



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti  
Risorse naturali e Ambiente

Corso di laurea in SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

Biostimolanti, strumento sinergico nella concimazione delle  
specie orticole: applicazioni su lattuga

Relatore  
Prof. Carlo Nicoletto

Laureando: Michele Salvador  
Matricola: n. 2006363

ANNO ACCADEMICO 2022/23



## SOMMARIO

RIASSUNTO .....	5
ABSTRACT .....	7
1 L'INTENSIFICAZIONE AGRICOLA .....	9
2 FERTILIZZANTI MINERALI.....	11
2.1 AZOTO.....	11
2.1.1 IMPATTO AMBIENTALE.....	12
2.2 FOSFORO .....	12
2.3 POTASSIO .....	14
3 POSSIBILE SOLUZIONE.....	15
4 BIOSTIMOLANTI.....	16
4.1 SOSTANZE UMICHE.....	18
4.2 IDROLIZZATI PROTEICI E ALTRI COMPOSTI CONTENENTI N .....	18
4.3 CHITOSANO E ALTRI BIOPOLIMERI .....	19
4.4 ESTRATTI DI ALGHE .....	20
4.4.1 ALGA BRUNA.....	20
4.5 MICRORGANISMI.....	21
4.5.1 FUNGHI BENEFICI.....	21
4.5.1.1 TRICHODERMA spp. ....	22
4.5.2 BATTERI BENEFICI.....	23
4.5.2.1 BACILLUS spp.....	24
4.5.2.2 PSEUDOMONAS FLUORESCENS .....	25
5 SCOPO DEL LAVORO .....	27
6 MATERIALI E METODI .....	29
6.1 MATERIALI .....	29
6.2.1 INOCULO GERMINAZIONE .....	30

6.2.2 SVILUPPO PIANTINE .....	30
6.2.3 ESPIANTO E ANALISI.....	31
6.2.3.1 INDICE SPAD .....	31
6.2.3.2 NUMERO DI FOGLIE .....	32
6.2.3.3 LUNGHEZZA APPARATO RADICALE E AEREO .....	33
6.2.3.4 PESO FRESCO.....	33
6.2.3.5 PESO SECCO.....	33
6.2.3.6 ANALISI STATISTICA .....	33
7 RISULTATI .....	35
8 DISCUSSIONE.....	39
9 CONCLUSIONI .....	43
BIBLIOGRAFIA.....	45
RINGRAZIAMENTI.....	57

## RIASSUNTO

Ogni anno, circa 800 milioni di persone soffrono la fame, sia in forma cronica che temporanea. Nei prossimi 50 anni, dovremo affrontare la sfida di nutrire non solo la popolazione attuale, ma anche ulteriori 3,5 miliardi di persone. Questo compito richiederà uno sviluppo agricolo dinamico per alleviare la povertà e migliorare la salute umana. Tuttavia, questo sviluppo deve essere diverso da quello avvenuto durante la Rivoluzione Verde, sebbene questa sia stata una vera e propria rivoluzione per la sua epoca. La Rivoluzione Verde ha notevolmente aumentato le rese agricole, contribuendo parzialmente a ridurre il problema della fame nel mondo, che è sceso dal 60% nel 1960 al 17% nel 2000 in 40 anni. Tuttavia, ha comportato l'uso massiccio di fertilizzanti inorganici e pesticidi, causando un lento degrado del suolo e problemi ambientali, soprattutto dovuti all'eccessivo utilizzo di fertilizzanti azotati. L'uso crescente di fertilizzanti ha portato a problemi di inquinamento atmosferico, del suolo (con aumenti esponenziali nei tassi di deposizione) e delle acque. Questi problemi ambientali hanno anche avuto un impatto significativo sulla salute umana e sugli ecosistemi, come l'eutrofizzazione causata da nutrienti come l'azoto e il fosforo. È importante notare che le riserve minerali dei nutrienti, soprattutto fosforici, si stanno esaurendo, il che rende necessario un utilizzo più efficiente di tali risorse per motivi ambientali e di disponibilità. Questo problema si estende anche al terzo macronutriente importante per la crescita delle piante, il potassio. Pertanto, è essenziale innovare l'agricoltura in modo sostenibile per affrontare i problemi legati all'approvvigionamento alimentare, alla salute pubblica e all'inquinamento. Una possibile soluzione potrebbe essere l'uso di biostimolanti, sostanze o microrganismi applicati alle piante con l'obiettivo di migliorare l'efficienza nutrizionale, la tolleranza agli stress abiotici e biotici, e la qualità delle colture. Esistono diverse tipologie di biostimolanti, tra cui sostanze umiche, molecole azotate, biopolimeri, estratti di alghe e microrganismi fungini o batterici. Questi prodotti hanno dimostrato di aumentare la tolleranza delle piante allo stress e migliorare la produttività e la qualità delle colture. Grazie alla capacità di queste molecole e microrganismi di rendere più efficiente l'assorbimento dei nutrienti da parte delle piante, è possibile ridurre la quantità di fertilizzanti utilizzati, affrontando così i problemi ambientali precedentemente descritti. In uno studio sperimentale condotto su piante di lattuga, utilizzando un preparato biostimolante contenente ceppi di *Bacillus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma* ed estratti di alga bruna, sono stati ottenuti risultati incoraggianti in termini di contenuto di clorofilla e crescita delle radici, sebbene non sia stato raggiunto l'aumento delle rese atteso. Questo potrebbe essere dovuto a interazioni antagonistiche

tra i vari microrganismi o ad una promozione della crescita radicale con conseguente traslocazione dei nutrienti. In ogni caso, i risultati sono promettenti per la ricerca futura.

## ABSTRACT

Every year, approximately 800 million people suffer from hunger, both in chronic and temporary forms. Over the next 50 years, we will face the challenge of feeding not only the current population but also an additional 3.5 billion people. This task will require dynamic agricultural development to alleviate poverty and improve human health. However, this development must differ from what occurred during the Green Revolution, even though it was a true revolution for its time. The Green Revolution significantly increased agricultural yields, partially contributing to the reduction of global hunger from 60% in 1960 to 17% in 2000 over 40 years. However, it involved the extensive use of inorganic fertilizers and pesticides, leading to a gradual degradation of the soil and environmental problems, primarily due to excessive use of nitrogen-based fertilizers. The increasing use of fertilizers has resulted in issues such as atmospheric and soil pollution (with exponential increases in deposition rates) and water pollution. These environmental problems have had a significant impact on human health and ecosystems, including eutrophication caused by nutrients like nitrogen and phosphorus. It is essential to note that mineral nutrient resources, particularly phosphates, are depleting, necessitating more efficient resource utilization for environmental and availability reasons. This problem also extends to the third important macronutrient for plant growth, potassium.

Therefore, it is crucial to innovate agriculture sustainably to address issues related to food supply, public health, and pollution. One potential solution may be the use of biostimulants, which are substances or microorganisms applied to plants with the goal of enhancing nutritional efficiency, tolerance to abiotic and biotic stress, and crop quality. There are various types of biostimulants, including humic substances, nitrogen-containing molecules, biopolymers, extracts from algae, and fungal or bacterial microorganisms. These products have demonstrated increased plant stress tolerance and improved productivity and crop quality. Thanks to the ability of these molecules and microorganisms to enhance nutrient uptake by plants, it is possible to reduce the quantity of fertilizers used, thereby addressing the previously described environmental problems.

In an experimental study conducted on lettuce plants using a biostimulant preparation containing strains of *Bacillus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma*, and brown algae extracts, encouraging results were obtained in terms of chlorophyll content and root growth, even though the expected increase in yields was not achieved. This could be attributed to antagonistic interactions among

various microorganisms or the promotion of root growth with subsequent nutrient translocation. In any case, the results are promising for future research.



## 1 L'INTENSIFICAZIONE AGRICOLA

L'agricoltura è sempre stata la primaria fonte di sostentamento dell'essere umano. Ma oggi più che mai, l'agricoltura ha un compito fondamentale: produrre sufficiente cibo e in modo sostenibile. Nel passato non ci si era posto il problema della sostenibilità ma, solo dell'aumento della produzione unitaria. Con la rivoluzione verde degli anni '50 e '60 il mondo della ricerca è riuscito a sviluppare pacchetti di cultivar e tecniche di gestione agricola tali per cui nel 1960 i raccolti di grano mondiali erano più che raddoppiati. Infatti, nonostante la crescita di popolazione, la produzione di alimento pro-capite aumentò di circa un quarto, grazie a questo la malnutrizione diminuì di quasi tre quarti (Mann, 1999).

Questo cambiò però con la rivoluzione verde, infatti l'elemento chiave dell'agricoltura portata da questa, è la sua dipendenza da prodotti fitosanitari e fertilizzanti chimici, soprattutto quelli a base di azoto; di fatto l'applicazione di questi dal 1960 è aumentata di 7 volte. Come vista generale nel ciclo dell'azoto, gli input artificiali hanno raggiunto la quantità degli input naturali e stanno impattando tutti gli ecosistemi da quelli acquatici a quelli terrestri; infatti, fino ai due terzi dell'azoto immesso artificialmente, arriva agli ecosistemi naturali andando quindi a modificare gli equilibri di essi. (Tilman, 1998). Questo però non è l'unico problema delle fertilizzazioni di tipo chimico, quando vengono applicati i principi della agricoltura cosiddetta convenzionale, il suolo si impoverisce con il passare degli anni in modo esponenziale, sia di azoto che di carbonio. Per far sì che il terreno di coltivazione riacquisisca gli elementi persi nella sua fase di produzione agricola secondo J. Knops e D. Tilman, sono necessari per lo meno 200 anni di successione naturale. Se invece, si usano pratiche alternative come la somministrazione di letame, questo tempo si può ridurre fino ai 40 anni (Tilman, 1998).

Ci sono quindi due problemi portati dall'avvento dell'intensificazione agricola, uno che riguarda appunto la degradazione della fertilità del suolo e l'altro che riguarda la qualità delle acque. Infatti, i vari nutrienti apportati alle coltivazioni, se in eccesso, possono arrivare fino ai sistemi acquatici tramite i flussi di acqua, superficiali e non, andando quindi a stimolare la crescita di biomassa in modo anormale, non in equilibrio con l'ecosistema circostante. Questo infatti, porta alla creazione di condizioni di anossia o ipossia causate dalla decomposizione della biomassa sviluppatasi (Potter et al., 2010). Un noto esempio di questo problema è presente nella laguna di Venezia, ambiente naturale decisamente complesso e fragile a causa della forte influenza antropica nelle sue vicinanze. Osservando le concentrazioni di Chl-a (indice di produzione algale) nel sistema lagunare veneto si

può dedurre che è un sistema eutrofico (Aslan et al., 2022). Ma l'eutrofizzazione propriamente detta non è l'unico problema che l'utilizzo eccessivo di fertilizzanti azotati ha provocato in questo ecosistema. Infatti, l'aumento della concentrazione soprattutto di azoto può, come conseguenza, modificare la struttura stessa anche delle specie animali, infatti nel caso della specie *Chironomus salinarius* si è visto un forte incremento della densità larvale dovuto, all'aumento di biomassa data dalla crescita anormale della *Ulva lactuca* e dalla ridotta competizione delle altre specie, a causa di una ridotta disponibilità di ossigeno (Ravera, 2000).

Conseguentemente, la gestione non ottimale delle componenti nutrizionali, soprattutto azotate, può determinare esiti ambientali indesiderati che esulano, anche, dalle zone coltivate, e nello stesso tempo quest'ultime stanno rallentando dalla metà degli anni 80 quello che è stato il miglioramento delle rese lasciato dalla rivoluzione verde, lasciando quindi dei dubbi sulla possibilità di riprodurre dei risultati dal punto di vista quantitativo della rivoluzione verde (Pingali, 2012). Lo studio di Burney et al. (2010) però evidenzia anche che gli impatti ambientali avuti nel mondo reale dall'intensificazione agricola sono stati preferibili a quelli di un ipotetico sistema in cui gli input fossero rimasti gli stessi, e fosse aumentata la conversione boschiva a terra coltivata. Questo però non preclude la possibilità di ridurre gli input utilizzati attualmente. Anzi: lavorazioni meno invasive e una gestione più attenta ed efficiente di risorse idriche, nutrienti e residui culturali sono di fondamentale importanza per l'obiettivo di una produzione sostenibile e più alta. Aumentare la produzione agricola, infatti, è di fondamentale importanza per mitigare i contributi del comparto agricolo al cambiamento climatico, e chiaramente per far fronte alle previsioni di aumento della popolazione fino a circa 9 miliardi entro il 2050 e conseguentemente all'aumento di domanda alimentare del 70 % (Burney et al., 2010). Anche se parte di questa potrebbe essere già soddisfatta in quanto un'ingente quantità di cibo non viene consumata ma viene scartata, degradata o consumata da parassiti lungo tutta la filiera. Uno studio della FAO indica che circa un terzo del cibo prodotto non viene mai consumato, altri studi invece riferiscono un dato ancora più alto, addirittura la metà di tutto il cibo coltivato viene sprecato. Nello specifico i paesi in via di sviluppo perdono oltre il 40 % degli alimenti nelle fasi di lavorazione e conservazione, al contrario i paesi industrializzati lo perdono soprattutto nelle fasi di vendita al dettaglio e di consumo. Per questo, la riduzione degli sprechi potrebbe migliorare la fornitura di calorie senza alcun danno ambientale. Sebbene l'eliminazione totale degli sprechi alimentari non siano obiettivi del tutto realistici anche passi incrementali potrebbero essere estremamente vantaggiosi e soprattutto in alimenti che consumano più risorse, in particolare la carne e i latticini (Foley et al., 2011).

L'aumento della resa unitaria, come detto, è in calo e probabilmente non si riuscirà a ripetere i risultati quantitativi della rivoluzione degli anni 60 ma, l'attuale espansione e quindi conversione di terre a favore della agricoltura avviene per lo più in foreste tropicali (quindi più ricche di carbonio di quelle disboscate), il potenziale di emissioni potrebbe essere maggiore e in termini di costi di GtC (Burney et al., 2010). Per questo, anche se esiste ancora una ragionevole disponibilità di terre da convertire, la maggior parte dell'aumento di produzione agricola dovrà provenire da terre già in produzione per far fronte alla sempre crescente domanda di cibo ma anche come fonte alimentare animale e come materia prima industriale (nel caso dell'industria tessile e dei biocombustibili). Tutto questo va affrontato senza perdere di vista e anzi aumentando l'equilibrio tra crescita demografica, produzione alimentare e sostenibilità ambientale (Borlaug, n.d.).

## 2 FERTILIZZANTI MINERALI

### 2.1 AZOTO

"L'ingegno che è stato usato per nutrire una popolazione mondiale in crescita, dovrà essere rapidamente accompagnato da uno sforzo per mantenere il ciclo dell'azoto in un equilibrio ragionevole" (Delwiche, 1970). Questo concetto chiave portato da Delwiche, a proposito dell'aumento dell'uso di fertilizzanti azotati, fa pensare alle conseguenze di questo, ovvero che l'azoto di origine antropica immesso nel ciclo è cresciuto e sta crescendo a dismisura. Tra il 1860 e il 1995 l'azoto prodotto è aumentato di circa 141 Tg N e in 10 anni dopo il 1995 è cresciuto di 31 Tg N. In alcune zone del mondo questo è stato utilizzato per produrre un eccesso di cibo con conseguenza un aumento di diete squilibrate, in altre zone del mondo invece l'azoto non è sufficiente per produrre l'apporto calorico di base per una persona (Galloway et al., 2008). L'eccesso di cibo viene chiaramente esportato, ma con esso viene esportato di conseguenza, anche l'azoto contenuto in esso andando a modificare il ciclo naturale dell'elemento; l'N invece perso nella produzione permane nell'ambiente di origine, e chiaramente parlando di quantità che aumentano di circa 31 volte tra il 1910 e il 1990 per la stessa area in Olanda, per esempio, entra nel ciclo una quantità di elemento devastante per le acque sotterranee, per la volatilizzazione di ammoniaca e per le deposizioni azotate in genere (Erisman et al., 2005). Infatti, se andiamo ad analizzare i tassi di deposizione in ecosistemi naturali a livello globale questi si attestano a circa 0,5 kg N ha<sup>-1</sup> annui, di netto inferiori a quelli in regioni del mondo produttive dove possiamo riscontrare dati di 10 kg N ha<sup>-1</sup>. Dati che peggiorano se ci affidiamo a analisi previsionistiche che calcolano nel 2050, un aumento anche fino ai 50 kg N ha<sup>-1</sup> (Galloway et al., 2004).

