

Biostimolanti: nuovo scenario per il futuro dell'agricoltura

Serenella Nardi*, Diego Pizzeghello e Andrea Ertani

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente, Università di Padova

Biostimulants: new scenario for the future of agriculture

Abstract. Biostimulants are organic molecules that are often referred to as positive plant growth regulators or as metabolic enhancers. When applied in small amounts, biostimulants can promote plant development, increase yields and support plants to overcome stress situations. They can also reduce the need for high levels of nitrogen fertilization by increasing the efficiency of nutrients and water uptake. Biostimulants include two important groups of molecules: humic substances and free amino acids/peptides. Humic substances are known to improve shoot and root growth, induce seed germination and seedling establishment. They positively affect plant physiology by acting on photosynthesis, protein synthesis, lignification rate and mechanisms involved in abiotic stress resistance. Protein hydrolysates are constituted of oligo- and poly-peptides, and free amino acids, which can be obtained through chemical and/or enzymatic hydrolysis of organic matrix from plant or animal sources. Their application leads to the improvement of plant nutrition and metabolism.

Key words: Humic substances, Protein hydrolysates, Root apparatus, Plant metabolism.

Introduzione

L'inquinamento delle acque causato da un eccessivo uso di fertilizzanti e pesticidi, da una parte, e la perdita di fertilità del suolo causata da lavorazioni prolungate dall'altra, hanno portato la pratica agricola a considerare sempre più sistemi ecocompatibili, i.e. coltivazioni biodinamiche (Spaccini *et al.*, 2012). Approcci come la selezione genetica e la creazione di nuovi genotipi sono stati inoltre sviluppati per aumentare l'efficienza delle piante nell'utilizzo dei fertilizzanti e la resistenza alle patologie (Hirel *et al.*, 2007). In questo contesto, non solo in Italia ma anche in Europa e negli USA, si è visto crescere fortemente l'interesse verso i biostimolanti (per recenti reviews

vedere Nardi *et al.*, 2009; Ertani *et al.*, 2012; Calvo *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2014). In Italia, la normativa ha introdotto il concetto di biostimolante solo recentemente quando, all'interno della categoria dei prodotti ad azione specifica, ha indicato per biostimolante un qualsiasi prodotto naturale o sintetico, minerale od organico caratterizzato da diverse azioni e modalità d'uso in grado di contribuire positivamente al miglioramento della nutrizione e allo sviluppo delle specie vegetali (D.Lgs. 217/2006). Peculiarità dei biostimolanti, che li rende di estremo interesse, è che la loro massima efficienza viene raggiunta solo quando forniti a dosaggi estremamente bassi (Nardi *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003). Tra gli effetti dei biostimolanti, la stimolazione dell'attività dei microrganismi e degli enzimi del suolo (Chen *et al.*, 2002, 2003; Fischer *et al.*, 2010) e la stimolazione del metabolismo vegetale (Schiavon *et al.*, 2008; Ertani *et al.*, 2009, 2011) sono tra i più noti. Scopo di questa review è quello di fare il punto della situazione sulle sostanze umiche e gli idrolizzati proteici, due tra le più importanti classi di biostimolanti e sul loro meccanismo di azione.

Le Sostanze Umiche

Le sostanze umiche sono dei composti organici di origine naturale derivati dalla decomposizione e trasformazione dei residui vegetali, animali e microbici (MacCarthy, 2001). Prodotti di neogenesi del terreno, le sostanze umiche sono particolarmente attive nell'incrementare la fertilità del suolo e stimolare la crescita delle piante. Le sostanze umiche possono essere considerate "progenitori" dei biostimolanti: il concetto di biostimolante può essere inteso nell'accezione della normativa e lo si compara alle proprietà biostimolanti riconosciute alle sostanze umiche, che vengono spesso assunte come riferimento (i.e., Nardi *et al.*, 2002, 2009; Canellas *et al.*, 2002).

