

IDROLIZZATO ENZIMATICO DI FABACEAE

SEZIONE I

Informazioni generali

L'idrolizzato enzimatico di Fabaceae è il frutto di anni di ricerca e nasce all'interno del progetto Biovenus (il cui valore è stato di 2,5 milioni di euro), che ha visto collaborare ILSA con le Università di Padova, di Bologna e il CRA-RPS di Roma (ex ISNP).

La necessità da parte del mondo agricolo di prodotti con elevata efficienza da utilizzarsi a basse dosi è sempre più pressante ed è in linea con la politica di riduzione degli input in agricoltura.

Il prodotto in oggetto è un biostimolante liquido derivante dall'idrolisi enzimatica di tessuti vegetali della famiglia delle Fabaceae e ha dimostrato un positivo effetto stimolante del metabolismo delle piante, dovuto alla presenza dei molteplici fitocomposti in esso presenti.

Il prodotto è stato oggetto di diversi test in laboratorio, in camera di crescita e in pieno campo effettuati della nostra azienda e da istituti di ricerca privati e universitari, durante i quali ha dato prova dell'effetto biostimolante.

Nel suggerire i parametri da riportare in etichetta si è volutamente ommesso ogni riferimento alla presenza di azoto e carbonio organico al fine di evitare qualsiasi confusione con i tradizionali concimi organici e per evitare l'uso in tal senso da parte del consumatore finale.

PRODOTTO

Idrolizzato enzimatico di Fabaceae

PRODUTTORE

ILSA S.p.A.

INDIRIZZO

Via Quinta Strada, 28, 36075 Arzignano (Vi)

TELEFONO

0444 45 20 20

FAX

0444 45 68 64;

RESPONSABILE TECNICO CON IL QUALE MANTENERE I CONTATTI

Clizia Franceschi (cfranceschi@ilsagroup.com)



SEZIONE 2

Identificazione normativa D.Lgs 29 Aprile 2010, n. 75

Prodotto ad azione specifica su pianta - biostimolante.

Denominazione del tipo:

- 6.4.1.7
- Prodotto ad azione specifica su pianta
- Biostimolante - Idrolizzato enzimatico di Fabaceae

Modo di preparazione e componenti essenziali:

- Prodotto ottenuto per idrolisi enzimatica di tessuti vegetali appartenenti alla famiglia delle Fabaceae

Titolo minimo in elementi e/o sostanze utili:

- amminoacidi totali 5%
- amminoacidi liberi 1,5%
- grado di idrolisi 30%

Elementi e/o sostanze utili il cui titolo deve essere dichiarato:

- amminoacidi totali
- amminoacidi liberi
- grado di idrolisi

Note:

- Il prodotto presenta attività biostimolanti
- Contenuto in triacontanolo di origine naturale pari ad almeno 6 mg/kg



SEZIONE 3

Processo produttivo

3.1 CAPACITÀ PRODUTTIVA ANNUA

150.000kg (previsto raddoppio).

3.2 MATERIE PRIME

NATURA	NOME	ORIGINE GEOGRAFICA
Materia prima di base	Fabaceae disidratate	Italia (selezione ILSA)
Solvente / diluente	Acqua	Italia
Agente idrolitico	Enzimi cellulolitici e proteolitici	Italia (selezione ILSA)
Correttore di pH	Acido citrico	Italia (selezione ILSA)

Le Fabaceae costituiscono una famiglia vegetale variegata. Tra le specie che la compongono si ricordano piselli, fagioli, soia, erba medica, ecc. Le leguminose sono particolarmente utilizzate in agricoltura in quanto stabiliscono importanti interazioni simbiotiche con i batteri azoto-fissatori.

Gli studi hanno dimostrato che oltre alla presenza di proteine, i vegetali appartenenti a questa famiglia ed in particolare il genere *Medicago*, evidenziano una importante presenza di phytochemicals.

Medicago sativa, conosciuta anche come alfalfa o erba medica, è la quarta coltura più presente nel Nord America (dopo mais, soia e grano) ed è la più importante coltura foraggera. Attualmente questa coltura viene utilizzata anche in medicina, alimentazione umana, mangimistica e come fonte di enzimi industriali per processi biotecnologici.

I componenti bioattivi più importanti sono amidi, carboidrati, proteine (amminoacidi essenziali e non essenziali), tannini, sostanze pectiniche, saponine, ammine, derivati coumarinici, glicosidi triterpenici, carotenoidi, basi puriniche, steroli vegetali, fitoestrogeni (cumestrololo), flavoni, isoflavonoidi, vitamine e composti fenolici.

3.3 PROCESSO PRODUTTIVO

Le biotecnologie, classiche e soprattutto moderne, trovano applicazioni in moltissimi ambiti e settori produttivi, grazie alla versatilità della “materia prima” su cui si basano e cioè cellule ed enzimi. Attualmente per semplificare i vari campi di applicazione è possibile usare un codice di colori, che li identifica nelle principali categorie:

- Red Biotech: biotecnologie per il settore della salute, comprendente sistemi diagnostici e terapie innovative, costituisce il segmento trainante dell'intera industria biotecnologica a livello internazionale;
- Green Biotech: settore delle biotecnologie che si occupa dei processi agricoli. Ad esempio l'applicazione maggiormente conosciuta è il mais Bt, una pianta di mais OGM, in grado di produrre una tossina batterica, proveniente da *Bacillus thuringiensis* (da cui il nome Bt), tossica per gli insetti;
- White Biotech: si definiscono biotecnologie industriali tutti gli utilizzi delle tecniche di biologia molecolare rivolte ad agevolare i processi industriali, a produrre bioprodotto e bioenergie, a bonificare aree ambientalmente compromesse.

In questa ultima classe si inseriscono le biotecnologie industriali che utilizzano mezzi biologici, come gli enzimi, per la produzione di un prodotto commerciale o di consumo di massa. Le applicazioni sono molteplici e si basano principalmente sul fatto che gli enzimi necessitano di condizioni operative blande (pH, temperatura, solventi, etc.), con un risparmio in termini di denaro, tempo e infrastrutture, riducendo allo stesso tempo gli scarti inquinanti e l'uso di acqua.

ILSA da anni è uno dei leader europei nell'utilizzo della biocatalisi enzimatica per la produzione di fertilizzanti, specialties e biostimolanti. La biocatalisi enzimatica, lavorando a basse temperature e pH “dolci”, permette di estrarre da materie prime “delicate” le molecole senza degradarle, mantenendo quindi inalterato tutto il loro potenziale e le possibili attività sulla pianta.

Nei vari tessuti vegetali sono presenti le pareti cellulari, che creano una barriera con l'esterno e fungono da prima difesa della cellula. Queste pareti sono molto complesse e devono essere degradate per permettere la penetrazione degli enzimi atti a idrolizzare le proteine.

