Genesi delle sostanze umiche e loro interazione con l'ambiente. I segnali sostanze umiche-pianta.

Prof.ssa Serenella Nardi
Dott. Andrea Ertani

Nel corso degli anni, molteplici studi hanno evidenziato che alcuni composti, quando vengono applicati al suolo e/o alla la pianta, hanno la capacità di **modificare la fisiologia delle piante migliorandone la crescita e la risposta alle situazioni di stress.**

In occasione del primo convegno mondiale sui biostimolanti, tenutosi a Strasburgo, i ricercatori si sono confrontati ed hanno presentato i risultati delle loro sperimentazioni nel campo di questi prodotti.

Convegno Internazionale sui Biostimolanti si è tenuto a Firenze il 16-19 novembre **2015**, organizzato da New Ag International.

Il Congresso ha visto la partecipazione di oltre **1.100** persone provenienti da **723** organizzazioni e **69** Paesi

DEFINIZIONE DI BIOSTIMOLANTI

European Biostimulants Industry Council

«I biostimolanti sono prodotti di natura organica in grado di incrementare l'attività microbica del suolo e la crescita delle piante mediante la stimolazione di diverse vie metaboliche. Il loro ruolo è quello di migliorare l'efficienza di assorbimento dei nutrienti forniti con la concimazione».

Sono prodotti che determinano effetti simili a quelli indotti da ormoni vegetali (**auxine, gibberelline, citochinine**), **senza tuttavia contenere tali molecole**. Il ruolo dei biostimolanti è quello di migliorare **l'efficienza di assorbimento** dei nutrienti forniti con la concimazione. Per questo motivo, in loro presenza, la quantità di **elementi nutritivi da apportare** con la normale pratica di fertilizzazione dovrebbe essere minore, con conseguente riduzione dei costi di coltivazione e dei rischi di **inquinamento**.

CATEGORIE DI BIOSTIMOLANTI

1. SOSTANZE UMICHE,
2. ESTRATTI DI ALGHE,
3. PROTEINE IDROLIZZATE
4. MICRORGANISMI, FUNGHI E BATTERI

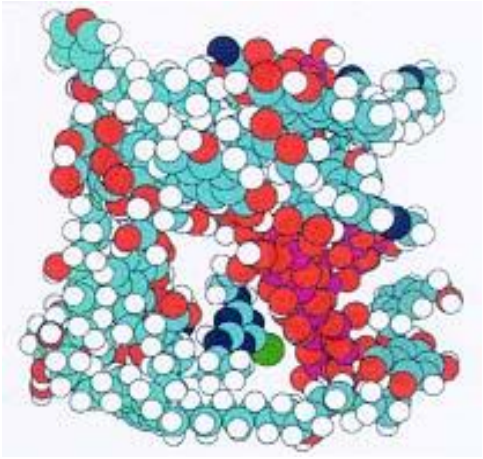
Cosa sono le S.U.?

SOSTANZA ORGANICA STABILIZZATA

costituiscono la maggior parte della componente non vivente e quindi del C totale del suolo e derivano dai processi di degradazione e re-sintesi dei residui organici.

Polimeri di difficile identificazione chimica originati dalla degradazione chimica e biologica dei residui vegetali e animali e dall'attività di sintesi dei microrganismi...

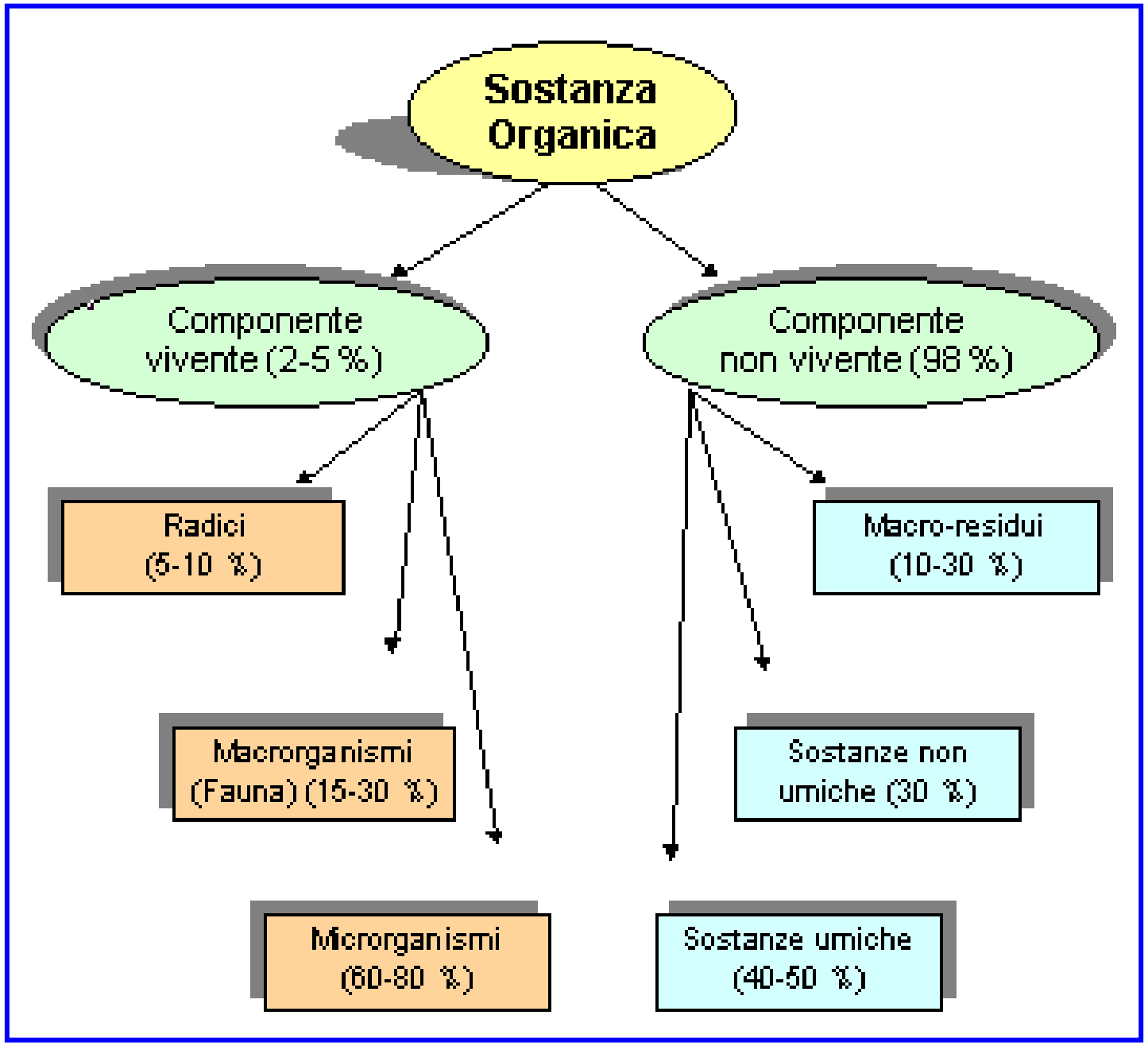
I prodotti così formatisi tendono ad associarsi in strutture organiche complesse che sono più stabili dei materiali di partenza



C O N H

Le sostanze umiche sono state identificate come le componenti maggiormente attive della sostanza organica e studi recenti hanno focalizzato la loro attenzione su come queste componenti biologicamente attive siano in grado di influenzare il metabolismo vegetale esercitando un'azione definita biostimolante.

