



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI  
CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE AGRARIE E DEL TERRITORIO

**Valutazione dell'efficacia di un Biostimolante per stress da  
freddo su piante di girasole e mais coltivate in camera  
climatica**

*Efficacy evaluation of a Biostimulant for cold stress in sunflower  
and maize plants grown in climatic chamber*

Studente:

*Giacoponi Morgan*

Relatore:

*Prof. Costantino Vischetti*

Correlatrice:

*Dott.ssa Arianna De Bernardi*

<b>INDICE</b>		<b>Pag.</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	<b>3</b>
<b>1.1.</b>	<b>MAIS, CARATTERI PRINCIPALI E CICLO COLTURALE.</b>	<b>3</b>
<b>1.1.1</b>	<b>Mais, semina anticipata e stress termico.</b>	<b>8</b>
<b>1.2.</b>	<b>GIRASOLE, CARATTERI PRINCIPALI E CICLO COLTURALE.</b>	<b>8</b>
<b>1.2.1</b>	<b>Girasole, semina anticipata e stress termico.</b>	<b>10</b>
<b>1.3.</b>	<b>BIOSTIMOLANTI, ORIGINE E LEGISLAZIONE.</b>	<b>11</b>
<b>1.3.1</b>	<b>Megafol Valagro®, composizione ed attività antistress.</b>	<b>13</b>
<b>1.4.</b>	<b>ENZIMI NEL SUOLO.</b>	<b>15</b>
<b>1.4.1</b>	<b>FDA.</b>	<b>16</b>
<b>1.4.2</b>	<b>o-Difenolossidasi (o-DPO).</b>	<b>17</b>
<b>2.</b>	<b>SCOPO DELLA TESI.</b>	<b>18</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALI E METODI.</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Descrizione della prova.</b>	<b>19</b>
<b>3.2</b>	<b>Substrato di coltivazione.</b>	<b>20</b>
<b>3.3</b>	<b>Varietà utilizzate, stadi fenologici e semina.</b>	<b>21</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Mais.</b>	<b>21</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Girasole.</b>	<b>22</b>
<b>3.4</b>	<b>Prodotto in analisi.</b>	<b>23</b>
<b>3.5</b>	<b>Stress termico ed applicazione.</b>	<b>24</b>
<b>3.5.1</b>	<b>Mais.</b>	<b>24</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Girasole.</b>	<b>28</b>
<b>3.6</b>	<b>Concimazione ed irrigazione.</b>	<b>31</b>
<b>3.7</b>	<b>Rilievi.</b>	<b>32</b>
<b>3.7.1</b>	<b>SPAD.</b>	<b>33</b>

<b>3.7.2 NDVI.</b>	<b>34</b>
<b>3.7.3 Area fogliare.</b>	<b>36</b>
<b>3.7.4 Plant Growth index.</b>	<b>38</b>
<b>3.7.5 Danni su tessuti fogliari.</b>	<b>38</b>
<b>3.7.6 Leaf area index.</b>	<b>39</b>
<b>3.7.7 Numeri di foglie.</b>	<b>39</b>
<b>3.7.8 Biomassa fresca e secca.</b>	<b>40</b>
<b>3.8 Analisi enzimatiche.</b>	<b>42</b>
<b>3.8.1 FDA.</b>	<b>42</b>
<b>3.8.2 o-Difenolossidasi (o-DPO).</b>	<b>44</b>
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONI.</b>	<b>45</b>
<b>4.1 MAIS.</b>	<b>45</b>
<b>4.2 GIRASOLE.</b>	<b>55</b>
<b>5. CONCLUSIONI</b>	<b>64</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>65</b>
<b>6.1 Sitografia</b>	<b>74</b>

## 1.INTRODUZIONE

L'agricoltura moderna deve far fronte a problematiche sempre più complesse in seguito ai cambiamenti climatici che si contrappongono negativamente all'aumento repentino dei costi connessi alle concimazioni, alla riduzione dell'uso di prodotti chimici ed all'espansione demografica che richiede sempre più elevate produzioni (Santa Chiara et al., 2010). Dalla situazione attuale emerge il bisogno di una gestione consapevole delle risorse e dei mezzi utilizzati nella risoluzione di problemi agronomici. L'introduzione dei biostimolanti negli ultimi vent'anni ha portato alla luce notevoli benefici per le piante che, con dosi d'applicazione ridotte, riescono ad avere una risposta agli stress abiotici e biotici. Recenti studi svolti su colture estensive hanno portato a notevoli risultati in termini di prestazioni produttive, anche in condizioni di stress abiotici.

Nel presente lavoro di tesi è stata condotta una sperimentazione al fine di valutare l'efficacia di un biostimolante su due colture a ciclo primaverile-estivo, quali mais e girasole. Con le variazioni di temperature si stanno sempre più verificando anticipi di semina e conseguenti possibili casi di ritorni di freddo che possono indurre stress termici nelle prime fasi delle colture macroterme.

L'esperimento è stato condotto in una cella climatica, chiamata fitotrone, dove si possono controllare tutti i parametri climatici di crescita della coltura. La prova si compone di quattro tesi per ogni coltura, la prima non trattata e non stressata (controllo negativo), la seconda non trattata e stressata (controllo positivo), la terza e la quarta trattate a dosi crescenti (2 e 3 L/ha) e stressate.

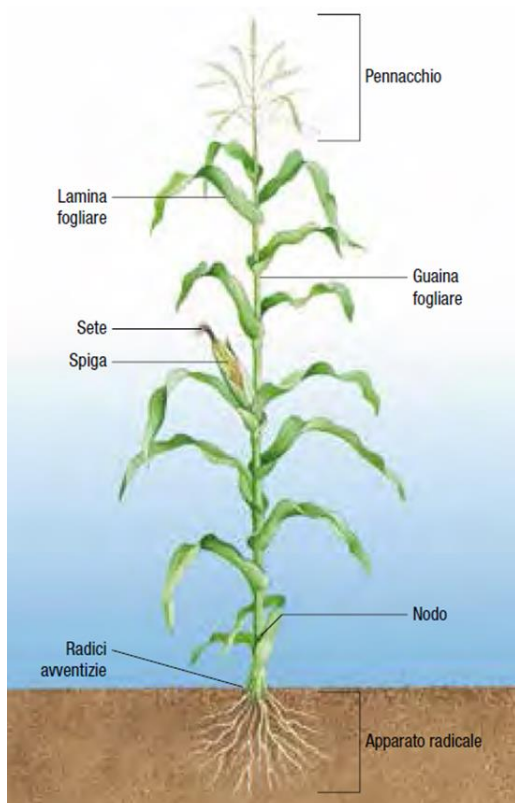
Le piante sono state sottoposte a stress termico nelle prime fasi del loro ciclo colturale. Nel corso della prova sono stati effettuati vari rilievi calendarizzati quali: contenuto in clorofilla, NDVI, area fogliare, indice di crescita, LAI, numero di foglie, danno sui tessuti ed eventuale fitotossicità del prodotto. Infine, sono state condotte analisi enzimatiche su campioni di terreno dove precedentemente erano presenti le piante, per valutare l'eventuale traslocazione dei benefici del prodotto verso l'apparato radicale.

### 1.1. MAIS, CARATTERI PRINCIPALI E CICLO COLTURALE

Il mais (*Zea mays*) appartiene alla famiglia delle Graminacee e *Zea mays* è l'unica specie del genere *Zea* che esiste allo stato coltivato. È una coltura primaverile-estiva a ciclo C4 e raggiunge la massima assimilazione di CO<sub>2</sub> a temperature massime di 40°C con elevata intensità luminosa (Bonsembiante, 1983). La sua coltivazione si estende dai

30° ai 55° di latitudine ed ha lo zero di vegetazione a 10°C. Ha elevate esigenze nutritive e idriche e risponde bene a intensificazioni colturali. Il mais è una pianta monoica, cioè ha i fiori maschili e femminili separati sulla stessa pianta, l'infiorescenza maschile è un panico (comunemente denominata pennacchio) posta all'apice dello stelo, mentre quella femminile è uno spadice (comunemente denominata pannocchia) posta lateralmente alla base della foglia e composta da un asse centrale sul quale si inseriscono spighe sessili riunite in coppie. Potenzialmente ad ogni foglia può corrispondere una spiga, ma in condizioni agricole ciascuna pianta produce una sola spiga o, più raramente, due (Baldoni et al., 1981). L'apparato radicale del mais, come quello di tutte le graminacee, è di tipo fascicolato e quindi abbastanza superficiale e si compone di radici primarie, secondarie o avventizie e aeree. Il portamento della pianta è eretto e può raggiungere i 4 metri di altezza nelle varietà coltivate, con un massimo di 22-24 foglie. Si tratta di una pianta brevidiurna ad alta efficienza fotosintetica che richiede un'elevata disponibilità idrica (Baldoni et al., 2001). La specie mais è allogama, ad impollinazione anemofila. Il seme è un frutto secco indeiscente costituita dall'embrione, dall'endosperma e dal rivestimento esterno.

Morfologia della pianta di mais



**Figura 1: Morfologia della pianta di mais (<https://dipartimenti.unicatt.it/diproves-Biodiversit%C3%A0%20e%20mais.pdf>).**

La temperatura minima del terreno per la germinazione del mais è di 12°C (Bonciarelli et al., 1992), in condizioni di umidità e di arieggiamento il seme assorbe acqua e inizia la mobilitazione delle sostanze di riserva. Con temperature di 12-13° C impiega circa 18-20 giorni ad emergere, con temperature di 16-18°C invece circa 8-10 giorni (Nelli et al., 2021). La germinazione dura circa 3 settimane, ma con l'aumentare della temperatura diminuiscono i giorni fino ad arrivare ad un'emergenza in 4-5 giorni con temperature di circa 25-28°C (Farooq et al., 2008); invece, per l'intero ciclo colturale, le temperature ottimali si aggirano intorno ai 20-22 °C (Neild et al., 1987).

La differenziazione delle foglie avviene in modo alterno nell'apice meristemato posto all'interno della pianta dagli stessi nodi basali spuntano le radici avventizie, che talora restano aeree. Allo stadio di 8-10 foglie (circa 30 giorni dopo la semina) la pianta differenzia l'infiorescenza maschile e 7-8 giorni dopo quella femminile (spesso all'ascella del sesto settimo nodo sotto il pennacchio). Dopo circa 4-6 settimane incomincia lo sviluppo completo della pianta dove c'è l'emissione dell'infiorescenza maschile seguita dalla fioritura. La durata dell'emergenza/fioritura dipende dalla varietà, da 45-50 giorni nelle precoci fino a 75-80 giorni nelle tardive (Nelli et al., 2021). Avvenuta la fecondazione incrociata, la cariosside si accresce molto rapidamente e dopo circa tre settimane raggiunge le dimensioni finali (maturazione latte). Dopo circa 25-30 giorni si giunge alla maturazione cerosa, nelle 3 settimane successive si ha una maturazione fisiologica che si concluderà con una graduale perdita d'acqua fino alla maturazione di raccolta (Baldoni et al., 2001).

#### 1.1.1 Mais, semina anticipata e stress termico.

La scelta della data di semina è un elemento cruciale per massimizzare le potenzialità produttive del mais. Secondo il rapporto IPCC (2021), la temperatura superficiale globale è aumentata di 1,07 °C durante l'ultimo decennio 2010-2019 rispetto al periodo 1850-1900 (Masson-Delmotte et al., 2021); di conseguenza nel tempo si è deciso di anticipare la data di semina del mais, anche grazie all'avvento di nuovi ibridi sempre più resistenti agli stress abiotici. Il motivo principale è quello di andare ad evitare stress idrici durante gli stadi fenologici più avanzati in quanto l'acqua è il fattore più limitante nelle colture a ciclo primaverile-estivo. Il livello delle precipitazioni meteoriche dagli anni '70 in poi è diminuito in tutte le aree mediterranee ((Vicente-Serrano et al. 2010; Caloiero et al. 2018) causando un aumento della frequenza e della durata dei periodi di

siccità e la riduzione dei giorni di pioggia (Raymond et al. 2019; Polade et al. 2014). Le semine anticipate però sono soggette a maggiori rischi dovuti a ritorni di freddo e avverse condizioni meteorologiche, spesso più frequenti nelle fasi di inizio primavera.

Il mais è una coltura che predilige la stagione di crescita calda e umida tipica delle zone tropicali di cui è originario quindi, in condizione di suoli freddi, può andare incontro a stress di natura biotica. L'alterazione della temperatura può causare danni alle membrane biologiche, riduzione dell'attività fotosintetica, limitazioni nell'assorbimento dei nutrienti e nel funzionamento di vari enzimi nelle piante di mais (Hussein et al., 2019). Quando il mais è seminato anticipatamente, in condizioni di temperatura inferiore a 10°C, è possibile che il seme rimanga nel suolo per più tempo del dovuto e che ci sia un'interruzione del normale processo di crescita fino alla fase riproduttiva (Farooq, 2009). La lunghezza di questo periodo dipende dalla temperatura del suolo e dalla capacità di trattenere acqua. Durante questo frangente, il mais può subire una serie di stress causati quindi principalmente dalla crescita alterata che porta di conseguenza una destabilizzazione dei meccanismi di difesa antiossidante (Che et al., 2012); la pianta è quindi più suscettibile a pressioni esterne di natura biotica o abiotica. Lo stress da freddo può influire negativamente sull'efficienza del fotosistema II, sul contenuto di clorofilla, sulla superficie fogliare e sulla morfologia dell'apparato radicale (Hund et al., 2007). In seguito a queste alterazioni, si sono osservati ritardi significativi di inizio dell'antesi (Hayashi et al., 2016) e, a livello morfologico, crescite anomale del fiocco nel mais (Hayashi et al., 2015).

Altri danni si possono riscontrare come riduzione dell'altezza dello stocco, riduzione della biomassa totale del raccolto (Liu et al., 2016) e una riduzione della crescita fogliare causata da un ridotto tasso di mitosi (Rymen et al., 2007).

A livello fisio-metabolico, temperature di 8-10°C durante le prime fasi del ciclo colturale possono indurre ritardi di germinazione, riduzioni del rapporto radici/germogli e riduzioni del contenuto di clorofilla (Bano et al., 2015) mentre temperature di 4-10°C possono interrompere la sintesi di clorofilla e di conseguenze causare una grave riduzione di attività del fotosistema II (Riva-Roveda et al., 2016). In letteratura è noto che le basse temperature creano squilibri fisiologici e biochimici come visto nello studio condotto da Chen et al. (2012). Gli studiosi hanno osservato un aumento significativo del contenuto di un indicatore dello stress ossidativo, la malondialdeide (MDA) e della permeabilità della membrana cellulare a causa dello stress termico nelle prime fasi del ciclo colturale, con consecutivo contenuto ridotto di

acqua, prolina e clorofilla nelle foglie di mais (Chen et al., 2012). Durante lo studio delle proprietà della parete cellulare sotto stress da freddo (12–14 °C), anche Bilaska-Kos et al. (2017) hanno mostrando che il contenuto di pectina della parete cellulare e l'attività della pectina metilesterasi diminuiscono in un ibrido di mais sensibile al freddo.

Altri studiosi (Liu et al., 2016) hanno osservato che limitando il trasporto di metaboliti, lo stress termico comporta la riduzione del trasporto di micronutrienti quali N, P, K, Ca, Mg.

Quando il seme secco si imbibisce con acqua fredda dovuta a pioggia o a scioglimento della neve, si possono generare delle lesioni. Le membrane cellulari del seme mancano di elasticità a basse temperature, ed in queste condizioni il processo di idratazione può generare la rottura della membrana. Il contenuto delle cellule che defluisce da queste rotture diventa fonte di cibo per i patogeni. L'acqua fredda può analogamente impattare sulla struttura fisica della plantula in emergenza. I risultati della sperimentazione Pioneer negli Stati Uniti durante il 2018 mostrano che temperature al di sotto di 10°C possono deprimere i processi di germinazione ed emergenza, specialmente se queste persistono dopo la semina (Corteva-Agriscienze, 2020).

Visivamente, questi problemi, si possono osservare come una colorazione rosso violacea sulle foglie che molto spesso imbruniscono e necrotizzano.



**Figura 2: Danni da freddo su giovane piantina di mais, prime foglie emerse con perdita di funzionalità (ASSOMAI: Gelate di metà aprile, danni alle piante di mais 20-04-17).**



## 1.2. GIRASOLE, CARATTERI PRINCIPALI E CICLO COLTURALE

Il girasole (*Helianthus annuus*) è una pianta erbacea annua appartenente alla famiglia delle *Compositae* ed è tra le colture oleose principali al mondo grazie alle caratteristiche qualitative del suo olio (Baydar & Erbas, 2005). È una pianta a ciclo C4 ed è quindi sensibile a basse temperature (Brouder & Volenec, 2008) e nonostante si sia adattato ai climi più temperati, predilige lunghi periodi di caldo (Johnston et al., 2002). Il miglioramento genetico ha permesso di selezionare nuovi ibridi capaci di mantenere produzioni in ambienti variegati (NODP, 2005); prove eseguite nel 2006 in Pakistan hanno mostrato che il girasole riesce a crescere sia in autunno che in primavera ma mostra le miglior performance produttive nella stagione più calda (Qader, 2006).



**Figura 3: Coltura estensiva di girasoli (<https://www.focus.it/ambiente/natura/come-avviene-il-moto-dei-girasoli>).**

Il girasole è una pianta annua macroterma che presenta un notevole sviluppo dell'apparato ipogeo grazie alla radice fittonante che può raggiungere i 2 metri di profondità ed alle ramificazioni radicali che ne susseguono (Bonciarelli et al., 1992). In condizioni di siccità la pianta di girasole tende ad aumentare la densità radicale a discapito della parte epigea, infatti, grazie al radicamento profondo, si può definire come una cultivar resistente alla siccità (Pratley & Beirne, 1994).

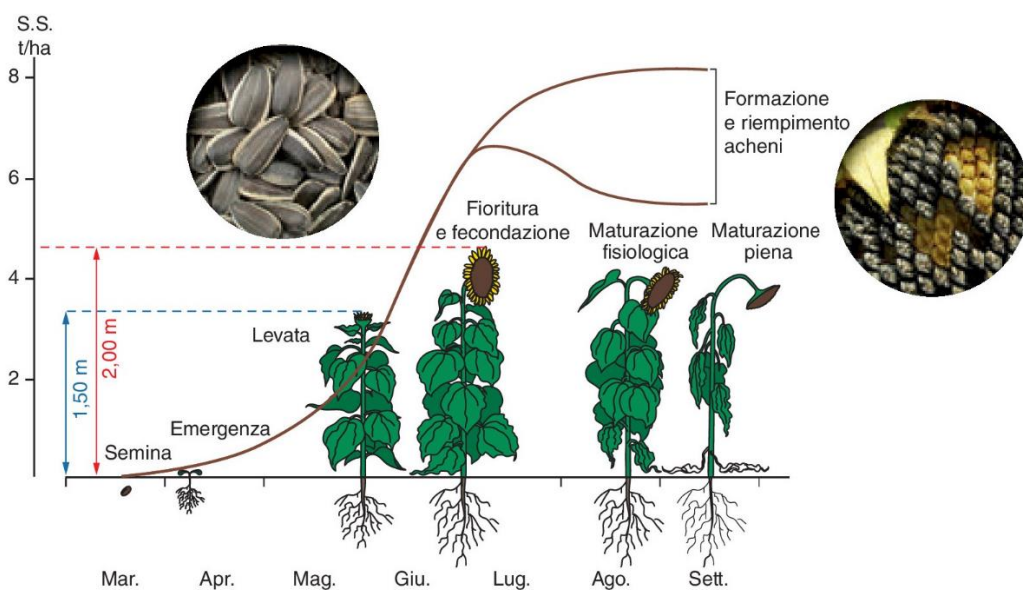
Il culmo, eretto, robusto e ruvido raggiunge fino ai due metri di altezza e termina con l'infiorescenza che è una calatide, a maturità tende a piegarsi al di sotto di questa. I primi 2/3 palchi si compongono di foglie opposte mentre, i successivi hanno foglie alterne (12-40). I fiori sono ligulati nella zona più periferica della caratide (funzione attrattiva, sterili) mentre sono tubolosi nella parte centrale (funzione

riproduttiva e di accumulo). Il frutto è un achenio complesso con un'elevata matrice grassa, un pericarpo duro e fibroso ed un colore dal bianco al nero (Bonciarelli, 1995).

Il ciclo dall'emergenza alla maturazione fisiologica dura 110-145 giorni, la temperatura base è pari a 6 °C ed in condizioni ottimali la pianta produce 12 t/ha di biomassa. Essendo originario di ambienti a clima temperato, predilige temperature relativamente alte; le esigenze termiche sono maggiori nelle prime fasi di crescita e diminuiscono leggermente alla maturazione. La coltura germina in un ampio intervallo di temperature (5–40°C) con un ottimale termico a circa 25°C mentre temperature sopra i 40°C ne inibiscono la crescita (Gay et al., 1990). I semi sono più sensibili alle basse temperature a causa del processo di dormienza dell'embrione (Corbineau, et al., 1987, 1990).

Il ciclo biologico del girasole può essere schematizzato nelle seguenti fasi (Bonciarelli, 1995):

- semina-emergenza
- emergenza-fioritura
- fioritura-maturazione fisiologica
- essiccamento degli acheni



#### **Figura 4: Stadi fenologici girasole**

**([https://digimparoreda.capitello.it/app/books+/CPAC90\\_8361344/html/135](https://digimparoreda.capitello.it/app/books+/CPAC90_8361344/html/135)).**

##### 1.2.1 Girasole, semina anticipata e stress termico.

Mediamente, molte colture non superano il 20% del potenziale produttivo a causa dell'adattamento che queste devono avere in diversi ambienti di coltivazione e, secondo alcune stime (Boyer, 1982), gli stress di natura abiotica legati a fattori ambientali, causano circa il 70% delle perdite produttive delle colture più importanti.