La parete cellulare può essere un ottimo substrato per molti enzimi in grado di degradarla, come:

- Cellulasi: le cellulasi (EC:3.2.1.4.) sono una classe di enzimi in grado di idrolizzare il legame β 1-4 glucosidico delle fibre di cellulosa. Industrialmente sono ampiamente utilizzate nelle industrie tessili e della produzione della pasta di cellulosa in cartiere. Sono ottenute prettamente da funghi e muffe delle specie *Pleurotus*, *Aspergillus* e *Trichoderma*;
- Emicellulasi: sono genericamente definite emicellulasi quella grande categoria di enzimi in grado di idrolizzare i legami glucosidici delle diverse strutture polisaccaridiche che compongono le emicellulose. Data la grande complessità e diversità delle emicellulose presenti in natura è ovvio che la stessa complessità e differenziazione si ritrovi anche nei biocatalizzatori naturalmente selezionati per l'idrolisi di tali strutture che sono genericamente classificati come EC 3.2.1.X.

Le proteine della parete cellulare dei vegetali sono degradate da proteasi, enzimi che scindono il legame peptidico tra due amminoacidi in una proteina. Le proteasi possono agire sia in maniera endo- sia eso- e a volte possono idrolizzare anche altri tipi di legami rispetto a quello peptidico.

ILSA ha selezionato una combinazione enzimatica in grado di estrarre i fitocompounds presenti nei tessuti di Fabaceae e sviluppato un processo altamente controllato che garantisce un prodotto standardizzato.

All'interno di bioreattori TSR (Top Stirred Reactor) avviene l'idrolisi enzimatica delle Fabaceae disidratate (FOTO). Al termine della reazione e della successiva concentrazione sottovuoto, il prodotto subisce diverse fasi di filtrazione prima del confezionamento finale.





SEZIONE 4

Composizione del prodotto finito*

* Indicazione degli elementi fertilizzanti come riportato nel Decreto Legislativo 29 Aprile 2010, n.75 Allegato 8. Tutti i dati riportati si riferiscono al prodotto tal quale ed in percentuale peso/peso.

I dati qui riportati sono al meglio delle nostre attuali conoscenze, ma non sono da intendersi come specifiche del prodotto.

4.1 PARAMETRI CHIMICO-FISICI

Stato fisico: fluido

Formulazione: liquido - bruno

PARAMETRO	METODO	UNITÀ	VALORE
pH	Reg. CE 2003/2003 All. IV	-	5,5-6,1
SALINITÀ	Reg. CE 2003/2003 All. IV	dS/m	1,30-1,65
DENSITÀ	IDL 1.2.1	kg/dm ³	1,13-1,15

4.2 COSTITUENTI

PARAMETRO	METODO	UNITÀ	VALORE
SOSTANZA ORGANICA	Calcolo	%	27-33
CENERI	IDL 1.2.13	%	5,5-6,5
UMIDITÀ	IDL 1.2.2	%	62-66
TOTALE	-	%	100

4.3 MACROELEMENTI

PARAMETRO	METODO	UNITÀ	VALORE
AZOTO (N) TOTALE	UNI EN 15750	%	1,6-2,4
AZOTO (N) AMMONICALE	UNI EN 15475	%	0,3-0,5
AZOTO (N) NITRICO	UNI EN 15476	%	<0,1
AZOTO (N) UREICO	IDL 1.2.35	%	<0,1
AZOTO (N) ORGANICO	Calcolo	%	1,3-1,9
CARBONIO (C) ORGANICO	PP 1.2.9	%	11,5-13,0

4.4 MESOELEMENTI

PARAMETRO	METODO	UNITÀ	VALORE
CALCIO (CaO) SOLUBILE IN ACQUA	Reg. CE 2003/2003 All. IV	%	<1
MAGNESIO (MgO)	Reg. CE 2003/2003 All. IV	%	<0,5
SODIO (Na ₂ O)	Reg. CE 2003/2003 All. IV	%	<0,5
ZOLFO TOTALE (SO ₃)	PP I.2.9	%	0,77-0,95

4.5 MICROELEMENTI

PARAMETRO	METODO	UNITÀ	VALORE
BORO (B) SOLUBILE IN ACQUA	Reg. CE 2003/2003 All. IV	mg/kg	<50
COBALTO (Co) SOLUBILE IN ACQUA	Reg. CE 2003/2003 All. IV	mg/kg	<5
RAME (Cu) SOLUBILE IN ACQUA	Reg. CE 2003/2003 All. IV	mg/kg	<50
FERRO (Fe) SOLUBILE IN ACQUA	Reg. CE 2003/2003 All. IV	mg/kg	<200
MANGANESE (Mn) SOLUBILE IN ACQUA	Reg. CE 2003/2003 All. IV	mg/kg	<200
MOLIBDENO (Mo) SOLUBILE IN ACQUA	Reg. CE 2003/2003 All. IV	mg/kg	<5
ZINCO (Zn) SOLUBILE IN ACQUA	Reg. CE 2003/2003 All. IV	mg/kg	<200

4.6 METALLI INDESIDERATI

PARAMETRO	METODO	UNITÀ	VALORE
ARSENICO (As) TOTALE	Reg. CE 2003/2003 All. IV	mg/kg	<0,1
PIOMBO (Pb) TOTALE	Reg. CE 2003/2003 All. IV	mg/kg	<1
CADMIO (Cd) TOTALE	Reg. CE 2003/2003 All. IV	mg/kg	<0,1
NICHEL (Ni) TOTALE	Reg. CE 2003/2003 All. IV	mg/kg	<5
MERCURIO (Hg) TOTALE	Reg. CE 2003/2003 All. IV	mg/kg	<0,1
CROMO ESAVALENTE (Cr VI)	Reg. CE 2003/2003 All. IV	mg/kg	non rilevabile

4.7 PARAMETRI DA ETICHETTA

PARAMETRO	METODO	UNITÀ	VALORE
AMMINOACIDI TOTALI	Dlgs 75/2010 Metodo X.11	%	>5
AMMINOACIDI LIBERI	Dlgs 75/2010 Metodo X.10	%	>1,5
GRADO DI IDROLISI	Dlgs 75/2010 Metodo X.6	%	>30
TRIACONTANOLO di origine naturale	IDL I.1.10	mg/kg	>6

4.8 ALTRI INDICATORI DI QUALITÀ

MASSE MOLECOLARI

M_p	Massa molecolare del picco di massima intensità	kDa 4,33
M_n	Numero medio della massa molecolare	kDa 8,83
M_w	Peso medio della massa molecolare	kDa 20,3
M_z	Valore z della media della massa molecolare	kDa 98,5
$P_{w/n}$	M_w/M_n	2,30
$P_{z/w}$	M_z/M_w	4,86