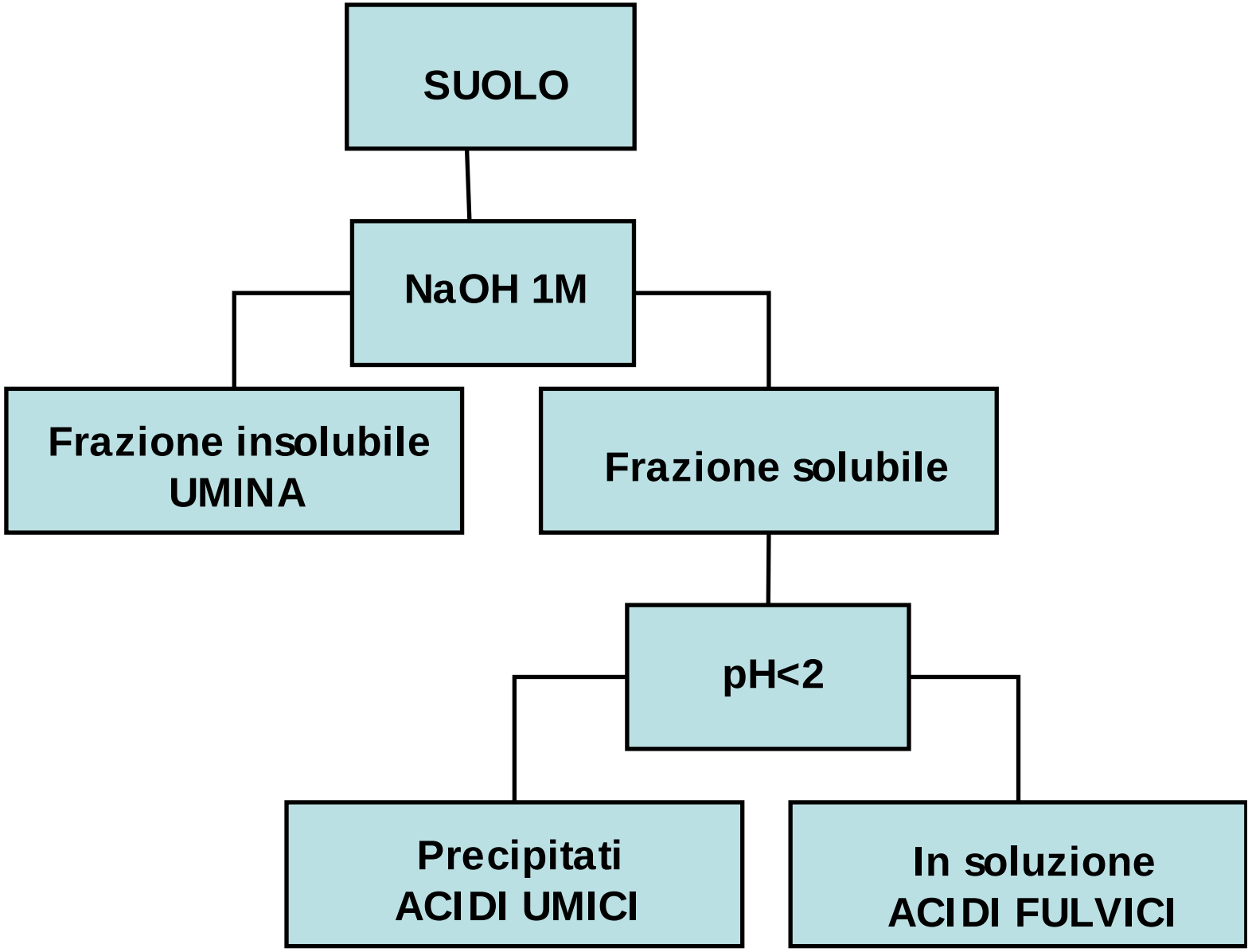
Tali studi risultano sempre più importanti vista la necessità di trovare tecniche di coltivazione che mirino a migliorare la qualità del prodotto, ponendo particolare attenzione alla componente biologica del suolo, principale responsabile della fertilità.


Sostanza Organica
Componente vivente (2-5 %)
Componente non vivente (98 %)
Radici (5-10 %)
Macrorganismi (Fauna) (15-30 %)
Microrganismi (60-80 %)
Macro-residui (10-30 %)
Sostanze non umiche (30 %)
Sostanze umiche (40-50 %)

Significato biologico della Sostanza Organica.

(Soils and Soil Fertility, 1973**)**

	Kg/ha ss (S.O.)	N° organismi /ha
Radice	4.000	1% del volume
Lombrichi	50	250.000
Miriapodi	40	150.000
Insetti	10	2.500.000
Roditori e rettili	5	50
Batteri	6.000	1.000.000.000 /g
Funghi	6.000	1.000.000 /g di terreno
Attinomiceti	1.500	1.000.000 /g di terreno
Protozoi	100	70.000 /g di terreno
Nematodi	2	0.003 /g di terreno
Alghe	1	500 /g di terreno
Humus	60.000	-


SUOLO
NaOH 1M
Frazione insolubile
UMINA
Frazione solubile
pH<2
Precipitati
ACIDI UMICI
In soluzione
ACIDI FULVICI

Le S.U. producono effetti sulle caratteristiche chimico-fisiche del suolo…

Formazione di aggregati (miglioramento struttura);

Aumento della CSC;

Aumento della disponibilità di elementi nutritivi.

Generale miglioramento della fertilità

INTERESSE AGRARIO

… e sul metabolismo e sullo sviluppo della pianta

a livello morfologico e a livello fisiologico

effetti indiretti

effetti diretti

> FERTILITA' DEL SUOLO

AZIONE DIRETTA
SULL'ATTIVITA' METABOLICA
DELLA PIANTA

ATTIVITÀ BIOLOGICA DELLE S.U.

