



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse
naturali e Ambiente

Corso di laurea in scienze e tecnologie agrarie

Attività biostimolante delle ficobiliproteine di
Anabena minutissima, *Arthrospira platensis* e
Hydropuntia cornea: caratterizzazione, attività
perossidasi e auxino-simile.

Relatore
Prof.ssa Serenella Nardi

Correlatore
Dott. Diego Pizzeghello

Laureando
Gianluca
Schirato

Matricola n.
1220825

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

Indice

Riassunto	3
Abstract.....	4
1. Introduzione.....	5
2. Biostimolanti	7
2.1 Definizione	7
2.2 Classificazione.....	8
2.2.1 Microrganismi benefici	9
2.2.2 Sostanze umiche	11
2.2.3 Idrolizzati proteici.....	12
2.2.4 Estratti d'alghe.....	13
2.3 Stress abiotico e biostimolanti.....	14
5. Materiali e metodi.....	25
5.1 Coltivazione di <i>Anabena minutissima</i> , <i>Arthrospira platensis</i> e <i>Hydropuntia</i> cornea. Estrazione e purificazione delle ficobiliproteine e trattamento	25
5.2 Attività perossidasi.....	26
5.3 Test Audus per attività auxino-simile.....	27
6. Risultati.....	29
6.1 Caratterizzazione ficobiliproteine.....	29
6.2 Effetto del trattamento con PBP su pomodoro: attività perossidasi	30
6.3 Effetto del trattamento con PBP su crescita: attività auxino-simile.....	32
7. Discussione.....	34
8. Conclusione	37
Bibliografia.....	38

Riassunto

L'agricoltura del XXI deve affrontare il problema di nutrire la popolazione umana in modo sostenibile. La via da percorrere è quella di aumentare la produttività dei terreni agrari secondo la logica della sostenibilità, aumentando l'efficienza dei fattori produttivi e riducendo l'impatto sull'ambiente. Varie istituzioni, a più livelli, si sono impegnate nel definire delle linee guide da seguire per ridurre l'impatto ambientale e incoraggiare l'uso di strumenti più sostenibili.

Proprio in questo senso, tra gli strumenti possibili, troviamo i biostimolanti, prodotti in grado di stimolare processi metabolici e migliorare l'efficienza d'uso dei nutrienti, la resistenza agli stress abiotici e le caratteristiche qualitative delle piante. Questi mezzi tecnici sono miscele complesse, di origine diversa, caratterizzati dall'assenza di tossicità per l'ambiente e per l'uomo e solitamente utilizzati a basse dosi. I biostimolanti hanno riscosso un notevole successo negli ultimi anni, ma le ricerche da fare in questo ambito restano ancora molte, soprattutto al fine di dare una più chiara classificazione e descrivere precisamente il loro meccanismo d'azione.

In questo contesto si inseriscono particolari molecole: le ficobiliproteine. Queste molecole sono pigmenti fotosintetici presenti nei cianobatteri e in alcune alghe, in particolare nelle alghe rosse, capaci di catturare in maniera molto efficace l'energia luminosa e trasferirla alle clorofille. L'utilizzo di queste molecole ha già avuto un riscontro positivo in molti ambiti, ma in quello agronomico gli studi a proposito sono pochi e riguardano le proprietà antimicrobiche e antifungine.

Questo elaborato si propone di testare la capacità biostimolante di questi pigmenti in piantine di pomodoro e crescita.

Nello specifico, le ficobiliproteine sono state ottenute dalle specie di cianobatteri *Anabaena minutissima* e *Arthrospira platensis* e dall'alga rossa *Hydropuntia cornea* e testate a diverse concentrazioni (0,6; 1,2; 2,4 e 4,8 mg/mL). Per prima cosa è stata eseguita una spettroscopia ad infrarossi per effettuare la caratterizzazione dei pigmenti e quindi descriverli in base ai vari gruppi funzionali. Sono state eseguiti poi i test per valutare l'attività enzimatica delle perossidasi in pomodoro e l'attività auxino-simile in crescita. Entrambe le attività sono state influenzate dalla proprietà stimolante delle ficobiliproteine, generalmente in maniera positiva e dose-dipendente, con differenze tra le specie da cui sono state ottenute.

Abstract

Agriculture in XXI century must address the problem of feeding the human population in a sustainable way. The way forward is to increase the productivity of agricultural land according to the logic of sustainability, increasing the efficiency of production factors and reducing the impact on the environment. Various institutions, at various levels, have defined guidelines to be followed to reduce the environmental impact and encourage the use of more sustainable means

Biostimulants are products capable of stimulating metabolic processes and improving the efficiency of the use of nutrients, resistance to abiotic stress and the qualitative characteristics of plants. These technical means are complex mixtures, of different origin, characterized by the absence of toxicity for the environment and for humans and usually used in low doses. Biostimulants have enjoyed considerable success in recent years but there is still many research to be done in this area, especially in order to give a clearer classification and study their mechanism of action.

The phycobiliproteins are considered in this context. These molecules are photosynthetic pigments present in cyanobacteria and in some algae, as red algae, capable of capturing light energy very effectively and transferring it to the chlorophylls. The use of these molecules has already found a positive response in many areas but in the agronomic field there are few studies on the subject and only related to the antimicrobial and antifungal properties.

This paper aims to test the biostimulating capacity of these pigments in tomato and watercress seedlings.

Specifically, the phycobiliproteins were obtained from the cyanobacteria species *Anabaena minutissima* and *Arthrospira platensis* and from the red alga *Hydropuntia cornea* and tested at different concentrations (0.6; 1.2; 2.4 and 4.8 mg / mL). First, infrared spectroscopy was performed to characterize the pigments and then describe them according to the various functional groups. Tests were then performed to evaluate the enzymatic activity of peroxidase on tomato and auxin-like activity on watercress. Both activities were influenced by the stimulating property of phycobiliproteins, generally in a positive and dose-dependent manner, with differences between the species from which they were obtained.

1. Introduzione

L'intensificazione sostenibile della produzione delle colture è l'obiettivo principale dell'agricoltura per i prossimi anni. Secondo l'ONU si prevede un aumento demografico di due miliardi, dagli attuali 7,7 ai 9,7 nel 2050 (United Nations, 2019). Da qui al 2050 i cambiamenti nella popolazione, nel clima e nei modelli di consumo, provocheranno un aumento della domanda alimentare che può essere soddisfatta solo se si verifica un aumento sostanziale della produttività di almeno il 60% rispetto ai livelli del triennio 2005/2007 (Alexandratos & Bruinsma, 2012).

Dagli anni 40', la richiesta di cibo di una popolazione in netta crescita fu soddisfatta grazie all'incremento della produttività delle colture più importanti, a seguito del miglioramento varietale e adottando efficacemente i fattori produttivi quali acqua, fertilizzanti e prodotti fitosanitari (Chrispeels & Gepts, 2018). Conversione e intensificazione delle terre, tuttavia, alterano le interazioni biotiche e i modelli di disponibilità delle risorse negli ecosistemi e possono provocare gravi conseguenze ambientali: a livello locale conseguenze negative come incremento di erosione, minor fertilità del suolo e ridotta biodiversità; a livello regionale come inquinamento delle acque di falda ed eutrofizzazione di laghi e fiumi; e a livello mondiale con un grosso impatto nella composizione dell'atmosfera e nel clima (Matson et al., 1997).

In media, l'agricoltura è responsabile del 70% dei prelievi globali di acqua dolce. La domanda di acqua è destinata ad aumentare per soddisfare il fabbisogno alimentare di una popolazione mondiale in crescita, ma la quantità dell'acqua prelevabile dall'agricoltura può aumentare solo del 10%, di conseguenza le pratiche irrigue devono essere migliorate (FAO, 2017). L'agricoltura utilizza circa il 38% della superficie terrestre, e i territori più fertili sono già stati utilizzati. Conversione di foreste in terre arabili comporta perdita dello stock di carbonio e di biodiversità. Le pratiche agricole sono responsabili del 23% dell'emissione di gas serra (Masson-Delmotte et al., 2019).

Nonostante i progressi significativi nella produzione di cibo, l'insicurezza alimentare resta uno dei maggiori problemi sia nei Paesi in via di sviluppo che in quelli sviluppati. L'uomo coltiva oggi più che mai nel pianeta, facendo largo uso delle risorse ambientali con effetti gravi negli ecosistemi, mentre utilizza una frazione importante delle colture per usi non alimentari. Per essere sostenibile la futura agricoltura non deve basarsi sull'ulteriore utilizzo delle terre coltivate, ma su un utilizzo più efficiente dei fattori produttivi (Foley et al., 2011).

Negli ultimi tre decenni molte innovazioni tecnologiche sono state proposte per migliorare la sostenibilità del sistema produttivo agricolo, riducendo l'uso di prodotti sintetici come fertilizzanti e pesticidi.

A questo riguardo, una promettente e sostenibile innovazione sarebbe l'uso dei biostimolanti che, secondo numerosi studi, migliorano: fioritura, crescita della pianta, allegagione, produttività delle colture, efficienza d'uso dei nutrienti e inoltre stimolano la tolleranza contro una larga gamma di stress abiotici (Nardi et al., 2016; Rouphael & Colla, 2020).

2. Biostimolanti

2.1 Definizione

Possiamo attribuire la prima discussione sulla teoria dei “stimolanti biogenetici” al medico russo Prof. V.P. Filatov, intorno agli anni 30’ del ventesimo secolo. Filatov propose la teoria secondo la quale materiali biologici derivanti da vari organismi, incluse piante, esposti a stress potessero influenzare i processi metabolici ed energetici di altri organismi. A seguito sono state fatte altre discussioni come quelle di Blagoveshchensky e Herve che portarono ad ulteriori sviluppi (Yakhin et al., 2017). Per la prima volta il termine biostimolante viene usato in un giornale web nel 1997 da due ricercatori del Department of Crop and Soil Environmental Sciences of the Virginia Polytechnic and State University definendo biostimolante come “materiali che, usati in minime quantità promuovono la crescita delle piante”. Con “minime quantità” gli autori si ponevano l’obiettivo di distinguere questi composti dai fertilizzanti e ammendanti che vengono però applicati in grandi quantità.

Nella letteratura scientifica per la prima volta la parola biostimolante appare in un articolo di Kauffman et al., 2007, dove viene aggiunta alla precedente definizione la distinzione dai fertilizzanti e viene introdotta una prima classificazione. “I biostimolanti sono disponibili in una varietà di formulazioni e con vari ingredienti ma sono generalmente classificati in tre grandi gruppi in base all’origine e al contenuto. Questi tre gruppi includono sostanze umiche (HS), quelli contenenti ormoni (HCP) e quelli contenenti aminoacidi (AACP). Prodotti HCP, come estratti d’alga, contengono quantità significative di promotrici di crescita come auxine, citochinine e derivati” (du Jardin, 2015).

La definizione di biostimolante presente nel Reg. (UE) 2019/1009 è la seguente “un prodotto fertilizzante dell’UE con la funzione di stimolare i processi nutrizionali delle piante indipendentemente dal tenore di nutrienti del prodotto, con l’unico obiettivo di migliorarne una o più delle seguenti caratteristiche delle piante o della loro rizosfera:

- a) efficienza dell’uso dei nutrienti;
- b) tolleranza allo stress abiotico;
- c) caratteristiche qualitative;
- d) disponibilità di nutrienti contenuti nel suolo o nella rizosfera”.

2.2 Classificazione

Nel corso degli anni, diversi autori hanno proposto sistemi di classificazione per i biostimolanti in base alla loro origine, ai componenti e alla modalità d'azione. La complessa natura della materia prima organica e i prodotti ottenuti da questa rendono difficile la comprensione su quale sia il composto responsabile dell'attività biologica. La classificazione ricorrente è basata sulla provenienza delle materie prime anche se questo non fornisce sempre corrette informazioni sull'attività biologica del prodotto (Franzoni et al., 2022).

Du Jardin, incaricato dalla Commissione Europea di effettuare uno studio bibliografico, ha individuato le seguenti sostanze ad azione biostimolante: sostanze umiche, materiali organici complessi, elementi chimici benefici, sali inorganici, estratti di alghe, chitina e derivati del chitosano, antitraspiranti e aminoacidi ed altri composti azotati. Lo studio non prevedeva volutamente l'analisi degli effetti biostimolanti dei microrganismi (du Jardin, 2012). Il Reg. (UE) 2019/1009 infine suddivide i biostimolanti in microbici e non microbici. In seguito a una ricerca bibliografica approfondita e per semplicità in questo lavoro prenderemo in considerazione i biostimolanti a base di:

- Microrganismi benefici
- Sostanze umiche
- Idrolizzati proteici
- Estratti di alghe

I meccanismi d'azione della maggior parte dei biostimolanti rimangono in gran parte sconosciuti.

