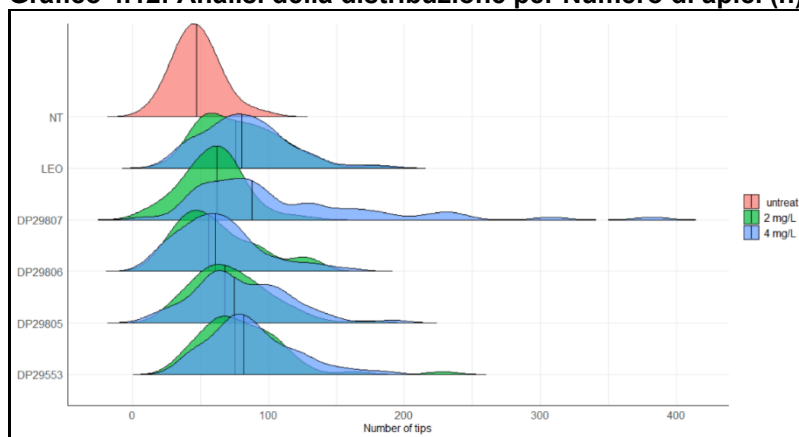


Grafico 4.13: Statistica descrittiva per Numero di apici (n).

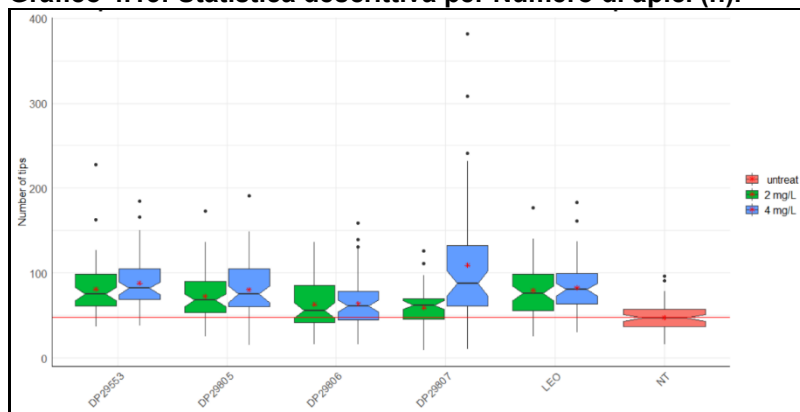


Grafico 4.14: Barplot per Numero di apici (n).

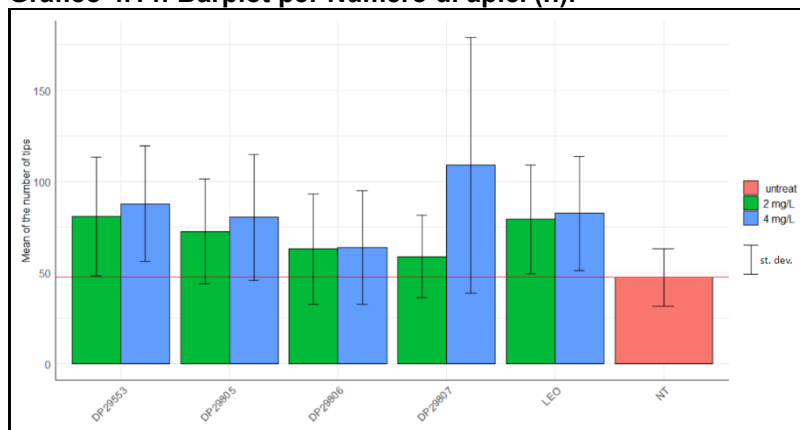


Tabella 4.15: Risultati t-test per Numero di apici (n).

t-test			
	comparison	p-value	significance
DP29553	2 mg/L vs 4 mg/L	0,2497	
	2 mg/L vs NT	1,020E-09	***
	4 mg/Lvs NT	6,248E-13	***
DP29805	2 mg/L vs 4 mg/L	0,1996	
	2 mg/L vs NT	4,287E-08	***
	4 mg/Lvs NT	1,705E-08	***
DP29806	2 mg/L vs 4 mg/L	0,8705	
	2 mg/L vs NT	8,326E-04	***
	4 mg/Lvs NT	5,299E-04	***
DP29807	2 mg/L vs 4 mg/L	2,580E-06	***
	2 mg/L vs NT	1,873E-03	***
	4 mg/Lvs NT	1,795E-08	***
LEO	2 mg/L vs 4 mg/L	0,5567	
	2 mg/L vs NT	1,569E-10	***
	4 mg/Lvs NT	1,443E-11	***

Per quanto riguarda il numero di apici, è stato fatto un t-test (Tabella 4.15) sui risultati delle osservazioni per verificare la presenza di differenze significative tra le piante trattati e non trattati e la verifica di un eventuale effetto dosaggio.