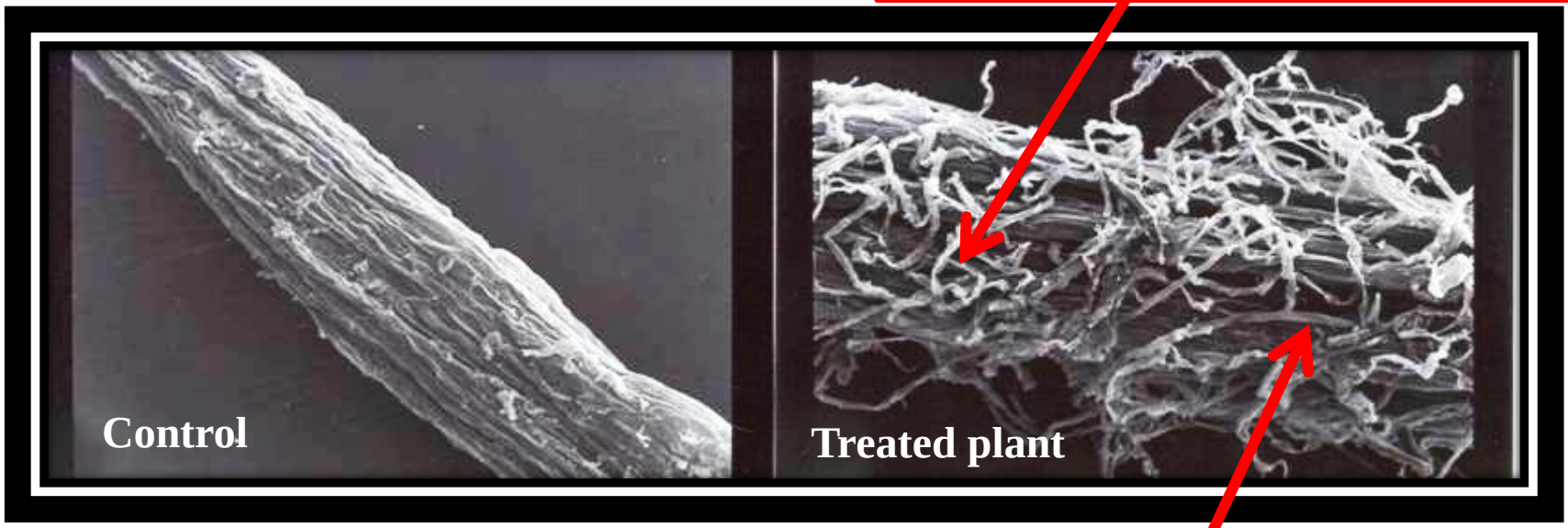
ATTIVITA' BIOLOGICA

↓

AZIONE ESERCITATA DA UNA SOSTANZA SU DI UN INSIEME DI PROCESSI METABOLICI

INTRODUCTION

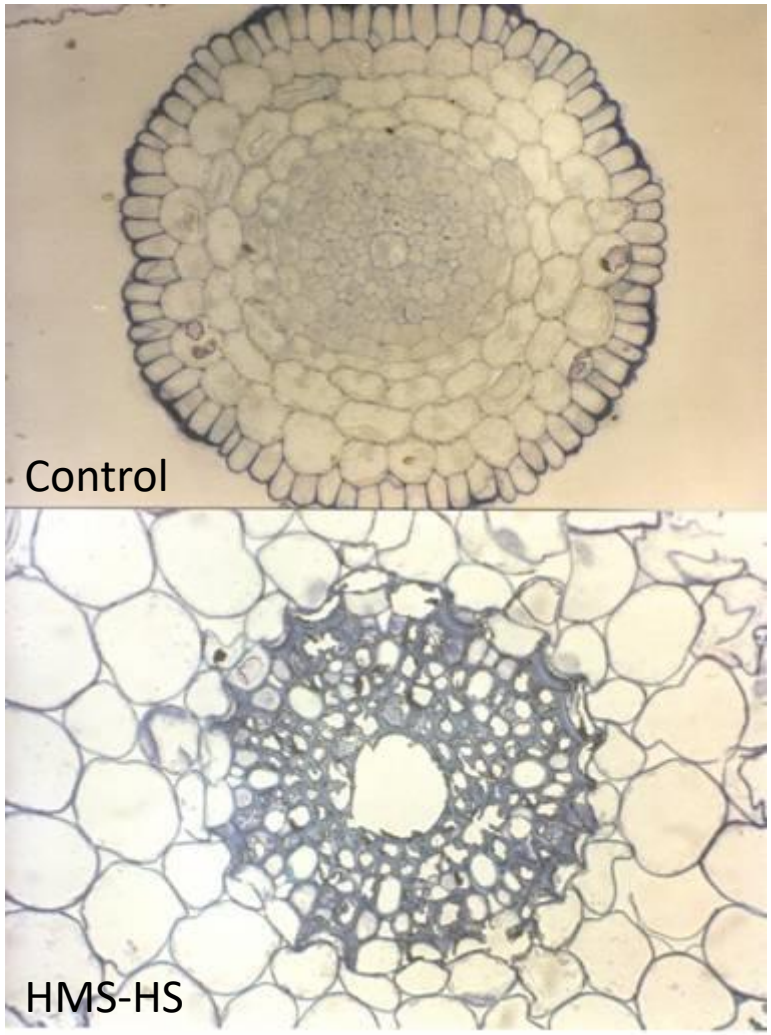
advantageous in plant nutrient uptake



Scanning electron micrographs (SEM) of wheat roots. Note the higher development and abundance of hairs in the humic substances (HS) treated compared to the control.

Auxin effect

*Concheri, G., **Nardi, S.**, Reniero, F., Dell'Agnola, G., 1996. The effects of humic substances within the Ah horizon of a Calcic Luvisol on morphological changes related to invertase and peroxidase activities in wheat roots. **Plant and Soil** 179, 65-72.*



Light microscopy photographs (LM) of wheat root seedlings. The central cylinder of root treated with high molecular size (HMS) showed a differentiation level higher than the control.

Influenza delle sostanze umiche sull'assorbimento degli ioni

Hordeum vulgare

SO_4^{2-}; NO_3^-; Cr^{3+}; Fe^{2+}; Cu^{2+}; Zn^{2+}

Zn^{2+}

SO_4^{2-}; NO_3^-; Fe^{2+}; Mn^{2+}

Zea mays

PO_4^{3-}; NO_3^-; Fe^{2+}; Zn^{2+}

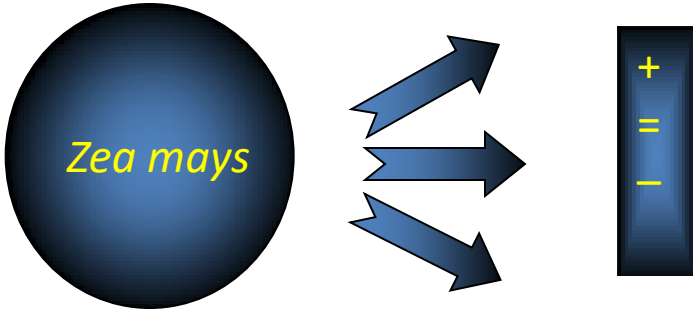
PO_4^{3-}

Solanum lycopersicum

PO_4^{3-}; Fe^{2+}; Mg^{2+}; K^+

Cl^-; Fe^{2+}

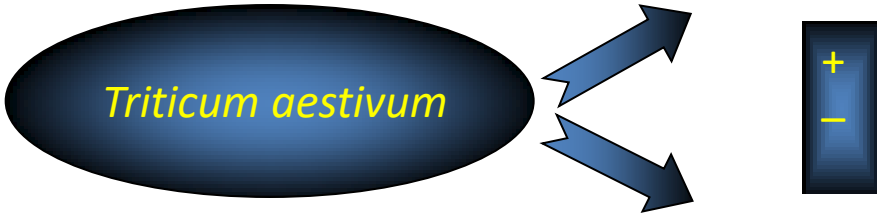
Effetto delle sostanze umiche sull'attività enzimatica di piante superiori



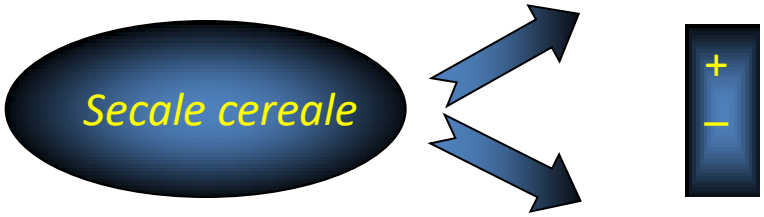
Amilasi; ATPsulfurilasi; O-acetilserina sulfidrilasi

ADPglucosio pirofosforilasi

Catalasi; perossidasi; polifenol-ossidasi



Fosforilasi
Catalasi; invertasi; perossidasi; polifenol-ossidasi



Aldolasi; fosfatasi; saccarasi

Amilasi

Determinazione della presenza AIA nelle sostanze umiche

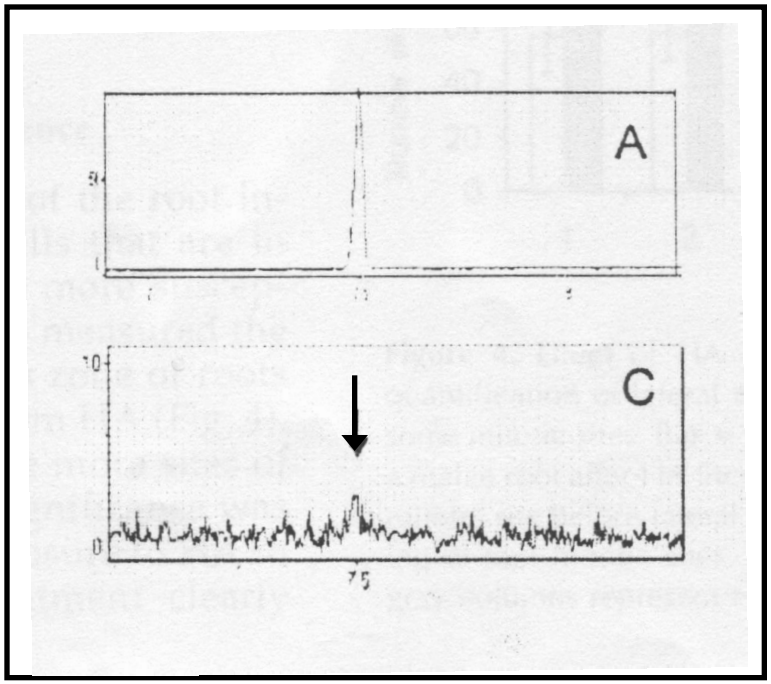
Metodo ELISA: Test immuno-enzimatico
(utilizza anticorpi monoclonali)

