



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE DELLE PRODUZIONI VEGETALI
INDIRIZZO AGRONOMIA AMBIENTALE**

CICLO XXI

Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali

**ATTIVITA' BIOSTIMOLANTE DI IDROLIZZATI PROTEICI
SULLA CRESCITA E SUL METABOLISMO DI ZEA MAYS L.**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Andrea Battisti

Supervisore : Ch.mo Prof. Maurizio Borin

Dottorando: Dr. Andrea Ertani

02 febbraio 2009

Il presente lavoro di ricerca che rientra nel progetto “Attività fisiologica di fertilizzanti ad azione biostimolante” è stato finanziato dalla ditta ILSA S.p.A., Arzignano Vicenza, tramite borsa di studio.

La caratterizzazione chimica degli idrolizzati proteici oggetto di studio è stata effettuata dal Dott. Cavani, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna.

Declaration

I hereby declare that this submission is my own work and that, to the best of my knowledge and belief, it contains no material previously published or written by another person nor material which to a substantial extent has been accepted for the award of any other degree or diploma of the university or other institute of higher learning, except where due acknowledgment has been made in the text.

A copy of the thesis will be available at <http://paduaresearch.cab.unipd.it/>

Dichiarazione

Con la presente affermo che questa tesi è frutto del mio lavoro e che, per quanto io ne sia a conoscenza, non contiene materiale precedentemente pubblicato o scritto da un'altra persona né materiale che è stato utilizzato per l'ottenimento di qualunque altro titolo o diploma dell'università o altro istituto di apprendimento, a eccezione del caso in cui ciò venga riconosciuto nel testo.

Una copia della tesi sarà disponibile presso <http://paduaresearch.cab.unipd.it/>

A INES

RIASSUNTO	7 -
ABSTRACT	8 -
INTRODUZIONE	10 -
1 INTRODUZIONE	11 -
1.1 Normativa prodotti ad azione specifica.....	11 -
1.2 Effetto dei biostimolanti sulla crescita e sul metabolismo delle piante.....	13 -
1.3 Sostanze umiche (SU).....	14 -
1.4 Derivati da alghe.....	17 -
1.5 Gli idrolizzati proteici	17 -
2 IL METABOLISMO DELL'AZOTO	20 -
2.1 L'azoto e la pianta: l'assimilazione riduttiva.....	20 -
2.2 L'assimilazione dell'azoto inorganico.	22 -
3 IL METABOLISMO RESPIRATORIO	28 -
3.1 Il ciclo di Krebs	28 -
4 INTERAZIONE FRA IL METABOLISMO DELL'AZOTO E IL METABOLISMO RESPIRATORIO	31 -
SCOPO DEL LAVORO	32 -
MATERIALI E METODI	34 -
1 Gli idrolizzati proteici	35 -
1.1 Caratterizzazione chimica degli idrolizzati.....	35 -
1.2 Determinazione dell'attività auxinica	36 -
1.3 Determinazione dell'attività giberellinica.....	36 -
2 Allevamento delle plantule di mais	37 -
2.1 Analisi HPLC sul contenuto in nitrati di foglie e radici e determinazione proteine totali.....	38 -
2.2 Attività enzimatiche monitorate.....	38 -
2.2.1 Estrazione e determinazione dell'attività specifica degli enzimi NR e NiR	39 -
2.2.2 Estrazione e determinazione dell'attività specifica dell'enzima GS.....	39 -
2.2.3 Estrazione e determinazione delle attività specifiche degli enzimi GOGAT, AspAT e AS.....	40 -
2.2.4 Estrazione e determinazione delle attività specifiche degli enzimi del ciclo respiratorio	41 -
2.3 Microscopio elettronico a scansione (SEM).....	41 -
2.4 Estrazione RNA totale da radici e foglie.....	41 -
2.4.1 Trattamento con DNasi	42 -
2.4.2 Sintesi del cDNA.....	42 -
2.4.3 RT-PCR semiquantitativa (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction).....	42 -
2.4.4 Purificazione del DNA da gel agarosio.....	43 -
3 Analisi statistica	44 -
RISULTATI	45 -
1 Caratterizzazione chimica dei biostimolanti	46 -
2 Attività ormono-simile	49 -
3 Parametri di crescita, macro e micro elementi	50 -

<i>4 Attività enzimatiche saggiate</i>	- 54 -
<i>5. Profilo trascrizionale</i>	- 56 -
DISCUSSIONI	- 60 -
CONCLUSIONI	- 65 -
RINGRAZIAMENTI	- 67 -

RIASSUNTO

Il Decreto Legislativo del 29 aprile 2006 n. 217 sancisce che “è definito concime con proprietà di biostimolante o biostimolante, qualsiasi concime in grado di contribuire positivamente al miglioramento della nutrizione e allo sviluppo delle specie vegetali, indipendentemente dalla presenza di elementi nutritivi”.

In questo elaborato sono stati saggiati due idrolizzati proteici forniti dalla ditta ILSA S.p.A.: un idrolizzato di erba medica (EM), ed un idrolizzato di farina di carne (FC), diversi per caratteristiche chimiche. Entrambi i prodotti hanno mostrato di possedere attività giberello-simile. Plantule di *Zea mays* L. sono state trattate per 48 h con 0,01 ml/l o 0,1 ml/l di EM o FC. Dai risultati ottenuti si può affermare che i prodotti saggiati sono in grado di promuovere la crescita delle plantule ed influenzare il livello dei macro e micro elementi. Le analisi condotte hanno previsto la determinazione in foglie e radici dell'attività di diversi enzimi implicati nell'assimilazione dell'azoto (nitrato reductasi, nitrito reductasi, glutammina sintetasi, glutammato sintetasi, aspartato ammino transferasi) e nel ciclo degli acidi tricarbossilici (citrato sintetasi, NADP+-isocitrato deidrogenasi, malato deidrogenasi). Al fine di confermare i dati ottenuti e di evidenziare un'eventuale regolazione trascrizionale dei componenti del metabolismo dell'azoto e del carbonio da parte dei due idrolizzati, l'espressione di geni codificanti per alcuni di questi enzimi (NR = nitrato reductasi, AS = aspartato ammino transferasi, CS = citrato sintetasi, IDH = NADP+-isocitrato deidrogenasi, MDH = malato deidrogenasi) è stata successivamente analizzata via RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). I risultati ottenuti mostrano una positiva risposta all'applicazione di questi prodotti suggerendo un loro utilizzo nella comune pratica agricola, affiancati ai fertilizzanti minerali.

ABSTRACT

The Italian Law n. 217 April 29, 2007 ratifies that “ It can be defined as a compound, with biostimulant properties or biostimulant, any compound able to contribute in a positive way to the improvement of plant nutrition and development, regardless of the presence of nutritional elements.”

In this PhD thesis two proteic hydrolysates provided by ILSA S.p.A have been tested: a hydrolysate of alfaalfa (EM) and one of meat flour (FC), differing for chemical characteristics. Both the products have shown to be endowed with a giberellin-like activity. Maize seedlings have been treated for 48 h with 0,01 ml/l e 0,1 ml/l of EM or FC. Obtained results demonstrated that the tested products are able to promote the plant growth and to influence tissue concentration of both macro and micro elements.

The performed analyses also included the determination of the enzyme activities involved in the nitrogen assimilation (nitrate reductase, NR, nitrite reductase, NiR, glutamine synthetase, GS, glutamate synthase, GOGAT, aspartate aminotransferase, AspAT) and in the Krebs cycle (malate dehydrogenase, MDH; isocitrate dehydrogenase, IDH; citrate synthase, CS).

RT-PCR has been adopted in order to further confirm the results on enzyme activities and to investigate the possible transcriptional regulation of the nitrogen and carbon pathways due to the application of the two hydrolysates. The expression of the genes encoding for the enzymes NR = nitrate reductase, AS = asparagine synthetase, CS = citrate synthase, IDH = NADP⁺-isocitrate dehydrogenase, MDH = malate dehydrogenase, have been then analyzed.

The results show that the plants responded positively to the use of these products, also suggesting their possible role in the common agricultural practices.

INTRODUZIONE

1 INTRODUZIONE

L'attività di ricerca nel settore agricolo è stata per anni concentrata sul miglioramento delle rese produttive delle colture, mentre poca attenzione è stata prestata alla qualità del prodotto.

In questi ultimi anni, tuttavia, la produzione in termini quantitativi ha assunto un ruolo secondario per molte specie d'interesse agrario e, contemporaneamente, è stata attribuita una maggior importanza alla salvaguardia ambientale ed alla riduzione dei costi di produzione.

Infatti, i rischi d'inquinamento dell'ambiente, soprattutto dovuto alla lisciviazione dei nitrati, spingono verso una razionalizzazione dell'uso dei fertilizzanti azotati e non, che risulta essere un passaggio obbligato, anche alla luce delle recenti indicazioni della politica agricola comunitaria, italiana e regionale.

La ricerca effettuata su questo argomento ha messo a disposizione degli operatori agricoli nuovi formulati, definendo soluzioni diverse sui tempi, modi e quantità di prodotto da distribuire. Tra i prodotti offerti dal mercato, troviamo i quelli ad azione specifica, definiti anche biostimolanti.

1.1 Normativa prodotti ad azione specifica

Da un punto di vista normativo, l'inserimento dei biostimolanti nella legislazione dei fertilizzanti ha da sempre presentato tutta una serie di problematiche, talora insuperabili, fino al 5 luglio 2006, data dell'entrata in vigore del Decreto Legislativo 29 aprile 2006 n. 217 (D.Lgs. 217/06) "Revisione della disciplina in materia di fertilizzanti", pubblicato sulla G.U. n. 141 del 20 giugno 2006 – Suppl. Ordinario n. 152. Fino a quella data non era prevista alcuna categoria merceologica specifica per i "Biostimolanti" e quindi un loro inserimento negli allegati era da sempre risultato quanto mai problematico. Nel 1999, pur non prevedendo una categoria merceologica specifica, si arrivò alla seguente definizione: "Per biostimolante si intende 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" che apparve abbastanza esaustiva e completa. Si ritenne inoltre necessario ribadire che "non rientrano in questa categoria i fitoregolatori ed i prodotti con dichiarata e specifica funzione

fitosanitaria”. Con il Decreto Ministeriale (D.M.) 7 dicembre 2001 vi fu il primo atto legislativo dove apparve ufficialmente nelle Premesse degli Allegati 1.B. e 1.C. della Legge 748/84 il termine “Biostimolante”. Infatti, il citato D.M. stabilì che “I prodotti ad attività biostimolante sono inseriti nell’elenco dei concimi nazionali o concimi, previa approvazione da parte della competente autorità del relativo metodo di analisi. Lo scoglio che ha di fatto bloccato in questi anni l’inserimento di qualsiasi prodotto in legge è stato la mancanza di un metodo ufficiale per l’accertamento e la determinazione (quali-quantitativa) dell’attività biostimolante. La normativa non poteva consentire l’inserimento di prodotti senza la possibilità di controllo delle proprietà biostimolanti da parte dell’autorità competente. Con la pubblicazione del D.Lgs. 217/06 molti degli ostacoli relativi alla normativa precedente sono stati superati, anche se altri ne sono rimasti. Innanzitutto l’Art. 2 del decreto recante “Definizioni” recita: “1. Ai sensi del presente decreto si intendono per «fertilizzanti» qualsiasi prodotto o materiale di seguito definito: [...] cc) «prodotti ad azione specifica»: i prodotti che apportano ad un altro fertilizzante e/o al suolo e/o alla pianta, sostanze che favoriscono o regolano l’assorbimento degli elementi nutritivi o correggono determinate anomalie di tipo fisiologico, i cui tipi e caratteristiche sono riportati nell’allegato 6”.

Pertanto all’Allegato 6 si riportano tipi e caratteristiche dei “prodotti ad azione specifica” fra i quali anche i Biostimolanti: “Prodotti che apportano ad un altro fertilizzante e/o al suolo e/o alla pianta, sostanze che favoriscono o regolano l’assorbimento degli elementi nutritivi o correggono determinate anomalie di tipo fisiologico”. In particolare, al comma 4. si fa riferimento ai “Prodotti ad azione su pianta” e al punto 4.1 proprio ai “Biostimolanti” (tab. 1).

La legge, ribadisce come nel D.M. del 7 dicembre 2001 che “Per tali prodotti è obbligatorio descrivere in etichetta dosi da impiegare e modalità d’uso”. Essendo prodotti che esplicano la loro attività a dosi molto più basse rispetto ai tradizionali concimi e che le modalità d’uso possono cambiare in relazione alla specie vegetale, allo stato fenologico della pianta, al clima, e così via, è assolutamente necessario fissare dosi e modalità d’uso adeguate al fine di ottimizzarne l’impiego. Un altro aspetto importante che è stato fissato riguarda la presenza di fitormoni. A tale riguardo il decreto 217/06 stabilisce che “L’attività biostimolante non deve derivare dall’addizione di sostanze ad azione fitormonale al

prodotto”. Si tratta di una precisazione molto importante in quanto, sebbene sia del tutto chiaro che non si possano in alcun modo aggiungere principi attivi riconducibili a fitormoni, è d’altro canto ragionevole avere utilizzato l’allocuzione “dall’addizione” piuttosto che “dalla presenza”, in quanto estratti di origine vegetale possono contenere naturalmente fitormoni. Per quanto riguarda la possibilità di procedere a miscele di prodotti con attività biostimolante con altri fertilizzanti, decreto 217/06 è altrettanto chiaro: “Salvo approvazione della Commissione tecnico consultiva di cui all’Art. 9, non è consentito dichiarare proprietà biostimolanti alle miscele dei prodotti di questa sezione con altri fertilizzanti”. In altri termini, le proprietà biostimolanti di un fertilizzante non possono essere trasferite sic et simpliciter ad una miscela, ma devono essere comprovate da prove sperimentali ex novo. In questo senso poi sarà compito della Commissione tecnico consultiva procedere ad esaminare la nuova istanza relativa al prodotto ottenuto dalla miscela di un fertilizzante ed un prodotto biostimolante. All’atto dell’entrata in vigore del decreto 217/06 le proprietà biostimolanti sono dichiarabili solo per 2 prodotti: N. 1 - Idrolizzato proteico di erba medica e N. 2 – Eptelio animale idrolizzato (solido e fluido).

1.2 Effetto dei biostimolanti sulla crescita e sul metabolismo delle piante

Le ricerche più recenti effettuate da aziende produttrici in collaborazione con enti e strutture di ricerca hanno evidenziato che i biostimolanti sono in grado di incrementare, sia in laboratorio che in pieno campo, la crescita e lo sviluppo della pianta in maniera differenziale rispetto ai normali fertilizzanti. Infatti, il ruolo dei biostimolanti è quello di migliorare l’efficienza di assorbimento dei nutrienti forniti con la concimazione (Frankenberger e Arshad, 1995), per cui, in loro presenza, la quantità di elementi nutritivi da apportare con la fertilizzazione dovrebbe essere minore, con la riduzione dei costi di produzione e la limitazione dei rischi di inquinamento ambientale. Da un punto di vista nutrizionale, i biostimolanti promuovono la crescita delle piante modificando l’architettura radicale, aumentando lo sviluppo delle radici e predisponendo così la pianta ad un maggior assorbimento degli elementi nutritivi (Nardi et al., 2006). E’ stato inoltre dimostrato, che questi prodotti aumentano l’efficienza fotosintetica, favorendo l’accumulo di zuccheri nei frutti; l’allegagione; il miglioramento della pezzatura e la serbevolezza (Presutto e Pezzutto, 2006). Alcuni autori hanno evidenziato che i biostimolanti possono rendere le colture meno

sensibili alle condizioni di stress da temperature estreme, siccità, eccessiva umidità della rizosfera, oppure alla sovra o sotto-esposizione alla luce (Subler et al., 1998). La loro efficacia è stata testata soprattutto in terreni salini, dove in presenza di biostimolanti, l'assorbimento di sodio e cloro vengono diminuiti a favore della traslocazione di altri elementi nutritivi (Subler et al., 1998).

Alcune sperimentazioni hanno dimostrato come l'impiego di tali composti in piante stressate e predisposte alle infezioni microbiche e fungine, causino l'aumento della prolina. Tale molecola induce l'abbattimento di sostanze ossigenate radicaliche e aiuta la pianta a riacquistare uno stato di salute in equilibrio con l'ambiente (Iyer e Caplan, 1998).

I biostimolanti, per esplicare al meglio la loro efficacia, devono essere somministrati in un momento specifico e in una dose ottimale che varia in relazione alla coltura e, nell'ambito della stessa coltura, da cultivar a cultivar, in considerazione del fatto che l'apporto della giusta quantità aumenta i processi di autodifesa e reazione agli stress normalmente presenti nella pianta (Zhang et al., 2003). Per scegliere il momento di applicazione occorrerà tener conto dei tempi di reazione dell'organismo vegetale e intervenire quando le funzioni vitali non siano già compromesse.

In questi ultimi anni nella letteratura internazionale sono stati descritti numerosi prodotti per l'agricoltura che ricadono nella larga categoria dei biostimolanti: sostanze umiche, alghe e aminoacidi (Miller, 1990).

1.3 Sostanze umiche (SU)

Le SU costituiscono la maggior parte della componente non vivente della sostanza organica, e quindi del carbonio totale del suolo, e derivano dai processi di degradazione e resintesi dei residui organici.

Lo studio delle relazioni esistenti fra la struttura chimica delle sostanze umiche e le loro funzioni necessita di un approccio globale che prenda spunto dal contesto d'origine e dai processi di formazione delle stesse. Le difficoltà che si incontrano nello studio delle sostanze umiche sono infatti dovute principalmente all'origine delle stesse, quindi a variabili come il clima, il tipo di vegetazione originaria, il tipo stesso di degradazione e quindi di popolazioni microbiche predominanti nel suolo (Pal, 1992; Piccolo, 2001). Tutto ciò determina la complessità della struttura delle macromolecole umiche, e di conseguenza

della difficoltà nella caratterizzazione del materiale di partenza, nonché la variabilità delle caratteristiche stesse di sostanze umiche di natura differente.

Le sostanze umiche sono definite come polimeri di complessità e composizione variabili, e per questo di difficile identificazione chimica (Ghosh e Schnitzer, 1980; Wershaw, 1986; Stevenson, 1994), originati nel suolo dalla degradazione chimica e biologica dei residui vegetali e animali e dall'attività di sintesi dei microrganismi.

Questa definizione deriva dallo studio dei processi degradativi e di resintesi cui va incontro la sostanza organica durante l'umificazione: i processi idrolitici rompono i legami chimici tra i componenti dei residui organici, scindendoli in molecole più semplici che, a loro volta, possono essere sottoposte a reazioni di ossidazione, ciclizzazione e nuova polimerizzazione. I polimeri ad elevate dimensioni molecolari contribuiscono alla formazione dello scheletro della molecola umica.