Determinazione mediante Cromatografia Liquida ad Esclusione Dimensionale (HP-SEC)

GRADO DI RACEMIZZAZIONE

Elettroforesi Capillare ad alte prestazioni (HPCE), metodo in accordo con Cavani <i>et al.</i> (2003)	>90% L-aa
---	-----------

4.9 PHYTOCHEMICALS

AMMINOACIDI NON PROTEICI

Esplicitabili a richiesta

ACIDI BENZOICI E FENILPROPANOIDI

Esplicitabili a richiesta

POLICHETIDI AROMATICI

Esplicitabili a richiesta

ACIDI GRASSI E POLICHETIDI

Esplicitabili a richiesta

ORMONI NATURALI

Esplicitabili a richiesta

STERIODI

Esplicitabili a richiesta

SEZIONE 5

Sicurezza del prodotto e aspetti ambientali

Il prodotto è costituito da proteine idrolizzate di origine vegetale e da altri estratti vegetali di molecole presenti nei tessuti di Fabaceae.

Non contiene sostanze pericolose per l'ambiente e non possiede proprietà che possano danneggiare, attraverso l'impiego agronomico, i suoli, i corsi d'acqua, il mondo vegetale ed animale.

L'utilizzazione del prodotto deve avvenire rispettando le prescrizioni vincolanti dettate dalla normativa comunitaria, nazionale e regionale in materia ambientale.

Il prodotto può essere utilizzato sia per via radicale sia fogliare; se ne sconsiglia l'uso su terreni gelati e comunque in condizioni di temperatura molto bassa, inferiore 0°C. Viene altresì sconsigliato l'utilizzo in prossimità di eventi piovosi.

Per qualsiasi ulteriore informazione la consultare scheda di sicurezza allegata.

5.1 ANALISI MICROBIOLOGICHE

PARAMETRO	UM	VALORE	METODO
E.coli β -glucuronidasi positivo	UFC/g	<10	ISO 16649-2:2001
Salmonella spp.	-	Assente in 25 g	DM 1337 27/01/2014 (Gu 42 20/02/2014) All Met 15
Stafilococco aureus (coagulasi +)	/25 g	62-66	Rapporti ISTISAN 2007/5 pag 188 Met. ISS A 018A



SEZIONE 6

Effetti

L'idrolizzato enzimatico di Fabaceae promuove l'assorbimento dell'azoto nelle piante attraverso la regolazione delle vie metaboliche di azoto e carbonio. Ciò normalmente si traduce in una maggiore crescita delle piante, up-take dei microelementi ed accumulo di zuccheri nelle foglie.

Questi effetti sono dovuti principalmente agli amminoacidi, ai polialcoli a lunga catena ed agli altri phytocompounds presenti che influenzano l'attività di numerosi enzimi coinvolti nel metabolismo del carbonio (malato deidrogenasi MDH, isocitrato deidrogenasi IDH, citrato sintetasi CS) e nell'assorbimento e riduzione dell'azoto (nitrato reductasi NR, glutammio sintetasi GS, glutammato sintetasi GOGAT, aspartato aminotransferasi AspAT). Ciò si esprime nell'aumento del peso fresco e secco dei trattati e nell'up-take dei microelementi.

L'effetto di questi compound è evidente inoltre nell' aumento della quantità di pigmenti fotosintetici, con conseguente maggiore efficienza fotosintetica della pianta.

Oltre agli enzimi coinvolti nel metabolismo primario è evidente anche l'aumento dell'attività dell'enzima PAL (fenilalanina ammonio liasi), cardine di vari pathway legati al metabolismo secondario. Questa attività si traduce in una maggiore risposta verso gli stress abiotici, come salinità, stress idrico e da temperatura.

Di seguito una tabella riassuntiva degli effetti del prodotto su pianta modello con i relativi riferimenti bibliografici.



EFFETTO	PIANTA MODELLO	RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	
Crescita e sviluppo			
+ attività hormon-like	<i>L.sativum and C. intybus</i>	Schiavon <i>et al.</i> 2008, Ertani <i>et al.</i> 2009	
+ biomassa	<i>Z. mays</i>	Schiavon <i>et al.</i> 2008, Ertani <i>et al.</i> 2009	
+ contenuto in zuccheri i foglia		Schiavon <i>et al.</i> 2008	
- contenuto in nitrati		Schiavon <i>et al.</i> 2008, Ertani <i>et al.</i> 2009	
+ attività enzimatiche		Schiavon <i>et al.</i> 2008, Ertani <i>et al.</i> 2009	
+ gene expression		Schiavon <i>et al.</i> 2008	
+ uptake		Ertani 2009	
+ K+ in foglia		Ertani <i>et al.</i> 2013	
+ SPAD		Ertani <i>et al.</i> 2012	
+ proteine		Ertani <i>et al.</i> 2012	
+ Crescita, maturazione, n°frutti		<i>C. chinensis</i>	Ertani <i>et al.</i> 2015
Miglioramento qualità del raccolto			
+ attività antiossidante	<i>C. chinensis</i>	Ertani <i>et al.</i> 2014	
+ componenti attivi (es. capsaicina)		Ertani <i>et al.</i> 2015	
Tolleranza e stress abiotici			
+ prolina nelle foglie	<i>Z. mays</i>	Ertani <i>et al.</i> 2012	
+ attività PAL			
+ contenuto in flavonoidi			
+ gene expression (ZmPALI)			
+ crescita in presenza di NaCl			
+ SPAD			
+ contenuto in flavonoidi			
+ attività PAL			
+ germinazione, crescita e Chl	<i>L. perenne</i>	Ertani <i>et al.</i> 2010	

6.1 ATTIVITÀ HORMON-LIKE

Per la determinazione dell'attività auxinica e gibberellinica dell'idrolizzato è stato seguito il metodo proposto da Audus (1972), che si basa rispettivamente sulla capacità dell'acido indolacetico (IAA) di inibire la crescita delle radici di crescione (*Lepidum sativum* L.) e sulla capacità dell'acido gibberellico di incrementare l'allungamento dell'ipocotile di plantule di cicoria zuccherina (*Cichorium intybus* L.).

Il trattamento con l'idrolizzato enzimatico di Fabaceae induce un allungamento dell'ipocotile di cicoria in maniera proporzionale alla concentrazione usata, seguendo lo stesso trend dell'acido gibberellico.

Per quanto riguarda l'attività auxino-simile il confronto con i risultati ottenuti con le varie concentrazioni di IAA evidenzia come il prodotto presenti una blanda attività.