### 2.1.1 IMPATTO AMBIENTALE

La forte dipendenza, del sistema agroalimentare dell'Europa occidentale (Garnier et al., 2023) prodotti di sintesi, ha avuto come conseguenza l'aumento degli apporti agricoli di N. Questo innalzamento è stato seguito da grandi perdite di nitrato nei sistemi acquatici, di ammoniaca e ossidi di azoto nell'atmosfera (Galloway et al., 2003). A queste sono imputabili, probabilmente tutti i problemi di tipo ambientale dell'aumento dei fertilizzanti azotati. Due tra i più importanti composti reattivi azotati di origine agricola sono l'ammoniaca e il protossido d'azoto. La perdita di ammoniaca è causata per il 94% dal settore agricolo. Anche se più della metà di questa quota è rappresentata dalla gestione di effluenti zootecnici, quindi non del tutto un tema prettamente agricolo, questi rientrano comunque nella macroarea dei fertilizzanti (EEA, 2013). Importante lo studio di Vergé et al. (2007), l'efficienza dell'azoto usato per la fertilizzazione è di circa il 50 %, il che significa per esempio che per ogni chilo di N da fertilizzante apportato, mezzo chilo è perso per volatilizzazione e lisciviazione. La volatilizzazione di N-NH<sub>3</sub>, nel caso di studio di (Garnier et al., 2023) in Spagna, Francia e Portogallo, varia dai 20 ai 40 kg ha di UAA all'anno (a seconda della coltura e del sistema agronomico utilizzato). Prendendo in considerazione invece le perdite tramite lisciviazione le concentrazioni di nitrati riscontrate vanno dai 15 mg/l ai 50, ben al di sopra della concentrazione consentita per le falde acquifere e l'acqua potabile, ovvero 11,3 mg.

In sintesi, si può dire che, le principali conseguenze atmosferiche sono correlate alle emissioni di NO<sub>x</sub> e NH<sub>3</sub>. L'ammoniaca svolge un ruolo fondamentale negli effetti diretti e indiretti degli aerosol sul forcing radiativo e quindi sul cambiamento climatico globale e infine la deposizione atmosferica di NH<sub>x</sub>, NO<sub>y</sub> (ossidi diversi da N<sub>2</sub>O) e le forme organiche di N possono partecipare all'acidificazione degli ecosistemi, e all'eutrofizzazione.

### 2.2 FOSFORO

Il fosforo è uno degli elementi fondamentali nella nutrizione delle piante. La fertilizzazione con questo elemento anche se è aumentata molto meno rispetto a quella azotata, è destinata a crescere a causa della domanda che è destinata a salire nei prossimi decenni, infatti, il picco produttivo globale è previsto nel 2030 (Cordell et al., 2009). I fertilizzanti a base di fosforo sono prodotti a partire da rocce fosfatiche, ma la qualità di queste sta diminuendo nel tempo, per questo i costi di produzione stanno aumentando, ostacolando l'accesso al fertilizzante ai paesi a basso reddito. Per di più si prevede che le riserve di P esistenti stanno andando in contro all'esaurimento, le stime però

parlano di un tempo che varia dai 40 ai 400 anni (Cordell e White, 2011). Parallelamente alle previsioni di esaurimento, si stima che il fabbisogno globale possa raddoppiare entro il 2050 (Nedelciu et al., 2020) anche a causa di una progressiva perdita di P nel suolo a causa dell'erosione di questo dovuta ai cambiamenti climatici (Alewell et al., 2020). Allo stesso tempo, però, in alcune zone del mondo (Asia orientale, Europa occidentale e USA costieri) si sono sviluppate grandi eccedenze a causa, oltre alla disuguaglianza economica, alla distribuzione ineguale delle fonti estraibili nel mondo; il Marocco, infatti, possiede l'85% delle riserve globali (Obersteiner et al., 2013). Per la stessa causa, si sono sviluppati anche dei deficit, soprattutto in Africa, e in generale nel 30 % delle zone coltivate del mondo (MacDonald et al., 2011). In queste realtà, dell'Africa subsahariana, dell'America latina e dell'Asia centrale gli apporti di P sono generalmente molto bassi (0-5 KG/ha), questa carenza minaccia, la fertilità del suolo e conseguentemente la produzione agricola quindi la sicurezza alimentare di questi luoghi (Cordell e White, 2011). Chiaramente, gestire questo deficit è possibile, si stima infatti, che l'80 % del P applicato alle coltivazioni sovradosate vada perso; se gli attuali volumi dei fertilizzanti fosforici venissero distribuiti in modo più efficiente non ci sarebbero zone con carenze. Per raggiungere una certa sostenibilità dell'utilizzo di questo nutriente, diverse figure dovrebbero contribuire, le società e gli Stati dovrebbero ricercare tecnologie e pratiche per riciclare il P dalla catena alimentare (Penuelas et al., 2023). Anche se si può redistribuire l'elemento e mitigare le carenze, il problema dell'aumento dell'attività estrattiva persiste, infatti dagli anni 40 in poi, la fonte di produzione preponderante è stata la roccia fosfatica naturale (vedi fig.1 (Cordell et al., 2009)). In relazione a questa fonte, appunto, se ne stima l'esaurimento; diversi autori (Fixen, 2009; GPRI Global Phosphorus Research Initiative, 2010; Runge-Metzger, 1995; Smit et al., 2009; Steen, 1998; Tweeten, 1989) sono d'accordo nel calcolare quest'avvenimento dai 61 ai 130 anni (con un solo dato così alto). Per questo, oltre a migliorare l'efficienza d'uso dei fertilizzanti fosforici per placare l'estrazione e redistribuire il nutriente equamente, è necessario provare a avvicinare il bilancio del P a 0, riducendo quindi la dipendenza da fertilizzanti inorganici. Questo si può raggiungere, sfruttando la grande quantità di P sottoutilizzato da effluenti zootecnici, che è attualmente perso dai sistemi agricoli (MacDonald et al., 2011). Ci sono aree del mondo in cui si possono riscontrare situazioni di P relativamente equilibrate e uno schema comune in queste è che meno del 10 % aveva applicazioni di P da fertilizzanti. Per questo, per diminuire l'uso di inorganici, è importante una gestione integrata dei nutrienti e migliorare la loro disponibilità nel suolo. A questo scopo e per conseguire la diminuzione del fenomeno dell'eutrofizzazione (ampiamente trattato nei

capitoli precedenti) a cui il P prende parte in congiunto con l'azoto, oltre a tecniche di agricoltura biologica, esistono diversi approcci sull'aggiunta di inoculanti microbiologici (Roy e Roy, 2006)

### 2.3 POTASSIO

Nella fertilizzazione inorganica il terzo componente fondamentale è il potassio. Anche in questo caso la produzione del fertilizzante viene a partire da riserve estraibili, è facile quindi capire che la situazione nutrizionale ricalchi un po' la situazione del fosforo. Infatti, il suo utilizzo è aumentato costantemente a partire dalla rivoluzione verde e come nel caso precedente ci si imbatte in uno scenario in cui i paesi con più disponibilità economiche tendono a sovradosare l'applicazione, con conseguenti problemi sia ambientali sia per la salute umana. Al contrario paesi con possibilità reddituali minori, come nei casi precedenti, hanno spesso problemi di approvvigionamento dei prodotti fertilizzanti con conseguente peggioramento delle rese. La causa a questo problema dicotomico, va ricercata nella crescente limitazione delle fonti estraibili di K in concomitanza con l'aumento della domanda dovuto all'intensificazione agricola (Sardans e Peñuelas, 2015). È assolutamente urgente l'accesso al K alle regioni più minacciate dall'aumento dell'aridità e dall'incertezza alimentare, il ruolo cruciale che quest'elemento svolge nell'assorbimento e nel trasporto dell'acqua lo rende uno strumento quasi indispensabile per mantenere i livelli di produzione alimentare soddisfacenti in condizioni di deficit idrico. I tassi molto bassi di somministrazione potassica in zone in via di sviluppo, porta a un deterioramento delle riserve potassiche del suolo, questo provoca, tra le altre cose, a sua volta un uso non efficiente degli altri nutrienti (Penuelas et al., 2023)

Attraverso questo breve sunto di quella che è la situazione mondiale dei nutrienti principali e più importanti, capiamo come la situazione sia difficile. È necessario, come nei secoli è successo, rivoluzionare, cambiare traiettoria e adottare quelle orientate a un maggiore raggiungimento di miglioramento e trasferimento tecnologico, le quali soddisferebbero la richiesta di colture, previste per il 2050 con minore impatto rispetto alle attuali tendenze che altro non sono che la continuazione delle traiettorie passate (Tilman et al., 2001). Attualmente esistono divari di resa notevoli, dati del 2005 indicano che esistono divari di resa calorica anche del 308% tra i paesi del gruppo A e rese dei gruppi F e G. Analisi che prendono in considerazione questi dati relazionandoli come conseguenza di effetti del clima e del suolo, suggeriscono che un'intensificazione agricola data da un avanzamento tecnologico e un miglioramento della fertilità del suolo nei paesi a basso reddito, ridurrebbe notevolmente il gap che esiste tra le rese (Lobell et al., 2009).

La domanda alimentare è in continua crescita, e parte delle coltivazioni ha rese al di sotto del loro potenziale e l'attuale strada adottata per l'espansione agricola avrà serie implicazioni per l'ambiente. L'impatto dell'aumento di domanda di prodotti agricoli dipenderà dalla traiettoria che verrà intrapresa. Una che si sviluppa, tra le altre cose, su un uso più efficiente dei nutrienti rappresenta un via di intensificazione agricola più sostenibile in termini ambientali e di sicurezza alimentare (Tilman et al., 2011). Allo stesso tempo la produzione di colture è spesso limitata dalla scarsa fitodisponibilità di elementi minerali essenziali (White e Brown, 2010).

### 3 POSSIBILE SOLUZIONE

Per biostimolante vegetale "si intende qualsiasi sostanza o microrganismo applicato alle piante con l'obiettivo di migliorare l'efficienza nutrizionale, la tolleranza agli stress abiotici e/o i tratti qualitativi delle colture, indipendentemente dal contenuto di nutrienti. Per estensione, i biostimolanti vegetali designano anche prodotti commerciali contenenti miscele di tali sostanze e/o microrganismi" (du Jardin, 2015). I biostimolanti, potrebbero essere la soluzione ad alcuni dei problemi sopracitati. In un caso studio (Colla et al., 2015b), riporta le ampie miglorie che gli inoculi di alcune specie batteriche hanno portato allo sviluppo delle piante di varie specie. In questo caso, per esempio, si è riscontrata, la produzione di siderofori attivi nella fitodisponibilità del ferro e la produzione di composti simili alle auxine (con quindi una stimolazione conseguente della crescita). In generale è stato riscontrato in questo caso studio, composto da quattro esperimenti diversi, che alcune specie batteriche usate come biostimolanti, hanno migliorato notevolmente i parametri di crescita in numerose specie orticole (lattuga, melone, peperone, pomodoro e zuccina) grazie a un maggior assorbimento di elementi principali e in traccia. Oltre ai parametri di crescita, l'utilizzo di questa tipologia di biostimolante, ha anche migliorato i risultati di resa e dei componenti stessi di questa. Questo tipo di miglioramento è stato riscontrato grazie all'effetto di fitostimolazione e al miglioramento dello stato nutrizionale delle piante. Allo stesso tempo però, Yakhin et al. (2017) sottolinea che, il miglioramento della funzione biologica modulata dal biostimolante, non è sempre definito in termini di modalità d'azione esplicita e specifica e per questo suggerisce che la ricerca si concentri sulla prova d'efficacia e sulla sicurezza, con la speranza che lo sviluppo e sperimentazione di questi prodotti possa portare la scoperta di nuove molecole e nuovi fenomeni biologici. Nonostante i meccanismi attivati da questi prodotti siano complessi da individuare e identificare (Paul et al., 2019), vari studi indicano che possono agire in modo diretto su metabolismo e fisiologia delle piante migliorando anche le condizioni del suolo (Bulgari et al., 2015; Caradonia et al., 2019).

Inoltre, modificando alcuni processi molecolari, sono in grado di contrastare gli stress abiotici, e di incrementare l'efficienza d'uso di acqua e nutrienti delle colture, stimolando così la crescita e sviluppo delle piante (Van Oosten et al., 2017) e potenziandone metabolismo primario e secondario (Caradonia et al., 2019).

Sono stati indicati vari effetti positivi, molto importanti per le coltivazioni in generale e d'importanza strategica per l'attività di ricerca futura, importanza che viene ribadita dalla situazione climatica e di sicurezza alimentare di quest'epoca. Per far fronte a questi temi è necessario un modo integrato e sostenibile di produzione agricola. Un report della FAO con titolo "Plant nutrition for food security" (Roy e Roy, 2006), propone tra gli altri approcci l'inoculo microbico per far fronte ai problemi nutrizionali delle colture, infatti i microrganismi possono aumentare la produttività delle colture, grazie al miglioramento dell'assorbimento di macro e micro-nutrienti e della loro solubilizzazione (Calvo et al., 2014). Più in generale i biostimolanti potrebbero essere una delle vie da percorrere promettenti nell'attuale scenario della produzione agricola (Bhupenchandra et al., 2022). Potrebbero essere un modo per preservare l'equilibrio ecologico negli agroecosistemi riducendo l'utilizzo di prodotti fitosanitari e fertilizzanti chimici. La Commissione europea si è posta come obiettivo, entro la fine del 2050, di sostituire il 30% di quest'ultimi con input a base organica (Hansen, 2018). Oltre ad aumentare le rese produttive, (Rajabi Hamedani et al., 2020; Singh et al., 2018) hanno evidenziato anche il grande potenziale di riduzione di emissione di CO<sub>2</sub> nelle coltivazione di canna da zucchero, di zucchine e spinaci.

Dalla bibliografia consultata emerge chiaramente che i biostimolanti possono rappresentare quello strumento di cui abbiamo bisogno per affrontare i problemi riportati. Finora sono stati applicati con successo per:

- migliorare l'efficienza nell'uso di nutrienti e acqua
- aumentare la tolleranza a stress abiotici
- aumentare la resa e qualità delle colture (Bulgari et al., 2019)

## 4 BIOSTIMOLANTI

Nella letteratura si sono susseguite numerose definizioni della parola biostimolante, una delle prime definizioni la danno Tagliavini e Kubiskin (2006) secondo i quali: "Con questo termine si identificano comunemente le formulazioni che supportano la pianta nel miglioramento delle sue prestazioni



senza utilizzare ormoni di sintesi". Ma, il primo a darne una definizione più articolata e scientifica, con poi una classificazione secondo du Jardin (2015) è stato Kauffman et al. (2007), secondo il quale: "I biostimolanti sono materiali, diversi dai fertilizzanti, che promuovono la crescita delle piante quando vengono applicati in basse quantità". Da evidenziare l'espressione "diversa dai fertilizzanti" che rappresenta proprio come, i biostimolanti siano stati definiti prima in base a ciò che non sono, differenziandoli da altre categorie di prodotti utilizzate nelle colture fertilizzanti e prodotti fitosanitari. In un secondo momento si è evidenziato che gli effetti positivi, quali promozione della crescita, modulazione di caratteristiche qualitative e promozione della tolleranza agli stress abiotici, dati dai biostimolanti chimici (con origine naturale o sintetica), possono essere forniti anche da batteri e funghi (du Jardin, 2015). Infatti, la classificazione redatta da Kauffman et al. (2007), presupponendo che i biostimolanti si presentano in moltissime formulazioni diverse, considera solo tre gruppi: sostanze umiche, prodotti contenenti ormoni e prodotti contenenti amminoacidi. Negli anni, poi, il termine biostimolante si è sempre più utilizzato, andando ad aumentare la gamma di sostanza e modalità di azione nella sua definizione (Calvo et al., 2014; Halpern et al., 2015), di fatto questo termine appare come se possa rappresentare qualsiasi sostanza benefica per le piante senza essere nutriente, prodotto fitosanitario o ammendante.

Il primo congresso sull'uso dei biostimolanti si è tenuto a Strasburgo nel 2012, questo aveva come scopo di riunire le maggiori personalità nel campo dei biostimolanti, in termini industriali, accademici e di agenzie di regolamentazione (Calvo et al., 2014), e può rappresentare l'inizio dell'accettazione dei biostimolanti in ambito accademico (du Jardin, 2015). Nello stesso anno il Consiglio europeo dell'industria dei biostimolanti (EBIC) ha definito i biostimolanti vegetali in questo modo: "Per biostimolante vegetale si intende un materiale contenente sostanze e/o microrganismi la cui funzione, applicata alle piante o alla rizosfera, è quella di stimolare i processi naturali a vantaggio dell'assorbimento dei nutrienti, dell'efficienza nutritiva, della tolleranza agli stress abiotici e/o della qualità delle colture, indipendentemente dal loro contenuto di nutrienti" (Colla e Rouphael, 2015). Nonostante questa definizione e gli sforzi per chiarire lo status di questi prodotti, non esiste una definizione legale o normativa mondiale compresi UE e USA. Alcune classi principali di biostimolanti sono riconosciute da scienziati e da alcuni enti (Calvo et al., 2014; du Jardin, 2012; Halpern et al., 2015), queste riguardano sia le sostanze che i microrganismi (comprendono batteri benefici, soprattutto PGPR, e funghi benefici) con diversi habitus. Nella prossima sezione verranno brevemente illustrate le categorie riportate in letteratura soffermandosi su quelle d'interesse per il caso studio.