L'humus, o meglio le sostanze umiche, svolgono un ruolo importante nell'interfaccia suolo – pianta. Infatti, oltre a regolare numerose proprietà fisiche e chimiche del suolo sono in grado di influenzare il metabolismo della pianta. L'influenza esercitata dalle sostanze umiche sulla germinazione dei semi e sulla crescita e sviluppo delle piante è definita attività biologica delle sostanze umiche. Il ruolo delle sostanze umiche nell'assimilazione dei nutrienti è stato studiato da diversi autori in relazione a diversi macroelementi, e l'azione sembra essere più o meno selettiva, dipendente dal pH e dalla concentrazione delle sostanze umiche (Vaughan e Malcom, 1985; Chen e Aviad, 1990; Varanini e Pinton, 2001; Clapp et al., 2001). Spesso però i risultati di questi studi sono risultati difficili da interpretare, perché sono state sovente utilizzate sostanze umiche di diversa origine e genesi, spesso scarsamente caratterizzate dal punto di vista chimicomolecolare. Considerata l'importanza dell'azoto nel metabolismo della pianta, la maggior parte degli studi è stata concentrata sull'assimilazione del nitrato (NO_3^-); è stato ipotizzato che le frazioni, ad alto (HMS) e a basso peso molecolare (LMS), possano interferire con il processo di trasporto di tale anione da parte della radice, anche influenzandone i parametri cinetici (Vaughan et al., 1985). L' H^+ -ATPasi della membrana plasmatica, che ha un ruolo definito e centrale sulla crescita della pianta e sulla nutrizione minerale viene stimolata dalla frazione LMS (Pinton et al., 1999a). Gli studi di Canellas et al. (2002) hanno inoltre dimostrato che l'aumento di attività H^+ -ATPasica, osservata in piantine di mais in risposta ad alcune sostanze umiche, è

riconducibile ad un incremento della quantità di proteina corrispondente all'isoforma Mha2. In esperimenti più recenti è stato osservato che in radici di mais, trattate per 48 ore con sostanze umiche della frazione LMS, si verifica un maggiore assorbimento del nitrato, cui corrisponde un marcato incremento della trascrizione del gene che codifica per Mha2 negli stessi tessuti (Quaggiotti et al., 2004). Nello stesso studio è stata misurata l'espressione di due trasportatori radicali del nitrato (ZmNrt1.1 e ZmNrt2.1), che risultano essere coinvolti nel suo assorbimento attivo, ma non sono state riscontrate alterazioni a carico della loro trascrizione in risposta alla stessa sostanza umica. Questi risultati, insieme ai precedenti, suggeriscono che il meccanismo attraverso cui le sostanze umiche stimolano l'assorbimento del nitrato sia mediato da un effetto diretto sull'H⁺-ATPasi e che tale effetto coinvolga la regolazione della trascrizione del gene che codifica per una principale isoforma di questo enzima. Gli effetti finora descritti sono comunque difficili da interpretare e da confrontare, perché le sostanze umiche utilizzate hanno origine diversa e sono ottenute con metodi di estrazione differenti. Lavori scientifici hanno mostrato come i cambiamenti indotti dalle sostanze umiche sulla pianta e, più in generale, dai biostimolanti, ricalchino quelli dovuti all'impiego di ormoni vegetali (Nardi et al., 2002). Diversi lavori hanno evidenziato la presenza di acido indolacetico (IAA) all'interno delle sostanze umiche, sia attraverso approcci di tipo immunologico (Muscolo et al. 1998; Muscolo et al., 1999; Quaggiotti et al., 2004), che attraverso l'utilizzo della gas cromatografia in associazione alla spettrometria di massa (Canellas et al., 2002). Ciononostante le sostanze umiche non possono essere classificate come dei veri e propri ormoni.

Gli effetti misurati in termini di crescita e sviluppo, non sempre hanno evidenziato una correlazione diretta al contenuto di auxina misurato all'interno delle sostanze umiche, ma sembrano anche dipendere dalla complessità strutturale delle sostanze utilizzate. Inoltre, la presenza di differenti composti auxinici (come acido fenilacetico e acido indol-butirrico) o di molecole che possano stimolare il metabolismo auxinico endogeno della pianta, non può essere esclusa. E' stato in generale dimostrato che i componenti biologicamente più attivi delle sostanze umiche non sono i componenti parentali, ma molecole di neosintesi derivate dall'attività microbica del suolo (Frankenberger e Arshad, 1995). I materiali organici di partenza potrebbero servire come precursori o substrati per la sintesi di sostanze biologicamente attive, tra cui sostanze con effetti ormono-simili. Questi regolatori di

crescita potrebbero essere incamerati e preservati dalla degradazione, resi quindi più disponibili per la pianta. Quest'ultima grazie all'emissione di acidi organici riesce a scindere le frazioni più attive del cosiddetto "assemblato sopramolecolare" per poi assorbirle (Nardi et al., 2000; Pizzeghello et al., 2001). Inoltre, in uno studio con composti marcati fluorescenti, si è evidenziato come sia l'auxina che le sostanze umiche a basso peso molecolare raggiungano le medesime zone all'interno delle cellule di carota (Muscolo e Nardi 1999). Più recentemente (Russel et al., 2006), è stato mostrato come l'auxina e le sostanze umiche agiscano in modo equivalente in termini di effetti e concentrazioni su un enzima chiave del metabolismo vegetale come la fosfolipasi.

1.4 Derivati da alghe

Nonostante che l'uso delle alghe nella pratica agricola abbia origini antiche, in letteratura mancano lavori riguardanti la sperimentazione in questo ambito. A partire dalla seconda metà del xx secolo iniziò la produzione dei primi derivati algali utilizzati per applicazione fogliare. Normalmente i prodotti a base di alghe utilizzati in agricoltura derivano da pochi generi appartenenti al phylum Heterocontophyta. Si attribuiscono molte proprietà ai prodotti a base di alghe essendo state rilevate diverse azioni di stimolazione e/o inibizione di processi fisiologici, come la stimolazione della produzione di elicitori. Il termine elicitore o induttore individua sostanze capaci di stimolare nella pianta la produzione di fitoalessine (antimicrobici) anche in assenza di patogeni, aumentando i sistemi di protezione naturale dei vegetali. Numerosi segnali elicitori sono riconducibili ad alcuni oligosaccaridi (Tagliavini et al., 2006). Tale gruppo di sostanze indicato con il nome di oligosaccarine, è considerato come una classe di fitormoni. Questi composti, come la lamarina sono ritenuti responsabili dell'aumento delle difese endogene delle piante trattate nei confronti di stress biotici e abiotici. Le beatine, una classe di ormoni che agiscono come le citochinine, si trovano in quantità cospicue nei prodotti a base di alghe.

1.5 Gli idrolizzati proteici

Gli idrolizzati proteici sono costituiti per lo più da peptidi a catena più o meno lunga e amminoacidi (AA) liberi di tipo levogiro. I peptidi, a loro volta, sono formati da amminoacidi legati tra loro (legame peptidico) a formare una catena che può essere

costituita da un numero più o meno elevato (oligopeptidi o polipeptidi). 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 diverse proprietà biostimolanti sui parametri chimici-fisici e biologici, degli idrolizzati proteici siano fondamentalmente collegate alla frazione con dimensioni molecolari più ridotte (Quartieri et al., 2002) in particolare a quella minore di 5.000 Da, oltre che agli amminoacidi liberi (Cavani e Ciavatta, 2007). Questa ipotesi si basa sul fatto che solo molecole di dimensioni ridotte possono essere assimilate direttamente dai tessuti vegetali, in quanto in grado di permeare attraverso la parete e la membrana cellulare e agire in modo diretto o indiretto sul metabolismo delle piante (Vercesi et al., 2005).

Pertanto la caratterizzazione della frazione peptidica degli idrolizzati proteici è di grande importanza per valutarne la qualità. Va ricordato, inoltre, che la determinazione delle dimensioni molecolari dei peptidi si era resa indispensabile per gli idrolizzati proteici di origine animale a seguito dell'emergenza Tse/Bse (vacca pazza). Infatti era stato indicato in 10.000 Da il valore massimo delle dimensioni molecolari per poter impiegare un idrolizzato proteico in sicurezza.

Il processo d'idrolisi per la produzione di questi biostimolanti, può essere classificato in base alla metodologia utilizzata: idrolisi chimica, attuata con un agente chimico ad elevata temperatura e a pH alcalino o acido; idrolisi enzimatica, che prevede l'utilizzo di enzimi, bassa temperatura e pH prossimi alla neutralità; idrolisi mista che prevede l'utilizzo di entrambe le tecniche in successione.

Appare chiaro come le differenti metodologie d'idrolisi portino alla formazione di idrolizzati aventi caratteristiche diverse, e come queste vadano ad incidere sulla composizione del prodotto e sulla sua azione. I parametri principali che permettono di valutare l'efficacia di un prodotto e le sue dosi di impiego si possono riassumere in: quantità di amminoacidi liberi e totali; peso molecolare dei componenti; e grado di racemizzazione, rapporto espresso in percentuale tra AA destrorotatori e levogiri.

Per quanto riguarda gli amminoacidi liberi questi dovrebbero essere in numero maggiore rispetto ai totali, in quanto sono maggiormente assorbiti dalla pianta (Cavani et al., 2007).

Idrolisi molto spinte permettono di ottenere esclusivamente AA e oligopeptidi, mentre processi idrolitici più blandi vedono prevalere i polipeptidi a peso molecolare più elevato. Il

peso molecolare incide sul grado di assorbimento da parte della pianta che presenta un elevato assorbimento per pesi molecolari ridotti che va via via riducendosi verso pesi molecolari sempre più elevati (Cavani, 2007).

Anche il grado di racemizzazione viene influenzato dal tipo di processo chimico che subiscono le matrici di partenza. L'idrolisi chimica rompe le catene di amminoacidi in modo irregolare e confuso dando origine ad una maggior quantità di miscele di forma destrorotatorio (D-), questo tipo di configurazione non è facilmente assorbita dalla pianta ed inoltre può provocare fitoto-tossicità. Al contrario l'idrolisi enzimatica, favorisce la produzione di miscele di amminoacidi di tipo levorotatorio (L-), naturalmente presenti e prodotti dai vegetali e per questo non tossiche e attive nella pianta.

Gli idrolizzati proteici vengono per la maggior parte distribuiti sulla vegetazione, perché come si diceva prima, gli amminoacidi sono in grado di entrare attraverso la membrana plasmatica. L'applicazione al suolo, comporta un aumento della dose da distribuire in funzione del fatto che la flora fungina e batterica del terreno utilizza parte del prodotto distribuito come substrato nutritivo.

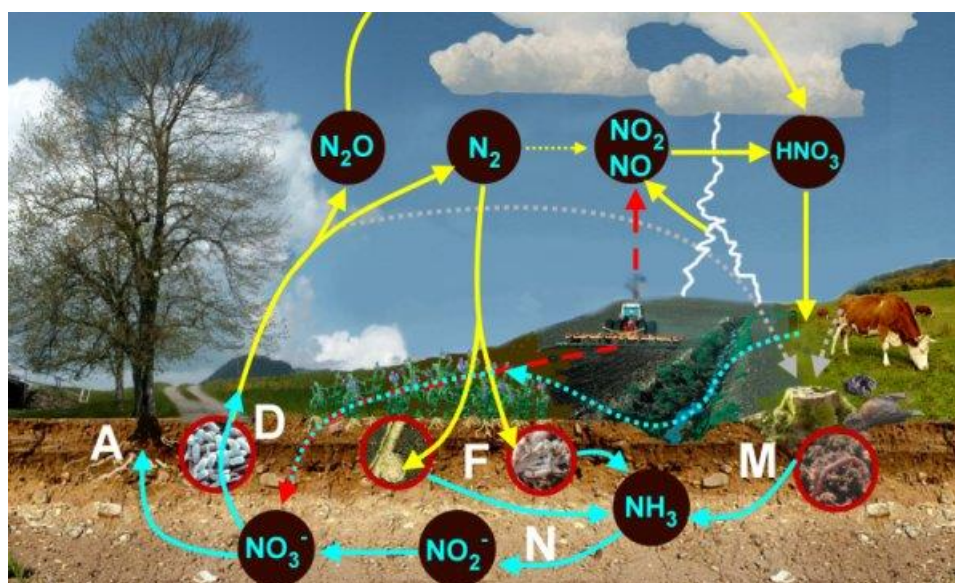
2 IL METABOLISMO DELL'AZOTO

2.1 L'azoto e la pianta: l'assimilazione riduttiva

L'azoto è fondamentale per la pianta poiché entra nella costituzione di molti composti organici ad elevato valore biologico, come per esempio gli aminoacidi, acidi nucleici, pigmenti e coenzimi partecipando alla catalisi enzimatica, è coinvolto in molte reazioni di ossidoriduzione e riveste un ruolo nella regolazione osmotica (Taiz e Zeiger, 1996). Tra i macroelementi richiesti dalla pianta, l'azoto è senza dubbio quello più utilizzato e quello maggiormente limitante per la crescita, fatta eccezione per i casi in cui le radici sviluppano un rapporto di simbiosi con microrganismi azoto-fissatori. Le forme di azoto presenti nel terreno variano in funzione dell'habitat considerato e dell'andamento dell'insieme delle trasformazioni microbiche e includono forme inorganiche (nitrato, ammonio, diazoto, etc.) ed organiche (urea, amino acidi, etc.).

Le piante, per adattarsi alle molteplici situazioni nutrizionali del suolo, hanno messo in atto differenti strategie di acquisizione di tale elemento (figura 1): dall'assorbimento radicale sino alla fissazione dell' N_2 atmosferico grazie alla simbiosi con microrganismi (Taiz e Zeiger, 1996). Molte specie sono in grado di assorbire ed assimilare nitrato (NO_3^-), ammonio (NH_4^+), urea e aminoacidi, anche se la risposta ad una particolare forma di azoto varia da specie a specie. In genere si può affermare che la maggior parte delle piante coltivate predilige la presenza contemporanea di ammonio e nitrato. In un tipico suolo agrario, sono presenti entrambe queste forme anche se il nitrato è prevalente; un studio condotto su 35 differenti tipi di suolo coltivato, ha dimostrato che la concentrazione media di NO_3^- è pari a 6.0 mM rispetto allo 0.77 mM di NH_4^+ (Wolt, 1994).

Fig.1 Rappresentazione del ciclo azotato terrestre.



L'assorbimento di azoto dal suolo è principalmente in forma nitrica NO_3^- ed è regolata non solo dalla disponibilità chimico-spaziale di azoto nel suolo, ma anche dall'attività e dal numero di sistemi di trasporto a livello cellulare, dal trasporto dalle radici alla parte epigea, e dall'utilizzo per la crescita e dalle riserve. Un importante fattore per la regolazione dell'assorbimento di azoto è anche la produzione di carboidrati e la loro distribuzione alle radici.

L'azoto influenza la crescita e la durata delle foglie e quindi l'entità della riserva di carboidrati, la fotosintesi per unità di area fogliare e il numero e l'entità degli organi vegetativi, riproduttivi e di riserva.

Il modo in cui i vari processi contribuiscono alla crescita e alla produzione vegetale è ancora poco chiaro. Per esempio, la carenza di azoto può ridurre la crescita delle piante non solo riducendo la sintesi di enzimi e i costituenti delle membrane, ma anche alterando il trasporto di acqua e di fitormoni dalle radici.

La cellula vegetale, oltre ad essere autotrofa nei confronti del carbonio e dello zolfo, è autotrofa anche nei confronti dell'azoto, potendo utilizzare forme inorganiche di questo elemento per la sintesi dei suoi costituenti organici azotati.

L'utilizzazione del nitrato da parte della cellula ha inizio con il suo assorbimento dal mezzo esterno, processo che avviene a livello della zona assorbente della radice. L'assorbimento è

reso possibile da permeasi specifiche che favoriscono il passaggio del nitrato attraverso il plasmalemma. Per quanto riguarda la cinetica di assorbimento di questo ione, è noto che si tratta di un trasporto attivo mediato, secondario, che richiede, anche se indirettamente, consumo di ATP. Avviene tramite simporto NO_3^-/H^+ , con il coinvolgimento di 2 protoni per ogni nitrato assorbito (Ullrich, 1992). La riduzione del nitrato e l'organizzazione dell'azoto possono avvenire già a livello della radice.

2.2 L'assimilazione dell'azoto inorganico.

Il nitrato entrato nella cellula è presente nel citoplasma, dove subisce la riduzione a nitrito. Questa reazione è catalizzata dall'enzima nitrato reduttasi citosolica, una molibdo-flavoproteina associata ad un citocromo b^{557} . I donatori fisiologici per la riduzione del nitrato sono il NADH ed il NADPH (Miller e Smith, 1996; Crawford e Glass, 1998)

Fig. 2 Rappresentazione schematica della riduzione assimilativa del nitrato.



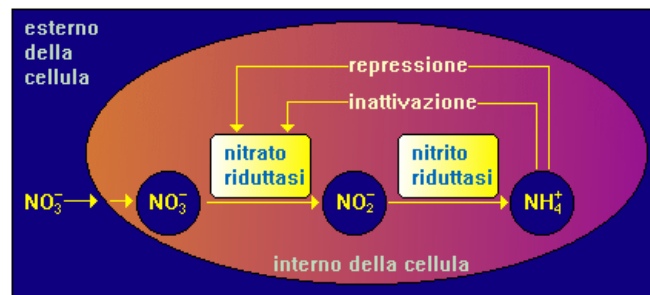
Nonostante la localizzazione citoplasmatica di questa riduzione, il cloroplasto può essere coinvolto in maniera indiretta in questa reazione attraverso l'esportazione nel citoplasma di equivalenti riducenti mediante la navetta malato-ossalacetato. Le reazioni successive all'assimilazione dell'azoto avvengono tutte nel cloroplasto e sono direttamente dipendenti dal rifornimento di ATP ed equivalenti riducenti di origine fotosintetica. L'ingresso di NO_3^- nel cloroplasto è mediato da un carrier localizzato sulla membrana plastidiale interna.

Fig. 3 Rappresentazione schematica della riduzione assimilativa del nitrato.