Aspetti morfologici

Tra gli effetti più comuni delle sostanze umiche sulle piante, quello più evidente riguarda la crescita (Vaughan e Malcom, 1985). A livello di radice, le sostanze umiche stimolano lo sviluppo dei peli e dei primordi con il risultato di un apparato radicale più

* serenella.nardi@unipd.it

esteso e complesso (Concheri *et al.* 1994; Canellas *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2005; Trevisan *et al.*, 2010). Osservazioni al microscopio ottico e a quello elettronico a trasmissione di piante trattate con sostanze umiche hanno evidenziato variazioni delle caratteristiche morfologiche cellulari, con un aumento dello spessore della parete delle cellule del cilindro centrale nonché dei vasi xilematici (Nardi *et al.*, 1996, 2000). Inoltre, lavorando su callo di varie specie (i.e. *Daucus carota*, *Nicotiana plumbaginifolia*, *Pinus laricio*) si è visto che le sostanze umiche inducono cambiamenti morfologici simili a quelli indotti da auxine e citochinine di sintesi suggerendo quindi un comportamento simile a quello degli ormoni (Nardi *et al.*, 1994, Muscolo *et al.*, 1999, 2005, 2007).

Influenza delle sostanze umiche sulla nutrizione

L'effetto delle sostanze umiche sull'assorbimento degli ioni è di tipo selettivo e varia a seconda della sostanza umica (composizione e concentrazione), pH del mezzo e, ovviamente, della specie vegetale (Vaughan e Malcom, 1985). Da studi sulla cinetica di assorbimento e sulla sintesi proteica si è evidenziato che l'effetto delle sostanze umiche sulla nutrizione è mediato dall'attività della pompa protonica H⁺-ATPasi (Nardi *et al.*, 1991; Pinton *et al.*, 1992; Varanini *et al.*, 1993). L'aumento del gradiente elettrochimico di protoni così generato è inoltre in parte responsabile dell'assorbimento del nitrato (Pinton *et al.*, 1999), che viene così assorbito tramite un processo substrato-induttivo di simporto. Altri studi (Canellas *et al.*, 2002) hanno evidenziato in mais una stimolazione dell'enzima H⁺-ATPasi via *western blot*, mentre in Quaggiotti *et al.* (2004) è stato trovato un incremento del gene che codifica per l'isoforma Mha2 dell'H⁺-ATPasi, oltre che di geni codificanti per trasportatori del nitrato a breve e a lunga distanza (ZmNrt1.1 e ZmNrt2.1). Inoltre, l'attivazione della pompa ATPasica incrementa la nutrizione delle piante mediante l'aumento del gradiente protonico elettrochimico che trasporta gli ioni attraverso la membrana cellulare, con un meccanismo di trasporto secondario e questo giustifica l'incremento di nutrienti (N, P, K, Ca e Mg) nelle foglie delle piante trattate (Canellas e Olivares, 2014).

Effetti sui processi biochimici

Le sostanze umiche influenzano le attività enzimatiche della glicolisi e del ciclo di Krebs (Nardi *et al.*, 2007). Questi effetti si ripercuotono sulla fotosintesi determinando un decremento del contenuto in amido in foglie di mais trattate con sostanze umiche (Ertani *et al.*, 2011), accompagnato da un incremento degli

zuccheri solubili (Muscolo *et al.*, 2005) e dell'attività della rubisco (Merlo *et al.*, 1991). Inoltre, il decremento di amido e il concomitante aumento degli zuccheri solubili è seguito da un aumento dell'attività dell' α -amilasi (Nardi *et al.*, 2000). Contemporaneamente le sostanze umiche influenzano anche l'invertasi e la saccarosio sintasi, attività legate al metabolismo degli zuccheri (Concheri *et al.*, 1994).

Idrolizzati Proteici

Sebbene tutte le piante siano in grado di sintetizzare aminoacidi, tale processo comporta un elevato dispendio energetico e pertanto si è visto che l'applicazione di idrolizzati proteici alle colture ne favorisce l'assorbimento e il metabolismo.