Evidente e statisticamente significativo l'aumento di biomassa.

6.2 PARAMETRI DI CRESCITA, AUMENTO DELLA BIOMASSA

Trattamenti	ml/l	RADICI		FOGLIE	
		g	%	g	%
Controllo	-	0,107a	100	5,638b	100
FH	0,01	0,144d	135	5,919ab	105
FH	0,1	0,152d	142	6,202ab	110
FH	1,0	0,128b	120	6,258a	111

Tabella 6.2 Risultati di una prova eseguita con plantule di mais in allevamento in idroponica presso l'Università degli studi di Padova. I pesi riportati sono pesi secchi. È evidente e statisticamente significativo l'aumento di biomassa rispetto al controllo. Lettere differenti nella stessa colonna indicano una differenza statisticamente significativa tra i trattamenti ($p \leq 0,05$) secondo il test di Student-Newman-Keuls.

Una ulteriore evidenza dell'attività biologica dei prodotti testati è fornita anche dalle modificazioni indotte dai biostimolanti sull'architettura dell'apparato radicale; le piante trattate presentano infatti, radici morfometricamente diverse dal controllo, come si evince dalla figura 6.2 realizzata mediante microscopia elettronica a scansione.



Immagine 6.2 Radici di mais, immagini al microscopio elettronico a scansione. A sinistra radice di plantula di mais cresciuta in soluzione nutritiva Hoagland, a destra radice di plantula di mais cresciuta in un soluzione nutritiva Hoagland contenente idrolizzato enzimatico di Fabaceae.

6.3 UP-TAKE MICROELEMENTI

Valutazione dell'efficacia nel modulare il trasporto dei microelementi approfondita mediante analisi del contenuto in foglie e radici. Sia a livello radicale che fogliare, si osserva un incremento del contenuto di elementi ed in particolare magnesio, manganese e ferro sono risultati superiori rispetto al controllo.

Trattamento	FOGLIE				RADICI			
	Mn (ppm)	Mg (ppm)	Cu (ppm)	Fe (ppm)	Mn (ppm)	Mg (ppm)	Cu (ppm)	Fe (ppm)
Controllo	2,1c	37c	0,04b	3,12b	12b	224c	0,05c	N.D.
FH 0,01 ml/l	2,5b	39b	0,05b	9,56c	55b	1134b	1b	216a
FH 0,1 ml/l	3,5a	42ab	0,12a	4,13a	86a	1455a	6a	104b

Tabella 6.3 Contenuto di elementi in foglie e radici di mais trattato con idrolizzato enzimatico di Fabaceae (FH). I valori ottenuti sono la media di 5 repliche. Lettere differenti nella stessa colonna indicano una differenza statisticamente significativa tra i trattamenti ($p \leq 0,05$) secondo il test di Student-Newman-Keuls.

6.4 CONTENUTO IN NITRATI

L'azoto è uno degli elementi che risulta maggiormente influenzato dal trattamento con il prodotto. In particolare è evidente come il contenuto in nitrati sia nelle radici sia nelle foglie sia statisticamente inferiore rispetto al controllo.

Trattamento	ml	RADICI		FOGLIE	
		NO ₃ ⁻ (μmol [g fw] ⁻¹)	%	NO ₃ ⁻ (μmol [g fw] ⁻¹)	%
Controllo	-	73,71a	100	1,94a	100
FH	0,01	11,13b	15	0,8c	41
FH	0,1	6,98c	10	0,9c	46
FH	1,0	6,98c	10	1,3b	67

Tabella 6.4 Contenuto di nitrati in radici e foglie di plantule di mais trattate con idrolizzato enzimatico di Fabaceae (FH). I valori ottenuti sono la media di 5 repliche. Lettere differenti nella stessa colonna indicano una differenza statisticamente significativa tra i trattamenti ($p \leq 0,05$) secondo il test di Student-Newman-Keuls.



6.5 CONTENUTO IN ZUCCHERI E PROTEINE

Trattamenti effettuati su piante di mais allevate in idroponica evidenziano incrementi significativi nel contenuto di zuccheri e proteine nelle foglie.

		FOGLIE			
Trattamento	ml	Saccarosio mg g ⁻¹ pf	Glucosio mg g ⁻¹ pf	Fruttosio mg g ⁻¹ pf	Proteine mg g ⁻¹ pf
Controllo	-	116,73a	26,964a	7,127a	284a
FH	0,01	133,22b	28,563a	4,962a	312a
FH	0,1	213,03c	30,152a	17,529b	451b

Tabella 6.5 Contenuto di zuccheri e proteine in foglie di plantule di mais trattate con idrolizzato enzimatico di Fabaceae (FH). I valori ottenuti sono la media di 5 repliche. Lettere differenti nella stessa colonna indicano una differenza statisticamente significativa tra i trattamenti ($p \leq 0,05$) secondo il test di Student-Newman-Keuls.

6.6 ATTIVITÀ ENZIMATICHE

Effetti dell'idrolizzato enzimatico di Fabaceae sui pathways di azoto e carbonio in piante modello (*Zea mays*), mediante misurazione delle attività enzimatiche di:

CICLO CTA

CS	Citrato sintetasi	E.C. 4.1.3.7
IDH	NADP ⁺ isocitrato deidrogenasi	E.C. 1.1.1.42
MDH	Malato deidrogenasi	E.C. 1.1.1.37

ASSIMILAZIONE E METABOLISMO DELL'AZOTO

NR	Nitrato reduttasi	E.C. 1.7.1.1
NiR	Nitrito reduttasi	E.C. 1.7.1.4
GS	Glutamina sintetasi	E.C. 6.3.1.2
GOGAT	Glutammato sintetasi	E.C. 1.4.1.14
AS	Asparagina sintetasi	E.C. 6.3.5.4
AspAT	Aspartato Ammino Transferasi	E.C. 2.6.1.1

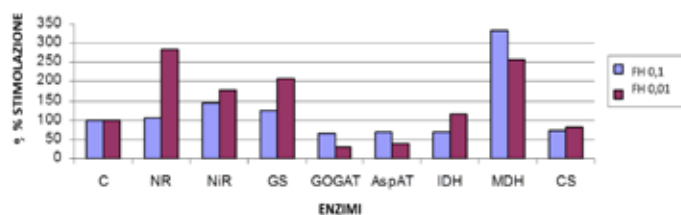


Grafico 6.6 a. - Controllo

Attività enzimatiche in radici di plantule di mais trattate con idrolizzato enzimatico di Fabaceae (FH). I valori ottenuti sono la media di 5 repliche.