La successiva riduzione del nitrito ad ammoniaca è catalizzata dall'enzima nitrito reduttasi, una proteina caratterizzata dall'aver come gruppo prostetico un siroene e che contiene un centro 4Fe-4S. Come donatore di elettroni per la riduzione del nitrito ad ammoniaca, essa utilizza ferridossina ridotta (Crawford e Glass, 1998). Dato che l'ammoniaca è la sola forma di azoto che può essere assimilata nei composti organici, lo ione ammonio non viene accumulato

Fig. 4 Riduzione assimilativa del nitrato

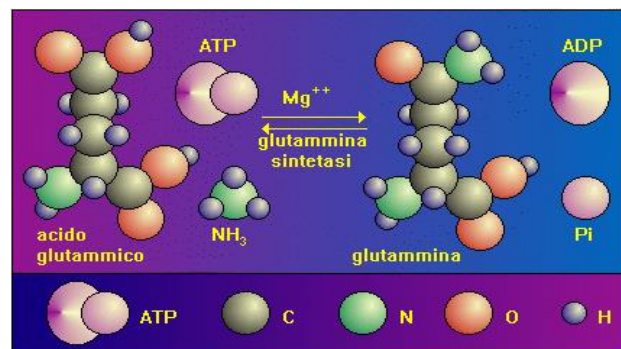


dalla pianta, né quando è assorbito dal suolo, né quando è prodotto attraverso processi richiedenti energia a partire da NO_3^- . L'ammonio è infatti tossico, poiché inibisce la produzione di ATP nei sistemi di trasporto di elettroni mitocondriale e fotosintetico.

Nei cloroplasti delle cellule vegetali è presente la glutammato deidrogenasi, un enzima zinco dipendente capace di utilizzare l'azoto ammoniacale in una reazione di amminazione riduttiva dell'acido 2-chetoglutarico per formare glutammato (Hirel et al., 2001).

Fino a poco tempo fa, questa reazione era ritenuta la via principale di organizzazione dell'azoto, ma esistevano forti dubbi a tal proposito.

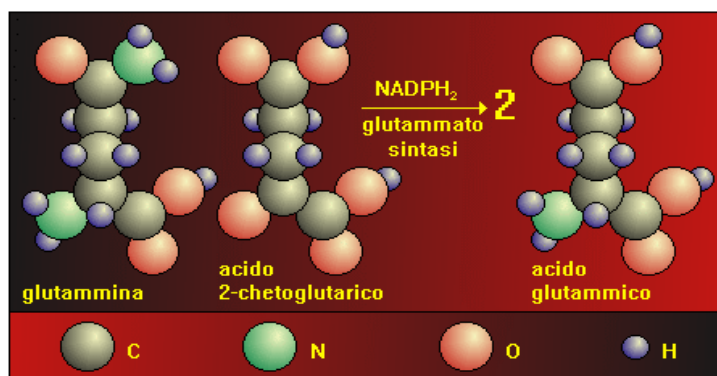
Fig. 5 Rappresentazione schematica dell'attività dell'enzima glutammina sintasi.



È infatti nota un'altra reazione enzimatica mediante la quale l'ammonio viene incorporato in un composto organico. La reazione è catalizzata dall'enzima glutammina sintetasi ed in essa il gruppo $-OH$ del carbossile più lontano dall'atomo di carbonio α del glutammato viene sostituito da un gruppo NH_2 derivato dall'ammonio con produzione di glutammina: La glutammina sintetasi plastidiale (della quale esiste anche una forma citosolica) è tipicamente una glicoproteina molto abbondante nel cloroplasto; ha una k_m molto bassa per NH_4^+ e utilizza l'ATP fotosintetico per la sua attività. Essa è l'enzima chiave dell'assimilazione dell'azoto nelle piante (Oaks, 1993). La sintesi della glutammina e quindi l'attività della glutammina sintetasi, è importante nella cellula vegetale per il processo di organizzazione dell'azoto e ha un fondamentale ruolo biosintetico: l'azoto ammidico di questo aminoacido può essere utilizzato dalla cellula per la sintesi di numerosi composti cellulari azotati, quali amminozuccheri, nicotinammide, istidina, triptofano, carbamil fosfato, arginina, nucleotidi. Dato che la glutammina sintetasi richiede il glutammato come substrato, il cammino biosintetico di questo composto concorre nel regolare l'attività di questo enzima.

Nel 1970 venne scoperto ad opera di Tempest, Meers e Brown un enzima, capace di sintetizzare il glutammato: la glutammato sintetasi (GOGAT). Esso trasferisce irreversibilmente il gruppo ammidico della glutammina al 2-cheto gruppo dell'acido 2-chetoglutarico, con la produzione di 2 molecole di glutammato (Srivastava and Singh, 1987; Robinson et al., 1990).

Fig. 6 Rappresentazione schematica dell'attività dell'enzima glutammato sintasi.



E' un trasferimento riduttivo, dipendente dalla ferridossina ridotta a livello di tessuti verdi e dal NADH o NADPH nella radice. La glutammina sintetasi, con il consumo di una molecola di ATP e l'intervento di una molecola di glutammato, incorpora dapprima una molecola di NH_4 sotto forma di azoto amidico della glutammina; successivamente la glutammato sintetasi, con l'intervento di ferridossina ridotta, opera il trasferimento riduttivo dell'azoto amidico della glutammina al 2-chetoglutarato. Esistono due tipi di GOGAT in funzione del fatto che usino come donatore di elettroni l'NADH o la ferrodossina ridotta (NADH-GOGAT e Fd-GOGAT). La NADH-GOGAT è localizzata principalmente nei plastidi non fotosintetici, ed è stato ipotizzato un suo ruolo nell'assimilazione primaria dell'ammonio, o nella riassimilazione dell'ammonio rilasciato durante il catabolismo degli amminoacidi (Lam et al., 1996). La Fd-GOGAT, al contrario, è localizzata per lo più nei cloroplasti, e la sua attività sembra essere collegata a processi legati alla fotosintesi e alla fotorespirazione.

L'organizzazione dell'ammonio attraverso l'attività della GS associata a quella della GOGAT costituisce un processo ciclico denominato ciclo GS/GOGAT, che porta al guadagno netto di una molecola di glutammato, in termini di ammonio organicato. Una delle due molecole di acido glutammico, infatti, rientra nel ciclo e viene trasformata in glutammina grazie alla GS. I due amminoacidi, glutammina e glutammato, agiscono da donatori di azoto organico in molte reazioni cellulari incluse la biosintesi di aspartato e asparagina (Givan, 1980; Lea, 1993). L'asparagina sintasi (AS) utilizza solitamente come substrati la glutammina, e l'aspartato, ma in alcuni casi, quando l'ammonio è presente in concentrazioni elevate e tossiche per la pianta, può utilizzare questo catione come substrato al posto della glutammina, fungendo quindi da detossificante. Questo enzima sembra essere regolato dallo stato carbonio-azoto dalla pianta (Lam *et al.*, 1994) e da segnali ambientali.

Fig. 7 Rappresentazione schematica dell'attività dell'enzima aspartatoaminotransferasi

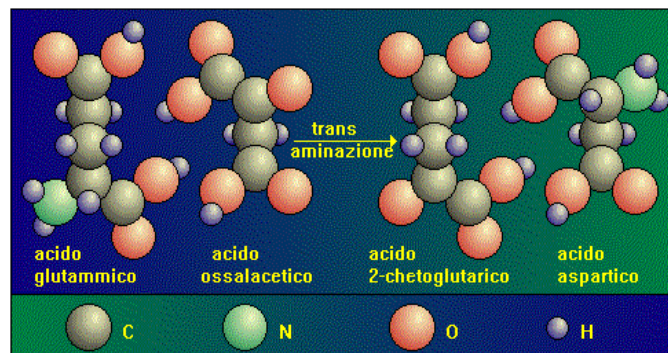
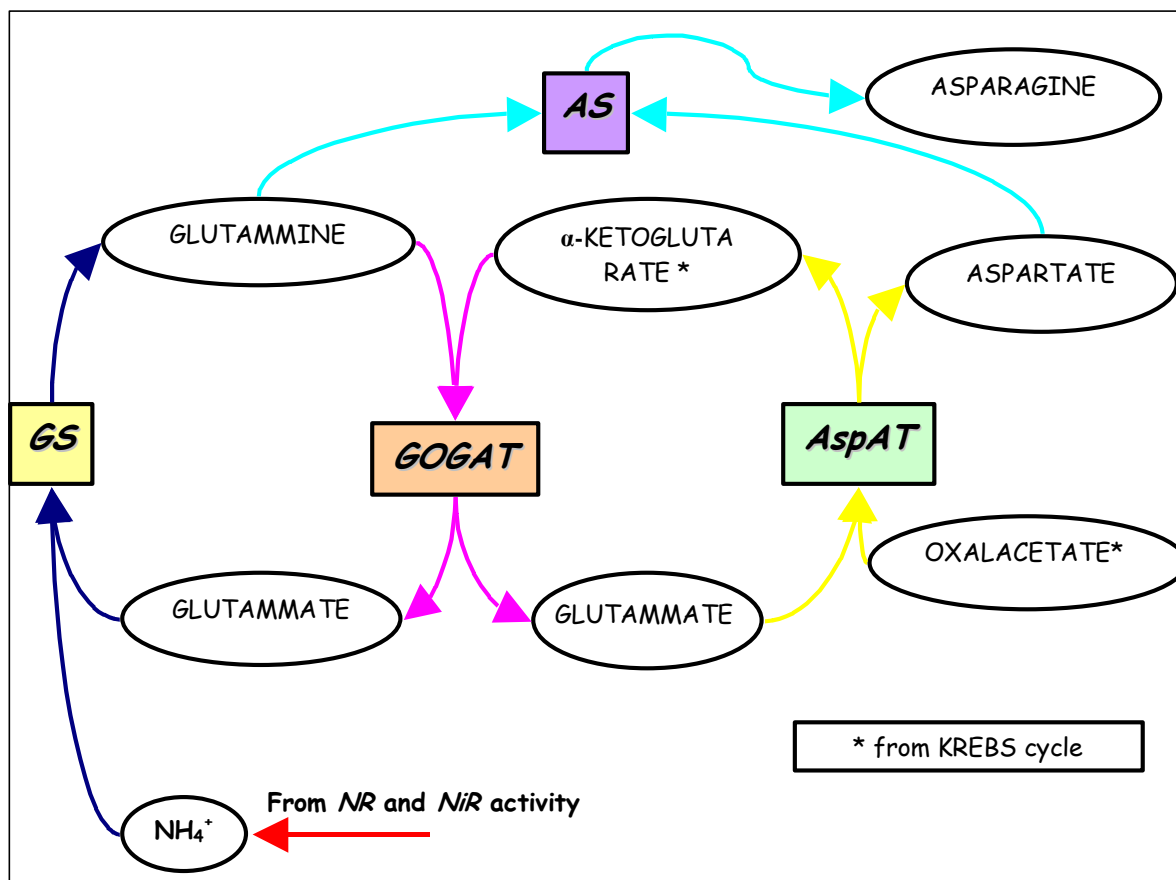


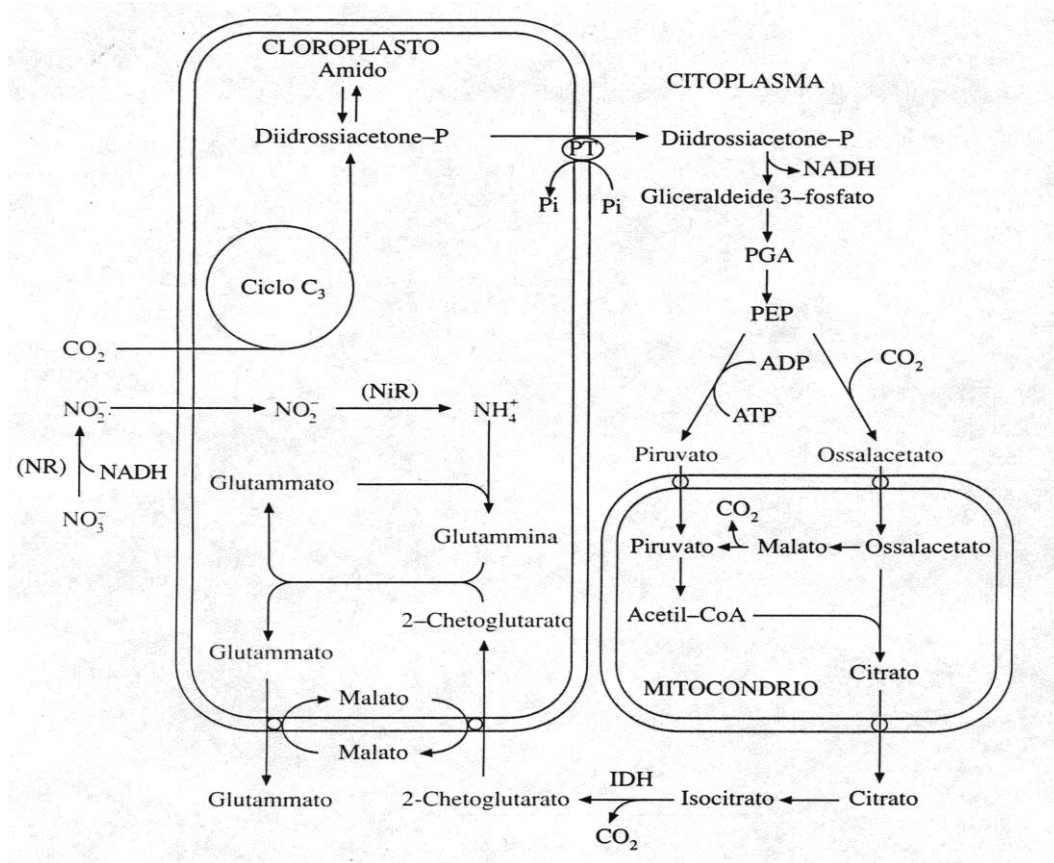
Fig. 8 Rappresentazione generale degli enzimi coinvolti nel metabolismo azotato



La biosintesi dell'aspartato coinvolge una reazione di transaminazione, catalizzata dall'enzima aspartato amminitransferasi (AspAT), che utilizza come substrati il glutammato e l'ossalacetato (dal ciclo degli acidi tricarbossilici) per formare α -chetoglutarato e aspartato appunto. Esistono diverse isoforme di AspAT, localizzate in diversi comparti cellulari (cloroplasti, cytosol, mitocondri, gliossisomi o perossisomi). È stato osservato che la compartimentazione delle isoforme determina anche una differenza di ruolo fra le stesse (Lam *et al.*, 1996), e questo è anche dimostrato dal fatto che le diverse isoforme rispondono in maniera diversa alle condizioni ambientali (Taniguchi *et al.*, 1995). L'AspAT è codificata da una famiglia multigenica. In *Arabidopsis* sono stati isolati cinque geni (*AAT1-5*) codificanti per le diverse isoforme di questo enzima, due dei quali codificano per l'isoforma citosolica (*AAT2* e *AAT4*), che si esprimono diversamente a seconda della localizzazione nella pianta e della specie (Shultz e Coruzzi, 1995). Il ruolo di questi enzimi,

e dei rispettivi prodotti, è quindi quello di “conduttori” di azoto nelle piante (Lam *et al.*, 1996).

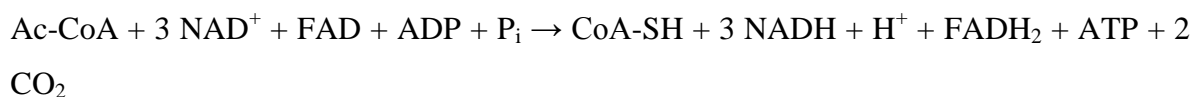
Fig. 9 Rappresentazione generale degli enzimi coinvolti nel metabolismo azotato.



3 IL METABOLISMO RESPIRATORIO

3.1 Il ciclo di Krebs

Il ciclo di Krebs avviene nei mitocondri delle cellule eucariote e nel citoplasma delle cellule procariote. I catabolismi glucidico e lipidico (attraverso la glicolisi e la beta ossidazione), producono acetil-CoA, un gruppo acetile legato al coenzima A. L'acetil-CoA costituisce il principale substrato del ciclo. Il suo ingresso consiste in una condensazione con ossalacetato, a generare citrato. Al termine del ciclo stesso, i due atomi di carbonio immessi dall'acetil-CoA verranno ossidati in due molecole di CO₂, rigenerando nuovamente ossalacetato in grado di condensare con acetil-CoA. La produzione rilevante dal punto di vista energetico, tuttavia, è quella di una molecola di GTP (immediatamente utilizzata per rigenerare una molecola di ATP), di tre molecole di NADH ed una di FADH₂. I cofattori ridotti (NADH e FADH₂), si comportano come intermedi ossido/riduttivi. Quando ridotti, essi sono in grado di trasportare elettroni ad energia relativamente alta (sottratti ai substrati ossidati ad esempio nella glicolisi o nello stesso ciclo di Krebs) fino alla catena respiratoria mitocondriale. Presso tale catena, essi vengono riossidati (a NAD⁺ e FAD) e cedono gli elettroni alla catena stessa, che sarà così in grado di rigenerare molecole di ADP ad ATP. La reazione netta è la seguente:



L'energia che si ricava dalla completa demolizione di una molecola di glucosio attraverso i tre diversi stadi della respirazione cellulare (glicolisi, ciclo di Krebs e catena di trasporto di elettroni), è idealmente di 36 molecole di ATP. In realtà sono 38 le molecole nette di ATP ad essere prodotte, ma 2 di esse vengono consumate per trasportare (tramite trasporto attivo) dal citoplasma alla matrice mitocondriale le 2 molecole di NADH + H⁺ prodotte nella glicolisi.

La velocità del ciclo di Krebs viene continuamente modulata per venire incontro alle esatte necessità energetiche della cellula. I siti primari di controllo sono gli enzimi allosterici, la isocitrato deidrogenasi e la α-chetoglutarato deidrogenasi. La isocitrato deidrogenasi è stimolata allostericamente dalla presenza di ADP, che aumenta l'affinità dell'enzima per il

substrato. I legami di isocitrato, di NAD^+ , di Mg_2^+ , e di ADP all'enzima sono mutualmente cooperativi in senso attivatore. Al contrario, il NADH inibisce l'enzima attraverso lo spiazzamento diretto di NAD^+ . Lo stesso ATP ha effetto inibitorio.

Il secondo sito di controllo del ciclo è posto presso la α -chetoglutarato deidrogenasi. Alcuni aspetti del controllo di questo enzima sono simili a quelli del complesso della piruvato deidrogenasi, come ci si può attendere dall'estrema omologia presente tra i due enzimi. La α -chetoglutarato deidrogenasi è dunque inibita dal succinil CoA e dal NADH, i prodotti della reazione che catalizza. La α -chetoglutarato deidrogenasi può anche essere inibita genericamente da un alto livello energetico presente nella cellula. Ciò significa che, in presenza di alti livelli di ATP, la cellula è in grado di ridurre l'efficienza del processo di produzione di energia, all'interno del quale il ciclo di Krebs ha una posizione centrale. In molti batteri, è controllato anche l'ingresso nel ciclo delle molecole a due atomi di carbonio. In essi, la sintesi di citrato da ossalacetato ed acetil CoA è la sede di una importante regolazione. L'ATP, infatti, è un inibitore allosterico della citrato sintasi. L'effetto concreto dell'ATP è quello di aumentare la K_m dell'enzima per l'acetil CoA. In questo modo, più ATP è presente nella cellula, meno Acetil CoA viene immesso nel ciclo.

