



# I biostimolanti come strumenti per migliorare la sostenibilità ambientale dei sistemi colturali

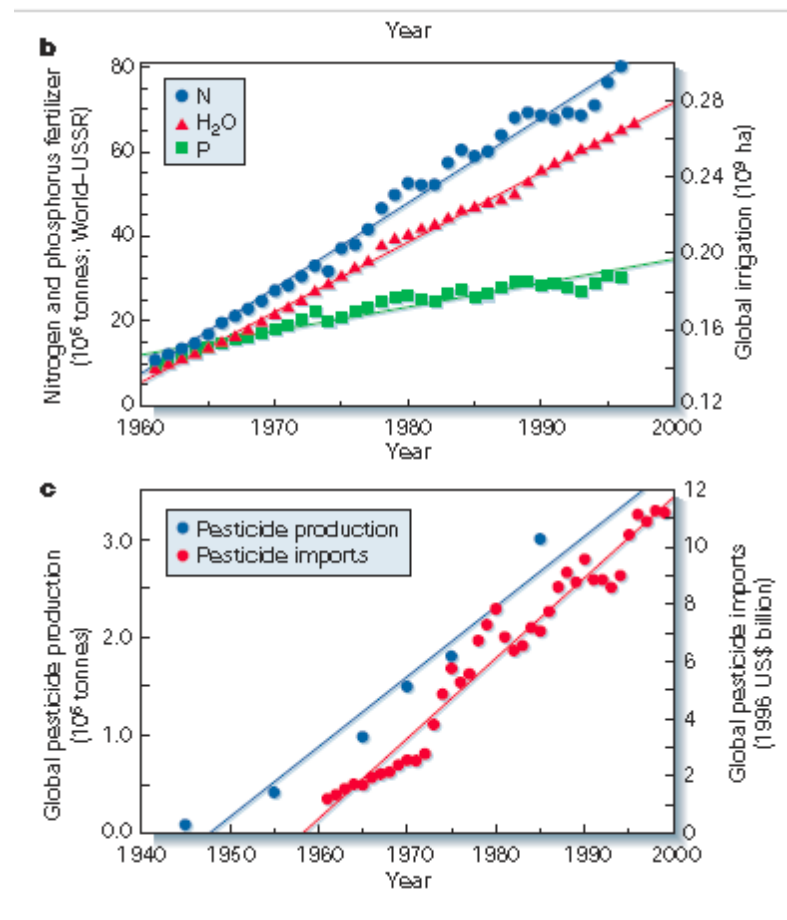
**Antonio Ferrante**

Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università degli Studi di Milano



# Trend futuro in agricoltura

- Consumatore sempre più attento alla qualità del prodotto;
- Aumento della popolazione mondiale 9,5 miliardi 2050;
- **Innovazione nella gestione dei sistemi colturali;**
- Controllo completo del processo produttivo.



# Biostimolanti



I sistemi colturali si stanno orientando sempre più verso la riduzione del consumo di acqua, nutrienti e fitofarmaci con l'obiettivo di migliorare la produzione e ridurre l'impatto ambientale.

Biostimolanti sono prodotti derivati da materiale organico contenente amminoacidi, peptidi, vitamine, acidi umici, estratti di alghe, elementi minerali e tracce di ormoni (sono proibiti l'aggiunta di ormoni di sintesi).

Questi prodotti inducono resistenza a stress biotici e abiotici, aumentare l'efficienza d'uso degli elementi minerali, determinare risposte ormone-simili.

Effetto sul terreno e sulla pianta.

# Biostimolanti

Definizione:

## European Biostimulant Industry Council (EBIC)

"I biostimolanti vegetali contengono una o più sostanze e/o microrganismi la cui funzione quando applicata alle piante o alla rizosfera è stimolare il processo naturale per migliorare/favorire l'assorbimento dei nutrienti, l'efficienza dei nutrienti, tollerare lo stress abiotico e la qualità delle colture"

## Biostimulant Coalition

«I biostimolanti sono sostanze, compresi i microrganismi, che vengono applicate a piante, semi, suolo o altri terreni di coltura che possono migliorare la capacità della pianta di assimilare i nutrienti applicati o fornire benefici allo sviluppo delle piante. I biostimolanti non sono sostanze nutritive delle piante e quindi non possono presentare alcuna richiesta o garanzia di nutrienti "

# Le principali component dei biostimolanti



- Acidi umici e fulvici
- Idrolizzati proteici e composti conteneti N
- Estratti di alghe e specie vegetali
- Chitosano e altri biopolimeri
- Composti inorganici
- Funghi
- Batteri

du Jardin 2015. Scientia Horticulturae, 196: 3-14.





- Nel giugno 2011 è stato costituito EBIC - European Biostimulant Industry Council
- Non esiste una normativa di riferimento a livello europeo, ogni Paese ha un proprio quadro normativo. In Italia rientrano nella categoria «Prodotti ad azione specifica - PAS» (D. Lgs. 75/2010 con successiva modifica del 10 luglio 2013)
- La normativa europea approvata dal **Parlamento europeo il 27 marzo 2019**, per quanto attiene nello specifico i biostimolanti delle piante (anche solo biostimolanti), definisce gli aspetti relativi alla tipologia (sostanze e/o microrganismi), la funzione (stimolare l'efficienza degli elementi nutritivi (nutrienti) e/o la loro disponibilità nel suolo o nella rizosfera, la tolleranza agli stress abiotici e/o la qualità della coltura), il campo di applicazione (le piante o la rizosfera) e ribadisce che tali effetti sono indipendenti dal contenuto di nutrienti.



# Stress abiotici e produzioni agricole

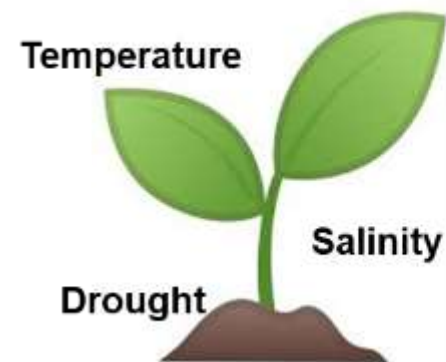
- Perdite di produzione (kg/ha) per alcune colture dovute a stress biotici o abiotici.  
*Yield losses (kg/ha) in some important crops as a result of biotic and abiotic stress.*

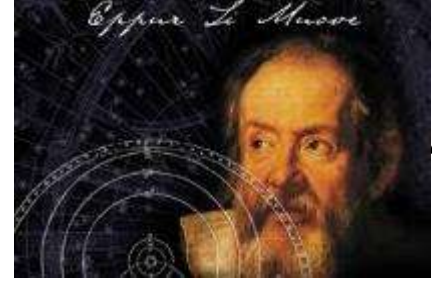
Coltura	Produzione potenziale*	Produzione effettiva	Perdite dovute a fattori biotici ed abiotici			
			Malattie (patogeni fungini)	Parassiti (Insetti)	Piante infestanti	Stress abiotici
Mais	19.300	4.600	750	691	511	12.700
Frumento	14.500	1.880	336	134	256	11.900
Soia	7.390	1.610	269	67	330	5.120
Sorgo	20.000	2.830	314	314	423	16.200
Avena	10.600	1.720	465	107	352	7.960
Orzo	11.400	2.050	377	108	280	8.590
Patata	94.100	28.300	8.000	5.900	875	50.900
Barbabietola da zucchero	121.000	42.600	6.700	6.700	3.700	61.300
% (valori medi)	-	21,6%	4,1%	2,6%	2,6%	69,1%

High light



Principali fattori limitanti per le produzioni agricole





# ..Eppur si muove... Eppur funziona!

Difficoltà nel riconoscimento a livello scientifico delle ricerche con i biostimolanti.

- «Spray and Pray», uso di composti a composizione parzialmente nota, difficoltà nell'attribuire l'effetto biologico;
- Attivazione fisiologica con incremento delle *performance* delle piante;
- Risposte fisiologiche quantificabili e verificabili.





# Dissolvere la nebulosa ignoranza....

?

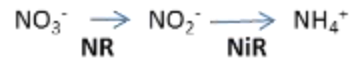


## Biostimulants and plant interactions

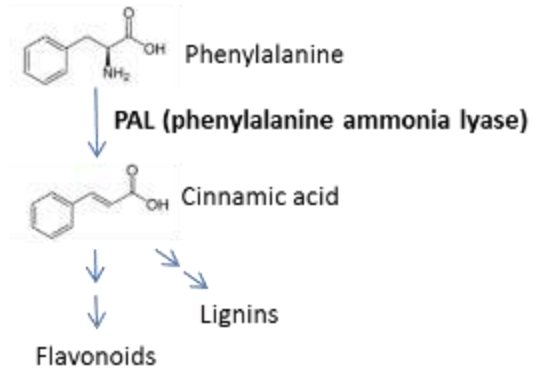


- Improve plant health and quality
- Increase chlorophyll content
  - Secondary metabolites
  - Increase nutrient use efficiency
  - Increase Nitrate Assimilation

