

## **Dottorato XXXV ciclo**

Sustainable Agricultural and Forestry Systems and Food Security  
(Coordinator: Prof. Albino Maggio)

### **Titolo**

Impiego di biostimolanti a base di idrolizzati proteici in orticoltura: approccio multidisciplinare per comprenderne i meccanismi di azione ed ottimizzarne l'efficacia

### **Proponente tutor**

Youssef Rouphael

### **Obiettivi del progetto di ricerca nel triennio e collaborazioni interdisciplinari**

(max 2000 caratteri spazi inclusi)

I biostimolanti sono sostanze e/o microrganismi utilizzati in agricoltura per aumentare l'efficienza d'uso dei nutrienti, la tolleranza delle piante a stress abiotici e la qualità dei prodotti. Tra le diverse tipologie di biostimolanti, gli idrolizzati proteici (IP), ossia le miscele di aminoacidi e peptidi ottenuti da idrolisi di matrici proteiche, sono quelli che stanno riscuotendo maggior interesse soprattutto in Italia, Spagna e Francia con un tasso di crescita annuo del mercato pari al 15%. In Europa, il primato produttivo degli IP appartiene all'Italia dove risiedono importanti aziende leader nel settore (Grena, ILSA, Italtollina, SICIT) con grosse potenzialità di crescita nel mercato globale. Gli IP sono ottenuti prevalentemente da idrolisi acida delle proteine animali (collagene) o attraverso idrolisi enzimatica di proteine da leguminose. Gli IP possono stimolare la crescita radicale delle piante soprattutto per azione auxino-simile determinata dalla presenza di specifici peptidi (es. Root Hair Promoting Peptide) o per incremento della sintesi di acido indolacetico indotta dall'apporto di un precursore, il triptofano. Tuttavia, i meccanismi di biostimolazione degli IP sono ancora poco conosciuti e limitate sono le conoscenze sulle frazioni più attive dei prodotti.

Obiettivo generale del progetto di dottorato è quello di studiare l'azione biostimolante di idrolizzati proteici (IP) di origine vegetale utilizzando il pomodoro ed la lattuga come piante modello. L'azione biostimolante sarà valutata considerando gli aspetti fisiologici e vegeto-produttivi della coltura e l'effetto sulle modificazioni del microbioma fogliare in condizioni colturali standard e limitanti la crescita (ridotta disponibilità di N o salinità). Il progetto si propone anche di comprendere i meccanismi d'azione degli IP e di individuare le frazioni più attive, sulla base delle variazioni dell'espressione genica e del metaboloma, con approccio di *translational research* che possa anche orientare e supportare le ditte produttrici per implementare i processi produttivi ed ottenere biostimolanti più efficaci. Inoltre, lo studio delle variazioni indotte da applicazioni fogliari di IP sul microbioma epifita permetteranno di comprendere i meccanismi indiretti di biostimolazione sulla pianta e di isolare forme batteriche da utilizzare come inoculanti microbici, in abbinamento con gli IP per potenziarne gli effetti.

#### **Obiettivi specifici:**

- caratterizzazione chimica e frazionamento in classi di peso molecolare di 2 IP;
- identificazione della capacità di IP e relative frazioni di stimolare/inibire in vitro la crescita di batteri promotori della crescita delle piante;
- individuazione di attività ormono-simile degli IP e relative frazioni;
- selezione di IP e delle frazioni in grado di incrementare l'efficienza d'uso dell'azoto e la tolleranza alla salinità della coltura;

- individuazione di geni e di metaboliti coinvolti nell'azione biostimolante degli IP e delle frazioni più attive;
- isolamento, caratterizzazione genetica e dell'attività biostimolante delle forme batteriche dominanti sulle foglie trattate con IP;
- miglioramento dell'azione biostimolante degli IP attraverso l'applicazione congiunta con batteri selezionati da foglie di pomodoro.