Una differenza fortemente significativa rispetto alle piante controllo risulta dal trattamento con entrambe le dosi di tutti i prodotti, particolarmente marcata nei campioni trattati con Leonardite. Anche il prodotto DP29807 determina una differenza significativa anche se meno marcata e solo alla dose più alta di 4 mg/L. Inoltre, è stato rilevato un effetto dosaggio statisticamente significativo nel trattamento con DP29807.

4.2.3. Lunghezza radichette (cm)

Grafico 4.16: Analisi della distribuzione per Lunghezza radichette (cm).

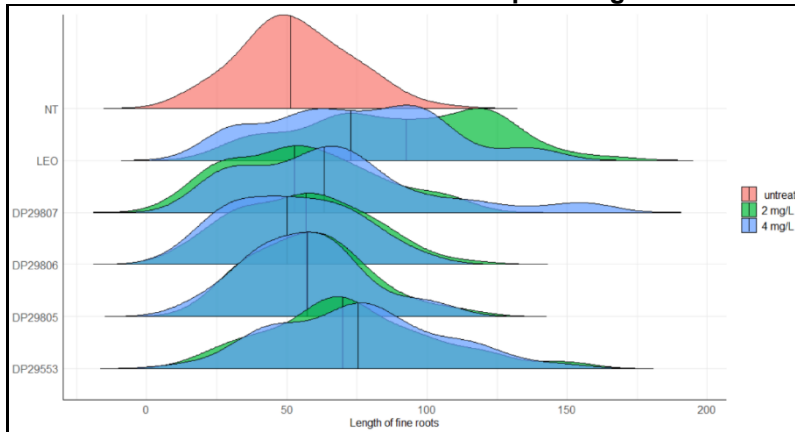


Grafico 4.17: Statistica descrittiva per Lunghezza radichette (cm).

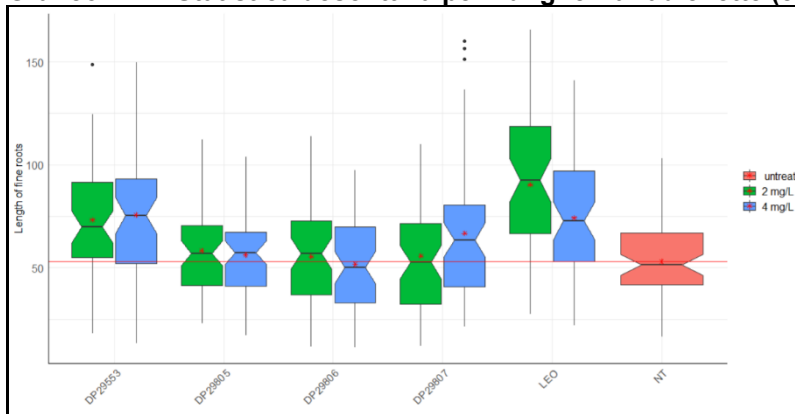


Grafico 4.18: Barplot per Lunghezza radichette (cm).

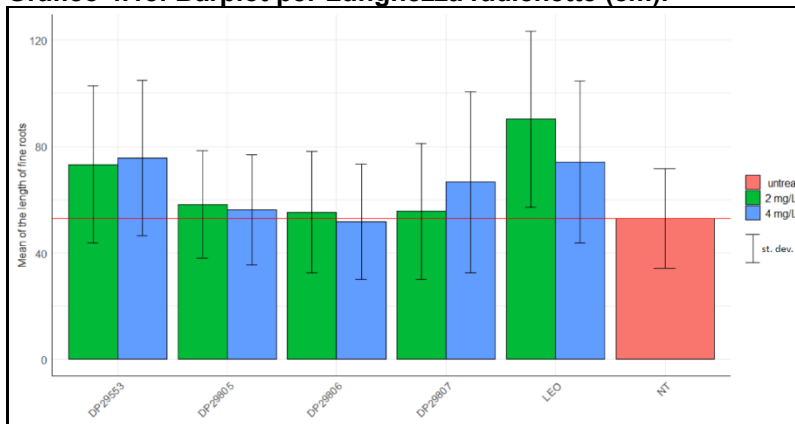


Tabella 4.19: Risultati t-test per Lunghezza radichette (cm).