Il girasole è una coltura a ciclo primaverile-estivo che può andare incontro a carenze idriche durante il periodo più caldo della stagione; a tal proposito sono state ideate negli anni nuove metodologie per rimediare a questi stress come l'utilizzo di cultivar resistenti o l'anticipo delle semine (P. Maury et al., 1996). Alcuni studi effettuati all'interno delle regioni mediterranee hanno infatti dimostrato la maggior disponibilità idrica (Soriano et al., 2004) e l'aumento delle rese sul girasole (Anastasi et al., 2000) in condizioni di semina anticipata.

La semina anticipata consente di evitare il periodo di siccità (Allinne et al. 2009; Houmanat et al. 2016) ma può comportare che le colture a ciclo primaverile-estivo siano esposte a fenomeni di ritorno di freddo. Tale esposizione può indurre nella pianta variazioni metaboliche adattative (Shukla et al., 2018; Wang et al., 2009) associate ad accumuli di metaboliti a basso peso molecolare e soluti nel citoplasma che riducono il potenziale osmotico e quindi il punto di congelamento citoplasmatico (Sfoggia et al., 2001). In altri casi invece è stata riscontrata una degradazione di lipidi di membrana che si ripercuote in alterazioni strutturali e cellulari in colture estive (Ismail et al., 2002).

In seguito a stress, nella pianta si possono osservare anormali attività metaboliche come: stomi che si chiudono, cloroplasti che vengono danneggiati, enzimi fotosintetici che si denaturano o inattivano o che l'attività fotosintetica rallenta (Chen et al., 2014; Salvi et al., 2021). Inoltre, si può verificare una distruzione della membrana plasmatica (Steponkus 1984), un'alterazione nella sintesi di proteine (Duman e Wisniewski 2014) e respirazione limitata (Liu et al. 2012).

Il danno principale non è causato dalla temperatura di congelamento ma dai cristalli di ghiaccio che si formano nell'ambiente extracellulare (Beck et al. 2007), questo causa un drenaggio d'acqua dai protoplasti verso lo spazio extracellulare e la

successiva disidratazione delle cellule; la strategia permette alla pianta di evitare il congelamento dei protoplasti ma di conseguenza porta lo sbiancamento dei tessuti (Scott, 2008).

### 1.3. BIOSTIMOLANTI, ORIGINE E LEGISLAZIONE

Al fine di soddisfare la sempre crescente richiesta alimentare della popolazione globale, l'agricoltura tradizionale ha basato le proprie strategie su un uso eccessivo di prodotti chimici (Canellas et al., 2015). Nati come risolutori di problematiche parassitarie, negli anni se ne è fatto un uso non razionale scatenando ripercussioni devastanti; in particolare la natura persistente di vari pesticidi e altri inquinanti organici ha generato danni all'umanità a causa delle loro proprietà di bioaccumulo e dell'elevata tossicità (UNEP, 2017). Oltre ai pesticidi, dalla rivoluzione industriale in poi, è aumentata la produzione mondiale e una diffusione nell'ambiente di metalli pesanti (Nriagu e Pacyna, 1988). I rischi derivanti dalla contaminazione di metalli e pesticidi nel suolo, nell'acqua e nell'aria ed il loro trasferimento agli organismi superiori attraverso la catena alimentare sta comportando un rischio per le generazioni future (Uwizeyimana et al., 2017). L'uso continuo di sostanze chimiche provoca effetti dannosi sui microrganismi del suolo e sull'ambiente, quali: ridotta fertilità e squilibri nei nutrienti del suolo, aumento dei livelli di salinità dei substrati e perdita della biodiversità (Altieri et al., 2002; Wan et al., 2021; Jin et al., 2022).

Negli ultimi anni si è assistito a una crescente domanda di applicare strumenti tecnologici ed ecologici nelle produzioni agricole in grado di garantire la sostenibilità dei sistemi di produzione a medio e lungo termine (Shahrajabian et al., 2022).

In questo scenario, assume particolare interesse l'utilizzo di sostanze e/o microrganismi noti come biostimolanti, ovvero prodotti in grado di migliorare l'efficienza d'uso degli elementi nutritivi, ridurre l'incidenza delle avversità abiotiche, migliorare la qualità delle produzioni ed ottimizzare i processi metabolici delle piante (Colla et al., 2019; Jiménez-Arias et al. 2021). L'utilizzo di biostimolanti ha un impatto positivo sulla nutrizione e sulla crescita delle colture, agendo anche indirettamente da antistress (Richardson et al., 2004; García-García et al., 2020).

I primi studi sulla biostimolazione vennero svolti in URSS nel 1933. Lo studioso Filatov, infatti, sosteneva che quando i tessuti (animali e vegetali) vengono isolati e conservati in determinate condizioni, si accumulano in essi molecole che stimolano i processi metabolici. Tali sostanze sono state denominate "stimolatori

biogenici". Quando questi stimolatori vengono introdotti in un organismo malato o stressato mediante trapianto o iniezione di estratti, si aumentano i poteri rigenerativi dell'organismo e si sopprimono i processi patologici (Filatov et al., 1944).

Negli anni 50 Blagoveshchensky definì gli stimolatori come “acidi organici con effetti stimolanti grazie alle loro proprietà dibasiche che possono potenziare l'attività enzimatica nelle piante” (Blagoveshchensky et al., 1955, 1956). Nel '90 Berlyn mette in evidenza il maggior assorbimento di nutrienti e acqua delle piante in seguito a basse applicazioni di questi prodotti ed a conseguenti aumenti di crescita radicali (Berlyn, 1990). Alla fine degli anni 90 due scienziati, Zhang e Schmidt, hanno coniato il termine “biostimolanti” definendoli “condizionatori pre-stress”, ovvero prodotti che applicati in piccole quantità riescono a mantenere un'elevata capacità fotosintetica della pianta e prevengono le condizioni di stress abiotici e biotici (Zhang et al., 1999).

Kauffman (2007) riprese la definizione di biostimolanti con alcune modifiche definendoli “materiali diversi dai fertilizzanti che promuovono la crescita applicati a basse dosi”.

Attualmente, i biostimolanti rappresentano uno degli strumenti più potenti e promettenti per migliorare crescita e produttività delle colture in modo naturale, affrontando contemporaneamente le questioni relative ai fertilizzanti chimici. (Trevisani et al., 2017; Franzoni et al., 2022).

I biostimolanti ad oggi in commercio sono classificati in diverse categorie, i ricercatori ne hanno identificate nove tra cui estratti d'alghe ed estratti vegetali, materiali organici complessi (ottenuti da estratti di fanghi di depurazione, compost, concimi urbani e prodotti di scarto agroindustriali), sostanze umiche, antitraspiranti (caolino e poliacrilammide), chitina e derivati del chitosano, elementi (Al, Co, Se, Na e Si), idrolizzati proteici, composti contenenti azoto e inoculati microbici (Colla & Roupheal, 2020; Teklić et al., 2021; Franzoni et al., 2022; Monteiro et al., 2022).

Nonostante il crescente utilizzo di biostimolanti in agricoltura, la comunità scientifica ritiene che questi prodotti manchino di una approfondita valutazione scientifica sottoposta a revisione paritaria (Calvo et al., 2014).

La legislazione sui biostimolanti è stata oggetto di molte controversie negli anni; quella attuale segue il Regolamento UE 2019/1009 sui prodotti fertilizzanti che è entrato in vigore il 22 luglio 2022 e abroga il Regolamento CE 2003/03 introducendo nuove tipologie di prodotti, tra cui concimi organici e biostimolanti (Gazzetta ufficiale

dell'Unione europea, 2022). Il nuovo Regolamento prevede il mutuo riconoscimento tra gli stati membri dell'UE di tutti i prodotti che, quindi, potranno circolare liberamente (Regolamento UE 2019/1009, articolo 3, Libera circolazione). Rispetto al Regolamento Ce 2003/03, nel nuovo cambia di molto l'approccio: nel primo per ogni fertilizzante si spiega come produrlo mentre nel secondo, vengono definiti i materiali costituenti utilizzabili, i processi che devono subire e i prodotti che devono essere conformi ai requisiti essenziali di qualità, sicurezza ed etichettatura (Regolamento UE 2019/1009, articolo 4, Prescrizioni sui prodotti). Se necessario, la valutazione di conformità dei prodotti dovrà essere effettuata da organismi notificati, in caso contrario sarà sufficiente l'autocertificazione. Nella pratica vuol dire che il produttore, adesso, deve far valutare da un apposito ente accreditato dalle autorità nazionali preposte se le caratteristiche del prodotto sono conformi ai requisiti della norma (tenore massimo in metalli pesanti, assenza di contaminanti, ecc.) mediante la realizzazione di apposite prove secondo determinati standard che fissano le metodiche analitiche da adottare (Regolamento UE 2019/1009, articolo 13, Presunzione di conformità; art 15, Procedure di valutazione della conformità). Una novità per tutti i paesi dell'Ue che di fatto introduce la necessità della Conformità CE come condizione per l'immissione in commercio, mentre prima era sufficiente il rispetto dei requisiti di legge e una corretta etichettatura (Regolamento UE 2019/1009, articolo 16,17,18).

Con le modifiche del Regolamento 1107, vengono introdotte le categorie “nuove tipologie di prodotto” tra cui troviamo i Biostimolanti che da normativa vengono definiti come: “Biostimolante delle piante è qualunque prodotto che stimola i processi nutrizionali delle piante indipendentemente dal suo tenore di nutrienti, con l'unica finalità di migliorare una o più delle seguenti caratteristiche della pianta o della rizosfera della pianta:

- efficienza dell'uso dei nutrienti;
- tolleranza allo stress abiotico;
- caratteristiche qualitative;
- disponibilità di nutrienti confinati nel suolo o nella rizosfera”

(du Jardin et al., 2015; Brown et al., 2016).

#### 1.3.1 Megafol Valagro®, composizione ed attività antistress.

Megafol Valagro® è un biostimolante, antistress ed attivatore della crescita costituito da un complesso di matrice organica di natura vegetale.

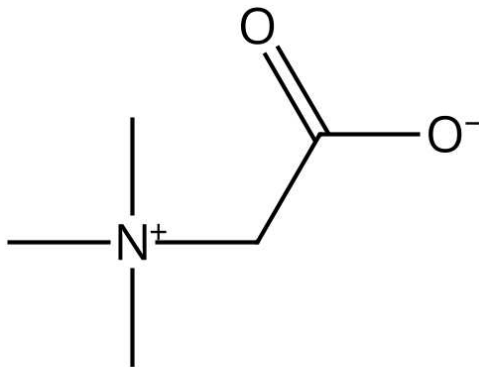
FUNZIONI DI MEGAFOL IN RELAZIONE AGLI INGREDIENTI			
	AMINOACIDI & PROTEINE	BETAINE	VITAMINE
ANTI-STRESS	✓	✓	✓
STIMOLO DELLA CRESCITA VEGETATIVA	✓		✓
<b>IN CONDIZIONI DI STRESS AMBIENTALI</b> PROTEGGE IL RACCOLTO			
<b>IN CONDIZIONI NORMALI DI CRESCITA</b> MIGLIORA L'ATTIVITÀ E LA PRODUZIONE DELLA PIANTA			

**Figura 5: Funzione di Megafol in relazione alle sue componenti.**

Il prodotto è composto principalmente da:

- betaine + vitamine + aminoacidi e proteine (azione antistress);
- vitamine + aminoacidi e proteine (stimolano la crescita vegetativa);

La betaina o betaina di glicina o glicina betaina (GB) è un composto organico appartenente all'importante gruppo delle betaine molto diffuso nel regno animale e vegetale specialmente nella *Beta vulgaris* e in alcune chenopodiacee. È stato osservato che nelle piante superiori, la glicina betaina (GB) migliora la tolleranza a stress abiotici come la siccità (Zhao et al.2007) e freddo (Kishitani et al. 1994, Chen et al. 2000).

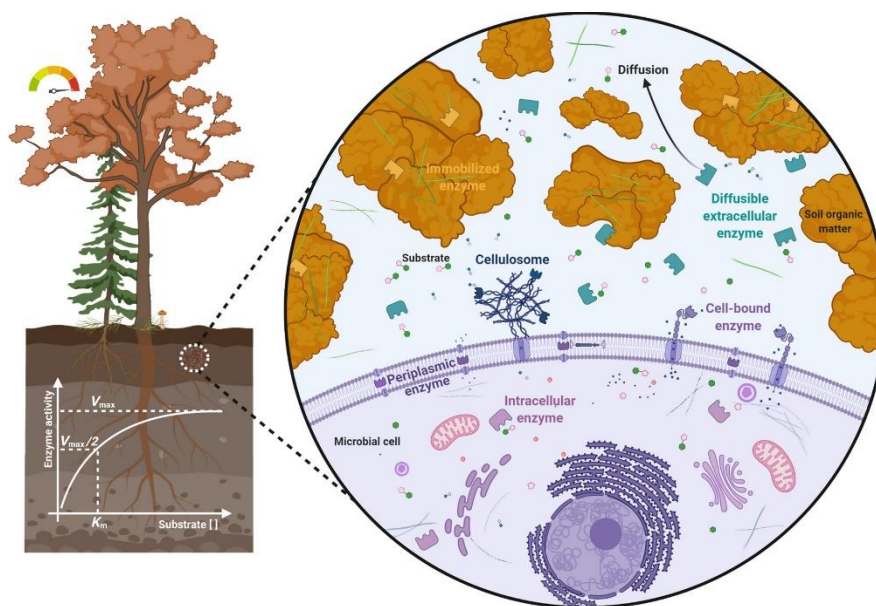


**Figura 6: Betaina (C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>), composto organico derivante dal regno animale e vegetale presente anche all'interno di prodotti biostimolanti (SCI FINDER).**

Gli aminoacidi sono delle molecole organiche fondamentali per la costruzione delle proteine, mentre le vitamine sono composti che regolano il metabolismo dei tessuti e della cellula attraverso il legame con enzimi.

## 1.4 ENZIMI DEL SUOLO

Gli enzimi del suolo svolgono un ruolo cruciale nei processi ecosistemici in quanto mediano numerose reazioni essenziali nei cicli biogeochimici (Fanin et al., 2021). Lo studio delle attività enzimatiche è fondamentale per valutare lo stato di salute dei suoli in quanto i microrganismi risultano sensibili a cambiamenti naturali o antropogenici anche lievi, nel breve periodo (Gilsotres et al., 2005; Wołejko et al., 2020; Lemanowicz et al., 2020). Gli enzimi del suolo vengono infatti prodotti principalmente dalla biomassa microbica (Ladd, 1978) e in minor quantità da piante e animali (Tabatabai et al., 1994). Come si evince dalla figura x, gli enzimi di origine microbica sono generalmente presenti all'interno delle cellule microbiche, associati alla membrana plasmatica, o raggruppati in complessi extracellulari multienzimatici (cellulosomi); sono presenti anche all'esterno delle cellule, escreti nella soluzione acquosa del suolo o stabilizzati nei suoli attraverso interazioni con la materia organica e i minerali argillosi (Fanin et al., 2021).



**Figura 7: Microrganismi nel suolo, organizzazione dei sistemi enzimatici endocellulari ed extracellulari (Fanin et al., 2021).**

Nonostante il loro quantitativo relativamente basso, i microbi svolgono un ruolo fondamentale nel mantenimento dei principali cicli nel suolo (C, N, P, S) attraverso il riciclo della materia organica, base fondamentale per la produzione primaria ed il funzionamento degli ecosistemi (Doran et al., 1994, 1996; Stevenson, 1986). La biomassa microbica è quindi fondamentale all'interno dei processi biochimici del suolo, specialmente partecipa alla formazione della struttura, trasformazione e accumulo di

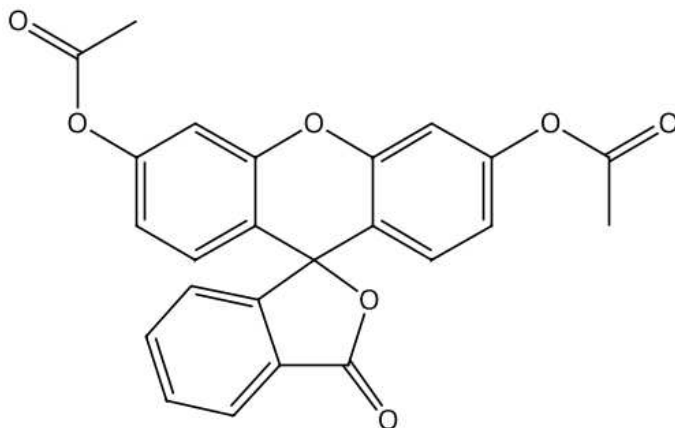


nutrienti, alla degradazione di residui organici animali e vegetali, all'immobilizzazione di metalli pesanti e alla detossificazione dei suoli da agenti inquinanti (Nannipieri et al., 2002; Gajda, 2008; Gajda et al., 2013). Secondo uno studio eseguito nel 1970 da Dommergues e Mangenot, i batteri sono i microrganismi più numerosi con una densità compresa tra 10<sup>6</sup> e 10<sup>9</sup> batteri/grammo di suolo, gli attinomiceti sono meno numerosi mentre i funghi sono compresi nel range 10<sup>4</sup> -10<sup>6</sup> unità/grammo di suolo (Paszczynski e Crawford, 2000). Tutte le variazioni a livello di pratiche colturali, successioni di colture, trattamenti con xenobiotici o cambiamenti delle condizioni ambientali possono influire sulla composizione della biomassa microbica all'interno del suolo (Kandeler et al., 1999).

Tra gli enzimi studiati troviamo gli idrolitici, ovvero quelli più utilizzati come indicatori di cambiamenti nella sostanza organica; è possibile misurare l'attività idrolitica globale con il test di fluoresceina diacetato (FDA) oppure l'attività delle di  $\beta$ -glucosidasi (Gil-Sotres et al., 2005), o delle fosfatasi che sono enzimi chiave del ciclo del fosforo nel suolo (Dick e Tabatabai, 1993) e che trasformano il fosforo organico in inorganico rendendolo disponibile per l'assimilazione da parte delle piante (Amador et al, 1997).

#### 1.4.1 FDA

Il diacetato di fluoresceina (FDA) è un composto incolore che viene idrolizzato da enzimi liberi o da quelli legati alle membrane (Stubberfield and Shaw, 1990), rilasciando un composto colorato, la fluoresceina, che può essere misurata mediante spettrofotometria (Tao et al., 2021). La struttura dell'FDA è rappresentata in figura 8:



**Figura 8: FDA (diacetato di fluoresceina, C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>), composto incolore che può venir idrolizzato da enzimi del suolo e rilasciare un composto colorato, la fluoresceina.**

L'intensità del colore della fluoresceina è direttamente proporzionale all'attività enzimatica del suolo che si va ad analizzare. L'FDA è idrolizzato principalmente da enzimi come proteasi, lipasi, esterasi, tutti coinvolti nella decomposizione microbica della sostanza organica (Schnürer and Rosswall, 1982). Quando viene assorbito dalle cellule, l'FDA viene scisso dagli enzimi e trattenuto all'interno come fluoresceina, cioè il prodotto di questa conversione enzimatica, che può essere visualizzata mediante microscopia a fluorescenza o quantificata mediante fluorimetria o spettrofotometria (Dick et al., 1996; Paul et al., 1996).

L'attività del FDA è quindi connessa alla biomassa microbica e può essere utilizzata per quantificare sia il contenuto di microflora nel terreno che l'attività idrolitica della sostanza organica (Sánchez-Monedero et al., 2008).

L'attività idrolasica è quindi fondamentale nel suolo, il processo fa sì che le idrolasi riducano le macromolecole in composti più semplici, rompendo legami covalenti per aggiunta di una molecola d'acqua; i principali enzimi che svolgono questa attività sono le lipasi, proteasi ed esterasi che, in condizioni sperimentali, hanno mostrato la capacità di idrolizzare il diacetato di fluoresceina (FDA) (Schnurer e Rosswall, 1982., Gaspar et al., 2001).

#### 1.4.2 o-Difenolossidasi (o-DPO)

Dall'ossidazione di composti fenolici, specialmente in presenza di composti con gruppi amminici, si formano i chinoni, elementi molto reattivi e capaci di formare vari prodotti di condensazione (Hartley e Whitehead, 1985).

Nel 1955, Mason e Peterson, studiando l'ossidazione enzimatica del catecolo in condizioni aerobiche, ottennero un composto rosso prodotto dall'ulteriore reazione della prolina con il chinone (Mason HS. et al., 1955). Il metodo Mason-Peterson venne ripreso nel 1970 da Yamaguchi et al. e nel 1973 da Mayaudon et al., per valutare l'attività dell' *o-difenolossidasi* (Yamaguchi et al., 1970, Mayaudon et al., 1973) rispettivamente nei funghi e negli estratti di terreno purificato, scoprendo che il composto rosso che si è sviluppato dopo l'ossidazione enzimatica del catecolo e la

reazione con la prolina, era stabile entro un range di pH 6-7 con un'assorbanza molare di  $5,0 \times 10^3$  a 525 nm.

Studiando la reattività e l'ossidazione nel suolo degli acidi fenolici, Lehmann e Cheng (1988) trovarono che subito dopo il contatto dei catecoli con il suolo si verificava una rapida reazione chimica, alla quale seguivano processi biochimici che portano ad una parziale degradazione e/o stabilizzazione dei prodotti di reazione. (Lehmann et al., 1988).

In seguito, Perucci et al. (2000) misero a punto un metodo nuovo, affidabile e semplice per misurare l'attività dell'o-difenolossidasi in un intero campione di suolo dove avviene la determinazione spettrofotometrica di un composto rosso (4-(N - prolina) -o-benzochinone) sviluppato dall'ossidazione enzimatica del catecolo in presenza di prolina (Perucci et al., 2000). Tale attività può essere messa in relazione con la complessità molecolare raggiunta dalla sostanza organica umificata e può quindi considerarsi una misura dello stato di umificazione raggiunto dalla sostanza organica del suolo.