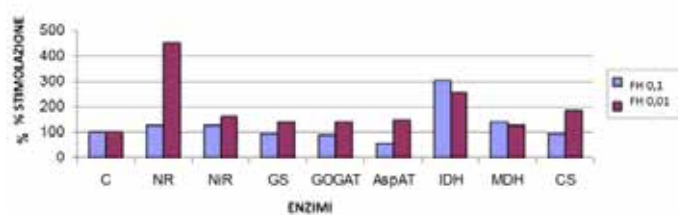


Grafico 6.6 b. - Controllo

Attività enzimatiche in foglie di plantule di mais trattate con idrolizzato enzimatico di Fabaceae (FH). I valori ottenuti sono la media di 5 repliche.

6.7 PROFILO TRASCRIZIONALE

Conferma dell'effetto di stimolazione del metabolismo azotato mediante analisi del profilo trascrizionale del gene codificante per l'enzima coinvolto nel primo step del processo di assimilazione riduttiva del nitrato, nitrato reduttasi (NR), e dei geni codificanti per alcuni degli enzimi del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA).

Valutazione dell'espressione trascrizionale del gene codificante per l'asparagina sintetasi (AS), enzima chiave del processo di organizzazione dell'azoto inorganico nell'aminoacido asparagina.

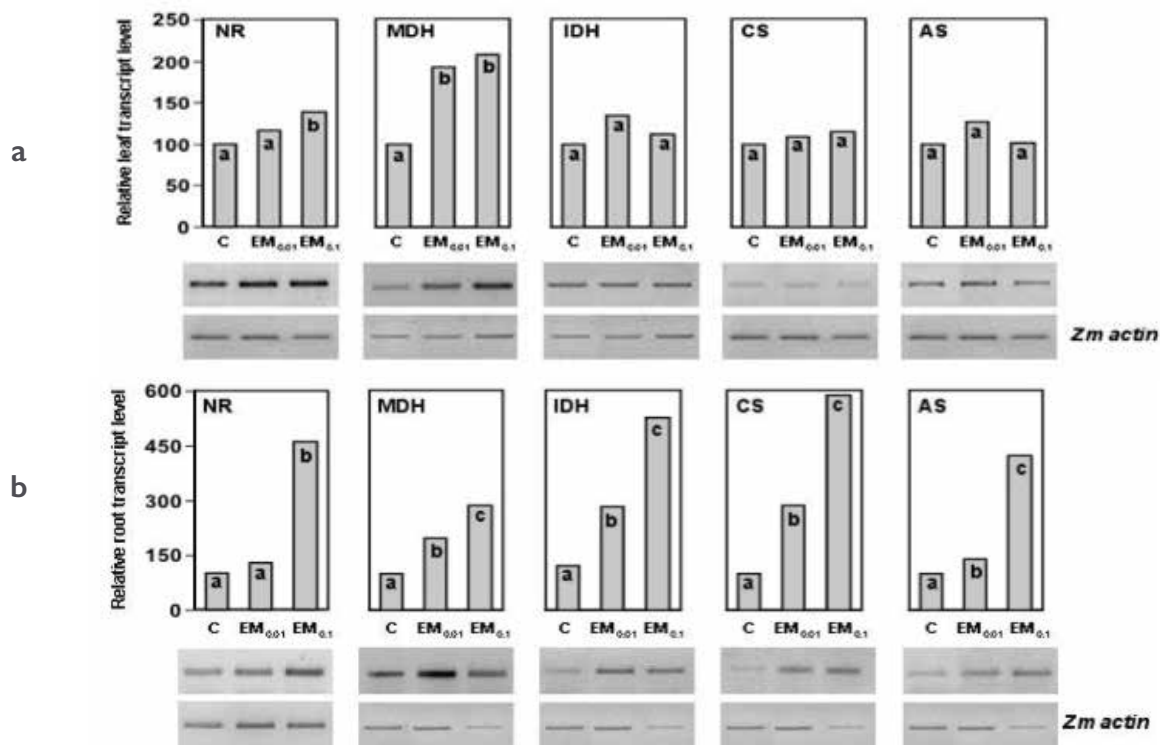


Figura 6.7 Pattern di espressione trascrizionale evidenziato nelle foglie (b) di piante di *Zea mays* e in radici (a) dei geni *Zm actin*, NR, MDH, IDH, CS, AS, che codificano rispettivamente per actina, nitrato reduttasi, malato deidrogenasi, isocitrato deidrogenasi, citrato sintasi, asparagina sintetasi. EM00 corrisponde a 0,01 ml/l di FH ed EM0 corrisponde a 0,1 ml/l di FH.

La quantificazione delle bande è stata eseguita usando il programma ImageJ a seguito di normalizzazione rispetto al gene costitutivo actina. I valori normalizzati mostrati in grafico sono stati calcolati relativamente al controllo (C) posto uguale a 100. I valori riportati nei grafici risultano dalla media di tre esperimenti di RT-PCR indipendenti (\pm SE).

Lettere differenti nella stessa colonna indicano una differenza statisticamente significativa tra i trattamenti ($p \leq 0,05$) secondo il test di Student-Newman-Keuls.

6.8 QUALITÀ

TRATTAMENTO (ml l ⁻¹)		ZUCCHERI RIDUCENTI (GLUCOSIO + FRUTTOSIO)			
		FIORITURA		MATURAZIONE	
		μg	%	μg	%
FOGLIA					
Controllo	-	4,19±1,12c	100	19,37±1,05a	100
FH	25	7,00±1,82b	167	18,39±1,23ab	95
FH	50	14,89±2,45a	355	16,35±0,97b	84
PEPERONCINI ROSSI					
Controllo	-	23,87±3,48a	100	67,12±4,66d	100
FH	25	17,68±2,66b	74	118,86±6,36a	177
FH	50	17,48±2,59b	73	100,83±5,88b	150
PEPERONCINI VERDI					
Controllo	-	17,56±2,33b	100	2,64±0,23c	100
FH	25	10,82±0,78c	62	9,47±0,85a	359
FH	50	32,89±3,01c	187	5,66±0,68b	214

Tabella 6.8 A Risultati di una prova eseguita con plantule di peperoncino presso l'Università degli studi di Padova. Effetti dell'idrolizzato enzimatico di Fabaceae sulla concentrazione di glucosio e fruttosio in piante di peperoncino alla fioritura ed in fase di maturazione. Lettere differenti nella stessa colonna indicano una differenza statisticamente significativa tra i trattamenti ($p \leq 0,05$) secondo il test di Student-Newman-Keuls.