Gli idrolizzati proteici sono costituiti prevalentemente da peptidi a catena più o meno lunga e da aminoacidi liberi di tipo levogiro. I peptidi, a loro volta, sono formati da aminoacidi legati a formare una catena che può esserne costituita da un numero più o meno elevato. Ne consegue che le dimensioni molecolari dei peptidi che costituiscono un idrolizzato proteico possono essere estremamente variabili e comprese tra alcune centinaia e diverse migliaia di dalton (Da). Si ritiene che le proprietà biostimolanti degli idrolizzati proteici siano legate alla frazione con dimensioni molecolari più ridotte (Quartieri *et al.*, 2002) e agli aminoacidi liberi (Cavani e Ciavatta, 2007).

Anche per i biostimolanti si è visto di recente che essi influenzano positivamente l'attività e l'espressione genica di enzimi del cammino metabolico del carbonio e dell'azoto (malato deidrogenasi, isocitrato deidrogenasi, citrato sintasi, nitrato reductasi, nitrito reductasi, glutammia sintetasi, glutammato sintasi e aspartato aminotransferasi) (Schiavon *et al.*, 2008). L'attivazione del metabolismo primario è stata seguita da quella del metabolismo secondario con una stimolazione dell'attività dell'enzima fenilalanina (tiro-sina) ammonio-liasi che catalizza la prima fase della biosintesi dei composti fenolici (Ertani *et al.*, 2011). Difatti, un maggior contenuto in acido clorogenico, p-hidrossibenzoico, p-cumarico e di attività antiossidante è stato riscontrato in frutti di piante di peperoncino trattate con biostimolanti (Ertani *et al.*, 2014). Un approccio metabolomico ha evidenziato sugli stessi frutti la presenza di elevati contenuti in carboidrati e in NADP⁺, in linea con le reazioni biosintetiche del ciclo di Calvin. Inoltre, altri composti biologicamente attivi come l'acido ascorbico, il β -carotene e la capsicina sono risultati essere fortemente incrementati dal trattamento (Ertani *et al.*, 2014).

Conclusioni

Gli effetti di stimolazione indotti da sostanze sostanze umiche e idrolizzati proteici sembrano essere simili e spesso coinvolgono una gran parte del sistema fisiologico. L'incremento dell'apparato radicale, i cambiamenti nel metabolismo primario e secondario e la sintesi di molecole nutraceutiche richiedono un approccio coordinato della ricerca al fine dello sviluppo di nuove tecnologie che tengano in salvaguardia il suolo, la produzione e l'ambiente.

Riassunto

Le sostanze umiche e gli idrolizzati proteici sono largamente riconosciuti come promotori della crescita delle piante per i cambiamenti indotti all'architettura dell'apparato radicale, che a sua volta influenza l'assorbimento dei nutrienti e le vie metaboliche. L'approccio genetico e metabolomico ha confermato l'effetto su numerose vie biosintetiche fino alla sintesi di composti a carattere nutraceutico.

Parole chiave: sostanze umiche, idrolizzati proteici, apparato radicale, metabolismo.