#### 4.1 SOSTANZE UMICHE

Le sostanze umiche (HS) comprendono acidi umici, fulvici, e umine. Sono costituenti naturali della materia organica presente nel suolo, e derivano dai processi che avvengono in esso, di decomposizione di piante animali e residui microbici, ma anche dall'attività microbica del suolo che utilizzano questi substrati (Rouphael e Colla, 2018). Molto interessante è il fatto che oltre a poter essere estratte da materia naturalmente umificata, da compost o da depositi minerali, possono venire prodotte a partire da sottoprodotti agricoli che, invece di essere decomposti nel suolo o attraverso il compostaggio, possono essere scomposti e ossidati in modo controllato producendo così un'alternativa alle HS naturali (Eyheraguibel et al., 2008). Questi composti hanno la capacità di formare colloidali sovra molecolari grazie alle dinamiche di dissociazione e associazione che avvengono tra di essi influenzate dall'apparato radicale delle piante e loro interazioni (du Jardin, 2015). Questa complessità molecolare e la diversità di risposte delle piante alterate dalla loro applicazione, rende estremamente difficile chiarire il modo in cui le HS influenzano la fisiologia delle piante, inoltre è emersa una relazione tra proprietà del terreno e la loro bioattività (Canellas et al., 2012). Questo spiega perché la loro applicazione mostra risultati incoerenti, ma in generale positivi, tant'è che una metanalisi a effetti casuali delle HS applicate alle piante condotta da Rose et al. (2014) ha riportato che il miglioramento complessivo del peso secco dei germogli è del 22 +/- 4%, dati che variano di poco, 21+/-6% per quanto riguarda le radici. Gli effetti positivi delle HS si riferiscono al miglioramento della nutrizione delle radici, attraverso l'aumento di assorbimento sia di macro che di micro nutrienti a causa dell'aumento di capacità di scambio cationico del terreno trattato con le HS e alla maggior disponibilità di P grazie all'interferenza che queste sostanze provocano nel processo di precipitazione del fosfato di calcio (Jindo et al., 2012). Altri effetti positivi possono essere attribuiti in comune all'effetto ormonosimile di alcuni componenti delle HS sia a meccanismi dell'IAA (Trevisan et al., 2011), per esempio come le auxine, le HS hanno la capacità di promuovere la crescita delle piante e di indurre l'attività della H<sup>+</sup> ATPasi nella membrana plasmatica (Nardi et al., 2000).

#### 4.2 IDROLIZZATI PROTEICI E ALTRI COMPOSTI CONTENENTI N

Per idrolizzati proteici s'intende una miscela di aminoacidi, peptidi, polipeptidi e proteine denaturate che sono ottenuti per idrolisi chimica, enzimatica, termica di proteine da sottoprodotti agroindustriali, sia di origine vegetale che animale. (Colla et al., 2015a; Nardi et al., 2016). Alcuni studi riportano che l'utilizzo di idrolizzati da fonti animali hanno effetto fitotossici e negativi sulla crescita delle piante (Cerdán et al., 2009; Lisiecka et al., 2011), allo stesso tempo in uno studio su

lattuga di (Botta, 2012), si osserva che il trattamento con idrolizzato proteico di origine animale ha portato a un peso fresco e secco maggiore rispetto al controllo. Tuttavia, l'utilizzo di questi prodotti di origine animale è sempre più preoccupante in quanto a sicurezza, per questo l'UE ne ha vietato l'applicazione sulle parti commestibili delle colture biologiche attraverso il Regolamento di esecuzione (UE) n. 354/2014 (du Jardin, 2015). La letteratura riporta che gli idrolizzati proteici aumentano la biomassa e l'attività microbica, la respirazione e in generale la fertilità del suolo (du Jardin, 2015) e in generale diversi autori riportano la loro capacità di indurre risposte di difesa delle piante aumentandone anche la tolleranza a molti stress abiotici (Colla et al., 2017; Lucini et al., 2015; Roupheal et al., 2017; Trevisan et al., 2019). Lo studio di (Colla et al., 2014) riporta, inoltre, che sono state evidenziate attività ormonali a carico degli idrolizzati proteici.

Altre molecole azotate comprendono le betaine, le poliammine e gli "amminoacidi non proteici", isolati nelle piante superiori ma ancora poco studiati dal punto di vista fisiologico ed ecologico (Vranova et al., 2011). Nel complesso queste molecole hanno evidenziato molteplici ruoli come biostimolanti per la crescita delle piante (Calvo et al., 2014; Halpern et al., 2015). Per esempio, in alcuni amminoacidi, come la prolina, sono stati descritti effetti chelanti con effetto su metalli pesanti, proteggendo le piante da questi, e su micronutrienti contribuendo all'acquisizione di questi. Tra gli effetti sulle piante si include anche la modulazione dell'assorbimento e dell'assimilazione dell'N attraverso la regolazione di enzimi coinvolti e dei loro geni strutturali; e contribuiscono anche alle relazioni tra i metabolismi del C e dell'N con la regolazione del ciclo TCA (du Jardin, 2015). In sintesi quindi sono stati riportati miglioramenti variabili, ma in molti casi significativi sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo delle colture agricole e orticole (Calvo et al., 2014).

#### 4.3 CHITOSANO E ALTRI BIOPOLIMERI

Il chitosano è prodotto industrialmente o naturalmente a partire da una forma deacetilata della chitina (biopolimero). Esistono varianti oligomeriche e polimeriche, entrambe vengono utilizzate in diversi settori come quello alimentare, cosmetico, medico e agricolo. Gli oligomeri hanno la capacità di legarsi a diversi componenti cellulari, DNA, membrana plasmatica, e i componenti della parete, inoltre è in grado di legarsi a recettori specifici di attivazione dei geni di difesa (Hadwiger, 2013; Katiyar et al., 2015). Analisi di proteoma (Ferri et al., 2014) e di trascrittomi (Povero et al., 2011) di tessuti vegetali trattati con chitosano, hanno evidenziato che una delle conseguenze del legame di questo polimero con recettori cellulari, è l'accumulo di perossido di idrogeno e la fuoriuscita dello ione calcio, specie chimiche importanti nelle risposte allo stress e nella regolazione dello sviluppo. Il

chitosano, inoltre, induce attraverso un meccanismo ABA-dipendente la chiusura stomatica (Iriti et al., 2009), partecipando così alla protezione da stress ambientale. Per questo nel corso degli anni sono state sviluppate applicazioni agricole, mirate alla protezione delle piante contro patogeni, ma più ampiamente il suo utilizzo riguarda la tolleranza agli stress abiotici e a tratti qualitativi dei metabolismi, primario e secondario (du Jardin, 2015). Esistono, poi altri polimeri di origine biologica o sintetica che vengono utilizzati come elicitori della difesa delle piante. Un esempio è la laminarina, glucano originario dell'alga bruna, di cui si utilizzano dei purificati in agricoltura (du Jardin, 2015).

#### 4.4 ESTRATTI DI ALGHE

L'uso delle alghe in agricoltura è antico, ma gli effetti biostimolanti sono emersi solo recentemente. In concomitanza con gli studi è iniziato l'uso commerciale di estratti e di composti purificati contenenti polisaccaridi come laminarina, alginati e carragenine. Altri composti che promuovono la crescita vegetale includono nutrienti, steroli, composti contenenti N come le betaine e ormoni (Craigie, 2011). I polisaccaridi contenuti negli estratti partecipano alla formazione di gel alla ritenzione idrica e a un efficiente scambio gassoso del suolo. Inoltre, i composti polianionici contribuiscono alla fissazione e allo scambio di cationi, azione che può essere sfruttata per la fissazione dei metalli pesanti e per la bonifica dei suoli. Per questo prodotti di origine algale, possono essere applicati sul terreno, ma anche attraverso soluzioni idroponiche e fogliarmente (du Jardin, 2015). Infatti questi biostimolanti sono in grado di incrementare la crescita delle piante, la tolleranza agli stress abiotici e biotici, migliorando, quindi, la produttività delle colture (Gajc-Wolska et al., 2013; Norrie e Keathley, 2006; Sharma et al., 2014).

##### 4.4.1 ALGA BRUNA

Le alghe brune del genere *Phaeophyta* sono comunemente le più utilizzate per la produzione di estratti commerciali per l'applicazione in agricoltura e in orticoltura (Khan et al., 2009). Gli estratti commerciali di alga bruna contengono molteplici componenti sia inorganici (minerali tra cui azoto fosforo potassio ferro) che organici. Quest'ultimi sono rappresentati da osmoliti come le betaine, amminoacidi (anche se in minori proporzioni di altri estratti di alga), vitamine e loro precursori e polisaccaridi (Battacharyya et al., 2015). I polisaccaridi più comuni negli estratti di alga bruna sono: alginati, fucoidani, laminarine, glucani anche contenenti fucosio (Khan et al., 2009). Studi dimostrano che: gli alginati promuovono la crescita delle piante (Yabur et al., 2007), le laminarine abbiano azione elicitoria di risposta di difesa vegetale contro patogeni funginei e batterici (Mercier et al., 2001). Inoltre, gli estratti di alga, soprattutto di questo genere, sono ricchi in composti fenolici,

questi sono metaboliti secondari che svolgono attività antiossidante proteggendo così le cellule e loro componenti dai radicali come il superossido (Battacharyya et al., 2015). È stato poi dimostrato da (Wally et al., 2013a, 2013b) che, sebbene gli estratti presentino una certa quantità di fitormoni e ormono-simili, gli effetti ormonali sono spiegati, per la maggior parte, dalla regolazione dei geni biosintetici degli ormoni nei tessuti vegetali.

Gli estratti di alga bruna, alterando le proprietà fisiche, biochimiche, e biologiche del suolo, possono anche modificare l'architettura radicale delle piante promuovendo l'efficienza di assorbimento dei nutrienti (Battacharyya et al., 2015). Viene riportato, per esempio, da (Castaings et al., 2011; Krouk et al., 2010) che l'estratto di *A. nodosum* (una specie di alga bruna) ha regolato un gene trasportatore di nitrati migliorando così il rilevamento dell'azoto e il trasporto delle auxine, determinando una migliore assimilazione dell'azoto.

#### 4.5 MICRORGANISMI

Questo gruppo comprende batteri, lieviti, funghi, filamentosi e microalghe. In generale vengono applicati al suolo per migliorare l'assorbimento dei nutrienti, attraverso la loro solubilizzazione, modificano inoltre lo stato ormonale delle piante. Grazie a questo riescono a migliorare la produttività delle colture (Bulgari et al., 2019).

##### 4.5.1 FUNGHI BENEFICI

I funghi hanno relazioni con le radici delle piante che vanno dalla simbiosi mutualistica al parassitismo, a causa della loro co-evoluzione oggi possiamo descrivere un'estesa gamma di relazioni comprese tra i due estremi (Johnson e Graham, 2013). Uno dei più importanti gruppi di funghi benefici, sono i funghi micorrizici, i quali stabiliscono simbiosi con oltre il 90 % delle specie vegetali. Gli AMF (Arbuscule-Forming Mycorrhiza), che formano degli arbuscoli penetrando nelle cellule corticali, sono molto diffusi associati con piante agricole e orticole (Bonfante e Genre, 2010). C'è crescente interesse per il loro utilizzo, dovuto agli ampi benefici nutrizionali, in termini di aumento dell'efficienza di assorbimento di micro e macronutrienti, di P in particolare, al miglioramento dell'equilibrio idrico e alla protezione da stress di vario tipo, che queste simbiosi riescono a dare (Gianinazzi et al., 2010; Hamel, 2007; Harrier e Watson, 2004; Siddiqui et al., 2008). Inoltre, si sta studiando anche sulle associazioni tripartite che gli AMF hanno con piante e rizobatteri con vantaggi rilevanti in campo agricolo (Siddiqui et al., 2008). Esistono però difficoltà tecniche di propagazione di questa tipologia di funghi, a causa del loro carattere biotrofico (Dalpé e Monreal, 2004), anche data dalla difficoltà di comprensione dei fattori determinanti la specificità d'ospite e delle dinamiche

di popolazione negli agroecosistemi, tutto questo ne limita molto l'uso in agricoltura (du Jardin, 2015).

Tuttavia, altri funghi endofiti, distinti dalle specie micorriziche, come *Sebacinales* e *Trichoderma spp.*, hanno la capacità di vivere almeno parte del loro ciclo vitale, lontano dall'apparato radicale della pianta, riuscendo con meccanismi ancora in parte non conosciuti a promuovere la crescita vegetale (Behie e Bidochka, 2014).

#### 4.5.1.1 TRICHODERMA spp.

I prodotti a base di *Trichoderma* hanno avuto un ottimo successo commerciale, come biopesticidi, grazie alla capacità di questo genere di fungo di invadere e distruggere altri funghi (Verma et al., 2007). Le specie maggiormente utilizzate per l'azione biocontrollatrice, e maggiormente studiate, come *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. virens*, presentano un'elevata azione biostimolante sulle culture orticole; per esempio la miscela delle ultime tre citate, ha aumentato l'altezza e la biomassa della pianta, inoltre ha potenziato l'assorbimento di nutrienti come P e N nei germogli e radici di piante di cece (Rudresh et al., 2005). Questo tipo di miscele, con uso di diverse specie, grazie al differente meccanismo d'azione di queste, possono, con successo, migliorare le prestazioni delle piante coltivate (López-Bucio et al., 2015). Ma vengono descritti casi in cui specie diverse possono avere effetto antagonista tra loro, per questo è necessario porre attenzione alle specie e analizzare poi in vitro le relazioni tra di esse (Gómez et al., 1997). In generale, però, *Trichoderma spp.* dovrebbe instaurare interazioni con altri attori della rizosfera come funghi AMF, e batteri rizosferici del genere *Bacillus* e *Rhizobium*, e studi abbastanza attuali riportano che almeno alcune combinazioni di questo fungo con altri microrganismi possono migliorare la crescita delle piante (Colla et al., 2015a). Infatti, una combinazione di *Glomus* (fungo micorrizico) -*Trichoderma* seguita da un singolo inoculo di uno dei due ha migliorato valori di peso secco di germogli e radici, e migliorato il contenuto di clorofilla in piante di lattuga, pomodoro e zucchine, rispetto al controllo non inoculato (López-Bucio et al., 2015). Uno studio di (K et al., 2011), ha evidenziato che una combinazione di *T. atroviride* e *Bacillus subtilis* ha migliorato notevolmente la crescita in termini di materia secca di piante di fagioli, i dati emersi danno +43% rispetto al controllo, rispetto al +2% del solo *Trichoderma* e al +34% del solo *B. subtilis*. Analogamente (Jisha e Alagawadi, 1996), utilizzando una miscela di *Bacillus polymyxa* e *T. harzianum* in sorgo, hanno ottenuto risultati di miglioramento di crescita. In generale, la promozione della crescita delle miscele è stata conferita a un aumento dell'assorbimento di nutrienti (Yobo et al., 2009), alla produzione di siderofori e di sostanze che favoriscono la crescita delle piante (K et al.,

2011). La letteratura ha dimostrato che l'applicazione al suolo, ai semi o sulla superficie vegetale di *Trichoderma spp.*, questo aumenta la solubilità dei nutrienti e il loro assorbimento grazie anche alla modifica architetture dell'apparato radicale delle piante (Zhao et al., 2014). Grazie a questo e all'aumento registrato di formazione di radici laterali è stato possibile vedere un aumento della produzione di biomassa (Contreras-Cornejo et al., 2009). Il ruolo di *Trichoderma spp.* come biostimolante, è fondamentale nella solubilizzazione del fosfato, in termini di esaurimento delle sue fonti di estrazione e al concomitante aumento dei prezzi del fertilizzante inorganico (Rudresh et al., 2005).

Sulla base di quanto discusso in precedenza, si riporta un caso studio come precedente, dell'elaborato in oggetto. Questo studio di (Rouphael et al., 2020), ha riconfermato che inoculi di *Trichoderma* in lattuga, in questo caso in condizioni di fertilizzazione azotata ottimale, comportano migliore resa (peso fresco, peso secco) e migliore stato nutrizionale delle foglie (indicato dall'aumento di tassi di P e Mg). Interessanti risultati, poi sono stati forniti dall'inoculo di *Trichoderma* in concomitanza con l'applicazione di prodotti a base di biopolimeri vegetali (altro tipo di biostimolante), in condizioni di bassa disponibilità di N, è stato più efficace del solo inoculo fungineo fornendo migliori rese e migliori qualità, aumentando il contenuto in acido ascorbico. Sono stati poi migliorate le assimilazioni di nitrati e altri macronutrienti, stimolando le vie assimilative del nitrato, inoltre, si è rilevato un aumento dell'indice SPAD e dei metaboliti antiossidanti. Pertanto, questa strategia di utilizzo di biostimolanti microbici e non, rappresenta una via efficiente e sostenibile per migliorare resa e qualità delle colture orticole, come la lattuga, soprattutto in terreni compromessi dal punto di vista azotato o in agroecosistemi a basso apporto di fertilizzanti (Rouphael et al., 2020).