		t-test		
		comparison	p-value	significance
DP29553		2 mg/L vs 4 mg/L	0,6685	
		2 mg/L vs NT	3,250E-05	***
		4 mg/Lvs NT	3,468E-06	***
DP29805		2 mg/L vs 4 mg/L	0,5984	
		2 mg/L vs NT	0,1392	
		4 mg/Lvs NT	0,3842	
DP29806		2 mg/L vs 4 mg/L	0,3757	
		2 mg/L vs NT	0,5449	
		4 mg/Lvs NT	0,7212	
DP29807		2 mg/L vs 4 mg/L	0,0530	
		2 mg/L vs NT	0,5246	
		4 mg/Lvs NT	0,0091	**
LEO		2 mg/L vs 4 mg/L	0,0067	**
		2 mg/L vs NT	3,264E-11	***
		4 mg/Lvs NT	1,360E-05	***

Per quanto riguarda la lunghezza delle radichette, è stato fatto un t-test (Tabella 4.19) sui risultati delle osservazioni per verificare la presenza di differenze significative rispetto ai campioni non trattati e di un eventuale effetto dosaggio.

Una differenza fortemente significativa risulta nelle piante trattate con entrambi i dosaggi dei prodotti DP29553 e Leonardite. Anche DP29807 determina una differenza significativa rispetto al controllo, anche se meno marcata, e solo alla dose più alta di 4 mg/L. Inoltre, è stato rilevato un effetto dosaggio statisticamente rilevante nei campioni trattati con Leonardite.

Diversamente, i prodotti DP29805 e DP29806 non hanno determinato effetti di stimolazione, presentando dati simili a quelli del controllo.

4.2.4. Tabella dei Risultati

Tabella 4.20: Risultati complessivi della coltivazione idroponica.

		Media Lunghezza Radici (cm)	Media Numero di Apici (n)	Media Lunghezza Radichette (cm)	Δ Media Lunghezza Radici	Δ Media Numero di Apici	Δ Media Lunghezza Radichette
NT		56,242	47,492	52,995	-	-	-
DP29553	2 mg/L	77,050	80,893	73,262	+37,00%	+70,33%	+38,24%
	4 mg/L	79,958	87,929	75,644	+42,17%	+85,15%	+42,74%
DP29805	2 mg/L	62,588	72,672	58,277	+11,28%	+53,02%	+9,97%
	4 mg/L	59,911	80,434	56,250	+6,52%	+69,36%	+6,14%
DP29806	2 mg/L	58,765	63,034	55,336	+4,49%	+32,73%	+4,42%
	4 mg/L	54,906	63,966	51,658	-2,38%	+34,69%	-2,52%
DP29807	2 mg/L	58,788	59	55,640	+4,53%	+24,23%	+4,99%
	4 mg/L	70,487	109,088	66,639	+25,33%	+129,70%	+25,74%
Leonardite	2 mg/L	94,781	79,424	90,305	+68,52%	+67,24%	+70,40%
	4 mg/L	78,021	82,733	74,185	+38,72%	+74,21%	+39,98%

Nella Tabella 4.20 sono riportate le medie dei parametri considerati e la differenza percentuale tra i risultati dei campioni non trattati e le performance ottenute dai trattamenti con i diversi prodotti.

Gli incrementi superiori al 30% sono marcati in rosso perché tali effetti positivi sono considerati un valido miglioramento agronomico (notare che le percentuali di DP29807 non

sono completamente affidabili in quanto i dati ottenuti presentano forti *outliers* specialmente sul numero di apici a 4 mg/L, come si può vedere dai grafici precedenti. Lo sfondo giallo contrassegna i valori statisticamente significativi rispetto al t-test effettuato.

I risultati ottenuti dai test sulla germinazione mostrano che i prodotti hanno effetti positivi apprezzabili in tutte le condizioni sulla lunghezza delle radici e in alcuni casi anche sul numero di semi con foglie. Per quanto riguarda il tasso di germinazione le prestazioni sono comparabili con quelle dei campioni non trattati (addirittura leggermente inferiori negli incrementi tra le 48 e le 96 ore, ad esclusione di Pro-Action a 1 mL/L). Force-Sol e Pro-Advance hanno prodotto un incremento nella lunghezza delle radici superiore al 30% (considerato un valido miglioramento agronomico) rispetto ai non trattati a tutte le dosi, con valori non troppo distanti tra loro e un effetto dosaggio scarso o assente.