Fig. 10 Rappresentazione generale delle vie metaboliche legate al ciclo di Krebs.

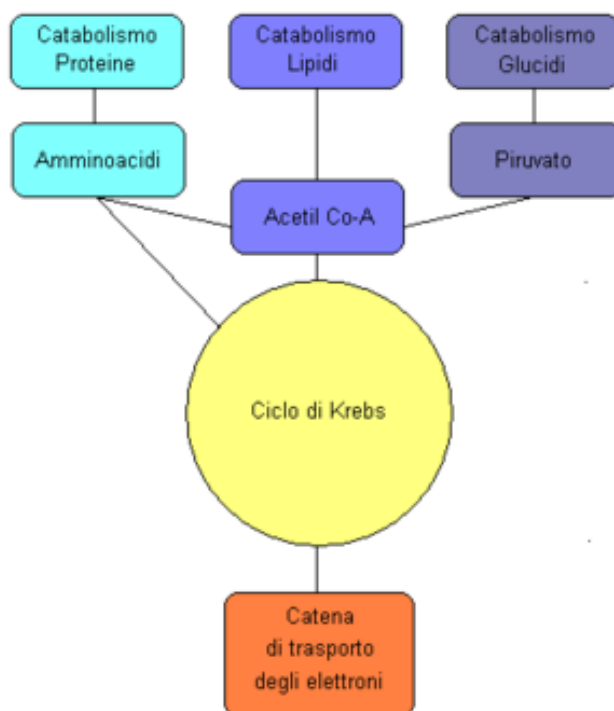
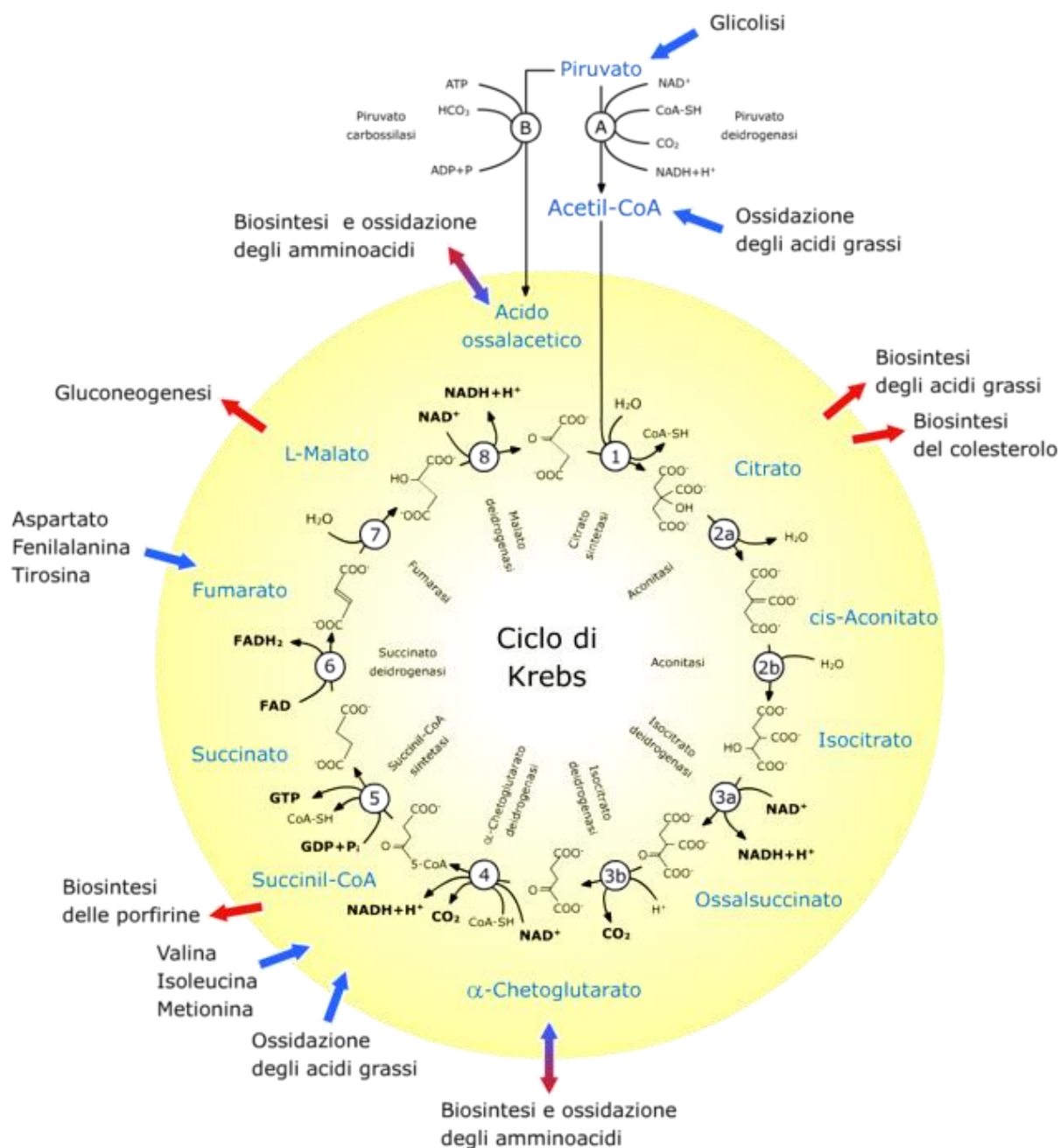


Fig.11 Rappresentazione generale del ciclo di Krebs.



4 INTERAZIONE FRA IL METABOLISMO DELL'AZOTO E IL METABOLISMO RESPIRATORIO

E' stato dimostrato lo stretto legame tra metabolismo dell'azoto e del carbonio, ed in particolare come i flussi di nitrato e ammonio siano integrati con il metabolismo degli acidi organici (Vance e Gantt, 1992). Infatti, l'incorporazione dell'ammonio, che avviene soprattutto a livello del ciclo GS/GOGAT, richiede disponibilità di scheletri carboniosi, ed in questo caso α -chetoglutarato. Questo acido organico viene originato nel ciclo di Krebs da parte dell'IDH, e nel ciclo dell'ammonio, da parte dell'AspAT. Proprio per la sua origine, l' α -chetoglutarato sembra essere un buon candidato come segnale metabolico nella regolazione della coordinazione del metabolismo dell'azoto e del carbonio (Lancien *et al.*, 1999; Hodges, 2002). Inoltre, la formazione di acido α -chetoglutarico, che è probabilmente limitante per l'attività della GOGAT, è regolata da una serie di fattori tra cui la disponibilità di nitrato e l'accumulo di ammonio (Lam *et al.*, 2006).

SCOPO DEL LAVORO

Una delle strategie utilizzabili per risolvere i problemi di inquinamento ambientale è rappresentata dall'utilizzo dei prodotti ad azione biostimolante, caratterizzati dalla capacità di promuovere risposte metaboliche rilevanti a basse dosi di applicazione.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di determinare l'attività biostimolante di un idrolizzato di farina di carne e di un idrolizzato di erba medica, forniti dalla ditta ILSA S.p.A. e ancora non in commercio.

L'azione biostimolante è stata valutata in termini di proprietà ormonosimili dei composti e, a seguito del trattamento con idrolizzati proteici di plantule di mais (*Zea mays* L.), in termini di crescita e di attività degli enzimi del metabolismo azotato come: nitrato riduttasi, nitrito riduttasi, glutammina sintetasi, glutammato sintasi, aspartato amminotrasferasi. Questi enzimi sono stati scelti poiché l'azoto da un lato rappresenta il principale nutriente minerale delle specie vegetali, dall'altro è responsabile, sotto forma di nitrato, dei più gravi fenomeni di eutrofizzazione delle acque.

Inoltre sono state valutate le attività di alcuni degli enzimi del ciclo di Krebs come: isocitrato deidrogenasi, citrato sintetasi e malato deidrogenasi. Queste analisi sono state di supporto ai risultati relativi al ciclo dell'azoto e hanno fornito la possibilità di monitorare lo stato metabolico della pianta.

Infine, è stato analizzato il profilo trascrizionale dei geni codificanti per la nitrato riduttasi e per alcuni degli enzimi del ciclo di Krebs, a seguito dell'applicazione dei suddetti idrolizzati proteici. In questo modo si è potuto valutare come le variazioni di attività enzimatiche trovino conferma a livello trascrizionale e di sintesi proteica.

MATERIALI E METODI

1 Gli idrolizzati proteici

1.1 Caratterizzazione chimica degli idrolizzati

Gli idrolizzati oggetto di studio, rientrano nel progetto “Attività fisiologica di fertilizzanti ad azione biostimolante”. Sono stati caratterizzati chimicamente utilizzando i metodi analitici ufficiali per i fertilizzanti (D.M 24 marzo 1986 e successive modifiche ed integrazioni Allegato IV/B al regolamento CE 2003/2003).

Brevemente, l'umidità è stata determinata dalla perdita di peso dei biostimolanti effettuata in stufa a 105°C per 24 ore, mentre le ceneri sono state ottenute dalla combustione del materiale in muffola a 550°C per due ore. La sostanza organica è stata ottenuta dalla detrazione del peso delle ceneri dal peso della sostanza secca.

Il pH è stato determinato sospendendo il campione in acqua nel rapporto (3/50, w/v), mentre la conducibilità elettrica specifica (CE) è stata misurata tramite conduttimetro sospendendo il campione in acqua in rapporto (1/10, w/v).

Il carbonio organico totale (TOC) è stato determinato tramite l'ossidazione con bicromato di potassio secondo il metodo Walkley e Black (1934) e l'azoto totale (TKN) mediante il metodo Kjeldahl (1883). L'azoto ammoniacale ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) è stato determinato utilizzando come estraente HCl diluito e successiva distillazione a vapore con ossido di magnesio.

L'azoto organico totale (TON) è dato dalla differenza tra TKN e $\text{NH}_4^+\text{-N}$. Fosforo, zolfo e metalli totali sono stati determinati tramite digestione con acido nitrico ultra puro (Merck, Darmstadt, Germania) e spettroscopia ad emissione atomica (Spectro CirosCCD, Kleve, Germania).

La quantità di aminoacidi liberi (FAA) è stata determinata utilizzando HCl 0,1 M come estraente e successiva analisi in RP-HPLC dopo derivatizzazione con FMOC. Il grado di idrolisi (DH) è stato calcolato sulla base del rapporto tra l'azoto α -aminico e l'azoto organico, mentre l'azoto α -amminico è stato determinato utilizzando il test spettrofotometrico dell' o-phthaldialdehyde (OPA)-N-acetylcysteine (NAC).

Il grado di racemizzazione è stato calcolato sulle forme chinali dell'alanina libera (D-Ala e L-Ala) in accordo con il metodo proposto ad Cavani et al. (2003).

1.2 Determinazione dell'attività auxinica

Per la determinazione dell'attività auxinica degli idrolizzati è stato seguito il metodo proposto da Audus (1972), che si basa sulla capacità dell'acido indolacetico di inibire la crescita delle radici delle piante.

L'attività ormonale è stata determinata in condizioni di assoluta sterilità, utilizzando scatole Petri, contenenti un filtro di carta (Whatman 91) imbibito con 1.6 ml della soluzione da esaminare su cui sono stati posti dieci semi di crescione (*Lepidum sativum* L.). I biostimolanti, con cui sono stati imbibiti i filtri, sono stati utilizzati a diverse diluizioni: tal quale (TQ), 10^{-2} TQ, 10^{-4} TQ e 10^{-6} TQ. In più, sono state preparate scatole Petri con filtri imbibiti di acqua bidistillata, che fungevano da controllo, e di acido indolacetico a diverse concentrazioni: 20 ppm, 10 ppm, 1 ppm, 0.1 ppm. Ogni determinazione è stata ripetuta due volte. Le piastre Petri, così preparate, sono state chiuse con parafilm e messe in cella buia alla temperatura costante di 25 °C per 48 ore.

Trascorso questo tempo, l'analisi consiste nella misurazione delle lunghezze radicali di ogni plantula. Le misure ottenute sono state confrontate con il controllo (acqua). L'attività auxinica è stata riscontrata quando il rapporto tra i dati del campione e quelli del controllo è risultata inferiore a 1 ed è stata determinata per confronto con i dati relativi alle tesi con le diverse concentrazioni di acido indolacetico.

1.3 Determinazione dell'attività giberellinica

Per la determinazione dell'attività gibberellinica dei biostimolanti è stato seguito il metodo di Audus (1972). In questo caso la prova si basa sulla capacità dell'acido gibberellico di incrementare l'allungamento dell'ipocotile di plantule di cicoria zuccherina di Trieste (*Cichorium intybus* L.).

I filtri nelle scatole Petri sono stati imbibiti con acqua (che funge da controllo), acido gibberellico (alle concentrazioni: 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm, 0.1 ppm), estratti organici (alle concentrazioni: TQ, 10^{-2} TQ, 10^{-4} TQ e 10^{-6} TQ). Sui filtri sono stati posti dieci semi di cicoria; le scatole Petri sono state chiuse con parafilm e messe in una cella buia a temperatura costante di 25 °C per 36 ore. Dopo questo tempo, è stato misurato l'ipocotile delle plantule e confrontato con quello riscontrato nel controllo (acqua) e nelle tesi con le diverse diluizioni di acido gibberellico. L'attività gibberellinica è stata riscontrata quando il

rapporto tra i dati del campione e quelli del controllo è risultata superiore a 1 ed è stata determinata per confronto con i dati relativi alle tesi con le diverse concentrazioni di acido gibberellico.

2 Allevamento delle plantule di mais

Tabella. 1 Condizioni di crescita delle plantule di mais.

	<i>H</i>	<i>T°C</i>	<i>U.R.%</i>
<i>Luce</i>	16	25	60
<i>Buio</i>	8	18	80

Per testare l'effetto dei biostimolanti sulle attività enzimatiche relative all'assimilazione dell'azoto, al pathway glicolitico e al ciclo respiratorio, plantule di mais (*Zea mays* L. DKc 5783, Dekalb, Italia) sono state allevate in coltura idroponica in moduli da 450 mL con soluzione nutritiva di Hoagland modificata (Tab. 2) (Hoagland and Arnon, 1950), con una densità di sei piante per modulo. L'ossigenazione necessaria alla respirazione delle radici è stata assicurata da insufflazione di aria attraverso gorgogliatori. La soluzione nutritiva è stata sostituita quotidianamente sia per evitare un'eccessiva acidificazione del mezzo di crescita sia per garantire alle radici la giusta concentrazione di nutrienti.

Tabella 2 composizione chimica della soluzione nutritiva (Hoagland).

Macronutrienti	mmol/L	microelementi	mmol/L
KH ₂ PO ₄	40	H ₃ BO ₃	4,6
KNO ₃	200	MnCl ₂ 4H ₂ O	0,9
Ca(NO ₃) 2H ₂ O	200	CaCl ₂ 2H ₂ O	0,036
MgSO ₄ 7H ₂ O	200	ZnCl ₂	0,086
FeNaEDTA 3H ₂ O	500	NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,011

Al dodicesimo giorno di allevamento dalla germinazione, alla soluzione nutritiva sono stati aggiunti i biostimolanti (erba medica e farina di carne) opportunamente disciolti alle

concentrazioni di 0 (C), 0,01 e 0,1 ml/l. La durata del trattamento è stata di 48 ore dopodiché le piante sono state prelevate ed analizzate.

2.1 Analisi HPLC sul contenuto in nitrati di foglie e radici e determinazione proteine totali

Sulle piante di mais allevate come descritto è stato valutato il contenuto di nitrati i foglie e radici. La preparazione del campione è avvenuta tramite l'estrazione con soluzione HCl 10 mM. 1 g di materiale vegetale è stato polverizzato in mortaio con N₂ liquido e successivamente omogeneizzato con il tampone di estrazione (rapporto di estrazione 1:5). Il materiale ottenuto è stato filtrato con garza a doppio strato e centrifugato a 17.000 g per 15 min a 4°C. L'estratto è stato ulteriormente filtrato con filtri da 0.22 µm (Millipore). Gli anioni NO₃⁻ sono stati rilevati mediante un sistema HPLC (Waters) costituito da una colonna a scambio anionico AS 4S-SC (Dionex), un soppressore e un detector a conduttività elettrica. Come eluente è stata usata una soluzione di bicarbonato di sodio e carbonato di sodio (NaHCO₃ 1.7mM/Na₂CO₃ 1.8 mM), mentre il flusso di esercizio è stato di 2 mL/min. Come riferimento è stata usata una retta di taratura ottenuta utilizzandosoluzioni standard di nitrato di sodio. Le proteine totali sono state determinate secondo il meto Bradford. I dati sono stati espressi in mg/gr di peso fresco

2.2 Attività enzimatiche monitorate

Gli effetti di questi idrolizzati proteici sull'assimilazione e metabolismo dell'azoto, e su respirazione sono stati valutati mediante l'analisi delle attività dei seguenti enzimi:

Tabella 3 Enzimi del ciclo di Krebs la cui attività è stata valutata

<i>Ciclo TCA</i>		
<i>CS</i>	<i>Citrato sintetasi</i>	<i>[E.C. 4.1.3.7]</i>
<i>IDH</i>	<i>NADP⁺-isocitrato deidrogenasi</i>	<i>[E.C. 1.1.1.42]</i>
<i>MDH</i>	<i>Malato deidrogenasi</i>	<i>[E.C. 1.1.1.37]</i>

Tabella 4 Enzimi del ciclo metabolico azotato la cui attività è stata valutata

<i>Assimilazione e metabolismo dell'azoto</i>		
<i>NR</i>	<i>Nitrato Reduttasi</i>	<i>[E.C. 1.7.1.1]</i>
<i>NiR</i>	<i>Nitrito Reduttasi</i>	<i>[E.C. 1.7.1.4]</i>
<i>GS</i>	<i>Glutamina sintetasi</i>	<i>[E.C. 6.3.1.2]</i>
<i>GOGAT</i>	<i>Glutammato sintetasi</i>	<i>[E.C. 1.4.1.14]</i>
<i>AS</i>	<i>Asparagina sintetasi</i>	<i>[E.C. 6.3.5.4]</i>
<i>AspAT</i>	<i>Aspartato AmminoTranferasi</i>	<i>[E.C. 2.6.1.1]</i>

2.3.1 Estrazione e determinazione dell'attività specifica degli enzimi NR e NiR

Per la determinazione della nitrato reduttasi, 1 g di foglie fresche è stato omogeneizzato in mortaio prerrefrigerato con 6 mL di tampone di estrazione (1 mM Na₂EDTA, 10 mM Cisteina cloridrato, 25 mM Potassio fosfato, BSA 3 %, pH 7.8 con KOH). L'omogeneizzato è stato quindi filtrato con 4 strati di garza e centrifugato per 15 min a 30.000 g a 4°C. L'attività specifica dell'enzima è stata saggiata secondo il metodo proposto da Lewis (1982) leggendo l'assorbanza a 540 nm. Lo stesso estratto enzimatico è stato utilizzato per la determinazione dell'attività dell'enzima NiR. L'attività di questo enzima è stata determinata secondo il metodo di Lillo (1984). La misura di queste attività è stata espressa in $\mu\text{M NO}_2^- \text{ g f.w.}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

2.2.2 Estrazione e determinazione dell'attività specifica dell'enzima GS

1 g di foglie fresche è stato omogeneizzato con 10 mL di tampone di estrazione (Imidazolo 50 mM, Na₂EDTA 1 mM, Cisteina cloridrato 10 mM, pH 7,2) in mortaio e pestello prerrefrigerati con N₂ liquido. L'omogeneizzato ottenuto è stato filtrato su quattro strati di garza e centrifugato per 10 min a 17.000 g a 4°C (Rhodes et al., 1975). L'attività dell'enzima è stata determinata utilizzando una miscela di reazione contenente Imidazolo-HCl (pH 7.0) 90 mM, idrossilammina 60 mM, Na₂HAsO₄ 20 mM, MnCl₂ 3 mM, ADP 0.4 mM, e glutamina 120 mM. A questa è stato aggiunto l'estratto enzimatico e la reazione è stata sviluppata per 15 min at 37 °C. La determinazione del γ -glutammilidrossammato è stata effettuata per via colorimetrica con l'aggiunta di una miscela contenente, in rapporto

1:1:1, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 10% (w/v) in 0.2 M HCl, acido tricloroacetico al 24% (w/v), e HCl al 50% (w/v). La densità ottica è stata registrata a 540 nm (Canovas et al., 1991). Per la determinazione delle isoforme della GS, l'estratto viene appesantito con del glicerolo e successivamente fatto correre su gel di acrilammide per due ore, al termine delle quali il gel viene fatto reagire con una soluzione di glutammina 0,1 N a pH 7. Dopo 20 minuti la reazione viene interrotta con una soluzione di FeCl_3 al 3%; tricloroacetico al 24, Hcl 6N. La quantificazione delle bande è stata eseguita usando il programma Image J Application version 1.32J (National Institutes of Mental Health, Bethesda, MD) .

