



**DIPARTIMENTO DI SCIENZE E INNOVAZIONE TECNOLOGICA**

**Corso di Laurea Magistrale in Biologia curriculum Agro-ambientale**

TESI DI LAUREA

**Valutazione dell'efficacia di un biostimolante con azione allegante su peperone (*Capsicum annuum* L.) mediante analisi fisiologiche, biochimiche e molecolari**

**Candidata: Chiara Ranieri**

Relatrice: Prof.ssa Cristina Pagliano

Stage svolto presso Green Has Italia S.P.A

Tutor esterno: Cristina Campobenedetto

Responsabile Ente: Giuseppe Gonella

*Anno accademico: 2024/2025*

*A Edoardo e Camilla*

## Sommario

1. Introduzione.....	1
1.1. Importanza delle colture orticole nel contesto agricolo.....	1
1.2. Allegagione: definizione, ruolo nel ciclo produttivo e fattori che la influenzano .....	2
1.3. Strategie per migliorare l'allegagione .....	7
1.4. Biostimolanti come approccio innovativo .....	9
1.4.1. Biostimolanti vegetali microbici e non microbici .....	10
1.4.2. Meccanismi d'azione dei biostimolanti.....	11
1.4.3. Interesse scientifico e necessità di chiarimento dei meccanismi d'azione .....	14
1.5. Fattori esogeni ed endogeni che influenzano l'allegagione nel peperone .....	14
2. Scopo della tesi.....	19
3. Materiali e metodi.....	20
3.1. Materiale vegetale, biostimolante e condizioni sperimentali .....	20
3.2. Parametri biometrici e fisiologici .....	22
3.3. Parametri biochimici.....	23
3.4. Analisi trascrittomica.....	24
3.4.1. Estrazione dell'RNA totale e sintesi del cDNA.....	24
3.4.2. Analisi di espressione genica mediante RT-qPCR.....	24
3.5. Analisi statistica.....	27
4. Risultati.....	28
4.1. Andamento della percentuale di allegagione in risposta al trattamento biostimolante..	28
4.2. Stato fisiologico delle piante e vitalità del polline .....	30
4.3. Contenuto di zuccheri solubili nelle piante .....	32
4.4. Modulazione dell'espressione genica associata ai processi di allegagione.....	34
5. Discussione.....	37
5.1. Effetto del biostimolante sull'allegagione .....	37
5.2. Effetto del biostimolante sullo stato fisiologico della pianta e sulla vitalità del polline	38
5.3. Effetto del biostimolante sul contenuto di zuccheri solubili e sulla sink strenght .....	38
5.4. Effetto del biostimolante su espressione genica e regolazione ormonale .....	40
6. Conclusioni.....	43
7. Limiti di studio e prospettive future .....	44
6. Bibliografia.....	45

# 1. Introduzione

## 1.1. Importanza delle colture orticole nel contesto agricolo

Le colture orticole rivestono un ruolo strategico nei sistemi agricoli moderni, sia per il loro contributo alla sicurezza alimentare e nutrizionale, sia per il valore economico generato lungo l'intera filiera agroalimentare. Frutta e ortaggi costituiscono una fonte primaria di fibre, vitamine, minerali e composti antiossidanti, contribuendo in modo significativo alla qualità della dieta e alla prevenzione di patologie croniche (Rajani & Shourabh, 2017).

In un contesto caratterizzato da crescita demografica, urbanizzazione e crescente pressione sulle risorse naturali, l'incremento sostenibile della produttività agricola rappresenta una priorità globale (Ahmed et al., 2024). Le colture orticole, grazie all'elevato valore nutrizionale per unità di superficie e al loro alto valore commerciale, assumono quindi un'importanza sempre maggiore nelle strategie di sviluppo agricolo.

Dal punto di vista economico, il comparto ortofrutticolo rappresenta uno dei segmenti più dinamici e ad alta intensità di lavoro dell'agroindustria mondiale. L'analisi della catena globale del valore evidenzia come la produzione di frutta e verdura sia caratterizzata da elevato valore unitario, forte integrazione nei mercati internazionali e crescente standardizzazione qualitativa imposta dalla grande distribuzione organizzata (Fernandez-Stark et al., 2011). In questo contesto, la competitività delle aziende agricole dipende non solo dal volume produttivo, ma anche dalla capacità di garantire continuità delle rese e conformità a standard qualitativi sempre più stringenti.

Tra le principali famiglie orticole, le Solanaceae occupano una posizione di rilievo per estensione colturale e rilevanza economica. Specie quali patata, pomodoro, melanzana e peperone contribuiscono in modo determinante alla produzione orticola mondiale (Samuels, 2015). Tuttavia, nei moderni sistemi agroalimentari l'obiettivo non si limita all'incremento quantitativo delle rese, ma include il miglioramento e il mantenimento della qualità del prodotto.

La qualità del frutto comprende caratteristiche sensoriali (colore, consistenza, sapore) e proprietà biochimiche legate al valore nutrizionale e alla sicurezza alimentare (Gao et al, 2022). I pigmenti vegetali, quali carotenoidi, clorofille e antociani, svolgono un ruolo centrale in questo contesto: determinano l'attrattiva commerciale del prodotto e contribuiscono alle sue proprietà funzionali grazie all'attività antiossidante. Il miglioramento della qualità, intesa sia in termini estetici sia nutrizionali, rappresenta pertanto un obiettivo prioritario nei programmi di ricerca e innovazione varietale.

Parallelamente, le colture orticole risultano particolarmente sensibili agli stress ambientali e nutrizionali (Marino, 2021). La natura deperibile dei prodotti e l'elevato valore unitario rendono il comparto fortemente esposto a rischi produttivi: anche riduzioni relativamente contenute della resa possono determinare perdite economiche significative lungo l'intera filiera (Fernandez-Stark et al., 2011).

In particolare, le fasi riproduttive rappresentano uno dei punti più vulnerabili del ciclo colturale. Eventi di stress termico o deficit idrico possono compromettere la vitalità del polline, la crescita del tubo pollinico e la recettività dello stigma, interferendo con la fecondazione e riducendo il processo di sviluppo del frutto (Benitez-Alfonso et al., 2023). Poiché il numero finale di frutti costituisce il principale determinante della resa commerciabile, alterazioni in questa fase si traducono direttamente in perdite produttive ed economiche. In un contesto di cambiamento climatico, diventa quindi prioritario individuare strategie capaci di stabilizzare la resa e migliorare la resilienza delle colture.

In questo scenario, tra le Solanaceae, il pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.) è tradizionalmente considerato la specie modello per lo studio della regolazione dello sviluppo del frutto e dell'allegagione. Tuttavia, anche il peperone (*Capsicum annuum* L.) riveste un'importanza agronomica e commerciale di primaria rilevanza a livello globale. Ampiamente coltivata in sistemi intensivi ed estensivi, questa specie comprende un'elevata diversità varietale e presenta un notevole interesse nutraceutico: i frutti sono ricchi di vitamina C, carotenoidi e flavonoidi e, nelle varietà piccanti, di capsaicinoidi, molecole dal sapore pungente e dotate di documentate proprietà biologiche (Hernández-Pérez et al., 2020).