Dosaggio radioimmunologico in fase liquida
(utilizza anticorpi policlonali)

Contenuto di AIA nelle SU

Da Deiezioni di Lombrico	0,3 – 0,5 %	3000 – 5000 µg/gSU
Humus Forestali	0,0045 – 0,0363 %	45 –363 % µg/gSU

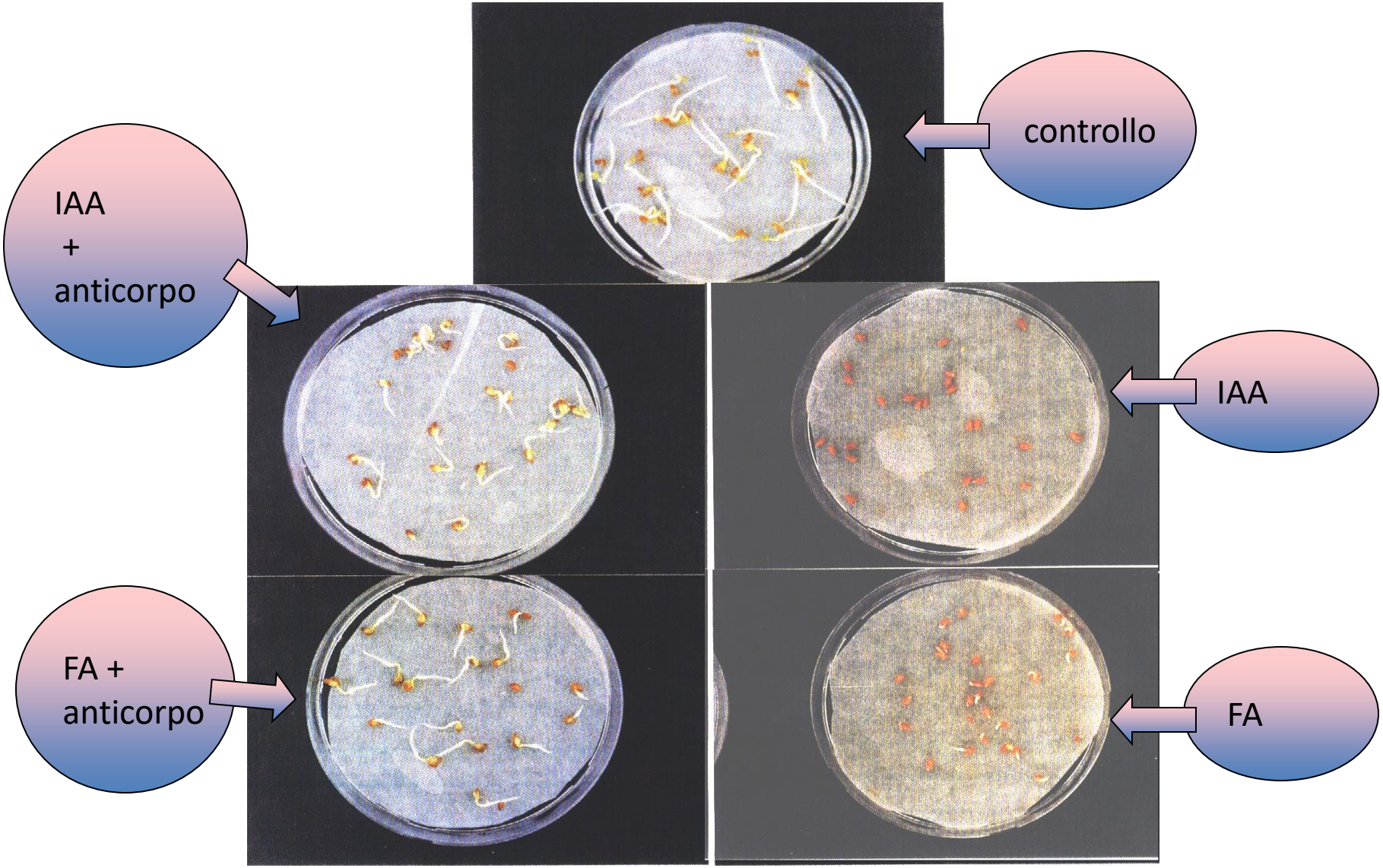
Muscolo et al., 1998 Pizzeghello et al., 2001



Da Canellas et al., 2002

Gas cromatogrammi dello standard di AIA (A)
e di HA isolato da compost di lombrico (C)

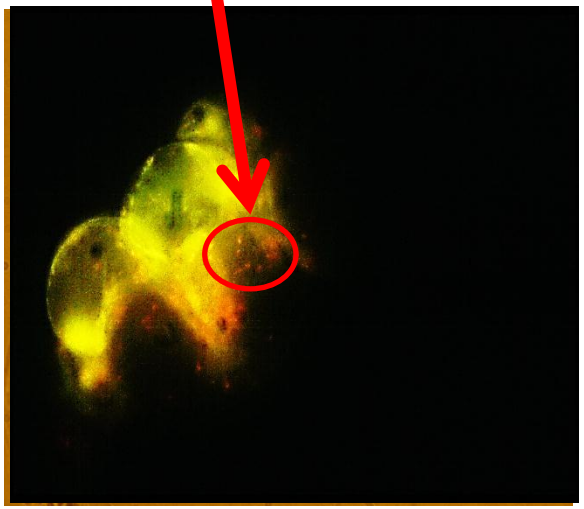
Effetto sull'inibizione della crescita in germogli di crescione



Fluorescein-labeled interaction with carrot cells in culture compared to indole-3-acetic acid.

Muscolo, et al., 2007. Journal of Chem Ecol 33, 115-129.

Both **humic substance** and **auxin** are able to cross the cell membrane



Fluorescence labeling of bound FA in carrot cell culture after 72 hr of incubation.

Fluorescence labeling of bound IAA in carrot cell culture after 72 hr of incubation.

Fluorescent membrane staining was present in IAA and the HS treated cell cultures.

LIGNOUMATI

- composti solubili che non rilasciano sedimenti e costituiti sia da molecole di alto che basso peso molecolare
- I lignoumati vengono sintetizzati in laboratorio a partire da lignina ottenuta per degradazione fungina degli scarti legnosi.
- Durante il processo di elaborazione, la lignina viene trasformata in un composto granulare contenente per il 90% sostanze umiche.

Caratteristiche dei lignoumati

produzione industriale di massa, con controllo qualità

– La materia di base è: - giovane
- di qualità costante
- non contaminata

– Il processo di trasformazione è privo di scarto

– Formando sostanze totalmente attive, bastano basse concentrazioni di lignohumati per ottenere buoni risultati.