2.2.3 Estrazione e determinazione delle attività specifiche degli enzimi GOGAT, AspAT e AS

Gli enzimi sono stati estratti da 1 g di materiale vegetale pestellando in mortaio, prerrefrigerato con N_2 , 3mL di tampone di estrazione (Hepes-NaOH pH 7.5 100 mM, MgCl_2 5 mM, e ditiotritolo (DTT) 1 mM. L'estratto è stato filtrato con 2 strati di garza e centrifugato a 20.000 g per 15 min. a 4°C.

L'attività dell'enzima GOGAT è stata determinata aggiungendo all'estratto una miscela di reazione contenente Hepes-NaOH 25 mM a pH 7.5, L- glutammina 2 mM, α -ketoglutarato 1 mM, β -NADH- NA_2 0.1 mM e Na_2EDTA 1 mM. L'attività specifica è stata valutata monitorando l'ossidazione del NADH a A_{340} (Avila et al., 1987).

Anche l'attività dell'AspAT è stata misurata per via spettrofotometrica monitorando l'ossidazione del NADH a 340 nm a 30 °C. Il mezzo di reazione conteneva Tris-HCl (pH 7.8) 100 mM, L-aspartato 240 mM, pirossidal-fosfato 0.11 mM, β -NADH- Na_2 0.16 mM, 0.93 kU di MDH, 0.42 kU di lattato deidrogenasi (LDH) e 2-oxoglutarato 12 mM (Rej and Horder, 1984). Per entrambi gli enzimi l'attività è stata espressa in $\mu\text{M g f.w.}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

L'attività dell'enzima AS è stata saggiata seguendo il metodo proposto da Patterson (1968), aggiungendo all'estratto una miscela di reazione contenente HEPES 50 mM pH 7.75, Gln 10 mM, ATP 30 mM, aspartato 10 mM, MgCl_2 10 mM, DTT 2 mM, e Na_2EDTA 0.1 mM, e incubando il tutto a 30°C per 60min. La reazione è stata bloccata aggiungendo acido sulfosalicilico. Il surnatante è stato quindi centrifugato e portato a pH 7.0 con NaOH, e aliquotato. L'attività è stata monitorata indirettamente, attraverso la quantificazione e la separazione di Asp e Asn con HPLC di OPA derivativa ed è stata espressa in nmoli di Asn prodotte per g f.w.⁻¹ min⁻¹.

2.2.4 Estrazione e determinazione delle attività specifiche degli enzimi del ciclo respiratorio

Per saggiare gli enzimi CS, NADP⁺IDH e MDH le foglie sono state omogeneizzate in mortaio prerrefrigerato con N₂ liquido utilizzando un tampone di estrazione TRIS HCl (pH 8.2) 100 mM, contenente β-Mercaptoetanololo (Sigma) 5 mM, Na₂EDTA 1 mM, e glicerolo al 10% (w/v). L'omogeneato è stato filtrato e centrifugato per 15 min a 4°C.

La citrato sintetasi è stata saggiata aggiungendo al tampone Tris-HCl 0.1M (pH 8.0), 1 mM acido ossalacetico 0.17, acetyl-CoA 0.2 mM, e l'estratto (Bergmeyer *et al.*, 1983).

L'attività dell'enzima NADP⁺-Isocitrato Deidrogenasi è stata determinata aggiungendo all'estratto una miscela di reazione contenente tampone imidazolo (pH 8.0) 88 mM, MgCl₂ 3.5 mM, β-NADH-Na₂ 0.41 mM e isocitrato-sale sodico 0.55 mM. Il saggio è stato condotto a 25°C (Goldberg e Ellis, 1983). La malato deidrogenasi è stata saggiata a 25°C utilizzando una miscela di reazione con tampone fosfato (pH 6.7) 94.6 mM, β-NADH-Na₂ 0.2 mM, ossalacetato 0.5 mM e MgCl₂ 1.67 mM (Bergmeyer *et al.*, 1986).

Le attività enzimatiche della via glicolitica e del ciclo respiratorio sono state determinate monitorando le variazioni di assorbanza a 340 nm per valutare l'ossidazione di NADH o la riduzione di NAD(P)⁺. L'attività specifica dell'enzima CS è stata determinata a 25°C misurando la riduzione di acetyl-CoA a 232 nm. Per tutte le è stato utilizzato lo spettrofotometro JASCO V-530 UV/VIS.

Per ogni prova enzimatica sono state svolte cinque repliche.

2.3 Microscopio elettronico a scansione (SEM)

Le radici delle piante sono preparate per l'analisi (SEM, Stereoscan 250; Strumenti di Cambridge, Cambridge Regno Unito) trattando una porzione di radice con gluteraldeide (6%) in buffer di cacodilato (pH 6.9). Successivamente le radici vengono immerse nella stessa soluzione di buffer con OsO₄ (1%) per 2 ore a 4° C e disidratate con diverse diluizioni di acetone.

2.4 Estrazione RNA totale da radici e foglie

Per l'estrazione del RNA sono stati utilizzati campioni di foglia e di radice mantenuti in freezer a -80°C. Il materiale vegetale, pesato in aliquote di 1 g (f.w.), è stato finemente macinato in un mortaio sterile in presenza di azoto liquido. L'RNA totale è stato isolato

usando il kit “*Nucleon, extraction & purification*” (Amersham-Pharmacia), seguendo le indicazioni del produttore. La vetreria e le soluzioni utilizzate sono state trattate seguendo le procedure standard indicate da Sambrook *et al.* (1989), in modo da evitare contaminazioni con RNAsi.

La quantità di RNA totale ottenuto è stata determinata per via spettrofotometrica, come indicato da Sambrook *et al.* (1989) e la qualità della preparazione è stata valutata mediante comparazione delle letture spettrofotometriche a 230, 260 e 280 nm ed analisi elettroforetica, su gel di agarosio all’1%, per verificare l’assenza di degradazione.

2.4.1 Trattamento con DNasi

50 µg di RNA totale sono stati trattati con 10 u di Dnasi RQ1 (Promega Italia) ponendo i campioni in bagnetto termostato a 37°C per mezzora secondo quanto riportato da Sambrook *et al.* (1989). Al termine della reazione i campioni sono stati trattati con fenolo-cloroformio (rapporto 3:1) e successivamente l’RNA è stato precipitato come indicato in Sambrook *et al.* (1989). I pellet così ottenuti sono stati risospesi in 20 µl di H₂O milliQ sterile e la quantità di RNA valutata come descritto precedentemente.

2.4.2 Sintesi del cDNA

La sintesi del cDNA è stata effettuata partendo da 5 µg di RNA totale, dopo trattamento con DNasi, e utilizzando 200 u di MMLV *Reverse Transcriptase* (Promega Italia) in reazioni da 20 µl finali, secondo quanto descritto da Sambrook *et al.* (1989).

2.4.3 RT-PCR semiquantitativa (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*)

L’analisi dei trascritti è stata condotta sul cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione dell’RNA attraverso l’uso di RT-PCR, con i *primer* specifici riportati in tabella 7.6.

In tutte le analisi RT-PCR effettuate è stato utilizzato 1 µl di cDNA, 0,025 u/µl di Taq-polimerasi (Amersham-Pharmacia), in un volume finale di 20 µl.

Per ogni tesi è stato considerato un numero di cicli variabile tra 15 e 35, in modo da scegliere quello corrispondente alla fase esponenziale dell’amplificazione (tabella 6.6.).

E’ stato utilizzato un termociclatore *Gen Amp PCR system 9700* (Applied-Biosystems) e i parametri di ogni ciclo, sono stati condotti con i seguenti parametri:

- fase di denaturazione di 30 s a 95°C, fase di *Annealing* di 1 min a temperatura variabile (vedi tab. 7.6), fase di estensione di 30 s a 72°C, il tutto preceduto da un periodo di denaturazione a 95°C per 5 min e da una estensione finale di 7 min a 72°C.

Inoltre, in modo da normalizzare i risultati ottenuti, è stato usato come gene costitutivo di riferimento il *18s*, i cui *primer* sono riportati in tabella 6.6. Per aumentare l'attendibilità dei risultati, le reazioni di PCR sono state compiute su cDNA ottenuto da due differenti estrazioni da piante di due allevamenti diversi, e ripetute almeno tre volte per ciascun cDNA.

I prodotti di PCR sono stati purificati dal gel e successivamente sequenziali in modo da verificarne la specificità di amplificazione.

2.4.4 Purificazione del DNA da gel agarosio

Le bande contenenti i diversi amplificati sono state recuperate dal gel usando un bisturi sterile e trattate con i tamponi contenuti nel kit "QIAquick Gel extraction" (Quiagen, Germany) seguendo le indicazioni del produttore. La quantificazione del DNA ottenuto è stata eseguita per via spettrofotometrica come indicato da Sambrook et al. (1989) e su gel agarosio 0,8% (w/v).

Tabella 5: Primer per RT-PCR, NCBI GenBank Accession Number.

Gene	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
NR	GACGCCATCCACTACGACATG	ACCTTGACGAGGAGGTCCAAGT
MDH	GCCAGATTTCTGAGAGACTTAATGTCCA	TCGAGGCATGAGTAAGCAAGCGTCTT
IDH	AAACTCGAGGCTGCTTGCGTTGAGA	ATAATTAGCTTGCATCGAACTGCGG
CS	GTTTGGTCATGGAGTTCTGCGTAA	GGAGGTACAACCTCATACTTGGACA
AS	CATCATTGAGCTCTCGCGCAGGTTAC	GGGGGAAATGTTATGAAGCGTTCACAA
Zm	TGTTTCGCCTGAAGATCACCCCTGTG	TGAACCTTTCTGACCCAATGGTGATGA

3 Analisi statistica

Tutti i dati presentati risultano dalla media di tre repliche. Le medie sono state differenziate usando il test di Student-Newman-Keuls (Sokal e Rohlf, 1969) e sono stati accettati come statisticamente differenti valori con $p < 0.05$.

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate tramite il programma SPSS© per Windows Ver 11.5.

I dati riportati, sono stati determinati dalla valutazione di 40 allevamenti di mais in cella climatica.

Ogni allevamento era formato da 20 moduli con 15 piante ciascuno, replicato 4 volte.

Nel corso di tre anni sono state analizzate 4800 plantule.

.

RISULTATI

1 Caratterizzazione chimica dei biostimolanti

Come si evince dalla tabella 6 i due prodotti differiscono per il contenuto in ceneri, in carbonio organico, azoto totale e macro e micro elementi. In particolare, il prodotto a base di farina di carne evidenzia un maggior contenuto di carbonio organico, 24,3% rispetto a 18,8% della farina di medica; di azoto totale 7,09% rispetto a 2,29%, di zolfo 0,4% rispetto a 0,13% e di P 0,3% rispetto a 0,05%.

Tabella 6. Caratterizzazione chimica dell'idrolizzato di erba medica (EM) e farina di carne (FC). I valori ottenuti sono la media di 3 repliche e l'errore standard $\leq 5\%$ della media.

	unità	EM	FC
umidità	%	43,5	45,8
ceneri	%	18,9	7,08
S.O.	%	37,6	47,1
pH		5,9	8
EC _w	DS m ⁻¹	16	8,1
TOC	%	18,8	24,3
TKN	%	2,29	7,09
NH ₄ ⁺ - N	%	0,38	0,14
NO ₃ ⁻ - N	%	0,03	0,02
C/N ratio	%	8,1	3,42
Total Na	%	0,19	0,77
Total S	%	0,13	0,4
Total K	%	1,65	1,59
Total Ca	%	4,16	1,03
Total Mg	mg Kg ⁻¹	0,08	0,05
Total P	mg Kg ⁻¹	0,01	0,03
Total Fe	mg Kg ⁻¹	38	9,1
Total Cd	mg Kg ⁻¹	< 0,1	< 0,1
Total Zn	mg Kg ⁻¹	103	12,4
Total Cu	mg Kg ⁻¹	18	5,4
Total Mn	mg Kg ⁻¹	65	0,2
Total Ni	mg Kg ⁻¹	1,3	0,3
Total Pb	mg Kg ⁻¹	0,3	8,4
Total Cr	mg Kg ⁻¹	24	8,7

E' stato determinato il contenuto di aminoacidi liberi, che presenta un'ampia variabilità (tab 7): l'idrolizzato di medica presenta ad esempio uno 1,80 ‰ di valina a uno 0,7 ‰ di acido aspartico. Questo ultimo aminoacido è presente in quantità maggiore nell'idrolizzato di carne (4,25 ‰), mentre l'isoleucina è l'aminoacido presente in minor quantità di quelli determinabili.

Tab 7 Contenuto di aminoacidi liberi, negli idrolizzati di EM (erba medica) e FC (farina di carne) espressi in g kg-1. I valori ottenuti sono la media di 3 repliche e l'errore standard sempre $\leq 5\%$ della media. LQ = non quantificati

Amminoacido	EM	FC
Asp	0.77	4.25
Glu	0.94	1.84
Ala	5.17	5.50
Arg	< LQ	1.64
Phe	1.29	1.13
Gly	2.95	1.55
Hyp	< LQ	0.92
Ile	0.71	0.63
His	0.82	3.41
Leu	1.56	2.22
Lys	1.30	1.78
Met	< LQ	1.56
Pro	1.04	1.45
Ser	< LQ	1.96
Tyr	0.81	1.17
Trp	0.01	< LQ
Thr	< LQ	1.10
Val	1.80	0.98
totale	19.16	33.09

Dai dati riportati in tabella 8 possiamo notare come il contenuto di N amminico nell'idrolizzato di erba medica sia la metà di quello presente dell'idrolizzato di carne, il grado di idrolisi segue invece un trend esattamente contrario.

Tabella 8 contenuto di N α -amminico, negli idrolizzati di EM (erba medica) e FC (farina di carne) Grado di idrolisi = Azoto α -amminico / Azoto Organico. I valori ottenuti sono la media di 3 repliche e l'errore standard sempre $\leq 5\%$ della media

FC	Azoto α -amminico	mg N g ⁻¹	12,5 \pm 0,1
	Grado di idrolisi	%	18,0
EM	Azoto α -amminico	mg N g ⁻¹	5,59 \pm 0,7
	Grado di idrolisi	%	29,3

Tabella 9 Grado di racemizzazione degli idrolizzati di EM (erba medica) e FC (farina di carne). Grado di racemizzazione = 2 (D-Ala)/(D-Ala+L-Ala)*100. I valori ottenuti sono la media di 3 repliche e l'errore standard sempre $\leq 5\%$ della media

FC	Grado di racemizzazione	%	61,0 \pm 2,0
EM	Grado di racemizzazione	%	67,4 \pm 0,9

Il grado di racemizzazione dei due idrolizzati come possiamo vedere in tabella 9 non presenta grandi differenze, anche se è leggermente maggiore nell'idrolizzato di medica. Le dimensioni molecolari dei peptidi che costituiscono un idrolizzato proteico sono distribuite all'interno di un intervallo piuttosto ampio, generalmente di tipo unimodale.

Tabella 10 Masse molecolari dell'idrolizzato di erba medica (EM) e farina di carne (FC). I valori ottenuti sono la media di 3 repliche e l'errore standard sempre $\leq 5\%$ della media

M_p	kDa	3,1	M_p	kDa	2,8
M_n	kDa	2,4	M_n	kDa	2,1
M_w	kDa	6,3	M_w	kDa	4,6
M_z	kDa	13,6	M_z	kDa	8,2
$P_{w/n}$		2,6	$P_{w/n}$		2,1
$P_{z/w}$		2,1	$P_{z/w}$		1,8

M_p = massa molecolare del picco di massima intensità (moda delle massa molecolare);
 M_n = numero medio della massa molecolare; M_w = peso medio della massa molecolare;
 M_z = valore z della media della massa molecolare; $P_{w/n} = M_w/M_n$ e $P_{z/w} = M_z/M_w$.

2 Attività ormono-simile

I risultati ottenuti applicando il test Audus (1972) ai due idrolizzati sono riassunti nella figura 14. Il trattamento con i due prodotti, induce un allungamento dell'ipocotile di cicoria in maniera proporzionale alla concentrazione usata, seguendo lo stesso trend dell'acido giberellico. Per quanto riguarda l'attività auxino-simile, il confronto con i risultati ottenuti con le varie concentrazioni di IAA evidenzia come i due biostimolanti presentino una blanda attività.