Ciò è dovuto principalmente alla composizione eterogenea delle materie prime utilizzate. È di primaria importanza chiarire i meccanismi d'azione attraverso i quali i biostimolanti esercitano la propria funzione, sia per una corretta e trasparente comunicazione agli agricoltori, sia per quanto riguarda la fase di ricerca e sviluppo dei prodotti (Yakhin et al., 2017).

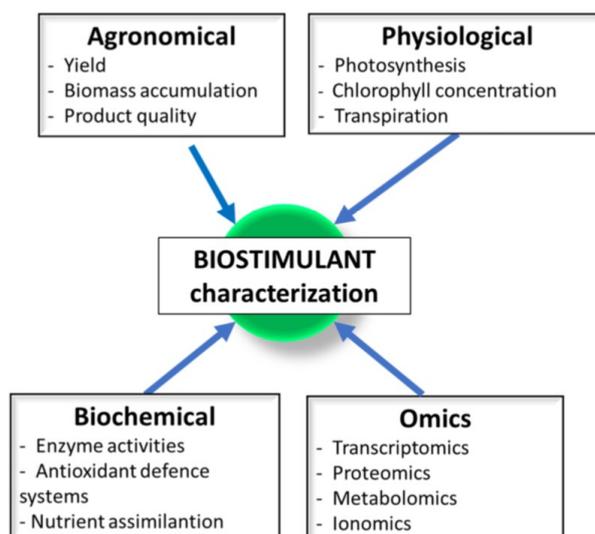


Figura 2-1. Approccio multidisciplinare per la caratterizzazione dei biostimolanti in base alla risposta delle piante (Franzoni et al., 2022).

2.2.1 Microrganismi benefici

I biostimolanti a base microbica includono batteri, lieviti, funghi e microalghe o una miscela di questi (la Torre et al., 2016). L'uso di inoculi microbici in agricoltura è notevolmente aumentato negli ultimi decenni per risolvere problemi associati all'agricoltura moderna. Sono isolati dal suolo, dalle piante, dall'acqua e da compost. Vengono applicati al suolo per aumentare la produttività delle colture minimizzando l'impatto che stress biotici e abiotici hanno sulle piante coltivate e aumentano l'efficienza nell'uso dei nutrienti (Calvo et al., 2014). Rispetto agli agrofarmaci di sintesi, i biostimolanti microbici sono sicuri per l'ambiente e per l'uomo ed hanno una ridotta possibilità di indurre resistenza nei microrganismi patogeni. I batteri utilizzati maggiormente come biostimolanti, generalmente chiamati PGPR o PGPB, non solo hanno effetti di biocontrollo su altri agenti patogeni, ma innescano anche diversi effetti di promozione biologica in vari parametri di crescita delle piante. Questi batteri migliorano le caratteristiche di crescita come altezza e vigore della pianta, germinazione dei semi, area fogliare, peso fresco e secco, capacità di assorbimento, resa e contenuto di nutrienti in colture di importanza economica globale (Tabassum et al., 2017).

I funghi interagiscono con le radici delle piante in varia maniera, dalle simbiosi mutualistiche al parassitismo. I funghi micorrizici stabiliscono simbiosi con oltre il 90% di tutte le specie vegetali.

Un gruppo di interesse agrario è formato da funghi AMF (Arbuscular-Forming Mycorrhiza), ad esempio buona parte della divisione *Glomeromycota*, che attraverso le ife fungine penetrano le cellule corticali delle radici e formano strutture ramificate (arbuscoli) di interscambio tra piante e fungo.

Vi è un crescente interesse per l'uso di questi funghi considerando i benefici ampiamente dimostrati da queste simbiosi che migliorano l'efficienza nutrizionale (sia per i macronutrienti, in particolare fosforo, sia per i micronutrienti), bilancio idrico, protezione dallo stress biotico e abiotico. Gli studi indicano l'esistenza, oltre alle reti ifali tra fungo e pianta partner, di una comunità vegetale anche tra le singole piante all'interno. Ci sono infatti prove che i condotti fungini permettono la segnalazione tra le piante con relative implicazioni ecologiche e ambientali.

Altri endofiti, come *Trichoderma* (Ascomycota) e *Sebacinales* (Basidiomycota), distinti dalle specie micorriziche, sono in grado di vivere almeno in parte del loro ciclo vitale lontano dalla pianta, di colonizzare le radici, e di trasferire i nutrienti ai loro ospiti, utilizzando meccanismi poco conosciuti. Alcuni di questi funghi, principalmente *Trichoderma*, sono stati utilizzati per le loro capacità biopesticida (micoparassitaria) e di biocontrollo (induttori di resistenza alle malattie). Vi sono prove convincenti per le quali, al loro affermato uso come biopesticidi, si possa affiancare anche il ruolo di biostimolante vista l'induzione di risposte in molte piante, inclusa una maggiore tolleranza allo stress abiotico, efficienza nell'uso dei nutrienti e crescita e morfogenesi degli organi (du Jardin, 2015; López-Bucio et al., 2015).

Le microalghe sono organismi fotosintetici capaci di crescere sia su ambienti di acqua dolce che in mare. La loro biomassa che può essere utilizzata in diversi settori, per quanto riguarda l'agricoltura possono essere utilizzate per promuovere una crescita e uno sviluppo ottimale delle colture. Queste hanno dimostrato di avere potenziali applicazioni come biostimolanti (Ronga et al., 2019). Le divisioni più abbondanti tra le microalghe sono *Bacillariophyta* (diatomee), *Chlorophyta* (alghe verdi), *Chrysophyta* (alghe dorate) e *Cyanophyta*. Le microalghe sono un gruppo estremamente diversificato che comprende circa 200.000 specie (Bleakley & Hayes, 2017). Quest'ultimi sono conosciuti per la loro capacità di fissare azoto e come agente di biocontrollo, attivando le difese della pianta tramite la produzione di enzimi idrolitici e composti microbici contro patogeni vegetali (Kapooore et al., 2021).

2.2.2 Sostanze umiche

Le sostanze umiche possono essere descritte in tre diverse maniere: (1) strettamente tecnica in accordo con il metodo di estrazione alcalina e quindi con le frazioni degli acidi umici (solubili in acqua a pH alcalino) e fulvici (solubili in acqua a tutti i pH) estraibili e parte non estraibile: l'umina; (2) come una sostanza esistente che non è semplicemente un costrutto operativo; (3) come una combinazione dei due (Lehmann & Kleber, 2015). Questi complessi sono costituenti naturali della sostanza organica del suolo, derivanti dalla decomposizione di residui vegetali, animali e microbici, ma anche dall'attività metabolica dei microrganismi.

Le sostanze umiche sono composti eterogenei e mostrano dinamiche di associazione/dissociazione in colloidali supramolecolari, influenzate dalle attività radicali attraverso rilascio di protoni ed essudati (Nardi et al., 2009). Sono il risultato di interazioni tra sostanza organica, radici e microbi.

A causa dell'eterogeneità, la struttura molecolare di questi composti non può essere identificata in modo univoco. Tuttavia, è stato chiaramente definito come la presenza di gruppi funzionali all'interno della loro struttura sia responsabile degli effetti diretti e indiretti osservati sulla crescita e nutrizione delle piante (Nardi et al., 2009, 2021). Questi gruppi funzionali aiutano a mantenere i micronutrienti in soluzione e/o in forme disponibili a diversi valori di pH. Le sostanze umiche esercitano un effetto diretto sulla pianta stimolando la rizogenesi simulando l'azione di fitormoni e modificandone i rapporti endogeni alla pianta (Calvo et al., 2014; Nardi et al., 2009, 2018; 2002). Queste molecole complesse esercitano una funzione sullo sviluppo della pianta attivando e regolando risposte metaboliche legate all'auxina e interferendo nella risposta allo stress. Le sostanze umiche sono anche in grado di stimolare le H⁺-ATPasi della membrana plasmatica promuovendo l'assorbimento del nitrato e di altri nutrienti, oltre a stimolare la crescita cellulare e dei tessuti (du Jardin, 2015; Nardi et al., 2017).

2.2.3 Idrolizzati proteici

I prodotti a base di proteine possono essere suddivisi in due categorie: gli idrolizzati proteici, costituiti da una miscela di peptidi e aminoacidi di origine animale o vegetale, e i singoli aminoacidi, come glutammato, glutammina, prolina e glicina betaina. Gli idrolizzati proteici sono ottenuti tramite l'idrolisi enzimatica, chimica o termica di residui animali e vegetali, come i tessuti epiteliali e connettivi, collagene, residui dell'industria ittica e biomasse di leguminose.

Gli idrolizzati proteici possono essere classificati in base alla fonte proteica e al metodo di idrolisi. L'idrolisi chimica delle proteine sotto condizioni acide o alcaline è solitamente preferibile per produrre idrolizzati di origine animale. L'idrolisi enzimatica è solitamente adottata per i prodotti di origine vegetale con l'uso di enzimi proteolitici di derivazione animale e microbica. La produzione di idrolizzati proteici tramite idrolisi enzimatica è più sostenibile rispetto a quella chimica, con un minor costo energetico e minori emissioni di anidride carbonica. La combinazione dei due processi è stata proposta per ridurre la spesa energetica e preservare la struttura degli aminoacidi. Oltre agli aminoacidi e ai peptidi gli idrolizzati proteici contengono altri composti come lipidi, carboidrati, fenoli, elementi minerali, fitormoni che possono contribuire all'attività biostimolante (Colla et al., 2015). Gli idrolizzati proteici hanno un grande potenziale per l'incremento delle performance agricole, specialmente sotto condizioni di stress ambientale. L'applicazione di questi composti mostra una maggiore efficienza nell'assorbimento dei nutrienti e sviluppo radicale.

Applicazioni fogliari e radicali dei prodotti a base proteica promuovono attività ormone-simile aumentando germinazione, crescita delle piante, allegagione, qualità dei frutti (Nardi et al., 2016). Restano ancora dubbi sul meccanismo d'azione di questi composti e solo grazie a studi di fenomica e trascrittomica sarà possibile chiarire i quesiti in sospeso. Recenti studi hanno evidenziato come gli idrolizzati proteici provochino cambiamenti nella composizione e nell'attività delle comunità microbiche del suolo associate alle piante.

Se le specie microbiche adattate a certi ospiti vengono identificate e applicate insieme ai prodotti proteici, quest'ultimi potrebbero supportare la loro colonizzazione e sopravvivenza sulle piante. Questi consorzi potrebbero ridurre il tempo necessario al microbioma per raggiungere il massimo sviluppo, escludendo i microrganismi patogeni (Colla et al., 2017).

2.2.4 Estratti d'alghe

Le alghe marine sono considerate una risorsa sottoutilizzata, ma per secoli il loro uso è stato ampio come fonte di cibo, materia prima industriale e in applicazioni terapeutiche e botaniche. Inoltre, alghe e derivati di esse sono state utilizzate come ammendante nei sistemi di produzione delle colture vista la presenza di numerosi composti stimolatori di crescita. È stato stimato che sono presenti oltre 9000 specie di macroalghe classificate in tre grandi gruppi in base alla loro pigmentazione (*Phaeophyta*, *Rhodophyta* e *Chlorophyta* rispettivamente brune, rosse e verdi). Le alghe brune sono le più utilizzate in agricoltura e tra queste *Ascophyllum nodosum* è la specie più usata commercialmente dalle industrie di produzione di estratti (Battacharyya et al., 2015; Khan et al., 2009). Il tipo di alga utilizzato, il periodo di raccolta e il processo di estrazione influenzano notevolmente le caratteristiche chimiche dell'estratto e quindi le sue proprietà biostimolanti.

La complessità e la variabilità degli estratti di alghe rende difficile determinare esattamente quale componente giochi un ruolo chiave. Questi biostimolanti di estratti d'alghe stanno emergendo come prodotti utili a promuovere la crescita delle colture e migliorare la tolleranza allo stress salino, termico e idrico (van Oosten et al., 2017). Le alghe agiscono sul suolo e sulle piante. Possono essere applicati sui terreni, in soluzioni idroponiche o come concimi fogliari. Nei terreni, i loro polisaccaridi contribuiscono alla formazione di una buona struttura e quindi all'aumento della ritenzione idrica e dell'aerazione del suolo. Migliorano la fissazione e scambio di cationi e possono risultare utili nelle bonifiche del suolo e nello stress da metalli pesanti. Gli estratti di alghe hanno anche effetti ormonali con conseguenze positive su germinazione, crescita e sviluppo delle piante (Ertani et al., 2018) spiegati da una sovra e sotto regolazione dei geni biosintetici ormonali nei tessuti vegetali.

Questi prodotti hanno dimostrato di avere effetti antistress e potrebbero essere coinvolti i composti protettivi all'interno di alghe, come gli antiossidanti, o una maggiore espressione dei geni regolatori contro i fattori di stress (du Jardin, 2015).