#### 4.5.2 BATTERI BENEFICI

L'utilizzo di microrganismi del suolo, aumentano l'efficienza di assorbimento di nutrienti e acqua (Armada et al., 2014). Tra questi microrganismi i rizobatteri promotori della crescita (PGPR) sono molto promettenti (Ruzzi e Aroca, 2015). Questi possono essere suddivisi in tre categorie a seconda del loro habitus: quello che vivono nella zona intorno la radice (rizosfera), quelli che ne colonizzano la superficie e gli endofiti che vivono all'interno di essa, questo ovviamente non è esclusivo in quanto ogni ceppo batterico può adottare tutti e tre gli habitus durante il suo ciclo vitale (Alavi et al., 2013). Le modalità d'azione dei PGPR differiscono da tipologia di batterio e specie non avendo gli stessi meccanismi (Dey et al., 2004). Infatti, questi, possono andare dalle modifiche del contenuto

ormonale, alla produzione di composti volatili, o al miglioramento della tolleranza agli stress abiotici (Choudhary et al., 2011), inoltre da tempo la letteratura scientifica riporta che l'inoculo di PGPR, può aumentare la concentrazione di nutrienti nella pianta ospite (Canbolat et al., 2006). Nel caso dell'N, per esempio, alcuni tipi di PGPR inducono le piante a rispondere in modo differente a seconda della concentrazione esterna di N, per massimizzarne la disponibilità (Mantelin et al., 2006). Similmente, all'N diversi PGPR sono in grado di solubilizzare i fosfati (Canbolat et al., 2006; Lai et al., 2008), causando l'aumento della disponibilità nel suolo di P disponibile per le piante. Ancora, esistono alcuni batteri PGPR che possono facilitare l'assorbimento di K della pianta ospite, grazie alla loro attività di liberazione del K dalle sue forme non mobili nel suolo (Liu et al., 2013), aumentando perciò la disponibilità del nutriente (Sheng, 2005). È chiaro, quindi, che l'utilizzo di PGPR come biostimolanti, sia una realtà e una possibilità per mantenere le produttività diminuendo però allo stesso tempo, gli input chimici in termini di fertilizzanti chimici e pesticidi (Ruzzi e Aroca, 2015). Le specie PGPR predominanti sono dei generi *Bacillus* e *Pseudomonas* (Radhakrishnan et al., 2017).

#### 4.5.2.1 *BACILLUS* spp.

*Bacillus* spp. è un batterio Gram-positivo ubiquitario in natura, suoi numerosi ceppi hanno mostrato capacità di controllo biologico su diverse colture (Utkhede e Koch, 1999) e diversi isolati sono in grado di promuovere la crescita delle piante (Probanza et al., 1996). Per le piante sono assolutamente importanti gli assorbimenti di N (componente delle proteine e di acidi nucleici) e P (coinvolto nei metabolismi di ATP, acidi nucleici e fosfolipidi), ma le forme biodisponibile (quindi assorbibili dalle piante) sono limitate nel terreno (Fernández Bidondo et al., 2012; Robinson, 2001). *Bacillus* spp., è in grado di convertire le forme complesse di N e P in forme semplici e disponibile che vengono assorbite dalle radici delle piante (Kang et al., 2015; Kuan et al., 2016). Infatti, la secrezione di fosfatasi e acidi organici di *Bacillus* spp. acidifica l'ambiente circostante facilitando la conversione fosfato inorganico in fosfato libero (Kang et al., 2015, 2014). Oltre che nell'assorbimento del P, alcuni *Bacillus* intervengono anche nei processi assuntivi dell'azoto. Sono in grado di rilasciare ammoniaca a partire da materia organica azotata (Hayat et al., 2010). Inoltre, alcuni *Bacillus* spp. possiedono, nel loro corredo genetico, il gene *nifH* e producono nitrogenasi, con cui possono fissare l'N<sub>2</sub> atmosferico rendendolo disponibile alle piante, migliorandone così crescita e resa (Kuan et al., 2016). La produzione di siderofori da parte di *Bacillus* spp. aiuta a solubilizzare il ferro a partire da minerali o da composti organici (Nadeem et al., 2012), queste macromolecole infatti, legano Fe<sup>3+</sup> e lo riducono a Fe<sup>2+</sup> che poi entra nelle vie metaboliche vegetali (Walker e Connolly, 2008). Questi batteri, inoltre, con la presenza di triptofano e altri composti, vengono indotti a sintetizzare IAA (Glick, 2014),



e altre sostanze promotrici della crescita come, gibberelline, citochinine e spermidine, le quali aumentano la divisione cellulare e l'allungamento di cellule sia radicali che dei germogli (Arkhipova et al., 2005; Radhakrishnan e Lee, 2016; Xie et al., 2014). Si è osservata la produzione di ACC deaminasi, la quale inibisce la sintesi di etilene e promuove la crescita delle piante coltivate (Pourbabaee et al., 2016; Xu et al., 2014).

A causa dei cambiamenti climatici e al degrado del suolo, le perdite di resa dovute a stress e da salinità e siccità sono in aumento (Calvo et al., 2014). Regolare, quindi, l'assorbimento e l'allocazione di nutrienti, il trasporto dell'acqua e l'accumulo di soluti e antiossidanti può migliorare la produttività delle piante in stress da siccità (Boomsma e Vyn, 2008). *Bacillus spp.*, riescono a regolare il trasportatore 1 di potassio ad alta affinità (HTK1), il quale modula l'omeostasi di  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  per mitigare lo stress idrico (Gassmann et al., 1996; Vieira-Pires et al., 2013). In generale, *Bacillus spp.* aumenta i tre maggiori macronutrienti (N, P, K) nelle piante stressate, nelle quali, normalmente, l'assorbimento di questi diminuisce (Barnawal et al., 2013). Infine, hanno anche un ruolo, di controllo di crescita di patogeni vegetali grazie ai lipopeptidi e sostanze tossiche che sono in grado di produrre (Radhakrishnan et al., 2017).

#### 4.5.2.2 *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*

*Pseudomonas*, sono batteri con habitus libero, aerobi o anaerobi facoltativi, gram-negativi. Insieme a *Bacillus*, è il genere principale di PGPR. Questo genere batterico, e nello specifico molti ceppi di questa specie, hanno la capacità di solubilizzare il fosfato, e possono portare a una migliore mobilizzazione di quello inorganico, di conseguenza a una maggiore efficienza di utilizzo da parte delle culture, portando quindi a una riduzione dell'inquinamento da sovra fertilizzazione (Browne et al., 2009). In questo caso però, i lavori sperimentali in letteratura, riguardano molto spesso, l'applicazione di batteri *Pseudomonas* insieme altri ceppi batterici, o ad altri tipi di biostimolanti. Infatti nel lavoro sperimentale dove vengono comparati gli effetti di varie specie batteriche tra di loro e con un inoculo multi specie, in piante di lattuga di (Vio et al., 2023), l'applicazione singola del solo ceppo di *Pseudomonas protegens* (*syn. Pseudomonas fluorescens*), non ha, quasi mai, portato a risultati statisticamente significativi di aumento di resa. Anche se l'inoculo singolo ha portato comunque a un miglioramento di peso fresco rispetto al controllo, l'inoculo multi specie ha portato a risultati migliori. L'inoculo di quattro ceppi, tra cui anche un ceppo di *Bacillus*, ha plausibilmente migliorato l'assorbimento dell'acqua o l'assorbimento dei nutrienti, per di più, il supporto strutturale per il supporto di germogli e foglie. Le piante di lattuga trattate con l'inoculo multi specie hanno

mostrato un tasso di crescita più elevato, dato da maggior numero di foglie con maggiore area, nelle fasi iniziali, portando a piantine più grandi in minor tempo. Questo, indica che le produzioni potrebbero essere maggiori per unità di suolo, con conseguente maggiore remunerazione (Vio et al., 2023).

Tutto questo può essere spiegato, dalla capacità dei microrganismi di sintetizzare fitormoni, solubilizzare nutrienti e fissare azoto, ma è complesso identificare nello specifico uno di essi come supporto ai miglioramenti di crescita. Interessante inoltre, che nello studio di (Coelho et al., 2007), è stato riscontrato che nel substrato in cui vi era coltivata lattuga la popolazione di microrganismi e in particolare di *Pseudomonas*, era più alta rispetto a substrati altre orticole, l'ipotesi è che le piante di lattuga producano sostanze che promuovono la crescita di questo tipo di microorganismi.

Anche nel caso di un lavoro sperimentale in cipolla l'utilizzo di *Pseudomonas fluorescens* ha portato all'incremento dei contenuti di Ca, Mg, K, P, Zn e Mn (Gupta et al., 2021). Nello stesso studio è emerso, però, che né le applicazioni di *Pseudomonas fluorescens* né quelle di un ceppo di *Bacillus*, al contrario di altri studi, hanno portato a risultati significativamente positivi dei parametri di crescita. Tuttavia, le applicazioni di questi, abbinate con un estratto di alga bruna ha portato a risultati positivi, questo suggerisce che quest'ultimo abbia contribuito a instaurare una interazione positiva tra le PGPR e le radici delle piante. Questo indica, che la co-applicazione di diversi biostimolanti con diverse modalità di azione, potrebbe incrementare ancor di più le rese e i contenuti nutrizionali delle colture. Si identificano, quindi, per la ricerca futura lo sviluppo di biostimolanti di seconda generazione dove questa si dovrà occupare degli effetti sinergici e additivi delle diverse tipologie di biostimolanti.

## 5 SCOPO DEL LAVORO

L'applicazione di biostimolanti nella coltivazione delle specie orticole rappresenta un'opportunità in termini produttivi e qualitativi. Finora le attività sperimentali hanno verificato molteplici effetti e meccanismi di azione legati all'impiego di biostimolanti, tuttavia è ancora necessario cercare di chiarire alcune relazioni per comprenderne meglio le conseguenze a livello produttivo. Questo studio, condotto presso la Facultad de Ciencias Agronómicas della Universidad de Chile, ha impiegato tre organismi *Bacillus spp.*, *Pseudomonas fluorescens* e *Trichoderma spp.* come prodotti ad azione biostimolante nella coltivazione di lattuga in vaso per la determinazione degli effetti produttivi e qualitativi. Con l'obiettivo, poi, di analizzare i dati e di approdare a dei risultati da confrontare con la letteratura esistente confrontando gli effetti dei prodotti biostimolanti per ipotizzare utilizzi su ampia scala. In caso di risposte positive, questi strumenti di gestione agronomica, potrebbero essere impiegati per diminuire l'utilizzo dei fertilizzanti inorganici aumentandone l'efficienza; diminuendo, di conseguenza gli effetti negativi che questi hanno nell'ambiente e nella salute pubblica in un'ottica di aumento della sostenibilità agricola.



## 6 MATERIALI E METODI

### 6.1 MATERIALI

Lo studio è stato svolto nei laboratori della Facultad de Ciencias Agronómicas della Universidad de Chile, nella Regione Metropolitana di Santiago del Cile in Cile. Si è lavorato per tutto il progetto in una camera di crescita a temperatura controllata (26° C – 65% UR), 12 ore di luce e 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-2}$  di intensità luminosa.

In questo lavoro sperimentale i materiali usati sono stati dei vasi in polietilene con diametro di 12 cm riempiti con un substrato di coltivazione composto a partire da torba, terreno agrario e perlite in parti volumetriche uguali, con composizione minerale da (Fig. 1). Il materiale di propagazione utilizzato è stato rappresentato da sementi capsule di *Lactuca sativa* L. tipologia “Butterhead letture” distribuite da Nunhems Chile S.p.a. con purezza del 99,99% e germinabilità del 99%. Il prodotto biostimolante usato è a base di ceppi di: *Bacillus spp.*, *Pseudomonas fluorescens* e *Trichoderma spp.* (ogni ceppo è presente almeno in  $1 \times 10^9$  UFC/ml) con l’aggiunta di un estratto di alga bruna, in un mezzo liquido diviso in due parti che prendono il nome di Promotore e Difensore. Come fertilizzante si è utilizzato  $\text{KNO}_3$  con titolo 13-0-46.

Identificación muestra		Sustrato		NCh 2880.Of2015		
N° de Laboratorio		31979		Compost-Clasificación y requisitos		
				*Nivel Aceptación		Método
				Clase A	Clase B	
<b>Análisis Químicos</b>						
pH	(suspensión 1:5)	1:5	7,1	5,0 - 8,5		TMECC 04.11
C.Eléctrica	(suspensión 1:5)	dS/m	0,37	< 3 *	< 8 *	TMECC 04.10
Materia orgánica		%	11,5	> 20		TMECC 05.07-A
Carbono orgánico		%	6,4	> 11		TMECC 05.07-A
Nitrógeno total	(N)	%	0,28	> 0,5		TMECC 04.02-D
Relacion C/N			22,8	< 30		TMECC 05.07-A
Fósforo total	(P2O5)	%	0,44			TMECC 04.03-A
Potasio total	(K2O)	%	0,16			TMECC 04.04-A
Calcio total	(CaO)	%	2,25			
Magnesio total	(MgO)	%	0,80			
Hierro total	(Fe)	mg/kg	6220			
Manganeso total	(Mn)	mg/kg	323			
Boro total	(B)	mg/kg	20			
Cobre total	(Cu)	mg/kg	16	70	400	TMECC 04.06
Zinc total	(Zn)	mg/kg	100	200	800	TMECC 04.06
Humedad		%	19	30 - 45		TMECC 03.09
Materia seca		%	81	70 - 55		

Figura 1:Caratteristiche chimico-fisiche del substrato utilizzato nella prova.

### 6.2.1 INOCULO GERMINAZIONE

Le sementi sono state adagiate in un disco di cotone posto su una scatola Petri nella quale è stato posizionato, anche del materiale assorbente in modo tale da trattenere l'acqua di irrigazione in eccesso per poi cederla in un secondo momento. Mantenendo opportunamente irrigato in maniera da mantenere un'umidità relativa molto alta, vicina alla saturazione. Allo stadio dei due cotiledoni emersi, l'apparato radicale è stato inoculato con il biostimolante, per immersione di un'ora previa preparazione del prodotto. Effettuata diluendo sia il Promotore che il Difensore con acqua distillata 1:400 e infine miscelando (da ora in poi verrà intesa questa preparazione quando si parla di "preparato"). Si sono disposti i vasi su vassoi con la medesima illuminazione. Si è quindi proceduto all'impianto delle plantule nel substrato portandolo poi, irrigando con acqua, alla capacità di vaso.

L'impianto sperimentale era quindi costituito da 3 trattamenti e 3 ripetizioni con un disegno a blocchi completi randomizzati. Si è applicato biostimolante, in un trattamento, fertilizzante inorganico nel secondo trattamento e acqua distillata nel terzo ottenendo 9 unità sperimentali (con una pianta ognuna) replicate 4 volte per un totale di 36 vasi.

### 6.2.2 SVILUPPO PIANTINE

Le plantule sono state irrigate nella prima parte del ciclo, ogni qual volta il contenuto idrico del substrato scendeva al di sotto dell' 80% circa della capacità di campo (C.C.), a causa infatti dell'apparato radicale poco sviluppato in questa fase le plantule hanno maggior difficoltà a raggiungere l'acqua nel substrato, inoltre a causa della ventilazione e del calore della camera di germogliamento il primo strato di circa 0,5 cm si disidratava molto velocemente, per questo si è optato per un livello idrico di base, così alto per irrigare. In una seconda fase invece, fino alla fine del ciclo, si è adottato come livello idrico di base circa il 60% della C.C.

Nel corso del ciclo di crescita che è durato esattamente dal 12 giugno 2023 al 11 agosto 2023 sono state effettuate:

- per il trattamento biostimolante (B): 4 applicazioni di preparato, 50 ml per ogni pianta per ogni applicazione
- per il trattamento con fertilizzante inorganico (F): 3 applicazioni di  $\text{KNO}_3$ , 1 g per ogni pianta per ogni applicazione, disciolto nell'acqua di irrigazione

- per il controllo (C) si applicò acqua distillata o non distillata a seconda rispettivamente, dell'applicazione del biostimolante o del fertilizzante.

In generale quando si è applicato il biostimolante (preparato con acqua demineralizzata), alle altre piante si applicava lo stesso volume di acqua demineralizzata, mentre quando alle piante F si applicava il fertilizzante alle altre piante si applicava lo stesso volume di acqua non demineralizzata.

### 6.2.3 ESPIANTO E ANALISI

La raccolta delle unità sperimentali è stata effettuata dopo circa 60 giorni. Si è proceduti con l'espianto, rimuovendo il substrato, con attenzione senza danneggiare l'apparato radicale, andandolo poi a lavare con abbondante acqua per rimuovere gli ulteriori residui del mezzo di coltivazione. Tamponando con della carta assorbente, si sono asciugate le piante, per poi procedere con le analisi. In questa fase sono stati rilevati i seguenti parametri: accumulo di clorofilla, n° di foglie, lunghezza dell'apparato radicale e fogliare, biomassa fresca e secca della parte aerea ed ipogea.

#### 6.2.3.1 INDICE SPAD

La concentrazione, della clorofilla nelle foglie è normalmente determinata con estrazione della stessa dalle foglie e successive misurazioni spettrofotometriche (Porra et al., 1989). Ma questo tipo di analisi in vitro sono di tipo distruttivo, sono costose e necessitano di molto tempo per eseguirle, perciò non applicabili a tutte le situazioni sperimentali. Per questo a partire dagli anni '80 sono stati sviluppati sistemi più rapidi e meno costosi per stimare la [chl]<sup>1</sup> fogliare; infatti, Minolta ha sviluppato un misuratore portatile a doppia lunghezza d'onda basato sull'assorbanza. Il misuratore SPAD-502 (Minolta corporation, Ltd., Osaka, Giappone), utilizza due diodi emettitori di luce e un rilevatore a fotodiodi per misurare attraverso la foglia la trasmittanza della radiazione rossa (650 nm) e infrarossa (940 nm). Elabora, quindi, un valore relativo del misuratore che dovrebbe "corrispondere alla quantità di clorofilla presente nella foglia campione" (Minolta, 1989). A partire dagli anni 2000 l'utilizzo di questo strumento è aumentato drasticamente sia nel campo dell'agricoltura sia in quello della ricerca; infatti, ci sono centinaia di studi che lo utilizzano nella letteratura scientifica. Solo una piccola parte di questi quantifica la relazione tra [chl] in vitro e l'indice SPAD, e chi di questi lo fa, parametrizza relazioni lineari, in accordo con la proporzionalità tra la concentrazione dei pigmenti e l'assorbanza, descritta dalla Legge di Beer (Eisenberg e Crothers, 1979). Esistono, però, studi che riportano relazioni curvilinee tra i due valori, per esempio (Castelli et al., 1996; Markwell et al., 1995;

---

<sup>1</sup> Concentrazione di clorofilla

Monje e Bugbee, 1992). Questa discrepanza è causata principalmente dalla distribuzione disuniforme del pigmento e dalla dispersione multipla nella foglia intatta (Richter e Fukshansky, 1996).