SCOPO

Saggiare l'attività biostimolante di tre formulati:

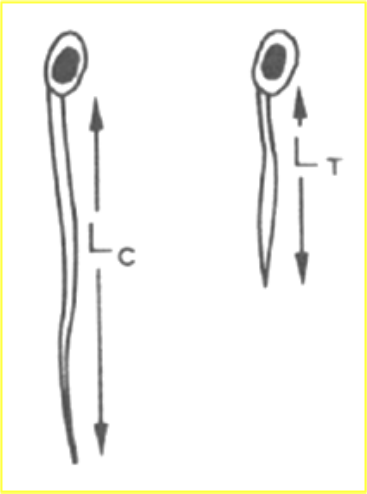
- ***LHa*** (lignohumato a)
- ***LHb*** (lignohumato b)
- ***PH*** (pow humus), un potassiohumato

sul metabolismo di plantule di Zea mays.

2 CONCENTRAZIONI: 0,5 e 1 gC/L

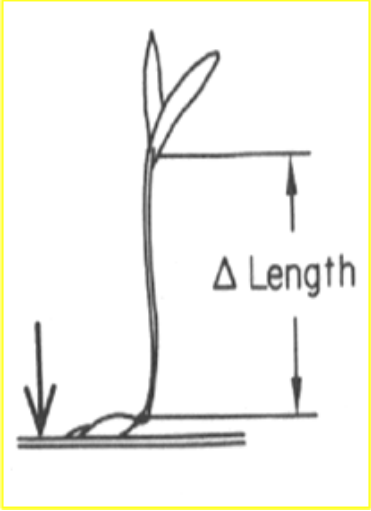
TEST AUDUS (Audus, 1972)

Il metodo si basa sulla capacità dell'acido indol-3-acetico (AIA) di inibire la crescita delle radici di crescione e sulla capacità dell'acido gibberellico (GA3) di allungare gli ipocotili di cicoria.

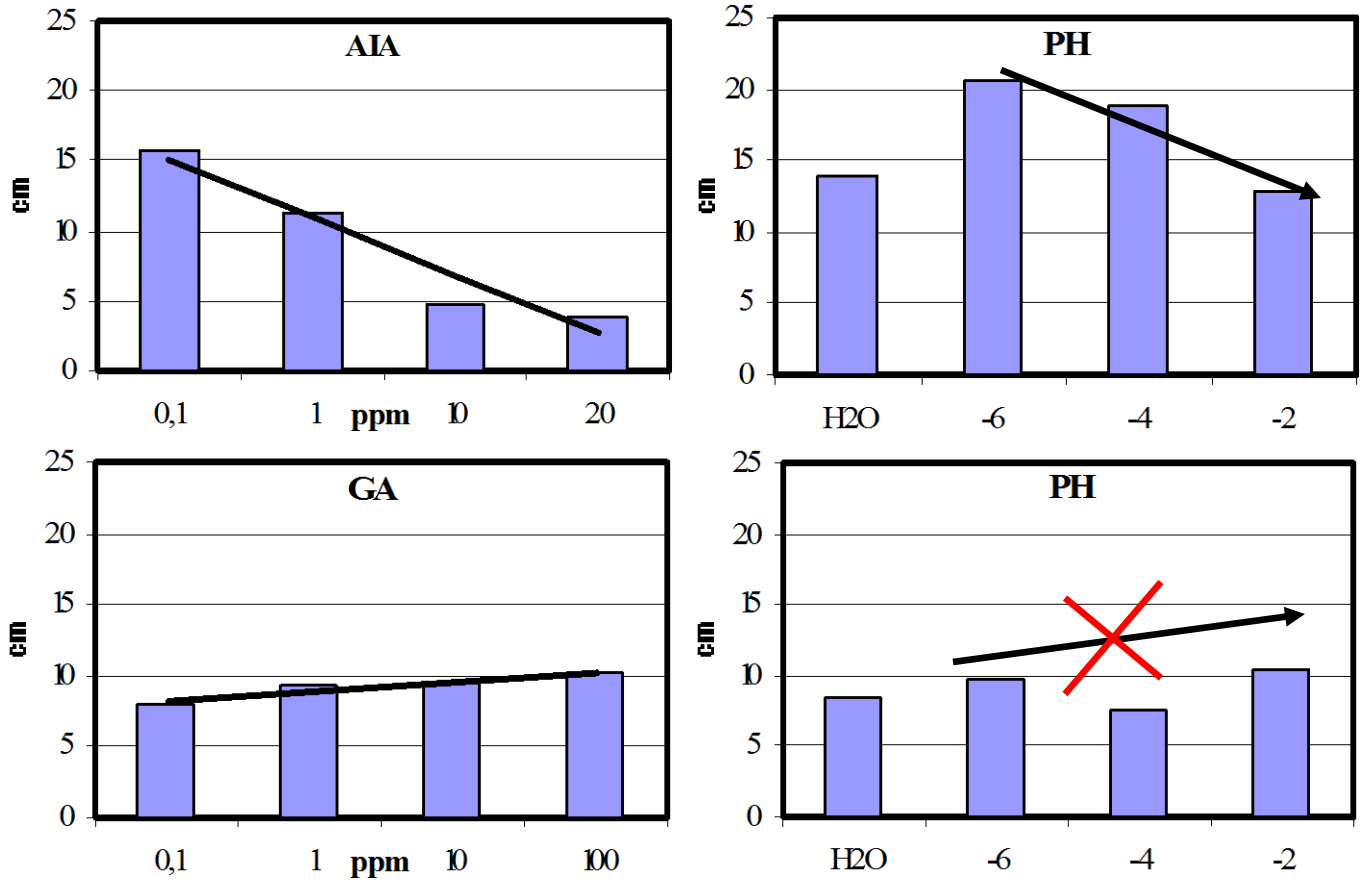


Test di crescita di radici di crescione (*Lepidium sativum* L.)

Test di crescita dell'ipocotile di cicoria (Lactuca sativa L.)