2.3 Stress abiotico e biostimolanti

Le piante crescono e si riproducono in un ambiente complesso composto da una moltitudine di fattori abiotici, chimici e fisici, che variano nel tempo e con la posizione geografica.

Le fluttuazioni di questi fattori ambientali, al di fuori dei loro valori normali, hanno di solito conseguenze biochimiche e fisiologiche negative per le piante. I fattori climatici e edafici hanno notevole impatto sulla fitness della pianta. I fattori climatici che influenzano le colture includono i gas atmosferici, la luce, la temperatura, l'umidità, le precipitazioni e il vento.

I fattori edafici sono quelli relativi alle condizioni del terreno che influenzano la crescita, lo sviluppo e la sopravvivenza delle piante, e che includono l'aria, l'umidità e la composizione elementare minerale. I fattori che insieme al clima determinano la disponibilità per le piante di acqua, aria e nutrienti sono i minerali del suolo e la composizione organica, la conduttività idraulica, la CSC, il pH e la microfauna e microflora presenti. Gli esseri umani influenzano il clima in vari modi: riducendo l'acqua disponibile, aumentando la concentrazione di gas serra e rilasciando gli inquinanti nel suolo e nelle acque di falda (Taiz & Zeiger, 2012). Il ventunesimo secolo è stato marchiato dal cambiamento climatico globale. Negli ultimi anni, molte colture hanno perso la potenziale produttività intrinseca a causa della crescente variazione climatica. Esiste infatti un legame di dipendenza tra le attività agricole e i parametri climatici. Allo stesso modo l'uso indiscriminato del suolo e dei fertilizzanti chimici, diserbanti, prodotti fitosanitari in agricoltura causa un'estrema perdita di diversità microbica nel suolo e della sua fertilità.

L'agroecosistema è continuamente influenzato da stress abiotici e biotici che modificano direttamente la produttività delle colture e la salute del suolo. Lo stress abiotico contribuisce per il 50% alle perdite di produttività agricola a livello mondiale influenzando a sua volta lo stress biotico e riducendo ulteriormente la produttività (Kumar & Verma, 2018). Le piante hanno diversi meccanismi che consentono a loro di difendersi e sopravvivere in ambienti spesso complessi. L'adattamento all'ambiente è caratterizzato da cambiamenti genetici in tutta la popolazione che sono fissati a seguito della selezione naturale, col susseguirsi delle generazioni.

Al contrario, le singole piante possono rispondere ai cambiamenti climatici nell'ambiente alterando direttamente la loro morfologia e/o fisiologia per consentire loro la sopravvivenza. Queste risposte che non richiedono cambiamenti nel genoma vengono dette di acclimatazione. Sono cambiamenti nella fisiologia temporanei, spesso reversibili e non ereditari (Taiz & Zeiger, 2012).

Gli stress abiotici inducono le piante ad attivare un'espressione genica alternativa che aiuta la pianta a fronteggiare lo stress e continuare a crescere, seppur a un ritmo inferiore.

Si verificano essenzialmente tre fasi:

1. Ricezione del segnale di stress: i recettori proteici sulle membrane cellulari della pianta percepiscono lo stress.
2. Trasduzione dello stress: una serie di reazioni iniziano quando il segnale si lega a una proteina recettore. Le cascate di trasduzione del segnale possono portare a cambiamenti nella trascrizione genica. Il segnale di stress raggiunge il nucleo cellulare grazie a dei messaggeri secondari, ovvero delle molecole intermedie tra segnale e trascrizione. Tre classi importanti di messaggeri secondari sono le specie reattive dell'ossigeno (ROS), gli ioni Ca^{2+} e gli ormoni.
3. Cambiamento di funzione: la risposta finale è il cambiamento sia fisiologico sia a livello cellulare (produzione di proteine diverse) sia a livello di organismo (accrescimento radicale maggiore).

A proposito dei processi di trasduzione, un ruolo fondamentale da investigare per il miglioramento genetico e per la comprensione dei processi di acclimatazione è quello riguardante i messaggeri secondari. Le specie reattive dell'ossigeno sono molecole altamente reattive che rappresentano dei sottoprodotti del normale metabolismo cellulare, ma a dosi troppo elevate possono danneggiare il DNA, le proteine e i lipidi della cellula. Includono il perossido di idrogeno H_2O_2 e dei radicali anionici superossidi. Livelli elevati di ROS sono dannosi e gli organismi possiedono naturali sistemi di eliminazione di queste molecole. Il genoma risponde al segnale attivando geni che codificano per enzimi che gestiscono i ROS, riportandoli a livelli normali. Questi sottoprodotti inoltre stimolano processi che aiutano le cellule ad affrontare quegli stress che hanno determinato l'aumento dei livelli stessi di ROS, quali elevate temperature, la salinità, la carenza idrica o la presenza di metalli pesanti tossici (Chrispeels & Gepts, 2018).

I biostimolanti sono stati proposti come strumenti agronomici in grado di contrastare lo stress abiotico. Questi prodotti hanno effetto benefico e migliorano la capacità delle piante di affrontare condizioni avverse agendo sul metabolismo primario o secondario.

La produzione delle specie reattive dell'ossigeno è una delle risposte comuni in condizioni di stress ma il loro coinvolgimento nelle vie di segnalazione implica che devono essere mantenuti sotto dei livelli non tossici, in un equilibrio tra produzione ed eliminazione (Figura 2-2).

Un forte stress provoca uno scoppio ossidativo all'interno della cellula e la difesa della pianta consiste nell'uso di componenti enzimatiche (es. perossidasi, catalasi, superossido dismutasi) e non-enzimatiche (es. acido ascorbico, licopene e composti fenolici) per eliminare o inibire l'azione ossidativa dei ROS e prevenire/ritardare il danno cellulare (Hasanuzzaman et al., 2021).

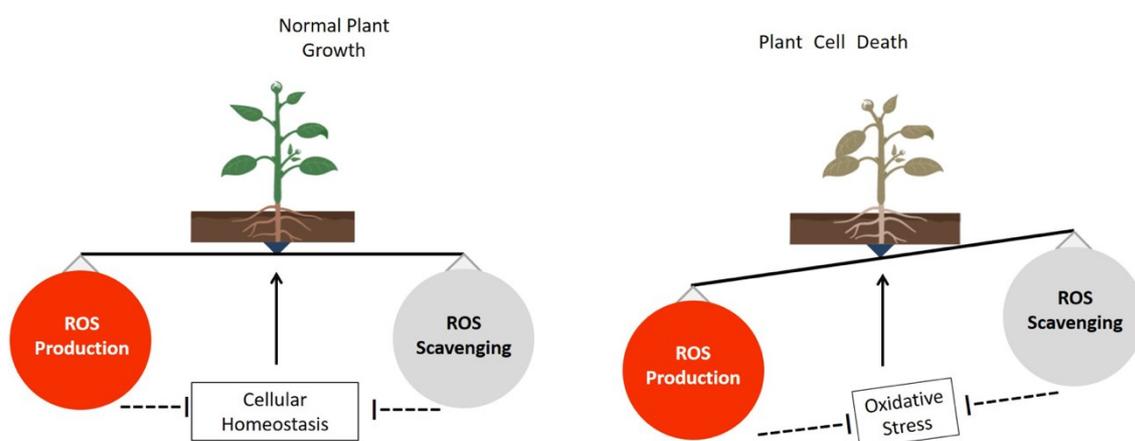


Figura 2-2. Salute della pianta in funzione dei livelli di produzione ed eliminazione di ROS (Naing & Kim, 2021).

È stato mostrato che l'uso di biostimolanti nelle colture può modificare l'attività degli enzimi e influenzare le proprietà antiossidanti (Drobek et al., 2019). Molti studi sono stati fatti in questo senso.

Un idrolizzato proteico applicato come biostimolante in pomodoro non ha modificato i livelli di composti fenolici, mentre una differenza significativa è stata notata nel contenuto di acido ascorbico e licopene (Rouphael et al., 2017). Un estratto di aglio ha migliorato le proprietà antiossidanti del pomodoro.

L'attività della superossido dismutasi è aumentata in proporzione alla concentrazione dell'estratto; inoltre anche l'attività della perossidasi era più alta dopo avere usato la concentrazione di 200 µg/L; una concentrazione minore (50 µg/L) non ha influenzato l'attività di questi enzimi (Hayat et al., 2018).

L'uso di un estratto di *M.oleifera* come biostimolante ha mostrato un incremento nell'attività degli enzimi antiossidanti in *Eruca versicari*. Allo stesso tempo, il contenuto di acido ascorbico e fenoli era maggiore con l'aumentare della concentrazione. In un altro studio i biostimolanti (estratto di *Ecklonia maxima*) hanno aumentato l'attività dell'enzima fenilalanina ammonio liasi rispetto al controllo. Questo enzima catalizza il primo passo nella sintesi dei composti fenolici. Durante lo stress si nota un aumento dei prodotti fenolici, da ciò si può concludere che i biostimolanti possono indurre lo stress per aumentare precocemente la produzione di metaboliti secondari (Drobek et al., 2019).

Molte aziende stanno investendo nello sviluppo di nuovi prodotti biostimolanti e nella formulazione più efficace dei diversi estratti in grado di suscitare risposte vegetali specifiche contro gli stress abiotici. L'efficacia dei biostimolanti nel contrastare lo stress dipende da diversi fattori, come i tempi di applicazione e la loro modalità d'azione. L'applicazione può essere effettuata in momenti diversi: prima, durante e dopo la manifestazione dello stress. Possono essere applicati sui semi, alla fase di plantula o piante completamente sviluppate.

L'identificazione del momento giusto nell'applicazione è importante quanto la determinazione della dose esatta, al fine di evitare sprechi e relativi costi (Bulgari et al., 2019).

3. Ficobiliproteine (PBPs)

La vita nella Terra dipende in maniera predominante dalla fotosintesi e quindi dalla conversione dell'energia solare in energia chimica. Il meccanismo alla base della fotosintesi si compone di due grandi strutture: il complesso antenna e il centro di reazione (Sen-Fang Sui, 2021).

L'energia solare a lunghezza d'onda tra i 400 e i 700 nm (PAR) è catturata dagli organismi fotosintetici e convertita in energia chimica che può essere usata direttamente dalle cellule (Li et al., 2019). Diversi pigmenti sono usati dagli organismi fotosintetici per assorbire efficacemente lo spettro di energia luminosa. Progressi considerevoli sono stati fatti per la caratterizzazione di tre complessi di captazione chiamati complessi antenna. In quasi tutti i casi, i pigmenti antenna sono associati a proteine per formare complessi pigmento-proteina. Nelle piante terrestri, la raccolta della luce viene effettuata da un complesso in cui i pigmenti principali sono le clorofille *a* e *b* e i costituenti polipeptidici del complesso sono un gruppo di proteine correlate. Secondo, nelle alghe marine come diatomee, dinoflagellati, alghe brune, il principale complesso della luce contiene xantofille e clorofilla *a* e *c*. Terzo, nei cianobatteri e nelle alghe rosse, la captazione della luce è dovuta principalmente a un gruppo di proteine pigmentate, chiamate ficobiliproteine (PBPs), che sono costituenti di un complesso macromolecolare chiamato ficobilisoma. Questo terzo complesso antenna è particolarmente diverso nella sua struttura dagli altri due. Questi costituenti sono molto abbondanti nella cellula tanto da poter costituire anche il 50% della proteina solubile totale (Grossman et al., n.d.). Le PBPs sono estremamente efficaci nel raccogliere l'energia solare e trasferirla ai fotosistemi e possono essere classificate in tre tipi morfologici: semiellissoidale, semidiscoidale e a forma di fascio (Li et al., 2019). Assorbono la radiazione in regione dello spettro visibile dove la clorofilla *a* ha basso potenziale di assorbimento, soprattutto nelle regioni del giallo e del verde.

Le PBPs possono essere divise in quattro grandi gruppi in base alla loro massima regione di assorbimento.

- Alloficocianina (AP) → 650-660 nm
- Ficocianina (PC) → 610-625 nm
- Ficoeritrina (PE) → 490-570
- Ficoeritrocianina (PEC) → 560-600 nm

Quantitativamente, la ficocianina è la più abbondante ficobiliproteina nei cianobatteri, seguita da ficoeritrina e alloficocianina. Le PBPs sono composte da un certo numero di subunità, ciascuna avente una spina dorsale proteica e una ficobilina legate da legame covalente. Queste ficobiline sono i cromofori capaci di catturare la luce e principali attori della fotosintesi (Pagels et al., 2019).