## 2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di valutare l'efficacia del biostimolante Megafol Valagro ® su due colture estensive, il mais ed il girasole, in risposta ad uno stress termico di 48 ore a 0°C. La prova è stata effettuata all'interno di una camera climatica dove si sono potuti controllare i parametri climatici e di crescita della coltura. La prova si componeva di quattro tesi per ogni coltura, la prima non trattata e non stressata (controllo negativo), la seconda non trattata e stressata (controllo positivo), la terza e la quarta trattate a dosi crescenti di biostimolante (2 e 3 L/ha) e stressate. Si sono effettuate due applicazioni fogliari del prodotto nelle 24-48 ore prima e 24-48 ore dopo lo stress termico. Durante il corso della prova sono stati effettuati vari rilievi per poter valutare gli effetti del prodotto testato tra le differenti tesi. I rilievi effettuati a livello della pianta hanno interessato il contenuto in clorofilla, l'NDVI (indice di vigoria della coltura), l'area fogliare, l'indice Plant Growth Index, i danni sui tessuti fogliari, l'indice LAI (superficie fotosinteticamente attiva), il numero di foglie, la biomassa fresca e secca. A livello del suolo sono state studiate due attività enzimatiche legate al ciclo del carbonio, quali l'idrolisi del diacetato di fluoresceina (FDA) e le orto-

difenol ossidasi o-DPO, per la valutazione di possibili effetti dell'aggiunta del biostimolante sulla fertilità e sull'attività della biomassa microbica.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Descrizione della prova

La prova si è svolta dal 28/09/22 al 31/10/22 presso l'azienda Res Agraria (via A. Canova 19/2, Tortoreto, TE) all'interno di una camera climatica (fitotrone); il tutto è stato commissionato dall'azienda Valagro® con lo scopo di valutare l'efficacia del prodotto Megafol® su due colture estensive, mais e girasole in seguito a stress termico. Lo stress è stato indotto nei primi stadi colturali per 48 ore a 0°C mentre le applicazioni con il prodotto in analisi sono state eseguite 24-48 ore prima dello stress e 24-48 ore dopo. L'esperimento è composto da due prove, una con il mais e una con il girasole, trattate allo stesso modo. Entrambe le prove sono composte da quattro tesi (tabella 1), tra cui un controllo positivo (T1, non trattato e non stressato), un controllo negativo (T2, non trattato e stressato) e due tesi trattate a dosi crescenti di biostimolante (T3, 2 L/ha e T4, 3 L/ha). Ogni tesi si compone di cinque repliche, ognuna formata da tre piantine disposte singolarmente in vasetto per un totale di venti plot distribuiti secondo una completa randomizzazione all'interno della camera climatica.

TESI	TRATTAMENTO	DOSE (L/ha)	APPLICAZIONE	COMMENTI
1	Controllo positivo	-	-	Non stressato
2	Controllo negativo	-	-	stressato
3	Megafol	2	Prima applicazione 24-48 prima dello stress, seconda applicazione 24-48 h dopo	Volume d'acqua: 400 L/ha
4	Megafol	3	Prima applicazione 24-48 prima dello stress, seconda applicazione 24-48 h dopo	Volume d'acqua: 400 L/ha

**Tabella 1: Protocollo della prova sperimentale.**

Nel corso della prova, sono stati eseguiti rilievi calendarizzati su vari parametri quali: vigoria, crescita, attività fotosintetica, danni da freddo ecc. in modo da essere in grado di analizzare eventuali variazioni tra le tesi e per poter poi condurre un'analisi statistica che servirà a verificare una potenziale significatività d'efficacia nell'applicazione del prodotto per ridurre i danni da stress termico. Al termine della prova, sono stati prelevati dei campioni di substrato di coltivazione per ogni tesi così da eseguire delle prove presso i laboratori di Scienze del Suolo del D3A UNIVPM sull'eventuale variazione dell'attività enzimatica del terreno; si sono condotte analisi dell'FDA e dell'ODP-O, anche queste accompagnate da analisi statistica.

### 3.2 Substrato di coltivazione

Il substrato di coltivazione utilizzato è un terriccio commerciale della ditta Potgond H. Klassmann), composto da torba nera vernalizzata e torba bionda di qualità professionale con aggiunta di concime minerale composto. È un terriccio a tessitura fine arricchito con concime idrosolubile e microelementi che aiuta lo sviluppo radicale e la crescita vegetativa della piantina ed è consigliato nelle prime fasi di semina e trapianto.

Analisi chimico-fisiche:

- Azoto (N/l): 210 mg/L;
- Fosforo ( $P_2O_5$ /l): 240 mg/L;
- Potassio ( $K_2O$ /l): 270 mg/L;
- Magnesio (Mg/l): 100 mg/L;
- tutti i più importanti microelementi, ferro in forma chelata.
- pH in  $H_2O$  = 6
- Conducibilità elettrica = 0.4 ds/m
- Densità apparente secca = 169  $kg/m^3$
- Porosità totale = 85%



**Figura 9: Potgrond H, substrato di coltivazione utilizzato durante la prova (sx), trapianto delle piantine di girasole da alveoli su vasetti singoli (dx) e successiva assegnazione delle tesi.**

### 3.3 Varietà utilizzate, stadi fenologici e semina.

#### 3.3.1 Mais

Per il mais, la varietà utilizzata è stata il DKC 3560, un ibrido molto precoce che permette di raggiungere il massimo livello produttivo anche in aree ostili, utilizzabile con tutti i tipi di terreno e piantabile ad una densità media di 9 semi al metro quadro. È una varietà tollerante alla siccità, con una fioritura anticipata ed un'elevata perdita di umidità finale.

La semina in alveoli è stata eseguita il giorno 28/09/22, mentre l'emergenza è avvenuta il 03/10/22; il trapianto è stato effettuato il 07/10/22 in vasetti singoli allo stadio fenologico 12 (secondo la scala BBCH), quindi con due foglie dispiegate. Di seguito vengono riportati gli stadi fenologici del mais che andranno a interessare questa prova indicati tramite la scala BBCH (tabella 2), un sistema a due cifre creato per uniformare ed omologare tutti i sistemi in circolazione; si compone di una prima cifra che va ad indicare lo stadio di sviluppo primario e la seconda che indica quello secondario. Le cifre usate non sono numeri, ma codici che non seguono linee temporali e non sono ordinali, cioè non seguono un ordine.

<b>Stadio principale di crescita 0: germinazione</b>	<b>Stadio principale di crescita 1: sviluppo fogliare</b>
00 seme asciutto	10 cotiledoni completamente spiegati
01 inizio imbibizione	11 prima foglia vera dispiegata
03 imbibizione completa dei semi	12, 13, 14, 15, 16: due, tre, quattro, cinque, sei foglie dispiegate
05 emergenza radichetta dalla cariosside	
07 emersione coleoptile dalla cariosside	
09 coleoptile emerge alla superficie	

**Tabella 2: Scala BBCH del mais nei primi due stadi di crescita che interessano la prova; la prima cifra va ad indicare lo stadio di sviluppo primario e la seconda quello secondario.**

### 3.3.2 Girasole

Per il girasole si è scelto di utilizzare la varietà SY Celesto, adatta alle semine anticipate, caratterizzata da un ciclo breve dalla durata di 66 giorni (emergenza-fioritura) e da una densità di semina di 6-6.5 semi/mq. La semina è stata effettuata manualmente il 28/09/22 in alveoli e l'emergenza della plantula è avvenuta il 7/10/22. Il giorno 12/10/22 si sono trapiantate le piantine in vasi singoli, lo stadio fenologico riconducibile alla scala BBCH è il 12 (tabella 3), ovvero corrisponde al primo paio di foglie spiegate.

<b>Stadio principale di crescita 0: germinazione</b>	<b>Stadio principale di crescita 1: sviluppo fogliare</b>
00 seme asciutto	10 prima foglia vera emersa dal coleoptile
01 inizio imbibizione	12 due foglie dispiegate
03 imbibizione completa dei semi	14-18 da quattro a otto foglie dispiegate
05 emergenza radichetta dalla cariosside	19 nove o più foglie dispiegate

06 radichetta allungata, peli radicali in via di sviluppo	
07 emersione coleoptile dalla cariosside	
09 coleoptile emerge alla superficie	

**Tabella 3: Scala BBCH del girasole nei primi due stadi di crescita che interessano la prova; la prima cifra va ad indicare lo stadio di sviluppo primario e la seconda quello secondario.**

### 3.4 Prodotto in analisi

Il prodotto utilizzato nella prova è il biostimolante Megafol Valagro® composto da:

- azoto (N) totale: 3,0% (1% organico, 2% ureico)
- ossido di potassio (K<sub>2</sub>O) solubile in acqua: 8,0%
- carbonio organico (C) di origine biologica: 9,0%

Le proprietà chimico-fisiche sono:

- Formulazione: liquida
- pH (1% in soluzione): 6,5
- Densità (g/cm<sup>3</sup>) 20°C: 1,22
- Colore: marrone
- Conducibilità E.C. -1‰ (mS/cm) 18°C: 0,3

Il prodotto, saggiato su varie colture, ha mostrato un'induzione di resistenza da parte delle piante in seguito a stress di natura abiotica; le dosi d'applicazione consigliate dall'azienda produttrice sono indicate in figura 9.



DOSI E MODALITÀ D'IMPIEGO	APPLICAZIONE FOGLIARE	COLTURA	PERIODO DI APPLICAZIONE	DOSE
		COLTURE FRUTTICOLE (VITE, MELO, PERO, AGRUMI, OLIVO, FRAGOLA)	in pre-fioritura, post-allegagione, ingrossamento frutti ed in tutti i casi di arresti vegetativi	2-3 L/ha
		COLTURE ORTICOLE (POMODORO, PEPERONE, MELANZANA, ZUCCHINO, CETRIOLO, INSALATE)	in pieno campo sotto serra intervenedo dal post-trapianto ogni 10-15 gg	2-3 L/ha 150 - 250 ml/ha
		COLTURE INDUSTRIALI (GIRASOLE, SOIA, TABACCO, BARBABIETOLA, SOIA, COTONE)	1-2 interventi durante il ciclo colturale	2,5-3 L/ha
		COLTURE ESTENSIVE (GRANO, MAIS, COLZA, RISO, SORGO)	1-2 interventi durante il ciclo colturale	1-3 L/ha

**Figura 10: Dosi e modalità d'impiego del concime liquido fogliare biostimolante Megafol Valagro® (Scheda tecnica Megafol Valagro®).**

### 3.5 Stress termico ed applicazione

#### 3.5.1 Mais

Lo stress termico ha avuto la durata di 48 ore e si è indotto nei giorni 13 e 14 ottobre 2022 all'interno di un congelatore da laboratorio per poi porre le piantine randomizzate in fitotrone alle stesse condizioni climatiche del controllo negativo (T1). Le condizioni climatiche di crescita sono state registrate durante il corso della prova mediante la capannina meteo nel fitotrone; di seguito (tabella 4) vengono riportati i trend dei parametri climatici per il mais:

No.	Date	Min Temp	Max Temp	Temp Unit	Min % Relative Humidity	Max % Relative Humidity	Additional Comments
1.	Sep-30-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
2.	Oct-1-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
3.	Oct-2-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
4.	Oct-3-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
5.	Oct-4-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
6.	Oct-5-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
7.	Oct-6-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
8.	Oct-7-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
9.	Oct-8-2022	23	25	C	65	70	2000 lux

10.	Oct-9-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
11.	Oct-10-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
12.	Oct-11-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
13.	Oct-12-2022	0	20	C	65	70	2000 lux
14.	Oct-13-2022	0	20	C	65	70	2000 lux
15.	Oct-14-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
16.	Oct-15-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
17.	Oct-16-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
18.	Oct-17-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
19.	Oct-18-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
20.	Oct-19-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
21.	Oct-20-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
22.	Oct-21-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
23.	Oct-22-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
24.	Oct-23-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
25.	Oct-24-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
26.	Oct-25-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
27.	Oct-26-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
28.	Oct-27-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
29.	Oct-28-2022	23	25	C	65	70	2000 lux

**Tabella 4: Principali parametri climatici registrati durante il corso della prova sul mais in camera climatica (fitotrone).**



**Figura 11: Congelatore da laboratorio FDM utilizzato per mantenere 48 ore le piantine di mais e girasole a 0°C.**

La prima applicazione, quindi, è stata eseguita 48 ore prima dello stress mentre la seconda 24 ore dopo. Il prodotto, formulato come soluzione concentrata, è stato applicato per via fogliare sulle dovute tesi mediante un erogatore che ha nebulizzato il tutto; la distribuzione sulla vegetazione è stata uniforme in modo da avere la stessa quantità ripartita su ogni pianta. L'applicazione ha seguito tutte le norme e le accortezze che si adottano in campo sperimentale per evitare contaminazioni di ogni genere ed in modo da realizzare un risultato oggettivo e privo di inquinamenti (stessa quantità distribuita su ogni pianta). La sostanza in esame è stata dispersa in acqua senza alcun problema e la solubilità era perfetta. L'acqua utilizzata è stata prelevata dalla rete del sito di prova (Pozzo Acquedotto del Ruzzo). Nessun problema è stato osservato durante la manipolazione dei materiali di prova e non si sono verificati difetti o problemi durante la preparazione del prodotto e l'applicazione. I dati dei due trattamenti (A e B) eseguiti sul mais vengono riassunti di seguito, in tabella 5:

	<b>A</b>	<b>B</b>
<b>Data applicazione</b>	<b>11/10/2022</b>	<b>14/10/2022</b>

<b>Inizio applicazione</b>	<b>9:00</b>	<b>10:00</b>
<b>Fine applicazione</b>	<b>9:30</b>	<b>10:30</b>
<b>Intervallo dalla appl. precedente</b>	<b>-</b>	<b>3 GIORNI</b>
<b>Metodo di applicazione</b>	<b>SPRAY</b>	<b>SPRAY</b>
<b>Stadio fenologico (BBCH)</b>	<b>12</b>	<b>12</b>
<b>Stadio maggiore (%)</b>	<b>12; 90</b>	<b>12; 80</b>
<b>Stadio minore (%)</b>	<b>11; 10</b>	<b>12; 80</b>
<b>Condizioni di crescita</b>	<b>In crescita attiva</b>	<b>In crescita attiva</b>
<b>Altezza coltura</b>	<b>10 cm</b>	<b>12 cm</b>
<b>Posizionamento appl.</b>	<b>FOGLIARE</b>	<b>FOGLIARE</b>
<b>Giorni dopo l'emergenza</b>	<b>8</b>	<b>11</b>
<b>Temperatura aria start/stop</b>	<b>19; 21 °C</b>	<b>18; 20 °C</b>
<b>% umidità relativa start/stop</b>	<b>65; 70</b>	<b>65; 70</b>
<b>Foglie bagnate (Y/N)</b>	<b>N; no</b>	<b>N; no</b>

**Tabella 5: Dati dei trattamenti 24-48 ore prima (A) e 24-48 ore dopo (B) lo stress termico sul mais: data applicazione, stadio fenologico coltura, metodo**

d'applicazione, condizioni climatiche e condizioni della coltura.



**Figura 12: Preparazione della dose con il prodotto in esame per successiva applicazione fogliare sulla coltura.**

### 3.5.2 Girasole

Per il girasole il procedimento è stato lo stesso descritto per la pianta di mais. Lo stress termico sul girasole è stato effettuato nelle 48 ore tra il 16 e il 17 ottobre; di seguito, in tabella 6, vengono riportati i parametri climatici registrati durante il corso della prova.

No.	Date	Min Temp	Max Temp	Temp Unit	Min % Relative Humidity	Max % Relative Humidity	Additional Comments
1.	Sep-30-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
2.	Oct-1-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
3.	Oct-2-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
4.	Oct-3-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
5.	Oct-4-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
6.	Oct-5-2022	23	25	C	65	70	2000 lux

7.	Oct-6-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
8.	Oct-7-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
9.	Oct-8-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
10.	Oct-9-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
11.	Oct-10-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
12.	Oct-11-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
13.	Oct-12-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
14.	Oct-13-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
15.	Oct-14-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
16.	Oct-15-2022	0	20	C	65	70	2000 lux
17.	Oct-16-2022	0	20	C	65	70	2000 lux
18.	Oct-17-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
19.	Oct-18-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
20.	Oct-19-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
21.	Oct-20-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
22.	Oct-21-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
23.	Oct-22-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
24.	Oct-23-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
25.	Oct-24-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
26.	Oct-25-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
27.	Oct-26-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
28.	Oct-27-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
29.	Oct-28-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
30.	Oct-29-2022	23	25	C	65	70	2000 lux

<b>31.</b>	Oct-30-2022	23	25	C	65	70	2000 lux
<b>32.</b>	Oct-31-2022	23	25	C	65	70	2000 lux

**Tabella 6: Principali parametri climatici registrati durante il corso della prova sul girasole in camera climatica (fitotrone).**

Il trattamento “A” è stato eseguito il 14 ottobre a sette giorni dall'emergenza della pianta e 48 ore prima dello stress mentre il trattamento “B” è stato eseguito il 17 ottobre a 24 ore dopo lo stress. Di seguito vengono riportati i dati del trattamento (tabella 7):

	<b>A</b>	<b>B</b>
<b>Data applicazione</b>	<b>Oct-14-2022</b>	<b>Oct-17-2022</b>
<b>Inizio applicazione</b>	<b>10:00</b>	<b>9:00</b>
<b>Fine applicazione</b>	<b>10:30</b>	<b>9:30</b>
<b>Intervallo dalla appl. precedente</b>	<b>-</b>	<b>3 DAYS</b>
<b>Metodo di applicazione</b>	<b>SPRAY</b>	<b>SPRAY</b>
<b>Stadio fenologico (BBCH)</b>	<b>12</b>	<b>12</b>
<b>Stadio maggiore (%)</b>	<b>12; 100</b>	<b>12; 100</b>
<b>Stadio minore (%)</b>	<b>12; 100</b>	<b>12; 100</b>
<b>Condizioni di crescita</b>	<b>In crescita attiva</b>	<b>In crescita attiva</b>
<b>Altezza coltura</b>	<b>5 cm</b>	<b>5 cm</b>
<b>Posizionamento appl.</b>	<b>fogliare</b>	<b>fogliare</b>
<b>Giorni dopo l'emergenza</b>	<b>7</b>	<b>10</b>
<b>Temperatura aria start/ Stop</b>	<b>20; 21 °C</b>	<b>20; 20 °C</b>

<b>% umidità relativa start/stop</b>	<b>70; 70</b>	<b>65; 70</b>
<b>Foglie bagnate (Y/N)</b>	<b>N; no</b>	<b>N; no</b>

**Tabella 7: Dati dei trattamenti 24-48 ore prima (A) e 24-48 ore dopo (B) lo stress termico sul girasole: data applicazione, stadio fenologico coltura, metodo d'applicazione, condizioni climatiche e condizioni della coltura.**

### 3.6 Concimazione ed irrigazione

Per entrambe le colture si sono eseguiti gli stessi interventi gestionali; la concimazione è avvenuta nello stesso momento e con la stessa dose per tutte le piante presenti all'interno della prova. Si è usato un concime minerale semplice della ditta PANFERTIL (Perfosfato semplice) composto dal 19% di anidride fosforica ( $P_2O_5$ ) e dal 25% di anidride solforica ( $SO_3$ ); essendo le piante disposte in vasetti singoli, si sono valutate le dosi sul singolo vasetto dando 1,5 grammi di prodotto ciascuno ad inizio ciclo colturale e umettando successivamente il terreno per attivare i granuli di concime.

L'irrigazione è avvenuta seguendo i fabbisogni idrici delle due colture mantenendo le piante idratate evitando deficit o surplus idrici. All'interno dei carrelli presenti nella camera climatica quando necessario veniva distribuito un velo sottile d'acqua che permetteva l'assorbimento radicale delle piante.





**Figura 13: Plot distribuiti all'interno della camera climatica al di sopra di un carrello; mantenere le repliche all'interno di cassette ha semplificato il trasporto di questi per eseguire i rilievi all'esterno del fitotrone.**

### 3.7 Rilievi

La scelta e la metodologia dei rilievi da eseguire è stata assegnata dallo sponsor della prova e l'azienda disponeva o si è dotata degli strumenti necessari per eseguire il lavoro. Ad ogni rilievo si sono misurati i valori su due piante delle tre che compongono la replica per poi mediare il tutto. Ad ogni rilievo è stata anche osservata l'eventuale fitotossicità del prodotto sulle due colture per poter poi segnalare un potenziale malfunzionamento di questo. In tabella 8 sono riassunti schematicamente i tipi di rilievo e i momenti in cui sono stati effettuati.

<b>Tipo di rilievo</b>	<b>Tempistiche</b>
SPAD	Prima dello stress; a stress concluso; 2-5-15 giorni dalla fine dello stress
NDVI	Prima dello stress; a stress concluso; 2-5-15 giorni dalla fine dello stress
Area fogliare	Prima dello stress; a stress concluso; 2-5-15 giorni dalla fine dello stress
plant growht index	Prima dello stress; a stress concluso; 2-5-15 giorni dalla fine dello stress
Danni su tessuti fogliari	Prima dello stress; a stress concluso; 2-5-15 giorni dalla fine dello stress
Leaf area index	Prima dello stress; a stress concluso; 2-5-15 giorni dalla fine dello stress
Numero di foglie	Prima dello stress; a stress concluso; 2-5-15 giorni dalla fine dello stress
Biomassa fresca aerea	A fine della prova

Biomassa secca aerea	A fine della prova
Biomassa fresca radicale	A fine della prova
Biomassa secca radicale	A fine della prova

**Tabella 8: Rilievi da effettuare durante il corso della prova su mais e girasole, ogni parametro è associato ad una data nella quale deve venir eseguito.**

### 3.7.1 SPAD

Lo SPAD (Chlorophyll Meter) è uno strumento capace di misurare il contenuto di clorofilla in modo rapido e non invasivo. La misura avviene su una porzione di foglia mediante l'apposita clip fogliare integrata sullo strumento ed il display va a indicare il contenuto di clorofilla espresso in unità SPAD. Lo strumento definisce poi anche il contenuto di azoto in quanto il rapporto tra il contenuto di clorofilla nelle foglie è direttamente proporzionale al contenuto di Azoto.