Nel caso della lattuga, lo studio di (León et al., 2007), stima il rapporto tra indice SPAD-502 e il contenuto di clorofilla a, b e totale attraverso una relazione lineare (Tab. 1). A fini statistici, di questo caso studio, si utilizzeranno direttamente i valori forniti dallo SPAD-502.

*Tabella 1: relazione tra SPAD-502 e contenuti di clorofilla a, clorofilla b e clorofilla totale (g di clorofilla/100 g di tessuto fresco) in foglie di lattuga*

<b>Variabile</b>	<b>Modello</b>	<b>Equazione</b>
<b>Clorofilla a</b>	Lineare	$Y=2,51x - 16,28$
<b>Clorofilla b</b>	Lineare	$Y=0,74x - 2,85$
<b>Clorofilla totale</b>	Lineare	$Y=3,40x - 19,00$

Le analisi SPAD si sono svolte, subito prima del vero e proprio espianco, per evitare il rischio di disidratazione e alterazione del pigmento post-espianco, con letture quindi che potrebbero essere falsate. Dopo aver calibrato lo strumento SPAD- 502 si sono analizzate 4 foglie per unità sperimentale quindi, si sono effettuate 3 letture in ogni foglia per poi mediarle, per un totale, quindi, di 4 valori per pianta.

#### *6.2.3.2 NUMERO DI FOGLIE*

Successivamente all'espianco e alla pulitura delle piante di lattuga, sono state contate le foglie completamente sviluppate di ogni pianta per poi compararle tra i diversi trattamenti, utilizzando questo dato come uno degli indici di accrescimento e sviluppo. Chiaramente questo dato è importante anche in termini di resa, essendo la lattuga un ortaggio da foglia, infatti, queste direttamente forniscono resa netta e sono prodotto commerciale. Estremamente importante, quindi, per l'obiettivo del caso studio e in generale per l'obiettivo di aumentare la produttività senza aumentare gli input di fertilizzanti inorganici richiesto dai problemi descritti nel paragrafo 2 e per aumentare la sostenibilità e l'efficienza delle coltivazioni.



#### *6.2.3.3 LUNGHEZZA APPARATO RADICALE E AEREO*

La lunghezza radicale è un fattore importante nello sviluppo delle piante e interessante da comparare nei diversi trattamenti, in quanto ci indica se c'è stata una attività di promozione della crescita di questo. Successivamente alla divisione dei due apparati tramite un taglio effettuato con bisturi di laboratorio nella regione del colletto, i dati di lunghezza dell'apparato radicale sono stati misurati attraverso uno strumento di misura fisso, per evitare errori di lettura.

Analogamente è stata misurata la lunghezza dell'apparato aereo, importante fattore da prendere in considerazione in quanto, come nel caso del numero delle foglie, è strettamente correlato con la resa e la sua qualità, andando a prendere in considerazione direttamente il prodotto commerciale.

#### *6.2.3.4 PESO FRESCO*

Sono state effettuate, inoltre le misurazioni del peso fresco sia della parte ipogea che epigea. Dato che indica, soprattutto nel caso della parte aerea, direttamente la resa reale della coltura della lattuga, essendo un ortaggio venduto fresco e nella maggior parte dei casi non processato, fatto salvo per la filiera della quarta gamma in cui vi è un processo di taglio e di preparazione del prodotto commerciale. In ogni caso anche il peso della parte ipogea ci permette di confrontare e di stimare se vi è stata una promozione della crescita delle radici.

In seguito all'espianto e al lavaggio delle piante intere di lattuga, ed eseguita una sommaria asciugatura delle stesse, si è proceduto con la stima dei pesi sia aerei che ipogei con una bilancia da laboratorio fissa con una precisione di 0,001 g.

#### *6.2.3.5 PESO SECCO*

Sono stati, inoltre, stimati i pesi secchi, anche in questo caso sia ipogei che epigei, con lo scopo di normalizzare i pesi freschi, che potrebbero essere falsati dal contenuto di umidità, e ottenere dati il più obiettivi possibile. Prima di eseguire le misurazioni è stato necessario seccare i campioni in stufa a 65° C. Successivamente quindi la disidratazione dei campioni, analogamente ai pesi freschi si sono stimati i pesi secchi attraverso una bilancia di laboratorio con precisione di 0,001 g.

#### *6.2.3.6 ANALISI STATISTICA*

Per elaborare statisticamente i dati ricavati dalle varie misurazioni è stato effettuato il test ANOVA<sup>2</sup> con probabilità fissata al 95% e la separazione delle medie è stata realizzata mediante il Test HSD di Tukey anche questo settato con  $p=95\%$  la cui significatività è stimata in accordo con (Copenhaver e

---

<sup>2</sup> Analisi della varianza

Holland, 1988). Il software utilizzato per processare i dati è stato Statgraphics Centurion 19 (Statgraphics Technologies, Inc.).

## 7 RISULTATI

In questa prova sperimentale in lattuga l'indice SPAD (Fig. 2) è significativamente diverso nei 3 trattamenti. Il trattamento F (fertilizzante) possiede un valore di SPAD medio più alto degli altri trattamenti, ma il trattamento B (biostimolante) a sua volta ha superato significativamente il C (controllo). Per quanto riguarda il numero di foglie, invece non si è riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa nelle medie di ogni trattamento. In figura 3 i dati di B e C sono stati simili e invece quelli di F si sono discostati, ma senza differenze significative. La lunghezza della parte aerea, quindi essenzialmente delle foglie, non ha presentato differenze nei 3 trattamenti con valori rispettivamente di F, C e B pari a 10,1, 9,2 e 9,5. Differenza significativa, che invece appare nella lunghezza radicale del trattamento B rispetto sia a C che a F, i quali tra di loro non presentano nessuna differenza significativa (Fig. 4). Il peso fresco totale, tra i trattamenti B e C non si è dimostrato diverso, differenza che invece si osserva tra questi e il trattamento F, ma questa, come mostra la (Fig. 5) è data solo dalla parte aerea, in quanto il peso fresco della parte ipogea non presenta differenziazioni in nessuno dei 3 trattamenti. Nell'ambito dei pesi secchi epigeo e ipogeo, invece, non c'è alcuna differenza significativa in nessuno dei trattamenti, ma se si prendono in esame le percentuali di sostanza secca, ci sono delle differenze statisticamente significative (Fig. 6). In particolare, la percentuale della sostanza secca (s.s.) sulla biomassa aerea è significativamente maggiore sia in B che in C rispetto ad F, stessa situazione si è riscontrata sulla s.s. radicale. Nel trattamento F si è osservato una maggiore dispersione dei dati soprattutto nel numero delle foglie e nel peso fresco aereo (Fig. 3 e 7).

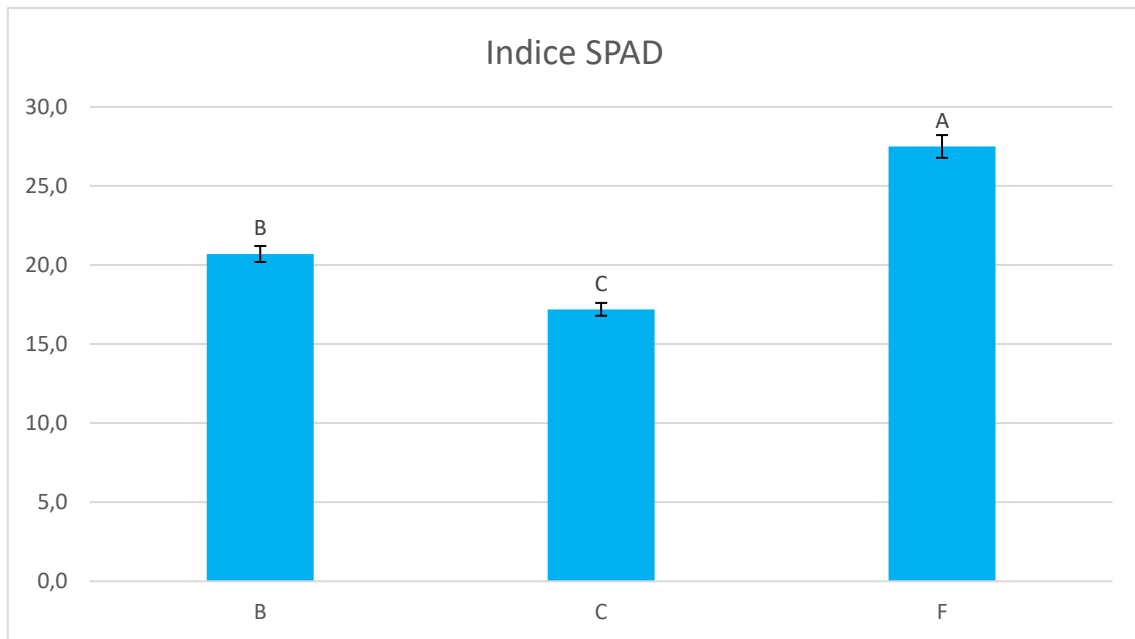


Figura 2: Effetto dei trattamenti di concimazione (B-biostimolante, C-controllo, F-fertilizzante) sull'indice SPAD in lattuga. Le colonne senza alcuna lettera in comune differiscono per  $P < 0.05$  secondo il Test HSD di Tukey.

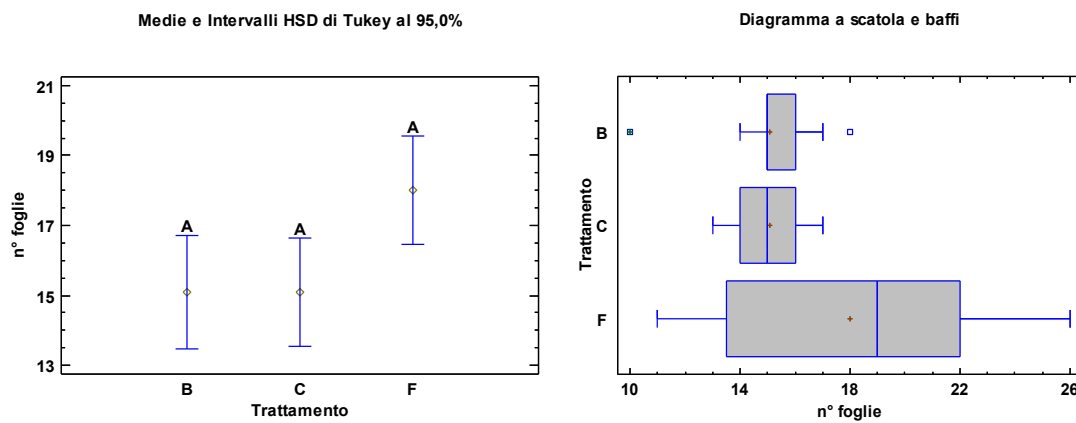


Figura 3: Effetto del trattamento di concimazione (B-biostimolante, C-controllo, F-fertilizzante) sul numero di foglie delle piante di lattuga. I valori senza alcuna lettera in comune differiscono per  $P < 0.05$  secondo il Test HSD di Tukey.

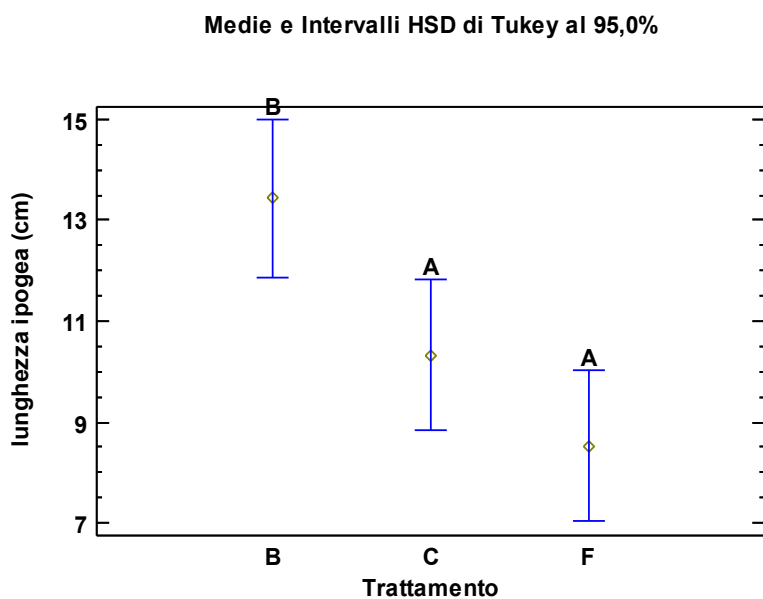


Figura 4: Effetto del trattamento di concimazione (B-biostimolante, C-controllo, F-fertilizzante) sulla lunghezza dell'apparato radicale. I valori senza alcuna lettera in comune differiscono significativamente per  $P < 0.05$  secondo il Test HSD di Tukey.

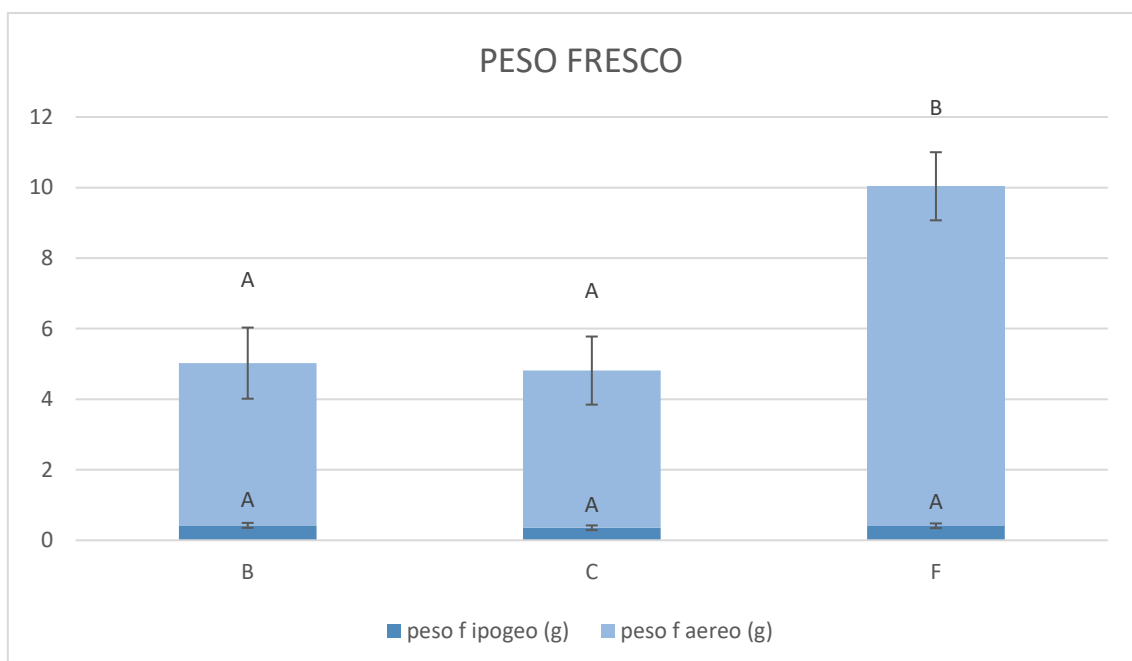


Figura 5: Effetto del trattamento di concimazione (B-biostimolante, C-controllo, F-fertilizzante) sul peso fresco epigeo ed ipogeo della pianta. I valori senza alcuna lettera in comune differiscono significativamente per  $P < 0.05$  secondo il Test HSD di Tukey.

Medie e Intervalli HSD di Tukey al 95,0%

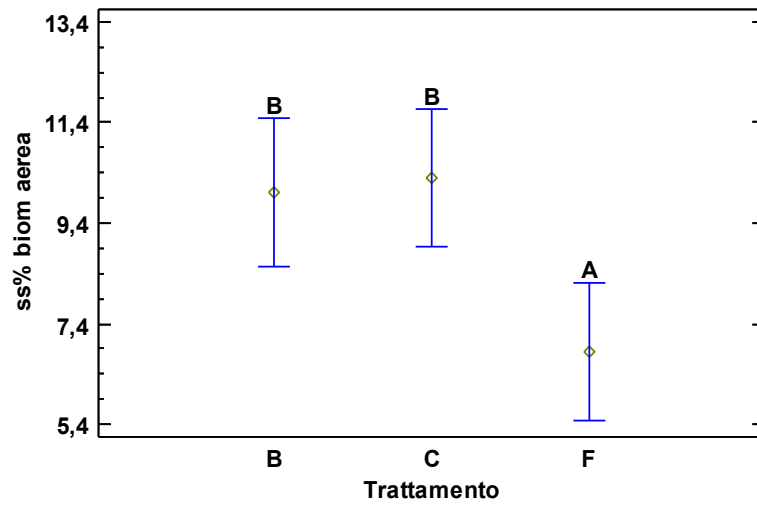
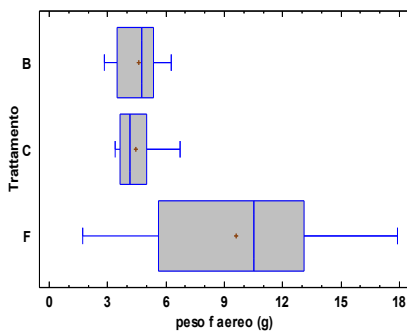


Figura 6: Effetto del trattamento di concimazione (B-biostimolante, C-controllo, F-fertilizzante) sulla percentuale di sostanza secca nella biomassa aerea. I valori senza alcuna lettera in comune differiscono significativamente per  $P < 0.05$  secondo il Test HSD di Tukey.