Le ficobiliproteine sono molecole solubili in acqua composte da proteine e cromofori, chiamati ficobiline, legate covalentemente tramite cisteine. In termini di distribuzione e trasferimento di energia, ficoeritrina e ficoeritrocianina sono le prime PBPs ad assorbire la luce e nella catena di trasferimento dell'energia trasferiscono quest'ultima alla ficocianina e consecutivamente all'alloficocianina (Pagels et al., 2019). L'energia intrappolata dalle PBPs è infine trasferita alla clorofilla a con un'efficienza superiore al 95%. L'elemento costitutivo di base delle ficobiliproteine è un monomero formato da subunità polipeptidiche α e β , ognuna con massa molecolare tra i 15 e 20 kDa e simili nella sequenza (160-165 aminoacidi) (Li et al., 2019; Pagels et al., 2019).

Le subunità sono omologhe tra loro nonché tra le varianti, indicando che si sono evolute da una subunità primordiale comune che per prima si è differenziata in α e β e poi nelle sue varianti di PC, PE, PEC e AP (Watanabe & Ikeuchi, 2013). Ciascuna subunità porta almeno una ficobilina e la struttura della ficobiliproteina varia in base al tipo presente. Le ficobiline sono tetrapirroli non ciclici e se ne trovano solitamente di quattro tipi: ficocianobilina, ficoeritrobilina, ficourobilina e ficoviolobina. Le PBPs sono solitamente presenti come trimeri $(\alpha\beta)_3$ o esameri $(\alpha\beta)_6$ legati da proteine specifiche (Pagels et al., 2019). I dischi di ficobiliproteine (trimeri ed esameri) sono assemblati con l'aiuto dei polipeptidi linker nel complesso del ficobilisoma che è organizzato in due distinti domini strutturali, il nucleo e le bacchette. Il nucleo, composto da alloficocianina, forma un legame fisico con la superficie esterna della membrana del tilacoide ed è spesso associato al fotosistema II. Dal nucleo si irradia una serie di barre composte da dischi impilati di ficobiliproteine, i primi sono di ficocianina, mentre le più distali sono di ficoeritrina (o ficoeritrocianina in alcuni cianobatteri) (Apt et al., 1995).

Il ficobilisoma è quindi un complesso di grandi dimensioni che migliora l'efficienza di cattura della luce nello spettro del visibile e aiuta ad allargare i confini entro i quali le specie fototrofiche possono sopravvivere.

Presenti nei cianobatteri e in alcune alghe eucariotiche (es. *Rhodophyta* e *Glaucophyta*), queste strutture sono particolarmente vantaggiose negli ambienti acquatici dove le onde del visibile a lunghezza d'onda più lunghe penetrano meno rispetto a quelle più corte (verde e blu) (Puzorjov & McCormick, 2020).

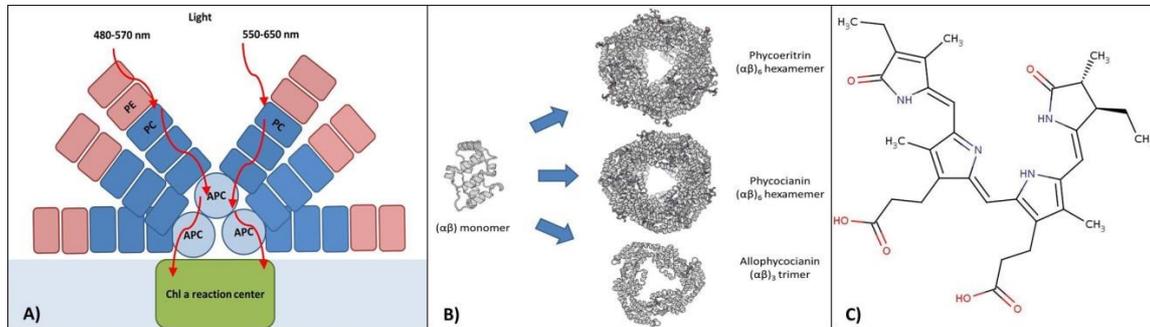


Figura 3-1. A) Struttura del ficobilisoma che include ficoeritrina, ficocianina e ficoallocalciana. B) Struttura generale di una ficobiliproteina. C) Struttura del cromoforo ficocianobilina (Garcia, 2020).

La biosintesi delle ficobiliproteine nelle cellule delle microalghe avviene attraverso le vie trascrizionali, trasduzionali e post-trascrizionali attraverso le quali si attua la sintesi di amminoacidi, proteine e ficobiline, e infine l'unione delle ficobiline con le apoproteine per formare le ficobiliproteine. Le ficobiline sono sintetizzate a partire dall'eme dall'azione dell'enzima eme-ossigenasi, che converte l'eme in biliverdina, seguita dall'azione di altri enzimi che convertono la biliverdina in ficobiline e infine, quest'ultime vengono legate covalentemente a diversi residui specifici di cisteina tramite legami tioetere dalle bilina-liasi.

L'eme è un cofattore con diverse funzioni biologiche e si ritiene sia la molecola precursore di tutte le vie metaboliche per la sintesi delle biline. La sintesi dell'eme è a sua volta condizionata dalla sintesi del suo precursore: l'acido aminolevulonico (ALA). Questo si origina dal glutammato o dal piruvato o dal succinil-CoA che è il precursore più immediato. L'eme subisce poi una scissione ossidativa da parte dell'eme ossigenasi per formare la biliverdina (Manirafasha et al., 2016).

La biliverdina è una bilina di colore verde che è il prodotto principale del catabolismo dell'eme. Nell'uomo, la biliverdina viene solitamente ridotta rapidamente per produrre la bilirubina.

Entrambi i composti hanno proprietà antimutagene e antiossidanti ed entrambi sono potenti distruttori di radicali liberi (Bryant et al., 2020).

Nei cianobatteri e in alcune microalghe le ficobiline vengono poi sintetizzate a partire dalla biliverdina seguendo pathways metabolici diversi e con l'ausilio di enzimi diversi, altre ficobiline come ficoviolobina e ficourobilina devono essere prodotti da altri meccanismi di isomerizzazione (Manirafasha et al., 2016).

Commercialmente, le PBP sono biomolecole naturali di alto valore con attuali e potenziali applicazioni biotecnologiche nel settore alimentare, nutraceutico, farmaceutico, cosmetico e biomedico. La produzione di ficobiliproteine di elevata purezza è frutto di una concomitanza di fattori produttivi e attività. Possiamo dividere il processo di produzione in quattro fasi: coltivazione, raccolta, estrazione e purificazione. Il processo di produzione dipende da vari fattori ambientali e produttivi che influenzano la crescita delle cellule e la composizione intrinseca della biomassa a causa di variazioni del metabolismo. La selezione della specie di microalga è un fattore critico che condiziona la produttività metabolica. Dopo il periodo di produzione della biomassa e l'accumulazione delle ficobiliproteine, un metodo efficace di raccolta deve essere in grado di elaborare grandi volumi di colture al minor costo e col minimo impatto ambientale.

Il recupero tramite centrifugazione della biomassa delle microalghe è fattibile per prodotti ad alto valore visto che è costoso e richiede molta energia. Un metodo promettente per la raccolta è la flocculazione che ha costi minori (Manirafasha et al., 2016). Metodi di purificazione delle ficobiliproteine dipende dalla fonte d'origine, in generale due step sono coinvolti: estrazione e purificazione. L'estrazione è fondamentale per estrarre le ficobiliproteine dalle cellule e allo stesso tempo mantenerne la struttura e le funzioni inalterate (Li et al., 2019). Le PBP possono essere estratte da biomasse umide o secche. L'estrazione umida è meno costosa ed evita eccessive perdite dei pigmenti (Manirafasha et al., 2016). Generalmente la biomassa di microalghe deve essere sottoposta a uno o alla combinazione di trattamenti fisici (alta pressione, cavitazione, sonicazione, blocchi osmotici, omogeneizzazione...) e chimici (uso di acidi, basi, detergenti, enzimi ecc.). La procedura di purificazione è data da un insieme di attività. Le più comuni sono il metodo del frazionamento con solfato d'ammonio, separazione con cromatografia e ATPS (two-phase aqueous system) (Li et al., 2019; Pagels et al., 2019).

Le ficobiliproteine hanno mostrato negli ultimi anni un'importanza notevole in molte attività degli esseri umani (Figura 3-2). L'applicazione delle PBPs nei differenti campi richiede un diverso grado di purezza. Questi composti trovano applicazioni nell'alimentazione e nei cosmetici come potenziali coloranti non tossici e non cancerogeni, nella ricerca biomedica come marker fluorescenti e nelle malattie indotte da stress ossidativo come agenti terapeutici a causa delle loro potenzialità antiossidanti (Manirafasha et al., 2016). L'applicazione commerciale principale di queste PBPs sembra essere come colorante naturale, al posto dei coloranti artificiali, con la ficocianina in particolare utilizzata come pigmento blu in prodotti come gomme da masticare, ghiaccioli, dolciumi, bibite, latticini e wasabi, nonché prodotti cosmetici (Bleakley & Hayes, 2017).

Nel campo medico è stato riportato che le PBPs, in particolare la ficocianina di varie specie di cianobatteri, esibiscono molte attività farmacologiche e fisiologiche come quella antiossidante, antinfiammatoria, epatoprotettiva, neuroprotettiva, antitumorale, ecc. (Manirafasha et al., 2016). Quando le PBPs entrano nel sistema digerente, vengono scomposti in aminoacidi, piccoli peptidi e ficobiline. Sebbene gli effetti terapeutici siano dimostrati, non è chiaro come queste o i loro metaboliti influenzino i loro bersagli e le vie metaboliche, per questo sono necessari ulteriori studi. Le PBPs possono poi trovare utilizzo nelle applicazioni ottiche grazie alle loro proprietà di emettere forte fluorescenza se irradiate.

Molta attenzione è stata posta allo sviluppo di sonde fluorescenti basate su PBP come marcatori in campi medici o di ricerca. Altro utilizzo delle proprietà ottiche può trovare luogo nella terapia fotodinamica, un nuovo tipo di terapia oncologica basata sull'arricchimento di un'area della lesione con fotosensibilizzanti che causano danno ossidativo al tessuto tumorale (Li et al., 2019).

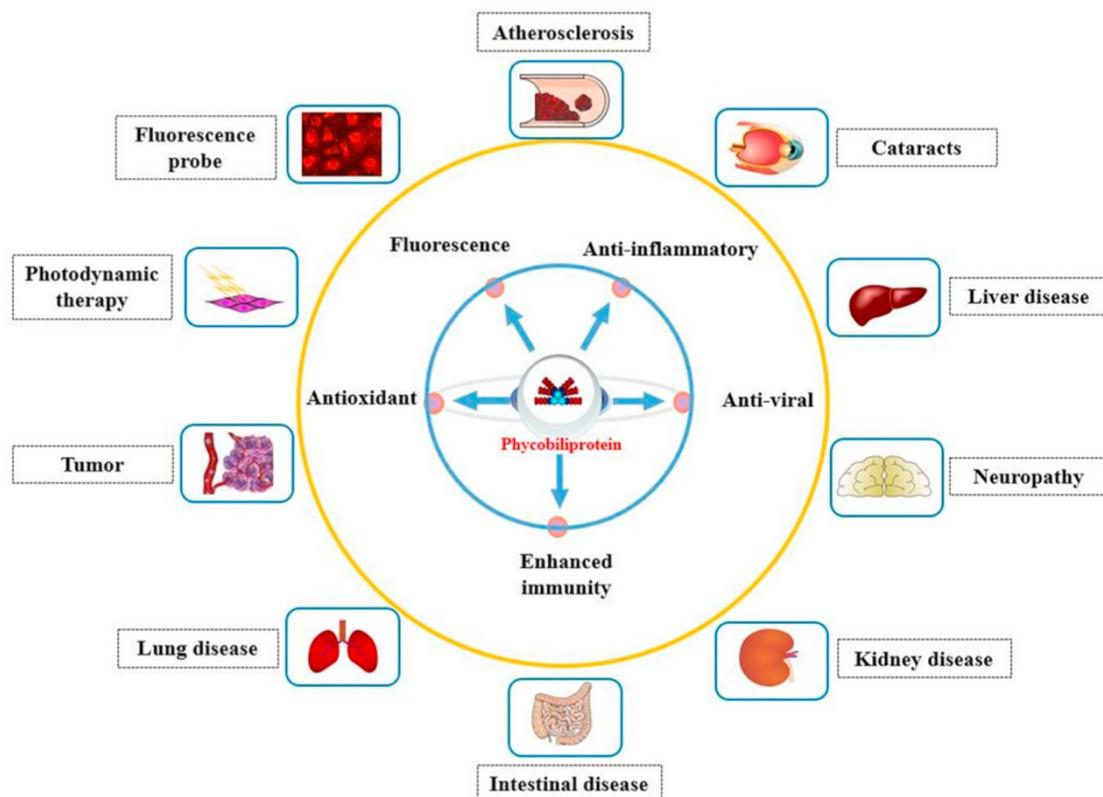


Figura 3-2. Applicazioni delle ficobiliproteine (Li et al., 2019).