### **Elementi di innovazione e/o originalità del progetto rispetto allo stato dell'arte**

(max 2000 caratteri spazi inclusi)

Dal punto di vista scientifico, il progetto di dottorato contribuirà ad un avanzamento delle limitate conoscenze nel campo genetico, biochimico, fisiologico, agronomico e microbiologico sugli effetti biostimolanti degli idrolizzati proteici (IP) con particolare riferimento alla stimolazione della crescita delle piante, all'efficienza d'uso dell'azoto, alla tolleranza alla salinità e alla qualità nutrizionale del frutto del pomodoro e delle foglie di lattuga. L'impiego di tecnologie 'omiche' consentirà di comprendere i meccanismi molecolari e i pattern metabolici influenzati dall'applicazione degli IP nelle diverse condizioni colturali (diversa disponibilità di azoto e salinità). Il progetto di dottorato permetterà anche di comprendere gli effetti interattivi tra IP e microbioma della fillosfera ed individuare ceppi batterici promotori della crescita della coltura stimolati da applicazioni di IP. I risultati del progetto serviranno ad orientare e supportare le aziende produttrici di IP nell'innovazione di prodotto e di processo. La conoscenza degli effetti degli IP e delle relative frazioni sui processi metabolici della pianta potrà stimolare lo sviluppo industriale di nuove tecnologie di produzione finalizzate ad ottenere nuovi biostimolanti funzionali (per incrementare la tolleranza alla salinità e/o l'efficienza d'uso dell'azoto e/o la qualità nutrizionale dei frutti, e/o la rizogenesi). Innovazioni di prodotto e di processo potranno anche derivare dall'isolamento e dalla caratterizzazione di ceppi batterici promotori della crescita in grado di agire in modo sinergico con gli apporti di IP; tali microrganismi saranno il punto di partenza per lo sviluppo di inoculanti microbici su scala industriale. Da un punto di vista economico, il progetto di dottorato permetterà aziende produttrici di IP di porre sul mercato biostimolanti più efficaci e, quindi, di maggior successo commerciale. Inoltre, le aziende agricole potranno beneficiare dell'impiego di IP ad elevata efficacia con il miglioramento delle performance produttive soprattutto in condizioni limitanti la crescita (salinità e carenza di azoto) con conseguente incremento della redditività.

Un più diffuso impiego di biostimolanti in grado di aumentare l'efficienza d'uso dell'azoto in agricoltura consentirà la riduzione dell'apporto di fertilizzanti azotati con conseguente miglioramento della sostenibilità dei sistemi produttivi. Tale aspetto è particolarmente importante nelle aree orticole che insistono in zone vulnerabili all'inquinamento da nitrati dove esistono restrizioni nell'apporto di fertilizzanti azotati (limite massimo annuo di 170 kg di N per ettaro). L'impiego di IP in grado di migliorare la qualità nutrizionale dei frutti e delle foglie consentirà di offrire sul mercato un prodotto di elevato valore alimentare a vantaggio della collettività.

Per tutti questi motivi, il progetto di dottorato contribuirà a promuovere lo sviluppo sostenibile del settore agricolo e l'occupazione all'interno delle aziende produttrici di IP e di quelle agricole.

**Disponibilità fondi** (finanziamenti a sostegno delle attività di ricerca previste)

**PRIN Codice progetto:** 2017FYBLPP

**Budget Totale:** Euro 728.966

**Budget UniNa:** Euro 163.296  
**Durata progetto:** 3 anni (2019-2022)

**Collaborazioni con istituzioni straniere**

(max 500 caratteri spazi inclusi)

Il progetto prevede una collaborazione con la Photon Systems Instruments(PSI), in Repubblica Ceca, che metterà a disposizione la piattaforma di fenotipizzazione automatizzata e le competenze per l'analisi delle immagini. Inoltre, sono previste collaborazioni con l'Università della Tuscia e di Piacenza per la parte di orticoltura, microbiologia e chimica agraria.

## **PhD Course XXXV Cycle**

Sustainable Agricultural and Forestry Systems and Food Security  
(Coordinator: Prof. Albino Maggio)

### **Title**

Use of protein-hydrolysates as biostimulants of vegetable crops: elucidating their mode of action and optimizing their effectiveness through a multidisciplinary approach

### **Proposing tutor**

Youssef Rouphael

### **Objectives of the research project and interdisciplinary collaborations** (max 2000 characters)

Biostimulants are defined as materials, which contain substance(s) and/or microorganisms applied to the plants or the rhizosphere with the aim to enhance nutrient uptake and efficiency, abiotic stress tolerance, and/or product quality of crops, independently of its nutrient content. Among the different categories of biostimulants, protein hydrolysates (PHs), i.e. the mixture of amino acids and small peptides obtained from the hydrolysis of protein matrixes, are receiving great interest especially in Italy, Spain and France, where the market is showing an increase of about 15% on year base. Leader companies in the sector of biostimulants are in Italy, thus making this country the major producer at European level. PH qualitative composition, in terms of amino acids and peptides, have been demonstrated to play key roles as biostimulants through direct and indirect effects that trigger growth, increase yield and alleviate the impact of abiotic stress of open-field and greenhouse crops through the modulation of microbial communities associated with plants. PHs are known to stimulate the root growth mainly through auxin-like mechanisms, due to the presence of specific peptides (e.g. Root Hair Promoting Peptides), or by increasing the synthesis of indol-3-acetic acid induced by the supplementation of tryptophan, which is the biosynthesis precursor.