Diagramma a scatola e baffi



Medie e Intervalli HSD di Tukey al 95,0%

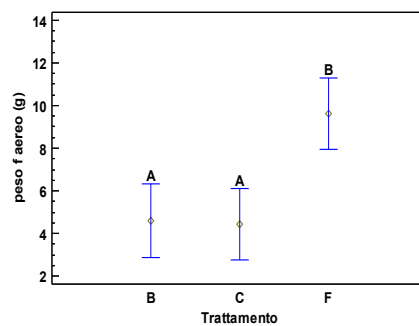


Figura 6: Effetto del trattamento di concimazione (B-biostimolante, C-controllo, F-fertilizzante) sul peso fresco aereo delle piante di lattuga. I valori senza alcuna lettera in comune differiscono per  $P < 0.05$  secondo il Test HSD di Tukey.

## 8 DISCUSSIONE

Alla luce dei risultati ottenuti dalle varie misurazioni e analisi statistiche effettuate, possiamo dedurre alcuni meccanismi che si sono verificati nelle piante trattate con prodotto biostimolante, prendendo in considerazione la letteratura scientifica a riguardo. I risultati dell'indice SPAD anche se da un lato il trattamento con il fertilizzante ha superato gli altri risultati, probabilmente in seguito alle condizioni nutrizionali ottimali. Si sottolinea il risultato delle piante a cui è stato somministrato il preparato biostimolante a base di microrganismi ed estratto di alga bruna. Possiamo osservare infatti, come i risultati di B siano significativamente maggiori di quelli C (Tab. 2), risultato assolutamente da non sottovalutare in quanto in condizioni assolutamente paragonabili a quelle del controllo; quindi, in assenza di somministrazione di nutrienti minerali il trattamento B ha superato di circa il 20 % il C. Per la relazione lineare di cui (Tab. 1) si può affermare che anche i contenuti di clorofilla a, b e totale sono significativamente superiori. Questo, in accordo con lo studio dell'azione biostimolante di una specie di *Bacillus* in lattuga di Arkhipova et al. (2005), può essere dovuto a una promozione da parte di *Bacillus spp.*, della produzione di citochinine con un loro conseguente aumento all'interno dei tessuti vegetali. Sappiamo infatti da Kusnetsov et al. (1994) e Paul et al. (1985), che questi ormoni sono responsabili dell'aumento di accumulo di pigmenti quali le clorofille e i carotenoidi; non è stato possibile effettuare l'analisi di questi ultimi, ma probabilmente avrebbero dato risultati simili. Inoltre, anche *Pseudomonas fluorescens* e gli estratti di alga bruna hanno evidenziato la capacità di influenzare la concentrazione interna di citochinine in molte specie (Aremu et al., 2016; Tsukanova et al., 2017). Anche nel caso dello studio di Roupael et al. (2020) con l'applicazione di un specie di *Trichoderma* in lattuga, l'indice SPAD è migliorato rispetto al controllo e questo può essere dovuto all'induzione del fungo alla produzione di sostanze antiossidanti come fenoli e glutatione, il quale agisce con l'acido ascorbico svolgendo azione antiossidante con la detossificazione delle specie reattive dell'ossigeno (RO), proteggendo la pianta e aumentando così il tasso fotosintetico (Carillo et al., 2019a, 2019b). Inoltre nello studio di Roupael et al. (2020), anche in condizioni di N sovra ottimale l'applicazione biostimolante, oltre a migliorare significativamente il contenuto di N e lo SPAD, ha ridotto il contenuto di nitrati (riducendo i possibili problemi che essi possono causare vedi 2.1.2) senza influenzare il tasso di assimilazione della CO<sub>2</sub> e l'accumulo di nutrienti benefici, per i quali invece, in condizioni sovra ottimali, si osserva spesso un peggioramento (Wang et al., 2008).

Tabella 2: Effetto della concimazione sull'indice SPAD e le variazioni di esso rispetto al controllo.

Trattamento	Media	Significatività (P<0.05)	Variazioni % rispetto C
Controllo	17,21	A	0%
Biostimolante	20,72	B	20,40%
Fertilizzante	27,47	C	59,63%

Per il numero delle foglie non è stata osservata nessuna differenza significativa in nessuno dei 3 trattamenti, perché probabilmente l'attività di promozione della crescita del biostimolante verte più sulla promozione della moltiplicazione e distensione cellulare rispetto all'aumento del numero di organi, infatti nemmeno nel caso della fertilizzazione minerale vediamo un discostamento significativo, in cui vediamo però una variabilità dei dati molto più accentuata rispetto agli altri trattamenti, e questo probabilmente è spiegato dal fatto che il numero di foglie come altri organi vegetali è già predeterminato geneticamente e le condizioni favorevoli agiscono solo sul loro sviluppo più o meno accentuato. Osserviamo la stessa situazione sull'altezza dell'apparato fogliare in cui non vi è alcuna differenza significativa fra i tre gruppi. Se si considera il peso fresco aereo, invece, emergono dati sovrapponibili tra C e B ma con una differenza notevole tra questi ed F dovuta proprio alla somministrazione di elementi minerali. Quest'ultima ha promosso, probabilmente, l'assorbimento di acqua aumentando quindi significativamente il peso della biomassa aerea. La causa del fatto che il trattamento B non abbia significativamente aumentato il peso fresco né quello ipogeo né epigeo rispetto al controllo, può essere ricercata nella notevole promozione, del biostimolante, della crescita radicale. In accordo con altri studi in colture orticole nel nostro studio si è rilevato una notevole e significativa differenza della lunghezza radicale di B rispetto sia a F che a C, fra i quali non si è palesata nessuna differenza. Nel caso della lunghezza radicale osserviamo (Tab. 3) uno scostamento di B rispetto a C e a F rispettivamente di circa il 30% e del 57% e tra C e F di circa il 21%. Questo è spiegabile chiaramente dal fatto che, se l'apparato radicale trova a disposizione gli elementi minerali sufficienti per la sua crescita come nel caso di F non ha alcun motivo di continuare la crescita. Situazione diversa invece nel confronto fra B e C i quali non hanno ricevuto nessun elemento minerale e per questo non ci dovrebbe essere alcuna motivazione per la differenza osservata, se non appunto a causa dell'azione biostimolante. *Bacillus spp.*, infatti, è noto per sintetizzare ormoni vegetali come gibberelline e auxine e quest'ultime sappiamo che inducono la crescita radicale in accordo con Idris et al. (2007) che hanno osservato che i ceppi di *Bacillus* con carenza di IAA erano meno efficaci nel promuovere la crescita delle piante rispetto ai batteri



biosintetici di IAA attivi. Allo stesso tempo la biosintesi delle gibberelline varia di specie in specie di *Bacillus* (Kang et al., 2015) ed anche questo potrebbe essere una spiegazione della mancata differenza nella crescita aerea.

Tabella 3: Confronto tra i trattamenti di concimazione e le differenze assolute e percentuali della lunghezza radicale fra i trattamenti.

Confronto	Differenze	Dif. %
B-C*	3,10	30,03
B-F*	4,90	57,46
C-F	1,80	21,09

\* indica una differenza statisticamente significativa per  $P < 0.05$  secondo il Test HSD di Tukey.

Azione sinergica o altra spiegazione potrebbe essere ricercata nell'azione del *Trichoderma*, infatti, risultati di significativo miglioramento della crescita radicale si sono osservati e sono documentati in letteratura. Lo studio di Rouphael et al. (2020) in lattuga ha consentito di evidenziare l'azione di promozione e rimodellamento della crescita radicale da parte di *Trichoderma* che ha determinato una risposta di acquisizione dei nutrienti, migliorando l'efficienza dell'uso delle risorse ed ha migliorato la produzione di biomassa vegetale e la qualità dei prodotti. Nel caso in oggetto non si è riscontrato un miglioramento di B né nella biomassa aerea né in quella ipogea, ma si è osservata una % di sostanza secca sia aerea sia ipogea significativamente maggiore di F questo ci suggerisce che in realtà la maggiore biomassa aerea prodotta da F è solo causata da un maggiore contenuto di acqua. Ovviamente però questo è un parametro importantissimo in quanto il valore commerciale è dato appunto dal peso fresco, il quale non è stato migliorato significativamente dal trattamento biostimolante. A proposito di questo si possono considerare numerose ipotesi dei risultati contrastanti con la letteratura scientifica, come per esempio possibili interazioni negative tra i vari microrganismi contenuti nel biostimolante in quanto appunto, come già riportato, si sa che i PGPR o i PGPB promuovono la crescita delle piante, ma molto spesso non si conosce a fondo le interazioni tra di essi. Per esempio *Pseudomonas fluorescens*, oltre a competere in modo aggressivo con altri microrganismi, produce una gamma di composti tra cui le pseudomonadi che sono responsabili della soppressione naturale di alcuni microorganismi del suolo (David et al., 2018). Inoltre, alcuni composti volatili, che tra l'altro possono promuovere la SAR<sup>3</sup>, da essi prodotti possono avere effetti negativi nella crescita delle piante (Song e Ryu, 2013). Anche gli estratti di alga bruna possono avere effetti indesiderati; infatti a seconda della loro concentrazione possono avere diverse azioni, ad alte

<sup>3</sup> systemic acquired resistance (SAR)

concentrazioni, per esempio, possono inibire la crescita delle piante (Battacharyya et al., 2015) altra possibile spiegazione al mancato aumento di resa. Parallelamente contengono fitormoni quali l'IAA, che potrebbe essere un'ulteriore spiegazione dell'aumento di crescita radicale registrato. Dato, che è comunque importante in quanto un aumento della lunghezza radicale può essere utilizzato per aumentare la resilienza vegetale e per sfruttare le riserve di acqua più in profondità, in situazioni di stress idrico temporaneo o di coltivazione in suoli aridi, implementando quindi le tecniche già esistenti utilizzabili in agricoltura di grande o piccola scala come possono essere quelle di sussistenza.

## 9 CONCLUSIONI

I biostimolanti definiti come sostanze o microrganismi che applicati alle piante migliorano efficienza nutrizionale, tolleranza agli stress abiotici e/o i tratti qualitativi delle colture, indipendentemente dal contenuto di nutrienti; sono uno strumento che potrebbe aiutare l'agricoltura mondiale a perseguire uno sviluppo sostenibile e a lavorare per raggiungere alcuni degli obiettivi che l'agenda dell'ONU ha prefissato per il 2030.

Esistono moltissime sostanze con effetto biostimolante che hanno avuto tutti effetti positivi e quanto meno promettenti, in agricoltura e in orticoltura, tra cui, sostanze umiche, amminoacidi o complessati proteici e biopolimeri. Ma esistono anche microrganismi con questo effetto, che essendo vivi e moltiplicabili possono fornire un effetto duraturo nel tempo al contrario di molecole, le quali una volta assorbite o degradate non hanno più alcuna influenza. Esistono, inoltre, alghe che si possono usare vive come le microalghe o si possono applicare alcuni loro estratti, funghi e batteri. Per lo studio svolto in lattuga si sono usati appunto questi ultimi, con risultati non del tutto coincidenti con quelli attesi e con quelli riportati in bibliografia ma del tutto incoraggianti. Si è usata infatti una miscela biostimolante che non ha precedenti nella bibliografia consultata ad oggi, quindi con interazioni tra gli attori di questa, sconosciuti. In ogni caso promettente l'osservato aumento significativo contenuto di clorofilla a livello fogliare e un aumento apprezzabile della crescita radicale sia rispetto al controllo sia rispetto alle piante fertilizzate. Risultati che, anche se non vi è stato l'atteso aumento della resa, sono incoraggianti per proseguire con gli studi futuri, anzitutto sulle relazioni che si possono instaurare, anche negative, tra i vari microrganismi utilizzati come biostimolanti ma anche sull'utilizzo della stessa miscela in condizioni di stress idrico e osservare se la crescita radicale in profondità è efficace per una possibile successiva applicazione in zone in difficoltà idrica, che sappiamo stanno aumentando in tutto il mondo. In generale è auspicabile l'avanzare della ricerca su questo tipo di composti, ma non solo di tipo accademico, ma anche un'analisi di tipo agronomico sul loro utilizzo a larga scala in orticoltura per proseguire nel raggiungimento degli obiettivi di sostenibilità. Sostenibilità che è necessario vagliare in tutte le sue sfaccettature, anche di tipo economico per mettere in condizione i professionisti del settore di potere utilizzare questi nuovi strumenti, per assicurare la sicurezza alimentare e la salvaguardia ambientale.



## BIBLIOGRAFIA

- Alavi, P., Starcher, M.R., Zachow, C., Müller, H., Berg, G., 2013. Root-microbe systems: the effect and mode of interaction of Stress Protecting Agent (SPA) *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405T. *Front. Plant Sci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00141>
- Alewell, C., Ringeval, B., Ballabio, C., Robinson, D.A., Panagos, P., Borrelli, P., 2020. Global phosphorus shortage will be aggravated by soil erosion. *Nat. Commun.* 11, 4546. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18326-7>
- Aremu, A.O., Plačková, L., Novák, O., Stirk, W.A., Doležal, K., Van Staden, J., 2016. Cytokinin profiles in ex vitro acclimatized *Eucomis autumnalis* plants pre-treated with smoke-derived karrikinolide. *Plant Cell Rep.* 35, 227–238.
- Arkhipova, T.N., Veselov, S.U., Melentiev, A.I., Martynenko, E.V., Kudoyarova, G.R., 2005. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant Soil* 272, 201–209. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-5047-x>
- Armada, E., Portela, G., Roldán, A., Azcón, R., 2014. Combined use of beneficial soil microorganism and agrowaste residue to cope with plant water limitation under semiarid conditions. *Geoderma* 232–234, 640–648. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.06.025>
- Aslan, S., Zennaro, F., Furlan, E., Critto, A., 2022. Recurrent neural networks for water quality assessment in complex coastal lagoon environments: A case study on the Venice Lagoon. *Environ. Model. Softw.* 154, 105403. <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2022.105403>
- Barnawal, D., Maji, D., Bharti, N., Chanotiya, C.S., Kalra, A., 2013. ACC Deaminase-Containing *Bacillus subtilis* Reduces Stress Ethylene-Induced Damage and Improves Mycorrhizal Colonization and Rhizobial Nodulation in *Trigonella foenum-graecum* Under Drought Stress. *J. Plant Growth Regul.* 32, 809–822. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9347-3>
- Battacharyya, D., Babgohari, M.Z., Rathor, P., Prithviraj, B., 2015. Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* 196, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.012>
- Behie, S.W., Bidochka, M.J., 2014. Nutrient transfer in plant–fungal symbioses. *Trends Plant Sci.* 19, 734–740. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.06.007>
- Bhupenchandra, I., Chongtham, S.K., Devi, E.L., R., R., Choudhary, A.K., Salam, M.D., Sahoo, M.R., Bhutia, T.L., Devi, S.H., Thounaojam, A.S., Behera, C., M. N., Harish., Kumar, A., Dasgupta, M., Devi, Y.P., Singh, D., Bhagowati, S., Devi, C.P., Singh, H.R., Khaba, C.I., 2022. Role of biostimulants in mitigating the effects of climate change on crop performance. *Front. Plant Sci.* 13, 967665. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.967665>
- Bonfante, P., Genre, A., 2010. Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat. Commun.* 1, 48. <https://doi.org/10.1038/ncomms1046>
- Boomsma, C.R., Vyn, T.J., 2008. Maize drought tolerance: Potential improvements through arbuscular mycorrhizal symbiosis? *Field Crops Res.* 108, 14–31. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.03.002>
- Borlaug, N., n.d. Feeding a Hungry World.
- Botta, A., 2012. Enhancing plant tolerance to temperature stress with amino acids: An approach to their mode of action. Presented at the *Acta Horticulturae*, pp. 29–36.