Diseases

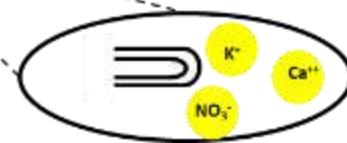


Enhance defense mechanisms against biotic and abiotic stresses



Consumatori

Increase nutrient uptake

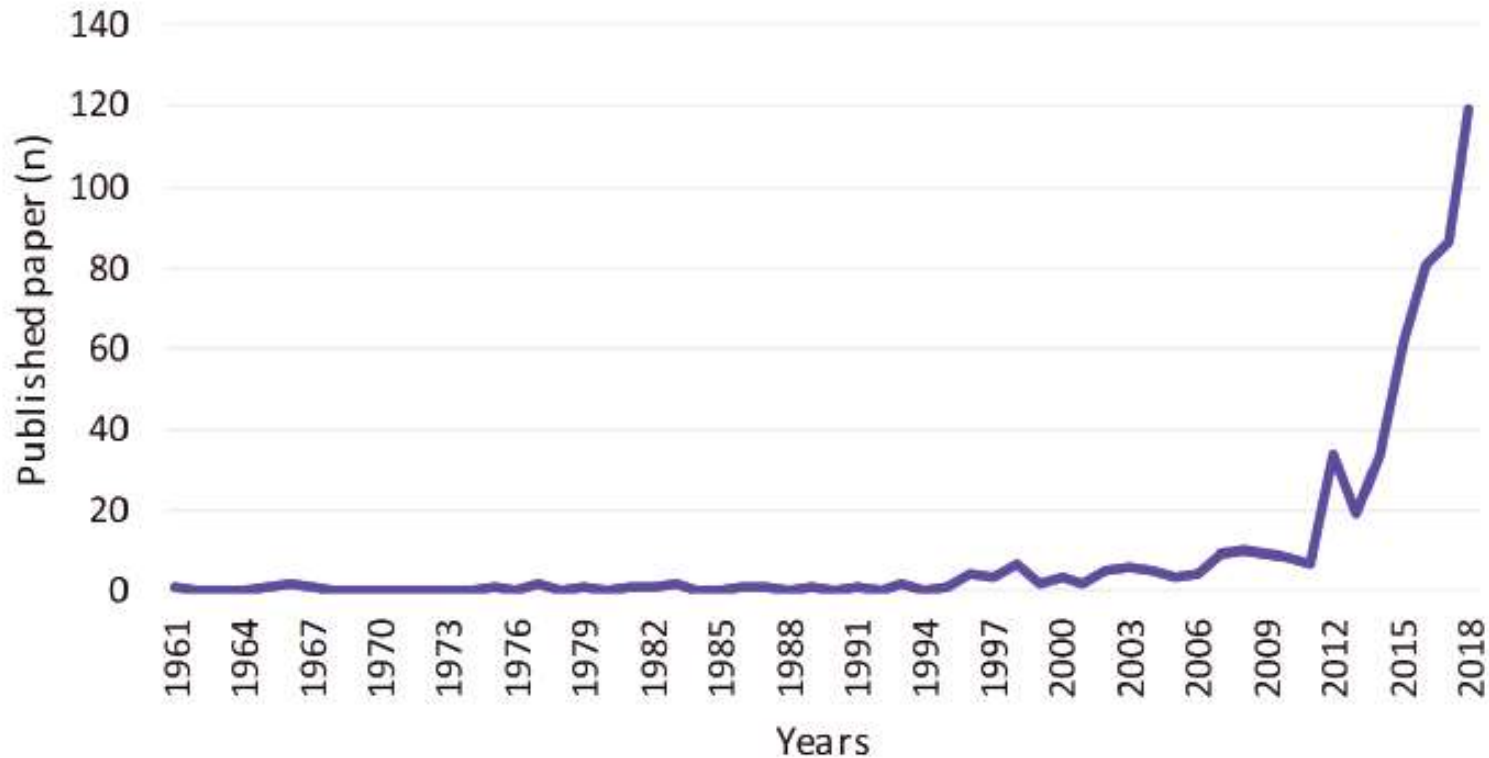


Industrie

Ricercatori

Agricoltori

# Publicazioni

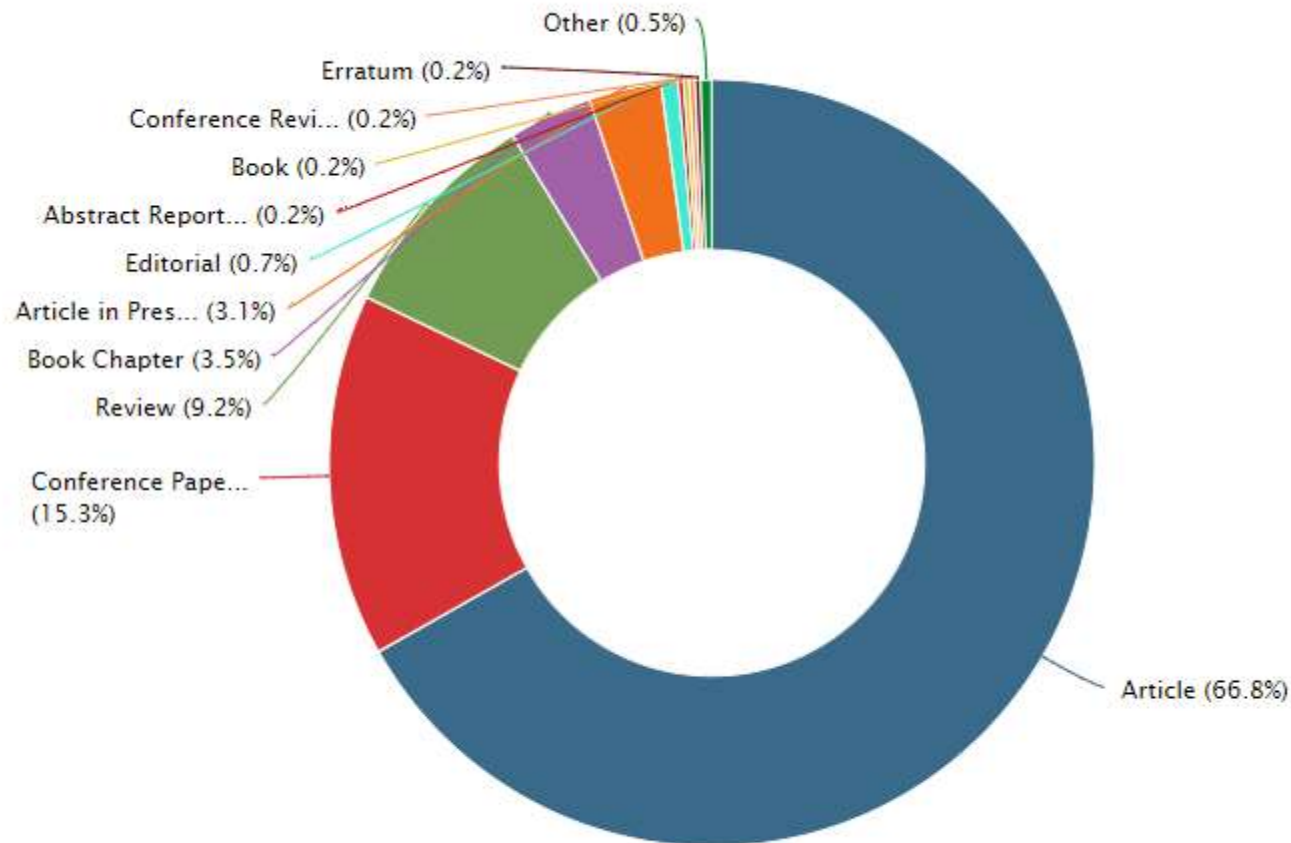


*Source: scopus*



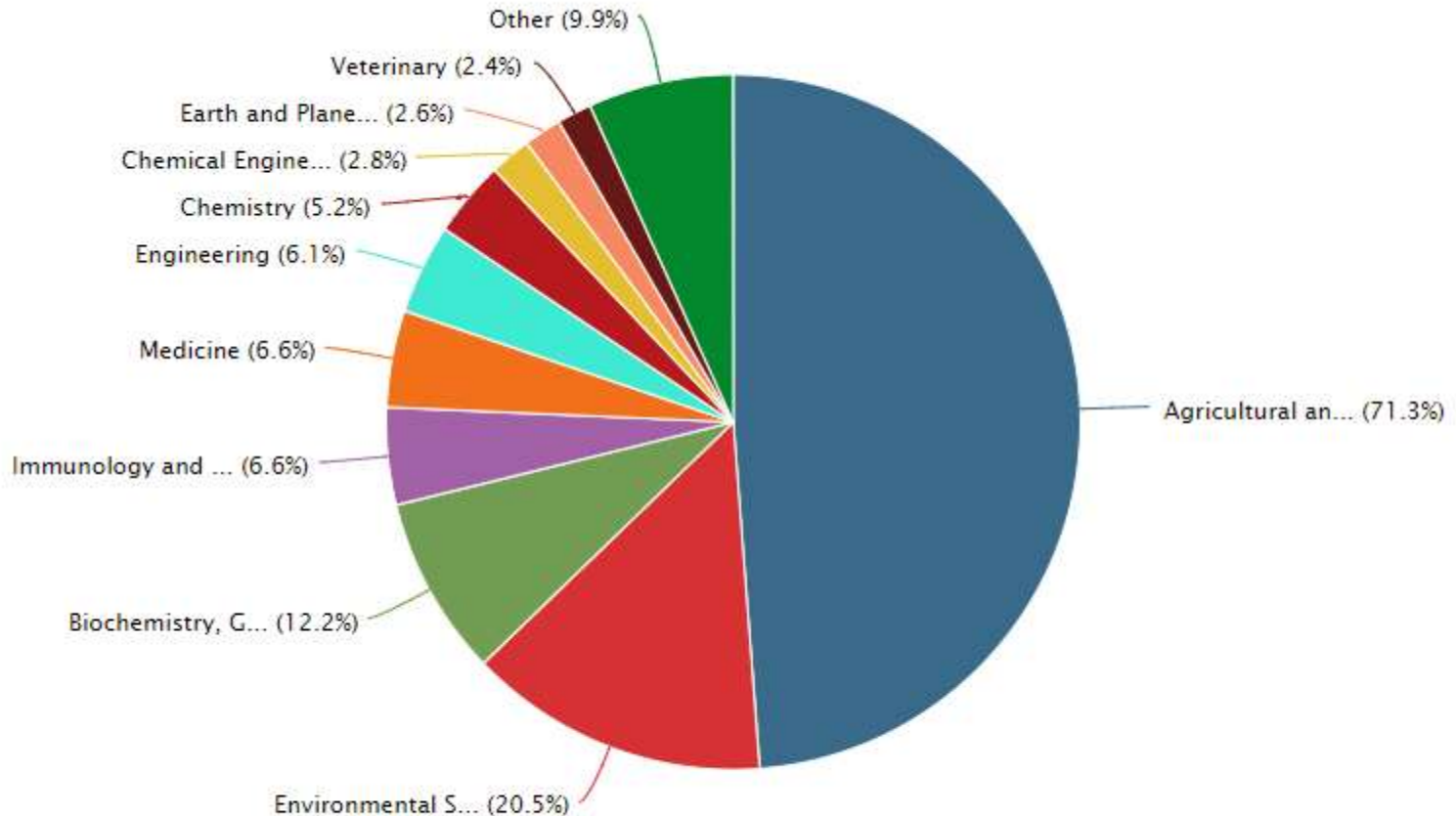
# Lavori pubblicati

## Documents by type



# Classificazione in aree d'interesse

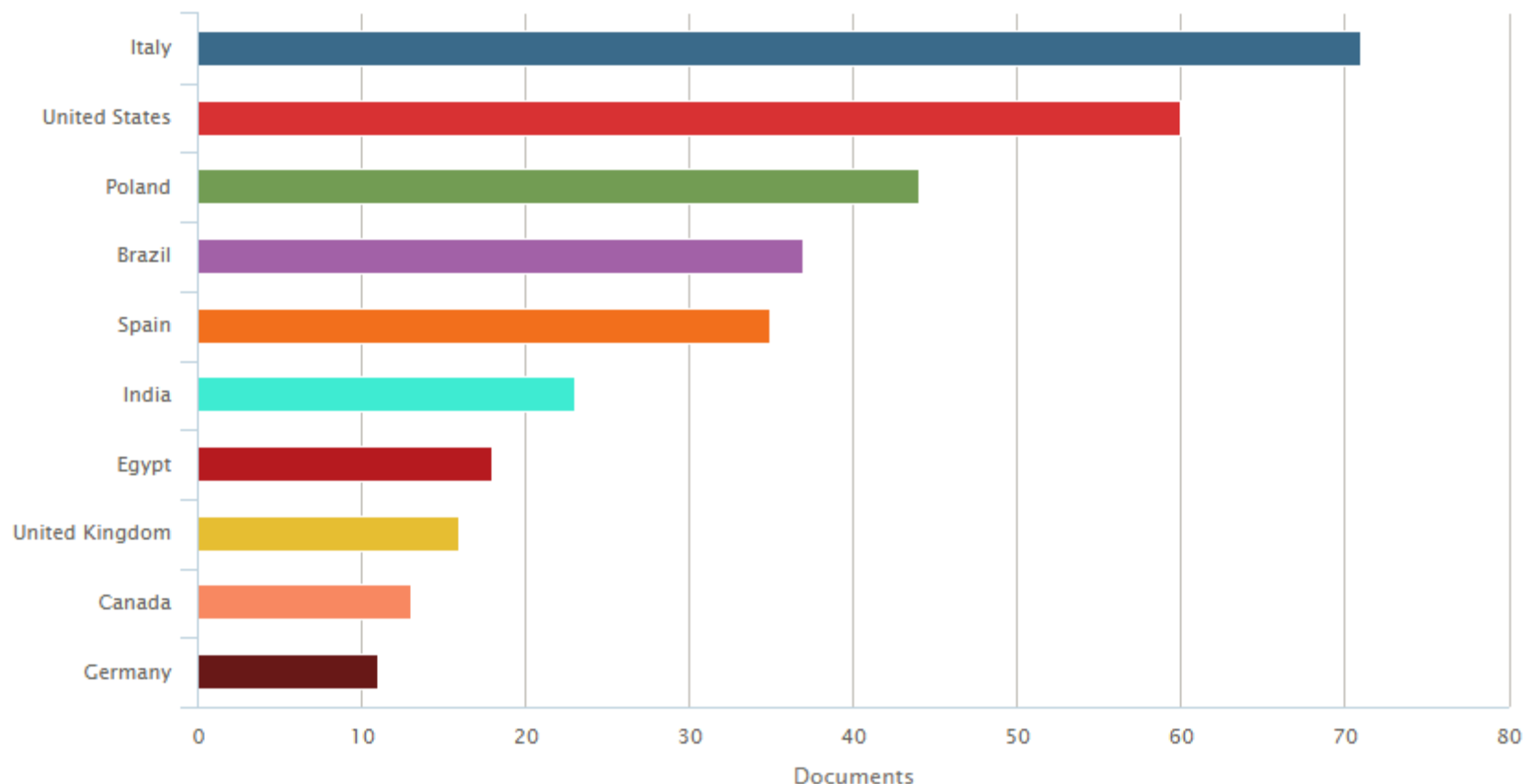
## Documents by subject area

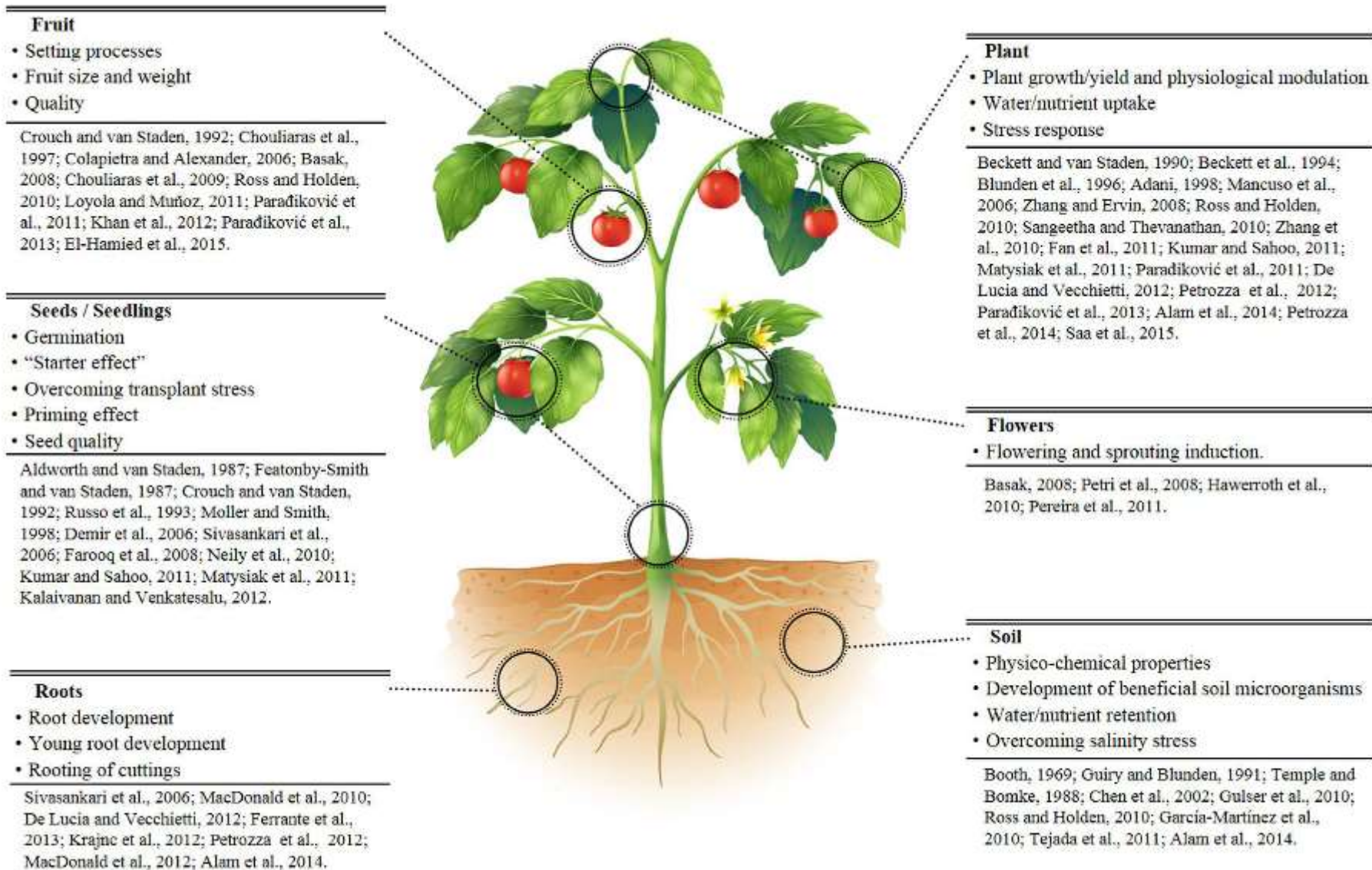


# Paesi che lavorano sull'argomento

## Documents by country/territory

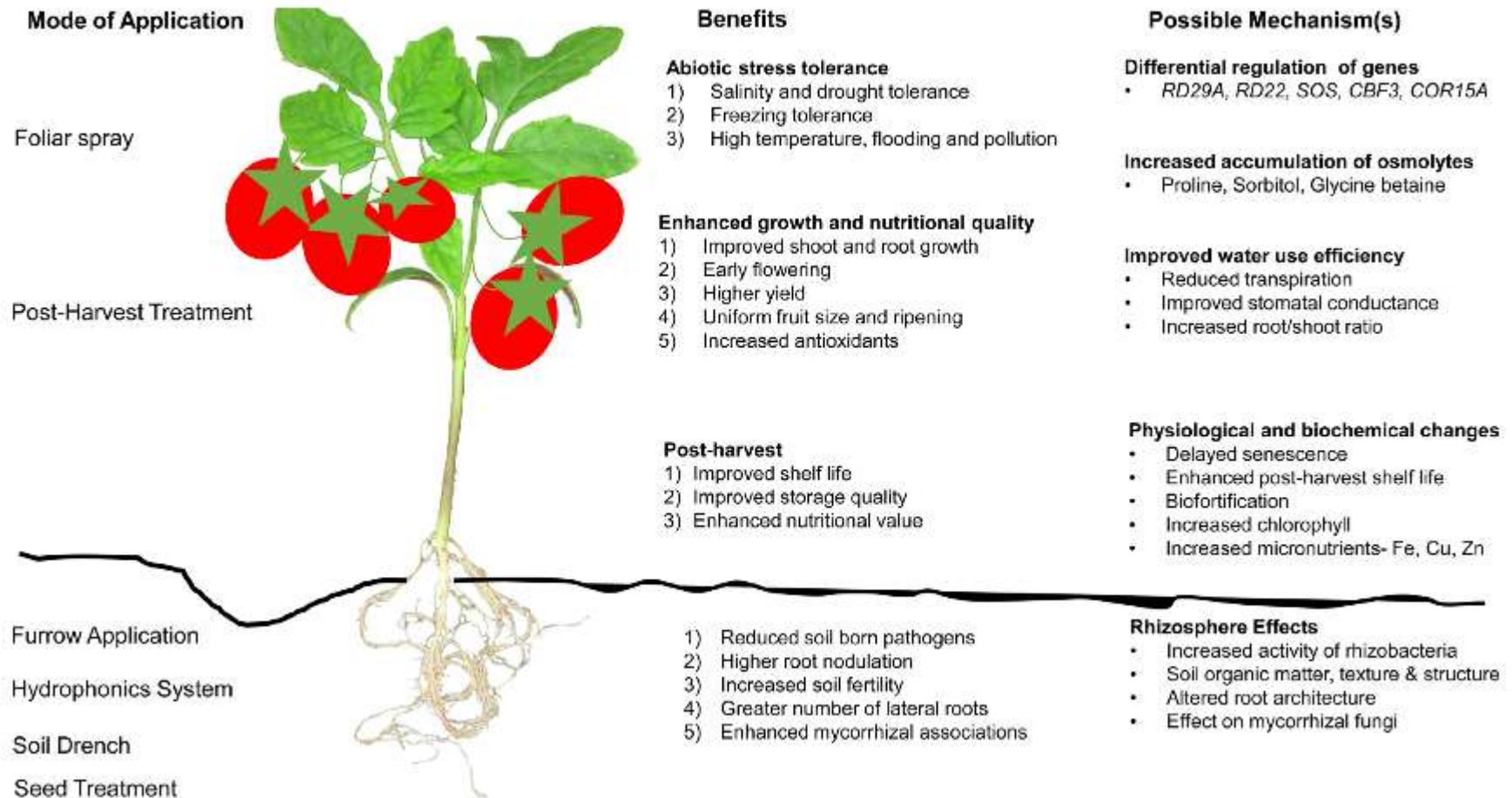
Compare the document counts for up to 15 countries/territories





Povero et al 2016. *Frontiers in Plant Science* 435.





Battacharyya et al., 2015. *Scientia Horticulturae*, 196, 39-48.



# «Il vecchio diventa nuovo...»



## Consociazioni favorevoli:

- **Aglio** con: carota, cavolo rapa, cetriolo, fragola, lattuga, sedano
- **Asparago** con: cavolo rapa, lattuga, ravanello
- **Bietola da coste** con: carota, cavolo, cavolo rapa, fagiolino nano, rapa, ravanello
- **Carota** con: aglio, bietola da coste, cipolla, menta, pisello, pomodoro, porro, ravanello