The main objective of the PhD project is to assess the biostimulant action of vegetal derived-PHs on tomato and lettuce as model crops. The biostimulant action will be evaluated in terms of morpho-physiological traits, microbiome modulation, and also molecular and biochemical processes under both optimal and adverse conditions (low nitrogen availability and/or salinity). A more specific aim of the project will be to shed light the physiological and molecular mechanisms affected by PH application, as well as identifying the most effective fractions of the products based on gene expression and metabolomics. The impact of PHs will be also evaluated at microbiome level, by identifying the microbial populations in treated and untreated tomato and lettuce leaves, in order to elucidate, the indirect biostimulant effects of PHs on crop performances and, to assess the food safety related to such agronomic practice. The adoption of a multidisciplinary, translational research approach will allow the transfer of results to fertilizer companies, to support the competitive innovation process by developing a new generation of highly efficient biostimulants.

The specific objectives of the PhD project can be summarized as follows:

- 1) production and chemical characterization of new vegetal PHs and their fractions
- 2) screening of PHs for biostimulant activities on selected crops at early stages of growth using a high-throughput phenotyping approach;
- 3) identification of hormone like activity of PHs and their fractions;

- 4) evaluation of selected PHs and their fractions for biostimulant activity in lettuce and tomato plants grown under optimal and adverse growing conditions (low N availability, salinity, and their combination) by the application of a multi-omic approach (i.e. metabolomic and transcriptomic);
- 5) assessment of PHs effect on microbial communities associated with lettuce and tomato plants, both at leaf and root level, with the aim of understanding the molecular basis of the PGPB-mediated biostimulation activity in plants;
- 6) integration of multi-omics data for unravelling the effects of PHs treatments in selected crops grown under optimal and adverse growing conditions.

**Innovation and originality of the project in relation to the state of the art**(max 2000 characters)

The application of biostimulants in particular protein hydrolysates (PHs) in agricultural practice is discussed very controversially. To a major part, this may be attributable to the insufficient effectiveness and reliability of existing commercial products, as well as to a limited knowledge on the conditions and requirements how to apply PHs successfully. Therefore, from a scientific perspective, the PhD project will contribute to advance the limited knowledge on the molecular, biochemical, physiological, agronomical and microbiological aspects of PH based biostimulants with particular emphasis on the increase of crop growth and productivity under single and combined abiotic stresses (low N availability and salinity) of two important horticultural commodities such as tomato and lettuce. The use of omics technologies will allow the understanding of molecular mechanisms and metabolic patterns affected by PH application under different growing conditions. The PhD project will provide new scientific insights on the most active components of the PHs thanks to the fractionation of the whole product and the use of advanced technologies for screening of PHs and their components for biostimulant activity. An important outcome of the project will be to elucidate the interaction between PH application and microbiome at leaves and root level under optimal and sub-optimal conditions (low nitrogen availability and salinity as well as combined stress). The results of the project will help Companies to develop more efficient biostimulants by using the PhD project scientific approach based on the use of omics technologies (high-throughput phenotyping, metabolomics, transcriptomics, and ionomics) to discover new biostimulants and understand their mode of action. A more widespread use of biostimulants able to increase the resource use efficiency in particular nitrogen use efficiency in vegetable cropping systems will contribute to reduce the needs of nitrogen fertilizer application and to 'produce more with less'. This is very important especially for nitrate vulnerable zones where farmers must face the restrictions on nitrogen fertilizer application (170 kg/ha of N as the maximum annual limit).

**Grant availability** (funds to support the research activities)

**PRIN Project:** 2017FYBLPP

**Total Budget:** Euro 728.966

**UniNa Budget:** Euro 163.296

**Three years project:** 2019-2022

**Collaborations with foreign institutions**(max 500 characters)

The multidisciplinary research will involve Photon Systems Instruments (PSI) in the Czech Republic, which will provide the automated phenotyping platform and image

analysis skills. Universities of Tuscia and Piacenza will also cover the parts dealing with horticulture, microbiology and omics.