TRATTAMENTO (ml l ⁻¹)		FIORITURA				MATURAZIONE			
		CAPSAICINA		DIIDROCPSAICINA		CAPSAICINA		DIIDROCPSAICINA	
		µg g ⁻¹ dw	%	µg g ⁻¹ dw	%	µg g ⁻¹ dw	%	µg g ⁻¹ dw	%
FOGLIA									
Controllo	-	-	-	0,91±0,02b	100	-	-	-	-
FH	25	-	-	1,80±0,06a	198	-	-	-	-
FH	50	-	-	0,76±0,02c	84	-	-	-	-
PEPERONCINI ROSSI									
Controllo	-	155,4±7,2c	100	42,8±1,18b	100	48,3±3,8d	100	17,2±0,6c	100
FH	25	201,1±6,2a	130	38,1±1,76b	91	220,1±52,5c	459	46,3±12,0b	262
FH	50	211,2±7,8a	137	62,7±3,83a	146	335,0±72,1a	696	78,2±14,1a	441
PEPERONCINI VERDI									
Controllo	-	179,3±18,3a	100	46,35±11,2a	100	89,0±13,2d	100	89,0±13,2d	100
FH	25	153,3±15,8b	86	38,74±11,5b	84	98,2±12,8c	111	25,4±13,1c	93
FH	50	160,2±13,2b	89	47,27±12,16a	102	117,1±16,2b	132	43,6±15,5b	161

Tabella 6.8 B Risultati di una prova eseguita con plantule di peperoncino in vaso presso l'Università degli studi di Padova. Effetti dell'idrolizzato enzimatico di Fabaceae sulla concentrazione di capsaicina e diidrocapsaicina in piante di peperoncino alla fioritura ed in fase di maturazione. Lettere differenti nella stessa colonna indicano una differenza statisticamente significativa tra i trattamenti ($p \leq 0,05$) secondo il test di Student-Newman-Keuls.

6.9 STRESS SALINO

TRATTAMENTO (ml l ⁻¹)	RADICI		FOGLIE	
	Peso fresco (g)	%	Peso fresco (g)	%
Controllo	1,98 ± 0,05 b	100	4,66 ± 0,12 b	100
FH 1 mg/l	3,51 ± 0,10 a	177	5,54 ± 0,16 a	119
25 mM NaCl	1,41 ± 0,13 c	71	3,02 ± 0,13 d	65
25 mM NaCl + FH	1,87 ± 0,08 b	94	3,88 ± 0,13 c	69
75 mM NaCl	1,24 ± 0,10 cd	63	2,59 ± 0,15 e	56
75 mM NaCl + FH	1,84 ± 0,13 b	93	3,15 ± 0,24 cd	68
150 mM NaCl	1,01 ± 0,10 d	51	2,10 ± 0,12 f	45
150 mM NaCl + FH	1,59 ± 0,11 c	80	2,66 ± 0,17 e	57

Tabella 6.9 A Risultati di una prova eseguita con plantule di mais in allevamento in idroponica presso l'Università degli studi di Padova. I pesi riportati sono pesi freschi di radici e foglie cresciute per 14 gg in una soluzione nutritiva completa con 0 (controllo), 25, 75 e 150 mM di NaCl. Un sottocampione di queste plantule è stato trattato al 12 giorno con idrolizzato enzimatico di Fabaceae alla concentrazione di 1 mg/l. Lettere differenti nella stessa colonna indicano una differenza statisticamente significativa tra i trattamenti ($p \leq 0,05$) secondo il test di Student-Newman-Keuls.

TRATTAMENTO (ml l ⁻¹)	SPAD	PROTEINE	
		Radici mg (g peso fresco) ⁻¹	Foglie mg (g peso fresco) ⁻¹
Controllo	32,66 ± 0,13 b	1,01 ± 0,02 b	2,90 ± 0,06 c
FH 1 mg/l	37,33 ± 0,10 a	1,15 ± 0,03 a	3,40 ± 0,11 a
25 mM NaCl	29,54 ± 0,07 c	1,00 ± 0,03 b	2,72 ± 0,12 cd
25 mM NaCl + FH	30,93 ± 0,09 bc	1,16 ± 0,11 ab	3,22 ± 0,07 b
75 mM NaCl	29,01 ± 0,07 c	0,82 ± 0,03 c	2,19 ± 0,11 e
75 mM NaCl + FH	31,36 ± 0,14 b	1,02 ± 0,10 b	3,16 ± 0,02 b
150 mM NaCl	28,14 ± 0,12 d	0,79 ± 0,03 c	1,83 ± 0,14 f
150 mM NaCl + FH	30,15 ± 0,19 bc	0,98 ± 0,02 b	2,72 ± 0,13 cd

Tabella 6.9 B Risultati di una prova eseguita con plantule di mais in allevamento in idroponica presso l'Università degli studi di Padova. Indice SPAD e contenuto in proteine riguardanti plantule cresciute per 14 gg in una soluzione nutritiva completa con 0 (controllo), 25, 75 e 150 mM di NaCl. Un sottocampione di queste plantule è stato trattato al 12 giorno con idrolizzato enzimatico di Fabaceae alla concentrazione di 1 mg/l. Lettere differenti nella stessa colonna indicano una differenza statisticamente significativa tra i trattamenti ($p \leq 0,05$) secondo il test di Student-Newman-Keuls.

TRATTAMENTO	PROLINA	FENOLI	FLAVONOIDI	PAL
	$\mu\text{g g}^{-1} \text{ f.wt}$	$\text{mg acido gallico g}^{-1} \text{ f.wt}$	$\text{mg acido gallico g}^{-1} \text{ f.wt}$	$\text{Nmol cinn acid mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$
Controllo	$315,01 \pm 23,04 \text{ c}$	$1,020 \pm 0,06 \text{ e}$	$0,084 \pm 0,002 \text{ e}$	$3,94 \pm 0,31 \text{ f}$
FH 1 mg/l	$310,12 \pm 34,11 \text{ c}$	$0,820 \pm 0,02 \text{ f}$	$0,075 \pm 0,013 \text{ e}$	$3,04 \pm 0,29 \text{ f}$
25 mM NaCl	$377,03 \pm 24,09 \text{ b}$	$2,080 \pm 0,12 \text{ c}$	$0,171 \pm 0,005 \text{ d}$	$8,03 \pm 0,20 \text{ e}$
25 mM NaCl + FH	$422,16 \pm 23,12 \text{ b}$	$1,101 \pm 0,22 \text{ d}$	$0,275 \pm 0,011 \text{ c}$	$12,92 \pm 0,15 \text{ c}$
75 mM NaCl	$388,18 \pm 34,23 \text{ b}$	$3,110 \pm 0,14 \text{ b}$	$0,263 \pm 0,020 \text{ cd}$	$12,34 \pm 0,15 \text{ c}$
75 mM NaCl + FH	$392,23 \pm 19,05 \text{ b}$	$1,122 \pm 0,40 \text{ d}$	$0,326 \pm 0,031 \text{ b}$	$15,27 \pm 0,22 \text{ b}$
150 mM NaCl	$410,22 \pm 32,13 \text{ b}$	$4,152 \pm 0,24 \text{ a}$	$0,270 \pm 0,021 \text{ c}$	$12,69 \pm 0,18 \text{ d}$
150 mM NaCl + FH	$492,20 \pm 26,16 \text{ a}$	$1,138 \pm 0,22 \text{ d}$	$0,372 \pm 0,022 \text{ a}$	$17,47 \pm 0,33 \text{ a}$