Nonostante tale rilevanza economica e scientifica, i meccanismi fisiologici e molecolari che regolano le fasi riproduttive nel peperone risultano meno conosciuti rispetto al pomodoro. Approfondire tali aspetti in *C. annuum* consente pertanto di ampliare le conoscenze sui processi che determinano la stabilità produttiva nelle colture orticole di maggiore interesse economico.

## 1.2. Allegagione: definizione, ruolo nel ciclo produttivo e fattori che la influenzano

L'allegagione rappresenta la fase fenologica in cui il fiore, a seguito dell'impollinazione e fecondazione, si trasforma in frutto e costituisce un passaggio determinante nel ciclo produttivo delle specie orticole. Il successo di questo processo dipende dal corretto svolgimento di una sequenza coordinata di eventi: trasferimento del polline allo stigma ricettivo, germinazione del granulo pollinico, crescita del tubo pollinico, fecondazione dell'ovulo e avvio dello sviluppo embrionale. Il completamento efficace di tali fasi consente la trasformazione del fiore in frutto;

in assenza di fecondazione può verificarsi partenocarpia, ossia sviluppo del frutto senza formazione di semi.

In seguito alla fecondazione, l'intensa sintesi di fitormoni nei tessuti embrionali e nell'endosperma attiva la divisione e l'espansione cellulare dell'ovario, avviando lo sviluppo del pericarpo (Figura 1). In questa fase, il giovane frutto acquisisce un'elevata forza di organo di accumulo metabolico ("sink"), entrando in competizione con gli organi vegetativi per l'allocatione dei foto-assimilati. Le relazioni sorgente-pozzo ("source-sink") influenzano pertanto non solo la crescita e la qualità del frutto, ma anche il mantenimento dei frutticini allegati (Banjare et al., 2023).

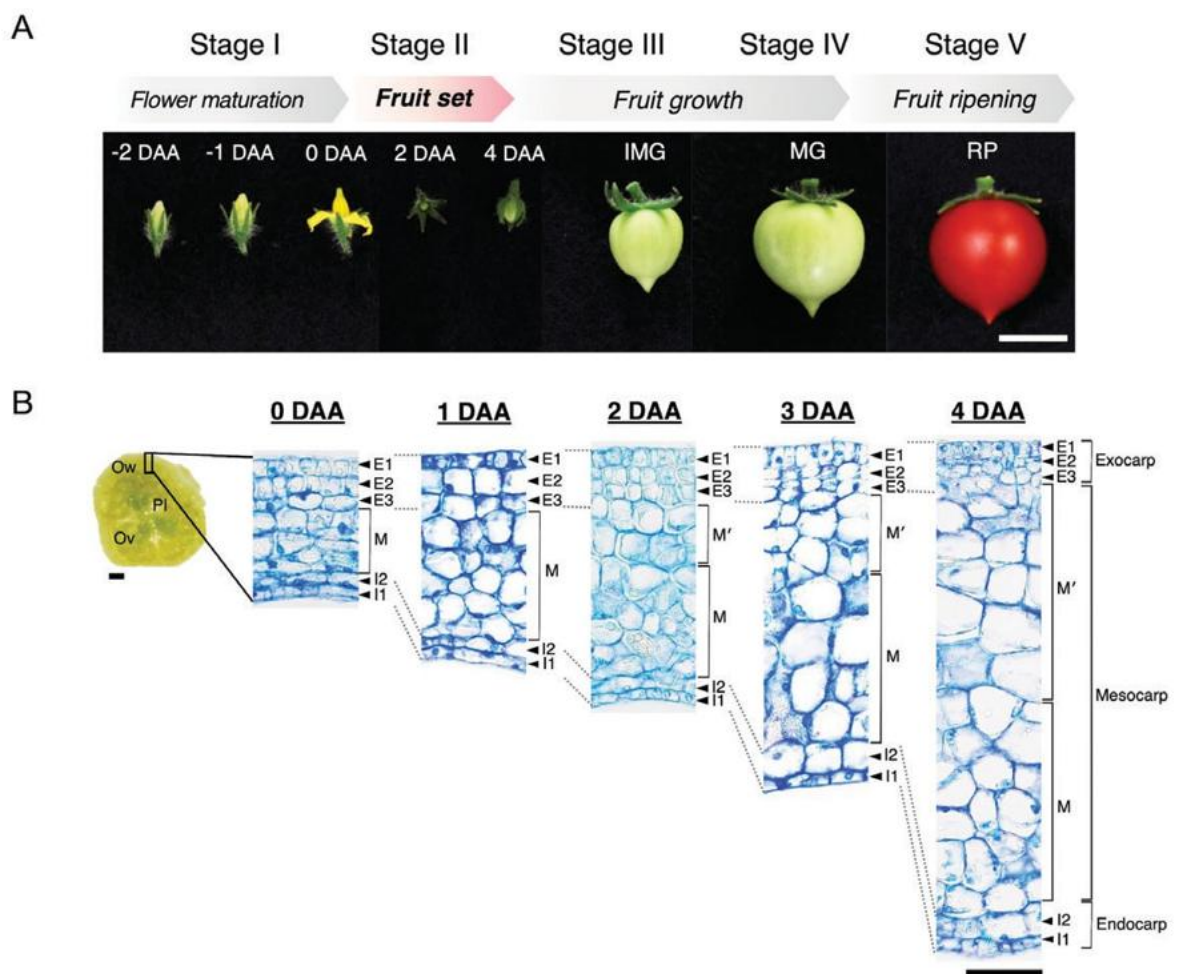


Figura 1. La dinamica della struttura della parete ovarica durante la formazione del frutto del pomodoro. (A) Fasi di sviluppo del frutto nel pomodoro. DAA, pochi giorni dopo l'antesi; IMG, verde immaturo; MG, verde maturo; RP, maturazione. (B) La struttura della parete ovarica e del pericarpo nella varietà di pomodoro 'Micro-Tom' durante lo sviluppo precoce del frutto. L'espansione cellulare del mesocarpo comporta un aumento significativo dello spessore del pericarpo da 2 DAA a 4 DAA. Sezioni colorate con blu toluidina della parete ovarica del pomodoro a 0, 2 e 4 DAA. DAA, pochi giorni dopo l'antesi; E1, epidermide esterna; E2 ed E3, due strati cellulari sub-epidermici esterni; I1, epidermide interna; I2, strato cellulare subepidermico interno; M, mesocarpo; M', mesocarpo appena formato; Ov, ovulo; Ow, parete ovarica; Pl, placenta (Ezura et al., 2023).