**Figura 14: SPAD (Chlorophyll Meter) utilizzato nella prova; nella foto a destra si può notare il rilievo eseguito su una piantina di girasole.**

### 3.7.2 NDVI

L'NDVI (Normalized Difference Vegetation Index) è un indice di vegetazione che descrive il livello di vigoria della coltura e si calcola come il rapporto tra la differenza e la somma delle radiazioni riflesse nel vicino infrarosso e nel rosso, ossia come  $(NIR-RED) / (NIR+RED)$ . Il valore dell'NDVI è stato valutato mediante lo strumento GreenSeeker, un dispositivo di rilevamento di facile utilizzo che può essere impiegato per valutare lo stato fitosanitario o la vigoria della pianta. Lo strumento dispone di un sensore che una volta acceso emette brevi raggi di luce rossa e infrarossa e, quindi, misura il tipo di luce riflessa. Il sensore continua a campionare l'area esaminata per tutto il tempo e alla fine rilascia un valore medio tra le piante esaminate. L'intensità della luce rilevata è un indicatore diretto del vigore della pianta. Il sensore mostra i valori rilevati su schermo LCD come lettura NDVI da 0.00 a 0.99; tanto più alta è la lettura, quanto più in salute sarà la pianta (tabella 9). Molto importante è definire una giusta altezza di rilevamento (tra i 0,6 e 1,2 m dalla coltura) e lasciarla invariata e stabile in tutti i rilievi.



**Figura 15: Misurazioni dell'indice NDVI mediante il GreenSeeker. Rilievo su piante di Mais (sx); rilievo su piante di girasole (dx).**

<b>NDVI</b>	<b>INTERPRETAZIONE</b>
<b>&lt;0.1</b>	<b>Suolo nudo o nuvole</b>
<b>0.1 – 0.2</b>	<b>Copertura vegetale quasi assente</b>
<b>0.2 – 0.3</b>	<b>Copertura vegetale molto bassa</b>
<b>0.3 – 0.4</b>	<b>Copertura vegetale bassa con vigoria bassa o copertura vegetale molto bassa con vigoria alta</b>
<b>0.4 – 0.5</b>	<b>Copertura vegetale medio-bassa con vigoria bassa o copertura vegetale molto bassa con vigoria alta</b>
<b>0.5 – 0.6</b>	<b>Copertura vegetale media con vigoria bassa o copertura vegetale medio-bassa con vigoria alta</b>
<b>0.6 – 0.7</b>	<b>Copertura vegetale medio-alta con vigoria bassa o copertura vegetale media con vigoria alta</b>
<b>0.7 – 0.8</b>	<b>Copertura vegetale alta con vigoria alta</b>
<b>0.8 – 0.9</b>	<b>Copertura vegetale molto alta con vigoria molto alta</b>
<b>0.9 – 1.0</b>	<b>Copertura vegetale totale con vigoria molto alta</b>

## **Tabella 9: Interpretazione dei valori medi di NDVI**

(<https://www.agricolus.com/indici-vegetazione-ndvi-ndmi-istruzioni-luso/>).

L'NDVI medio varia in base alla varietà e alla fase fenologica della coltura, piante che hanno lo stesso stadio fenologico ma il cui valore di NDVI è significativamente più basso rispetto alla media presentano problemi nello sviluppo vegetativo, che possono essere causati da fattori molto diversi come:

- stress nutrizionali
- attacchi parassitari
- forti danni da grandine o gelata

Visto che le piante di girasole e mais sono state messe nelle migliori condizioni climatiche, nutrizionali e sanitarie, l'unica imputazione da fare per valori di NDVI diversi è lo stress termico avvenuto per 48 ore a 0°C.

### 3.7.3 Area fogliare

Per valutare l'area fogliare si è utilizzato il dispositivo "Petiole", uno strumento che mediante una fotocamera digitale ed in seguito a calibrazione definisce l'area fogliare di una pianta. La calibrazione avviene in base alle dimensioni della pianta e viene eseguita tramite schede che vengono selezionate prima del rilievo così che, una volta calibrato, lo strumento è pronto ad analizzare l'area. Importante è fissare un'altezza che dovrà restare la stessa per tutti i rilievi e delimitare la zona da misurare con una colorazione neutra; infatti, attorno al colletto di ogni pianta è stata disposta una fascia bianca che ha permesso la specifica rilevazione degli organi verdi escludendo il terreno nel vasetto sottostante.



**Figura 16: Rilevazione dell'area fogliare mediante lo strumento "Petiole": foglio di calibrazione utilizzato prima di ogni misurazione (sx alto); rilevazione ad un'altezza prestabilita su piantina di girasole, sfondo bianco per permettere l'esclusiva valutazione degli organi verdi (dx alto, sx basso); visualizzazione**

**tramite la schermata dell'applicazione "Petiole", sullo schermo in basso viene indicata la superficie fogliare in cm<sup>2</sup> (dx basso).**

#### 3.7.4 Plant growth index

Il Plant growth index è un indice che va a descrivere la crescita di una coltura e si estrapola da un'analisi quantitativa misurando l'altezza e le due larghezze in direzione perpendicolare di due piante su tre per ogni plot. La formula utilizzata è:

$-(ht+diam1+diam2)/3$  (Monterusso et al., 2005, Gibbs et al., 2006).

#### 3.7.5 Danni su tessuti fogliari

Il danneggiamento dei tessuti è un parametro valutato dall'operatore, qui l'esperienza nel campo della sperimentazione ha permesso una valutazione il più oggettiva possibile senza contaminazioni. Come nei molti casi affrontati durante l'esperienza lavorativa, il rilievo si basa sulla percentuale di copertura del danno sulla pianta; tra gli effetti del freddo si può notare una perdita di colore nei tessuti, una riduzione di vigoria, un rallentamento del ciclo, macchie necrotiche sulla foglia o sui margini.



**Figura 17: Danni su tessuti fogliari a confronto, piante sottoposte per 48 ore a 0 °C, tesi 2 non trattata (controllo negativo), tesi 3 trattata a 2 L(ha), danni su girasole (alto) e su mais (basso).**

### 3.7.6 Leaf area index

Il Leaf Area Index (LAI) è un indice definito come la superficie fogliare totale che intercetta l'energia luminosa espressa in relazione all'area di terreno sottostante (Watson, 1947).

È un'importante informazione per definire l'estensione della superficie dei tessuti fotosinteticamente attivi. Vari studi hanno dimostrato che è possibile ricavare il LAI in modo empirico mediante altri indici come l'NDVI, l'MSR e l'MSAVI. L'NDVI è l'indice più utilizzato, sviluppato (Rouse J. Et al., 1974) e accettato dai ricercatori come punto di riferimento per confrontare algoritmi di inversione alternativi. Tra i vari algoritmi quello più consigliato per le colture estensive (Regina P. et al., 2017) è il modello di Peterson (Peterson et al., 1987) che si esplica con la seguente formula:

$$-(0.52*((NDVI+1) / (1-NDVI))) ^ 1,175$$

Quindi per ricavare l'indice LAI si sono utilizzati i precedenti rilievi sull'NDVI applicati sul modello di Peterson.

### 3.7.7 Numero di foglie

Il numero di foglie è un semplice rilievo visivo ma importante in quanto rispecchia la vigoria e l'andamento di crescita delle piante in seguito allo stress. Il parametro in questione è stato facile da osservare in quanto lo stadio fenologico della coltura era basso e ci si trovava nei primi stadi della scala BBCH.



**Figura 18: Differenti stadi fenologici su giovani piantine di mais, rilievo eseguito sul numero di foglie emerse.**



### 3.7.8 Biomassa fresca e secca

Alla fine della prova si è calcolata la biomassa, fresca e secca, della parte epigea ed ipogea di ambe due le colture. Per ogni tesi è stata asportata la parte aerea di due piante tagliandole alla base del colletto e la parte basale pulendo e lavando le radici dal residuo di terreno. Successivamente, le porzioni di pianta sono state pesate mediante bilancia di precisione WELLIH e trasferite nel laboratorio aziendale per procedere con l'essiccazione in stufa a temperatura costante.



**Figura 19: Pesatura della parte epigea di una tesi del mais (sx); lavaggio pre-essiccazione di radici di una pianta di mais (dx).**

Ciascuna tesi è stata distribuita sul piano dell'essiccatore e lasciata per minimo 6 ore a 70°C fino ad arrivare a peso costante. Una volta essiccato ogni campione è stato pesato con la stessa bilancia di prima e confrontato con il peso della biomassa fresca per determinarne il contenuto d'acqua.



**Figura 20: Essiccazione della biomassa epigea ed ipogea di piantine di mais a 70 °C fino a peso costante, effettuata nel laboratorio all'interno del centro di saggio Res Agraria.**

Questo rilievo ha permesso agli operatori di avere, oltre che dei dati sul peso della biomassa, un impatto visivo sulla grandezza e sulla morfologia dell'apparato radicale.





**Figura 21: Apparati radicali di mais a confronto, ogni tesi è stata trattata in diverso modo, la T1 è un controllo negativo, la T2 un controllo positivo mentre la T3 e T4 sono state rispettivamente trattate a dose crescente; per le foto sono stati scelti i campioni più rappresentativi tra le repliche della tesi.**

### 3.8 Analisi enzimatiche

In seguito all'asportazione della biomassa, si è scelto di effettuare delle ulteriori analisi sul substrato di coltivazione per monitorare eventuali variazioni a livello enzimatico. Pur essendo applicato per via fogliare, si è voluto indagare se il trattamento abbia avuto qualche effetto sull'attività enzimatica dei microrganismi del terreno, precisamente sulle idrolasi e o-DPO. Sono stati prelevati campioni di suolo che sono stati successivamente trasferiti presso l'università Politecnica delle Marche (UNIVPM), nel dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, all'interno dei laboratori di Chimica del Suolo dove sono stati conservati a basse temperature fino all'inizio delle analisi.

#### 3.8.1 FDA

L'attività delle idrolasi è stata valutata tramite il metodo messo a punto da Schnürer e Rosswall (1982), con degli adattamenti al protocollo.

I suoli sono stati setacciati a 2 mm eliminando così parti grossolane e/o eventuale materiale inerte, poi sono stati pesati 0,25 grammi di suolo (tre ripetizioni per ogni tesi?) e sono stati disposti all'interno di beute di vetro da 100 ml.



**Figura 22: Setacciamento dei suoli a 2 mm (sx); pesatura di 0,25 gr per replica e trasferimento in beute di vetro di 100 ml (dx).**

Una volta pesati i suoli, viene aggiunto 10 ml di FDA 10 ug/ml in tampone fosfato pH 7.6. La miscela FDA-suolo viene poi incubata in stufa a 37°C per un'ora; trascorso il tempo necessario la reazione viene bloccata con 10 ml di acetone.



**Figura 23: Trasferimento dei campioni trattati all'interno di un'incubatrice dove hanno trascorso un'ora a 37 °C (sx); campioni trattati con acetone post incubazione per bloccare la reazione (dx).**

A questo punto si procede con la centrifugazione a una velocità di 5000 giri/minuto per 5 minuti. Gli enzimi idrolitici presenti nel campione di suolo scindono la fluoresceinadiacetato di sodio in acetato di sodio e fluoresceina. È proprio la fluoresceina prodotta che conferisce la tipica colorazione giallo-fluorescente alla

soluzione. Infine, 2 ml di soluzione finale vengono trasferiti su cuvette in quarzo e analizzati tramite spettrofotometro per misurare l'assorbanza a 490 nm. I risultati sono stati espressi come  $\mu\text{g}$  di FDA idrolizzato  $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ .



**Figura 24: Centrifuga utilizzata nella prova (sx); spettrofotometro (dx).**

### 3.8.2 o-Difenolossidasi (o-DPO)

Per l'o-DPO si è utilizzato il metodo sperimentato da Perucci et al., 2000, apportando leggere modifiche in termini di quantità di terreno iniziale.

Reagenti:

- Tampone Fosfato (pH 6.5, 0.1 M)
- Catecolo 0.2 M in tampone Fosfato 0.1M.
- L-prolina 0.2 M in tampone Fosfato 0.1M.
- etanolo (EtOH)

La procedura prevede di pesare 0,25 g di suolo setacciato a 2 mm (tre ripetizioni per ogni tesi?) all'interno di un matraccio da 25 ml e di addizionarvi 2 ml di tampone Fosfato a pH 6,5; la miscela ottenuta è stata posta in termostato a 30°C e nel frattempo è stata preparata la soluzione di catecolo e prolina (in rapporto di 1:1) in tampone Fosfato termostatato. Dalla soluzione sono stati estratti 3 ml da aggiungere al campione di suolo; il tutto poi è stato incubato a 30°C per 10 minuti. Trascorso il tempo di incubazione, si è bloccata la reazione aggiungendo 5 ml di etanolo per poi centrifugare il tutto per 5 minuti a 5000 g/min. Infine si è misurata l'assorbanza dei campioni mediante spettrofotometro a 525 nm ponendoli all'interno di una cuvetta in quarzo. L'attività enzimatica è espressa come  $\mu\text{moli}$  di catecolo ossidato  $10 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  suolo

(su base di peso secco). Per i campioni in bianco si è applicata la stessa procedura ma senza suolo.



**Figura 25: Cuvetta in quarzo con all'interno un campione su cui si è effettuata reazione di o-DPO con conseguente colorazione violacea della soluzione.**

#### 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

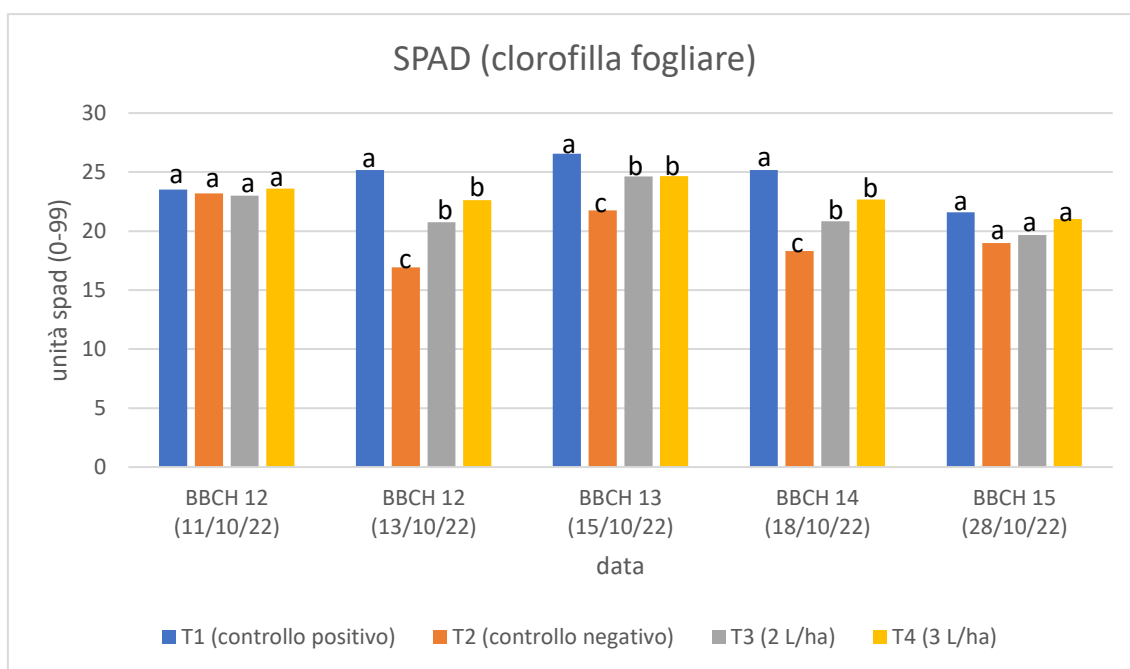
L'analisi statistica dei dati (ANOVA) è stata effettuata utilizzando il software ARM®. Il dato statistico utilizzato per il confronto tra le tesi è l'LSD (Least Significant Differences) in italiano DMS (Differenza Minima Significativa) che indica la significatività delle differenze tra le medie con probabilità  $p < 0,05$  e si denota con lettere minuscole (lettere uguali, nessuna differenza significativa, lettere differenti, differenza significativa, all'interno di ogni data di campionamento).

Anche la statistica applicata ai dati relativi all'attività o-difenolossidasi del substrato di coltivazione del mais è stata realizzata applicando R software (R Core Team, 2022) version 1.3.5 e utilizzando il test non parametrico Kruskal–Wallis per via della distribuzione non parametrica dei dati e valutando le differenze significative con probabilità  $p < 0,05$ .

##### 4.1 MAIS

Di seguito vengono riportati i grafici ottenuti dai rilievi sul mais; come definito in precedenza, ogni rilievo è calendarizzato a priori, viene associato al principale stadio fenologico (BBCH) riscontrato tra le piante e prevede l'analisi di due piante random tra

le tre che compongono una replica. Nei grafici sono stati direttamente inseriti i valori medi tra le repliche che compongono ogni tesi e le lettere di significatività secondo il test dell'LSD.

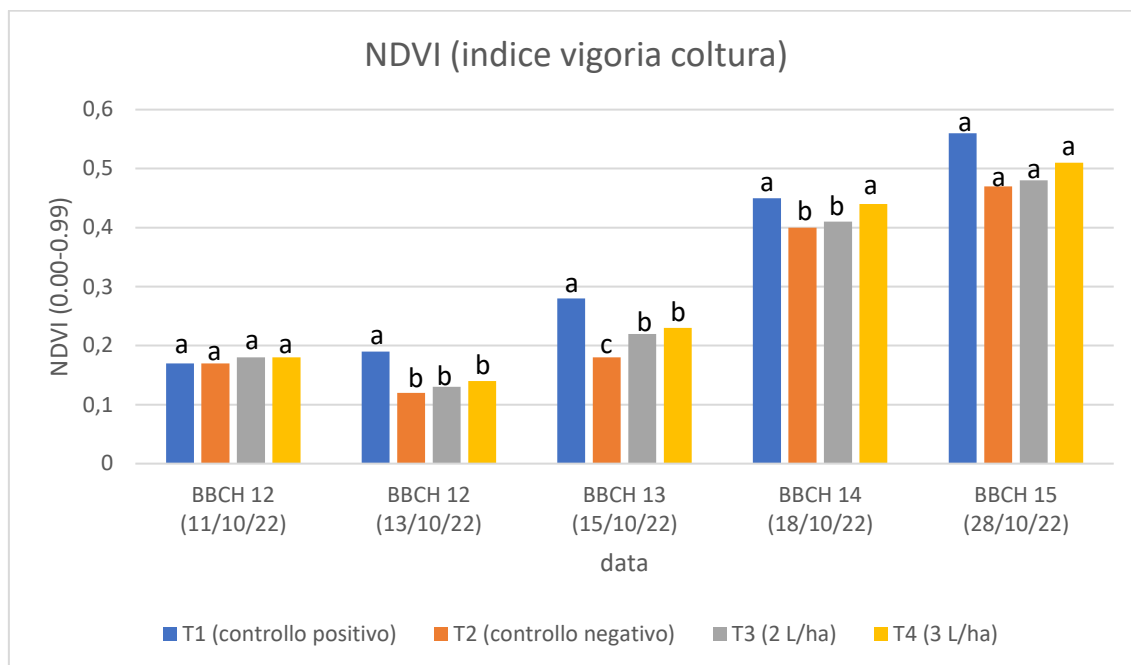


**Figura 26: Rilievi del contenuto di clorofilla su mais.**

Dalla figura 26 si può osservare che il primo rilievo eseguito precedentemente allo stress termico non ha portato variazioni significative tra le tesi che risultano molto omogenee; quindi, prima dello stress le piante avevano lo stesso contenuto in clorofilla. Al momento del secondo, terzo e quarto rilievo, eseguiti a 0, 2, 5 giorni dalla fine dello stress, è stata osservata una differenza significativa tra la tesi 1 (controllo positivo) e le tesi 2,3,4, mentre si è mostrata una differenza significativa tra le tesi 3 e 4 e la tesi 2 (controllo negativo); quindi la tesi 1, non trattata e non stressata, ha avuto un contenuto in clorofilla maggiore rispetto alle tesi trattate 3 e 4 che a loro volta hanno avuto un contenuto in clorofilla maggiore rispetto alla tesi 2, ovvero la tesi non trattata ma stressata. Quindi l'applicazione del prodotto ha permesso alle piante di reagire allo stress termico e produrre più clorofilla rispetto ad una pianta non trattata, con effetti positivi sull'attività fotosintetica e indirettamente sul contenuto di azoto nella foglia.

Ciò viene confermato da recenti lavori svolti sullo stress da basse ed alte temperature sul pomodoro, dove si è visto che piante trattate con il prodotto in questione aumentavano, rispetto al controllo, la sintesi di clorofilla e i tassi fotosintetici con conseguente miglioramento di vitalità della pianta (Chenxu Niu et al., 2022).

Nell'ultimo rilievo, eseguito a 14 giorni dall'applicazione "B", non si è individuata alcuna differenza significativa tra la tesi, indicando che anche il controllo negativo può recuperare il contenuto di clorofilla in un tempo più o meno breve.