Le ficobiliproteine sono state usate in differenti modi. In particolare, la ficocianina è stata il target di mercato principale e da quando è stata accettata dalla Food and Drug Administration (FDA) negli USA il suo utilizzo è aumentato. Il costo delle PBPs varia col variare della purezza in un range tra i \$130 ai \$15000 per grammo. Quando utilizzata per le industrie alimentari la purezza non è un vincolo e il prezzo può essere ridotto, tuttavia, se utilizzato per applicazioni scientifiche e farmaceutiche, la purezza deve essere maggiore e quindi anche il suo costo. Il costo risulta essere un vincolo pesante nell'applicabilità di tali prodotti e per aumentare l'interesse del mercato. Un modo possibile per superare questo limite sarebbe ottimizzare la concentrazione di PBPs nella biomassa algale e trovare nuove applicazioni interessanti (Pagels et al., 2019).

4. Scopo dello studio

Le ficobiliproteine sono proteine insolubili presenti nei cianobatteri e in alcune alghe, come Rodophyta, Glaucophyta e Cryptomonas. Queste proteine hanno trovato largo impiego nel settore cosmetico, alimentare e medico-diagnostico. In campo agrario ci sono ancora pochi studi riguardanti le interazioni tra questi prodotti e le piante. Alcuni studi sulle sono stati fatti negli ultimi anni con un occhio di riguardo all'attività biostimolante e alla tolleranza verso gli stress biotici e abiotici.

Resta molto spazio per l'approfondimento e ulteriori studi devono essere fatti per sviluppare il tema. Questo elaborato si propone di testare la capacità stimolante di ficobiliproteine ottenute dall'alga rossa *Hydropuntia cornea* e dai cianobatteri *Anabena minutissima* e *Arthrospira platensis*. Il lavoro trova origine dalla produzione, estrazione e purificazione con successiva caratterizzazione delle PBPs. Questi prodotti sono stati poi usati in trattamenti a diverse concentrazioni e svariati test sono stati eseguiti in laboratorio per determinare le loro funzionalità. Tra le varie determinazioni eseguite, in questo lavoro prenderemo in considerazione:

- la caratterizzazione delle ficobiliproteine eseguita tramite spettroscopia;
- l'attività enzimatica delle perossidasi, enzimi coinvolti nell'adattamento e in risposta allo stress abiotico;
- l'attività auxino-simile tramite Test di Audus.

Sono state scelte queste due attività correlate che insieme comportano cambiamenti nello stato redox intracellulare e una conseguente risposta morfologica adattativa.

5. Materiali e metodi

5.1 Coltivazione di *Anabena minutissima*, *Arthrospira platensis* e *Hydropuntia cornea*. Estrazione e purificazione delle ficobiliproteine e trattamento

L'alga *Hydropuntia cornea* e i cianobatteri *Arthrospira platensis* e *Anabena minutissima* sono stati coltivati con metodi diversi presso la Banca spagnola delle alghe: *Arthrospira platensis* è stata coltivata in uno stagno lungo 6 m, largo 1,3 m e profondo 0,25 m per una superficie totale di 10 m² e un volume di 1200 L. La soluzione è stata mantenuta in rotazione da pale ed era composta da: 95.24 mM NaHCO₃, 584.10 mM NaCl, 19.78 mM KNO₃, 0.19 mM MgSO₄ 7H₂O, 0.70 mM NH₄H₂PO₄, 1.25 mM Na₂ EDTA 2H₂O, 0.25 mM urea, and 0.02 mM FeSO₄ 7H₂O. *Anabena minutissima* è stata invece coltivata in una vasca di propilene aperta con volume di 90 L e alimentate con terreno BG11. Per monitorare la crescita è stato usato per entrambe le colture uno spettrofotometro impostato alla lunghezza d'onda di 680 nm.

Per la coltivazione di *Hydropuntia cornea* è stata utilizzata una vasca in vetroresina con un volume di 750 L ed alla coltura è stata pompata acqua di mare contenente 200 µM of N-NH₄⁺ and 20 µM of P-PO₃⁻. In questo caso è stata usata la seguente equazione per calcolare il tasso di crescita: $\mu = 100 \ln (W_t / W_0) / t$; dove W₀= peso fresco iniziale, W_t=peso fresco finale e t=tempo in giorni.

Per tutte e tre le colture, a seguito della raccolta settimanale, filtrazione e lavaggio con acqua distillata, la biomassa finale è stata disidratata tramite essiccatore. Le condizioni di temperatura rilevate durante la coltivazione variavano tra i 20 e i 24°C con un irraggiamento di 1800 µmol fotoni m⁻²s⁻¹ (Righini et al., 2020, 2021).

Per l'estrazione delle ficobiliproteine sono stati utilizzati 7,5 g di biomassa liofilizzata di *A. platensis* e *A. minutissima* e 15 g di tallo essiccato di *H.cornea*. Le differenti biomasse sono state messe in soluzione insieme a 100 mL di tampone fosfato 0,2 M a pH 7 (Righini et al., 2020). Successivamente le soluzioni sono state mantenute in agitazione per 4h a temperatura ambiente e al buio e poi centrifugate a 13°C alla velocità di 5000 giri/minuto.

Successivamente sistemi di filtraggio centrifugo Amicon® Ultra-4 (Millipore Corporation, Burlington, MA, USA) sono stati usati per separare e desalinizzare i residui cellulari di alghe e cianobatteri dalle ficobiliproteine. Queste sono state infine liofilizzate e conservate a -80°C (Righini et al., 2021).

Con l'obiettivo di identificare i principali gruppi funzionali delle PBPs sono state eseguite analisi spettroscopiche FT-IR. Gli spettri, misurati tra 4000 e 400 cm⁻¹, sono stati ottenuti con una risoluzione di 4 cm⁻¹ e 64 scansioni per ficobiliproteine ottenute da *H. cornea* e *A. platensis* e a 4 cm⁻¹ e 32 scansioni da *A. minutissima* (Righini et al., 2020, 2021).

I semi di *Solanum lycopersicum* cv. Pachino sono stati trattati con la procedura descritta da Righini et al., 2021. Per prima cosa i semi sono stati sterilizzati in superficie con soluzione di etanolo al 70% per 5 minuti e in soluzione di NaClO (1,5%) per 3 minuti. Sono stati quindi risciacquati in acqua distillata per tre volte. Al termine della sterilizzazione sono stati trattati per immersione in 600 µL di ciascuna concentrazione di PBP (0.6, 1.2, 2.4, 4.8 mg/mL). Per il trattamento di controllo è stata utilizzata acqua distillata. Trenta semi per ogni trattamento e per il controllo sono stati seminati in vasi con torba e sabbia in rapporto 7:3 in peso. I vasi sono stati mantenuti in serra a 24-26°C di giorno e 20-22°C di notte, con fotoperiodo giorno/notte di 12 ore/12 ore, umidità relativa del 70% e irrigati in maniera regolare. L'emergenza ha impiegato otto giorni per avvenire. Per la preparazione dei campioni le foglie sono state raccolte, congelati in azoto liquido e frammentate con pestello e mortaio.

5.2 Attività perossidasi

L'attività perossidasi è stata effettuata seguendo il metodo di Pütter, 1974 e misurata tramite l'assorbanza di una soluzione in spettrofotometro. Una soluzione tampone è stata ottenuta aggiungendo 1,31 g di KH₂PO₄ a 250 ml di acqua Mill-Q (acqua purificata e deionizzata). Nel frattempo, con lo scopo di estrarre gli enzimi coinvolti, i campioni di pomodoro sono stati trattati con N₂, ridotti a polvere fine con mortaio e pestello, e mescolati con acqua in rapporto 1:10.

I campioni sono stati allora filtrati e posti in centrifuga per 15 minuti a 2°C e a 15000 giri/min. Una cuvetta di quarzo 100-QS (Hellma, Germany) è stata poi riempita con:

- 3 ml di soluzione tampone
- 50 μ l di guaiacolo
- 35 μ l of H₂O₂
- 200 μ l di enzima.

Tre repliche di lettura a 400 secondi dell'assorbanza sono state fatte per ogni campione a lunghezza d'onda di 495 nm con l'uso dello spettrofotometro Jasco V-530 (Jasco Europe, Cremella, LC, Italia). L'attività è stata misurata come densità ottica $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ di peso fresco. I dati sono stati raccolti per tre diversi range di tempi (0-400; 100-400; 200-400) e ordinati in un file excel.

5.3 Test Audus per attività auxino-simile

Un biosaggio è un metodo di laboratorio che, utilizzando porzioni di pianta, o piante intere, consente di valutare gli effetti di una sostanza comparandola e includendola in una classe di composti con azione simile. Tra i diversi biosaggi, il test di inibizione della crescita delle radici di crescione è tra i più affidabili e riproducibili. Il metodo proposto per valutare l'attività auxino-simile si basa sul test proposto da Audus (Audus, 1972). Il metodo si basa sulla capacità da parte dell'auxina di inibire la crescita delle radici di piante di crescione. Un composto possiede capacità auxino-simile quando provoca effetti simili a quelli indotti dall'ormone (Ertani et al., 2009; Nardi et al., 2002).

L'attività dell'auxina è stata determinata in condizioni di sterilità, utilizzando per ogni trattamento cinque piastre Petri, contenenti un filtro di carta imbevuto di 1,2 ml della soluzione da saggiare su cui sono stati collocati venti semi di crescione (*Lepidium sativum* L.). Le ficobiiiproteine, con le quali sono stati imbevuti i filtri, sono state diluite in diverse concentrazioni: TQ quando 10 mg di PBP sono state miscelate con 10 mL, TQ⁻², TQ⁻⁴, TQ⁻⁶ e TQ⁻⁸. Il controllo era rappresentato da piastre Petri con filtro imbevuto con acqua distillata. Le piastre di Petri così preparate e chiuse con parafilm, sono state poste in una cella buia a temperatura costante di 24-25°C per 48 ore.

Infine, le piantine sono state rimosse e le lunghezze delle radici di crescita sono state misurate tramite calibro elettronico TESA CAL IP67 (TESA, Renens, CH) e software Data Direct versione 1 (ArtWare, Asti, IT). I dati sono stati trasformati su scala logaritmica naturale per ottenere il miglior adattamento lineare.

Per l'analisi statistica dell'attività perossidasi e dell'attività auxino-simile è stata utilizzata un'analisi di regressione per verificare la relazione tra diversi parametri chimici e biochimici delle piante trattate a diverse dosi di ficobiliproteine. Le correlazioni tra le variabili sono state determinate tramite coefficiente di Pearson. Tutte le analisi sono state effettuate con il software SPSS versione 19 (SPSS inc., 1999).

6. Risultati

6.1 Caratterizzazione ficobiliproteine

Con l'obiettivo di descrivere e identificare i gruppi funzionali presenti nelle ficobiliproteine di *Anabena minutissima*, *Arthrospira platensis* e *Hydropuntia cornea* è stata eseguita un'analisi spettroscopica ad infrarossi. Poiché diverse molecole con le loro strutture differenti producono spettri diversi, gli spettri possono essere usati per identificare e distinguere le stesse. Risultano quindi una sorta di impronta digitale. La lettura dello spettro consiste nel determinare quali gruppi e legami corrispondono a quale picco (<https://www.sigmaaldrich.com/n.d.>).