- **Cavolo** con: bietola da coste, cetriolo, fagiolino nano, fragola, indivia, lattuga, pisello, pomodoro, porro, ravanello, sedano, spinacio
- **Cetriolo** con: aglio, cavolo, cipolla, fagiolino nano, finocchio, lattuga, sedano, zucchini
- **Cipolla** con: camomilla, carota, cetriolo, fagiolino nano, fragola, lattuga, pisello, zucchini





# «Il vecchio diventa nuovo...»



Rotazioni colturali per evitare problemi fitosanitari e accumuli di sostanze allelopatiche.



# Approccio multidisciplinare



Materiale grezzo



Estrazione industriale



Sperimentazione agronomica



Analisi

A blue arrow pointing from the agricultural experimentation stage towards the analysis stage.

Trascrittomica

Biochimica  
(metabolomica)

Fisiologia



# Matrice organica di partenza

Problema di caratterizzazione:

- Matrici spesso non omogenee;
- Limite di quantificazione anche dei componenti conosciuti;
- Molti composti sono sconosciuti;
- Azione sinergica e antagonista.

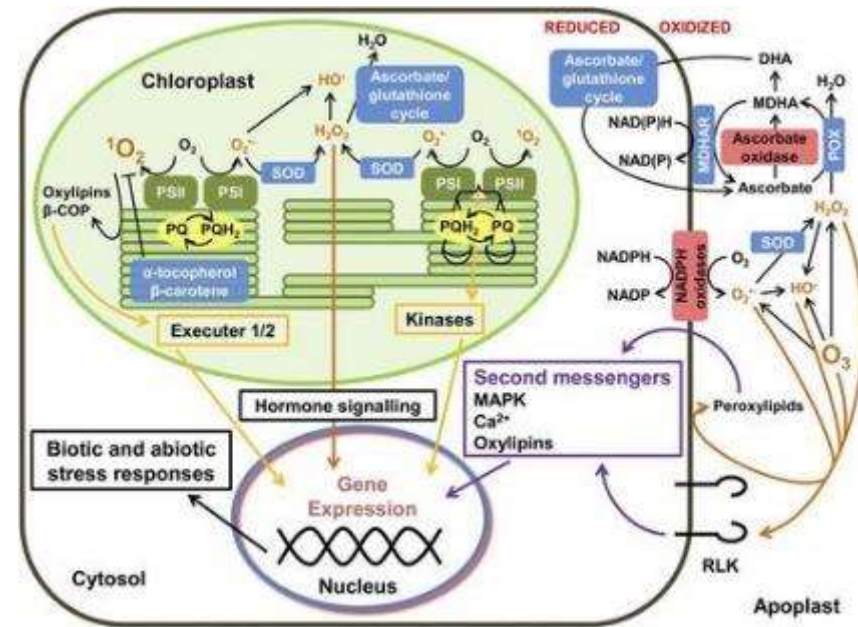


# Risposte delle colture ai biostimolanti

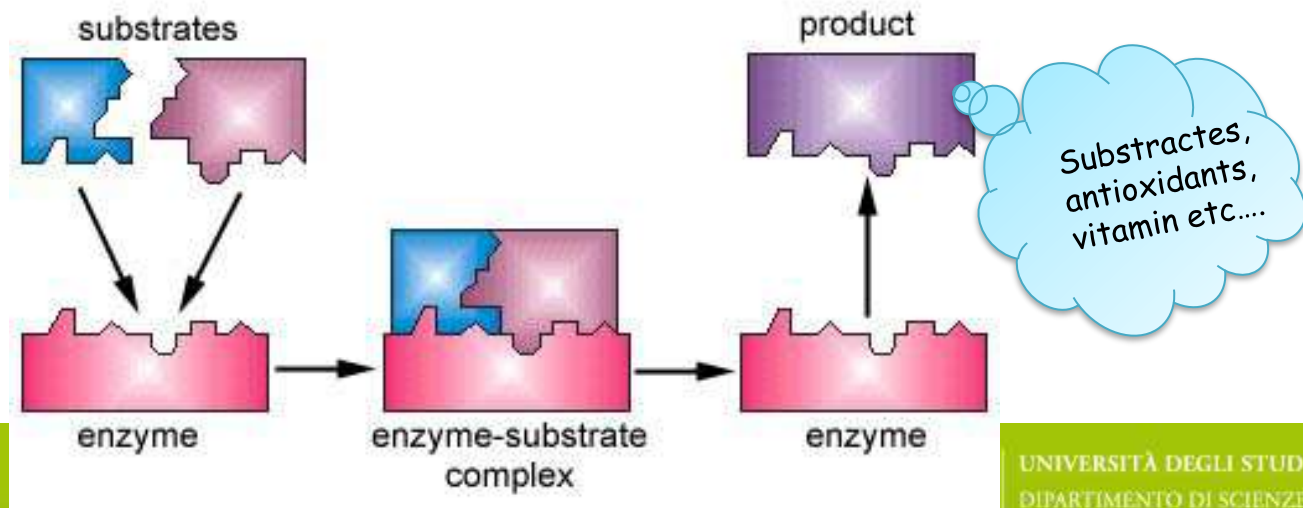
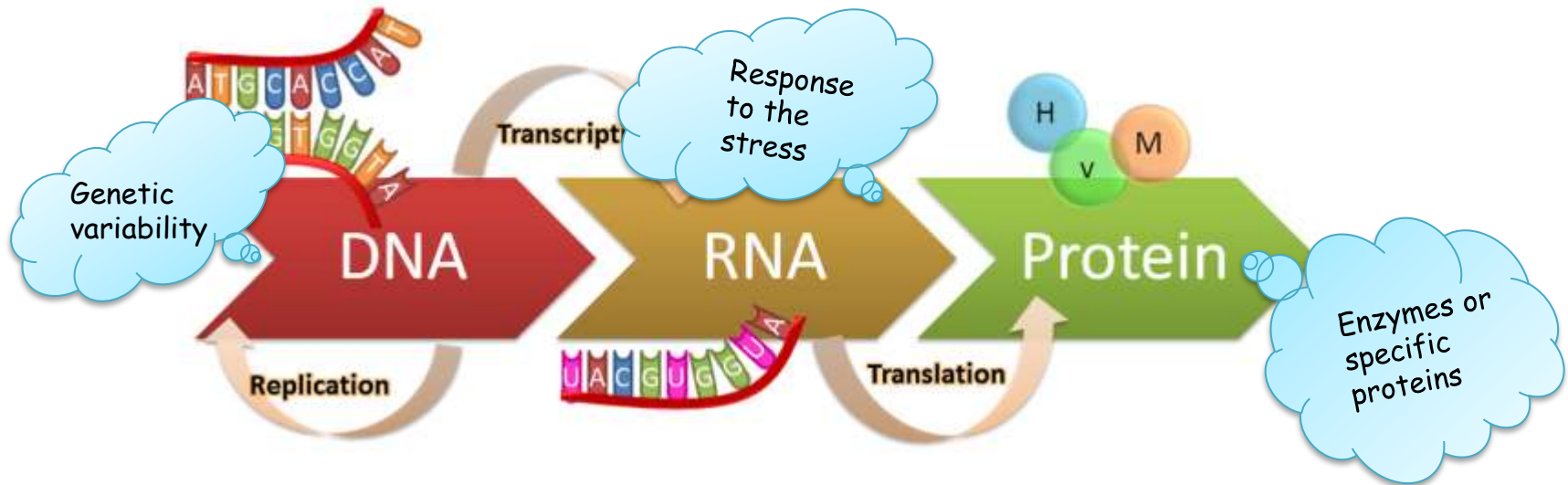
Composizione parzialmente sconosciuta impone:

- Identificare quali sono i target del biostimolanti
- Definire i processi fisiologici attivati
- Quali metabolismi sono influenzati

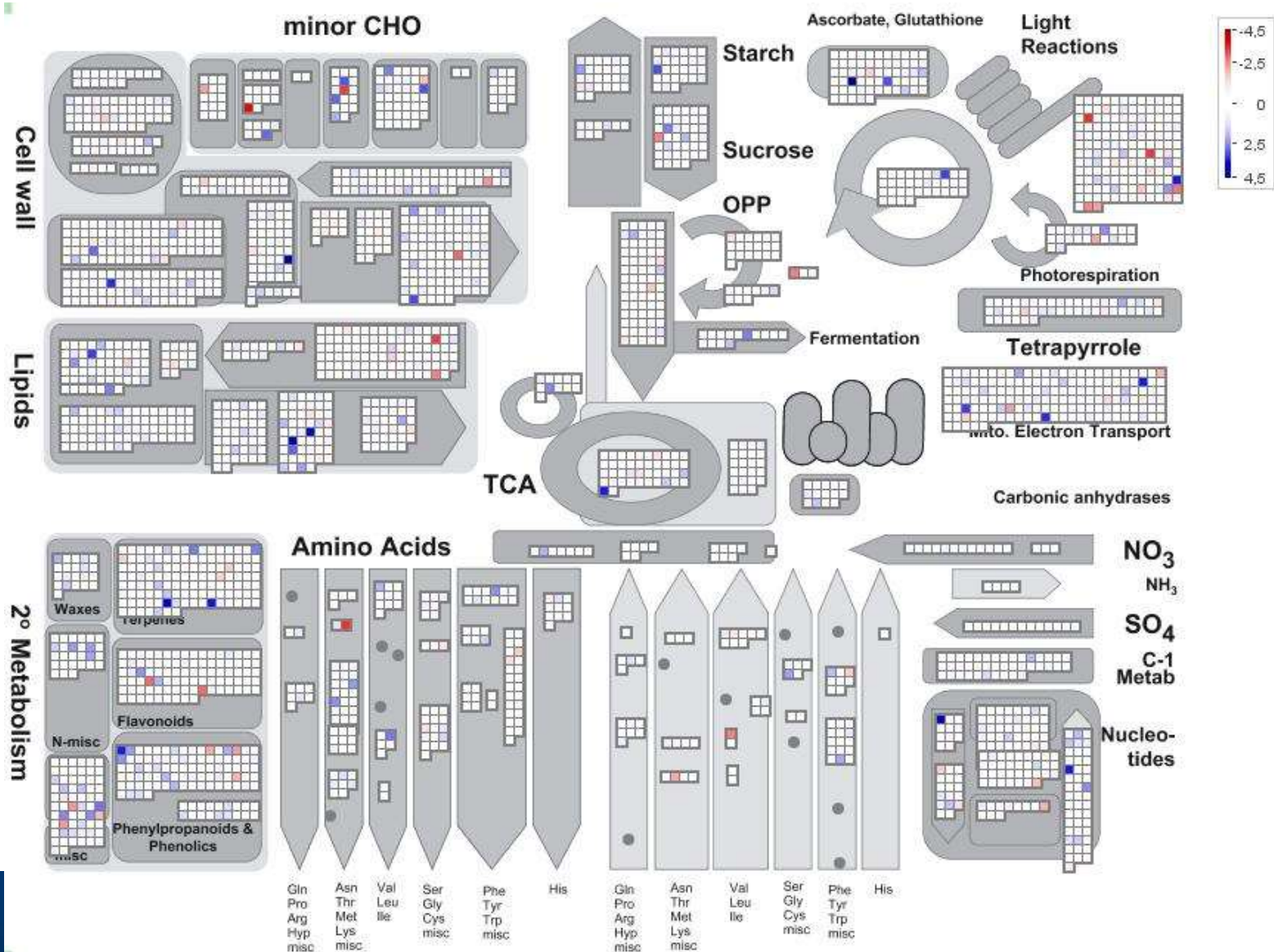
Effetti sulla produzione e/o sulla qualità.