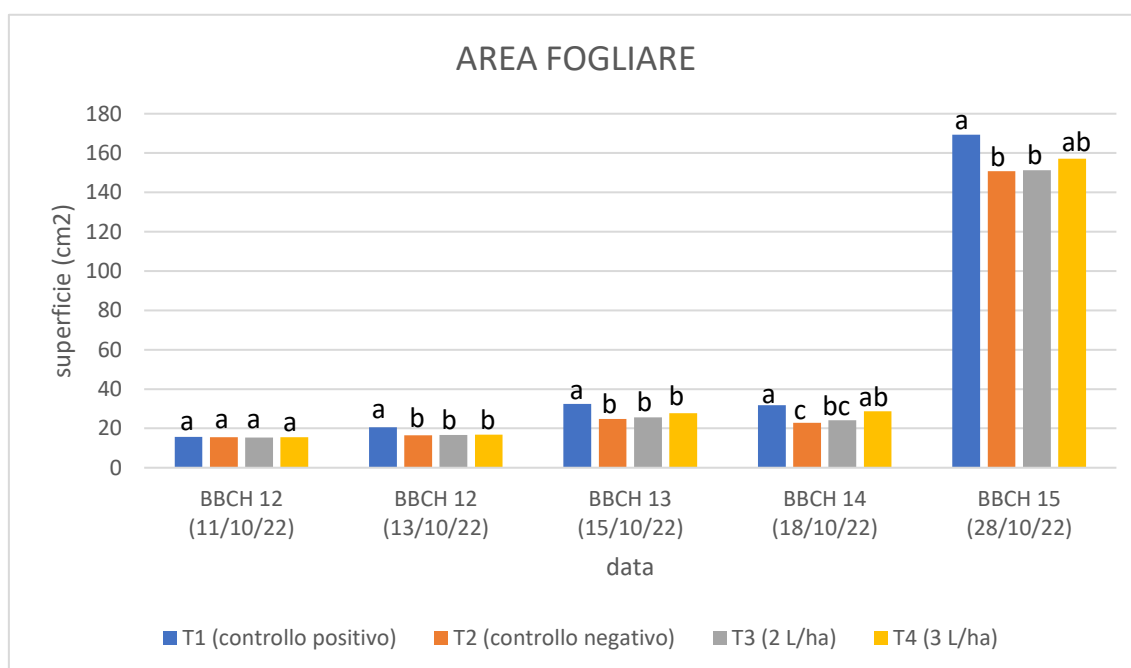


**Figura 27: Rilievi sull'NDVI effettuati mediante lo strumento GreenSeeker.**

I rilievi sull'NDVI (figura 27), ovvero un indice di vigoria della pianta, hanno portato risultati interessanti a due e cinque giorni dalla fine dello stress. Il primo rilievo eseguito non ha mostrato variazioni tra le tesi ed il motivo è stato proprio la non presenza del fattore di variabilità, ovvero lo stress termico. Il secondo ha mostrato una differenza significativa tra il controllo positivo e tutte le altre tesi; si ipotizza che lo stress, essendo appena concluso, non ha permesso alle piante trattate di reagire. Nel terzo rilievo, a due giorni dal termine delle basse temperature, la differenza significativa è stata osservata anche tra le due tesi trattate (T3 e T4) e il controllo negativo (T2). Quindi le piante trattate con il prodotto in questione hanno mostrato un indice di vigoria maggiore rispetto a quelle non trattate in seguito ad uno stress abiotico. Invece, nel quarto rilievo, a cinque giorni dallo stress, la differenza significativa si riscontra anche tra le tesi 3 e 4 mettendo in evidenza di fatto l'effetto dose; quindi, le piantine trattate con volumi di applicazione di 3 L/ha hanno mostrato una vigoria uguale al controllo positivo e maggiore rispetto al controllo negativo ed alle piantine trattate a 2 L/ha. La maggior dose d'applicazione ha permesso alle piante di avere un maggior indice NDVI dopo

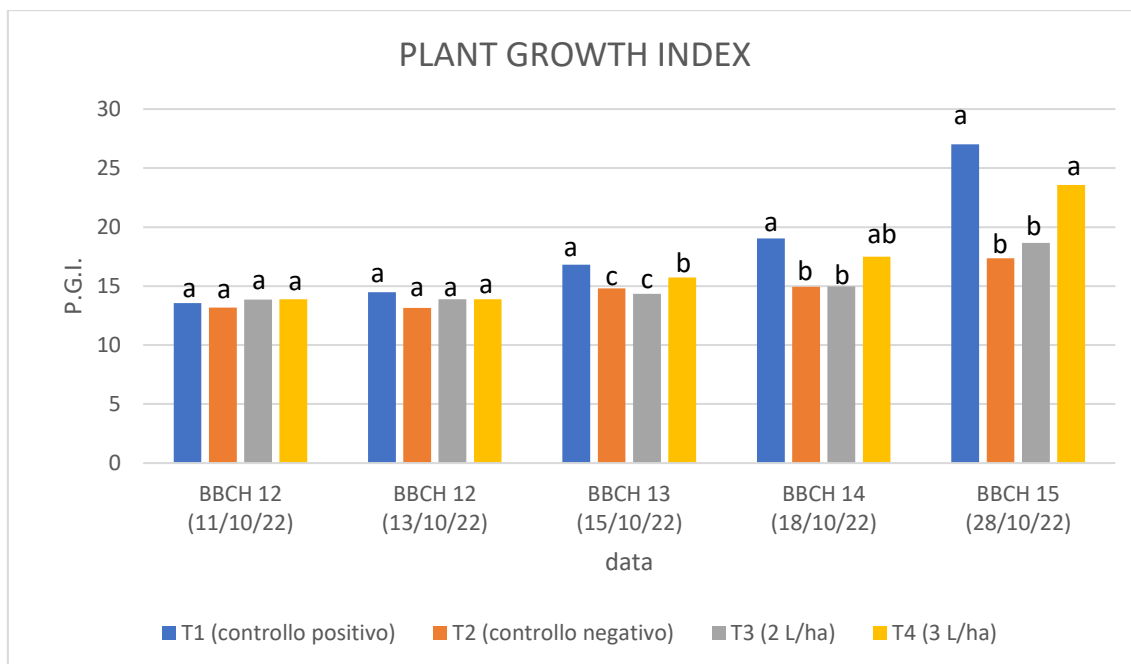


cinque giorni dallo stress termico; di fatto, le piante della tesi 4 hanno avuto una vigoria uguale a piante disposte nelle migliori condizioni di crescita. Il tutto va a confermare la maggior presenza di clorofilla che ha portato le piante trattate ad avere un indice NDVI più alto. L'ultimo rilievo invece non ha mostrato differenze significative tra le tesi, indicando che anche per questo parametro, le piante non trattate raggiungono valori simili alle altre.



**Figura 28: Rilievi sull'area fogliare delle piante di mais.**

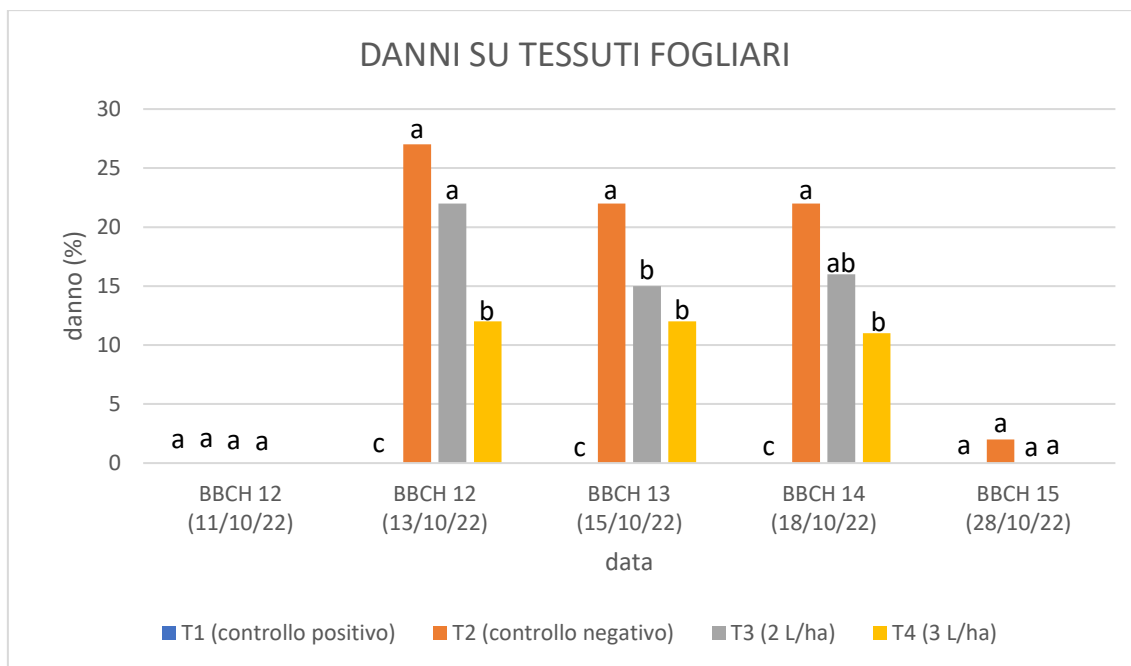
Per quanto riguarda l'area fogliare, i risultati sono riportati in figura 28. Anche in questo caso le differenze tra le tesi si sono iniziate a mostrare dal secondo rilievo in poi, infatti nel secondo e terzo si nota la differenza significativa tra il controllo positivo e tutte le altre tesi; quindi, fino a 2 giorni dallo stress, tutte le piante stressate mostravano la stessa area fogliare, il motivo principale potrebbe essere dato dalle corte tempistiche tra un rilievo e l'altro che non hanno permesso alle piante di esprimere le proprie performance nella produzione di superficie fogliare. Nel quarto rilievo, le tesi 1 e 4 mostrano una differenza significativa rispetto alla tesi 2 (controllo negativo), quindi le piante trattate a 3 L/ha hanno mostrato un'area fogliare simile a piante non stressate e maggiore a piante stressate. L'area fogliare cresce notevolmente nell'ultimo rilievo, nel quale la dose maggiore produce un'area fogliare simile al controllo positivo mentre le altre due tesi mostrano valori significativamente inferiori.



**Figura 29: Rilievi sull'indice Plant growth index (PGI) sulle piante di mais.**

I risultati sul Plant growth index (figura 29) mostrano che nel terzo rilievo, a due giorni dalla conclusione dello stress, il controllo positivo (T1) mostra differenze significative rispetto alle altre tesi, mentre la tesi 4 mostra differenze significative rispetto alle tesi 2 e 3; quindi, le piante trattate a 3 L/ha, hanno avuto una maggior crescita quantitativa rispetto a quelle trattate a 2 L/ha e a quelle non trattate, ma comunque rimanendo più bassa rispetto alle piante non stressate. Nei due rilievi successivi invece, la tesi 4 non mostra differenze rispetto al controllo positivo e, indicando un ritmo di crescita simile alle piante non stressate.

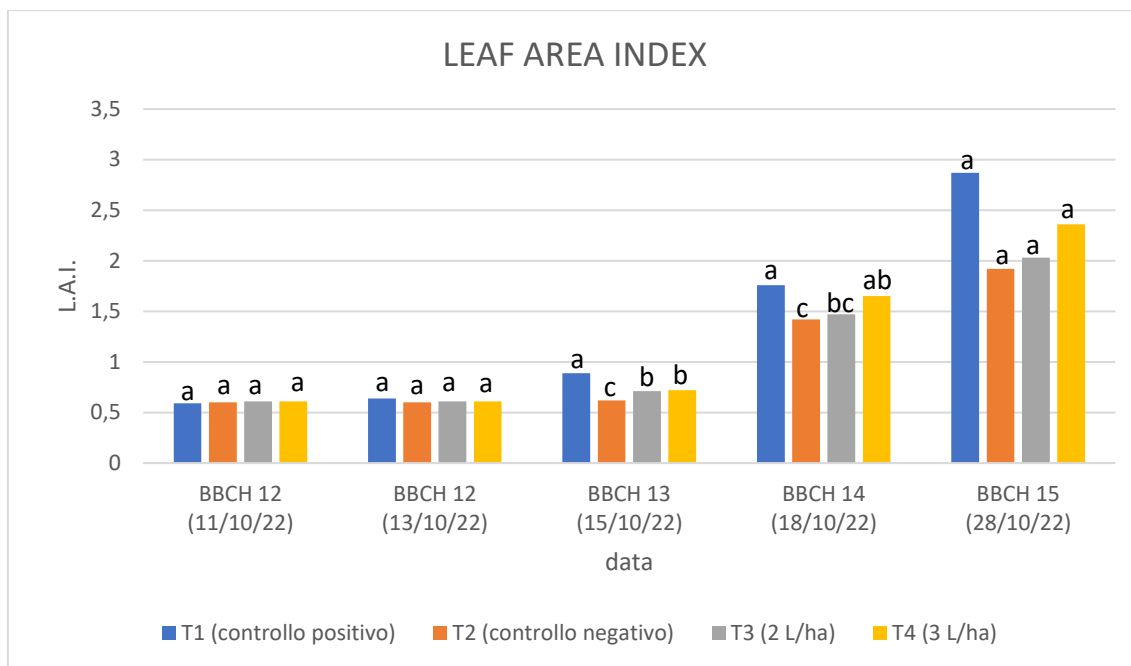
In questo tipo di rilievo l'effetto dose si è evidentemente manifestato; infatti, la tesi 3 non ha mai mostrato differenze significative con il controllo negativo (T2), mentre nel corso dei rilievi si è allontanata di molto dalla tesi 4 che invece si è equiparata al controllo positivo. Quindi la dose d'applicazione di 2 L/ha non ha influenzato la crescita delle piante in seguito allo stress, mentre l'applicazione di 3 L/ha ha portato, dopo 15 giorni dalla conclusione dello stress termico, una crescita uguale a piante messe nelle migliori condizioni ambientali.



**Figura 30: Danni su tessuti fogliari di mais in seguito a stress termico.**

Per quanto riguarda i danni causati dal freddo sui tessuti fogliari (figura 30), Il primo rilievo è servito semplicemente come accertamento in modo da verificare che non ci siano danni preesistenti sulla coltura e si è concluso con esito positivo. Quindi la tesi 1 in questo rilievo è servita solo come paragone per individuare eventuali danni causati da altri fattori estranei allo stress termico.

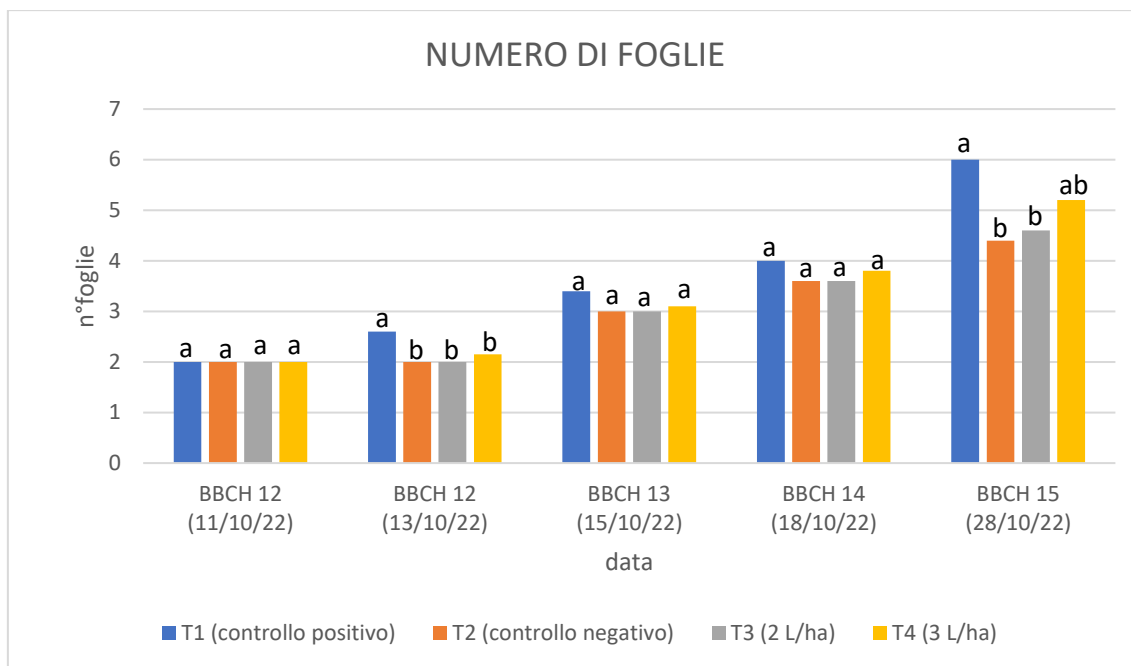
Il secondo rilievo, effettuato al termine dello stress termico, ha mostrato una differenza significativa tra le tesi 3 e la 4, palesando quindi che le piante trattate a dose maggiore hanno resistito meglio allo stress termico evidenziando meno danni sui tessuti fogliari. Il terzo rilievo, a due giorni dalla conclusione dello stress, ha abbassato tutte le incidenze portando le tesi 3 e 4 a non mostrare differenze significative tra loro, ma pur sempre una differenza con il controllo negativo e quindi con minor danni fogliari rispetto a piante non trattate. Andando avanti con i giorni e con i rilievi, l'incidenza si è andata sempre più ad abbassare, mostrando nelle due tesi trattate una ripresa eccellente con conseguente incidenza pari a zero nell'ultimo rilievo eseguito. Quindi tutte le piante hanno riassorbiti i danni fogliari che si sono creati durante lo stress, le piante trattate però hanno avuto meno danni ed hanno impiegato meno tempo nel riassorbirli.



**Figura 31: Rilievi sull'indice LAI che definisce la superficie fotosintetizzante eseguito sulle piante di mais.**

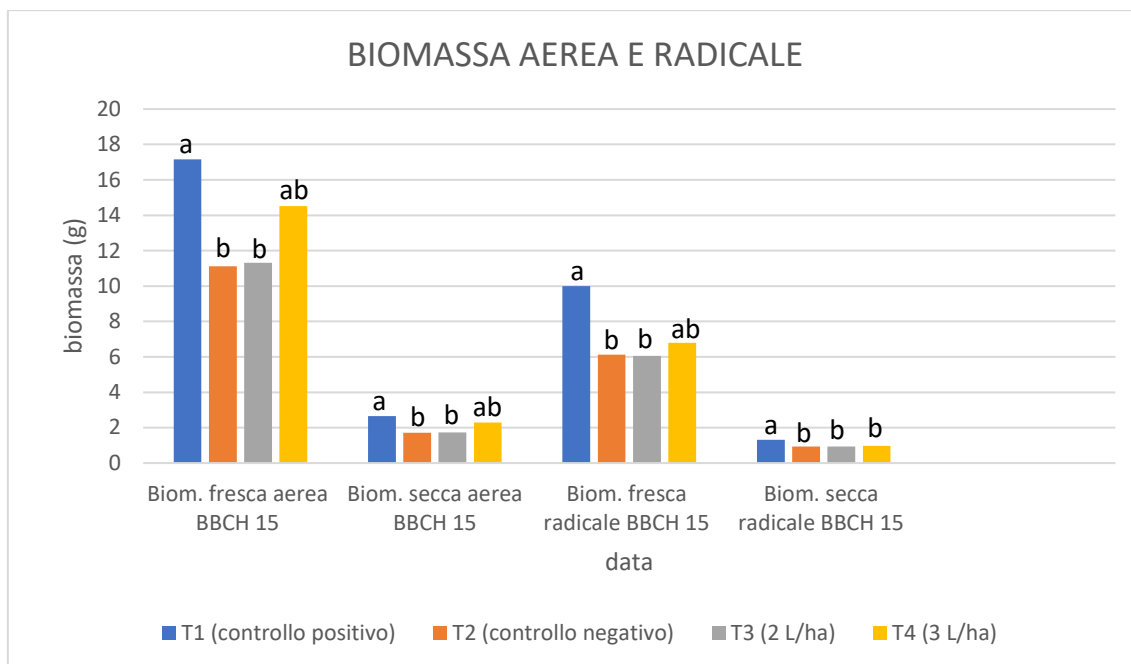
I rilievi sull'indice L.A.I. (figura 31) hanno mostrato che, a due giorni dalla fine dello stress termico, la tesi 1 (controllo positivo) ha mostrato differenze significative rispetto a tutte le altre tesi mentre, le tesi 3 e 4, rispettivamente trattate a dose crescente, hanno mostrato valori significativamente più elevati rispetto alla tesi 2 (controllo negativo); quindi, come nel caso della clorofilla e dell'NDVI, le piante trattate hanno avuto una superficie fotosinteticamente attiva maggiore rispetto alle piante non trattate in seguito ad uno stress termico.

Nel quarto rilievo, effettuato a 5 giorni dalla fine dello stress, si può notare come le differenze tra la tesi 4 ed il controllo positivo (T1) si assottiglino; quindi, le piantine di mais trattate a 3 L/ha con il biostimolante in analisi, dopo 5 giorni da uno stress da freddo, hanno avuto una superficie fotosinteticamente attiva statisticamente analoga a piante non sottoposte al freddo. Nell'ultimo rilievo non si manifesta significatività tra le tesi ma si può notare l'andamento crescente tra le tesi 2, 3, 4, 1.



**Figura 32: Rilievi sul numero di foglie delle piante di mais eseguiti durante il corso della prova.**

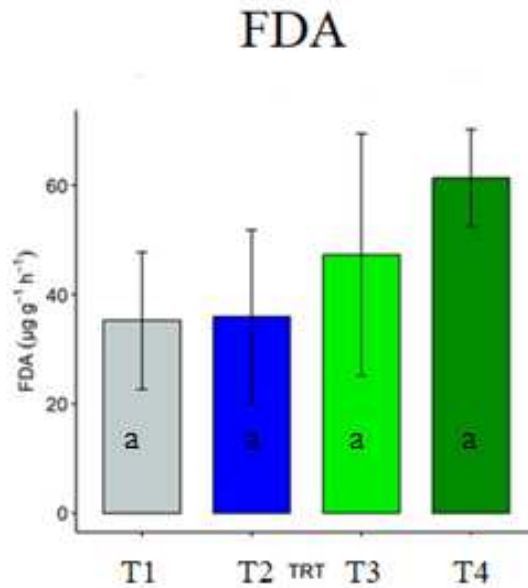
Il rilievo sul numero di foglie (figura 32) non mostra particolari differenze tra le tesi se non nell'ultimo rilievo a 15 giorni dalla fine dello stress in quanto il parametro preso in analisi ha bisogno di tempo per esprimere eventuali differenze. Dopo 15 giorni dallo stress si può notare che il controllo positivo presenta un numero di foglie significativamente più elevato rispetto al controllo negativo e alla tesi 3 (2 L/ha), mentre la tesi 4 (3 L/ha) si colloca nel mezzo. Di conseguenza, si può confermare che, in seguito ad uno stress termico, le piante di mais trattate a 3 L/ha con il prodotto in questione hanno formato un maggior numero di foglie rispetto alle piante non trattate e quasi lo stesso numero di foglie di piante non stressate. Il tutto può essere connesso alla maggior quantità di clorofilla, ai maggior tassi di crescita e indici L.A.I. riscontrati nei giorni successivi allo stress che hanno portato di conseguenza le piante trattate a produrre più foglie; interessante sarebbe visualizzare le differenze tra le piante in stadi fenologici più avanzati così da capire se il prodotto possa influenzare nel tempo l'emissione di foglie.