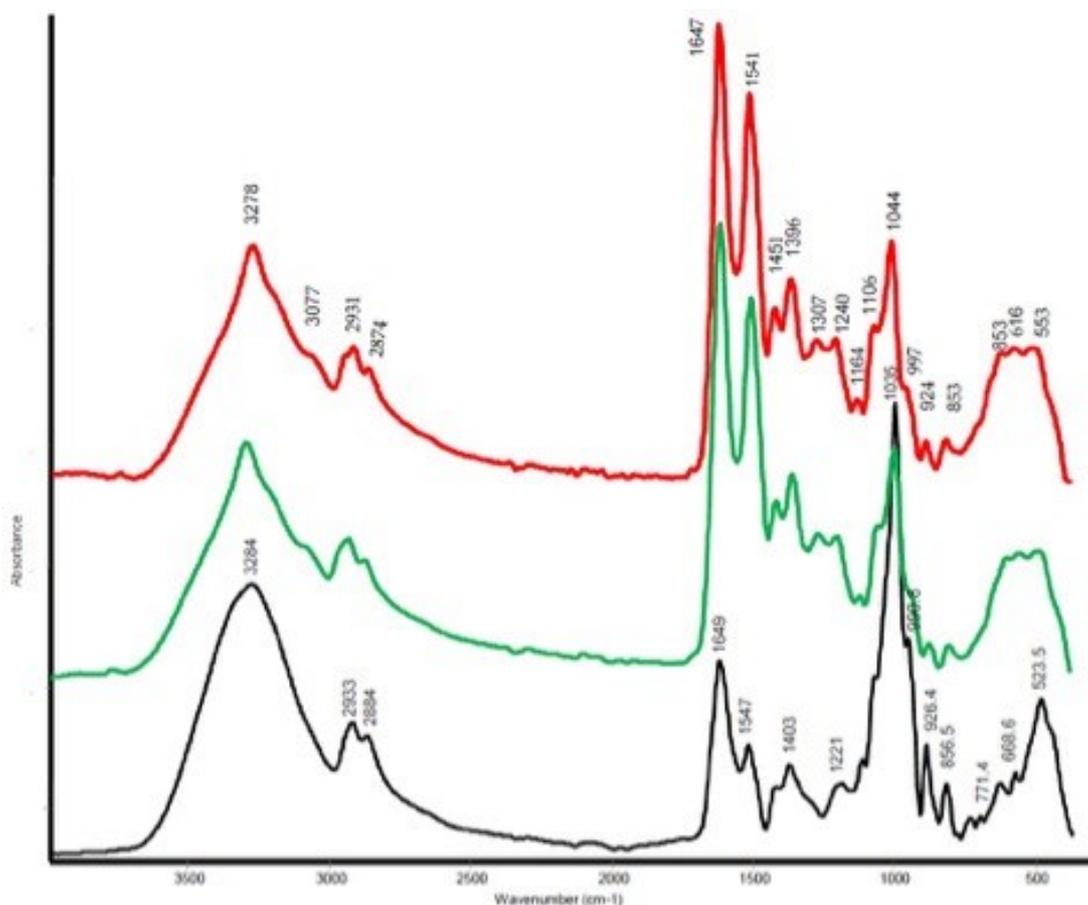


Figura 6-1. Spettro a infrarossi di *H. cornea* (nero); *A. platensis* (rosso) e *A. minutissima* (verde). Modificato da Righini et al. (2020,2021).

Il picco a forma di spalla che appare tra 3100-3077 cm^{-1} è assegnato alla vibrazione di stiramento del legame chimico -N-H.

Questa banda è anche nota come Ammide A ed è tipica nelle ammidi secondarie che sono associate al legame idrogeno di tipo $\text{N-H}\cdots\text{O}=\text{C}$.

Le bande da 2960 a 2927 cm^{-1} sono attribuibili rispettivamente alla vibrazione asimmetrica dei gruppi -CH₃ e -CH₂ e lo stiramento di questi gruppi è osservabile a 2884-2856 cm^{-1} . Il picco intorno a 1649-1647 cm^{-1} si riferisce allo stiramento C-O nel legame peptidico (Ammide I). Il picco tra 1547 e 1541 cm^{-1} è dovuto allo stiramento del legame C-N e alla deformazione dell'angolo di legame di N-H nella banda dell'Ammide II. Gli spettri delle ficobiliproteine differiscono per intensità delle relative bande delle ammidi che appaiono più forti in *A. platensis* e *A. minutissima* rispetto a *H. cornea*. La banda a 1403 cm^{-1} nello spettro è conseguenza dello stiramento simmetrico di -COO⁻, alla deformazione di -CH₃, -CH₂ e -OH. Le altre bande osservate tra 1300 e 1221 cm^{-1} sono attribuibili alle vibrazioni che coinvolgono lo stiramento del legame C-N e la flessione di N-H nell'Ammide III. Le ammidi secondarie sono riconoscibili dalla presenza delle bande specifiche: l'Ammide V a circa 700 cm^{-1} (deformazione di N-H), l'Amide IV a 620-625 cm^{-1} caratterizzata dalla flessione del legame O=C-N e l'Amide VI tra 535 e 600 cm^{-1} (deformazione di C=O).

La presenza di una banda tra 1044-1035 cm^{-1} è causa dello stiramento del legame C-O-H in alcoli primari e secondari. In *H. cornea* la banda a 1035 cm^{-1} è la più intensa come mostrato in Figura 6-1 e l'amplificazione nell'intensità è dovuta al contributo del silicato presente (Righini et al., 2020, 2021).

6.2 Effetto del trattamento con PBP su pomodoro: attività perossidasi

L'attività perossidasi allo spettrofotometro è stata analizzata statisticamente considerando tre intervalli di tempi diversi: tra 0 e 400 secondi, tra 100 e 400 secondi e tra 200 e 400 secondi.

Per ogni replica allo spettrofotometro sono stati riportati in un file excel i valori dell'attività (misurata come densità ottica al minuto), la retta, la correlazione e la varianza. Delle repliche più conformi sono state poi calcolate medie, dev.standard e differenze rispetto al controllo.

Come mostrato in Figura 6-2, l'attività perossidasi è influenzata in maniera diversa dalle ficobiliproteine a seconda del trattamento e della concentrazione. I valori sono espressi come differenza percentuale dei trattamenti rispetto al controllo. I tre intervalli assumevano andamenti pressochè uguali e sovrapponibili, ma l'intervallo tra 200 e 400 secondi è stato ritenuto il migliore come livello di significatività.

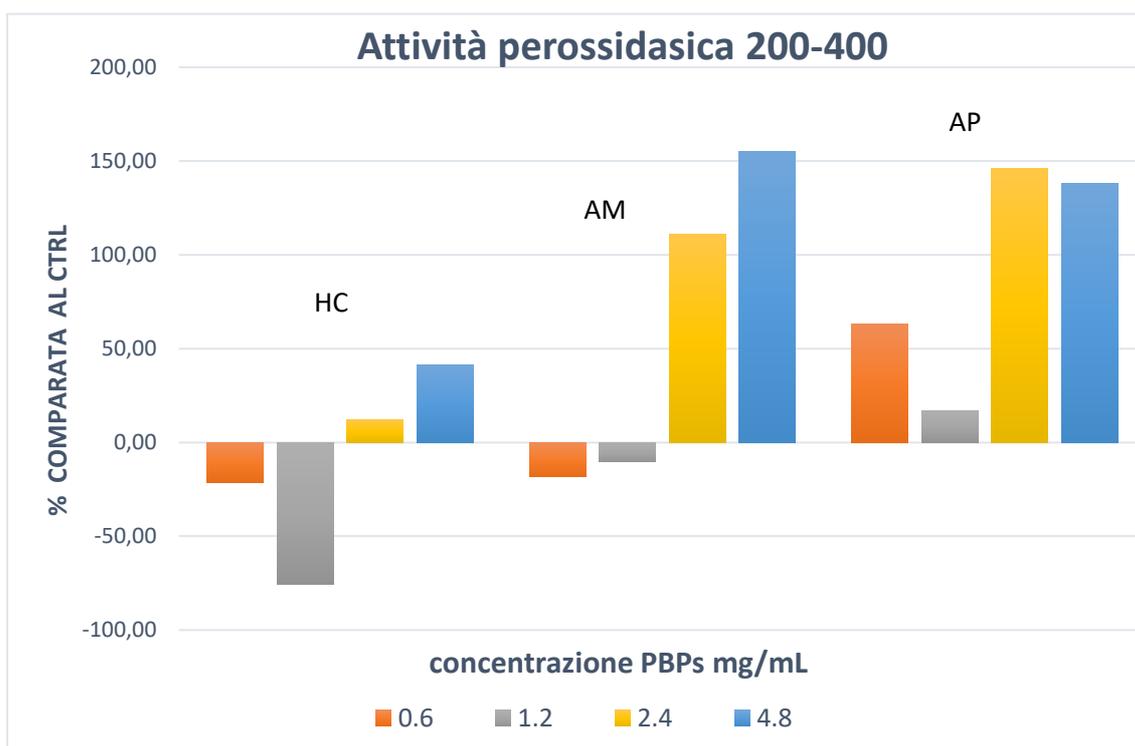


Figura 6-2: variazioni percentuali dei trattamenti a diverse concentrazioni rispetto al controllo nei diversi intervalli.

In questo intervallo è stato valutato la bontà del modello di regressione caratterizzato da valori di $r^2 = 0.452$, $p = 0.017$ per *H. cornea*; $r^2 = 0.598$, $p = 0.003$ per *A. minutissima*; $r^2 = 0.444$, $p = 0.018$ per *A. platensis*. Le concentrazioni di 2,4 e 4,8 mg/mL hanno mostrato incrementi significativi dell'attività enzimatica per tutti e tre i trattamenti. In particolare, *A. minutissima* e *A. platensis* hanno mostrato incrementi notevoli delle medie delle tre repliche con differenze percentuali rispetto al controllo rispettivamente di 111,2 e 155,1% per la concentrazione di 2,4 mg/mL, e di 146,2 % e 138,1 per quella a 4,8 mg/mL.

Effetti di incremento dell'attività perossidasi rispetto al controllo sono stati notati anche in *H. cornea* alle dosi più elevate anche se con differenza meno significativa (12,3% e 41,5%). Incrementi importanti sono stati trovati anche alle dosi minori per *A. platensis*, rispettivamente di 63,1% alla concentrazione di 0,6 mg/mL e di 16,7% alla concentrazione di 1,2 mg/mL. Effetti contrari a queste concentrazioni si hanno avuto in *H. cornea* e *A. minutissima* dove si sono trovati dei decrementi nell'attività perossidasi con un picco minimo di -74,5% per *H. cornea* alla concentrazione di 1,2 mg/mL.

6.3 Effetto del trattamento con PBPs su crescita: attività auxino-simile

L'attività auxino-simile delle ficobiliproteine è stata valutata nei semi di crescita misurando la lunghezza della radice nelle piante trattate alle varie concentrazioni e quelle di controllo e confrontandone le misure.

In tutti i casi, un modello logaritmico spiegava un'elevata percentuale della variabilità totale della variabile dipendente ($R^2 = 83 - 97\%$, $P = 0.029-0.001$). I valori del coefficiente di regressione (b) di ciascuna curva sono visibili in Tabella 1. Il valore b è indicativo di come le ficobiliproteine abbiano avuto un impatto sulla crescita delle piante in riferimento all'attività auxinica. Come si può notare *A. platensis* ha mostrato i valori maggiori in termini assoluti (da -0,179 a -0,271), seguito da *H. cornea* (da -0,124 a -0,17) e da *A. minutissima* (da -0,117 a -0,162). Come mostrato in Figura 6-4 i dati riferiti alle dosi più elevate hanno indotto una maggiore riduzione nella crescita radicale. Anche in questo caso *A. platensis* ha mostrato l'effetto maggiore e *H. cornea* il minore.

Treatment	replicate	R2	F	P	b
AP	1	0,92	36,58	0,009	-0,271
	2	0,83	15,38	0,029	-0,185
	3	0,85	16,32	0,027	-0,179
AM	1	0,84	15,73	0,029	-0,138
	2	0,89	26	0,015	-0,162
	3	0,95	55,38	0,005	-0,117
HC	1	0,88	21,4	0,019	-0,124
	2	0,97	131,41	0,001	-0,132
	3	0,94	47,89	0,006	-0,170
IAA		0,94	52,12	0,001	-1,318

Tabella 6-3. Parametri della curva di regressione [$Y = a + b \log(X)$] tra concentrazione e lunghezza della radice di crescita trattate con PBPs o con IAA.