Tabella 6.9 c Risultati di una prova eseguita con plantule di mais in allevamento in idroponica presso l'Università degli studi di Padova. Contenuto in prolina, fenoli, flavonoidi ed attività dell'enzima PAL riguardanti plantule cresciute per 14 gg in una soluzione nutritiva completa con 0 (controllo), 25, 75 e 150 mM di NaCl. Un sottocampione di queste plantule è stato trattato al 12 giorno con idrolizzato enzimatico di Fabaceae alla concentrazione di 1 mg/l. Lettere differenti nella stessa colonna indicano una differenza statisticamente significativa tra i trattamenti ($p \leq 0,05$) secondo il test di Student-Newman-Keuls.

6.10 SHELF LIFE

La Risonanza Magnetica per Immagini (MRI) è una tecnica non invasiva e non distruttiva che non altera l'integrità dei campioni e le proprietà organolettiche. MRI permette di studiare i cambiamenti che avvengono durante la conservazione e l'evoluzione della morfologia interna.

Per ogni sezione di campione che viene analizzata mediante MSME (Multi-Slice-Multi Echo) si ottengono 144 immagini, nelle quali il segnale, monitorato ed utilizzato per la ricostruzione dell'immagine finale, è quello dell'acqua.

Le immagini ottenute permettono di valutare la mobilità dell'acqua nei tessuti e possono quindi essere interpretate nel seguente modo:

- Zone scure: indicano acqua con bassa mobilità e forti interazioni con le cellule. Nei campioni vegetali, l'acqua molto legata indica verosimilmente la presenza di tessuti fibrosi. La permanenza delle zone scure nel tempo durante la conservazione indica una stabilità della consistenza del frutto;
- Zone chiare: indicano acqua molto mobile e con deboli interazioni con la matrice cellulare. Nei campioni vegetali dove è presente rilascio dell'acqua durante la conservazione, le zone bianche indicano una perdita di consistenza del frutto nel tempo.

	CONTROLLO NON TRATTATO	IDROLIZZATO DI FABACEAE
1st day storage		
4th day storage		

Tabella 6.10 Risultati: Dalle immagini MSME al 4° giorno si evince che l'uva non trattata si deteriora molto più velocemente di quella trattata.



Laboratorio ILSA



Particolare della camera climatica ILSA

SEZIONE 7

Impiego del prodotto

7.1 MODO D'IMPIEGO DEL PRODOTTO

Il prodotto può svolgere differenti azioni specifiche in funzione della concentrazione delle sostanze attive, predeterminate in fase produttiva, e delle modalità di impiego.

7.2 PRECAUZIONI E CONDIZIONI D'USO PARTICOLARI

Miscele possibili

Amminoacidi
Estratti vegetali
Acidi umici
Alghe
Concimi organici
Concimi organo-minerali
Concimi minerali
Microelementi
Triazoli
Neonicotinoidi
Strobilurine
Sulfoniluree
Fosfiti

Miscele sconsigliate

Con prodotti a pH estremi

Condizioni climatiche da evitare

Pre e post piogge

Condizioni di suolo da evitare

Prossimità alla capacità di campo

Condizioni colturali da evitare

Nessuna

Da non impiegare sulle seguenti colture

Nessuna

7.3 COLTURE

COLTURA	EPOCA	DOSE
Actinidia	5 applicazioni: Bottoni fiorali, Fioritura, Allegagione, Ingrossamento frutto, Invaiaura.	1,5-2 kg/ha
Agrumi	5 applicazioni: Bottoni fiorali, Fioritura, Allegagione, Ingrossamento frutto, Invaiaura.	1,5-2 kg/ha
Cavolfiore	4-5 applicazioni ogni 15 giorni, a partire da due settimane dopo il trapianto.	2-2,5 kg/ha (pieno campo) 0,5 kg/1.000 m ² (serra)
Cipolla, Aglio	3 applicazioni ogni 15 giorni, a partire da un mese dopo il trapianto.	1,5-2 kg/ha (pieno campo) 0,5 kg/1.000 m ² (serra)
Fragola	4-5 applicazioni ogni 15 giorni, a partire da due settimane dopo il trapianto.	1,5-2 kg/ha (pieno campo) 0,5 kg/1.000 m ² (serra)
Mais e altri cereali	2 interventi, in occasione dei trattamenti antiparassitari, a partire dalla levata	1-2 kg/ha
Melo, Pero	5 applicazioni: Bottoni rosa, Fioritura, Allegagione, Frutto noce/ Ingrossamento frutto, Invaiaura.	1,5-2 kg/ha
Melone, Zucchini	4-5 applicazioni ogni 15 giorni, a partire da due settimane dopo il trapianto.	1,5-2 kg/ha (pieno campo) 0,5 kg/1.000 m ² (serra)
Olivo	4 interventi: mignolatura, formazione drupe, accrescimento drupe, invaiatura/inolizione	1-2 kg/ha
Patata	4 applicazioni ogni 15 giorni, a partire da inizio tuberificazione	1,5-2 kg/ha
Pesco, Albicocco, Ciliegio, Susino	5 applicazioni: Fioritura, Allegagione, Scamicatura, Ingrossamento frutto, Invaiaura.	1,5-2 kg/ha
Pomodoro, peperone e altre Solanacee	4-5 applicazioni ogni 15 giorni, a partire da due settimane dopo il trapianto.	2-2,5 kg/ha (pieno campo) 0,4 kg/1.000 m ² (serra)
Spinacio, Indivia, Lattuga, Radicchio e altre orticole di IV gamma	3-4 interventi ogni 8 giorni, a partire da 1 settimana post-trapianto	2,5 kg/ha (pieno campo) 0,5 kg/1.000 m ² (serra)
Vite da tavola	3-4 applicazioni ogni 15 giorni, da fioritura a invaiatura.	2-3 kg/ha
Vite da vino	5 interventi ogni 15 giorni, a partire da pre-fioritura	1,5-2 kg/ha

I dosaggi e le modalità di impiego si riferiscono al prodotto base (5% di amminoacidi totali, 1,5% di amminoacidi liberi, 30% di grado di idrolisi e triaccontanolo <10 mg/kg).