**Figura 33: Biomassa fresca epigea ed ipogea (g) di piantine di mais allo stadio fenologico di cinque foglie dispiegate.**

Il rilievo sulla biomassa (figura 33) ha sempre mostrato differenze significative tra il controllo positivo (T1) e la tesi 2 e 3, evidenziando quindi che il trattamento a 2 L/ha a questo stadio fenologico non ha espresso variazioni significative sulla biomassa prodotta rispetto al controllo negativo non trattato, sia sulla parte aerea che radicale. Si può notare invece che sulla biomassa epigea fresca e secca, la tesi 4 trattata a 3 L/ha non ha mostrato differenze significative rispetto al controllo positivo; la T4 si colloca a metà tra la T2-T3 e la T1, ma non si differenzia statisticamente sul controllo positivo; ha quindi dimostrato di riuscir a produrre più biomassa rispetto alle piante non trattate e trattate a 2 L/ha e di avvicinarsi alla biomassa di piante non stressate. La causa principale potrebbe essere lo stadio fenologico ridotto, infatti le piante al momento della pesata si trovavano allo stadio di cinque foglie dispiegate e probabilmente le maggiori differenze si sarebbero viste in stadi più avanzati.

In figura 34 vengono riportati i risultati dell'attività enzimatica FDA idrolisi del substrato in cui era presente la pianta di mais, nelle quattro tesi saggate, espressi come  $\mu\text{g}$  FDA idrolizzato  $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ .

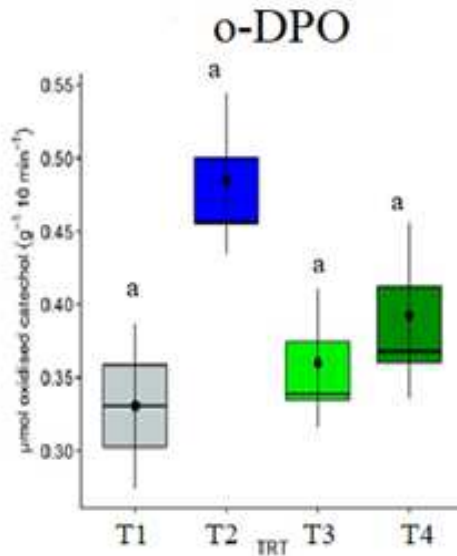


**Figura 34: Valori di FDA idrolisi ottenuti dall'analisi enzimatica su campioni di mais.**

Dall'analisi non sono emerse differenze significative tra le tesi anche se è possibile notare un andamento scalare tra le tesi in ordine crescente, dal controllo negativo fino alla dose più elevata che ha mostrato valori maggiori anche rispetto al controllo positivo (T1).

Nonostante l'elevata variabilità dei dati che non ha permesso di rilevare differenze significative si può comunque affermare che l'applicazione del prodotto ha in qualche modo incentivato il lavoro dei microrganismi nel terreno che hanno prodotto più enzimi quali proteasi, lipasi ed esterasi, tutti coinvolti nella decomposizione microbica della sostanza organica.

In figura 35, vengono riportati i risultati dell'attività enzimatica o-DPO del substrato in cui era presente la pianta di mais, nelle quattro tesi saggiate, espressi come  $\mu\text{mol di catecolo ossidato g}^{-1} 10 \text{ min}^{-1}$ .



**Figura 35: Valori di o-DPO ottenuti dall'analisi enzimatica su campioni di mais.**

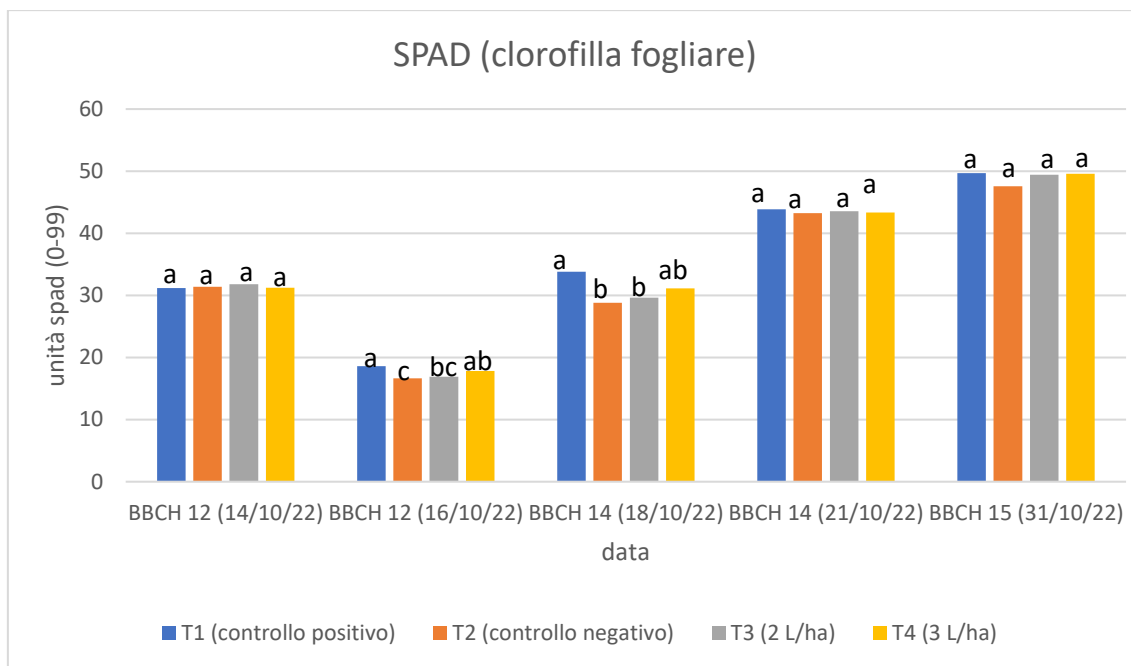
Dall'analisi non sono emerse differenze significative tra le tesi. L'applicazione del prodotto, quindi, non ha avuto effetti sull'attività delle o-Difenolossidasi in giovani piantine di mais in seguito a stress termico. Nonostante l'elevata variabilità dei dati, è possibile notare comunque che tale attività risulta più elevata nel controllo negativo, indicando che lo stress provoca un rallentamento del processo di umificazione, portando ad una maggiore presenza di acidi fulvici rispetto agli acidi umici, i quali possono essere attaccati dalle o-difenolossidasi con più facilità; tale attività non viene comunque completamente recuperata con l'aggiunta del biostimolante ad entrambe le dosi.

L'attività delle o-difenolossidasi indica la presenza di strutture organiche complesse nel suolo, con pesi molecolari elevati e alto grado di aromaticità. Lo stress potrebbe aver provocato una interruzione dell'attività di riarrangiamento delle componenti organiche del substrato operata dalla microflora batterica nelle tesi 3 e 4 indicando che l'aggiunta del biostimolante non ha effetto su questa particolare attività enzimatica.

#### 4.2 GIRASOLE

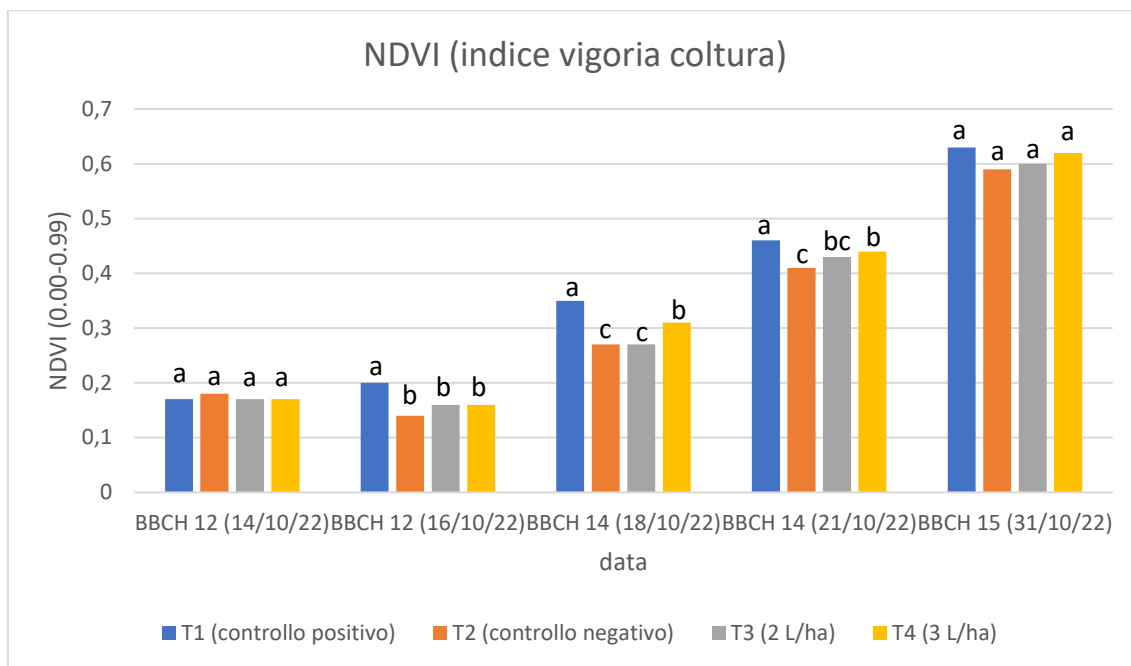
Di seguito vengono riportati i grafici dei rilievi effettuati sul girasole.





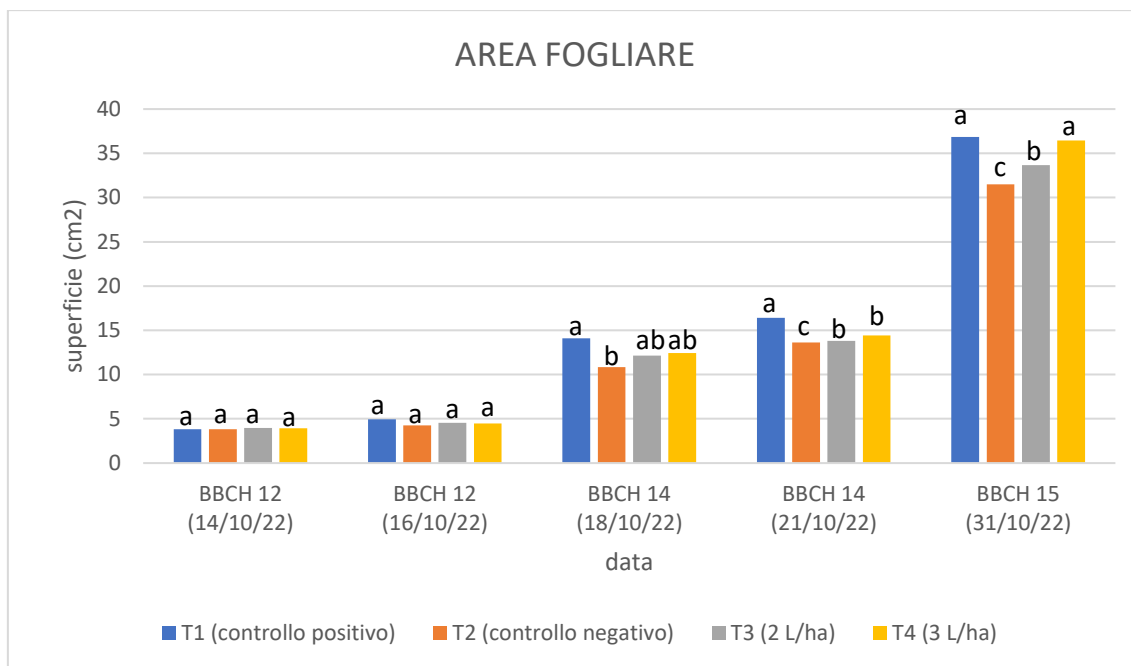
**Figura 36: Rilievi del contenuto di clorofilla su girasole.**

Nella misurazione riguardante il contenuto in clorofilla (figura 36), il primo rilievo, effettuato prima dello stress, non ha mostrato differenze tra le piante che si trovavano nelle stesse condizioni di crescita. Il secondo rilievo, effettuato al termine dello stress termico, mostra una differenza significativa tra la tesi 1 (controllo positivo) e le tesi 2-3 (controllo negativo e tesi trattata a 2 L/ha), mentre la tesi 4 si colloca al centro; quindi, l'effetto dose in questo caso si può notare ma non ha avuto performance così elevate da mostrare una differenza significativa con la tesi a minor volume d'applicazione (T3); le piante trattate a 3 L/ha hanno quindi avuto un contenuto in clorofilla poco più basso del controllo positivo e poco più alto del controllo negativo e della tesi trattata a 2 L/ha. La situazione è simile nel rilievo a due giorni dal termine dello stress, dove è possibile osservare una scalarità tra le tesi, anche se non ci sono differenze significative. Nei rilievi successivi invece il contenuto di clorofilla è simile in tutte le tesi indicando come in questo caso, a differenza del mais, il prodotto ha meno influito sul contenuto in clorofilla delle foglie ed anche che lo stress non ha provocato particolari effetti negativi su questo parametro.



**Figura 37: Rilievi sull'NDVI effettuati mediante lo strumento GreenSeeker.**

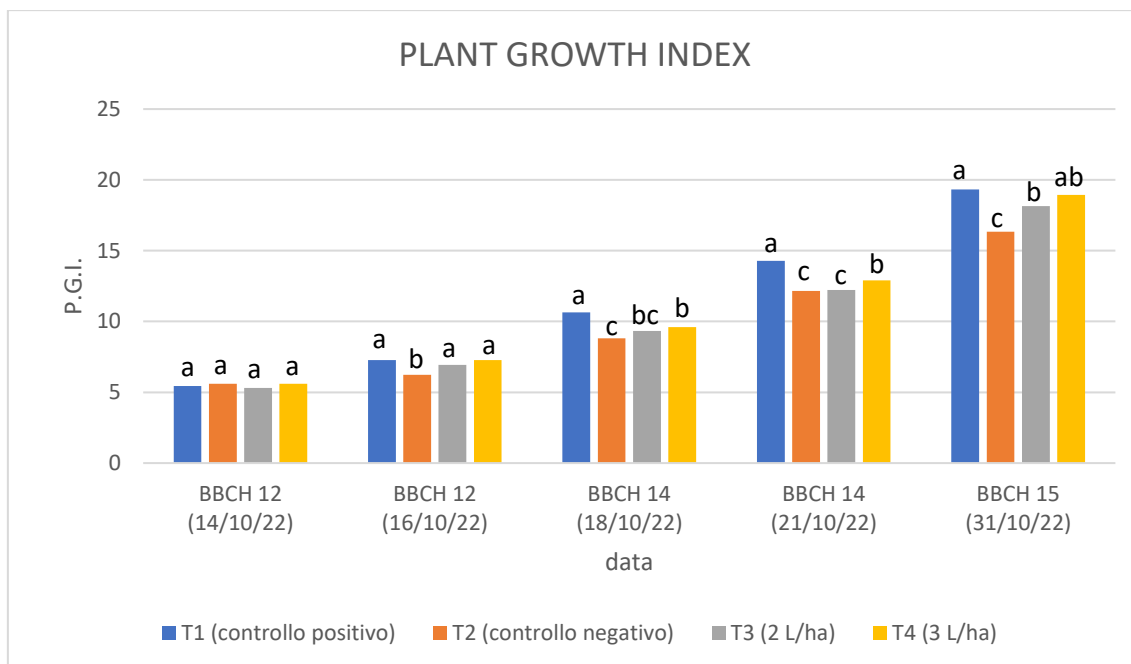
Per quanto riguarda l'indice di vigoria della coltura (NDVI, figura 37), a stress concluso, il controllo positivo mostra una differenza significativa rispetto a tutte le tesi; a due giorni dalla fine dello stress invece si manifesta l'effetto dose mostrando una differenza significativa tra la tesi 4 (3 L/ha) e la tesi 3 (2 L/ha); quindi, in seguito ad uno stress termico, il trattamento a dose maggiore (3 L/ha) ha aumentato il livello di vigoria della coltura di girasole rispetto a quelle non trattate e a quelle trattate a dose minore. Nei giorni successivi però, la situazione si va piano piano stabilizzando tra le tesi fino all'ultimo rilievo, effettuato a 15 giorni dalla fine dello stress, dove l'analisi statistica non mostra differenze significative tra tutte le tesi. Quindi nei primi giorni successivi allo stress, le piante trattate hanno avuto una maggior vigoria rispetto a quelle non trattate ma, col decorrere del tempo, anche le piante non trattate sono riuscite ad avere un indice di vigoria statisticamente vicino alle piante trattate.



**Figura 38: Rilievi sull'area fogliare di piante di girasole.**

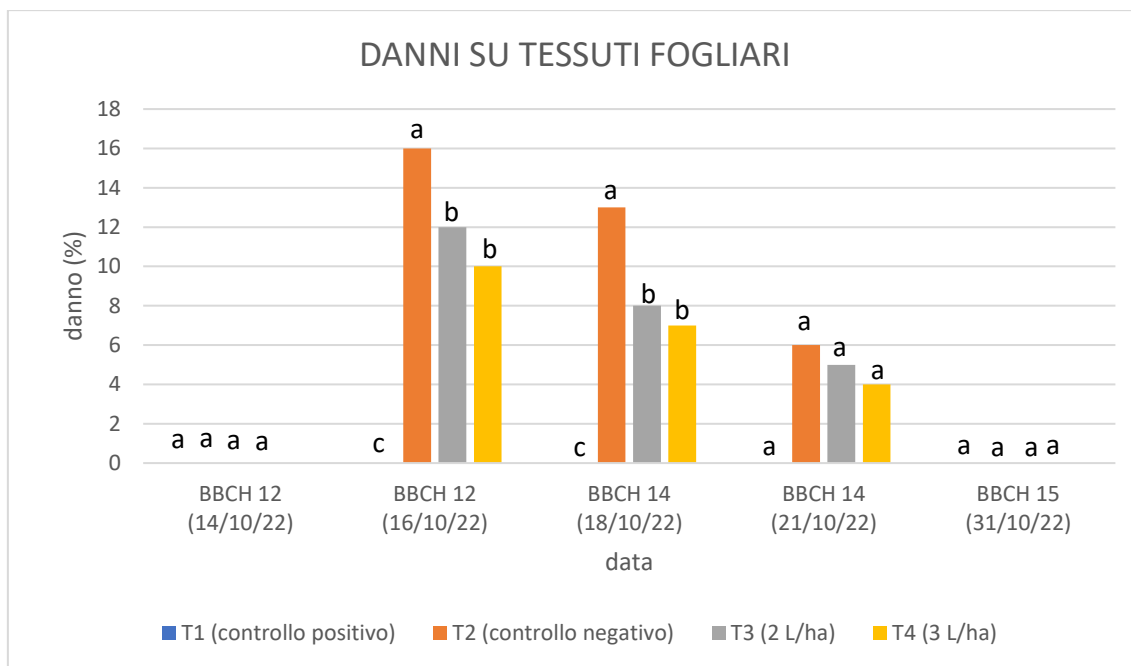
I risultati più evidenti sul parametro dell'area fogliare (figura 38) sono stati osservati a 5 e 15 giorni dalla fine dello stress termico in quanto la crescita è una conseguenza dello stato di salute della pianta; quindi, se nei rilievi precedenti si poteva visualizzare un effetto immediato dello stress, in questo l'incidenza si è vista nel tempo come una conseguenza delle condizioni di deficit di crescita delle piante.

A 5 giorni dallo stress si evidenzia una differenza significativa tra il controllo positivo e tutte le altre tesi stressate e tra le tesi trattate ed il controllo negativo; e cioè le piante non stressate hanno prodotto una maggior superficie fogliare rispetto a tutte quelle stressate mentre, tra quelle stressate, le piante trattate hanno prodotto più superficie rispetto a quelle non trattate. A 15 giorni dallo stress invece, la tesi trattata a 3 L/ha (T4) ha mostrato dei valori di area fogliare statisticamente uguali al controllo positivo e significativamente più elevati del controllo negativo e della tesi trattata a 2 L/ha (T2 e T3). Quindi le piante trattate con dose maggiore (3 L/ha) hanno avuto una ripresa più efficiente dallo stress abiotico producendo di conseguenza più area fogliare rispetto alle piante trattate a dose minore (2 L/ha) e alle piante non trattate.



**Figura 39: Rilievi sull' sull'indice Plant growth index su giovani piantine di girasole.**

Dai rilievi dell'indice di crescita PGI (figura 39) si può notare che a termine dello stress le piante trattate ed il controllo positivo hanno mostrato una differenza significativa rispetto al controllo negativo ; quindi in seguito ad uno stress termico di due giorni le piante trattate hanno avuto un indice di crescita uguale a piante poste nelle miglior condizioni di crescita e maggiore a piante non trattate; col passare dei giorni, nei successivi due rilievi, si può notare la significatività che si manifesta anche tra le tesi trattate mettendo in evidenza l'effetto dose del prodotto. Di fatto, dopo 5 giorni dallo stress, le piante trattate a 3 L/ha hanno mostrato un indice di crescita maggiore rispetto a piante trattate a 2 L/ha. Nel corso dei rilievi e specialmente nell'ultimo rilievo a 15 giorni dallo stress si può notare l'assottigliamento tra i valori del controllo positivo e la tesi 4 trattata a dose più elevata; questo mette in risalto il fatto che le piante trattate a 3 L/ha hanno avuto una ripresa ed una crescita superiore a quelle non trattate e quasi uguale alle piante non stressate.