- Browne, P., Rice, O., Miller, S.H., Burke, J., Dowling, D.N., Morrissey, J.P., O’Gara, F., 2009. Superior inorganic phosphate solubilization is linked to phylogeny within the *Pseudomonas fluorescens* complex. *Appl. Soil Ecol.* 43, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.06.010>
- Bulgari, R., Cocetta, G., Trivellini, A., Vernieri, P., Ferrante, A., 2015. Biostimulants and crop responses: a review. *Biol. Agric. Hortic.* 31, 1–17. <https://doi.org/10.1080/01448765.2014.964649>
- Bulgari, R., Franzoni, G., Ferrante, A., 2019. Biostimulants Application in Horticultural Crops under Abiotic Stress Conditions. *Agronomy* 9, 306. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060306>
- Burney, J.A., Davis, S.J., Lobell, D.B., 2010. Greenhouse gas mitigation by agricultural intensification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 12052–12057. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914216107>
- Calvo, P., Nelson, L., Kloepper, J.W., 2014. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil* 383, 3–41. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
- Canbolat, M.Y., Bilen, S., Çakmakçı, R., Şahin, F., Aydın, A., 2006. Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biol. Fertil. Soils* 42, 350–357. <https://doi.org/10.1007/s00374-005-0034-9>
- Canellas, L.P., Dobbss, L.B., Oliveira, A.L., Chagas, J.G., Aguiar, N.O., Rumjanek, V.M., Novotny, E.H., Olivares, F.L., Spaccini, R., Piccolo, A., 2012. Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. *Eur. J. Soil Sci.* 63, 315–324. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2012.01439.x>
- Caradonia, F., Battaglia, V., Righi, L., Pascali, G., La Torre, A., 2019. Plant Biostimulant Regulatory Framework: Prospects in Europe and Current Situation at International Level. *J. Plant Growth Regul.* 38, 438–448. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9853-4>
- Carillo, P., Colla, G., El-Nakhel, C., Bonini, P., D’Amelia, L., Dell’Aversana, E., Pannico, A., Giordano, M., Sifola, M.I., Kyriacou, M.C., De Pascale, S., Rouphael, Y., 2019a. Biostimulant Application with a Tropical Plant Extract Enhances *Corchorus olitorius* Adaptation to Sub-Optimal Nutrient Regimens by Improving Physiological Parameters. *Agronomy* 9. <https://doi.org/10.3390/agronomy9050249>
- Carillo, P., Colla, G., Fusco, G.M., Dell’Aversana, E., El-Nakhel, C., Giordano, M., Pannico, A., Cozzolino, E., Mori, M., Reynaud, H., Kyriacou, M.C., Cardarelli, M., Rouphael, Y., 2019b. Morphological and Physiological Responses Induced by Protein Hydrolysate-Based Biostimulant and Nitrogen Rates in Greenhouse Spinach. *Agronomy* 9. <https://doi.org/10.3390/agronomy9080450>
- Castaigns, L., Marchive, C., Meyer, C., Krapp, A., 2011. Nitrogen signalling in *Arabidopsis*: how to obtain insights into a complex signalling network. *J. Exp. Bot.* 62, 1391–1397. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq375>
- Castelli, F., Contillo, R., Miceli, F., 1996. Non-destructive determination of leaf chlorophyll content in four crop species. *J. Agron. Crop Sci.* 177, 275–283. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.1996.tb00246.x>

- Cerdán, M., Sánchez-Sánchez, A., Oliver, M., Juárez, M., Sánchez-Andreu, J.J., 2009. EFFECT OF FOLIAR AND ROOT APPLICATIONS OF AMINO ACIDS ON IRON UPTAKE BY TOMATO PLANTS. *Acta Hortic.* 481–488. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.830.68>
- Choudhary, D.K., Sharma, K.P., Gaur, R.K., 2011. Biotechnological perspectives of microbes in agro-ecosystems. *Biotechnol. Lett.* 33, 1905–1910. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0662-0>
- Coelho, L.F., Dos Santos Freitas, S., De Melo, A.M.T., Ambrosano, G.M.B., 2007. Interaction of fluorescent pseudomonads and bacillus spp. with distinct plant rhizospheres. *Rev. Bras. Cienc. Solo* 31, 1413–1420. <https://doi.org/10.1590/s0100-06832007000600018>
- Colla, G., Hoagland, L., Ruzzi, M., Cardarelli, M., Bonini, P., Canaguier, R., Rouphael, Y., 2017. Biostimulant Action of Protein Hydrolysates: Unraveling Their Effects on Plant Physiology and Microbiome. *Front. Plant Sci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02202>
- Colla, G., Nardi, S., Cardarelli, M., Ertani, A., Lucini, L., Canaguier, R., Rouphael, Y., 2015a. Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* 196, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.037>
- Colla, G., Rouphael, Y., 2015. Biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* 196, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.044>
- Colla, G., Rouphael, Y., Canaguier, R., Svecova, E., Cardarelli, M., 2014. Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. *Front. Plant Sci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00448>
- Colla, G., Rouphael, Y., Di Mattia, E., El-Nakhel, C., Cardarelli, M., 2015b. Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. *J. Sci. Food Agric.* 95, 1706–1715. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6875>
- Colla, G., Rouphael, Y., Di Mattia, E., El-Nakhel, C., Cardarelli, M., 2015c. Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. *J. Sci. Food Agric.* 95, 1706–1715. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6875>
- Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., López-Bucio, J., 2009. *Trichoderma virens*, a Plant Beneficial Fungus, Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root Growth through an Auxin-Dependent Mechanism in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 149, 1579–1592. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130369>
- Copenhaver, M.D., Holland, B., 1988. Computation of the distribution of the maximum studentized range statistic with application to multiple significance testing of simple effects. *J. Stat. Comput. Simul.* 30, 1–15.
- Cordell, D., Drangert, J.-O., White, S., 2009. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Glob. Environ. Change* 19, 292–305. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009>
- Cordell, D., White, S., 2011. Peak Phosphorus: Clarifying the Key Issues of a Vigorous Debate about Long-Term Phosphorus Security. *Sustainability* 3, 2027–2049. <https://doi.org/10.3390/su3102027>
- Craigie, J.S., 2011. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *J. Appl. Phycol.* 23, 371–393. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9560-4>

- Dalpe, Y., Monreal, M., 2004. Arbuscular Mycorrhiza Inoculum to Support Sustainable Cropping Systems. *Crop Manag.* 3, 1–11. <https://doi.org/10.1094/CM-2004-0301-09-RV>
- David, B.V., Chandrasehar, G., Selvam, P.N., 2018. *Pseudomonas fluorescens*: A Plant-Growth-Promoting Rhizobacterium (PGPR) With Potential Role in Biocontrol of Pests of Crops, in: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Crop Improvement through Microbial Biotechnology*. pp. 221–243. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63987-5.00010-4>
- Delwiche, C.C., 1970. The Nitrogen Cycle. *Sci. Am.* 223, 136–146. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0970-136>
- Dey, R., Pal, K.K., Bhatt, D.M., Chauhan, S.M., 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res.* 159, 371–394. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.08.004>
- du Jardin, P., 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hortic.* 196, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- du Jardin, P., 2012. The Science of Plant Biostimulants—A bibliographic analysis, Ad hoc study report. EEA, 2013. EMEP / technical guidance to prepare national emission inventories. Publications Office, Luxembourg.
- Eisenberg, D.S., Crothers, D.M., 1979. *Physical chemistry : with applications to the life sciences*. Benjamin/Cummings Pub. Co. Menlo Park, Calif., Menlo Park, Calif.
- Erisman, J.W., Domburg, N., De Vries, W., Kros, H., De Haan, B., Sanders, K., 2005. The Dutch N-cascade in the European perspective. *Sci. China C Life Sci.* 48, 827–842. <https://doi.org/10.1007/BF03187122>
- Eyheraguibel, B., Silvestre, J., Morard, P., 2008. Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. *Bioresour. Technol.* 99, 4206–4212. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.082>
- Fernández Bidondo, L., Bompadre, J., Pergola, M., Silvani, V., Colombo, R., Bracamonte, F., Godeas, A., 2012. Differential interaction between two *Glomus* intraradices strains and a phosphate solubilizing bacterium in maize rhizosphere. *Pedobiologia* 55, 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2012.04.001>
- Ferri, M., Franceschetti, M., Naldrett, M.J., Saalbach, G., Tassoni, A., 2014. Effects of chitosan on the protein profile of grape cell culture subcellular fractions. *ELECTROPHORESIS* 35, 1685–1692. <https://doi.org/10.1002/elps.201300624>
- Fixen, P.E., 2009. World fertilizer nutrient reserves-a view to the future. *Better Crops Plant Food* 93, 8–11.
- Foley, J.A., Ramankutty, N., Brauman, K.A., Cassidy, E.S., Gerber, J.S., Johnston, M., Mueller, N.D., O'Connell, C., Ray, D.K., West, P.C., Balzer, C., Bennett, E.M., Carpenter, S.R., Hill, J., Monfreda, C., Polasky, S., Rockström, J., Sheehan, J., Siebert, S., Tilman, D., Zaks, D.P.M., 2011. Solutions for a cultivated planet. *Nature* 478, 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature10452>
- Gajc-Wolska, J., Spizewski, T., Grabowska, A., 2013. THE EFFECT OF SEAWEED EXTRACTS ON THE YIELD AND QUALITY PARAMETERS OF BROCCOLI (*BRASSICA OLERACEA* VAR. *CYMOSA* L.) IN OPEN FIELD PRODUCTION. *Acta Hortic.* 83–89. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1009.9>



- Galloway, J.N., Aber, J.D., Erisman, J.W., Seitzinger, S.P., Howarth, R.W., Cowling, E.B., Cosby, B.J., 2003. The Nitrogen Cascade. *BioScience* 53, 341. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2003\)053\[0341:TNC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2003)053[0341:TNC]2.0.CO;2)
- Galloway, J.N., Dentener, F.J., Capone, D.G., Boyer, E.W., Howarth, R.W., Seitzinger, S.P., Asner, G.P., Cleveland, C.C., Green, P.A., Holland, E.A., Karl, D.M., Michaels, A.F., Porter, J.H., Townsend, A.R., Voesmer, C.J., 2004. Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. *Biogeochemistry* 70, 153–226. <https://doi.org/10.1007/s10533-004-0370-0>
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martinelli, L.A., Seitzinger, S.P., Sutton, M.A., 2008. Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. *Science* 320, 889–892. <https://doi.org/10.1126/science.1136674>
- Garnier, J., Billen, G., Aguilera, E., Lassaletta, L., Einarsson, R., Serra, J., Cameira, M.D.R., Marques-dos-Santos, C., Sanz-Cobena, A., 2023. How much can changes in the agro-food system reduce agricultural nitrogen losses to the environment? Example of a temperate-Mediterranean gradient. *J. Environ. Manage.* 337, 117732. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117732>
- Gassmann, W., Rubio, F., Schroeder, J.I., 1996. Alkali cation selectivity of the wheat root high-affinity potassium transporter HKT1. *Plant J.* 10, 869–882. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10050869.x>
- Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, M.-N., van Tuinen, D., Redecker, D., Wipf, D., 2010. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20, 519–530. <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0333-3>
- Glick, B.R., 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Spec. Issue Plant Growth Promot.* 169, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>
- Gómez, I., Chet, I., Herrera-Estrella, A., 1997. Genetic diversity and vegetative compatibility among *Trichoderma harzianum* isolates. *Mol. Gen. Genet.* 256, 127–135. <https://doi.org/10.1007/s004380050554>
- GPRI Global Phosphorus Research Initiative, 2010. Statement on Global Phosphorus Scarcity.
- Gupta, S., Stirk, W.A., Plačková, L., Kulkarni, M.G., Doležal, K., Van Staden, J., 2021. Interactive effects of plant growth-promoting rhizobacteria and a seaweed extract on the growth and physiology of *Allium cepa* L. (onion). *J. Plant Physiol.* 262, 153437. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153437>
- Hadwiger, L.A., 2013. Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid science or hype. *Plant Sci.* 208, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.03.007>
- Halpern, M., Bar-Tal, A., Ofek, M., Minz, D., Muller, T., Yermiyahu, U., 2015. The Use of Biostimulants for Enhancing Nutrient Uptake, in: *Advances in Agronomy*. Elsevier, pp. 141–174. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2014.10.001>
- Hamel, C., 2007. *Mycorrhizae in crop production*. CRC Press.
- Hansen, J., 2018. EU must get serious about promoting the circular economy. URL <https://www.theparliamentmagazine.eu/articles/partner/article/fertilizers-Eur.-Must-Get-Serious-About-promoting-Circ.-Econ>. Acesso Em 18.

- Harrier, L.A., Watson, C.A., 2004. The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. *Pest Manag. Sci.* 60, 149–157. <https://doi.org/10.1002/ps.820>
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I., 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann. Microbiol.* 60, 579–598. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>
- Idris, E.E., Iglesias, D.J., Talon, M., Borriss, R., 2007. Tryptophan-dependent production of Indole-3-Acetic Acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 20, 619–626. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-6-0619>
- Iriti, M., Picchi, V., Rossoni, M., Gomarasca, S., Ludwig, N., Gargano, M., Faoro, F., 2009. Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. *Environ. Exp. Bot.* 66, 493–500. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.01.004>
- Jindo, K., Martim, S.A., Navarro, E.C., Pérez-Alfocea, F., Hernandez, T., Garcia, C., Aguiar, N.O., Canellas, L.P., 2012. Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. *Plant Soil* 353, 209–220. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1024-3>
- Jisha, M.S., Alagawadi, A.R., 1996. Nutrient uptake and yield of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) inoculated with phosphate solubilizing bacteria and cellulolytic fungus in a cotton stalk amended vertisol. *Microbiol. Res.* 151, 213–217. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(96\)80046-2](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(96)80046-2)
- Johnson, N.C., Graham, J.H., 2013. The continuum concept remains a useful framework for studying mycorrhizal functioning. *Plant Soil* 363, 411–419. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1406-1>
- K, S.Y., M, D.L., C, H.H., 2011. Effects of single and combined inoculations of selected *Trichoderma* and *Bacillus* isolates on growth of dry bean and biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 8746–8756. <https://doi.org/10.5897/AJB10.2213>
- Kang, S.-M., Radhakrishnan, R., Lee, K.-E., You, Y.-H., Ko, J.-H., Kim, J.-H., Lee, I.-J., 2015. Mechanism of plant growth promotion elicited by *Bacillus* sp. LKE15 in oriental melon. *Acta Agric. Scand. Sect. B — Soil Plant Sci.* 65, 637–647. <https://doi.org/10.1080/09064710.2015.1040830>
- Kang, S.-M., Radhakrishnan, R., You, Y.-H., Joo, G.-J., Lee, I.-J., Lee, K.-E., Kim, J.-H., 2014. Phosphate Solubilizing *Bacillus megaterium* mj1212 Regulates Endogenous Plant Carbohydrates and Amino Acids Contents to Promote Mustard Plant Growth. *Indian J. Microbiol.* 54, 427–433. <https://doi.org/10.1007/s12088-014-0476-6>
- Katiyar, D., Hemantaranjan, A., Singh, B., 2015. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. *Indian J. Plant Physiol.* 20, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s40502-015-0139-6>
- Kauffman, G.L., Kneivel, D.P., Watschke, T.L., 2007. Effects of a Biostimulant on the Heat Tolerance Associated with Photosynthetic Capacity, Membrane Thermostability, and Polyphenol Production of Perennial Ryegrass. *Crop Sci.* 47, 261–267. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.03.0171>
- Khan, W., Rayirath, U.P., Subramanian, S., Jithesh, M.N., Rayorath, P., Hodges, D.M., Critchley, A.T., Craigie, J.S., Norrie, J., Prithviraj, B., 2009. Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth

- and Development. *J. Plant Growth Regul.* 28, 386–399. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9103-x>
- Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., Hoyerova, K., Tillard, P., Leon, S., Ljung, K., Zazimalova, E., Benkova, E., Nacry, P., Gojon, A., 2010. Nitrate-Regulated Auxin Transport by NRT1.1 Defines a Mechanism for Nutrient Sensing in Plants. *Dev. Cell* 18, 927–937. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.008>
- Kuan, K.B., Othman, R., Abdul Rahim, K., Shamsuddin, Z.H., 2016. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Inoculation to Enhance Vegetative Growth, Nitrogen Fixation and Nitrogen Remobilisation of Maize under Greenhouse Conditions. *PLOS ONE* 11, e0152478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152478>
- Kusnetsov, V.V., Oelmüller, R., Sarwat, M.I., Porfirova, S.A., Cherepneva, G.N., Herrmann, R.G., Kulaeva, O.N., 1994. Cytokinins, abscisic acid and light affect accumulation of chloroplast proteins in *Lupinus luteus* cotyledons without notable effect on steady-state mRNA levels: specific protein response to light/phytohormone interaction. *Planta* 194, 318–327.
- Lai, W.-A., Rekha, P.D., Arun, A.B., Young, C.-C., 2008. Effect of mineral fertilizer, pig manure, and *Azospirillum rugosum* on growth and nutrient contents of *Lactuca sativa* L. *Biol. Fertil. Soils* 45, 155–164. <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0313-3>
- León, A.P., Viña, S.Z., Frezza, D., Chaves, A., Chiesa, A., 2007. Estimation of chlorophyll contents by correlations between SPAD-502 meter and chroma meter in butterhead lettuce. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 38, 2877–2885. <https://doi.org/10.1080/00103620701663115>
- Lisiecka, J., Knaflewski, M., Spizewski, T., Frąszczak, B., Kałużewicz, A., Krzesiński, W., 2011. The effect of animal protein hydrolysate on quantity and quality of strawberry daughter plants cv. “Elsanta.” *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* 10, 31–40.
- Liu, F., Xing, S., Ma, H., Du, Z., Ma, B., 2013. Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9155–9164. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5193-2>
- Lobell, D.B., Cassman, K.G., Field, C.B., 2009. Crop Yield Gaps: Their Importance, Magnitudes, and Causes. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 34, 179–204. <https://doi.org/10.1146/annurev.enviro.041008.093740>
- López-Bucio, J., Pelagio-Flores, R., Herrera-Estrella, A., 2015. Trichoderma as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Sci. Hortic.* 196, 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.043>
- Lucini, L., Roupael, Y., Cardarelli, M., Canaguier, R., Kumar, P., Colla, G., 2015. The effect of a plant-derived biostimulant on metabolic profiling and crop performance of lettuce grown under saline conditions. *Sci. Hortic.* 182, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.022>
- MacDonald, G.K., Bennett, E.M., Potter, P.A., Ramankutty, N., 2011. Agronomic phosphorus imbalances across the world’s croplands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 3086–3091. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010808108>
- Mann, C.C., 1999. Crop Scientists Seek a New Revolution. *Science* 283, 310–314. <https://doi.org/10.1126/science.283.5400.310>