Nei prodotti testati in coltivazione idroponica, si è riscontrato un basso livello di eterogeneità tra i campioni trattati. Nonostante alcuni test mostrassero una bassa significatività statistica, tutte le sostanze umiche hanno dimostrato di indurre un incremento alla lunghezza media delle radici e, specialmente, al numero medio di apici, quest'ultimo ha infatti registrato in tutti i casi una differenza positiva superiore al 30% rispetto ai campioni non trattati (con la sola esclusione di DP29807 a 2 mg/L). DP29553 e Leonardite hanno prodotto i migliori risultati (tra loro comparabili) in tutti i parametri considerati con incrementi sempre superiori al 30% con entrambi i dosaggi e tutti statisticamente significativi. Differentemente, DP29805, DP29806 e DP29807 hanno evidenziato un rapporto incrementale positivo per il numero di apici, suggerendo di poter lavorare meglio a dosi maggiori.

L'effetto positivo indotto dall'applicazione delle diverse sostanze umiche sulla germinazione dei semi, sulla crescita delle plantule e sullo sviluppo dell'apparato radicale può essere attribuito al loro contenuto di fitormoni e/o alla presenza di molecole ad attività ormonosimile di tipo auxinico, gibberellinico e citochinico (dati non presentati). Grazie a queste caratteristiche, le sostanze umiche sono in grado di stimolare la crescita delle piante e diverse attività enzimatiche del metabolismo primario e secondario.

5. CONCLUSIONI

Nel complesso, i risultati ottenuti dalla sperimentazione hanno dimostrato che le sostanze umiche sono in grado di stimolare la germinazione dei semi e la crescita delle plantule. In particolare, la loro azione si esplica a livello radicale, dove inducono dei cambiamenti alla morfologia delle radici causando un aumento sia degli apici che della lunghezza delle radici. L'effetto è diverso in relazione alle dosi di sostanza umica utilizzata. Anche i prodotti utilizzati a dose basse hanno indotto una stimolazione dei parametri morfo-fisiologici delle plantule trattate rispetto alle piante non trattate.

I prossimi step necessari alla completa valutazione saranno: replicare l'esperimento per confermare i risultati, testare diversi dosaggi, e valutare l'efficacia di questi prodotti su altre specie e in diverse condizioni ambientali.

6. BIBLIOGRAFIA

- A. C. Santacruz-García, M. G. Senilliani, A. T. Gomez, M. Ewens, M. E. Yonny, G. F. Villalba, M. A. Nazareno, 2022; Biostimulants as forest protection agents: Do these products have an effect against abiotic stress on a forest native species? Aspects to elucidate their action mechanisms.
- A. E. Fadji, O. O. Babalola, G. Santoyo, M. Perazzolli, 2022; The Potential Role of Microbial Biostimulants in the Amelioration of Climate Change-Associated Abiotic Stresses on Crops.
- A. Nikbakht, M. Kafi, M. Babalar, Y. P. Xia, A. Luo, N. A. Etemadi, 2008; Effect of humic acid on plant growth, nutrient uptake, and postharvest life of gerbera.
- Al. Pardo-García, AM. Martinez-Gil, E. Cadahia, F. Pardo, GL. Alonso, MR. Salinaa, 2014; Oak extract application to grapevines as a plant biostimulant to increase wine polyphenols.
- Alharby, H.F., Al-Zahrani, H.S., Hakeem, K.R., Alsamadany, H., Desoky, E.S.M., Rady, M.M., 2021; Silymarin-enriched biostimulant foliar application minimizes the toxicity of cadmium in maize by suppressing oxidative stress and elevating antioxidant gene expression.
- Atiyeh R.M., Lee S., Edwards C.A., Arancon N.Q., Metzger J.D., 2002; The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth.
- B. De Lucia, L. Vecchietti, 2012; Type of biostimulant and application method effects on stem quality and root system growth in LA Lily.
- Banzato D., 2019; Fertilizzanti, le nuove norme per il mercato europeo.
- Biostimolanti Conference, Catania, 1-3 marzo 2023,
- Briamonte L., Pergamo R., Istituto Nazionale di Economia Agraria 2010; I metodi di produzione sostenibile nel sistema agroalimentare.
- Corrado M., 2021; Che differenza c'è tra agricoltura sostenibile e agricoltura biologica.
- Du Jardin, P., 2012; The science of plant biostimulants- a bibliographic analysis.
- E. Kunicki, A. Grabowska, A. Sekara, R. Wojciechowska, 2010; The effects of cultivar type, time of cultivation, and biostimulant treatment on the yield of spinach (*Spinacia oleracea* L.).
- EGS360, 2021; Agricoltura sostenibile, cos'è e come funziona.
- FAO report, 2022; Forest and landscape restoration has huge potential to tackle climate change.
- FAO, 2018; Alimentazione e agricoltura sostenibili.
- Ferrini, F., F. P. Nicese, 2002; Response of English Oak (*Quercus robur* L.) Tress to Biostimulants Application in the Urban Environment.
- Fraser, A. Gillian, C. G. Percival, 2003; The Influence of Biostimulants on Growth and Vitality of Three Urban Tree Species Following Transplanting.
- G. Colla, Y. Rouphael, 2019; Biostimolanti per un'agricoltura sostenibile.
- G. Colla, Y. Rouphael, L. Lucini, M. Cardarelli, 2015; Biostimolanti, cosa sono e come agiscono.
- G. Fascella, M. M. Mammano, P. Maggiore, 2015; Composti umo-simili ottenuti da biomasse residuali della filiera del biogas come biostimolanti per il miglioramento della qualità delle piante ornamentali.