Bibliografia

- CALVO P., NELSON L., KLOPPER J. W. 2014. *Agricultural uses of plant biostimulants*. Plant Soil. DOI 10.1007/s11104-014-2131-8.
- CANELLAS L.P., OLIVARES F.L., OKOROKOVA-FACANHA A.L., FACANHA A.R., 2002. *Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots*. Plant Physiol. 130: 1951–1957.
- CANELLAS L.P., OLIVARES F.L., 2014. *Physiological responses to humic substances as plant growth promoter*. Chemical and Biological Technologies in Agriculture 1:3.
- CAVANI L., CIAVATTA C., 2007. *Attività Biostimolante degli Idrolizzati Proteici*. L'informatore Agrario., 44, 46-52.
- CHEN S.K., SUBLER S., EDWARDS C.A., 2002. *Effects of agricultural biostimulants on soil microbial activity and nitrogen dynamics*. Appl. Soil Ecol. 19, 249–260.
- CHEN S.K., EDWARDS C.A., SUBLER S., 2003: *The influence of two agricultural biostimulants on nitrogen transformations, microbial activity, and plant growth in soil microcosms*. Soil Biol. Biochem. 35, 9–19.
- CONCHERI G., NARDI S., PICCOLO A., RASCIO N., DELL'AGNOLA G., 1994. *Effects of humic fractions on morphological changes related to invertase and peroxidase activities in wheat seedlings*. In: Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health, Senesi, N., and Miano, T. M., eds., Elsevier Science, pp. 257–262.
- ERTANI A., CAVANI L., PIZZEGHELLO D., BRANDELLERO E., ALTISSIMO A., CIAVATTA C., NARDI S., 2009. *Biostimulant activities of two protein hydrolysates on the growth and nitrogen metabolism in maize seedlings*. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 172, 237–244.
- ERTANI A., SCHIAVON M., ALTISSIMO A., FRANCESCHI C., NARDI S. 2011. *Phenol-containing organic substances stimulate phenylpropanoid metabolism in Zea mays L*. J. Plant Nutr. Soil Sci. 3, 496–503.
- ERTANI A., NARDI S., ALTISSIMO A., 2012. *Review: long-term research activity on the biostimulant properties of natural origin compounds*. Acta Horticult. 1009, 181–188.
- ERTANI A., PIZZEGHELLO D., FRANCIOSO O., SAMBO P., SANCHEZ-CORTES S., NARDI S., 2014. *Capsicum chinensis L. growth and nutraceutical properties are enhanced by biostimulants in a long-term period: chemical and metabolomic approaches*. Frontiers in Plant Science | Crop Science and Horticulture, 5: 375-2.
- FISCHER J., KAPPELMEYER U., KASTNER M., SCHAUER F., HEIPIEPER H.J., 2010. *The degradation of bisphenol A by the newly isolated bacterium Cupriavidus basilensis JF1 can be enhanced by biostimulation with phenol*. International Biodeterioration and Biodegradation 64 (4), pp. 324-330.
- HIREL B., LE GOUIS J., NEY, B., GALLAIS A., 2007. *The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: Towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches*. Journal of Experimental Botany 58 (9):2369-2387.
- MACCARTHY P., 2001. *The principles of humic substances*. Soil Sci. 166(11), 738-751.
- MERLO L., GHISI R., RASCIO N., PASSERA C., 1991. *Effects of humic substances on carbo-hydrate metabolism of maize leaves*. Can. J Plant Sci. 71, 419-425.
- MUSCOLO A., BOVALO F., GIONFRIDDO F., NARDI S., 1999. *Earthworm humic matter produces auxin-like effects on Daucus carota cell growth and nitrate metabolism*. Soil Biol. Biochem. 31, 1303–1311.
- MUSCOLO A., PANUCCIO M.R., SIDARI M., NARDI S., 2005. *The effects of humic substances on Pinus callus are reversed by 2,4-dichlorophenoxy acetic acid*. J. Chem. Ecol. 31(3), 577-590.
- MUSCOLO A., SIDARI M., FRANCIOSO O., TUGNOLI V., NARDI S. 2007. *The auxin-like activity of humic substances is related to membrane interactions in carrot cell cultures*. J. Chem. Ecol. 33(1), 115–129.
- NARDI S., CONCHERI G., DELL'AGNOLA G., SCRIMIN P., 1991. *Nitrate uptake and ATPase activity in oat seedlings in the presence of two humic fractions*. Soil Biol. Biochem. 23: 833-836.
- NARDI S., PANUCCIO M.R., ABENAVOLI M.R., MUSCOLO A., 1994. *Auxin-like effect of humic substances extracted from faeces of Allolobophora caliginosa and A. rosea*. Soil Biol. Biochem. 26: 1341–1346.
- NARDI S., CONCHERI G., DELL'AGNOLA G., 1996. *Biological activity of humus*. In: Humic Substances in Terrestrial Ecosystems, Piccolo A. ed., Elsevier, The Netherlands, pp. 361-406.
- NARDI S., PIZZEGHELLO D., REMIERO 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.
- NARDI S., PIZZEGHELLO, D., MUSCOLO A., VIANELLO A., 2002. *Review - Physiological effects of humic substances on higher plants*. Soil Biol. Biochem. 34, 1527-1537.
- NARDI S., MUSCOLO A., VACCARO S., BAIANO S., SPACCINI R., PICCOLO A., 2007. *Relationship between molecular characteristics of soil humic fractions and glycolytic pathway and Krebs cycle in maize seedlings*. Soil Biol. Biochem. 39, 3138-3146.
- 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. PART I. Fundamentals and