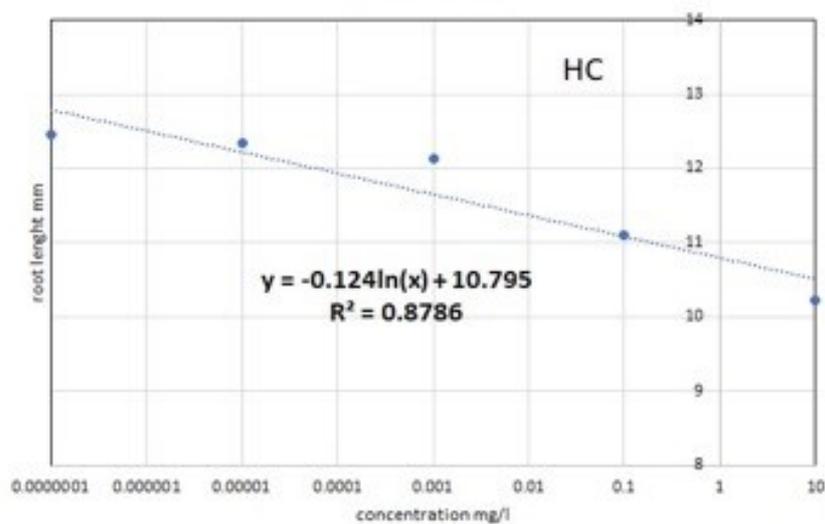
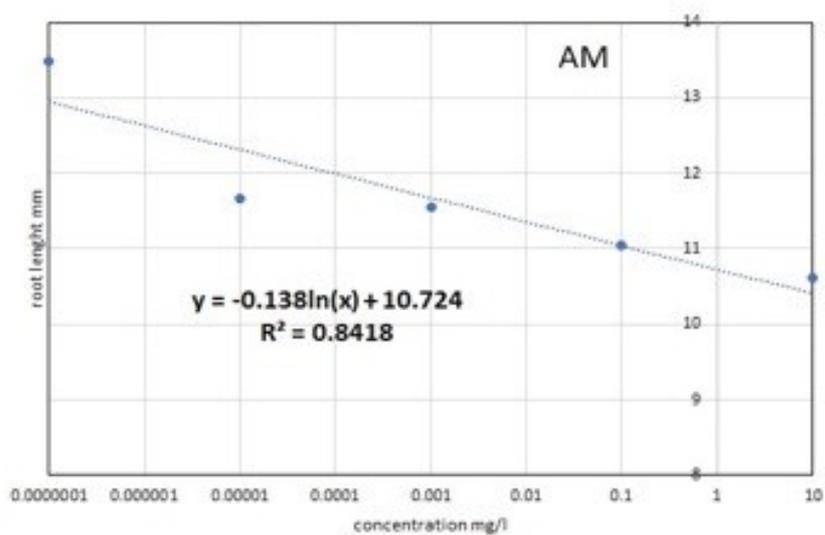
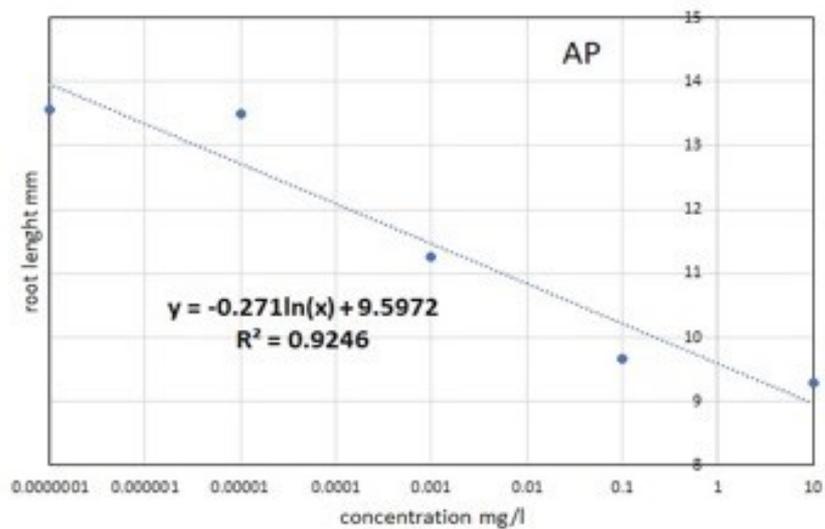


Figura 6-4. Rappresentazione delle curve di regressione tra concentrazioni di PBP e lunghezza radicale con linearizzazione del modello logaritmico.

7. Discussione

L'uso benefico delle ficobiliproteine derivanti da cianobatteri e alghe sulla crescita e lo sviluppo delle piante è stato ampiamente dimostrato. Questi pigmenti sono stati argomento di diverse ricerche in svariati ambiti, ma i riferimenti nel campo agronomico sono limitati a pochissimi studi.

In questo lavoro le ficobiliproteine ottenute da *A.minutissima*, *A.platensis* e *H.cornea* mostrano un generale effetto stimolante sulle piante di pomodoro, per quanto riguarda l'attività enzimatica perossidasi, e su crescita riferito all'attività auxino-simile.

Le differenze sono state riscontrate a seconda del trattamento e delle dosi valutate. Grazie ad un'analisi spettroscopica ad infrarossi si è potuto definire generalmente le caratteristiche di questi prodotti e le loro proprietà. Sebbene le ficobiliproteine condividano una spalla comune, nota come Amide A, tra 3100 e 3077 cm^{-1} , differiscono per intensità della fascia per quanto riguarda l'Amide I (1649-1647 cm^{-1}). Questa fascia insieme a quella dell'Amide II (1547-1541 cm^{-1}) e dell'Amide III (1248-1274 cm^{-1}) risultano più intense nelle ficobiliproteine derivanti da cianobatteri rispetto ad *H.cornea* e questo effetto è tipicamente correlato ai legami delle proteine. Inoltre, le PBPs differiscono nella struttura secondaria dell'Amide I, una struttura a α -elica nei cianobatteri e più random-coil nell'alga rossa (Righini et al., 2020).

Per valutare l'attività biostimolante delle molecole organiche sulle piante vengono eseguiti dei saggi. Questi confrontano l'intensità degli effetti indotti da una sostanza con l'azione esercitata da composti capaci di stimolare risposte simili. Questi test si basano sulle risposte fisiologiche dei prodotti con ormoni di riferimento. Tra i vari saggi quello più affidabile è il test Audus che consente di determinare se le molecole in considerazione possiedono un'attività ormone-simile. *Arthrospira platensis*, *Anabena minutissima* e *Hydropuntia cornea* hanno dimostrato di avere attività biostimolante perché mostravano attività simile all'auxina. Tali attività possono essere in parte dovute all'azione biologica di piccoli peptidi e amminoacidi, che sono considerati precursori ormonali e molecole chiave nelle vie di segnale. Infatti, la funzione di segnale dei peptidi è importante in diversi aspetti dello sviluppo e crescita delle piante, compresa l'organizzazione dei meristemi e la morfogenesi fogliare (Matsubayashi & Sakagami, 2006). Inoltre, la presenza di gruppi carbossilici e aromatici è di importanza biologica e secondo studi precedenti questi gruppi sono responsabili nell'indurre risposte ormoni simili (IAA e GA) nelle piante (Muscolo et al., 2013; Nardi et al., 1996).

Altri studi hanno evidenziato che l'attività ormono-simile potrebbe essere attribuita alla presenza di IAA endogena e di altre auxine (acido fenilacetico e acido indolbutirrico), tutte contenenti un gruppo carbossilico oltre ad un anello idrofobico (Russell et al., 2006).

Infine, è stata analizzata l'attività delle perossidasi. Le perossidasi sono onnipresenti nelle piante e sono, insieme ad altri enzimi, coinvolti in molti processi come la differenziazione e la crescita; esse sono implicate nell'organogenesi e correlate all'attività auxinica (Krsnik Rasol et al., 1982). Le perossidasi sono fondamentali per mantenere in equilibrio le specie reattive dell'ossigeno. Queste sono considerate generalmente come sottoprodotti tossici del metabolismo, ma sono elementi fondamentali nelle vie di segnale intracellulare. Alcuni studi sul gravitropismo della radice indicano che le ROS possono funzionare come componente a valle nella trasduzione del segnale mediata dall'auxina (Joo et al., 1993). L'integrazione delle ROS con la rete di segnali degli ormoni indotta dai fattori ambientali è nota come "risposta morfogenetica indotta da stress". In condizioni di siccità o salinità, dall'interazione dei ROS con gli ormoni auxinici, derivano variazioni dello stato redox che portano a cambiamenti morfologici (Figura 7-1); questi concorrono a limitare i danni dati dallo stress e includono fenomeni quali il blocco della divisione cellulare nel meristema primario delle radici, l'inibizione dell'allungamento delle radici, l'aumento del numero di radici laterali (Matta et al., 2017).

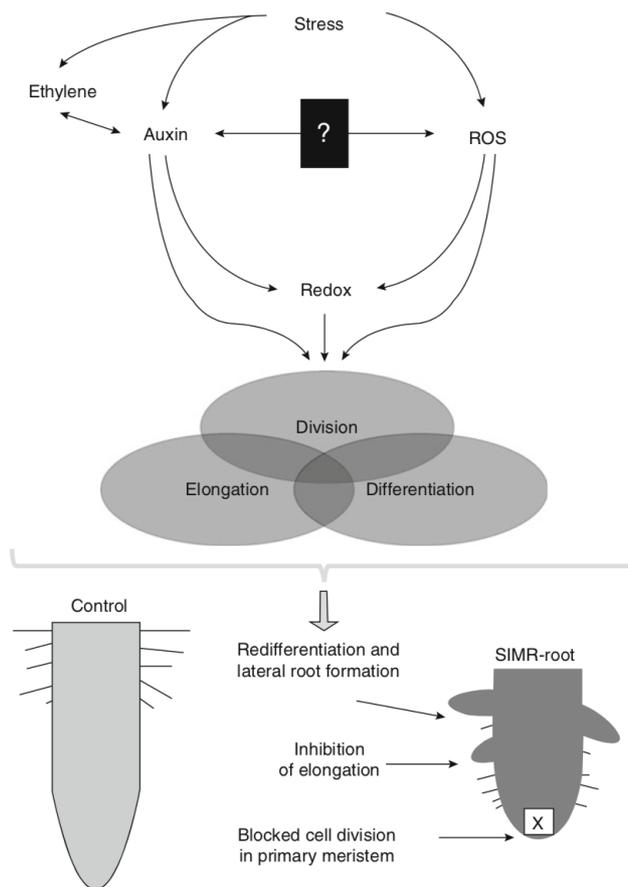


Figura 7-1. Risposta morfologicamente indotta da stress in radice (Patakas, 2012).

I nostri risultati hanno evidenziato che il trattamento con *A. minutissima* e *A. platensis* stimolava l'attività delle perossidasi in modo diverso a seconda delle loro concentrazioni, mentre *H. cornea* inibisce l'attività enzimatica. Per le specie cianobatteriche i risultati sono in accordo con quanto riportato in letteratura. Infatti aumenti dell'attività perossidasi sono riportati da Roberti et al. (2015) a seguito dell'applicazione di *A. minutissima* su zuccina, e da Ertani et al. (2019) attraverso l'applicazione di un idrolizzato di *A. platensis* su mais. I dati sono poi corroborati dall'evidente attività auxino-simile degli estratti cianobatterici.

D'altro canto i risultati evidenziano anche la bassa attività delle perossidasi su *H. cornea* che si scontra con quanto riportato finora in letteratura. Le perossidasi sono un costituente delle alghe rosse e la loro attività è solitamente aumentata (Oesterhelt et al., 2008; Rachidi et al., 2021). Tuttavia, questi studi non si riferiscono ad esperimenti effettuati direttamente su piante o utilizzano specie diverse da quella qui presentata.

Questa differenza può essere causa di risultati diversi, che dovranno essere in qualsiasi caso oggetto di ulteriori ricerche.

8. Conclusione

Dai risultati riportati e discussi in precedenza, in generale, emerge una buona attività biostimolante delle ficobiliproteine. Le differenze sono presenti tra i prodotti di diversa origine e con andamento dose-dipendente.

L'incremento simultaneo dell'attività enzimatica delle perossidasi e il contenuto totale di auxine può significare un miglioramento nella salute della pianta grazie ad un aumento nelle capacità adattative e di difesa dagli stress abiotici e biotici.

Nel nostro caso i pigmenti estratti dai cianobatteri hanno avuto risultati superiori a quelli di *H.cornea*, confermando solo in parte quanto visto in letteratura.

Le differenze nei risultati potrebbero essere determinate dalle differenze chimico-strutturali rilevate grazie alla spettroscopia ad infrarossi, oppure in base alle specie scelte per lo studio che devono essere oggetto di ulteriori ricerche.

Considerando l'effetto benefico ottenuto da questi prodotti e tenendo conto di altri presenti in letteratura, con ulteriori ricerche a seguito, si potrebbe ottenere un'ampia gamma di formulati possibili. Queste miscele potrebbero consentire di avere dei miglioramenti sostanziali nello sviluppo e nella crescita delle piante, con tutti i relativi benefici dei prodotti biostimolanti e riducendo allo stesso tempo input di inquinanti.

Questo studio è solo un primo passo nello studio delle ficobiliproteine come prodotti biostimolanti e in generale nel campo agronomico. Sulla base dei risultati ottenuti, ulteriori spunti di riflessione su queste molecole e in generale sui biostimolanti potrebbero essere fatti, allargando il campo di ricerca ai vari prodotti e migliorandone le caratteristiche.

Ulteriori ricerche sui biostimolanti dovranno essere eseguite per dare una più precisa descrizione identificativa del prodotto e del meccanismo d'azione.