Fig 14. Rappresentazione dei dati ottenuti applicando il test Audus all'idrolizzato di erba medica (EM) 1 e farina di carne (FC) 2. I valori ottenuti sono la media di 3 repliche. Valori seguiti dalla stessa lettera non si differenziano a $p \leq 5\%$ secondo il test di Student-Newman-Keuls.

1		
Trattamento	concentrazione	lunghezza fusticino (mm)
Controllo	-	10.8 c
GA	0.1 mg L ⁻¹	11.9 b
GA	1.0 mg L ⁻¹	12.4 b
GA	10 mg L ⁻¹	12.8 ab
GA	100 mg L ⁻¹	13.5 a
EM	0.01 mL	11.9 b
EM	0.1 mL	12.2 b
EM	1 mL	13.2 a
FC	0.01 mL	11.9 b
FC	0.1 mL	12.2 b
FC	1 mL	12.4 b

Trattamento	concentrazione	lunghezza radice (mm)
Control	-	21,1 e
IAA	0.01 mg L ⁻¹	18 c
IAA	0.1 mg L ⁻¹	12,4b
IAA	1 mg L ⁻¹	6,6 a
IAA	10 mg L ⁻¹	4,8 a
EM	0.01 mL	21 e
EM	0.1 mL	19,4 d
EM	1 mL	18,8 d
FC	0.01 mL	21,2 e
FC	0.1 mL	19,5 d
FC	1 mL	18,2 c

3 Parametri di crescita, macro e micro elementi

Dalla tabella 11 si evince come, sia nella parte epigea che in quella ipogea, ci sia un incremento dei pesi freschi di foglie e radici rispetto al controllo che va dal 5% nei trattati con FC 0,1 ml/l al 35% nei trattati con EM 1ml/l in radici. Nelle foglie l'incremento è minore e va dal 4% al 12%.

Tabella 11. Pesi freschi di foglie e radici di piantule di mais dopo trattamento con l'idrolizzato di erba medica (EM) e farina di carne (FC) I valori ottenuti sono la media di 3 repliche. Valori seguiti dalla stessa lettera non si differenziano a $p \leq 5\%$ secondo il test di Student-Newman-Keuls..

Trattamenti	ml/l	Radice		Foglie	
		g	%	g	%
Controllo	-	0.107a	100	5.638b	100
EM	0,1	0.144c	135	5.919ab	105
EM	0,01	0.128b	120	6.258a	111
FC	0,1	0.137c	128	5.863ab	104
FC	0,01	0.112a	105	6.314a	112

Una ulteriore evidenza dell'attività biologica dei prodotti testati è fornita anche dalle modificazioni indotte dai biostimolanti sull'architettura dell'apparato radicale; le piante trattate presentano infatti, radici morfometricamente diverse dal controllo, come si evince dalla figura 13.

Fig. 13 Esempi di radici di mais trattate con biostimolanti a diverse concentrazioni.



L'efficacia dei biostimolanti nel modulare il trasporto dei macroelementi è stata ulteriormente approfondita valutandone il contenuto in foglie e radici (tabella 12 e 13 rispettivamente). Sia a livello radicale che fogliare, si osserva un incremento del contenuto di elementi ed in particolare magnesio, manganese, e ferro sono risultati superiori rispetto al controllo. Il contenuto di rame passa da valori di 0,04 ppm (controllo) a valori di 0,23 ppm nelle foglie. Nelle radici l'incremento è ancora maggiore con valori che passano da 0,05 per il controllo ad 11 ppm nelle piante trattate con 0,1 ml/l.

Tabella 12 Contenuto di elementi in foglie di mais trattato con gli idrolizzati di EM (erba medica) e FC (farina di carne). I valori ottenuti sono la media di 3 repliche. Valori seguiti dalla stessa lettera non si differenziano a $p \leq 5\%$ secondo il test di Student-Newman-Keuls..

Trattamento	Mn (ppm)	Mg (ppm)	Cu (ppm)	Fe (ppm)
controllo	2.1d*	37d	0.04d	3.12f
EM 0,01ml/l	2.5c	39c	0.05d	9.56a
EM 0,1ml/l	3.5b	42bc	0.12c	4.13d
FC 0,01 ml/l	4.0a	46b	0.16b	4.40d
FC 0,1ml/l	2.0d	54a	0.23a	7.56b

Tabella 13 Contenuto di elementi in radici di mais trattato con gli idrolizzati di EM (erba medica) e FC (farina di carne). I valori ottenuti sono la media di 3 repliche. Valori seguiti dalla stessa lettera non si differenziano a $p \leq 5\%$ secondo il test di Student-Newman-Keuls..

Trattamento	Mn (ppm)	Mg (ppm)	Cu (ppm)	Fe (ppm)
controllo	12b*	224e	0.05e	N.D.
EM 0,01ml/l	55b	1134d	1e	216a
EM 0,1ml/l	86a	1455c	6d	104c
FC 0,01 ml/l	90a	1520c	7c	110c
FC 0,1ml/l	80a	2402a	11a	173b

Tabella 14 Contenuto di nitrati in radici di plantule di mais trattato con gli idrolizzati di EM (erba medica) e FC (farina di carne) I valori ottenuti sono la media di 3 repliche. I valori ottenuti sono la media di 3 repliche. Valori seguiti dalla stessa lettera non si differenziano a $p \leq 5\%$ secondo il test di Student-Newman-Keuls..

Trattamento	NO ₃ ⁻		PO ₄ ³⁻		SO ₄ ²⁻	
	µmoli g ⁻¹ pf	%	µmoli g ⁻¹ pf	%	µmoli g ⁻¹ pf	%
controllo	73.710a	100	13.382a	100	36.281a	100
EM 0,1 ml/l	11.13d	15	12.51b	93	19.448bc	54
EM 0,01 ml/l	6.98e	10	12.04b	90	12.743d	35
FC 0,1 ml/l	6.96e	10	10.70c	80	7.256e	20
FC 0,01 ml/l	50.34b	68	8.34d	62	18.827c	52

Dall'analisi dei risultati si evince che il contenuto in macroelementi delle radici (tabella 14) e delle foglie (tabella 15) è ridotto rispetto al controllo. In particolare il contenuto di nitrato appare decisamente inferiore (-90%) nelle radici trattate. Nelle foglie il calo è compreso tra il 35 ed il 50%. Il fosforo è l'elemento meno influenzato dal trattamento a livello radicale (tabella 14) con decrementi a livello fogliare (-30%). Infine lo zolfo mostra forti cali a seguito dei trattamenti in radici che, però, corrispondono a diminuzioni minori in foglie. In tab. 16 è riportato il contenuto di proteine totali del quale si evince come i trattamenti portino ad un incremento delle proteine in tutti i casi, tranne nelle piante trattate con FC a 0,01 ml/l in radici e 0,1 ml/l nelle foglie.

Tabella 15 Contenuto di nitrati in foglie di plantule di mais trattate con gli idrolizzati di EM (erba medica) e FC (farina di carne) I valori ottenuti sono la media di 3 repliche. Valori seguiti dalla stessa lettera non si differenziano a $p \leq 5\%$ secondo il test di Student-Newman-Keuls..

Trattamento	NO ₃ ⁻		PO ₄ ³⁻		SO ₄ ²⁻	
	µmol g ⁻¹ pf	%	µmol g ⁻¹ pf	%	µmol g ⁻¹ pf	%
controllo	1.937a	100	8.396a	100	6.989ab	100
EM 0,01ml/l	1.258 b	65	6.06cd	72	6.633b	95
EM 0,1ml/l	0.976 b	50	6.49bc	77	5.509c	79
FC 0,01 ml/l	1.171b	60	5.625d	67	5.591c	80
FC 0,1ml/l	1.201b	62	6.335c	75	5.604c	80

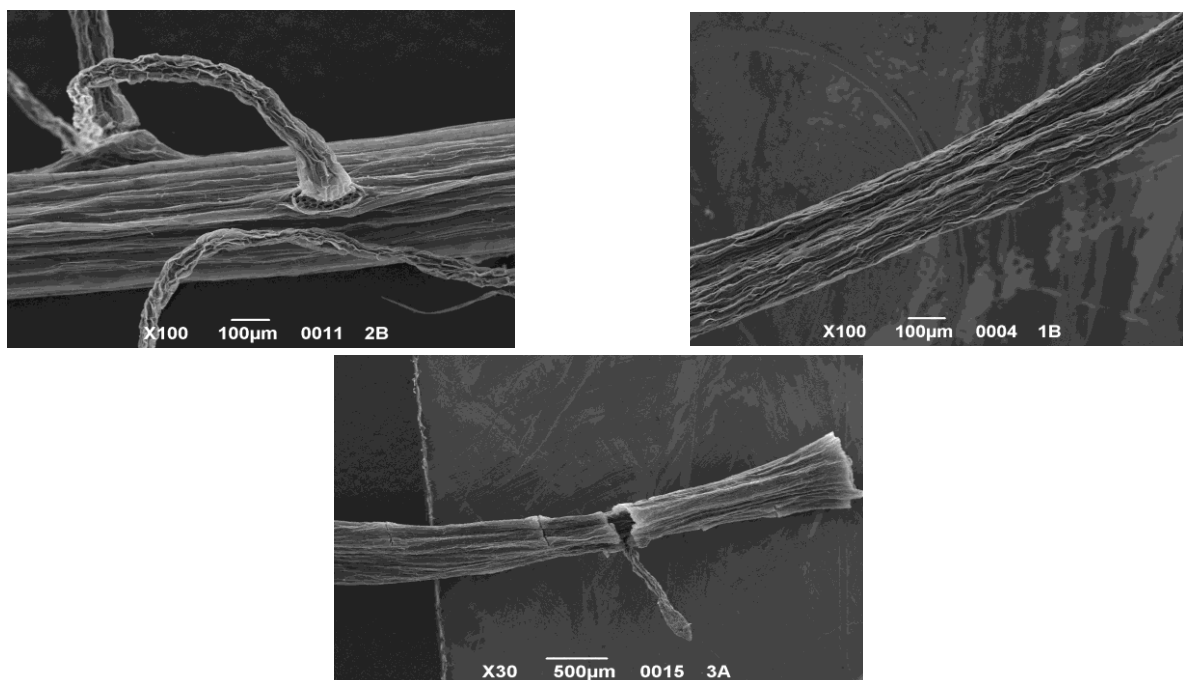
Al fine di caratterizzare ulteriormente gli effetti dei biostimolanti sulla crescita e la morfologia radicale delle plantule di mais sono state eseguite alcune foto al SEM

Tabella 16 Contenuto di proteine totali in foglie e in radici di plantule di mais trattate con gli idrolizzati di EM (erba medica) e FC (farina di carne) I valori ottenuti sono la media di 3 repliche.

TRATTAMENTO	mg/gpf	% stimolazione
controllo r	1,954	100
EM 0,01 r	1,981	101
EM 0,1 r	1,967	101
FC 0,01 r	1,788	92
FC 0,1 r	1,954	100
controllo f	2,128	100
EM 0,01 f	2,106	99
EM 0,1 f	2,470	116
FC 0,01 f	2,290	108
FC 0,1 f	1,878	88

(microscopio elettronico a scansione) (figura 14). Questa tecnica, pur rappresentando una valida metodologia ha rivelato in questo caso risultati di difficile interpretazione. Ulteriori analisi sono auspicabili anche con l'utilizzo di altre tecniche microscopiche come, ad esempio, l'ESEM (microscopio elettronico a scansione ambientale).

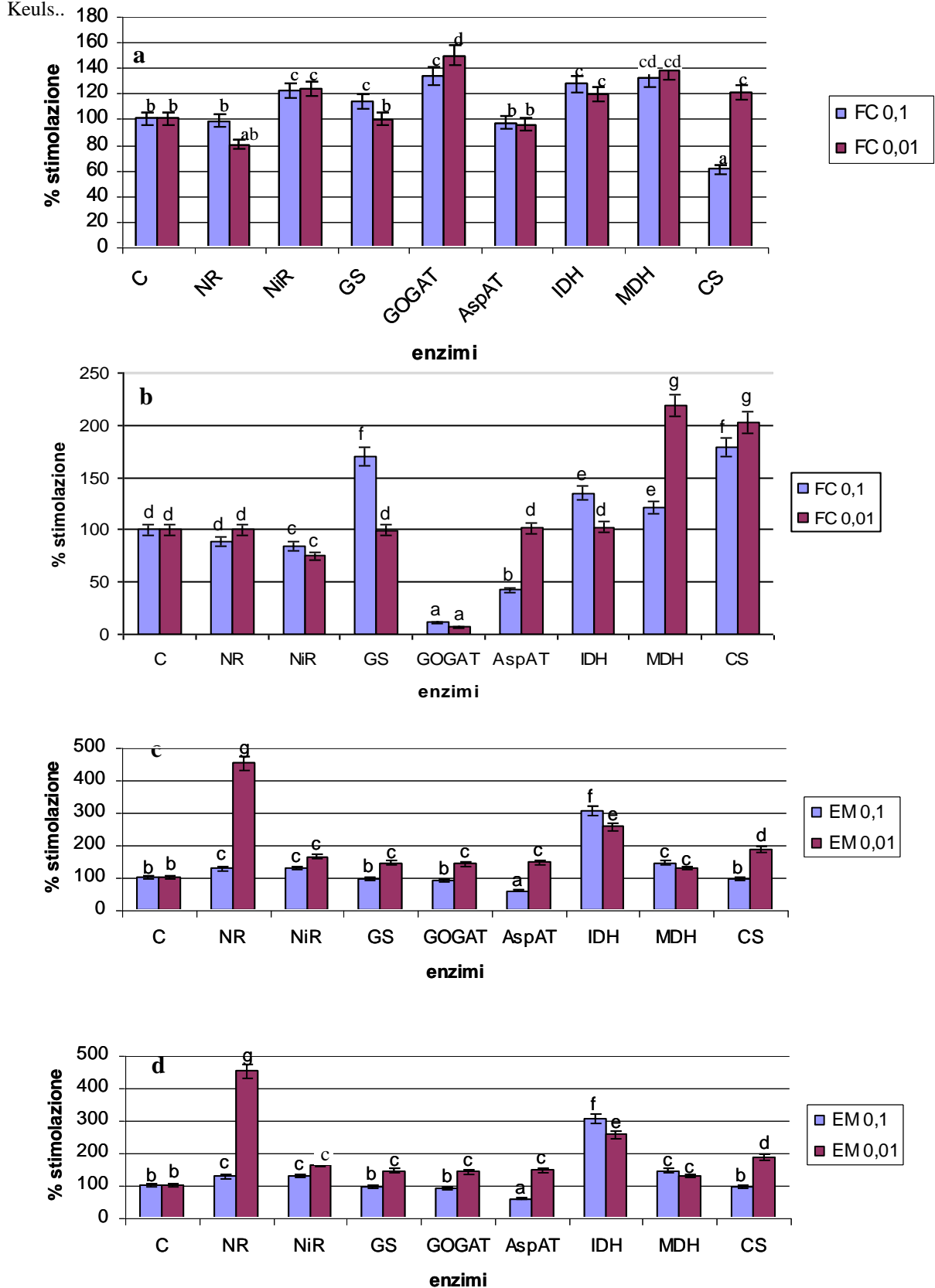
Fig 14. Foto al microscopio elettronico a scansione di porzioni di radici da piante controllo (1B), trattate con l'idrolizzato di erba medica (2B) e con l'idrolizzato di farina di carne (3A).



4 Attività enzimatiche saggiate

Lo studio riguardante l'attività dei due prodotti biostimolanti è quindi proseguito con la determinazione delle diverse attività enzimatiche, saggiate su piante di Mais. Dall'analisi della figura 15 a si evince che a livello fogliare, l'idrolizzato di carne stimola l'attività di NiR, GOGAT, IDH ed MDH ad entrambe le concentrazioni, mentre vi è una stimolazione alla concentrazione di 0,1 ml/l dell'attività di GS e alla concentrazione di 0,01 della CS. A livello radicale (graf 15 b) vi è una stimolazione dell'attività di GS e IDH alla concentrazione di 0,1 ml/l, e di MDH e CS ad entrambe le concentrazioni. Per quanto riguarda l'idrolizzato di medica, possiamo notare dalla figura 15 c come nelle foglie, l'attività di NR, NiR, IDH ed MDH sia stimolata ad entrambe le concentrazioni usate, mentre vi è un'incremento dell'attività di GS, GOGAT e AspAT solo alla concentrazione di 0,1 ml/l. Lo stesso idrolizzato nelle radici (figura 15 d) porta ad un incremento dell'attività di NR e IDH, alla concentrazione di 0,01 ml/l, mentre NiR, GS ed MDH sono incrementate ad entrambe le concentrazioni saggiate.

Fig 15 Attività enzimatiche in foglie (a) e in radici (b) di plantule di mais trattato con gli idrolizzati di FC (farina di carne) e in foglie (c) e radici (d) di mais trattato con EM (erba medica) I valori ottenuti sono la media di 3 repliche. Valori seguiti dalla stessa lettera non si differenziano a $p \leq 5\%$ secondo il test di Student-Newman-Keuls..



Dalla tabella 17 possiamo vedere come vi sia una stimolazione delle isoforme dell'enzima GS nelle foglie di piante trattate ad entrambe le concentrazioni dei biostimolanti.