- G. L. Kauffman, D. P. Kneivel, T. L. Watschke, 2007; Effects of a Biostimulant on the Heat Tolerance Associated with Photosynthetic Capacity, Membrane Thermostability, and Polyphenol Production of Perennial Ryegrass.
- Gelisio T., 2022; Agricoltura sostenibile: le certificazioni provano davvero la sostenibilità?
- Hoagland, D.R. and Arnon, D.I. (1938) The water culture method for growing plants without soil.
- Image Line Network, 2023; Biostimolanti: ritorno economico, effetti ambientali e criticità normative.
- Kelting, P. Matthew, J. R. Harris, B. L. Appleton, A. X. Niemiera, 1997; Effects of Soil Amendments and Biostimulants on the Post-Transplant Growth of Landscape Trees.
- L. P. Canellas, N. O. Canellas, L.E.S.D.S. Irineue, F. L. Olivares, A. Piccolo, 2020; Plant chemical priming by humic acids.
- Lasorella V., 2021; Nuovo Regolamento Europeo dei Fertilizzanti: ecco come funziona.
- M. L. Bartucca, M. Cerri, D. Del Buono, C. Forni, 2022; Use of Biostimulants as a New Approach for the Improvement of Phytoremediation Performance - A Review.
- M. Schiavon, D. Pizzeghello, A. Muscolo, S. Vaccaro, O. Francioso, S. Nardi, 2010; High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays L.*).
- MarketsandMarkets, 2019; Biostimulants for Crops from Seed Germination to Plant Development.
- MM. Abdalla, 2013; The potential of Moringa oleifera extract as a biostimulants in enhancing the growth, biochemical and hormonal contents in rocket (*Eruca vesicaria subsp. sativa*) plants.
- Nardi, S., Concheri, G., Pizzeghello, D., Sturaro, A., Rella, R., Parvoli, G., 2000; Soil organic matter mobilization by root exudates.
- Ozyhar, T., Mughini, G., Marchi, M. 2020; Influence of biostimulant application in containerized *Eucalyptus globulus Labill* seedlings after transplanting.
- Paolo Vernieri, Antonio Ferrante, Eva Borghesi, Sergio Mugnai, 2006; I biostimolanti: uno strumento per migliorare la qualità delle produzioni.
- R. Bulgari, G. Cocetta, A. Trivellini, L. Martinetti, A. Ferrante, 2015; Prodotti biostimolanti ed effetti sulle colture ortofloricole.
- S. De Felice, 1989; The Nutraceutical revolution: fueling a powerful.
- S. R. Hamedani, Y. Rouphael, G. Colla, A. Colantoni, M. Cardarelli, 2020; Biostimulants as a Tool for Improving Environmental Sustainability of Greenhouse Vegetable Crops.
- S. W. Mattner, D. Wite, D. A. Riches, I. J. Porter, T. Arioli, 2013; The effect of kelp extract on seedling establishment of broccoli on contrasting soil types in southern Victoria, Australia.
- Soliman, A. S., Shanan, N. T. 2017; The role of natural exogenous foliar applications in alleviating salinity stress in *Lagerstroemia indica L.* seedlings.
- Tweddell, R. J., Pelerin, S. and Chabot, R. 2000; A two-year field study of a commercial biostimulant applied on maize as seed coating.
- United Nations Conference on Environment and Development, Rio de Janeiro, Brazil, 3-14 June 1992.
- Xunzhong Zhang, R. E. Schmidt, 2000; Hormone-Containing Products' Impact on Antioxidant Status of Tall Fescue and Creeping Bentgrass Subjected to Drought.