**Figura 40: Danni su tessuti fogliari di piante di girasole.**

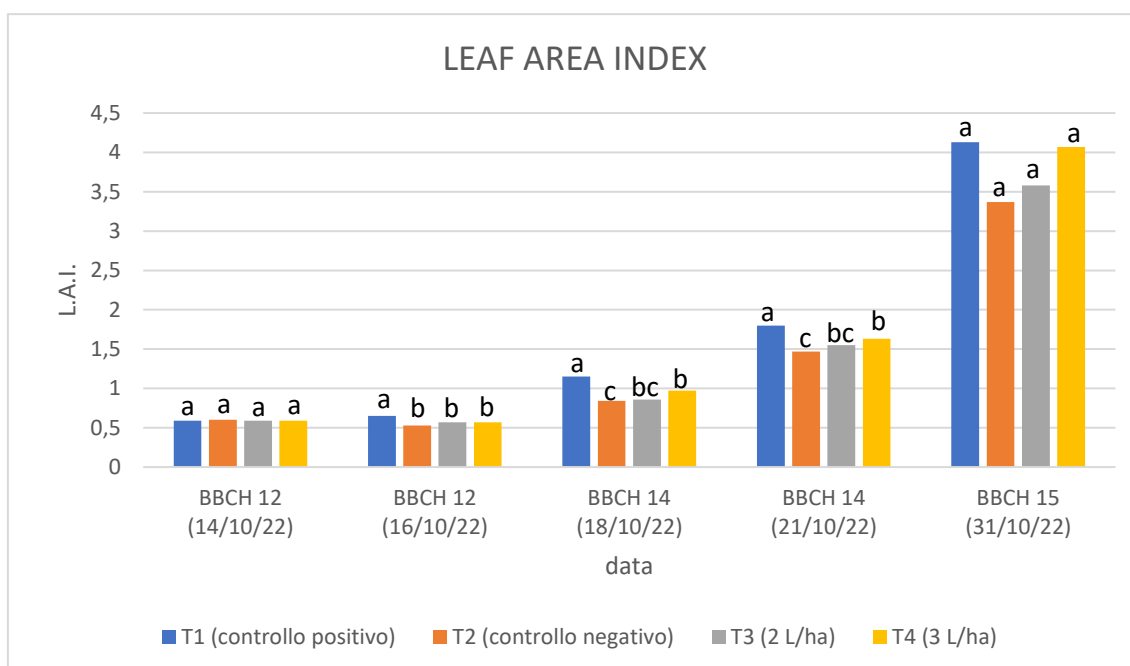
Il primo rilievo riguardante i danni fogliari causati dallo stress (figura 40) può essere considerato come preventivo in quanto ha solo lo scopo di evidenziare eventuali danni dovuti alle pratiche precedenti che non dovranno essere valutati in seguito allo stress; il rilievo non ha mostrato queste condizioni e tutte le piante della prova sono state valutate senza danneggiamenti; quindi, ogni danno da qui in poi è stato valutato come danno causato da freddo.

Nel secondo e terzo rilievo, rispettivamente a fine stress ed a due giorni dalla fine dello stress, si è mostrata la differenza significativa tra le tesi trattate ed il controllo negativo; quindi, le piante trattate hanno risposto in maniera più efficiente allo stress manifestando quindi meno danni sulla superficie fogliare rispetto alle piante non trattate.

Nel quarto rilievo la percentuale di danno si assottiglia tra le tesi; infatti, c'è sempre una scalarità di danno crescente tra le tesi 3-4-2, ma non si evidenziano differenze significative.

Nell'ultimo rilievo, a 15 giorni dallo stress, l'incidenza viene valutata pari a zero su tutte le piante della prova; quindi, si evidenzia che il danno fogliare visibile ad occhio nel tempo è stato riassorbito anche nelle piante non trattate; il fattore principale che ha ridotto l'incidenza nel corso dei rilievi è stata proprio l'emissione di nuove foglie

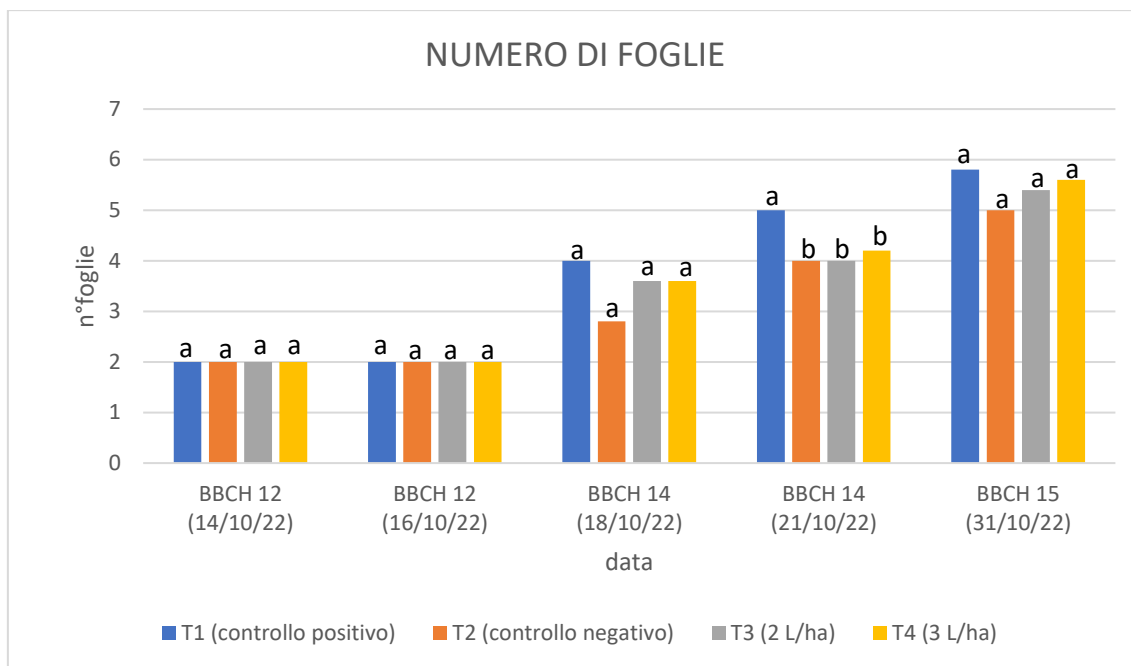
da parte delle piante che non sono state valutate in quanto non sottoposte a stress da freddo. Invece, il maggior danno sulle foglie di piante non trattate si ripercuote negativamente sulla produzione futura di biomassa e sulla crescita della coltura.



**Figura 41: Rilievi sulla superficie fotosintetizzante di giovani piantine di girasole;**

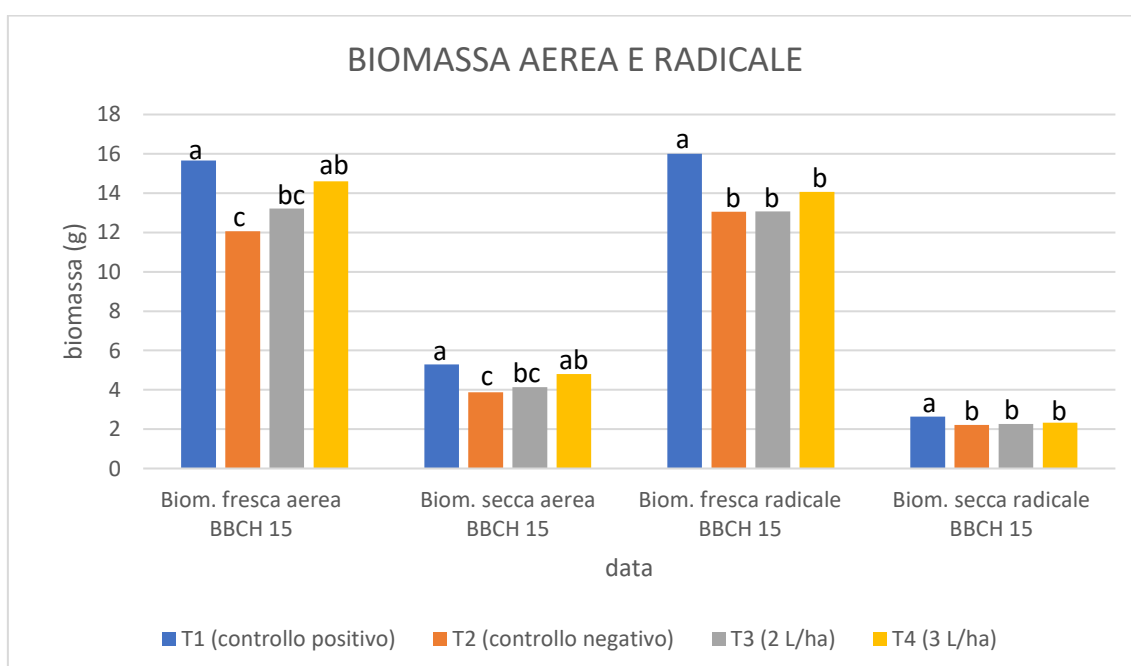
Per quanto riguarda l'indice LAI (figura 41), dal secondo rilievo fino al quarto, il controllo positivo mostra differenze significative con tutte le tesi mentre le differenze tra le altre tesi si vanno a manifestare con il passare dei giorni; si può notare che nel quarto rilievo, eseguito a 5 giorni dallo stress, la tesi 4 mostra una differenza significativa con il controllo negativo mettendo in luce che le piantine trattate a 3 L/ha hanno avuto una superficie fotosintetizzante maggiore rispetto a quelle non trattate in seguito a stress termico.

Nell'ultimo rilievo invece non si evidenziano differenze significative tra tutte le tesi ma la scalarità tra queste è ben evidente; infatti, si può notare dal grafico che la tesi 4 si avvicina di molto al controllo positivo rispetto alla tesi 3 ed al controllo negativo.



**Figura 42: Rilievi sul numero di foglie delle piantine di girasole eseguiti durante il corso della prova.**

Nella valutazione del numero di foglie (figura 42), le tempistiche ridotte tra un rilievo e l'altro non hanno permesso un'espressione evidente della differenza tra le tesi, il dato avrebbe potuto mostrare variazioni in stadi più avanzati. Infatti, solo nel quarto rilievo si evidenzia una differenza significativa tra il controllo positivo e le altre tesi stressate. La durata della prova non ha permesso alla coltura di manifestare una minor o maggior emissione di foglie statisticamente visibile.

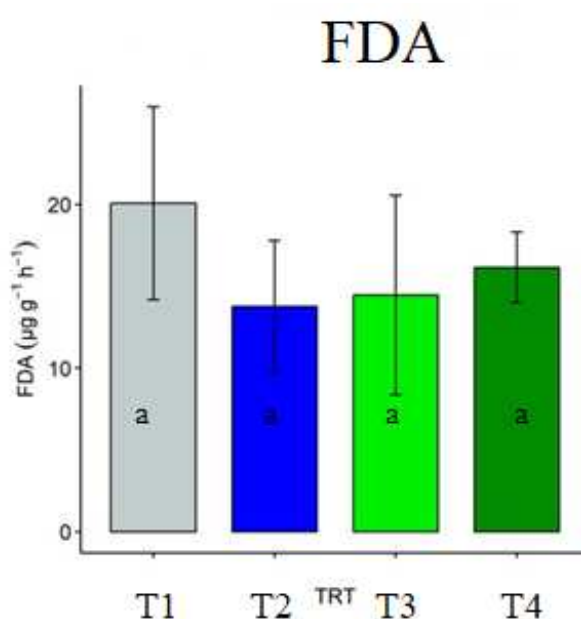


**Figura 43: Biomassa fresca epigea ed ipogea (g) di piantine di girasole allo stadio fenologico di cinque foglie dispiegate.**

Sulla biomassa fresca della parte epigea (figura 43) si può notare la differenza significativa tra la tesi 1 (controllo positivo) e le tesi 2 e 3 (controllo negativo e trattamento a 2 L/ha), quindi lo stress indotto sulle tesi 2 e 3 ha portato una biomassa inferiore rispetto alle piante non stressate; interessante è vedere la tesi 4 che si colloca nel mezzo mostrando differenza significativa con il controllo negativo ma con un dato non così forte da poterne dimostrare l'effetto dose a confronto con la tesi 3. Collocandosi nel mezzo, la tesi 4 (3 L/ha) ha prodotto una biomassa aerea a metà tra il controllo positivo e la tesi 3 (2 L/ha), ma maggiore rispetto al controllo negativo. Successivamente all'essiccazione della parte epigea, i dati non variano e le condizioni statistiche restano uguali.

Per quanto riguarda la biomassa radicale, si nota una differenza significativa tra il controllo positivo e tutte le tesi; quindi, lo stress termico ha influito sulla crescita radicale che è risultata inferiore nelle tesi stressate; l'applicazione del prodotto non ha inciso statisticamente, così come in post essiccazione;

In figura 44, vengono riportati i risultati dell'attività enzimatica FDA idrolisi del substrato in cui era presente la pianta di girasole, espressi come  $\mu\text{g FDA idrolizzato g}^{-1} \text{h}^{-1}$ .

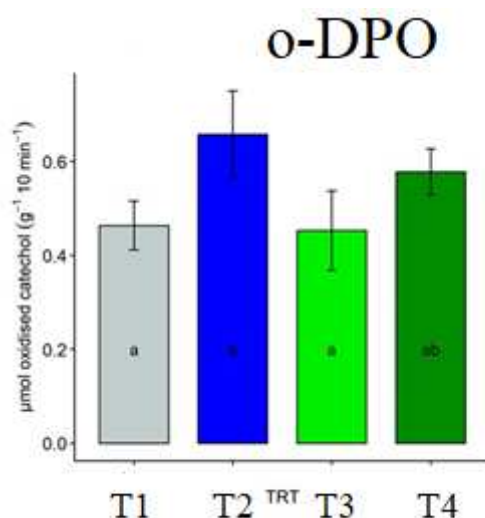




**Figura 44: Valori di FDA idrolisi ottenuti dall'analisi enzimatica su campioni di girasole.**

Dalle analisi condotte sono emerse alcune differenze significative tra le tesi.

In figura 45, vengono riportati i risultati dell'attività enzimatica o-DPO del substrato in cui era presente la pianta di girasole, espressi come  $\mu\text{mol}$  di catecolo ossidato  $\text{g}^{-1} 10 \text{ min}^{-1}$ .



**Figura 45: Valori espressi in  $\mu\text{mol}$  di catecolo ossidato  $\text{g}^{-1} 10 \text{ min}^{-1}$  ottenuti dall'analisi enzimatica sull' o-DPO su campioni di girasole;**

Per quanto riguarda le analisi sull' o-DPO, questa è risultata significativamente maggiore nel controllo negativo e nel trattato alla dose maggiore mentre il controllo positivo e il trattato alla dose minore hanno mostrato attività enzimatica minore e simile tra loro. Come nel caso del mais, la maggiore attività di questo enzima nel controllo negativo potrebbe essere legata ad un processo di umificazione rallentato con produzione di acidi fulvici, facilmente attaccabili dalle o-difenolossidasi. Il trattato alla dose più elevata permette comunque un recupero di tale attività ed una ripresa del processo di umificazione.

## 5. CONCLUSIONI

La sperimentazione effettuata ha permesso di rilevare azioni positive del biostimolante utilizzato in seguito a stress termico su molti dei parametri presi in analisi, sia per la prova con il mais che per quella con il girasole.

L'effetto è più evidente per il mais, essendo questa una coltura più sensibile alle basse temperature rispetto al girasole. per molti dei rilievi la dose maggiore di biostimolante è risultata più efficace, fornendo risultati spesso simili al controllo positivo non soggetto a stress.

Le due attività enzimatiche misurate sul substrato di crescita delle piante, non hanno mostrato differenze significative per le due colture. Un caso particolare è quello dell'attività o-difenolossidasi nel controllo negativo sottoposto a stress, significativamente maggiore nel caso del girasole che potrebbe indicare un rallentamento del processo di umificazione della sostanza organica, prontamente ripristinato dal biostimolante alla dose maggiore.

Il prodotto ha dimostrato di avere un effetto "biostimolante" sulla coltura, quindi, oltre ad avere un effetto di concime fogliare, può subentrare in momenti critici per la coltura facendola trovare nelle migliori condizioni durante un drastico abbassamento termico che può di conseguenza compromettere la produzione finale.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Allinne C., Maury P., Sarrafi A., Grieu P., 2009. Genetic control of physiological traits associated to low temperature growth in sunflower under early sowing conditions. *Plant Science*, 177: 349–359.
- Amador, J.A., Glucksman, A.M., Lyons, J.B., Gorres, J.H., 1997. Spatial distribution of soil phosphatase activity within a riparian forest. *Soil. Sci.* 162: pp. 808-825.
- Anderson TH, Domsch KH (1985) Ratios of microbial biomass carbon to total carbon in arable soils. *Soil Biol Biochem* 21:471– 479
- A. Richardson, M. Aikens, G. Berlyn, P. Marshall. 2004. Piantine di stress da siccità e betulla da carta (*Betula papyrifera*): effetti di un biostimolante organico sulla salute delle piante e sulla tolleranza allo stress e rilevamento degli effetti dello stress con metodi non invasivi basati su strumenti. *J. Arbor*, 30, pp. 52-61.
- Altieri, MA. 2002. Agroecologia: la scienza della gestione delle risorse naturali per gli agricoltori poveri in ambienti marginali. *Agric., Ecosyst. Dintorni*, 93, 1-24.
- AM Ismail, AE Hall. 2002. Variazione dei tratti associati alla tolleranza al freddo durante l'emergenza nel germoplasma del fagiolo dall'occhio. *Ricerca sul raccolto sul campo.*, 77, pp. 99 - 113.
- Angelo Petrozza, Antonietta Santaniello, Stephan Summerer, Gianluca Di Tommaso, Donata Di Tommaso, Eleonora Paparelli, Alberto Piaggese, Pierdomenico Perata, Francesco Cellini. 2015. Physiological responses to Megafol® treatments in tomato plants under drought stress: A phenomic and molecular approach, *Scientia Horticulturae*, Volume 174, Pages 185-192.

- Bano, S.; Aslam, M.; Saleem, M.; Bassora, S.; Aziz, K., 2015. Valutazione delle accessioni di mais sotto stress da bassa temperatura nelle prime fasi di crescita. *J.Anim. Pianta Sci.*, 25, 392–400.
- Baydar H, Erbas S., 2005. Influence of seed development and seed position on oil, fatty acids and total tocopherol contents in sunflower (*Helianthus annus L.*). *Turk. J. Agric.*, 29: 179-186.
- Beck E.H., Fettiq S., Knake C., Hartiq K., Bhattarai T. 2007. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of Biosciences*, 32: 501–510.
- Berlyn, medico di base; Russo, RO. 1990. L'uso di biostimolanti organici per promuovere la crescita delle radici. *Sottosuolo Ecol.*, 2, 12–13.
- Brouder SM, Volenec JJ., 2008. Impact of climate change in crop nutrient and water use efficiencies. *Physiological Plantarum*, 133: 705-724.
- Brown P., Saa S. 2015. Biostimulants in agriculture. *Front Plant Sci.* Aug 27; 6:671
- Bilska-Kos, A.; Solecka, D.; Dziewulska, A.; Ochodzki, P.; Jończyk, M.; Bilski, H.; Sowiński, P. 2017. La bassa temperatura ha causato modifiche nella disposizione delle pectine della parete cellulare a causa dei cambiamenti del potenziale osmotico delle cellule delle foglie di mais (*Zea mays L.*). *Protoplasma*, 254, 713–724.
- Blagoveshchensky, AV Biogenic stimolanti e natura biochimica della loro azione. *Toro. Bot principale. Gard.* 1956, 25, 79–86
- Blagoveshchensky, stimolanti AV Biogenic in agricoltura. *Priroda* .1955. 7, 43-47.
- Bonciarelli F., 1995, Coltivazioni erbacee da pieno campo.
- Bonciarelli P., Bonciarelli U., 1992, Coltivazioni erbacee.
- Bonsembiante M. 1983. Il mais, Liviana Editrice.
- Boyerj.S., 1982. Plant productivity and environment. *S c i e n c e* 218: 443-448.
- Calvo, P.; Nelson, L.; Kloepper, JW. 2014. Usi agricoli di biostimolanti vegetali. *Suolo vegetale*, 383, 3 – 41.
- Canellas, LP; Olivares, Florida; Aguiar, NO; Jones, DL; Nebbioso, A.; Mazzei, P.; Piccolo, A. 2015. Acidi umici e fulvici come biostimolanti in orticoltura. *Sci. Ortico*, 196, 15 – 27.
- Carvalho, D., Pereira, S. C., Silva, R., & Rocha, A. 2022. Aridity and desertification in the Mediterranean under EURO-CORDEX future climate change scenarios. *Climatic Change*, 174(3-4), 28.
- C. Gay, F. Corbineau, D. Vieni. 1990. Effetti della temperatura e dell'ossigeno sulla germinazione dei semi e sulla crescita delle piantine nel girasole (*Helianthus annuus L.*), Laboratoire de Physiologie Végétale Appliquée, Université Pierre et Marie Curie, tour 53, 1er étage, 4 place Jussieu, 75252 Paris cédex 05, France.

- Chen, C., Twito, S., Miller, G., 2014. New cross talk between ROS, ABA and auxin controlling seed maturation and germination unraveled in APX6 deficient Arabidopsis seeds. *Plant Signal Behav.* 9.
- Chen, J.; Xu, W.; Velten, J.; Xin, Z.; Stout, J. 2012. Caratterizzazione delle linee di razza del mais per la tolleranza alla siccità e al calore. *J. Conservazione dell'acqua del suolo.* 67, 354–364.
- Chen, W.P., Li, P.H., Chen. 2000. T.H.H.: Glycinebetaine increases chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. - *Plant Cell Environ.* 23: 609-618.
- Chenxu Niu, Ge Wang, Jing Sui, Genzhong Liu, Fangfang Ma, Zhilong Bao. 2022. Biostimulants alleviate temperature stress in tomato seedlings, *Scientia Horticulturae*, Volume 293, 110712.
- Colla, G., and Rouphael, Y. 2020. Microalgae: New source of plant biostimulants. *Agronomy* 10, 1240 doi: 10.3390/agronomy10091240.
- Corbineau F.1987. La germination des semences de Tournesol et sa regulation par ethylene. *C. r. Acad. Agric. France* 73, 59 68. 9.
- CORBINEAU F., BAGNIOL S. and C6ME D. 1990. Sunflower (*Helianthus annuus*) seed dormancy and its regulation by ethylene, *Isr. J. Bot.* 39, 313 325.
- Dick, R.P., 1994. Soil enzyme activities as indicators of soil quality. In: Doran, J.W. (Ed.), *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. SSSA Special Publication no. 35, Madison, WI, pp. 107–124.
- Dick RP, Breakwel DP, Turco RF. 1996. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. In: Doran JW, Jones AJ (eds) *Methods for assessing soil quality*, vol. 49. Madison, WI: SSSA Special Public, pp 247–271.
- Dick, W.A & Tabatabai, M.A.1993. Kinetic parameters of phosphatases in soils and organic waste materials. *Soil Sci.*, 137: pp. 7-15.
- Doran JW, Parkin TB.1996. Quantitative indicators of soil quality: a minimum data set. In: Doran JW, Jones AJ (eds) *Methods for assessing soil quality*, vol. 49. Madison, WI: SSSA Special Public, pp 25–37.
- Duman J.G., Wisniewski M.J. 2014. The use of antifreeze proteins for frost protection in sensitive crop plants. *Environmental and Experimental Botany*, 106: 60–69.
- du Jardin P. 2015. Biostimolanti vegetali: definizione, concetto, principali categorie e normativa. *Sci Orto.*;30(196):3–14.
- Du, J., Patrick, 2015. *Plant biostimulants: definition, concept, main categories and Enzymes*". Academic Press, 51-96.
- Fanin, N., Mooshammer, M., Sauvadet, M., Meng, C., Alvarez, G., Bernard, L., ... & Nottingham, A. T. 2022. Soil enzymes in response to climate warming: Mechanisms and feedbacks. *Functional ecology*, 36(6), 1378-1395.