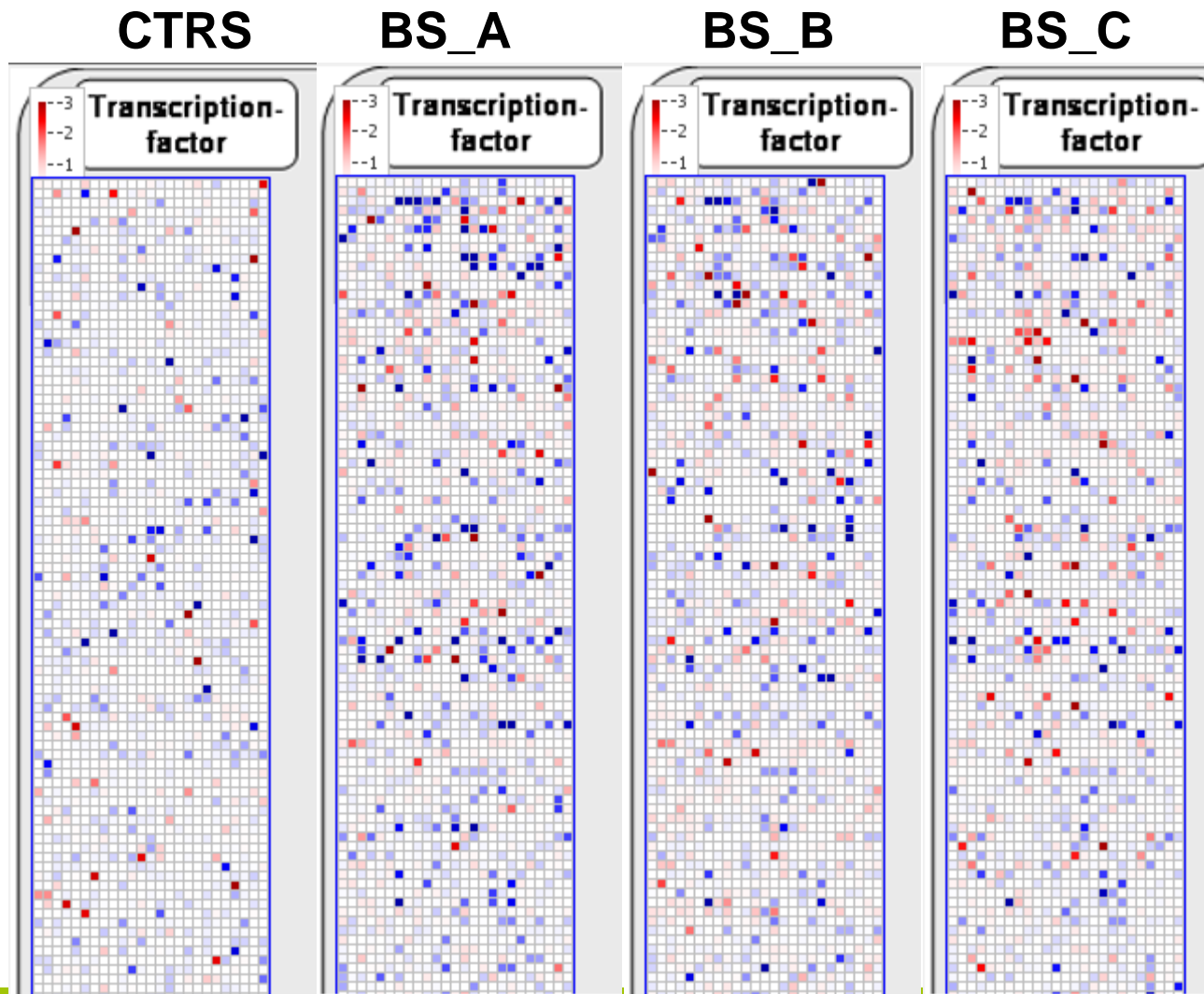
# OMICS tools



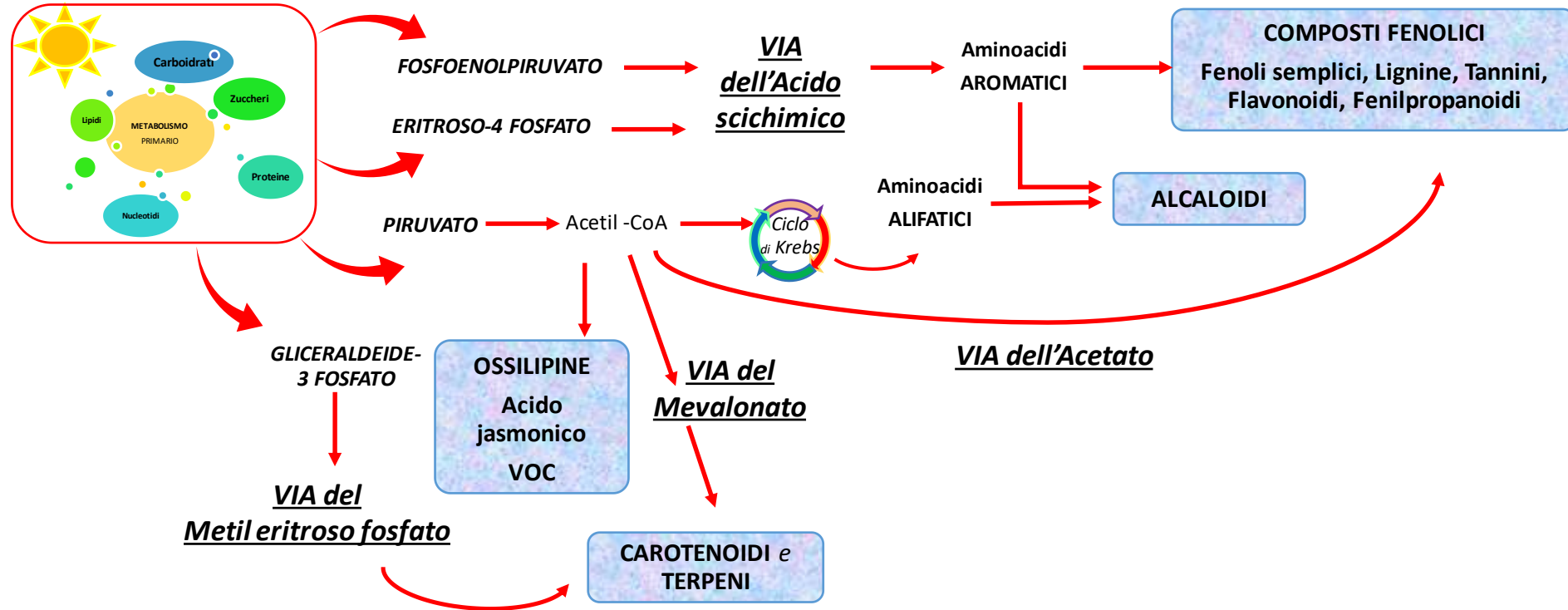
# Overview – Transcript profile



# Transcriptional regulation



## Metabolismo primario





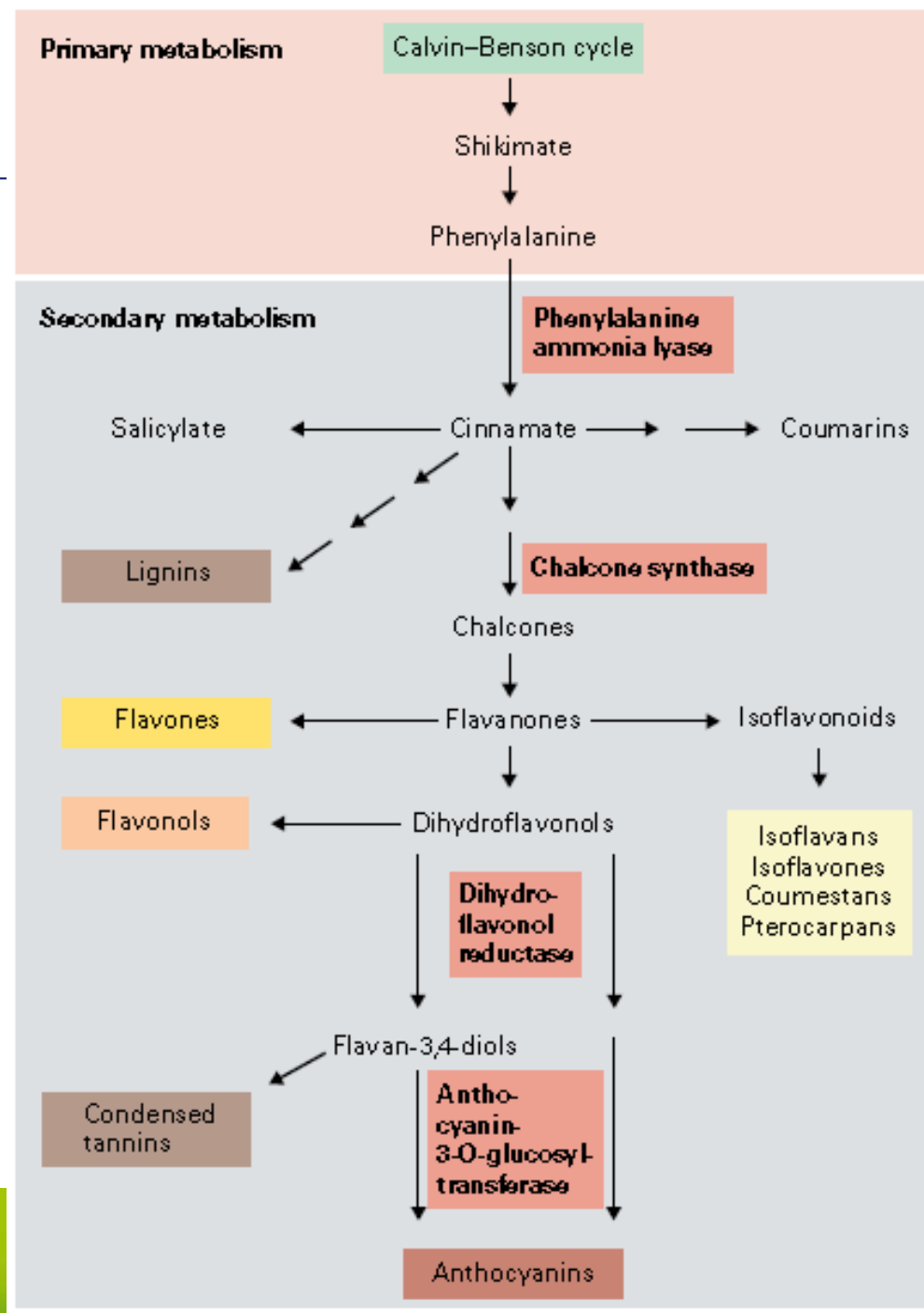
# Analisi risposte legate al:

## Metabolismo primario

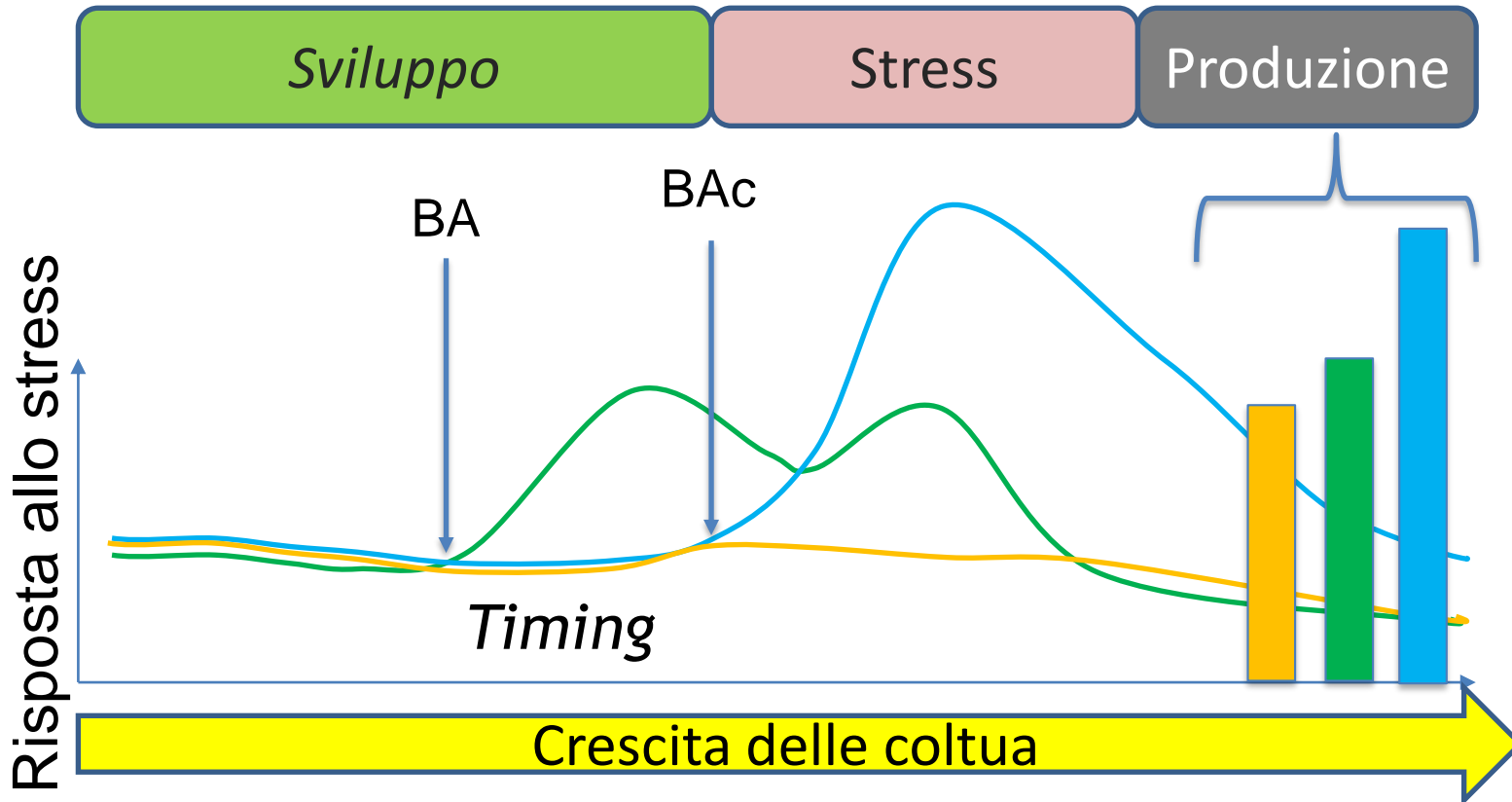
- Contenuto in clorofilla
- Attività fotosintetica
- Zuccheri

## Metabolismo secondario

- PAL
- Fenoli e antociani
- Lignina ecc.



# Transient tolerance activation response



# Sensibilità e risposta nelle colture

Ogni coltura ha:

- livello di sensibilità alle diverse sostanze bioattive;
- attivazione processi con azione sinergica;
- attivazione di processi antagonisti;
- composti intermedi di vie metaboliche silenti e potenzialmente attivabili;



Sensibilità variabile nel corso dello sviluppo



# Approccio multidisciplinare



- Crescita della coltura;
- Resa;
- Fluorescenza della clorofilla *a*;
- Scambi gassosi;
- Produzione di etilene;
- Clorofille e carotenoidi;
- Nitrati;
- Zuccheri;
- Capacità antiossidante;
- Fenoli totali;
- Flavonoidi totali;
- Attività della PAL.

## Evaluation of Borage Extracts As Potential Biostimulant Using a Phenomic, Agronomic, Physiological, and Biochemical Approach

Roberta Bulgari<sup>1</sup>, Silvia Morgutti<sup>1</sup>, Giacomo Cocetta<sup>1</sup>, Noemi Negrini<sup>1</sup>, Stefano Farris<sup>2</sup>, Aldo Calcante<sup>1</sup>, Anna Spinardi<sup>1</sup>, Enrico Ferrari<sup>1</sup>, Ilaria Mignani<sup>1</sup>, Roberto Oberti<sup>1</sup> and Antonio Ferrante<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Agricultural and Environmental Sciences – Production, Landscape, Agroenergy; Università degli Studi di Milano, Milan, Italy, <sup>2</sup> Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy



# Caratterizzazione di un estratto di pianta come biostimolante

- I. Estrazione e applicazioni dosi (*Lactuca sativa* L.);
- II. Valutazione degli estratti sul metabolismo primario e assimilazione del N su rucola (*Diplotaxis tenuifolia* L.);
- III. Valutazione dell'effetto ormonale usando mutanti di mais;



Pl. 224. Bourrache officinale. Borrago officinalis L.



# Preparazione estratti

- Piante di borragine raccolte in piena fioritura (Aprile) in campo aperto;

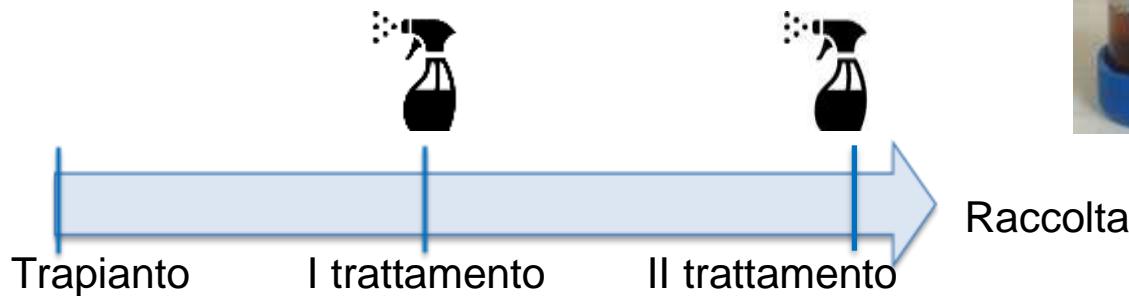


- foglie e fiori di borragine frullati separatamente, lasciati macerare in acqua (500 g/L) e filtrati

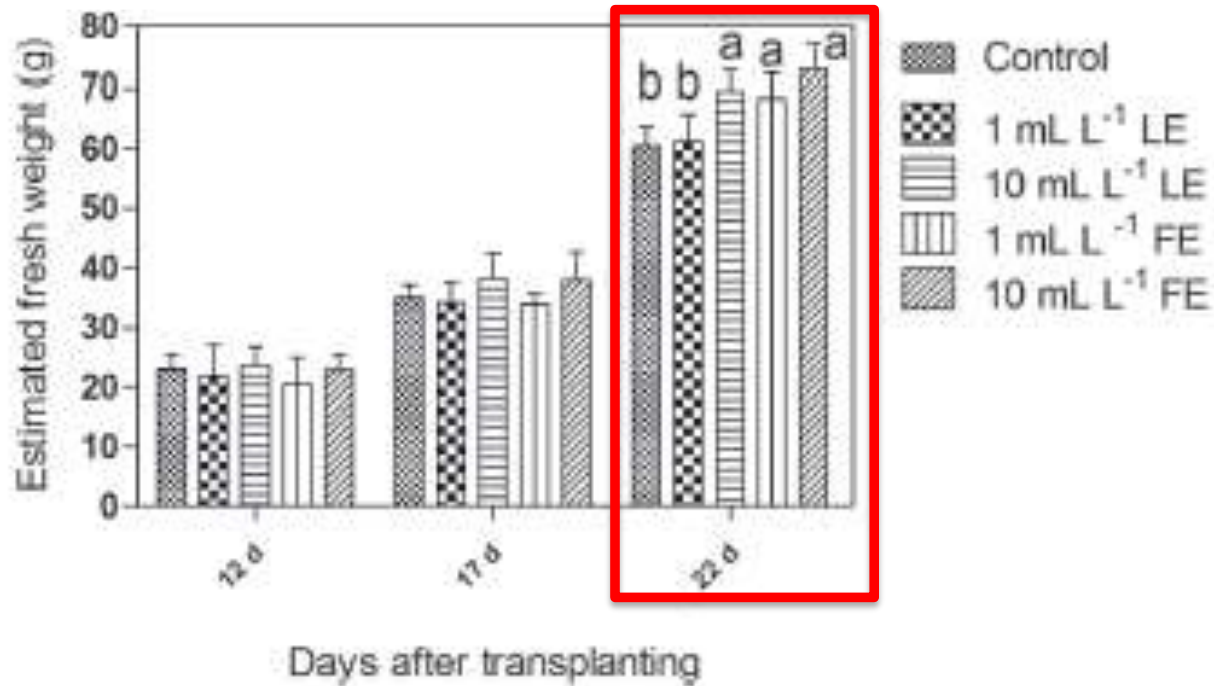


# I. Estratto di borragine su *Lactuca sativa* L.

- Estratti da foglie (LE) e fiori (FE) di *Borago officinalis* L.;
- 1 or 10 mL L<sup>-1</sup> dosi;
- *Lactuca sativa* 'Longifolia'