SEZIONE 8

Efficacia Agronomica

N.	ANNO	COLTURA	TIPOLOGIA	AP	EFFETTO VALUTATO			RISULTATO		
					PROD	IND F	NITR	-I	0	+I
1	2006	Melanzana	TF	R						
2	2006	Lattuga cappuccia	TF	R						
3	2007	Lattuga batavia	TF	F						
4	2007	Fragola	TF	R						
5	2007	Lattuga scarola	C	F						
			TF	R						
6	2009	Pomodoro	-	-						
7	2009	Lattuga batavia	C	F						
			TF	R						
8	2009	Pomodoro	C	R						
9	2009	Lattuga	-	-						
10	2009	Cavolfiore	C	F						
11	2010	Lattuga Batavia	TF	F						
12	2010	Zucchini	C	F						
13	2010	Pomodoro	C	F						
14	2010	Pomodoro	C	F						
15	2010	Zucchini	C	F						
16	2010	Fragola	C	F						
17	2010	Cavolfiore	C	F						
18	2010	Cavolo	C	F						
19	2010	Finocchio	C	F						
20	2010	Lattuga Renger	C	F						
21	2010	Spinacio	-	-						
22	2010	Lattuga	-	-						

LEGENDA PROVE*

C	Pieno campo	PROD	Produzione/resa, biomassa, sviluppo vegetativo, qualità dei frutti
TF	Tunnel freddo	IND F	Induzione fiorale
S	Serra	NITR	Riduzione dei nitrati
R	Trattamento in radicale	-I	Risultato inferiore rispetto al testimone
F	Trattamento in fogliare	0	Risultato paragonabile al testimone
		I	Risultato migliore rispetto al testimone

*comprendenti prove di ricerca, prove di sviluppo e prove esterne

N.	ANNO	COLTURA	TIPOLOGIA	AP	EFFETTO VALUTATO			RISULTATO		
					PROD	IND F	NITR	-I	0	+I
23	2011	Basilico	C	F						
24	2011	Melanzana	C	F						
25	2011	Pomodoro	C	F						
26	2011	Cavolo cappuccio	C	F						
27	2011	Melone	C	F						
28	2011	Rucola	S	F						
29	2011	Lattuga tardiva	C	F						
30	2011	Lattuga primitiva	C	F						
31	2012	Rucola	TF	F						
32	2012	Fragola	S	F						
33	2012	Spinacio	S	F						
34	2012	Vite da vino	C	F						
35	2012	Vite da vino	C	F						
36	2013	Melone	C	F						
37	2013	Susino	C	F						
38	2013	Vite da tavola	C	F						
39	2013	Vite da vino	C	F						
40	2013	Vite da vino	C	F						
41	2013	Vite da vino	C	F						
42	2013	Vite da vino	C	F						
43	2013	Vite da vino	C	F						
44	2013	Vite da vino	C	F						
45	2014	Albicocca	C	F						
46	2014	Fragola	C	R						
47	2014	Vite da vino	C	F						

SEZIONE 9

Bibliografia

Schiavon M, Ertani A, Nardi S (2008). Effects of an alfaalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of TCA cycle and N metabolism in *Zea mays* L. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol 56 pp 11800-11808. DOI: 10.1021/jf802362g. ISSN: 0021-8561.

Ertani A, Peserico L, Brandellero E, Franceschi C, Altissimo A, Nardi S (2008). The effect of a biostimulant on salinity plant stress. 17th International Symposium of CIEC. "Plant Nutrient Management Under Stress Conditions". Cairo, Egypt 24-27 November pp 177-185.

Ertani A, Cavani L, Pizzeghello D, Brandellero E, Altissimo A, Ciavatta C, Nardi S (2009). Biostimulant activities of two protein hydrolysates on the growth and nitrogen metabolism in maize seedlings. JOURNAL OF PLANT NUTRITION AND SOIL SCIENCE, vol 172 pp 237-244. DOI: 10.1002/jpln.200800174.

Ertani A, Altissimo A, Franceschi C, Nardi S (2009). Biostimulant activity of two protein hydrolysate in peroxidase and esterase activity of maize seedlings. Proc. 18th CIEC Symposium of the International Scientific Centre of Fertilizers: More Sustainability in new fertilizers and fertilization management. 8-12 November, Rome. ISSN: 1971-0755. Published in Fertilitas Agrorum, 442-448. Online CIEC journal <http://fertilizzanti.entecra.it/english/publications.html>.

Ertani A, Cavani L, Pizzeghello D, Franceschi C, Altissimo A, Ciavatta C, Nardi S (2009). Effect of two biostimulant on maize nitrogen metabolism. In: VIII Convegno Nazionale della International Humic Substances Society (IHSS). Padova, 14-16 December. Oral communication.

Ertani A., Peserico L, Franceschi C, Altissimo A, Nardi S (2010). The effects of a biostimulant on *Lolium perenne* stressed plants pp 70-71. ETS (European Turfgrass Society), International Conference 12 -14 aprile, Angers, France. Oral communication.

Ertani A., Altissimo A., Nardi S. (2012). Long term research activity on the biostimulant properties of natural origin compounds. The first word congress on the use of biostimulants in agriculture , Strasbourg, November, 26-29, oral communication.

Ertani A., Altissimo A., Nardi S. (2012). Use of a fabaceae plant-derived biostimulant to alleviate salt stress in *Zea mays* L. The first word congress on the use of biostimulants in agriculture , Strasbourg, November, 26-29, oral communication.

Ertani A., Schiavon M., Muscolo A., Nardi S. (2012). Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. Published in Plant Soil DOI 10.1007/s11104-012-1335-z.

Ertani A., Schiavon M., Muscolo A., Nardi S. (2013). Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. Plant and Soil. 364, 145-158.. DOI 10.1007/s11104-012-1335-z.

Ertani A, Pizzeghello D, Francioso O, Sambo P, Sanchez-Cortes S, Nardi S. (2014). *Capsicum chinensis* L. growth and nutraceutical properties are enhanced by biostimulants in a long-term period: chemical and metabolomic approaches. FRONTIERS IN PLANT SCIENCE 5,375 DOI:10.3389/fpls.2014.00375. ISSN:1664-462X.

Ertani A., Sambo P., Nicoletto C., Santagata S., Schiavon M., Nardi S. (2015). The use of organic biostimulants in hot pepper plants to help low input sustainable agriculture. Chemical and Biological Technologies in Agriculture 2:11 DOI 10.1186/s40538-015-0039-z.

ILSA S.p.A.

Via Quinta Strada, 28

36071 - Arzignano (VI) Italia

Sede legale: Via Roveggia, 31 - 37136 - Verona

Tel. +39 0444 452020

Fax +39 0444 456864

www.ilsagroup.com