- Farooq, M.; Aziz, T.; Bassora, S.; Cheema, M.; Rehman, H. 2008. Tolleranza agghiacciante nel mais ibrido indotta dall'adescamento dei semi con acido salicilico. *J. Agron.*
- Farooq, M.; Aziz, T.; Wahid, A.; Lee, D.-J.; Siddique, KH Chilling. 2009. Tolleranza nel mais: approcci agronomici e fisiologici. *Coltivazione Pascolo Sci*, 60, 501–516.
- Ferrara V. 2003. Evoluzione del clima ed impatti dei cambiamenti climatici in Italia. *Energia, Ambiente e Innovazione*, 49:15-30.
- Filatov, VP. 1944. Terapia dei tessuti in oftalmologia. *Sono. Rev. Sov. Med.*, 2, 53-66
- Franzoni, G., Cocetta, G., Prinsi, B., Ferrante, A., and Espen, L. 2022. Biostimulants on crops: Their impact under abiotic stress conditions. *Horticulturae* 8, 189.
- Franzoni, G., Cocetta, G., Prinsi, B., Ferrante, A., and Espen, L. (2022). Biostimulants on crops: Their impact under abiotic stress conditions. *Horticulturae* 8, 189.
- García-García, A.L.; García-Machado, F.J.; Borges, A.A.; Morales-Sierra, S.; Boto, A.; Jiménez-Arias, D. Pure Organic Active Compounds Against Abiotic Stress: A Biostimulant Overview. *Front. Plant Sci.* 2020, 11, 575829.
- Gaspar, M.L., Cabello, M.N., Pollero, R., Aon, M.A., 2001. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of fungal biomass in soil. *Curr. Microbiol.*, 42: pp. 339–344.
- Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, REGOLAMENTO DELEGATO (UE) 2022/1171 DELLA COMMISSIONE del 22 marzo 2022.
- Gajda A.M., 2008. Effect of different tillage systems on some microbiological properties of soils under winter wheat.
- Gajda A.M., Przewłoka B., and Gawryjolek K., 2013. Changes in soil quality associated with tillage system applied.
- Gaofei Yin, Aleixandre Verger, Yonghua Qu, Wei Zhao, Baodong Xu, Yelu Zeng, Ke Liu, Jing Li, Qinhuo Liu. 2019. "Recupero dell'indice dell'area fogliare ad alta risoluzione spaziotemporale con processi gaussiani, rete di sensori wireless e fusione di dati satellitari", *Telerilevamento*, vol.11, n.3, pp.244.
- Gibbs, J., K. Luckett, V. Jost, S. Morgan, T. Yan, W. Retzlaff. 2006. Evaluating Performance of a Green Roof System with Different Growing Mediums, Sedum Species and Fertilizer Treatments, Environmental Sciences Program; Green Roof Blocks™, St. Louis MetalWorks, Inc.; Jost Greenhouses; Civil Engineering; Mechanical Engineering; Department of Biological Sciences; Southern Illinois University Edwardsville.
- Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leiros, M. C., Seoane, S., 2005. "Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties". *Soil Biology and Biochemistry* 37, 877–887.
- Hartley RD, Whitehead DC. 1985. Acidi fenolici nei suoli e loro influenza sulla crescita delle piante e sui processi microbici del suolo.

- Hayashi, T. 2016. Differenza varietale negli effetti della bassa temperatura sullo sviluppo della nappa nel mais ibrido. *Pianta Prod. Sci.*, 19, 230–237.
- Hayashi, T.; Makino, T.; Seduto su.; Deguchi, K. 2015. Sterilità e cambiamenti nello sviluppo della nappa e nell'abitudine alla fioritura del mais ibrido associato a basse temperature dell'aria. *Pianta Prod. Sci.*, 18, 93–98.
- Herman Uwizeyimana, Meie Wang, Weiping Chen, Kifayatullah Khan. 2017. The ecotoxic effects of pesticide and heavy metal mixtures towards earthworms in soil, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Volume 55, Pages 20-29.
- Houmanat K., EL Fechtali M., Mazouz H., Nabloussi A. 2016: Evaluation and selection of promising sunflower germplasm under early winter planting conditions. *African Journal of Agricultural Research*, 11: 4610–4618
- HS Mason, EW Peterson. 1955. La reazione dei chinoni con protamina e nucleoprotamina: prolina *N-terminale*, *Journal of Biological Chemistry*, 212, , pp . 485-493.
- Hund, A.; Richner, W.; Soldati, A.; Fracheboud, Y.; Stamp, P. 2007. Root morfologia e prestazioni fotosintetiche di linee inbred di mais a bassa temperatura. *Euro. J. Agron.*, 27, 52-61.
- Hussein, HA; Uomo.; Hussein, S.; Chen, Y.; Ali, S.; Zhang, S.; Zhang, K.; Li, Y.; Xu, Q.; Liao, C. 2019. Effetti interattivi della siccità e dello stress termico sugli attributi morfo-fisiologici, resa, assorbimento dei nutrienti e stato ossidativo negli ibridi di mais.
- J. Mayaudon, M El Halfawi, MA Chalvignac. 1973. Proprietà delle difenolo ossidasi estratti dai sol *Biologia e biochimica del suolo*, 5 (1973), pp. 369-383.
- J. Sfoglià, Z. Xin. 2001. Rilevamento della temperatura e acclimatazione al freddo, *Corr. Opin. Pianta Biol.*, 4, pp. 241 – 246.
- Jenkinson DS .1988. Determination of microbial carbon and nitrogen in soil. In: Wilson JB (ed) *Advances in nitrogen cycling*. Wallingford, England: CAB International, pp 368–386.
- Jin, N., Jin, L., Wang, S., Li, J., Liu, F., Liu, Z., et al. 2022. Reduced chemical fertilizer combined with bio-organic fertilizer affects the soil microbial community and yield and quality of lettuce. *Front. Microbiol.* 13.
- Johnston AM, Tanaka D, Miller P, Brandt S, Nielsen D, Lafond P, Riveland NR. 2002. Oil seed crops for semi-arid cropping systems in the Northern Great Plains. *Agron. J.* 94: 231-240.
- Kandeler E., Tscherko D., and Spiegel H. 1999. Long-term monitoring of microbial biomass, N mineralisation and enzyme activities of a Chernozem under different tillage management. *Biology and Fertility of Soils* 28:343-351.
- Kishitani, S., Watanabe, K., Yasuda, S., Arakawa, K., Takabe, T. 1994. Accumulation of glycinebetaine during cold acclimation and freezing tolerance in leaves of winter and spring barley plants. - *Plant Cell Environ.* 17: 89-95.

- Kumari, R., Kaur, I. & Bhatnagar, AK. 2011. Effetto dell'estratto acquoso di *Sargassum johnstonii* Setchell & Gardner su crescita, resa e qualità di *Lycopersicon esculentum* Mill. *J Appl Phycol* **23**, 623–633.
- Ladd, J. N., 1978. “Origin and range of enzymes in soil”.
- Le Houérou H.N. 1996. Climate Change, drought and desertification. *Journal of Arid Environments*, 34:133- 185.
- Lemanowicz, J., Brzezińska, M., Siwik-Ziomek, A., & Koper, J. 2020. Activity of selected enzymes and phosphorus content in soils of former sulphur mines. *Science of The Total Environment*, 708, 134545.
- Liu Y.F., Qi M.F., Li T.L. 2012. Photosynthesis, photoinhibition, and antioxidant system in tomato leaves stressed by low night temperature and their subsequent recovery. *Plant Science*, 196: 8–17.
- Liu, D.; Hallermann, E.; Peng, Y.; Li, Y. 2016. Sviluppo di riso Bt e mais Bt in Cina e loro efficacia nel controllo dei parassiti bersaglio. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1561.
- Liu, Y.; Liang, J.; Sole, L.; Yang, X.; Li, D. 2016. La proteina LEA del gruppo 3, ZmLEA3, è coinvolta nella protezione dallo stress da bassa temperatura. *Davanti. Pianta Sci.* 7, 1011.
- M Yamaguchi, PM Hwang, JD Campbell, 1970. *O*-difenolossidasi latente nei funghi (*Agaricus biporus*); *Giornale canadese di biochimica*, 28, pp. 198-202.
- Masson-Delmotte, V. P., Zhai, P., Pirani, S. L., Connors, C., Péan, S., Berger, N., ... & Scheel Monteiro, P. M. 2021. *Ipcc: Summary for policymakers. in: Climate change 2021: The physical science basis. contribution of working group i to the sixth assessment report of the intergovernmental panel on climate change.*
- MILBORROW B.V., 2001. The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of know - ledge of ABA biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 52: 1145-1164.
- Monteiro, E., Gonçalves, B., Cortez, I., and Castro, I. 2022. The role of biostimulants as alleviators of biotic and abiotic stresses in grapevine: A review. *Plants* 11, 396.
- Monterusso, M.A., D.B. Rowe, and C.L. Rugh. 2005. Establishment and persistence of *Sedum* spp. and native taxa for green roof applications. *HortScience* 40(2):391- 396.
- N. Parađiković , T. Vinković , I. Vinković Vrček , I. Žuntar , M. Bojić , M. Medić-Šarić. 2011. Effetto dei biostimolanti naturali sulla resa e sulla qualità nutrizionale: un esempio di pianta di peperone giallo dolce (*Capsicum annuum* L.). *J Sci Food Agric*, 91, pp. 2146 – 2152.
- Nannipieri P., Kandeler E., and Ruggiero P. 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: Burns R.G., and Dick R.P., editors. *Enzymes in the Environment* Marcel Dekker. New York. p 1-34.
- Nelli E., Sodi F., Segnaboni C. 2021. *Atlante delle coltivazioni erbacee. Mais*, Agraria.org.

- Neild, RI; Newman. 1987. Caratteristiche e requisiti della stagione di crescita JE nella cintura di mais; Cooperative Extension Service, Iowa State University: Ames, IA.
- NODP. 2005. Annual report on oil seed crops. Ministry of Food, Agriculture and Livestock, Govt. Pak. Islamabad.
- Nriagu, JO e Pacyna, JM. 1988. Valutazione quantitativa della contaminazione mondiale di aria, acqua e suolo da tracce di metalli. *Natura*, 333, 134-199.
- Osborne C.P., Mitchell P.L., Sheehy J.E., Woodward F.I. 2000. Modelling the recent historical impacts of atmospheric CO<sub>2</sub> and climate change on Mediterranean vegetation.
- P Perucci, C Casucci, S Dumontet. 2000. An improved method to evaluate the o-diphenol oxidase activity of soil, *Soil Biology and Biochemistry*, Volume 32, Issue 13, 2000, Pages 1927-1933.
- P. Maury, F. Mojayad, M. Berger, C. Planchon. 1996. Risposta fotochimica all'acclimatazione alla siccità in due genotipi di girasole, *Fisiolo. Pianta.*, 98, pp. 57-66.
- Paola Regina, Francesco Bevilacqua, Raffaella Matarrese, Ivan Portoghese, Andrea Guerriero. 2017. "Identificazione del miglior algoritmo per determinare il LAI da Landsat-8 in assenza di dati di verità a terra".
- Paszczyński A. e R.L. Crawford. 2000. "Recent advances in the use of fungi in environmental remediation and biotechnology". In: *Soil biochemistry*, Bollag J.M. e Stotzky G. (eds), Vol 10, pp 379-422. Marcel Dekker Inc., New York.
- Peterson D., Spanner M., Running S., Teuber. K.B. 1987. "Relationship of Thematic Mapper Simulator data to leaf area index of temperate coniferous forest", "Remote Sensing of Environment", 22: 323-341.
- Polade SD, Pierce DW, Cayan DR, Gershunov A, Dettinger MD. 2014. Il ruolo chiave dei giorni asciutti nel cambiamento del clima regionale e dei regimi delle precipitazioni. *Rep scientifica* 4:4364.
- Pratley, J.E., and K.O. Beirne. 1994. Irrigation for crop production. p. 349-389. In J.E. Pratley (ed.) *Principles of field crop production*. 3rd ed. Oxford Univ. Press, Melbourne, Australia.
- Qader G. 2006. Morpho-Genetic expression of sunflower under varied temperature and moisture regimes. Ph.D. Agric. Thesis, Dept. of Agron. Univ. of Arid Agric. Rawalpindi-Pakistan.
- Raymond F, Ullmann A, Trambly Y, Drobinski P, Camberlin P. 2019. Evoluzione dei periodi di siccità estrema del Mediterraneo durante la stagione delle piogge sotto i cambiamenti climatici. *Reg Environ Change* 19:2339–2351.
- RG Lehmann, HH Cheng. 1988. Reattività degli acidi fenolici nel suolo e formazione di prodotti di ossidazione, *Soil Science Society of American Journal*, 52, pp. 1304-1309.
- Riva-Roveda, L.; Scala, B.; Giauffret, C.; Périlleux, C. 2016. Le piante di mais possono entrare in modalità standby per far fronte allo stress da freddo. *BMC Pianta Biol.*, 16, 212.



- Rouse J., Haas R., Schell J. A., Deering D.W. 1974, "Monitoring vegetation system in the great plains with ERTS", "Proceedings of the Third Earth Resource Technology Satellite-1 Symposium NASA SP-351", I: 309-317.

- Rymen, B.; Fiorani, F.; Kartal, F.; Vandepoele, K.; Inze, D.; Beemster, GT. 2007. Le notti fredde compromettono la crescita delle foglie e la progressione del ciclo cellulare nel mais attraverso i cambiamenti trascrizionali dei geni del ciclo cellulare. *Fisiologia vegetale*, 143, 1429-1438.

- Sánchez-Monedero M.A., Mondini C., Cayuela M.L., Roig A., Contin M., and Nobili M. 2008. Fluorescein diacetate hydrolysis, respiration and microbial biomass in freshly amended soils. *Biology and Fertility of Soils* 44(6):885-890.

- Salvi, P., Manna, M., Kaur, H. et al. 2021. Segnalazione di fitormoni e diafonia nella regolazione della risposta allo stress da siccità nelle piante. *Cellula vegetale*.

-Santa Chiara, SB, Lynch, JP. 2010. L'apertura del vaso di Pandora: il cambiamento climatico influisce sulla fertilità del suolo e sulla nutrizione delle colture nei paesi in via di sviluppo. *Suolo vegetale* 2010, 335, 101 – 115.

-Sauer CO. 1966. Il primo spagnolo principale. California, USA: University of California Press, Berkeley e Los Angeles.

- Schnürer J., and Rosswall T., 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl Environ Microbiol* 43:1256-1261.

- Schnurer, J., Rosswall, T., 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbiological activity in soil and litter. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43: pp. 1256-1261.

- Scott P. (2008): *Physiology and Behaviour*. New York, John Wiley and Sons, 305.

- Shahrajabian, M.H.; Sun, W.; Cheng, Q. 2022. Using bacteria and fungi as plant biostimulants for sustainable agricultural production systems. *Recent Pat Biotechnol.* 16, 1–10.

- Stubberfield L.C.F., and Shaw P.J.A., 1990. A comparison of tetrazolium reduction and FDA hydrolysis with other measurements of microbial activity. *Journal of Microbiological Methods* 12:151-162.

-Shukla, P.S., Katy, S., Erin, N., Will, N., Critchley, A.T., Balakrishnan, P., 2018. Seaweed extract improve drought tolerance of soybean by regulating stress-response genes. *AoB Plants* 10.

signaling and crosstalk in regulating drought stress response in plants. *Plant Cell*

-Steponkus P.L. 1984: Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Physiology*, 35: 543–584.

- Tao K, Tian H, Fan J, Li D, Liu C, Megharaj M, Li H, Hu M, Jia H, He W. 2021. Kinetics and catalytic efficiency of soil fluorescein diacetate hydrolase under the pesticide parathion stress. *Sci Total Environ* 771:1–10.

- Teklić, T., Parađiković, N., Š poljarević, M., Zeljković, S., Lončarić, Z., and Lisjak, M. 2021. Linking abiotic stress, plant metabolites, biostimulants and functional food. *Ann. Appl. Biol.* 178, 169–191.
- Trevisan, S.; Manoli, A.; Ravazzolo, L.; Franceschi, C. 2017. Quaggiotti, l'analisi del sequenziamento dell'mRNA di *S.* rivela cambiamenti trascrizionali nella radice delle piantine di mais trattate con due concentrazioni crescenti di un nuovo biostimolante. *J. Agric. Chimica alimentare.* 65, 9956 – 9969.
- U. Anastasi, M. Cammarata, V. Abbate, E. Fereres. 2000. Potenziale di resa e qualità dell'olio del girasole (oleico e standard) coltivato tra l'autunno e l'estate, *Ital. J. Agron.*, 4, pp. 23 – 36.
- UNEP/MAP 2017. 2017 Mediterranean Quality Status Report.
- UNEP. 2007. Convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti (POP). Programma ambientale delle Nazioni Unite.
- UNEP.2001. Convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti (POP). Programma ambientale delle Nazioni Unite.
- Vos JG, Dybing E, Greim HA, Ladefoged O, Lambre C, Tarazona JV, Brandt I, Vethaak AD .2000. Effetti sulla salute delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino sulla fauna selvatica, con particolare riferimento alla situazione europea. *Crit Rev Toxicol* 30(1):71–133.
- Vicente-Serrano SM, Begueria S, Lopez-Moreno JI .2010. Un indice di siccità multiscalare sensibile al riscaldamento globale: l'indice di evapotraspirazione delle precipitazioni standardizzato. *JClim* 23(7):1696–1718
- Vicino MA Soriano, F. Orgaz , FJ Villalobos , E. Fereres. 2004. Efficienza dell'uso dell'acqua delle prime piantagioni di girasole, *Euro. J. Agron.*, 21, pp. 465 – 476.
- Walther G.R. 2000. Climatic forcing on the dispersal of exotic species. *Phytocoenologia*, 30:409-430.
- Wan, L. J., Tian, Y., He, M., Zheng, Y. Q., Lyu, Q., Xie, R. J., et al. 2021. Effects of chemical fertilizer combined with organic fertilizer application on soil properties, citrus growth physiology, and yield. *Agriculture* 11, 1207.
- Wang, H., Siopongco, J., Wade, L.J., Yamauchi, A., 2009. Fractal analysis on root systems of rice plants in response to drought stress. *Environ. Exp. Botany* 65, 338–344.
- Waqas, Massachusetts; Wang, X.; Zafar, SA; Noor, MA; Hussein, HA; Azher Nawaz, M.; Farooq, M. 2021. Stress termici nel mais: effetti e strategie di gestione. *Piante*, 10, 293.
- Waqas, Massachusetts; Wang, X.; Zafar, SA; Noor, MA; Hussein, HA; Azher Nawaz, M.; Farooq, M. 2021. Stress termici nel mais: effetti e strategie di gestione. *Piante*, 10, 293.

- Wołejko, E., Jabłońska-Trypuć, A., Wydro, U., Butarewicz, A., & Łozowicka, B. 2020. Soil biological activity as an indicator of soil pollution with pesticides—a review. *Applied Soil Ecology*, 147, 103356.
- Watson D.J. 1947. “Comparative Physiological Studies on the Growth of Field Crops: I. Variation in Net Assimilation Rate and Leaf Area between Species and Varieties, and within and between Years”, “*Annals of Botany*”, 11: 41-76.
- Wollum, A., 1994. “Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical.
- Xie, Q., Huang, W., Zhang, B., Chen, P., Song, X., Pascucci, S., Pignatti S., Laneve G. & Dong, Y. 2016. Estimating Winter Wheat Leaf Area Index From Ground and Hyperspectral Observations Using Vegetation Indices. *IEEE Journal Of Selected Topics In Applied Earth Observations And Remote Sensing*, Vol. 9, No. 2.
- XIONG L., ZHU J.K., 2003. Regulation of abscisic acid biosynthe - sis. *Plant Physiol.* 133: 29–36.
- Zhang, X.; Schmidt, R. 1999. Tappeti erbosi biostimolanti. *Motivi Manutenzione*, 34, 14–15.
- Zhao, X.X., Ma, Q.Q., Liang, C., Fang, Y., Wang, Y.Q., Wang, W. 2007. Effect of glycinebetaine on function of thylakoid membranes in wheat flag leaves under drought stress. - *Biol. Plant.* 51: 584-588.

#### 6.1 SITOGRAFIA

- <https://www.ruminantia.it/semine-anticipate-diagnosi-dei-danni-da-ritorno-di-freddo-e-ristagno-su-mais/>
- <https://www.focus.it/ambiente/natura/come-avviene-il-moto-dei-girasoli>
- <http://www.assomais.it/gelate-meta-aprile-danni-alle-piante-mais/>
- <https://agripiudabenito.files.wordpress.com/2013/09/megafol.pdf>
- <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022R1171&from=EN>