L'allegagione rappresenta il risultato dell'integrazione tra fattori endogeni e condizioni ambientali. Tra i regolatori interni, il bilanciamento ormonale riveste un ruolo centrale. L'auxina, prodotta nei tessuti dell'ovulo fecondato, rappresenta il segnale primario per l'avvio dello sviluppo dell'ovario in frutto, agendo in stretta sinergia con le gibberelline e, in misura variabile, con le citochinine. La corretta sintesi, il trasporto polare e la percezione di tali fitormoni sono indispensabili per l'attivazione dei programmi genetici responsabili della divisione e dell'espansione cellulare nel giovane frutto. Parallelamente, l'equilibrio tra promotori della crescita come auxine e gibberelline e regolatori negativi, quali l'etilene, contribuisce a determinare la stabilità dell'allegagione (Ezura et al., 2023; Howlett, 1931).

Oltre al controllo ormonale, l'allegagione è fortemente condizionata anche da fattori genetici e molecolari, i quali determinano se la fecondazione possa avvenire correttamente.

Tra questi, un ruolo centrale è svolto dalla sterilità genetica, frequentemente associata a fenomeni di ibridazione, soprattutto quando l'incrocio avviene tra specie geneticamente distanti. In tali casi si possono osservare fiori completamente sterili o con gameti non funzionali, con conseguente mancata allegagione indipendentemente dalle condizioni ambientali.

Ancora più rilevante, in molte specie frutticole e orticole, è il fenomeno dell'incompatibilità riproduttiva, ossia l'incapacità del polline vitale di completare la crescita del tubetto pollinico fino all'ovulo. L'auto-incompatibilità, regolata geneticamente dalla presenza di alleli multipli al locus S, rappresenta un meccanismo molecolare che impedisce l'autofecondazione attraverso barriere biochimiche a livello dello stilo. Quando il tubetto pollinico viene bloccato o rallentato, la fecondazione non avviene o risulta parziale, riducendo il numero di ovuli fecondati e compromettendo l'avvio dei segnali ormonali necessari allo sviluppo del frutto (Wani et al., 2010).

Questi meccanismi evidenziano come la transizione da fiore a frutto sia il risultato di un'interazione complessa tra regolazione molecolare e compatibilità genetica, con importanti ricadute sul potenziale produttivo della coltura.

Tuttavia, tali meccanismi endogeni risultano fortemente influenzati dall'ambiente. Il periodo immediatamente precedente e successivo alla fecondazione rappresenta una delle fasi dell'intero ciclo colturale in cui la pianta è più sensibile a stress abiotici (Figura 2). Studi fisiologici hanno dimostrato che anche brevi episodi di stress termico possono compromettere irreversibilmente il successo riproduttivo (Zinn et al., 2010).

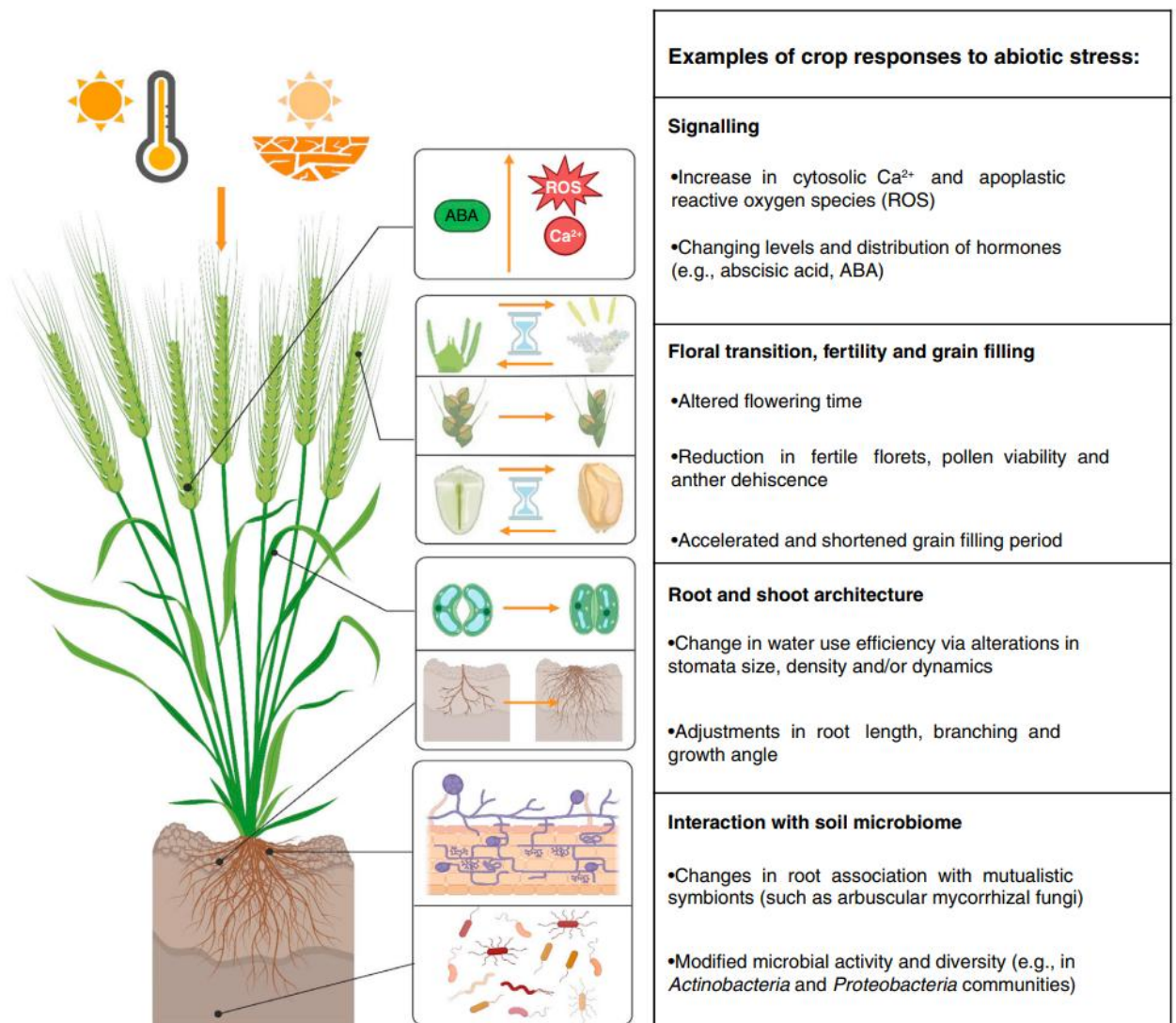


Figura 2. Rappresentazione schematica degli effetti dell'alta temperatura e della siccità sullo sviluppo delle colture (in questo caso cereali). Gli esempi evidenziano varie tipologie di risposta agli stress nella pianta: a livello di segnalazione cellulare nei semi, durante la transizione fiorale, il riempimento della granella e la conseguente fertilità della spiga, i cambiamenti nell'architettura delle radici e dei germogli e le interazioni con il microbioma del suolo come effetti principali. ROS, specie reattive dell'ossigeno; ABA, acido abscissico (Gao, L., Hao, N., Wu, T., & Cao, 2022).