- Mantelin, S., Desbrosses, G., Larcher, M., Tranbarger, T.J., Cleyet-Marel, J.-C., Touraine, B., 2006. Nitrate-dependent control of root architecture and N nutrition are altered by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* sp. *Planta* 223, 591–603. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0106-y>
- Markwell, J., Osterman, J.C., Mitchell, J.L., 1995. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Photosynth. Res.* 46, 467–472. <https://doi.org/10.1007/BF00032301>
- Mercier, L., Lafitte, C., Borderies, G., Briand, X., Esquerré-Tugayé, M.-T., Fournier, J., 2001. The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant defence. *New Phytol.* 149, 43–51. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00011.x>
- Minolta, K., 1989. Chlorophyll meter SPAD-502 instruction manual. Minolta Co Ltd Radiom. Instrum. Oper. Osaka Jpn. 22.
- Monje, O.A., Bugbee, B., 1992. Inherent limitations of nondestructive chlorophyll meters: a comparison of two types of meters. *HortScience Publ. Am. Soc. Hortic. Sci.* 27, 69–71. <https://doi.org/10.21273/hortsci.27.1.69>
- Nadeem, S.M., Shaharoon, B., Arshad, M., Crowley, D.E., 2012. Population density and functional diversity of plant growth promoting rhizobacteria associated with avocado trees in saline soils. *Appl. Soil Ecol.* 62, 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.08.005>
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Reniero, F., Rascio, N., 2000. Chemical and Biochemical Properties of Humic Substances Isolated from Forest Soils and Plant Growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64, 639–645. <https://doi.org/10.2136/sssaj2000.642639x>
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Schiavon, M., Ertani, A., 2016. Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. *Sci. Agric.* 73, 18–23. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0006>
- Nedelciu, C.E., Ragnarsdottir, K.V., Schlyter, P., Stjernquist, I., 2020. Global phosphorus supply chain dynamics: Assessing regional impact to 2050. *Glob. Food Secur.* 26, 100426. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2020.100426>
- Norrie, J., Keathley, J.P., 2006. BENEFITS OF ASCOPHYLLUM NODOSUM MARINE-PLANT EXTRACT APPLICATIONS TO ‘THOMPSON SEEDLESS’ GRAPE PRODUCTION. *Acta Hort.* 243–248. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.727.27>
- Obersteiner, M., Peñuelas, J., Ciais, P., Van Der Velde, M., Janssens, I.A., 2013. The phosphorus trilemma. *Nat. Geosci.* 6, 897–898. <https://doi.org/10.1038/ngeo1990>
- Paul, K., Sorrentino, M., Lucini, L., Roupheal, Y., Cardarelli, M., Bonini, P., Reynaud, H., Canaguier, R., Trtílek, M., Panzarová, K., Colla, G., 2019. Understanding the Biostimulant Action of Vegetal-Derived Protein Hydrolysates by High-Throughput Plant Phenotyping and Metabolomics: A Case Study on Tomato. *Front. Plant Sci.* 10, 47. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00047>
- Paul, Y., Kaur, S., Sharma, B.N., 1985. Effect of kinetin (6-furfuryl aminopurine) on changes in lipids in relation to growth of excised cotyledons of squashmelon (*Citrullus vulgaris* var. *Fistulosus*). *Plant Sci.* 41, 193–198.
- Penuelas, J., Coello, F., Sardans, J., 2023. A better use of fertilizers is needed for global food security and environmental sustainability. *Agric. Food Secur.* 12, 5. <https://doi.org/10.1186/s40066-023-00409-5>

- Pingali, P.L., 2012. Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 12302–12308. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912953109>
- Porra, R.J., Thompson, W.A., Kriedemann, P.E., 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *BBA - Bioenerg.* 975, 384–394. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(89\)80347-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(89)80347-0)
- Potter, P., Ramankutty, N., Bennett, E.M., Donner, S.D., 2010. Characterizing the Spatial Patterns of Global Fertilizer Application and Manure Production. *Earth Interact.* 14, 1–22. <https://doi.org/10.1175/2009EI288.1>
- Pourbabaee, A.A., Bahmani, E., Alikhani, H.A., Emami, S., 2016. Promotion of wheat growth under salt stress by halotolerant bacteria containing ACC deaminase.
- Povero, G., Loreti, E., Pucciariello, C., Santaniello, A., Di Tommaso, D., Di Tommaso, G., Kapetis, D., Zolezzi, F., Piaggese, A., Perata, P., 2011. Transcript profiling of chitosan-treated Arabidopsis seedlings. *J. Plant Res.* 124, 619–629. <https://doi.org/10.1007/s10265-010-0399-1>
- Probanza, A., Lucas, J.A., Acero, N., Gutierrez Mañero, F.J., 1996. The influence of native rhizobacteria on european alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) growth 1. Characterization of growth promoting and growth inhibiting bacterial strains. *Plant Soil* 182, 59–66. <https://doi.org/10.1007/BF00010995>
- Radhakrishnan, R., Hashem, A., Abd\_Allah, E.F., 2017. Bacillus: A Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments. *Front. Physiol.* 8, 667. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00667>
- Radhakrishnan, R., Lee, I.-J., 2016. Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce. *Plant Physiol. Biochem.* 109, 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.018>
- Rajabi Hamedani, S., Roupshael, Y., Colla, G., Colantoni, A., Cardarelli, M., 2020. Biostimulants as a Tool for Improving Environmental Sustainability of Greenhouse Vegetable Crops. *Sustainability* 12, 5101. <https://doi.org/10.3390/su12125101>
- Ravera, O., 2000. The Lagoon of Venice : the result of both natural factors and human influence. *J. Limnol.* 59, 19. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2000.19>
- Richter, T., Fukshansky, L., 1996. Optics of a bifacial leaf: 2. Light regime as affected by the leaf structure and the light source. *Photochem. Photobiol.* 63, 517–527. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1996.tb03078.x>
- Robinson, D., 2001. Root proliferation, nitrate inflow and their carbon costs during nitrogen capture by competing plants in patchy soil. *Plant Soil* 232, 41–50. <https://doi.org/10.1023/A:1010377818094>
- Rose, M.T., Patti, A.F., Little, K.R., Brown, A.L., Jackson, W.R., Cavagnaro, T.R., 2014. A Meta-Analysis and Review of Plant-Growth Response to Humic Substances, in: *Advances in Agronomy*. Elsevier, pp. 37–89. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800138-7.00002-4>
- Roupshael, Y., Cardarelli, M., Bonini, P., Colla, G., 2017. Synergistic Action of a Microbial-based Biostimulant and a Plant Derived-Protein Hydrolysate Enhances Lettuce Tolerance to Alkalinity and Salinity. *Front. Plant Sci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00131>

- Rouphael, Y., Carillo, P., Colla, G., Fiorentino, N., Sabatino, L., El-Nakhel, C., Giordano, M., Pannico, A., Cirillo, V., Shabani, E., Cozzolino, E., Lombardi, N., Napolitano, M., Woo, S.L., 2020. Appraisal of Combined Applications of *Trichoderma virens* and a Biopolymer-Based Biostimulant on Lettuce Agronomical, Physiological, and Qualitative Properties under Variable N Regimes. *Agronomy* 10, 196. <https://doi.org/10.3390/agronomy10020196>
- Rouphael, Y., Colla, G., 2018. Synergistic Biostimulatory Action: Designing the Next Generation of Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Front. Plant Sci.* 9, 1655. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01655>
- Roy, R. N., Roy, Ranendra Narayan (Eds.), 2006. Plant nutrition for food security: a guide for integrated nutrient management, FAO fertilizer and plant nutrition bulletin. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Rudresh, D.L., Shivaprakash, M.K., Prasad, R.D., 2005. Tricalcium phosphate solubilizing abilities of *Trichoderma* spp. in relation to P uptake and growth and yield parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Can. J. Microbiol.* 51, 217–222. <https://doi.org/10.1139/w04-127>
- Runge-Metzger, A., 1995. Closing the cycle: obstacles to efficient P management for improved global food security. *Scope-Sci. Comm. Probl. Environ. Int. Counc. Sci. Unions* 54, 27–42.
- Ruzzi, M., Aroca, R., 2015. Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* 196, 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.042>
- Sardans, J., Peñuelas, J., 2015. Potassium: a neglected nutrient in global change: Potassium stoichiometry and global change. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 24, 261–275. <https://doi.org/10.1111/geb.12259>
- Sharma, H.S.S., Fleming, C., Selby, C., Rao, J.R., Martin, T., 2014. Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. *J. Appl. Phycol.* 26, 465–490. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0101-9>
- Sheng, X.F., 2005. Growth promotion and increased potassium uptake of cotton and rape by a potassium releasing strain of *Bacillus edaphicus*. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1918–1922. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.02.026>
- Siddiqui, Z.A., Akhtar, Mohd.S., Futai, K. (Eds.), 2008. Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry. Springer Netherlands, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8770-7>
- Singh, I., Anand, K.V., Solomon, S., Shukla, S.K., Rai, R., Zodape, S.T., Ghosh, A., 2018. Can we not mitigate climate change using seaweed based biostimulant: A case study with sugarcane cultivation in India. *J. Clean. Prod.* 204, 992–1003.
- Smit, A.L., Bindraban, P.S., Schröder, J.J., Conijn, J.G., Van der Meer, H.G., 2009. Phosphorus in agriculture: global resources, trends and developments: report to the Steering Committee Technology Assessment of the Ministry of Agriculture, Nature and Food Quality, The Netherlands, and in collaboration with the Nutrient Flow Task Group (NFTG), supported by DPRN (Development Policy review Network). Plant Research International.
- Song, G.C., Ryu, C.-M., 2013. Two volatile organic compounds trigger plant self-defense against a bacterial pathogen and a sucking insect in cucumber under open field conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 9803–9819. <https://doi.org/10.3390/ijms14059803>
- Steen, I., 1998. Phosphorus availability in the 21st century: management of a non-renewable resource. *Phosphorus Potassium* 217, 25–31.

- Tagliavini, S., Kubiskin, C., 2006. Effetti della biostimolazione in ortofrutticoltura: alcune esperienze a confronto. *Fertil. Agrorum* 1, 23–28.
- Tilman, D., 1998. The greening of the green revolution. *Nature* 396, 211–212. <https://doi.org/10.1038/24254>
- Tilman, D., Balzer, C., Hill, J., Befort, B.L., 2011. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 20260–20264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116437108>
- Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D'Antonio, C., Dobson, A., Howarth, R., Schindler, D., Schlesinger, W.H., Simberloff, D., Swackhamer, D., 2001. Forecasting Agriculturally Driven Global Environmental Change. *Science* 292, 281–284. <https://doi.org/10.1126/science.1057544>
- Trevisan, S., Botton, A., Vaccaro, S., Vezzaro, A., Quaggiotti, S., Nardi, S., 2011. Humic substances affect *Arabidopsis* physiology by altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development. *Environ. Exp. Bot.* 74, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.04.017>
- Trevisan, S., Manoli, A., Quaggiotti, S., 2019. A Novel Biostimulant, Belonging to Protein Hydrolysates, Mitigates Abiotic Stress Effects on Maize Seedlings Grown in Hydroponics. *Agronomy* 9, 28. <https://doi.org/10.3390/agronomy9010028>
- Tsukanova, K.A., Chebotar, V.K., Meyer, J.J.M., Bibikova, T.N., 2017. Effect of plant growth-promoting Rhizobacteria on plant hormone homeostasis. *South Afr. J. Bot.* 113, 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.07.007>
- Tweeten, L.G. (Ed.), 1989. *Agricultural policy analysis tools for economic development*, Westview special studies in agriculture science and policy. Westview Press [u.a.], Boulder.
- Utkhede, R.S., Koch, C.A., 1999. Rhizobacterial growth and yield promotion of cucumber plants inoculated with *Pythium aphanidermatum*. *Can. J. Plant Pathol.* 21, 265–271. <https://doi.org/10.1080/07060669909501189>
- Van Oosten, M.J., Pepe, O., De Pascale, S., Silletti, S., Maggio, A., 2017. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 4, 5. <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0089-5>
- Vergé, X.P.C., De Kimpe, C., Desjardins, R.L., 2007. Agricultural production, greenhouse gas emissions and mitigation potential. *Agric. For. Meteorol.* 142, 255–269. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2006.06.011>
- Verma, M., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., Valéro, J.R., 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochem. Eng. J.* 37, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.012>
- Vieira-Pires, R.S., Szollosi, A., Morais-Cabral, J.H., 2013. The structure of the KtrAB potassium transporter. *Nature* 496, 323–328. <https://doi.org/10.1038/nature12055>
- Vio, S.A., Galar, M.L., Gortari, M.C., Balatti, P., Garbi, M., Lodeiro, A.R., Luna, M.F., 2023. Multispecies Bacterial Bio-Input: Tracking and Plant-Growth-Promoting Effect on Lettuce var. sagess. *Plants* 12, 736. <https://doi.org/10.3390/plants12040736>
- Vranova, V., Rejsek, K., Skene, K.R., Formanek, P., 2011. Non-protein amino acids: plant, soil and ecosystem interactions. *Plant Soil* 342, 31–48. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0673-y>

- Walker, E.L., Connolly, E.L., 2008. Time to pump iron: iron-deficiency-signaling mechanisms of higher plants. *Cell Signal. Gene Regul.* 11, 530–535. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.06.013>
- Wally, O.S.D., Critchley, A.T., Hiltz, D., Craigie, J.S., Han, X., Zaharia, L.I., Abrams, S.R., Prithiviraj, B., 2013a. Regulation of Phytohormone Biosynthesis and Accumulation in Arabidopsis Following Treatment with Commercial Extract from the Marine Macroalga *Ascophyllum nodosum*. *J. Plant Growth Regul.* 32, 324–339. <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9301-9>
- Wally, O.S.D., Critchley, A.T., Hiltz, D., Craigie, J.S., Han, X., Zaharia, L.I., Abrams, S.R., Prithiviraj, B., 2013b. Erratum to: Regulation of Phytohormone Biosynthesis and Accumulation in Arabidopsis Following Treatment with Commercial Extract from the Marine Macroalga *Ascophyllum nodosum*. *J. Plant Growth Regul.* 32, 340–341. <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9311-7>
- Wang, Z., Li, S., Malhi, S., 2008. Effects of fertilization and other agronomic measures on nutritional quality of crops. *J. Sci. Food Agric.* 88, 7–23. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3084>
- White, P.J., Brown, P.H., 2010. Plant nutrition for sustainable development and global health. *Ann. Bot.* 105, 1073–1080. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq085>
- Xie, S.-S., Wu, H.-J., Zang, H.-Y., Wu, L.-M., Zhu, Q.-Q., Gao, X.-W., 2014. Plant Growth Promotion by Spermidine-Producing *Bacillus subtilis* OKB105. *Mol. Plant-Microbe Interactions®* 27, 655–663. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-14-0010-R>
- Xu, M., Sheng, J., Chen, L., Men, Y., Gan, L., Guo, S., Shen, L., 2014. Bacterial community compositions of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds and plant growth promoting activity of ACC deaminase producing *Bacillus subtilis* (HYT-12-1) on tomato seedlings. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 835–845. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1486-y>
- Yabur, R., Bashan, Y., Hernández-Carmona, G., 2007. Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion. *J. Appl. Phycol.* 19, 43–53. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9109-8>
- Yakhin, O.I., Lubyantsev, A.A., Yakhin, I.A., Brown, P.H., 2017. Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Front. Plant Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049>
- Yobo, K.S., Laing, M.D., Hunter, C.H., 2009. Effects of Single and Dual Applications of Selected *Trichoderma* and *Bacillus* Isolates on Performance of Dry Bean Seedlings Grown in Composted Pine Bark Growth Medium under Shadehouse Conditions. *J. Plant Nutr.* 32, 1271–1289. <https://doi.org/10.1080/01904160903005996>
- Zhao, L., Wang, F., Zhang, Y., Zhang, J., 2014. Involvement of *Trichoderma asperellum* strain T6 in regulating iron acquisition in plants. *J. Basic Microbiol.* 54, S115–S124.



## RINGRAZIAMENTI

Mi sento molto fortunato di aver avuto la possibilità di intraprendere questo percorso di studi, che oltre a conoscenze accademiche mi ha dato la possibilità di maturare e crescere come persona. Alla conclusione di questo percorso di studi e di vita, quindi, è doveroso ringraziare tutte quelle persone che mi hanno aiutato in qualsiasi modo possibile. Per l'aiuto nella realizzazione e stesura di questo progetto, ringrazio il prof. Carlo Nicoletto per i consigli e le correzioni e l'Universidad de Chile, in particolare i prof. José Ignacio Covarrubias e Ricardo Pertuzé per aver messo disposizione i loro laboratori e il loro aiuto per la realizzazione del progetto sperimentale.