- Impact of Mineral-Organic-Biota Interactions on the Formation, Transformation, Turnover, and Storage of Natural Nonliving Organic Matter (NOM), eds N. Senesi, B. Xing, and P. M. Huang (Hoboken, NJ: JohnWiley & Sons), 305-339.
- PINTON R., VARANINI Z., VIZZOTTO G., MAGGIONI A. 1992. *Soil humic substances affect transport properties of tonoplast vesicles isolated from oat roots*. Plant Soil 142: 203-210.
- PINTON R., CESCO S., IACOLETTI G., ASTOLFI S., VARANINI Z., 1999. *Modulation of NO₃⁻ uptake by water-extractable humic substances: Involvement of root plasma membrane H⁺-ATPase*. Plant Soil 215, 155-161.
- QUAGGIOTTI S., REPERTI B., PIZZEGHELLO D., FRANCIOSO O., TUGNOLI V., NARDI S., 2004. *Effect of low molecular size humic substances on the expression of genes involved in nitrate transport and reduction in maize (Zea mays L.)*. J. Exp. Bot. 55: 803-813.
- QUARTIERI M., CAVANI L., LUCCHI A., MARANGONI B., TAGLIAVINI M., 2002. *Effects of the rate of protein hydrolysis spray concentration on growth of potted kiwifruit (Actinidia deliciosa) plants*. Acta Hort. 594, 341-347.
- SCHMIDT W., CESCO S., SANTI S., PINTON R., VARANINI Z., 2005. *Water-extractable humic substances as nutrient acquisition signals for root hairs development in Arabidopsis*. In Rizosphere 2004 - Perspectives and Challenges, Hartmann, A., Schmid, M., Wenzel, W., and Hinnsinger, P., eds., GSF-Berich, Neuherberg, p. 71.
- 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*. Journal of Applied Phycology 26 (1): 465-490.
- SCHIAVON M., ERTANI A., NARDI S., 2008. *Effects of an alfaalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of TCA cycle and N metabolism in Zea mays L.* J. Agric. Food Chem., 56:11800-11808.
- SPACCINI R., MAZZEI P., SQUARTINI A., GIANNATTASIO M., PICCOLO A. 2012. *Molecular properties of a fermented manure preparation used as field spray in biodynamic agriculture*. Environmental Science Pollution Research 19 (9): 4214-25.
- TREVISAN S., PIZZEGHELLO D., RUPERTI B., FRANCIOSO O., SASSI A., PALME K., QUAGGIOTTI S., NARDI S., 2010. *Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in Arabidopsis*. Plant Biology 12: 604-614.
- VAUGHAN D., MALCOLM R.E., 1985. *Influence of humic substances on growth and physiological processes*. In Soil Organic Matter and Biological Activity, Vaughan, D., and Malcolm, R. E., eds., Martinus Nijhoff/Junk, Dordrecht, The Netherlands: 37-76.
- VARANINI Z., PINTON R., DE BIASI M.G., ASTOLFI S., MAGGIONI A., 1993. *Low molecular weight humic substances stimulated H⁺-ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from oat (Avena sativa L.) roots*. Plant Soil 153: 61-69.
- ZHANG X., ERVIN E.H., SCHMIDT R.E., 2003. *Effects of liquid application of a seaweed extract and a humic acid on creeping bentgrass (Agrostis palustris Huds. A.)*. J. Am. Soc. Hort. Sci. 128, 492-496.