Le alte temperature, soprattutto se coincidenti con la fase di antesi e di fecondazione, compromettono la vitalità del polline, riducendone la germinabilità e la capacità di emettere un tubetto pollinico funzionale. Inoltre, lo stress termico può alterare la funzionalità dello stigma e dello stilo, interferendo con il corretto avanzamento del tubetto pollinico verso l'ovulo. Anche lo sviluppo dell'ovario nelle primissime fasi dopo la fecondazione risulta sensibile alle temperature elevate, con conseguente aumento dell'aborto fiorale o della cascola dei frutticini appena allegati. D'altra parte, temperature inferiori ai range ottimali rallentano il metabolismo cellulare, ostacolano la germinazione del polline e possono determinare fecondazioni

incomplete o inefficaci. In entrambi i casi, la fase di transizione da fiore a frutto emerge come estremamente vulnerabile agli sbalzi termici.

Lo stress idrico rappresenta un fattore critico per l'allegagione, poiché la ridotta disponibilità d'acqua compromette il turgore cellulare e l'attività fotosintetica, determinando una diminuzione della produzione e del trasporto dei foto-assimilati verso gli organi riproduttivi (Chaves et al., 2003). In condizioni di limitata disponibilità di carbonio, la competizione tra organi "sink" si intensifica, con possibili effetti negativi sul mantenimento del frutto neoformato.

Nelle fasi immediatamente successive alla fecondazione, l'ovario costituisce infatti un "sink" ancora relativamente debole. Tale condizione è legata alla sua ridotta "sink strength", intesa come combinazione tra dimensione dell'organo e attività metabolica (Marcelis, 1996). Nelle prime fasi di sviluppo, la limitata attività degli enzimi coinvolti nel metabolismo del saccarosio e il ridotto numero di cellule in divisione rendono l'ovario meno competitivo rispetto ad altri organi in accrescimento attivo (Osorio et al., 2013). Pertanto, in condizioni di stress idrico, la riduzione della disponibilità di assimilati amplifica tale condizione di vulnerabilità, aumentando la probabilità di aborto fiorale o di interruzione precoce dello sviluppo del frutto.

Parallelamente, lo stress idrico può alterare in modo significativo l'equilibrio ormonale che regola l'avvio e la stabilizzazione dell'allegagione. In questo contesto, per equilibrio ormonale non si intende esclusivamente la concentrazione assoluta di singoli fitormoni, ma il rapporto dinamico tra auxine, gibberelline e altri regolatori della crescita, nonché la loro interazione a livello dei pathway di biosintesi e segnalazione (Kumar et al., 2014). Dopo la fecondazione, l'auxina prodotta dagli ovuli fecondati stimola la biosintesi di gibberelline, e la corretta proporzione tra questi ormoni coordina divisione ed espansione cellulare dell'ovario (Serrani et al., 2008). Alterazioni di tale rapporto, indotte da condizioni di stress, possono compromettere la trasduzione del segnale necessario al mantenimento del frutto, favorendo l'aborto dei fiori e riducendo il numero finale di frutti allegati.

Anche la luce influisce in maniera significativa, principalmente attraverso il suo effetto sulla fotosintesi e quindi sulla disponibilità di carboidrati e sul rapporto carbonio/azoto. Una bassa radiazione luminosa riduce la produzione di foto-assimilati, limitando l'apporto di carbonio necessario per sostenere la crescita iniziale dell'ovario. In condizioni di ridotta disponibilità energetica, la pianta può non essere in grado di mantenere tutti i frutti potenzialmente allegati, determinando una selezione fisiologica che porta alla cascola dei frutticini più deboli. In questo contesto, le relazioni "source-sink" assumono un ruolo centrale nel determinare il successo dell'allegagione (Karapanos et al., 2008).

Le evidenze sul cambiamento climatico indicano che l'aumento delle temperature sta già influenzando negativamente le rese agricole a livello globale (Lobell et al., 2011). Nel comparto orticolo, le colture nelle fasi riproduttive presentano elevata sensibilità all'aumento della temperatura, che determina effetti particolarmente critici. La transizione da fiore a frutto può quindi essere interpretata come un vero e proprio “collo di bottiglia” produttivo: qualsiasi perturbazione che riduca l'efficienza dell'allegagione si traduce direttamente in una diminuzione del numero di frutti commerciabili (Yeshiwas et al., 2026).

Alla luce di tali considerazioni, la comprensione integrata dei meccanismi fisiologici e molecolari che regolano l'allegagione, e della loro modulazione in risposta a condizioni ambientali avverse, rappresenta un passaggio fondamentale per l'individuazione di strategie agronomiche innovative.

### 1.3. Strategie per migliorare l'allegagione

Considerata la centralità dell'allegagione nel determinare resa e qualità delle produzioni orticole, nel tempo sono state sviluppate diverse strategie volte a ottimizzarne l'efficienza. Tali interventi mirano a creare condizioni favorevoli alla fecondazione e al mantenimento dei frutticini nelle prime fasi di sviluppo, agendo sull'equilibrio tra crescita vegetativa e attività riproduttiva e sulla funzionalità dell'apparato florale.

Le strategie tradizionali si fondano innanzitutto sulla gestione agronomica della coltura. Il bilanciamento tra vigore vegetativo e carico produttivo rappresenta una leva fondamentale per evitare competizione per i foto-assimilati durante la fase critica dell'allegagione. In molte colture frutticole arboree ciò viene ottenuto mediante potatura, controllo del vigore e impiego di portainnesti; sebbene tali tecniche siano meno applicabili alle specie orticole, i principi fisiologici che le sottendono, ovvero la regolazione della competizione tra “sink” vegetativi e riproduttivi, risultano pienamente trasferibili anche al peperone (*Capsicum annuum* L.) (Wani et al., 2010).

Un secondo aspetto cruciale riguarda il controllo dell'impollinazione. Nelle specie con limitata autofertilità o in condizioni ambientali sub-ottimali, la presenza di adeguati impollinatori e di insetti pronubi diventa determinante per garantire la disponibilità di polline vitale e compatibile. Nel peperone, è stato dimostrato che l'attività di insetti impollinatori, come le api mellifere, i tripidi, *Exomalopsis* e *Bombus impatiens*, migliora l'allegagione e la formazione dei semi; in ambiente protetto, l'impiego di *Bombus terrestris* può incrementare sia la resa sia la qualità dei frutti (Karapanos et al., 2008).

Un ulteriore fattore determinante per il miglioramento dell'allegagione è rappresentato da una

corretta gestione della nutrizione minerale, che influenza direttamente sia la fase di fecondazione sia lo sviluppo iniziale del frutto. L'equilibrio dell'azoto (N) risulta particolarmente critico: livelli adeguati sostengono la crescita e la differenziazione fiorale, mentre eccessi possono indurre un vigoroso sviluppo vegetativo, aumentando la competizione per i foto-assimilati e riducendo la percentuale di allegazione. Anche il fosforo (P), coinvolto nei processi energetici e nella divisione cellulare, è essenziale per la vitalità dei tessuti riproduttivi e per una corretta crescita del tubo pollinico. Il potassio (K), attraverso il suo ruolo nella regolazione osmotica e nella traslocazione degli zuccheri, contribuisce a garantire un adeguato apporto di carboidrati ai fiori e ai giovani frutticini, limitando fenomeni di cascola precoce.