## Effetto sulla crescita della coltura



Effetto sulla crescita e accumulo di biomassa e quindi resa





# Scambi gassosi

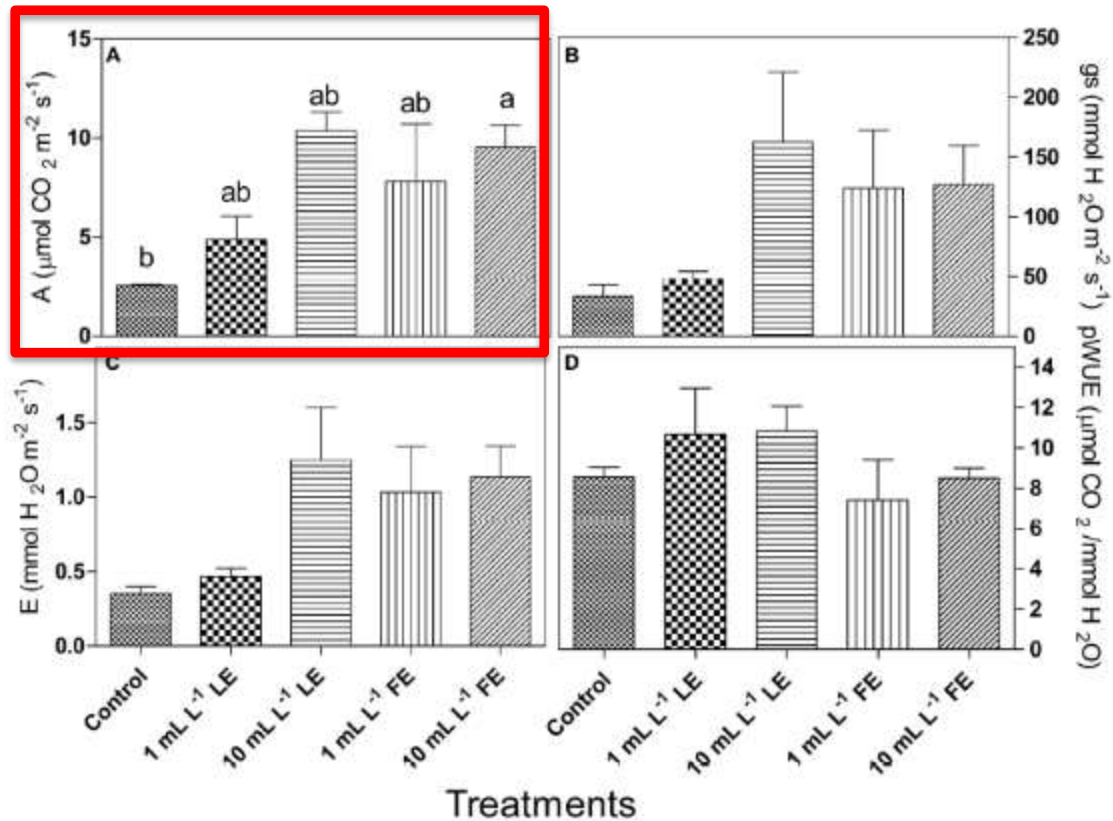


Figure. A) Net photosynthesis, B) transpiration, C) stomata conductance, D) photosynthetic water use efficiency. Values are means  $\pm$  SE (n=3). Data were subjected to one way ANOVA.



# Proteine solubili totali

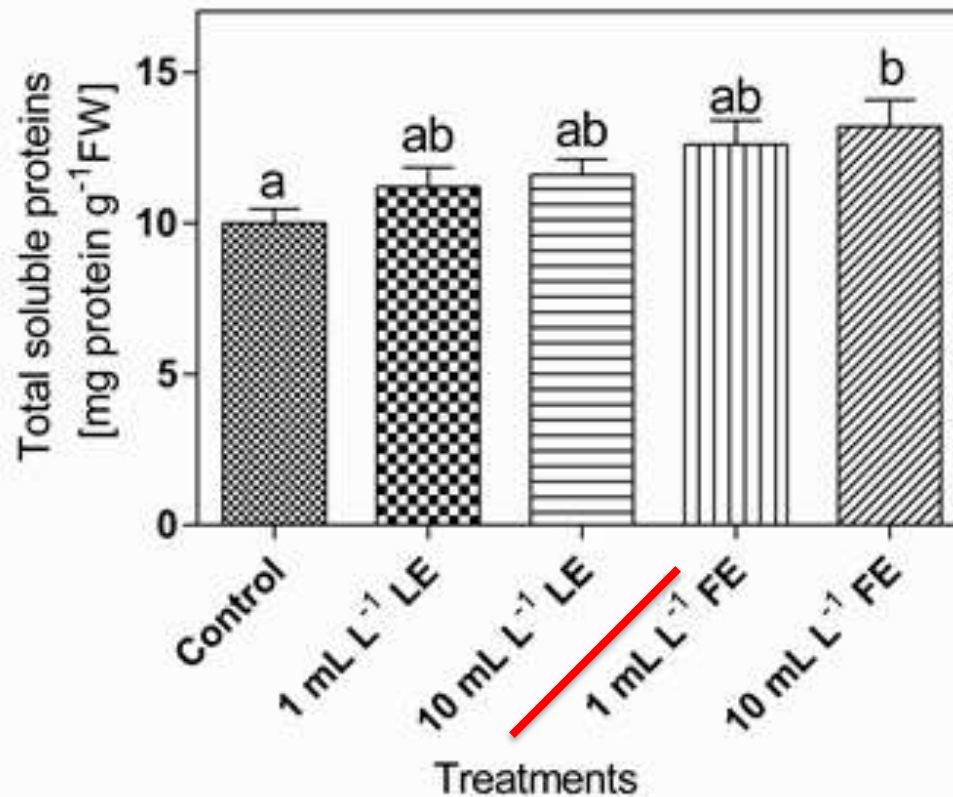
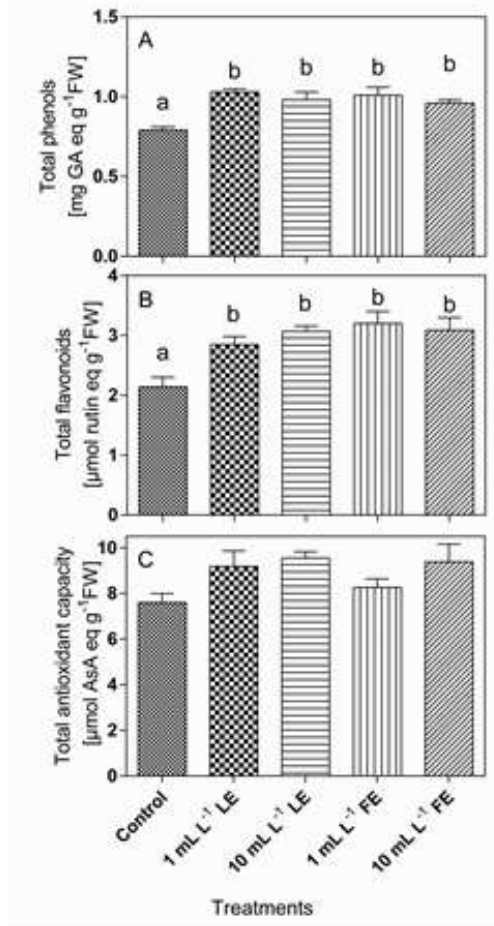


Figure. Values are means  $\pm$  SE (n=8). Data were subjected to one way ANOVA.



# Metabolismo secondario



Fenoli totali

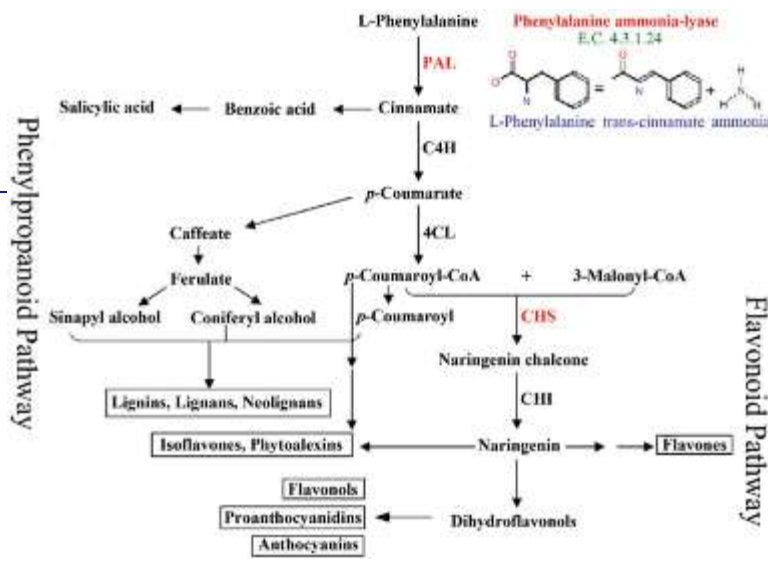
Flavonoidi totali

Aumento dei metaboliti secondari  
indica un rafforzamento delle  
difese delle piante

Figure. Phenolics (A) and total flavonoids (B) concentrations, and antioxidant capacity (C). Values are means  $\pm$  SE (n=8). Data were subjected to one way ANOVA.



# Fenilalanina ammonio-liasi (PAL)



- Attività dell'enzima PAL aumenta
- Accumulo di Proteine PAL-like aumentano

+17% in media

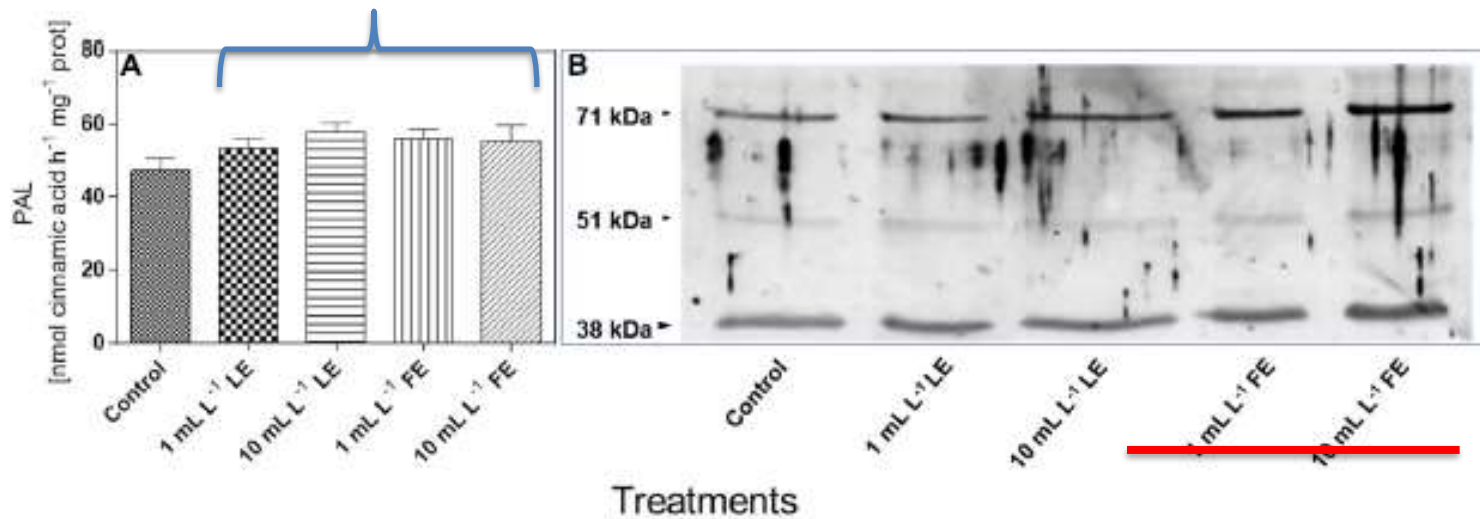
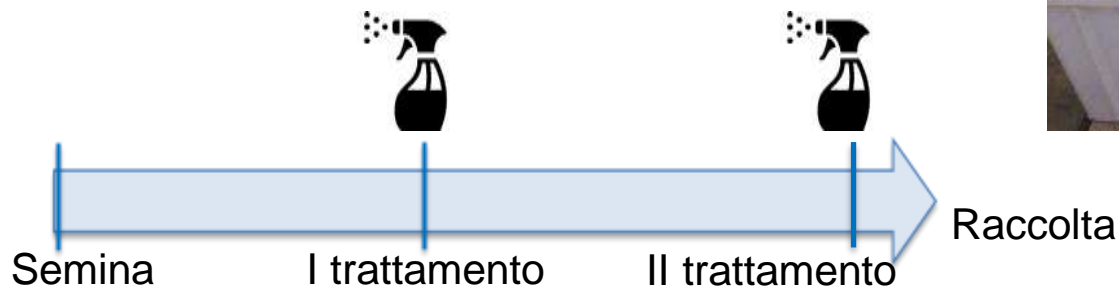