Tabella 17 Percentuali di attività delle isoforme di GS in foglie di plantule di mais trattate con l'idrolizzato di erba medica (EM) e di farina di carne (FC). I valori ottenuti sono la media di 3 repliche. Valori seguiti dalla stessa lettera non si differenziano a $p \leq 5\%$ secondo il test di Student-Newman-Keuls..

trattamento	ml/l	GS1	GS2
Controllo		100c*	100d
EM	0,01	122b	712c
	0,1	129b	712c
FC	0,01	147a	943a
	0,1	110bc	795b

5. Profilo trascrizionale

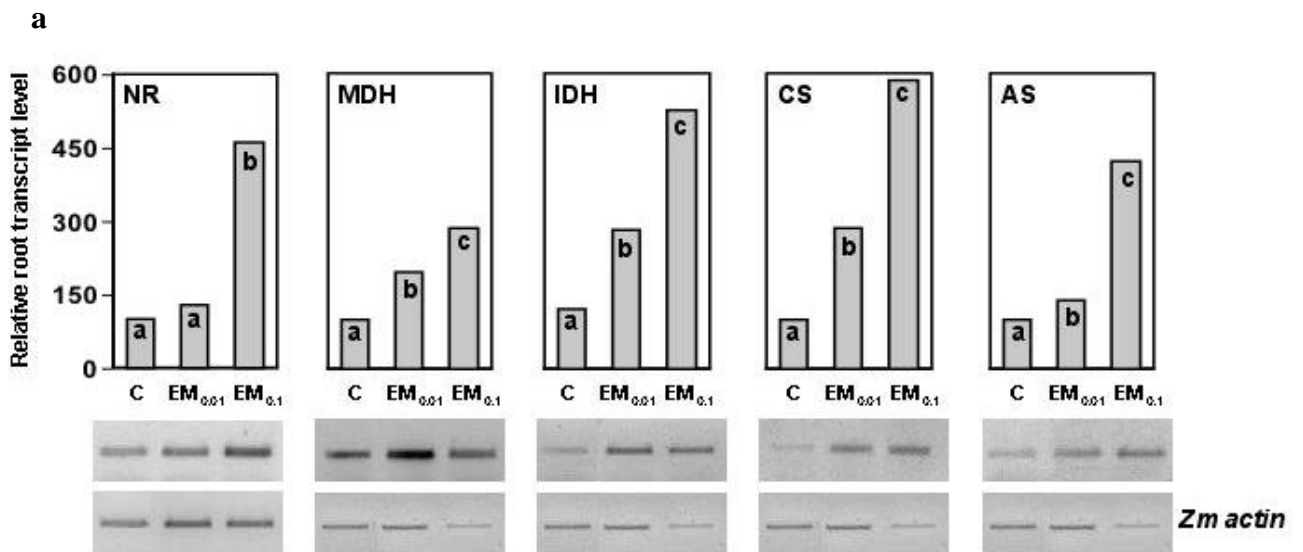
Al fine di confermare l'effetto di stimolazione del metabolismo azotato da parte del biostimolante a base di erba medica (EM) e farina di carne (FC), è stato analizzato il profilo trascrizionale del gene codificante per l'enzima coinvolto nel primo step del processo di assimilazione riduttiva del nitrato, la nitrato reductasi (NR), e dei geni codificanti per alcuni degli enzimi del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) È stata inoltre valutata l'espressione trascrizionale del gene codificante per l'asparagina sintetasi (AS), enzima chiave del processo di organizzazione dell'azoto inorganico nell'aminoacido asparagina.

A livello fogliare (figura 16), l'espressione trascrizionale dei geni codificanti per IDH, CS e AS non varia rispetto al controllo in seguito all'applicazione del biostimolante EM. Il livello di mRNA del gene che codifica per NR risulta più elevato del controllo solo nelle piante trattate con la più alta concentrazione di biostimolante (0,1 ml/l), mentre il gene codificante per MDH viene significativamente up-regolato dal biostimolante ad entrambe le concentrazioni applicate. L'analisi dell'espressione dei geni codificanti per MDH, IDH, CS e AS eseguita mediante RT-PCR ha evidenziato a livello radicale una significativa induzione della loro trascrizione nelle piante di mais trattate con entrambe le concentrazioni di biostimolante derivato dall'idrolisi di erba medica. In particolare, tale induzione risulta fortemente dipendente dalla concentrazione di biostimolante applicata alle piante poiché il livello di trascritto dei quattro geni risulta essere circa 1.5-2 volte più elevato alla concentrazione 0,1 ml/l rispetto a quello misurato a 0,01 ml/l. Analogamente a quanto

osservato nelle foglie, la trascrizione del gene codificante per l'enzima nitrato reductasi viene indotta solo nelle piante trattate con la più alta concentrazione di biostimolante, mentre non si osservano differenze significative tra piante controllo e piante trattate nell'altro caso.

Per quanto riguarda il profilo trascrizionale dei geni estratti dalle piante trattate con l'idrolizzato di farina di carne (figura 17 a,b), possiamo evincere come il livello di mRNA del gene che codifica per NR è inferiore del controllo, mentre l'espressione dei geni codificanti per MDH, IDH, e AS ha evidenziato sia a livello radicale che a livello fogliare una significativa induzione della loro trascrizione ad entrambe le concentrazioni di biostimolante. La trascrizione del gene codificante per l'enzima CS viene indotta solo nelle piante trattate con la minor concentrazione di biostimolante (0,01 ml/l), mentre non si osservano differenze significative tra piante controllo e piante trattate con 0,1 ml/l (Fig. 17).

Fig.16 Pattern di espressione trascrizionale evidenziato nelle foglie (b) di piante di *Zea mays* e in radici (a) dei geni *Zm actin*, NR, MDH, IDH, CS, AS, che codificano rispettivamente per actina, nitrato reductasi, malato deidrogenasi, isocitrato deidrogenasi, citrato sintasi, asparagina sintetasi. EM₀₀ corrisponde a 0,01 ml/l ed EM₀₁ corrisponde a 0,1 ml/l. La quantificazione delle bande è stata eseguita usando il programma ImageJ a seguito di normalizzazione rispetto al gene costitutivo actina. I valori normalizzati mostrati in grafico sono stati calcolati relativamente al controllo (C) posto uguale a 100. I valori riportati nei grafici risultano dalla media di tre esperimenti di RT-PCR indipendenti (\pm SE). Lettere diverse sopra le barre indicano differenze significative ($P < 0.05$).



b

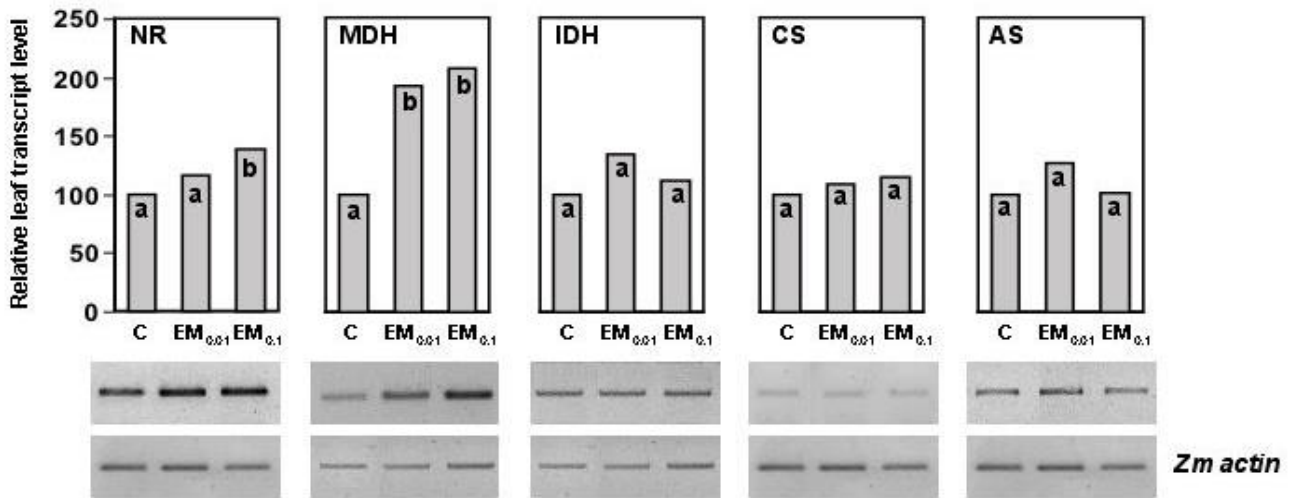
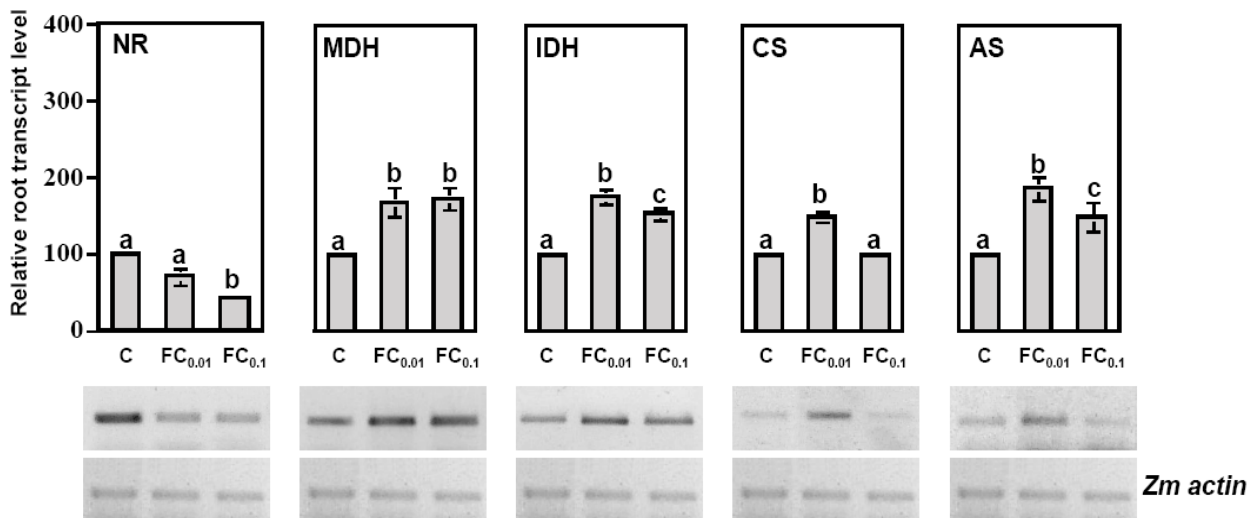
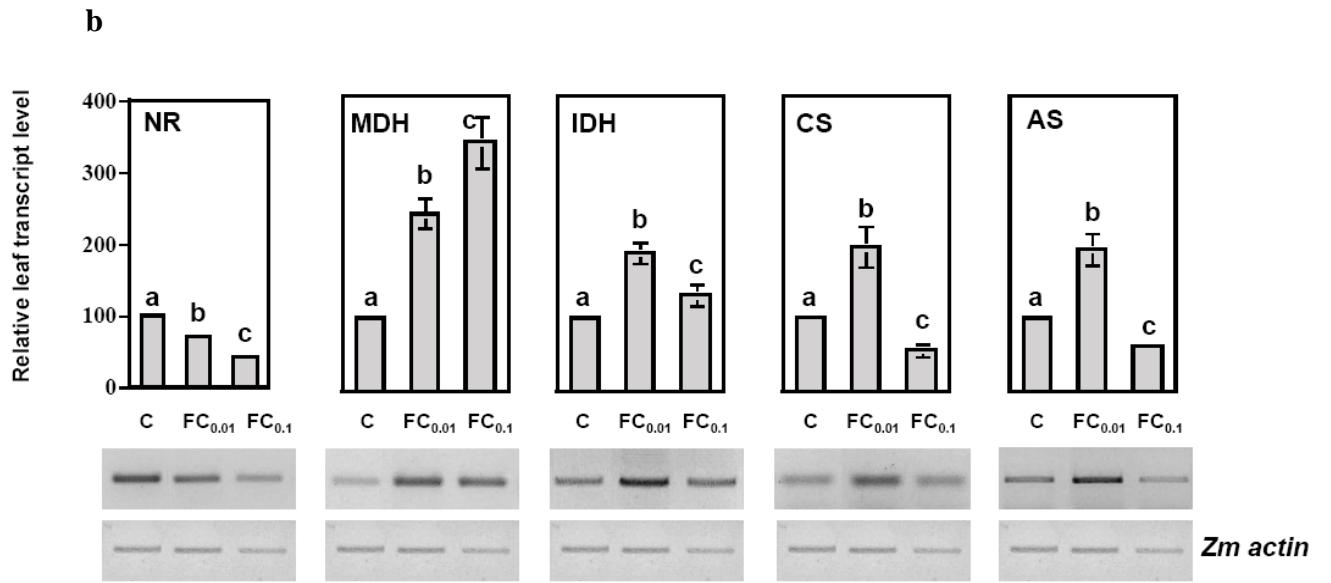


Fig.17 Pattern di espressione trascrizionale evidenziato nelle foglie (b) di piante di *Zea mays* e in radici (a) dei geni *Zm actin*, *NR*, *MDH*, *IDH*, *CS*, *AS*, che codificano rispettivamente per actina, nitrato reductasi, malato deidrogenasi, isocitrato deidrogenasi, citrato sintasi, asparagina sintetasi. $FC_{0.01}$ corrisponde a 0,01 ml/l ed $FC_{0.1}$ corrisponde a 0,1 ml/l. La quantificazione delle bande è stata eseguita usando il programma ImageJ a seguito di normalizzazione rispetto al gene costitutivo actina. I valori normalizzati mostrati in grafico sono stati calcolati relativamente al controllo (C) posto uguale a 100. I valori riportati nei grafici risultano dalla media di tre esperimenti di RT-PCR indipendenti (\pm SE). Lettere diverse sopra le barre indicano differenze significative ($P < 0.05$).

a





DISCUSSIONI

Studi condotti con biostimolanti, su diverse piante, e su differenti aspetti del metabolismo vegetale hanno portato ad ipotizzare che i biostimolanti siano in grado di interferire con numerosi processi fisiologici coinvolti nella crescita, nello sviluppo e nel metabolismo della pianta (Nardi *et al.*, 1996, Pinton, 2001). Questi effetti, potrebbero essere dovuti all'assorbimento da parte della radice, o alla funzione di segnale che essi svolgerebbero, segnale che sarebbe percepito e trasdotto in risposte metaboliche specifiche.

I due biostimolanti oggetto di questo studio derivano dall'idrolisi di matrici organiche di diversa origine, uno era a base di erba medica, l'altro di farina di carne. Seppur in entrambi i casi i processi idrolitici siano stati condotti enzimaticamente, è insito nell'attacco enzimatico la produzione di composti finali differenti. I dati di caratterizzazione chimica dei biostimolanti (tabelle 6-10) mostrano come alcuni parametri siano simili, mentre altri siano discordanti fra i due idrolizzati. Questo può essere imputato al fatto che è difficile trovare una diretta correlazione tra le matrici di partenza ed i prodotti dell'idrolisi. Fra i vari parametri di particolare importanza è il grado di idrolisi (tabella 8) che identifica il numero di legami peptidici rotti durante l'idrolisi e quindi è una stima della quantità di AA liberi nel prodotto. Poiché gli AA liberi sono molecole di dimensioni ridotte, capaci di entrare attraverso la membrana cellulare, ad essi si ipotizza sia legata la maggiore o minore attività biostimolante di un prodotto (Cavani *et al.*, 2007). EM presentava un grado di idrolisi più spinto rispetto ad FC. Infatti, in termini generali l'idrolizzato di medica ha mostrato una attività biostimolante più marcata rispetto a quello di farina di carne.

La legge vieta l'aggiunta di ormoni ai prodotti biostimolanti, ma non vieta la presenza di ormoni endogeni. Uno dei saggi biologici per valutare l'attività ormono-simile di composti organici di varia natura è il test Audus, in grado di palesare le capacità di indurre risposte ormonali. L'analisi effettuata sui nostri campioni ha evidenziato che entrambi presentano una chiara attività gibberello-simile ed una trascurabile attività auxino-simile (figura 12). Questo risultato può essere dovuto alla presenza nei composti di ormoni oppure di prodotti ad azione ormonale già presenti nella matrice di partenza e/o sviluppatasi durante il processo di produzione. Risultati simili si sono ottenuti tramite il medesimo test con composti umici (Nardi *et al.*, 2002). In quel caso la presenza di ormoni o sostanze ad attività ormonale è stata dimostrata.

Dalla valutazione dei pesi freschi di foglie e radici di plantule di mais trattate o meno con i due biostimolanti (tabella 11) è emerso che, rispetto al controllo, vi è un incremento della biomassa per entrambi i prodotti ed ad entrambe le concentrazioni. L'incremento di biomassa conferma l'effettiva risposta delle piante ai trattamenti alle concentrazioni saggiate. Questi effetti non possono, però, essere imputati ad un incremento degli elementi nutritivi nelle soluzioni di crescita a seguito dell'applicazione dei prodotti poiché, alle dosi di applicazione (0,1 e 0,01 ml/l) è da escludere un effetto fertilizzante dovuto ai componenti degli idrolizzati.

Uno dei principali effetti dei biostimolanti è quello di modificare la conformazione dell'apparato radicale delle piante trattate (Nardi et al., 2006). Nel nostro caso l'utilizzo di biostimolanti ha confermato di dati presenti in bibliografia (figura 13). Queste modificazioni, che comportano una maggiore quantità di radici secondarie possono essere riconducibili alla presenza di sostanze ormonali nei formulati testati, come suggerito dal test Audus.

Allo scopo di valutare se, contemporaneamente all'effetto positivo sulla biomassa, i biostimolanti agissero sull'assorbimento e la traslocazione dei nutrienti, sono stati determinati i contenuti di magnesio, manganese, rame e ferro nelle foglie e nelle radici. In generale l'effetto del trattamento è un maggiore contenuto degli elementi sia in foglie che in radici. Questo potrebbe essere dovuto agli effetti di maggiore assorbimento legati alla aumentata superficie assorbente delle radici delle piante trattate. I risultati, però mostrano andamenti eterogenei per le due concentrazioni e per i due idrolizzati. Questo evidenzia come le risposte indotte siano paragonabili a quelle indotte dalle sostanze umiche (Nardi et al., 2006).

I dati riguardanti il contenuto di macroelementi (NO₃⁻; PO₄³⁻; SO₄²⁻) evidenziano come vi sia una diminuzione di tali composti nelle piante trattate con i biostimolanti. Questo effetto può essere spiegato dal fatto che tali elementi sono stati utilizzati a livello biologico, e in particolar modo, possiamo notare come il nitrato sia l'elemento con il maggiore indice di decremento (anche del 90%). La riduzione del contenuto di nitrato potrebbe essere ascritta ad un consumo più veloce di nitrato per la produzione di amminoacidi (Schiavon et al., 2008), quindi che il metabolismo della pianta è attivo e che l'azione del prodotto non si è limitata all'assorbimento dei nutrienti, ma anche alla loro traslocazione e al loro utilizzo, in

accordo con i dati delle proteine totali dai quali si vede che vi è un aumento delle stesse rispetto al controllo.

Dai risultati riportati in questo studio, è emerso che l'applicazione dell'idrolizzato proteico a base di erba medica (EM) ha determinato un generale aumento dell'attività degli enzimi saggiati, sia in foglie che in radici (figura 15), mentre l'idrolizzato ottenuto da farina di carne (FC) ha stimolato l'attività fogliare di NiR, GOGAT, IDH e MDH ad entrambe le concentrazioni saggate. L'attività di NR risulta invece ridotta in foglie ed in radici. A livello fogliare FC stimola alcune le attività enzimatiche testate alla concentrazione più alta, mentre lo stesso prodotto, a concentrazioni più basse inibisce l'attività della GS, AspAT, CS.