Particolare attenzione deve essere rivolta ai microelementi, in particolare al boro (B), strettamente associato alla germinazione del polline e all'allungamento del tubo pollinico: carenze di questo elemento possono compromettere la fecondazione e determinare aborto fiorale. Anche il calcio (Ca) svolge un ruolo chiave nella stabilità delle membrane e delle pareti cellulari, oltre a partecipare ai meccanismi di segnalazione coinvolti nelle prime fasi dello sviluppo del frutto. Complessivamente, non è il singolo elemento nutritivo a determinare il successo dell'allegazione, bensì il mantenimento di un equilibrio nutrizionale che consenta un'adeguata disponibilità di foto-assimilati e un corretto coordinamento tra crescita vegetativa e sviluppo riproduttivo (Chaplin & Westwood, 2008).

Accanto agli interventi agronomici, l'applicazione esogena di regolatori di crescita rappresenta una delle strategie più consolidate per migliorare l'allegazione. Come evidenziato da Bons & Kaur, (2019), auxine, gibberelline e citochinine possono modulare artificialmente i segnali ormonali che regolano lo sviluppo dell'ovario, la divisione cellulare e la crescita iniziale del frutto. Le auxine (es. l'acido naftalenico, NAA) possono stimolare lo sviluppo ovarico anche in assenza di fecondazione; le gibberelline (es. GA<sub>3</sub>) promuovono l'espansione cellulare e, in alcune condizioni, inducono partenocarpia; le citochinine (es. 6-benziladenina, BA) favoriscono la divisione cellulare post-fecondazione.

Tuttavia, nel peperone l'induzione artificiale della partenocarpia o la modulazione ormonale non sempre si traducono in frutti di qualità commerciale. L'applicazione di NAA ha prodotto frutti senza semi ma appiattiti e con peso ridotto rispetto ai frutti normali; trattamenti con STS (tiosolfato d'argento, inibitore dell'azione dell'etilene), TIBA (acido 2,3,5-triiodobenzoico, inibitore del trasporto polare dell'auxina) e AOA (acido aminoossiacetico, inibitore della biosintesi dell'etilene) hanno determinato malformazioni fiorali e fruttali; inoltre, in condizioni di bassa luminosità, applicazioni di NAA, GA<sub>3</sub> e BA non hanno promosso l'allegazione, ma

hanno indotto abscissione fiorale, probabilmente attraverso un aumento della sintesi di etilene (Karapanos et al., 2008).

Nel complesso, questi risultati evidenziano i limiti delle applicazioni ormonali classiche: l'efficacia è fortemente dipendente da dose, stadio fenologico e condizioni ambientali; la risposta è specie- e cultivar-specifica; dosaggi non ottimali possono generare squilibri vegeto-riproduttivi, effetti fitotossici o alterazioni qualitative del frutto. A ciò si aggiungono costi elevati, variabilità di risposta e crescenti restrizioni normative sull'impiego di molecole di sintesi.

In questo contesto, emerge la necessità di strategie più sostenibili e fisiologicamente integrate, capaci non tanto di sostituire la regolazione ormonale quanto di modularla indirettamente attraverso il potenziamento dei meccanismi endogeni della pianta. Proprio da queste considerazioni prende avvio l'interesse crescente verso l'impiego dei biostimolanti come approccio innovativo per il miglioramento dell'allegagione.

#### 1.4. Biostimolanti come approccio innovativo

Un'innovazione promettente nell'ambito delle strategie agronomiche sostenibili è rappresentata dall'impiego dei biostimolanti vegetali, prodotti in grado di migliorare la fioritura, la crescita vegetativa, la fruttificazione, la produttività e l'efficienza d'uso dei nutrienti (NUE), oltre a incrementare la tolleranza delle colture a molteplici stress abiotici (Rouphael & Colla, 2020).

La definizione di biostimolante è stata oggetto di ampio dibattito nell'ultimo decennio e ha trovato una formalizzazione normativa nel Regolamento (UE) 2019/1009, secondo il quale:

“Un biostimolante vegetale è un prodotto fertilizzante dell'UE la cui funzione è stimolare i processi nutrizionali delle piante indipendentemente dal contenuto nutrizionale del prodotto, con l'unico scopo di migliorare una o più delle seguenti caratteristiche della pianta o della rizosfera vegetale: i) efficienza nell'uso dei nutrienti, ii) tolleranza allo stress abiotico, iii) caratteristiche di qualità, oppure iv) disponibilità di nutrienti confinati nel suolo o nella rizosfera” (Europeo & Consiglio, 2019).

Alla luce di tale definizione, i biostimolanti vegetali non sono classificati in base alla loro composizione chimica, bensì in funzione delle rivendicazioni agronomiche e dei processi fisiologici che sono in grado di modulare. Essi comprendono un insieme eterogeneo di sostanze naturali bioattive, tra cui: acidi umici e fulvici; idrolizzati proteici di origine animale o vegetale; estratti di macroalghe e microalghe; silicio; microrganismi benefici quali (i) funghi micorrizici arbuscolari (AMF) e (ii) batteri azotofissatori appartenenti ai generi *Rhizobium*, *Azotobacter* e *Azospirillum* (Rouphael & Colla, 2020).

### 1.4.1. Biostimolanti vegetali microbici e non microbici

- Inoculi microbici e rizobatteri promotori della crescita

Gli inoculanti microbici possono essere distinti in agenti di controllo biologico (biopesticidi) e biofertilizzanti. Questi ultimi sono costituiti da microrganismi viventi che, applicati su semi, organi vegetali o suolo, promuovono la crescita della pianta attraverso diversi meccanismi, tra cui l'aumento della disponibilità di nutrienti, l'incremento della biomassa radicale e il miglioramento della capacità di assorbimento (Vessey, 2003). Essi sono spesso utilizzati in integrazione alla fertilizzazione minerale convenzionale.

Tra i biofertilizzanti maggiormente studiati figurano i rizobatteri promotori della crescita (PGPR: plant growth-promoting rhizobacteria) e i batteri che favoriscono la crescita delle piante (PGPB: plant growth-promoting bacteria), batteri liberi isolati prevalentemente dalla rizosfera. Questi microrganismi possono agire attraverso la fissazione biologica dell'azoto, la solubilizzazione del fosforo, la produzione di fitormoni e l'attività dell'enzima ACC-deaminasi, contribuendo alla modulazione della risposta allo stress (Calvo et al., 2014).