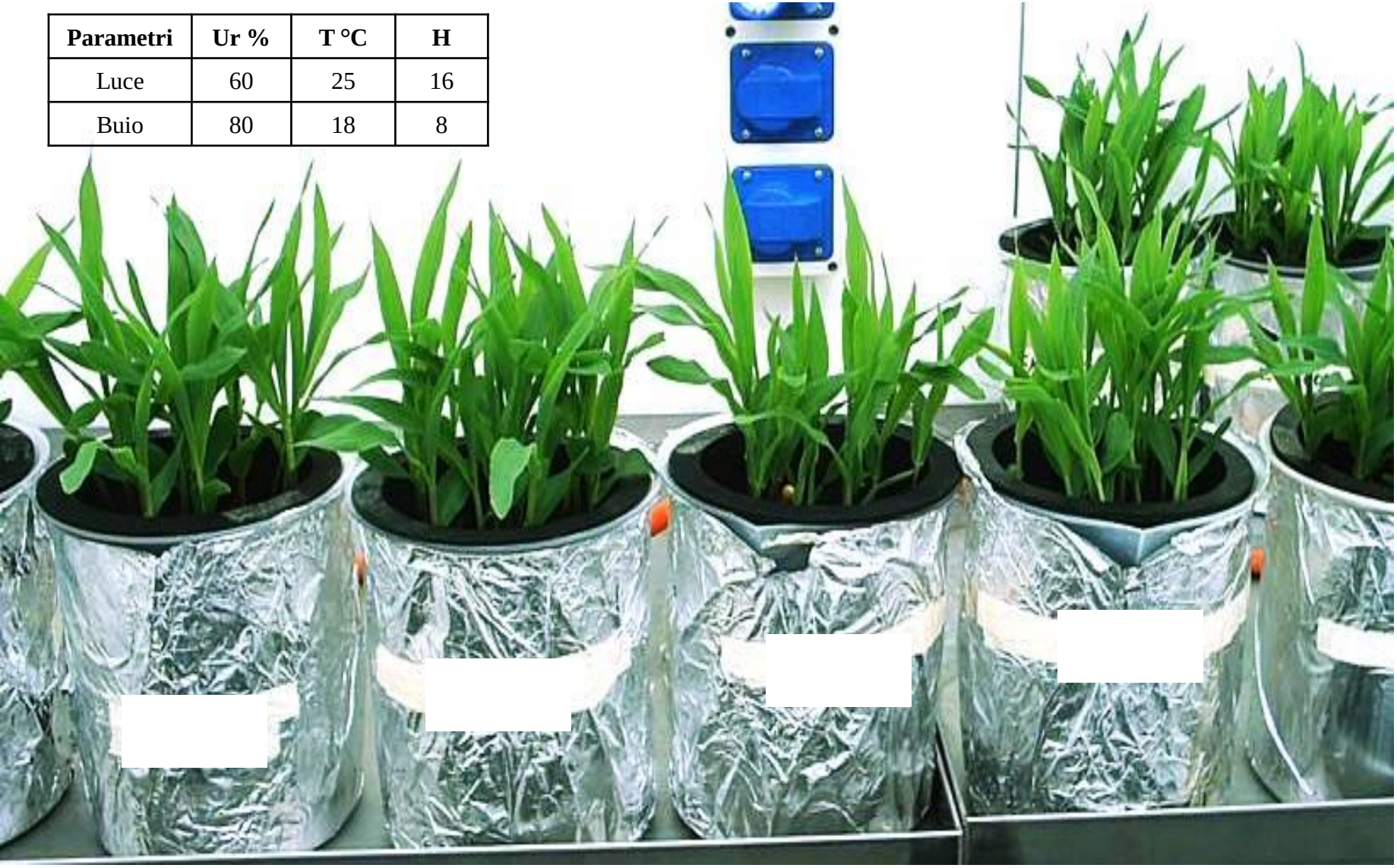


L'attività ORMONOSIMILE è stata verificata per tutti i trattamenti eccetto quella gibberellosimile per il PH :



Plantule allevate per 14 giorni con soluzione nutritiva Hoagland, in cella climatica alle seguenti condizioni:

Parametri	Ur %	T °C	H
Luce	60	25	16
Buio	80	18	8



ELEMENTAL ANALYSIS AND ASH CONTENT

Samples	C	H	N	Ash
		%		
LHa	59 ± 0.7	5.1 ± 0.1	3.0 ± 0.04	5.8 ± 0.01
LHb	57 ± 0.5	5.6 ± 0.5	2.7 ± 0.01	5.0 ± 0.02
PH	50 ± 0.1	3.5 ± 0.2	1.0 ± 0.02	21 ± 0.01

Table 1. Elemental analysis and ash content (average ± s) of lignosulfonate-humates (LHa and LHb) and leonardite humic acid (PH).

- LHa and LHb showed similar C, H and N contents.
- The amount of C, H and N are lower in PH respect to the ones detected in LHa and LHb

ELISA TEST enzyme-linked immunosorbent assay)

IAA (Indole-3-acetic acid) have a **cardinal role** in coordination of many growth and behavioral processes **in the plant's life cycle**

IPA (Isopentenyladenosine) is a **cytokinin** inhibitor and stimulator of DNA synthesis.

Product	IAA (nmol/mg C)	IPA (nmol/mg C)
LHa	5.6	65.5
LHb	4.5	34.0
PH	10.7	41.5

Table 3. Content of IAA and IPA in LHa, LHb and PH.

EFFECT OF LIGNOHUMATES (LHA AND LHB) AND PH ON ROOT AND LEAF

Treatment	Roots		Leaves	
	g	%	g	%
Control	2.02 ± 0.06 c	(100)	4.77 ± 0.10 b	(100)
LHa 0.5	2.49 ± 0.07 a	(123)	5.03 ± 0.18 ab	(105)
LHa 1	2.50 ± 0.12 a	(124)	4.29 ± 0.14 c	(90)
LHb 0.5	2.37 ± 0.09 b	(117)	4.31 ± 0.04 c	(90)
LHb 1	2.38 ± 0.07 b	(118)	4.74 ± 0.14 b	(99)
PH 0.5	2.25 ± 0.06 b	(111)	5.39 ± 0.12 a	(113)
PH 1	2.04 ± 0.05 c	(101)	5.28 ± 0.15 a	(111)

Table 4 .LHa, LHb and PH stimulated root growth.
LHa and LHb slightly decreased leaf biomass of plants, while PH significantly enhanced leaf dry weight at both test doses.

Percentage values refer to the root and leaf growth of plants treated with LHa or LHb or PH compared to the control (=100%). Data represent the means of three measurements with ten plants in each (± s). Values in the same column following the same letter are not statistically different at P<0.05 according to Student-Newman-Keuls test.

CHLOROPHYLL AND PROTEIN CONTENT

(Welburn and Lichtenthaler 1984 - Bradford 1976)

Treatment	*Chla*	*Chlb*	Proteins	
	mg g^{-1} f.wt.		mg g^{-1} f.wt.	
			Roots	Leaves
Control	5.13 ± 0.009 c	1.11 ± 0.007	1.05 ± 0.01 c	2.90 ± 0.01 c
LHa 0.5	6.51 ± 0.05 b	2.00 ± 0.08 a	1.08 ± 0.02 c	2.90 ± 0.01 c
LHa 1	6.05 ± 0.19 b	1.89 ± 0.08 a	1.12 ± 0.002 b	2.90 ± 0.03 c
LHb 0.5	5.65 ± 0.07 bc	1.64 ± 0.03 b	1.06 ± 0.01 c	3.61 ± 0.03 a
LHb 1	7.45 ± 0.06 ab	1.79 ± 0.02 b	1.09 ± 0.01 c	3.53 ± 0.04 b
PH 0.5	6.37 ± 0.02 b	1.73 ± 0.01 b	1.04 ± 0.01 c	3.24 ± 0.09 bc
PH 1	8.01 ± 0.11 a	2.05 ± 0.09 a	1.28 ± 0.02 a	3.44 ± 0.06 b

Table 4

LHa, LHb and PH increased the level of *Chla* and *Chlb*, in most cases at 1 mg C L^{-1}
LHa did not affect the protein content, while LHb and PH enhanced it.

For chlorophylls, two measurements were performed for each plant on six plants per treatment. For protein determination, data represent the means of 3 measurements with three plants in each (± s). Values in the same column following the same letter are not statistically different at $P<0.05$ according to Student-Newman-Keuls test.

GLUCOSE AND FRUCTOSE CONTENT

Treatment	Roots				Leaves			
	Glucose		Fructose		Glucose		Fructose	
	mg g^{-1} d.wt.		mg g^{-1} d.wt.	%	mg g^{-1} d.wt	%	mg g^{-1} d.wt	%
Control	34.56 ± 1.11 d	(100)	19.18 ± 1.12 d	(100)	23.12 ± 1.03 e	(100)	6.12 ± 0.02 e	(100)
LHa 0.5	70.76 ± 1.22 a	(205)	25.01 ± 1.04 b	(130)	46.24 ± 0.12 d	(200)	12.52 ± 0.02 d	(205)
LHa 1	72.71 ± 0.98 a	(210)	33.58 ± 0.13 a	(175)	54.65 ± 0.11 c	(236)	17.94 ± 0.04 b	(293)
LHb 0.5	39.55 ± 0.77 c	(114)	21.92 ± 0.13 c	(114)	69.10 ± 0.14 b	(229)	18.71 ± 0.07 b	(306)
LHb 1	47.79 ± 0.16 b	(138)	22.71 ± 1.13 c	(118)	76.56 ± 0.22 a	(331)	20.41 ± 0.03 a	(333)
PH 0.5	39.05 ± 0.21 c	(112)	19.89 ± 1.15 d	(104)	41.45 ± 1.12 d	(179)	16.30 ± 0.12 c	(226)
PH 1	39.55 ± 1.10 c	(114)	21.52 ± 1.22 c	(112)	47.15 ±2.20 d	(204)	12.82 ± 0.22 d	(209)

Table 5, Glucose and fructose increased in roots and leaves of plants treated with LHa, LHb and PH at both tested concentrations

Data are the means of three measurements with three plants in each (± s). Values in the same column following the same letter are not statistically different at P<0.05 according to Student-Newman-Keuls test.