I biostimolanti a base di erba medica e farina di carne, sono stati saggiati anche su pomodoro Philovita (Kiepenkerl), "Cherry Typ" in tunnel dal Dott. Bruns nell'Università di Kassell. Il trattamento delle piante è stato fatto sulle foglie, apportando 0,05 e 0,1 ml/l di prodotto tal quale, su un totale di 648 piante. A fine ciclo, sono stati valutati alcuni parametri, come il peso dei frutti, la quantità di licopene, il contenuto di carotenoidi, di acido ascorbico e di zuccheri solubili. Dalla valutazione dei dati è emerso come il trattamento con i gli drolizzati proteici abbia portato un incremento dei parametri presi in esame, con aumenti del peso dei frutti che vanno dal 150 al 170 %, e aumenti del contenuto di carotenoidi e licopene (+160-180%). Ulteriori analisi sono state condotte nell'azienda dello studio di Agronomi Associati Landlab di Quinto Vicentino su insalata batavia coltivata in vaso in tunnel freddo su substrato rappresentato da 50% sabbia + 50% terreno povero di nutrienti. Le tesi sono state: trattate con estratto di erba medica ed estratto di farina di carne alle concentrazioni di 0,01 ml/ e 0,1 ml, il controllo era rappresentato da piante non trattate. Tutte le tesi hanno ricevuto un unico trattamento a 10 giorni dal trapianto. Erano previste 4 repliche per tesi, ogni replica era formata 6 piante. Durante il ciclo colturale le piante sono state regolarmente irrigate. Non si è eseguito alcun trattamento fitosanitario . Le valutazioni dei trattamenti sono state fatte attraverso la determinazione dello SPAD e CM (Chlorophyll meter), che hanno permesso di misurare indirettamente la quantità di clorofilla presente nelle piante. Durante il ciclo di prova sono stati fatti 3 rilievi di ciascun tipo, le uniche differenze statisticamente significative sono tra i testimoni non concimati e tutte le altre tesi. Successivamente è stato valutato il diametro

cespi attraverso un calibro. Per entrambi i parametri valutati si sono osservate differenze significative tra le tesi trattate e i testimoni non trattati.

I risultati sopra descritti dimostrano come i due biostimolanti siano in grado di stimolare diverse attività enzimatiche, espressioni di differenti cammini metabolici. La loro azione riesce ad influenzare la capacità degli enzimi di catalizzare la riduzione e l'assimilazione del nitrato, requisito importante per l'adattamento delle specie vegetali alle diverse condizioni ambientali come: qualità del suolo, clima, pH, etc., (Ertani et al., 2007) considerato che l'azoto è elemento limitante per la crescita e la produttività delle piante stesse.

Numerosi autori hanno suggerito che alcuni composti legati all'assimilazione dell'azoto abbiano un effetto di inibizione a feedback sui messaggeri di NR, NiR, GS e GOGAT. Tali composti sono principalmente l'ammonio, la glutammina e il glutammato (Vance e Gantt, 1992). Nel nostro caso questo feedback potrebbe spiegare la ridotta attività di alcuni enzimi, nelle piante trattate con i biostimolanti.

L'effetto dei due idrolizzati saggiati, non si limita al solo metabolismo azotato, ma si lega anche al metabolismo del carbonio, fornendo energia sotto forma di ATP e scheletri carboniosi dell' α -chetoglutarato e dell'ossalacetato, permettendo quindi la stimolazione dell'attività di enzimi come IDH e MDH. Gli stessi risultati sono stati riscontrati in plantule di mais e di graminacee trattate con sostanze uniche manifestanti a loro volta attività ormonosimile (Nardi et al., 2006)

Al fine di confermare l'effetto di stimolazione del metabolismo azotato da parte dei due idrolizzati proteici, è stato analizzato il profilo trascrizionale dei geni codificanti per alcuni enzimi (NR, MDH, IDH, CS, AS) di cui è stata precedentemente evidenziata una variazione dell'attività. I risultati mostrano una correlazione tra l'analisi enzimatiche ed il livello dei trascritti in foglie e radici delle piante trattate con EM. Anche il trattamento con FC evidenzia come i due parametri siano in stretta relazione. Questa evidenza suggerisce un meccanismo di coordinazione tra la regolazione della trascrizione del gene e la traduzione del segnale nelle vie metaboliche del carbonio e dell'azoto, supportano l'ipotesi di una regolazione coordinata dei due metabolismi via cross-signalling.

CONCLUSIONI

I biostimolanti in futuro, potrebbero essere affiancati alle pratiche di fertilizzazione. Questi composti sono in grado di stimolare la crescita delle piante a concentrazioni molto basse, attraverso meccanismi non ancora del tutto chiariti.

Questa tesi ha focalizzato la sua attenzione sugli effetti di due biostimolanti su assimilazione e organicazione dell'azoto, e sul metabolismo del carbonio, utilizzando mais come pianta-test attraverso metodi enzimatici e molecolari.

I risultati ottenuti indicano che l'applicazione dei due idrolizzati proteici, EM e FC, influenza il metabolismo dell'azoto sia a livello trascrizionale che post-traduzionale (attività enzimatica). Il miglioramento dell'assimilazione dell'azoto in piante di mais potrebbe avvenire attraverso una regolazione coordinata dei pathways metabolici del carbonio e dell'azoto. Quindi, in qualità di sostanze in grado di incrementare la NUE (Nutrients Use Efficiency), l'impiego agricolo dei due idrolizzati proteici comporterebbe un utilizzo razionale dei fertilizzanti azotati di sintesi nelle normali pratiche colturali con conseguenti benefici ambientali.

RINGRAZIAMENTI

Un grazie particolare alla Dott. ssa Michela Schiavon per il prezioso aiuto, per la collaborazione ed amicizia.

Ringrazio il personale del laboratorio ILSA : Elena, Clizia, Teresa, Adriano, Lisanna, e tutto il personale dello Studio Associato Landlab per la pronta e sempre efficiente collaborazione e Giorgio Ceolato per la stampa.

Ringrazio la mia famiglia per l'indispensabile supporto morale ed economico, i miei tesisti: Tiziano, Alessandro, Elena, Elisa, Damiano, Claudio e Marco.

Ringrazio alcuni cari amici che con la loro compagnia e il loro buonumore, hanno dato forza ed energia nuova per proseguire questo lavoro: Marta, Manuela, Eva, Fabio, Vince, Alessia, Giacomo, Simone, Nico Valerio ed Elena.

Per ultima ma non per importanza ringrazio la mia correlatrice, la Prof.ssa Serenella Nardi senza la quale tale lavoro non sarebbe stato possibile, e perché ha permesso la mia crescita scientifica e umana.

BIBLIOGRAFIA

- Alpi A., Pupillo P., Rigano C., (2000). *Fisiologia delle piante*. Ed. III / 2000.
- Audus L (1972). *J. Plant Growth Substances Chemistry and Physiology*. Hill, L. Ed. London; 1, pp 24-65.
- Avila C., Rotella J.R., Canovas F.M., De Castro I.N. Valpuesta V., (1987). Different characteristics of the two glutamate synthetases in green leaves of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Physiol.* 85, 1036-1039.
- Bergmeyer, H. U., (1983). *Methods of Enzymatic Analysis*. Edit. J. Bergmeyer and Marianne Graßl. Weinheim: Verlag Chemie, Vol. IV.
- Bergmeyer, H. U., (1986). *Methods of Enzymatic Analysis*. Edit. J. Bergmeyer and Marianne Graßl. Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim-Deerfield Beach- Basel (Edit. in Chief).
- Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding (1976). *Anal. Biochem.*, 72, 248–254.
- 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.
- Canovas, F.M., Canton, F.R., Gallardo, F., Garcia-Gutierrez, A., de Vincente, A. (1991). Accumulation of glutamine synthetase during early development of maritime pine (*Pinus pinaster*) seedlings. *Planta*, 185, 372-378.
- Cavani, L., Ciavatta, C., Gessa, C., (2003). Determination of free and -alanine in hydrolysed protein fertilisers by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 985, 463-469

- Cavani, L., Ciavatta C., (2007). Attività Biostimolante degli Idrolizzati Proteici. *L'informatore Agrario*, 44, 46-52.
- Chen Y., Aviad T. (1990). Effects of humic substances on plant growth. In. P MacCarthy, C.E.
- Clapp, C.E., Chen, Y., Hayes, M.H.B., Cheng, H.H., (2001). Plant growth promoting activity of humic substances. In. Seift, R.S., Sparks, K.M. Eds., *Understanding and Managing Organic Matter in Soils, Sediments, and Waters*. IHSS. Madison, pp. 243-255.
- Crawford N.M. and Glass A.D.M. (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Plant Science* 10, 389-395.
- Ertani A., Peserico L., Brandellero E., Franceschi C., Altissimo A., Nardi S. (2008). The effect of a biostimulant on salinity plant stress. 17th International Symposium of CIEC "PLANT NUTRIENT MANAGEMENT UNDER STRESS CONDITIONS". Cairo – Egypt 24- 27 November 2008.
- 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*. Accepted 13 January 2009.
- Frankenberger, W.T.; Arshad, M. *Phytohormones in soils: Microbial Production and Function*, Ed. Dekker, M.; Inc: New York, 1995
- Ghosh K. & Schnitzer, M. (1980). Macromolecular structures of humic substances. *Soil Science*, 129, 266–276.
- Givan C.V. (1980). Aminotransferases in higher plants. In *The Biochemistry of Plants. Amino Acids and Derivatives*, ed. BJ Miflin, 5. 329– 57.

- Goldberg D.M., Ellis G.,(1983). Isocitrate. In HU Bergmeyer, ed, *Methods of Enzymatic Analysis*, Ed 18. Academic Press, New York, pp 183-190.
- Hirel B, Bertin P, Quilleré I, Bourdoncle W, Attagnant C, Dellay C, Gouy A, Cadieux S and Falque M. (2001). Toward a Better Understanding of the Genetic and Physiological Basis for Nitrogen Use Efficiency in Maize. *Plant Physiol.* 125, 1258-1270.
- Hoagland, D.R., and D.I. Arnon. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Calif. Agr. Expt. Sta. Circ.* 347. Univ. California, Berkeley, CA.
- Hodges M. (2002). Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation *J Ex Bot*, 370, 905–916.
- Iyer S, Caplan A. (1998) Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes in rice. *Plant Physiol.* 116: 203-211.
- Kjeldahl J., (1883). A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Z. Anal. Chem.*, 22: 366.
- Lam H-M, Peng SS-Y, Coruzzi GM. (1994). Metabolic regulation of the gene encoding glutamine-dependent asparagine synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 106.1347–57.
- Lam H.M., Coschignano K.T., Oliveira I.C., Melo-Oliveira, G.M. Coruzzi, (1996). The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acid in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* 47. 569-93.
- Lam H.M., Chiao Y.A., Li M.W., Yung Y.K., Ji S. (2006). Putative Nitrogen Sensing Systems in Higher Plants. *J. Int. Plant Biol.* 48 (8), 873–888.
- Lancien M., Ferrario Mery S., Roux Y., Bismuth E., Masclaux C., Hirel, B. Gadal P., and Hodges M., (1999). Simultaneous Expression of NAD-Dependent Isocitrate

- Dehydrogenase and Other Krebs Cycle Genes after Nitrate Resupply to Short-Term Nitrogen-Starved Tobacco. *Plant Physiol.* 120, 717–725.
- Lea PJ. (1993). Nitrogen metabolism. In *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, ed. PJ Lea, RC Leegood, pp. 155– 80. New York. Wiley.
- Lewis O.A.M., James D.M. Hewitt E.J. (1982). Nitrogen Assimilation in Barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Mazurka) in Response to Nitrate and Ammonium Nutrition *Annals of Botany* 49: 39-49.
- Lillo C. (1984). Diurnal variations of nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in barley leaves. *Physiol Plant* 61 (2), 214–218.
- Miller A.J, Smith S.J. (1996). Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. *J. Exp. Bot.* 300, 843-854.
- Miller A.J, Cramer M.D. (2005). Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant Soil* 274, 1-36.
- Muscolo A., Cutrupi S., Nardi S., (1998). IAA detection in humic substances. *Soil Biol. and Biochem.*, 30. 1199-1201.
- Muscolo A., Bovalo F., Gionfriddo F., Nardi S., (1999). Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Dacus carota* cell growth and nitrate metabolism. *Soil Biol. and Biochem.*, 31. 1303-1311.
- Nardi S., Pizzeghello D., Reniero F., Rascio N. (2000). Chemical and biochemical properties of humic substances isolated from forest soils and plant growth. *SSSAJ* 64: 639–645.
- Nardi S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello, A.; (2002). Review “Physiological effects of humic substances on higher plants”. *Soil Boil. Biochem.* 1527-1536.

- Nardi S., Carletti P., Ertani A., Pizzeghello D. (2006). Biostimolanti e attività biostimolante, *Informatore Agrario*.
- Pal S. (1992). "Nature and properties of soil humic acid as influenced by incorporation of different plant materials." *Plant and Soil* 16. 11-15.
- Piccolo A. (2001). The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci* 66:810–832.
- Piccolo A., Cozzolino A., Conte P. (2001)a. Chromatographic and spectrophotometric properties of dissolved humic substances as compared to macromolecular polymers. *Soil Sci.* 166. 174-185.
- Piccolo A. (2002). The Supramolecular Structure of Humic Substances. A Novel Understanding of Humus Chemistry and Implications in Soil Science. *Adv. Agron.* 75 57-134.
- Piccolo A., M. Spiteller (2003). Electrospray ionization mass spectrometry of terrestrial humic substances and their size fractions. *Anal. Bioanal. Chem*, 377.1047-1059.
- Pinton R., Cesco S., Iacoletti G., Astolfi S. and Varanini Z. (1999). Modulation of NO₃-uptake by water extractable humic substances. involvement of root plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant and Soil* 215, 155-161
- Pizzeghello, D., Nicolini, G., Nardi, S. (2001). Hormone-like Activity of humic substances in *Fagus sylvaticae* L. *Forests. New Phytol.*, 151, 647-657.
- Presutto P., Pezzutto S. (2005). I vantaggi dell'applicazione di glucosio fosforilato e aminoacidi alla vite. *Phytomagazine speciale biostimolanti*.
- Quaggiotti, S., Ruperti, B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tugnoli, V. and Nardi, S., (2004). Effects of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize *Zea mays* L. *J Ex Bot.* 398. 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. Proceedings of International Symposium on Foliar Nutrition of Perennial Fruit Plants. Acta Hort., 594, 341-347.
- Rej R., Horder, M. (1983). Aspartate aminotransferase. In: Methods of enzymatic analysis, vol. 3, pp. 416–433, Bergmeyer, H.U. ed. V.C.H., Weinheim.
- Rhodes D, Rendon GA, Stewart GR (1975). The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. Planta 125. 201-211.
- Russell L., Stokes A.R., Macdonald H., Muscolo A. and Nardi S. (2006). Stomatal Responses to Humic Substances and Auxin are Sensitive to Inhibitors of Phospholipase A2. Plant and Soil, 283:175-185.
- Sambrook, J., Fritsch E.F., Maniatis, F. (1989).Molecular Cloning. a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Ed, 2nd edn.,
- Schiavon M., Ertani E., Nardi S. (2008). Journal of Agricultural and Food Chemistry. Effects of an alfaalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of TCA cycle and N metabolism in *Zea mays* L.
- Schnitzer, M. (1978). Humic Substances. Chemistry and Reactions. In. Schnitzer, M., Khan, S.U., Eds., Soil Organic Matter, Elsevier, Amsterdam 3.
- Schultz, C.J., and Coruzzi, G.M. (1995). The aspartate aminotransferase gene family of *Arabidopsis* encodes isoenzymes localized to three distinct subcellular compartments. Plant J. 7, 61-75.
- Simpson AJ, Kingery WL, Shaw DR, Spraul M, Humpfer E, Dvortsak P. (2001).The application of ¹H HR-MAS NMR spectroscopy for the study of structures and

- associations of organic components at the solid-aqueous interface of a whole soil. Environ. Sci. Technol.; 35: 3321.
- Sokal R.R., F.J. Rohlf. (1969). Biometry. Freeman and Co, San Francisco.
- Stevenson F.J. (1994). Humus chemistry. Genesis, composition and reactions. 2nd ed. Wiley-Intersci., New York.
- Subler S., Dominguez J., Edwards C.A. (1998). Assessing biological activity of agricultural biostimulants: bioassays for plant growth regulators in three soil additives. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 29(7&8):859-866
- Taiz L and Zeiger E. (1996). Assimilazione degli elementi nutritivi minerali. Fisiologia Veg. 329-357.
- Taniguchi M., Kobe A., Kato M., Sugiyama T. (1995). Aspartate aminotransferase isoenzymes in *Panicum miliaceum* L., and NAD-malic enzyme– type C 4 plant. comparison of enzymatic properties, primary structures, and expression patterns. Arch. Biochem. Biophys. 318.295–306.
- Thaer A.D., (1810). Grundsätze der Rationellen Landwirtschaft, Volume 1. Grasslerchen Buchhandlungen, Vienna, Austria. Seen in translation by Shaw W & Johnson CW (1844). Ridgway, Piccadilly, London.
- Ullrich W.R. (1992). Transport of nitrate and ammonium through plant membranes. In K Mengel, DJ Pilbeam eds. "Nitrogen Metabolism of Plants", Clarendon Press, Oxford, pp 121-137.
- Vance C.P., Gantt J.S. (1992). Control of nitrogen and carbon metabolism in root nodules. Physiol Plant. 85.266–274.

- Varanini, Z., Pinton, R., (2001). Direct versus indirect effect of soil humic substances on plant growth and nutrition. In. Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, P. Eds.. The Rhizosphere. Marcel Dekker, Basel, pp. 141-158.
- Vaughan, D., e Malcom, R.E., (1985). Influence of humic substances on growth and physiological processes. In. Vaughan, D., and Malcom, R.E., Eds., Soil Organic Matter and Biological Activity. Martinus Nijhoff, Dordrecht/Dr Junk W. Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 37-76.
- Vercesi, A.E., Boreck, J., de Godoy Maia, I., Arruda, P.; Cuccovia, I.M.; Chaimovich, H. (2006). Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 57, 383-404.
- Vance C. P. 1990. Symbiotic nitrogen fixation. Recent genetic advances. In *The Biochemistry of Plants*, Vol. 16. Ed. A Marcus. pp 43–87. Academic Press, New York.
- Walkley A. and Black I.A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determination soil organic matter and proposed modification of the chromic acid titolation method. *Soil Sci.* 37:29-38.
- Wolt J.D. (1994). *Soil solution and chemistry. Applications to environmental science and Agriculture.* Wiley, New York, 345
- Wershaw, R.L. (1986). A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic chemicals in soil water and sediment-water systems. *J. Contam. Hydrol.* 1:29-45
- Zhang X., Ervin E.H., Schmidt R.E. (2003)c. Effects of liquid application of a seaweed extract and a humic acid on creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds. A.). *J. Amer. Soc. HortSci.* 128:492-496.