- Sostanze umiche

Le sostanze umiche rappresentano i prodotti finali della decomposizione microbica e della degradazione chimica della biomassa nei suoli (Asli & Neumann, 2010; Schiavon et al., 2010). Esse costituiscono la frazione più abbondante della sostanza organica del suolo e svolgono funzioni centrali nel controllo della disponibilità dei nutrienti, negli scambi gassosi suolo-atmosfera e nella trasformazione e mobilità di composti potenzialmente tossici (Berbara & García, 2014).

Tradizionalmente, le sostanze umiche sono suddivise in:

- acidi umici, solubili in ambiente alcalino e precipitabili in ambiente acido;
- acidi fulvici, solubili sia in ambiente acido sia alcalino;
- humine, non estraibili.

Gli acidi umici sono generalmente caratterizzati da elevato peso molecolare, mentre gli acidi fulvici presentano peso molecolare inferiore e maggiore mobilità (Berbara & García, 2014; Calvo et al., 2014). La loro struttura varia in funzione dell'origine della matrice organica e del grado di trasformazione.

Gli acidi fulvici, grazie alla loro capacità di chelare micronutrienti quali il Fe e di attraversare le membrane cellulari, sono stati proposti come analoghi funzionali di chelanti naturali, facilitando la mobilizzazione e il trasporto di nutrienti. Inoltre, la loro stabilità in un ampio intervallo di pH e salinità ne favorisce la permanenza in soluzione nel suolo, prolungando l'interazione con l'apparato radicale (Calvo et al., 2014).

- Idrolizzati proteici e amminoacidi

I prodotti a base proteica comprendono:

- idrolizzati proteici, costituiti da miscele di peptidi e amminoacidi di origine animale o vegetale;
- singoli amminoacidi (es. glutammato, glutammina, prolina, glicina betaina).

Numerose evidenze dimostrano l'assorbimento radicale e fogliare di amminoacidi e riportano effetti di stimolazione della crescita e incremento della tolleranza agli stress (Sharma, S. S., & Dietz, 2006). Oltre a fungere da fonte organica di azoto, tali molecole possono agire come segnali regolatori del metabolismo del carbonio e dell'azoto e come induttori delle risposte difensive della pianta.

- Estratti di alghe

Gli estratti di alghe esercitano un'azione multifattoriale: agiscono come chelanti, migliorano l'assorbimento dei nutrienti minerali e possono influenzare la struttura del suolo e lo sviluppo radicale. È stato riportato un miglioramento della germinazione, dell'accrescimento vegetativo, della resa, della formazione fiorale, della produzione di frutti e della shelf-life post-raccolta (Calvo et al., 2014).

I processi industriali di estrazione, spesso proprietari, includono trattamenti acquosi, acidi o alcalini, con o senza riscaldamento, nonché metodi fisici quali macinazione a bassa temperatura o alta pressione.

#### 1.4.2. Meccanismi d'azione dei biostimolanti

Nonostante l'eterogeneità compositiva, i biostimolanti condividono la capacità di modulare in maniera coordinata processi fisiologici, metabolici e molecolari della pianta (Franzoni, 2020). Il loro effetto non si limita a un semplice apporto nutritivo, ma si configura come una regolazione multilivello in grado di influenzare l'omeostasi cellulare e la plasticità fisiologica (Figura 3).

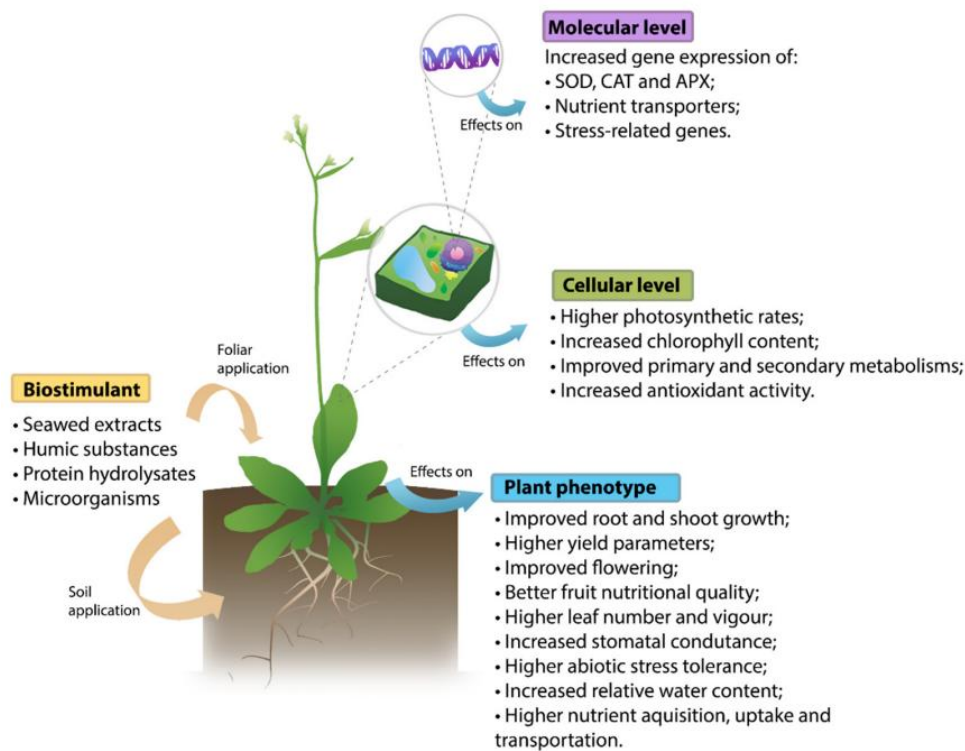


Figura 3. Rappresentazione schematica dei principali effetti fisiologici e molecolari dei biostimolanti, con particolare riferimento alla modulazione del metabolismo del carbonio e dell'azoto, della risposta antiossidante e dei pathway ormonali (Baltazar et al., 2021).

Uno dei principali ambiti di azione riguarda il potenziamento dell'apparato fotosintetico: incrementi del contenuto di clorofilla e carotenoidi sono stati osservati in seguito a trattamenti con estratti di alghe, idrolizzati proteici e PGPR (Bulgari et al., 2015; Kulkarni et al., 2019; Lucini et al., 2015). Tali variazioni si associano frequentemente a un miglioramento dell'efficienza del fotosistema II e a un incremento dell'assimilazione del carbonio (Mattner et al., 2013), suggerendo un effetto diretto sulla capacità fotosintetica e sull'accumulo di foto-assimilati nella pianta trattata.

Parallelamente, numerosi studi evidenziano una modulazione del metabolismo primario e secondario, con aumento dei livelli di zuccheri solubili, proteine, composti fenolici e acido ascorbico (Abdalla, 2013; Lucini et al., 2015). In condizioni di stress abiotico, tali modificazioni si accompagnano a un incremento dell'attività di enzimi antiossidanti, quali superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT) e perossidasi, e a una riduzione della perossidazione lipidica (Bano et al., 2012), indicando un rafforzamento dei sistemi di difesa contro lo stress ossidativo. In questo quadro, esempi specifici confermano la varietà dei meccanismi coinvolti: trattamenti con estratti di *Ascophyllum nodosum*, biostimolante appartenente alla categoria degli estratti di macroalghe, hanno evidenziato un miglioramento dell'efficienza fotosintetica e della tolleranza

allo stress idrico (Petrozza et al., 2014), mentre alcuni PGPR dotati di ACC-deaminasi risultano in grado di modulare i livelli del precursore dell'etilene, contribuendo ad attenuare le risposte negative associate allo stress (Arshad et al., 2008; Mayak et al., 2004).