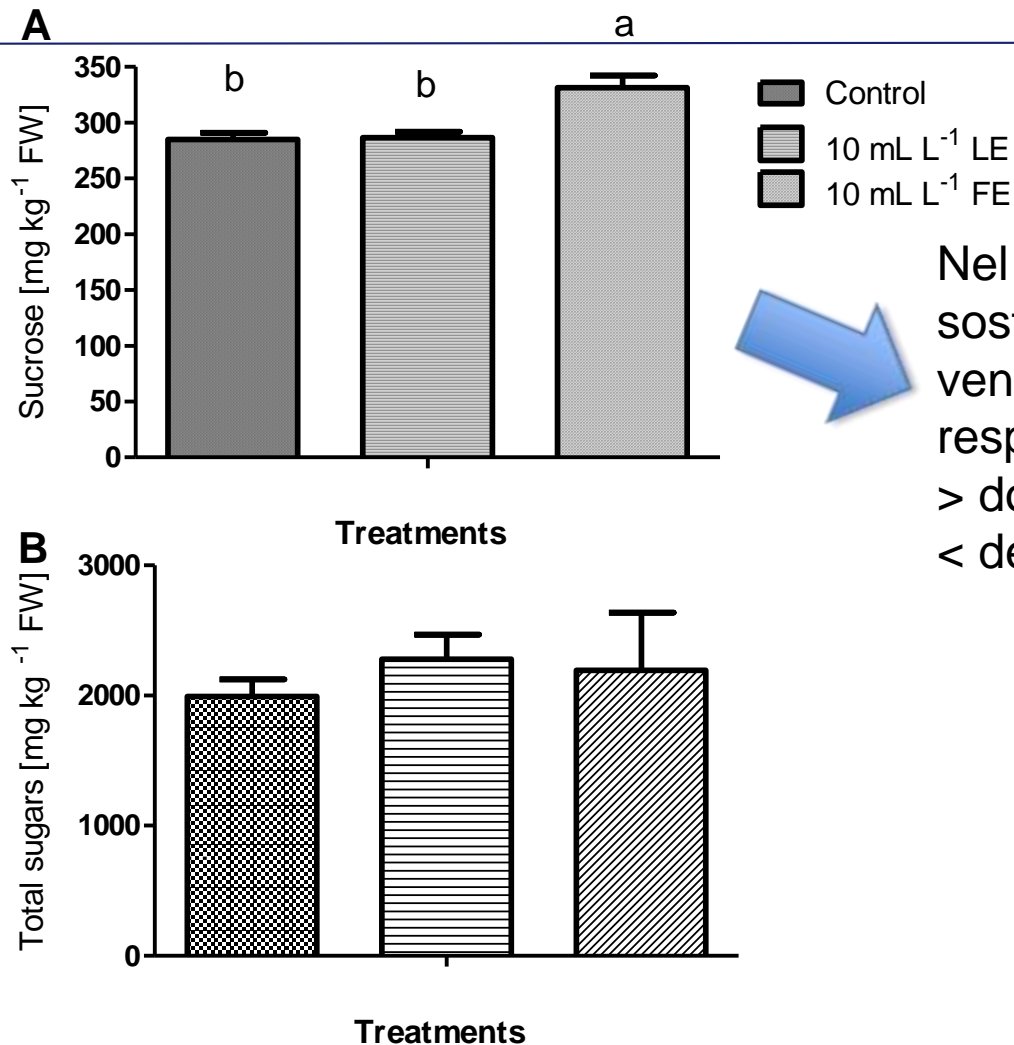
Figure. *In vitro* PAL specific activity (A) and levels of PAL-like polypeptides (B). *In vitro* PAL activity data are means ± SE (n=8). For immunoblotting, polyclonal antibodies raised against a PAL protein of *Petroselinum crispum* were used. Loading was 10 µg protein per lane.

## II. Prova sperimentale su *Diplotaxis tenuifolia* L.

- Estratti acquosi di foglie (LE) o fiori (FE) di *Borago officinalis* L.;
- 10 mL L<sup>-1</sup> dose applicata;
- coltivazione in floating system



# Saccarosio e zuccheri totali



Nel post raccolta le sostanze di riserva vengono utilizzate per la respirazione.

> dotazione saccarosio  
< decadimento prodotto

Figure. Values are means  $\pm$  SE (n=3). Data were subjected to one way ANOVA.



# Nitrati e problematiche connesse

## Regolamento CE N. 1258/2011

Leafy vegetable species	Harvesting period	Limits of NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg kg <sup>-1</sup> FW)
Spinach ( <i>Spinacia oleracea</i> L.)		3500
		2500
Frozen/canned spinach		2000
Lettuce ( <i>Lactuca sativa</i> L.) grown in protected environment or open field.	Harvesting from 1st October to 31st March:	
	-Grown in protected environment	5000
	-Grown in open field	4000
	Harvesting from the 1st April to 30th September:	
	-Grown in protected environment	4000
	-Grown in open field	3000
Lettuce type "Iceberg"	-Grown in protected environment	2500
	-Grown in open field	2000
Salad Rocket, wild Rocket ( <i>Eruca sativa</i> , <i>Diplotaxis tenuifolia</i> )	Harvesting from 1st October to 31st March	7000
Salad Rocket, wild Rocket ( <i>Eruca sativa</i> , <i>Diplotaxis tenuifolia</i> )	Harvesting from the 1st April to 30 September	6000

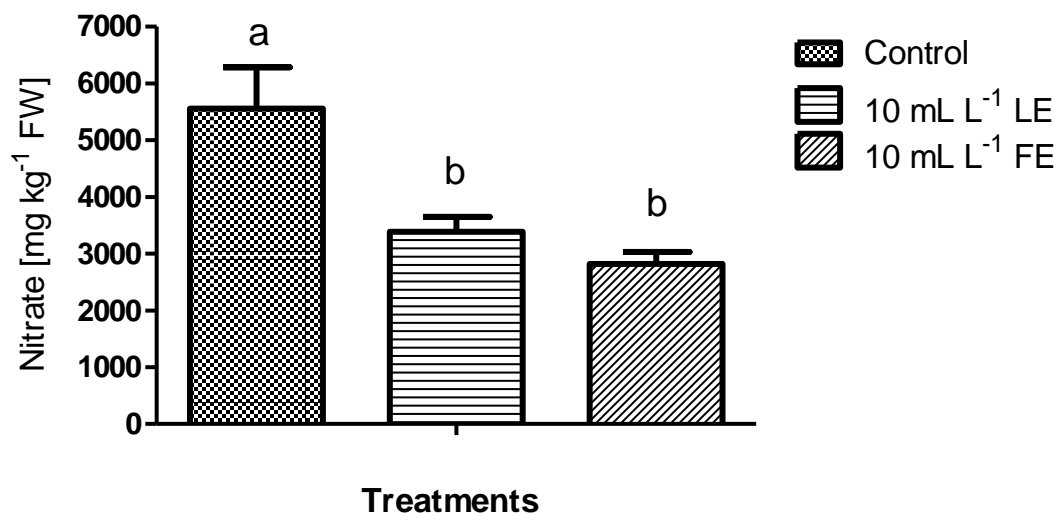


- Metaemoglobinemia nei bambini (baby blue);
- Cancro all'intestino negli adulti, soprattutto se ingeriti con la carne (formazione di nitrosammine);
- Funzione protettiva antimicrobica nello stomaco

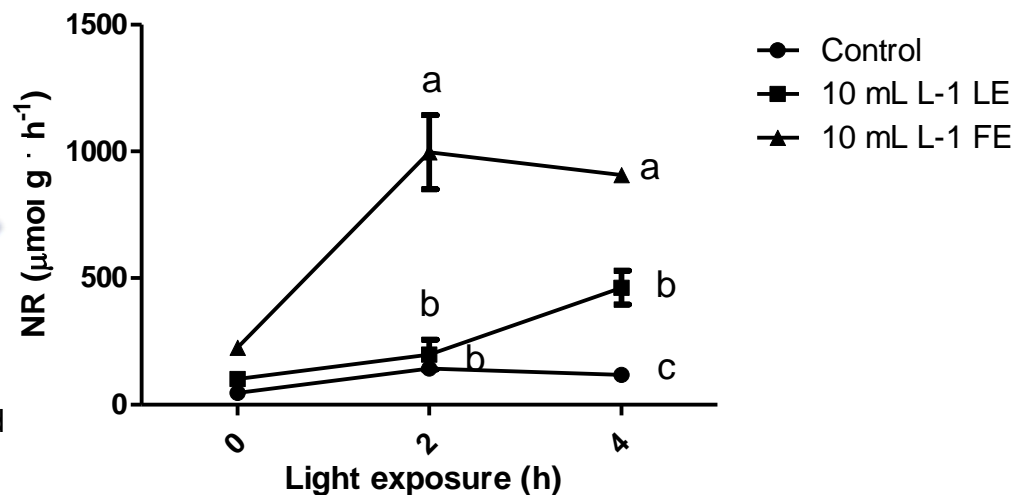
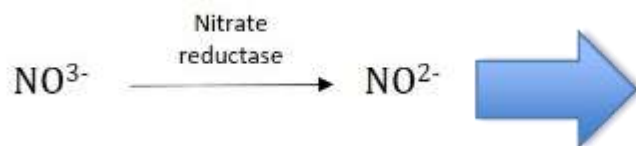
(McKnight et al., 1999; Santamaria et al., 2001; D'Anna et al., 2003; Ferrante et al., 2002)



# Nitrati e attività NR *in vivo*



LIMITI UE: < 7000 / 6000 mgNO<sub>3</sub>/kg PF  
REG. (EU) N. 1258/2011



Figures. Values are means  $\pm$  SE (n=3). Data were subjected to one way ANOVA

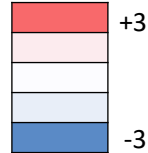




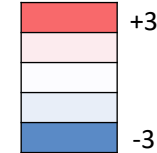


# Livelli di espressione genica

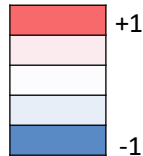
<b>NTR</b>	10 mL/L LE	10 mL/L FE
2 h		
4 h	***	
6 h		*
9 h		
24 h		



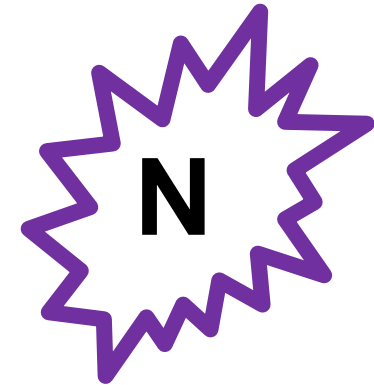
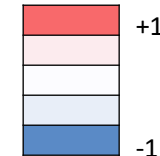
<b>NR</b>	10 mL/L LE	10 mL/L FE
2 h		
4 h		
6 h		***
9 h		
24 h		



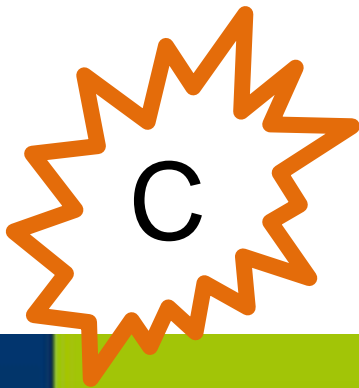
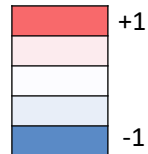
<b>NiR</b>	10 mL/L LE	10 mL/L FE
2 h		
4 h	**	*
6 h		
9 h		
24 h		



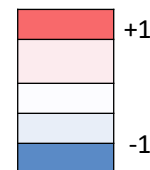
<b>GS</b>	10 mL/L LE	10 mL/L FE
2 h		
4 h		
6 h		
9 h	**	
24 h		



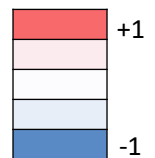
<b>GLU</b>	10 mL/L LE	10 mL/L FE
2 h		
4 h	*	
6 h		
9 h		
24 h		



<b>RuBisCO</b>	10 mL/L LE	10 mL/L FE
2 h		
4 h		
6 h	**	
9 h		
24 h		



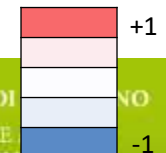
<b>IDH</b>	10 mL/L LE	10 mL/L FE
2 h		*
4 h		
6 h		
9 h		
24 h		



<b>PEPC2</b>	10 mL/L LE	10 mL/L FE
2 h		
4 h		
6 h		
9 h		
24 h		

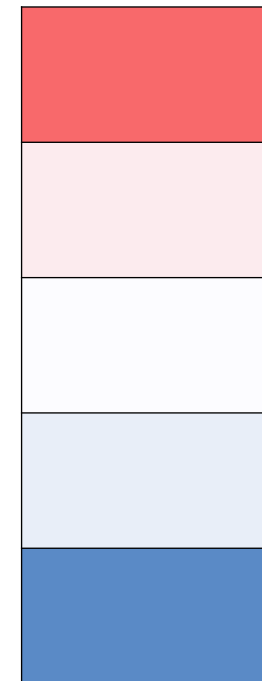


<b>PEPC4</b>	10 mL/L LE	10 mL/L FE
2 h	**	
4 h		***
6 h		
9 h		
24 h		



# DtNR

<i>NR</i>	10 mL/L LE	10 mL/L FE
2 h		
4 h		
6 h		***
9 h		
24 h		



### III. Attività ormone-simile

- Estratti di foglie (LE) e fiori (FE) di *Borago officinalis* L.;
- 10 mL L<sup>-1</sup> dose;
- Attività auxina-like (IAA like) e gibberellino-like (GA like) su due mutanti di mais (brachytic R3932 e il dwarf R4194);
- I mutanti sono stati utilizzati per verificare se i biostimolanti erano in grado di ripristinare almeno parzialmente il fenotipo.