GS, GOGAT AND RURUBISCO ENZYME ACTIVITY

(Canovas et al., 1991 – Avila et al., 1987 – Di Marco et al., 1989)

Treatment	GS		GOGAT		RuBisCo
	µmol $^{-1}$ac glut g $^{-1}$ fw		µmol $^{-1}$NADH g $^{-1}$ fw		µmol^{-1} prot g^{-1} fw
	Roots	Leaves	Roots	Leaves	Leaves
Control	2.07 ± 0.06 c	3.68 ± 0.17 c	8.28 ± 0.15 d	11.62 ± 0.56 d	0.99 ± 0.006 c
LHa 0.5	4.23 ± 0.13 a	4.79 ± 0.58 b	18.6 ± 0.08 b	9.56 ± 0.15 e	1.23 ± 0.04 bc
LHa 1	0.46 ± 0.03 d	4.44 ± 0.32 bc	6.95 ± 0.07 d	20.73 ± 1.37 b	0.82 ± 0.001 c
LHb 0.5	1.57 ± 0.07 c	3.70 ± 0.18 c	12.48 ± 0.10 c	28.10 ± 0.11 a	0.93 ± 0.005 c
LHb 1	3.81 ± 0.29 b	3.95 ± 0.47 c	18.45 ± 0.21 b	8.32 ± 0.17 b	1.29 ± 0.01 b
PH 0.5	3.27 ± 0.54 b	5.68 ± 0.43 b	22.91 ± 1.01 a	23.72 ± 1.59 b	1.39 ± 0.01 b
PH 1	3.43 ± 0.30 b	7.13 ± 0.15 a	17.28 ± 0.15 b	17.74 ± 0.01 c	1.70 ± 0.01 a

Table 6 The tested products strongly enhanced GOGAT activity in roots with the exception of LHa at 1mg C L-1

Percentage values refer to the activity of GS, GOGAT and RuBisCo in plants treated with the two investigated products compared to the control (=100%). Data are the means of three measurements with three plants in each (± s). Values in the same column following the same letter are not statistically different at P<0.05 according to Student-Newman-Keuls test.

CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS

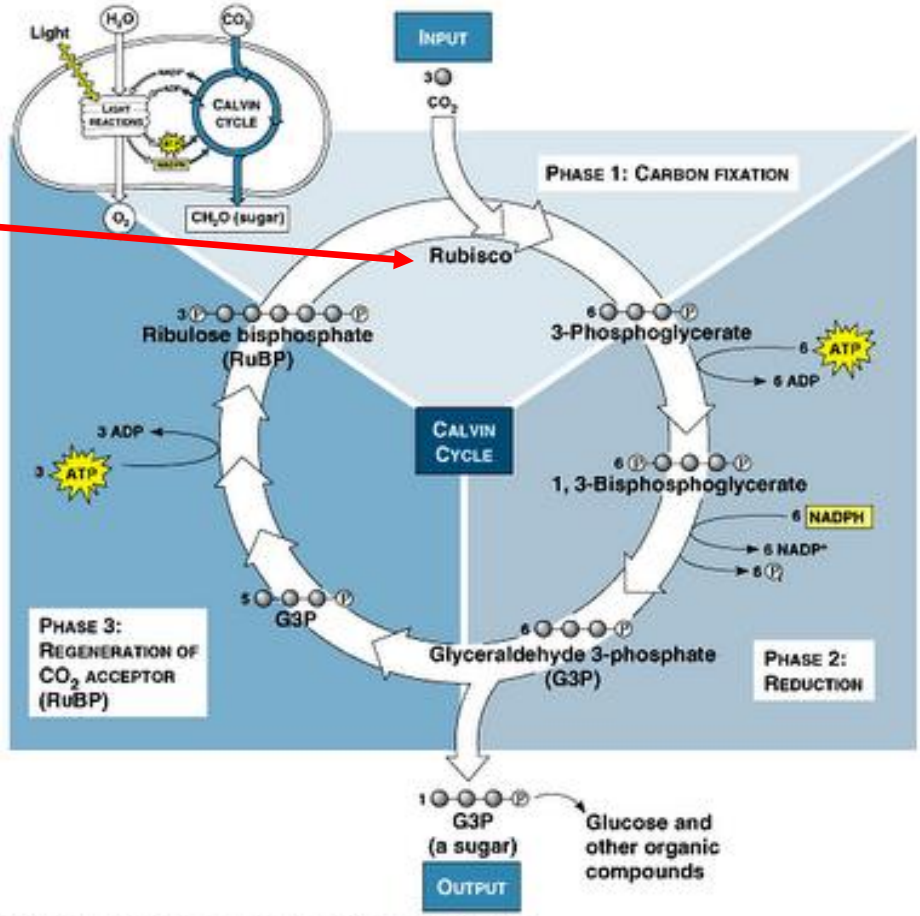
	Control	LHa 0.5	LHa 1.0	LHb 0.5	LHb 1.0	PH 0.5	PH 1.0
				Roots µg g^{-1} d.wt.			
Protocatechuic acid	0.10 ± 0.02c	141.6 ± 1.11a	46.1±1.65 b	62.7±1.30 b	94.0±1.42 a	112.9±3.28 b	86.0±2.98 b
Caffeic acid	3.21 ± 0.23b	n.d.	20.5±2.13c	15.9±1.22 d	n.d.	n.d.	n.d.
p-Coumaric acid	3.23 ± 0.13b	16.3 ±1.23c	144.5±2.75 a	32.7±1.10 c	20.2±3.10 c	333.2±2.75 a	214.5±3.60 a
Ferulic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
p-Hydroxibenzoic acid	15.22 ± 1.02 a	47.4±2.15b	39.9±1.12b	104.9±2.17 a	55.1±1.01 b	44.2±2.12 c	41.8±2.10 c
				Leaves µg g^{-1} d.wt.			
Protocatechuic acid	13.8 ±1.73 c	116.4±2.55 a	70.5±1.11 a	124.2±2.03 a	n.d.	112.9±2.32 a	40.1±1.18 a
Caffeic acid	0.11 ±1.23 d	47.4±0.12 b	44.4±0.73 b	42.2±1.12 b	43.1±0.78 b	46.0±0.13 b	37.8±0.95 a
p-Coumaric acid	56.01 ±4.03 b	16.3±1.13 c	n.d.	32.7±0.13 c	n.d.	12.87±0.13 c	n.d.
Ferulic acid	76.33 ± 5.62 a	17.1±0.11 c	22.6±1.08 c	20.0±0.55 d	94.9±1.12 a	18.6±0.42 c	20.8±1.30 b
p-Hydroxibenzoic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Table 6 Differential accumulation of phenol compounds was found in plants in response to LHa, LHb and PH treatments

Data are the means of three measurements with three plants in each (± s). Values in the same column following the same letter are not statistically different at P<0.05 according to Student-Newman-Keuls test.