Sul piano nutrizionale, l'applicazione di biostimolanti è stata associata all'incremento dell'attività di enzimi chiave del metabolismo dell'azoto, quali nitrato reductasi e glutammina sintetasi (Colla et al., 2014), nonché a un miglioramento dell'efficienza d'uso dei nutrienti (Cerdán et al., 2013), con ricadute positive sulla crescita e sulla produttività.

A livello ormonale e trascrizionale, i biostimolanti modulano l'espressione genica lungo le vie di biosintesi e trasduzione del segnale di auxine, gibberelline e citochinine (Craigie, 2011; Khan et al., 2009). Studi trascrittomici recenti confermano inoltre la regolazione di geni coinvolti nella risposta allo stress ossidativo e nel mantenimento dell'equilibrio ossido-riduttivo cellulare (Franzoni, 2020), evidenziando un'interazione complessa tra segnali metabolici e regolazione genica.

Nel loro insieme, tali effetti possono essere interpretati come una modulazione integrata della risposta allo stress, della ripartizione della biomassa e della dinamica degli assimilati, con ricadute dirette sulla stabilità metabolica e resilienza fisiologica della pianta. Tali meccanismi risultano particolarmente rilevanti nelle fasi fenologiche sensibili, quali l'allegagione, in cui l'equilibrio tra crescita vegetativa e sviluppo riproduttivo condiziona in modo determinante la resa finale. In questa prospettiva, l'azione dei biostimolanti si traduce in una riduzione delle perdite produttive e in un miglioramento della resa e della qualità (Figura 4).

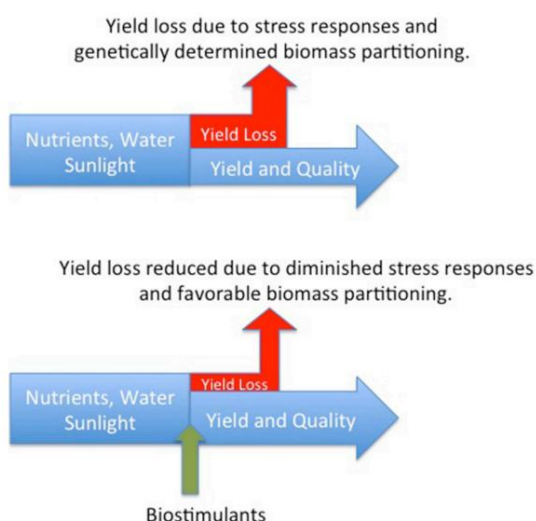


Figura 4. Schema concettuale dell'effetto dello stress non letale sulla perdita di resa (yield loss), dovuta alla deviazione degli assimilati verso il metabolismo di risposta allo stress (in alto), e del potenziale ruolo dei biostimolanti nella modulazione dei processi di segnalazione vegetale, con riduzione della risposta allo stress e promozione di una più favorevole allocazione della biomassa verso la componente produttiva (in basso) (Brown & Saa, 2015).

### 1.4.3. Interesse scientifico e necessità di chiarimento dei meccanismi d'azione

Il crescente interesse verso i biostimolanti si colloca in un contesto caratterizzato da elevate aspettative applicative, ma anche da rilevanti criticità di natura scientifica e regolatoria. In particolare, l'assenza, fino a tempi recenti, di una definizione normativa univoca e di criteri armonizzati per la classificazione e la valutazione dell'efficacia dei prodotti ha contribuito a generare eterogeneità concettuale e incertezza interpretativa. Solo con l'introduzione del Regolamento (UE) 2019/1009 è stata definita a livello europeo una cornice giuridica più chiara per l'inquadramento dei biostimolanti (Europeo & Consiglio, 2019). Il settore è stato a lungo contraddistinto da una marcata variabilità di efficacia tra prodotti commerciali, non sempre supportata da evidenze sperimentali robuste e riproducibili. Proprio tale variabilità ha stimolato un'intensa attività di ricerca finalizzata alla caratterizzazione chimica delle formulazioni e alla comprensione dei loro meccanismi d'azione. La natura multicomponente di molti biostimolanti, spesso derivati da matrici naturali complesse, rende infatti difficile attribuire gli effetti osservati a specifiche molecole bioattive.

In questo scenario, l'approfondimento delle basi fisiologiche e molecolari dell'azione dei biostimolanti rappresenta un passaggio imprescindibile per il loro impiego razionale e mirato. Solo attraverso studi integrati (fisiologici, biochimici, molecolari) sarà possibile consolidare il ruolo dei biostimolanti come strumenti innovativi per il miglioramento sostenibile delle produzioni agricole.

## 1.5. Fattori esogeni ed endogeni che influenzano l'allegagione nel peperone

Alla luce delle evidenze riportate, emerge come l'allegagione rappresenti una fase altamente sensibile del ciclo produttivo delle colture orticole, in cui fattori ambientali, assetto ormonale, disponibilità di assimilati e regolazione molecolare concorrono in modo integrato a determinare la stabilità dei giovani frutti e, quindi, il numero finale di frutti commerciabili. Uno studio condotto da Wubs et al., (2015) su *Capsicum annuum L.* dimostra che il fenomeno della cascola fiorale e dei frutticini è strettamente connesso alla capacità del frutto in sviluppo di affermarsi come "sink" competitivo all'interno della pianta, in un contesto influenzato da fattori ambientali, quali temperatura, radiazione luminosa, disponibilità idrica e densità colturale.

In particolare, la riduzione della forza di sorgente (source strength), legata a limitazioni fotosintetiche o stress abiotici, o un'elevata competizione tra frutti possono compromettere il mantenimento dell'ovario fecondato, conducendo all'aborto. Allo stesso modo, alterazioni nei

segnali ormonali e nello sviluppo dei semi influenzano direttamente la forza di accumulo (sink strength) del giovane frutto.

Il modello concettuale proposto dallo studio di Wubs et al., (2015) (Figura 5) riassume le interazioni tra fattori ambientali, metabolismo del carbonio e regolazione dello sviluppo che determinano l'esito della fase riproduttiva nel peperone.