Bibliografia

- Regolamento (UE) 2019/1009 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 5 giugno 2019*, (2019).
- Alexandratos, N., & Bruinsma, J. (2012). *The 2012 Revision PROOF COPY*.
www.fao.org/economic/esa
- Apt, K. E., Collier, J. L., & Grossman, A. R. (1995). Evolution of the Phycobiliproteins. In *J. Mol. Biol* (Vol. 248).
- Audus, L. J. (1972). *Plant growth substances: Vol. 1*.
- Battacharyya, D., Babgohari, M. Z., Rathor, P., & Prithiviraj, B. (2015). Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. In *Scientia Horticulturae* (Vol. 196, pp. 39–48). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.012>
- Bleakley, S., & Hayes, M. (2017). *Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production*.
- Bryant, D. A., Hunter, C. N., & Warren, M. J. (2020). Biosynthesis of the modified tetrapyrroles—the pigments of life. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 295, Issue 20, pp. 6888–6925). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.006194>
- Bulgari, R., Franzoni, G., & Ferrante, A. (2019). Biostimulants Application in Horticultural Crops under Abiotic Stress Conditions. *Agronomy*.
- Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. In *Plant and Soil* (Vol. 383, Issues 1–2, pp. 3–41). Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
- Chrispeels, M. J., & Gepts, P. (2018). *Agricoltura sostenibile attraverso le biotecnologie* (Piccin, Ed.).
- 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. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02202>
- Colla, G., Nardi, S., Cardarelli, M., Ertani, A., Lucini, L., Canaguier, R., & Rouphael, Y. (2015). Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. In *Scientia Horticulturae* (Vol. 196, pp. 28–38). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.037>

- Drobek, M., Frac, M., & Cybulska, J. (2019). Plant Biostimulants: Importance of the Quality and Yield of Horticultural Crops and the Improvement of Plant Tolerance to Abiotic Stress—A Review. *Agronomy*.
- du Jardin. (2012). *The Science of Plant biostimulants*.
- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. In *Scientia Horticulturae* (Vol. 196, pp. 3–14). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Ertani, A., Cavani, L., Pizzeghello, D., Brandellero, E., Altissimo, A., Ciavatta, C., & Nardi, S. (2009). Biostimulant activity of two protein hydrolyzates in the growth and nitrogen metabolism of maize seedlings. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 172(2), 237–244. <https://doi.org/10.1002/jpln.200800174>
- Ertani, A., Francioso, O., Tinti, A., Schiavon, M., Pizzeghello, D., & Nardi, S. (2018). Evaluation of seaweed extracts from laminaria and ascophyllum nodosum spp. As biostimulants in zea mays L. using a combination of chemical, biochemical and morphological approaches. *Frontiers in Plant Science*, 9.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00428>
- Ertani, A., Nardi, S., Francioso, O., Sanchez-Cortes, S., Foggia, M. Di, & Schiavon, M. (2019). Effects of two protein hydrolysates obtained from chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Spirulina platensis* on *Zea mays* (L.) plants. *Frontiers in Plant Science*, 954.
- FAO. (2017). *Water for Sustainable Food and Agriculture*.
- 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., ... Zaks, D. P. M. (2011). Solutions for a cultivated planet. *Nature*, 478(7369), 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature10452>
- Franzoni, G., Cocetta, G., Prinsi, B., Ferrante, A., & Espen, L. (2022). Biostimulants on Crops: Their Impact under Abiotic Stress Conditions. *Horticulturae*, 8(3), 189.
<https://doi.org/10.3390/horticulturae8030189>
- Garcia, D. (2020). *Potential strategies and opportunities for the development of Arthrospira maxima (Spirulina) processes: A review PhycoPigments: Novel manufacturing methods for high value pigments products from microalgae View project Scientific divulgation View project*.
<https://www.researchgate.net/publication/343046872>

- Grossman, A., & Schaefer, M. (1993). *The Phycobilisome, a Light-Harvesting Complex Responsive to Environmental Conditions*.
- Hasanuzzaman, M., Parvin, K., Bardhan, K., Nahar, K., Anee, T. I., Masud, A. A. C., & Fotopoulos, V. (2021). Biostimulants for the regulation of reactive oxygen species metabolism in plants under abiotic stress. In *Cells* (Vol. 10, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10102537>
- Hayat, S., Ahmad, H., Ali, M., Ren, K., & Cheng, Z. (2018). Aqueous garlic extract stimulates growth and antioxidant enzymes activity of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Scientia Horticulturae*, 240, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.011>
- <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ftir-spectroscopy>. (n.d.). *What is FTIR Spectroscopy?*
- Joo, J. H., Bae, Y. S., & Lee, J. S. (1993). *Greenberg*. Pennell and Lamb. <https://academic.oup.com/plphys/article/126/3/1055/6103582>
- Kapooore, R. V., Wood, E. E., & Llewellyn, C. A. (2021). Algae biostimulants: A critical look at microalgal biostimulants for sustainable agricultural practices. In *Biotechnology Advances* (Vol. 49). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107754>
- 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 Science*, 47(1), 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., & Prithiviraj, B. (2009). Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. In *Journal of Plant Growth Regulation* (Vol. 28, Issue 4, pp. 386–399). <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9103-x>
- Krsnik Rasol, M., Jelaska, S., & Šerman, D. (1982). Isoperoxidases-early indicators of somatic embryoid differentiation in pumpkin tissue. *Acta Botanica Croatica*, 41(1), 33–39.
- Kumar, A., & Verma, J. P. (2018). Does plant—Microbe interaction confer stress tolerance in plants: A review? In *Microbiological Research* (Vol. 207, pp. 41–52). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.004>

- la Torre, A., Battaglia, V., & Caradonia, F. (2016). An overview of the current plant biostimulant legislations in different European Member States. In *Journal of the Science of Food and Agriculture* (Vol. 96, Issue 3, pp. 727–734). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7358>
- Lehmann, J., & Kleber, M. (2015). The contentious nature of soil organic matter. In *Nature* (Vol. 528, Issue 7580, pp. 60–68). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature16069>
- Li, W., Su, H. N., Pu, Y., Chen, J., Liu, L. N., Liu, Q., & Qin, S. (2019). Phycobiliproteins: Molecular structure, production, applications, and prospects. In *Biotechnology Advances* (Vol. 37, Issue 2, pp. 340–353). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.01.008>
- López-Bucio, J., Pelagio-Flores, R., & Herrera-Estrella, A. (2015). Trichoderma as biostimulant: Exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. In *Scientia Horticulturae* (Vol. 196, pp. 109–123). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.043>
- Manirafasha, E., Ndikubwimana, T., Zeng, X., Lu, Y., & Jing, K. (2016). Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. In *Biochemical Engineering Journal* (Vol. 109, pp. 282–296). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.025>
- Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Pörtner, H.-O., Roberts, D., Skea, J., Calvo, E., Priyadarshi, B., Shukla, R., Ferrat, M., Haughey, E., Luz, S., Neogi, S., Pathak, M., Petzold, J., Pereira, J. P., Vyas, P., Huntley, E., Kissick, K., Belkacemi, M., & Malley, J. (2019). *Climate Change and Land An IPCC Special Report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems* Head of TSU (Operations) IT/Web Manager Senior Administrator. www.ipcc.ch
- Matson, P. A., Parton, W. J., Power, A. G., & Swift, M. J. (1997). Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science*, 277(5325), 504–509. <https://doi.org/10.1126/science.277.5325.504>
- Matsubayashi, Y., & Sakagami, Y. (2006). PEPTIDE HORMONES IN PLANTS. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 649–674. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144204>
- Matta, A., Buonauro, R., & Favaron, F. (2017). *Fondamenti di patologia vegetale*.

- Muscolo, A., Sidari, M., & Nardi, S. (2013). Humic substance: Relationship between structure and activity. Deeper information suggests univocal findings. *Journal of Geochemical Exploration*, 129, 57–63.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.10.012>
- Naing, A. H., & Kim, C. K. (2021). Abiotic stress-induced anthocyanins in plants: Their role in tolerance to abiotic stresses. In *Physiologia Plantarum* (Vol. 172, Issue 3, pp. 1711–1723). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ppl.13373>
- Nardi, S., Carletti, P., Pizzeghello, D., & Muscolo, A. (2009). Biological Activities of Humic Substances. In *Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Nonliving Organic Matter in Environmental Systems* (pp. 305–339). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470494950.ch8>
- Nardi, S., Concheri, G., & Dell’Agnola, G. (1996). Chapter 9 - Biological Activity of Humus. In A. Piccolo (Ed.), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems* (pp. 361–406). Elsevier Science B.V. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-044481516-3/50010-4>
- Nardi, S., Ertani, A., & Francioso, O. (2017). Soil–root cross-talking: The role of humic substances. In *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* (Vol. 180, Issue 1, pp. 5–13). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/jpln.201600348>
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Bragazza, L., & Gerdol, R. (2002). Low-molecular-weight organic acids and hormone-like activity of dissolved organic matter in two forest soils in n italy. In *Journal of Chemical Ecology* (Vol. 29, Issue 7).
- Nardi, S., Pizzeghello, D., & Ertani, A. (2018). Hormone-like activity of the soil organic matter. *Applied Soil Ecology*, 123, 517–520.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.04.020>
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., & Vianello, A. (2002). *Physiological effects of humic substances on higher plants*. www.elsevier.com/locate/soilbio
- 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. In *Scientia Agricola* (Vol. 73, Issue 1, pp. 18–23). Scientia Agricola. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0006>
- Nardi, S., Schiavon, M., & Francioso, O. (2021). Chemical structure and biological activity of humic substances define their role as plant growth promoters. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 8). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/molecules26082256>

- Oesterhelt, C., Vogelbein, S., Shrestha, R. P., Stanke, M., & Weber, A. P. M. (2008). The genome of the thermoacidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* encodes a small family of secreted class III peroxidases that might be involved in cell wall modification. *Planta*, 227(2), 353–362. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0622-z>
- Pagels, F., Guedes, A. C., Amaro, H. M., Kijjoo, A., & Vasconcelos, V. (2019). Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. In *Biotechnology Advances* (Vol. 37, Issue 3, pp. 422–443). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.010>
- Patakas, A. (2012). Abiotic Stress-Induced Morphological and Anatomical Changes in Plants. In *Abiotic Stress Responses in Plants* (pp. 21–39). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0634-1_2
- Pütter, J. (1974). Peroxidases. In *Methods of enzymatic analysis* (pp. 685–690). Elsevier.
- Puzorjov, A., & McCormick, A. J. (2020). Phycobiliproteins from extreme environments and their potential applications. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 71, Issue 13, pp. 3827–3842). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa139>
- Rachidi, F., Benhima, R., Kasmi, Y., Sbabou, L., & Arroussi, H. el. (2021). Evaluation of microalgae polysaccharides as biostimulants of tomato plant defense using metabolomics and biochemical approaches. *Scientific Reports*, 11(1), 930. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78820-2>
- Righini, H., Francioso, O., di Foggia, M., Quintana, A. M., & Roberti, R. (2020). Preliminary Study on the Activity of Phycobiliproteins against *Botrytis cinerea*. *Marine Drugs*, 18(12). <https://doi.org/10.3390/md18120600>
- Righini, H., Francioso, O., di Foggia, M., Quintana, A. M., & Roberti, R. (2021). Assessing the potential of the terrestrial cyanobacterium *Anabaena minutissima* for controlling *botrytis cinerea* on tomato fruits. *Horticulturae*, 7(8). <https://doi.org/10.3390/horticulturae7080210>
- Roberti, R., Galletti, S., Burzi, P. L., Righini, H., Cetrullo, S., & Perez, C. (2015). Induction of defence responses in zucchini (*Cucurbita pepo*) by *Anabaena* sp. water extract. *Biological Control*, 82, 61–68.
- Ronga, D., Biazzi, E., Parati, K., & Carminati, D. (2019). Microalgal-biostimulants-and-biofertilisers-in-crop-productionsAgronomy. *Agronomy*.

- Rouphael, Y., & Colla, G. (2020). Editorial: Biostimulants in Agriculture. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00040>
- Rouphael, Y., Colla, G., Giordano, M., El-Nakhel, C., Kyriacou, M. C., & de Pascale, S. (2017). Foliar applications of a legume-derived protein hydrolysate elicit dose-dependent increases of growth, leaf mineral composition, yield and fruit quality in two greenhouse tomato cultivars. *Scientia Horticulturae*, 226, 353–360.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.09.007>
- Russell, L., Stokes, A. R., Macdonald, H., Muscolo, A., & Nardi, S. (2006). Stomatal responses to humic substances and auxin are sensitive to inhibitors of phospholipase A2. *Plant and Soil*, 283(1–2), 175–185.
<https://doi.org/10.1007/s11104-006-0011-6>
- Sen-Fang Sui. (2021). *Structure of Phycobilisomes*.
- Tabassum, B., Khan, A., Tariq, M., Ramzan, M., Iqbal Khan, M. S., Shahid, N., & Aaliya, K. (2017). Bottlenecks in commercialisation and future prospects of PGPR. In *Applied Soil Ecology* (Vol. 121, pp. 102–117). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.09.030>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2012). *Fisiologia vegetale* (Piccin, Ed.; 4th ed.).
- United Nations. (2019). *World Populations Prospects 2019*.
- 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. In *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* (Vol. 4, Issue 1). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0089-5>
- Watanabe, M., & Ikeuchi, M. (2013). Phycobilisome: Architecture of a light-harvesting supercomplex. In *Photosynthesis Research* (Vol. 116, Issues 2–3, pp. 265–276). Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9905-3>
- Yakhin, O. I., Lubyantsev, A. A., Yakhin, I. A., & Brown, P. H. (2017). Biostimulants in plant science: A global perspective. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 7). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049>