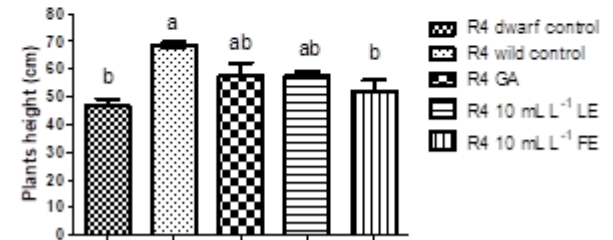
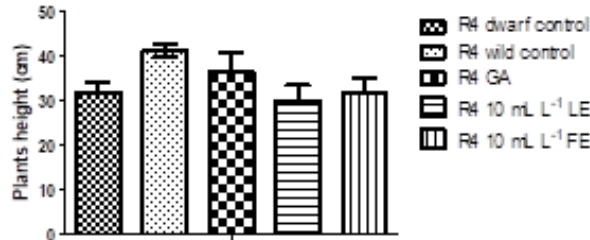
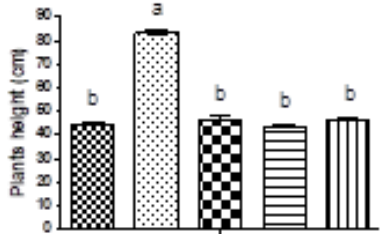
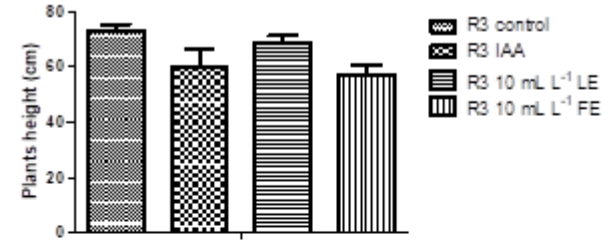
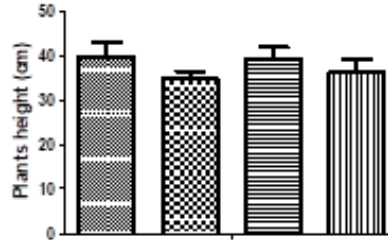
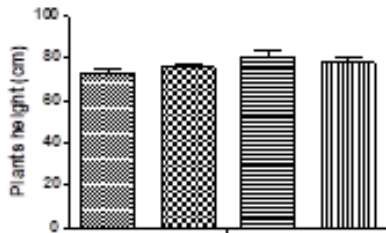
# Trattamenti

- Tre trattamenti;
- Trattamenti fogliari: acqua (controllo), FE 10 mL L<sup>-1</sup>, LE 10 mL L<sup>-1</sup>, 0,1 mM IAA (mutant R3932), 0,1 mM GA<sub>3</sub> (mutant R4194);
- Le piante sono state trattate ogni 4 d, per 3 settimane a luglio 2016, ogni 3 d, per 2 settimane nel mese di marzo 2017, e ogni 2 d per 2 settimane in maggio 2017.



# Altezza delle piante

R3



Treatments

Treatments

Treatments

R4

Luglio

Marzo

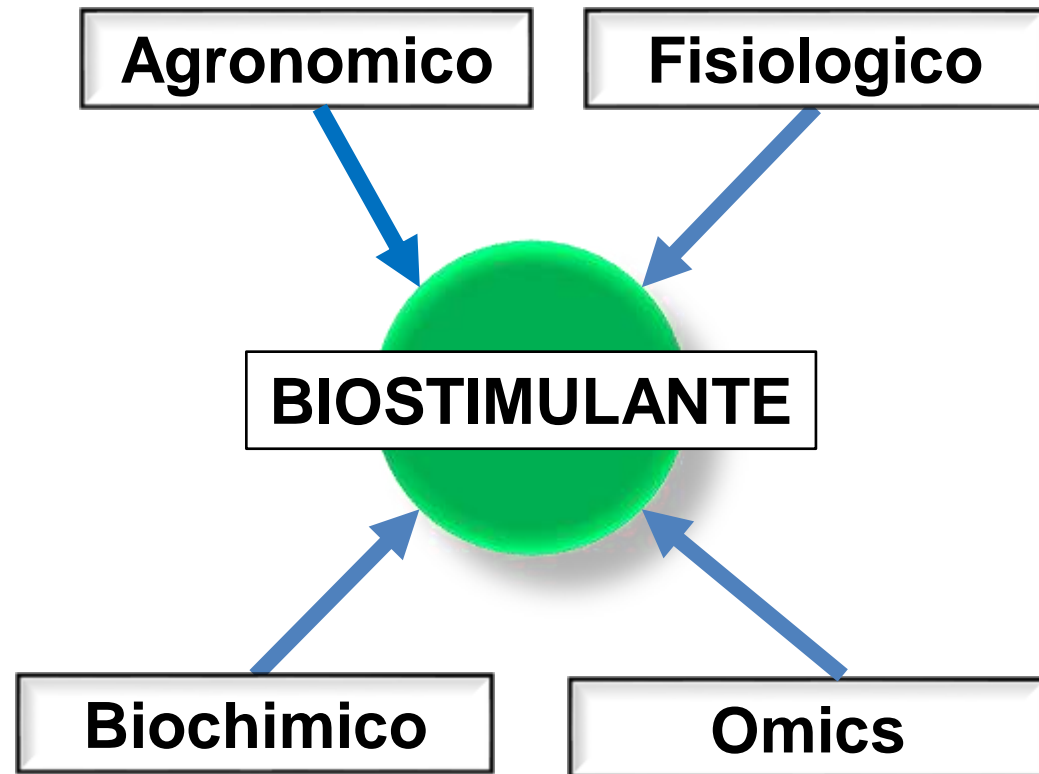
Maggio

Figure. Values are means  $\pm$  SE (n=6). Data were subjected to one way ANOVA.



# Approccio multidisciplinare

Lo studio dell'efficacia dei biostimolanti sulle colture



Permette di caratterizzare e validare i biostimolanti



# Problematiche e fabbisogno di ricerca

- Azione dei prodotti spesso non consistente su specie diverse e risposte variabili nell'ambito di una stessa specie
- Ricercare sistemi per caratterizzare le matrici organiche di partenza renderle omogenee.
- Effetto dei processi di lavorazione sul biostimolante finale.



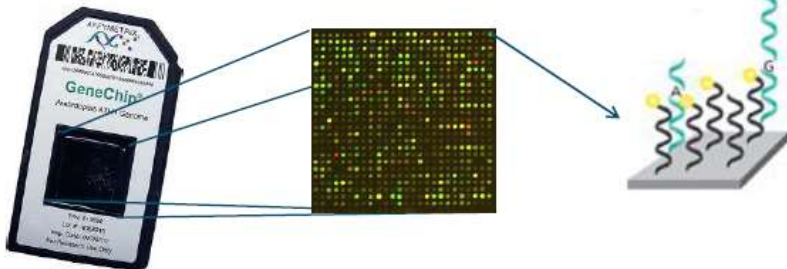


# Individuazione di potenziali marcatori molecolari

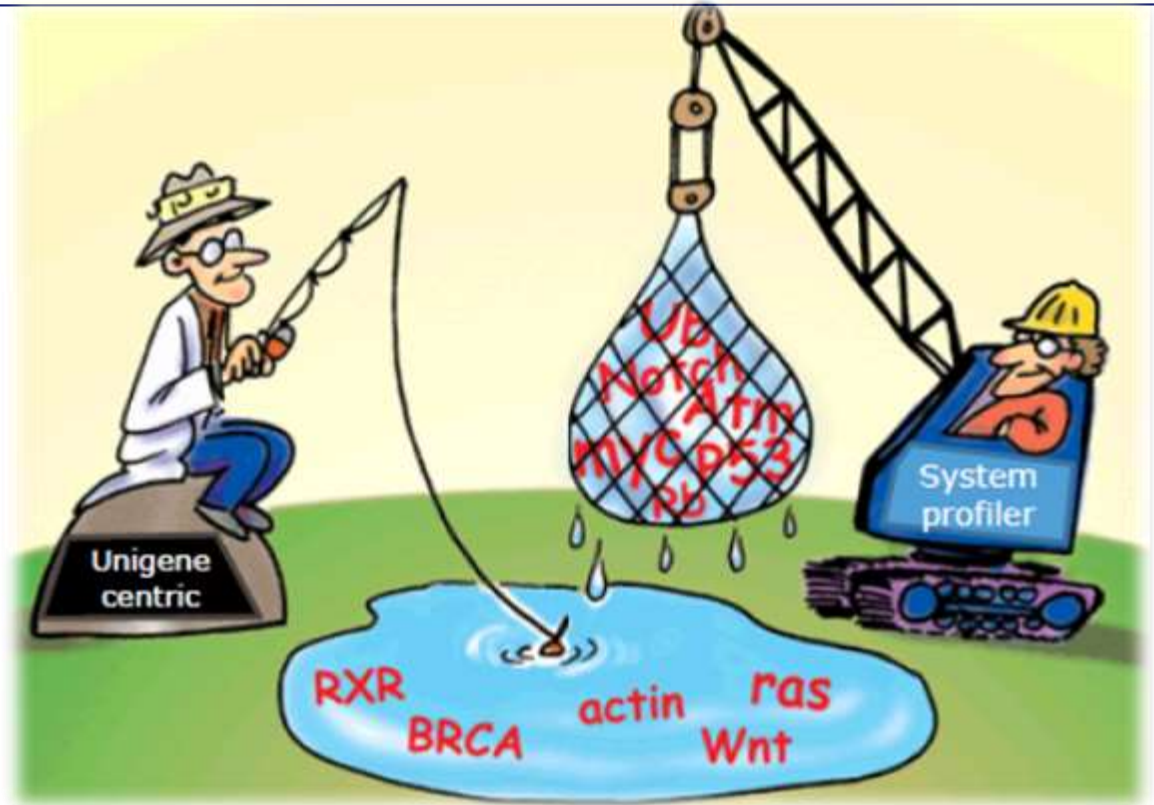
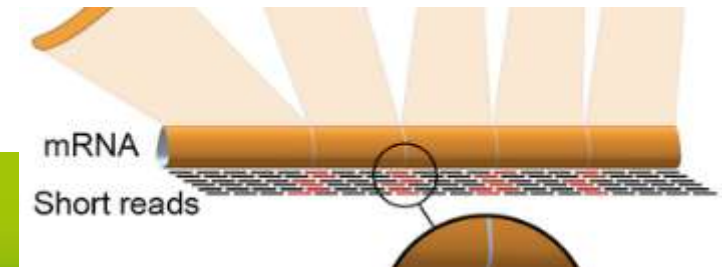
Espressione genica (RT-PCR)



Microarray



New Generation Sequencing RNA-seq

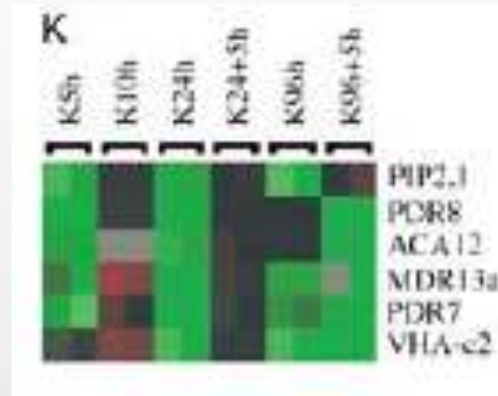


# EFFETTO MATRICE

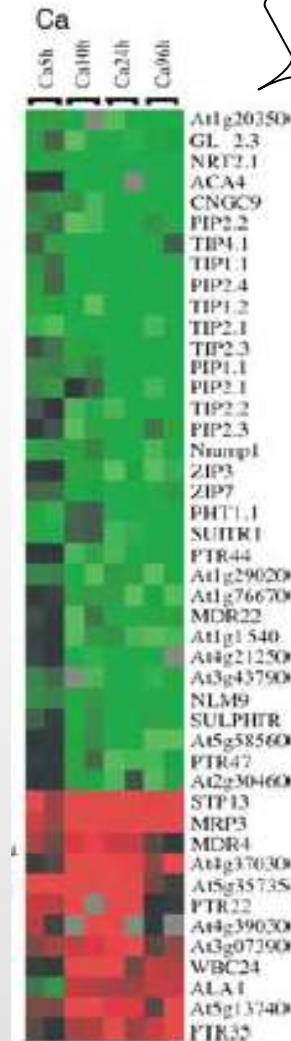
Matrice X



Matrice Y

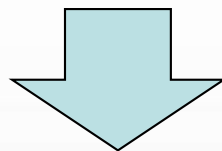


Matrice



# Conclusioni

- I biostimolanti possono essere dei mezzi tecnici per aumentare la sostenibilità dei sistemi colturali



- Individuare i meccanismi di azione nella pianta e nel suolo.
- Identificare l'azione sinergica di diversi componenti e definire la soglia di sensibilità nelle piante.

Collana Edagricole - Università & Formazione

## **I BIOSTIMOLANTI IN AGRICOLTURA**

**Prossima pubblicazione autunno 2019**



# Grazie per l'attenzione!

Collana Edagricole - Università & Formazione

**I BIOSTIMOLANTI IN AGRICOLTURA**

**Prossima pubblicazione autunno 2019**