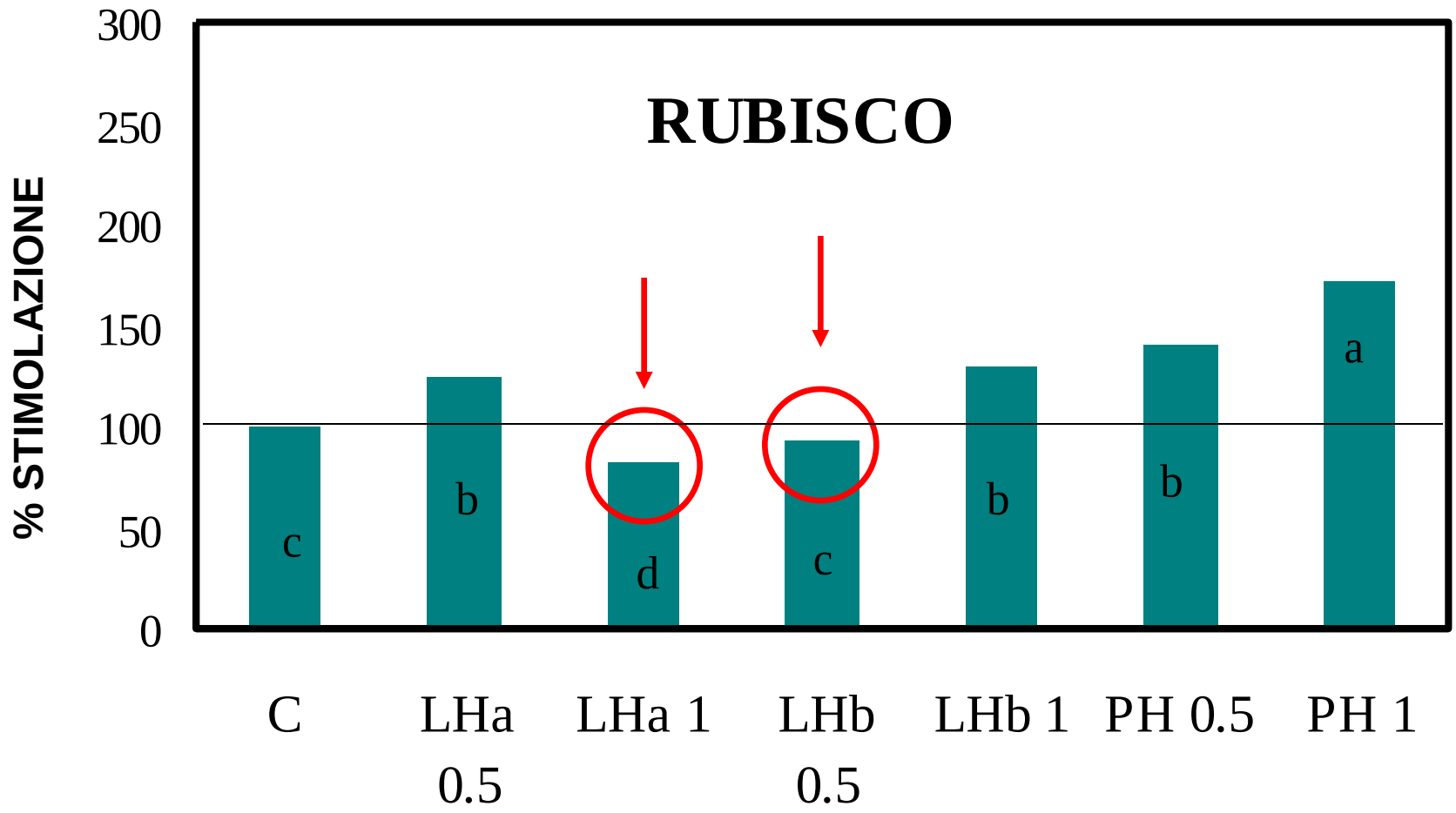
Infine, sono state valutate le attività enzimatiche di RUBISCO…

L'enzima RUBISCO (*Ribulasio 1,5 Carbossilasi Ossigenasi*), è l'enzima che catalizza la reazione di carbossilazione dello zucchero pentoso (ribulosio), il quale dopo una fase intermedia a 6 atomi di carbonio (*C*), si scinde in due molecole di 3-gliceraldeidefosfato.

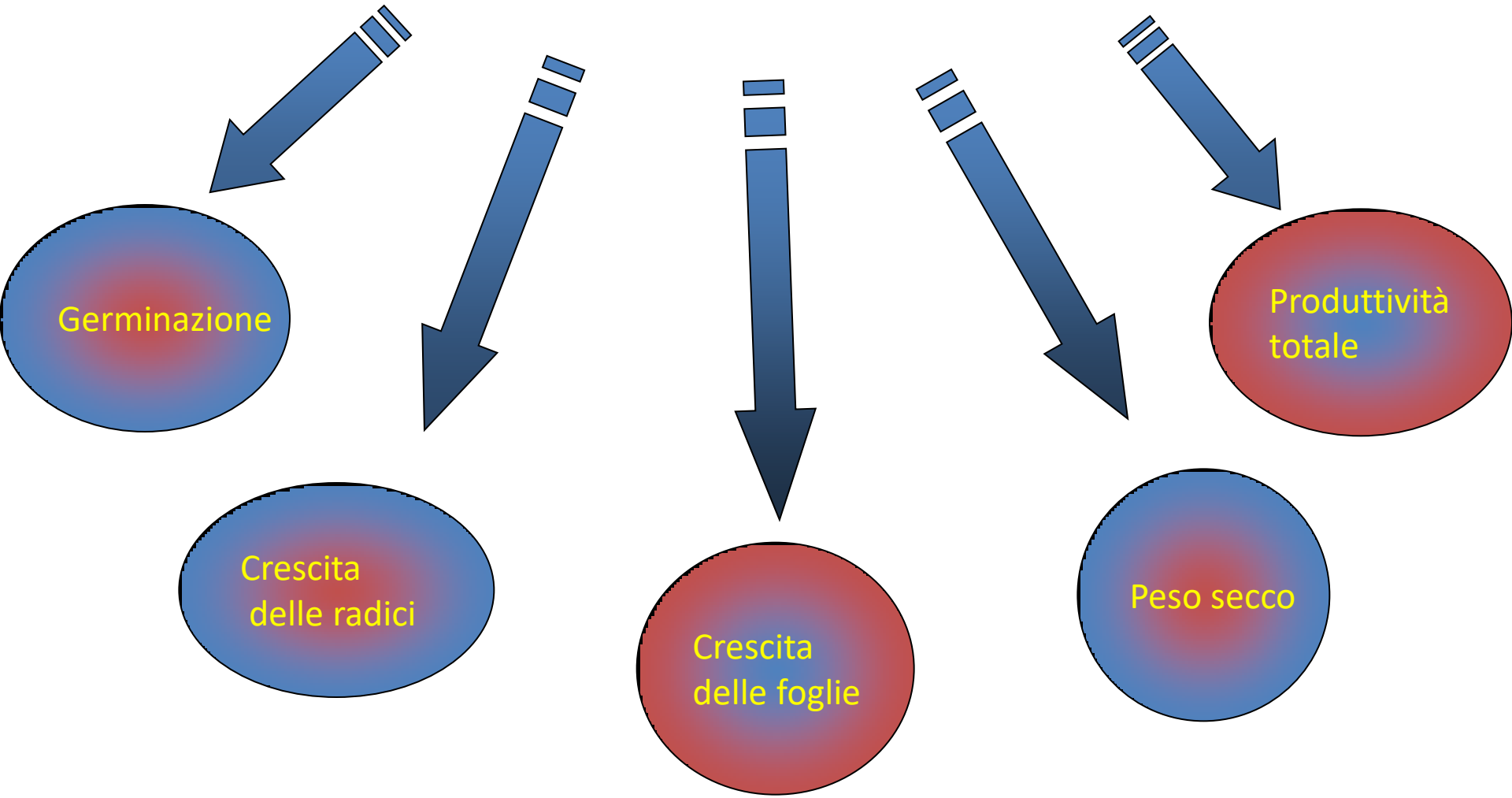


Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

La percentuale di stimolazione rileva:



Le sostanze umiche stimolano la crescita della pianta



GRAZIE PER L’ATTENZIONE