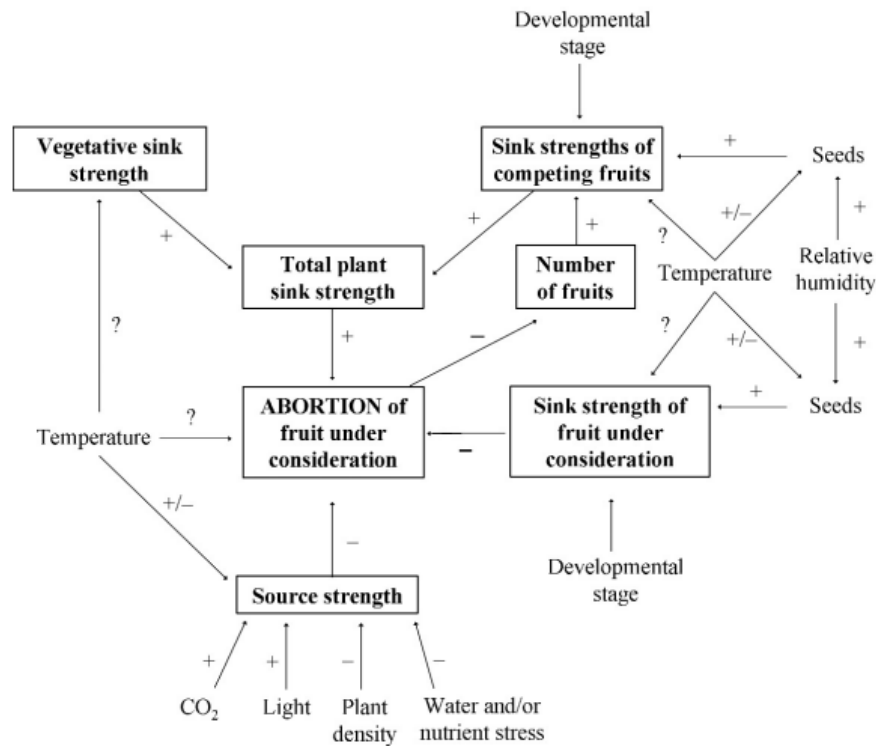


Figura 5. Fattori che influenzano l'aborto dei frutti nel peperone dolce (*Capsicum annuum* L.). Un segno positivo implica che il fattore aumenta l'aborto dei frutti; un segno negativo implica che diminuisce l'aborto dei fiori e dei frutti; +/- indica che esiste un valore ottimale nell'influenza del fattore; ? significa che l'effetto non è stato ancora stabilito (Wubs, 2015).

Sebbene i biostimolanti abbiano dimostrato effetti positivi sulla crescita vegetativa, sulla tolleranza agli stress abiotici e sulla produttività, i meccanismi fisiologici e molecolari attraverso cui tali prodotti possano influenzare direttamente i processi riproduttivi risultano ancora solo parzialmente chiariti, in particolare nella specie *Capsicum annuum* L.

Numerosi studi hanno rivelato tendenze comuni nella regolazione ormonale delle diverse fasi dello sviluppo del frutto (Figura 6), dimostrando che l'allegagione dipende da un delicato equilibrio tra auxine, gibberelline e citochinine, la cui azione coordinata attiva i programmi di divisione ed espansione cellulare nel gineceo dopo l'impollinazione (Ezura et al., 2023; Mcatee et al., 2013).

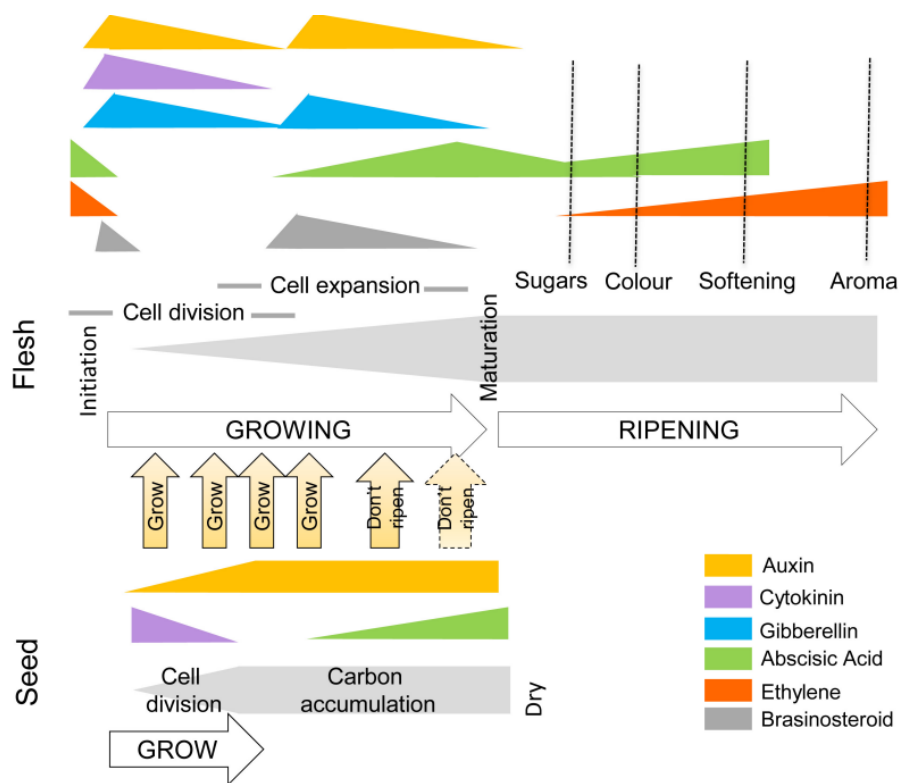


Figura 6. Cambiamenti ormonali che si verificano in un frutto generico durante lo sviluppo e la maturazione. Concentrazioni ormonali differenziali si verificano nel seme e nel tessuto circostante, con il seme in via di sviluppo che influenza il suo ambiente. Molteplici studi hanno dimostrato aumenti di auxina, citochinina, gibberellina e brassinosteroidi all'allegazione e un coinvolgimento di auxina, gibberellina e brassinosteroidi nella crescita del frutto. Per la maturazione dei frutti si verifica un'inibizione del trasporto dell'auxina dal seme e un aumento dell'ABA. Questo innesca il programma di maturazione/senescenza che porta ad un aumento dell'ABA e/o della biosintesi dell'etilene e alla risposta (Mcatee et al., 2013).

I fattori di risposta all'auxina (ARF) rappresentano nodi centrali nel crosstalk tra auxina e gibberelline. In pomodoro, ad esempio, ARF7 e ARF8 modulano l'espressione di geni biosintetici delle gibberelline (GA20ox, GA3ox) e interagiscono con proteine DELLA e Aux/IAA per reprimere o attivare l'allegazione in funzione dello stato di fertilizzazione (Baral et al., 2025). In questo contesto, l'interazione tra fattori di trascrizione ARF e proteine repressorie Aux/IAA, come IAA9, insieme alla regolazione di geni della famiglia MADS-box (tra cui *AGL6*, *FUL* e *SEP*), costituisce un meccanismo chiave nel controllo dell'*ovary arrest* e della partenocarpia. L'*ovary arrest* rappresenta uno stato fisiologico di quiescenza dell'ovario che si verifica in assenza di impollinazione e fecondazione, in cui la crescita è mantenuta repressa attraverso complessi regolatori che coinvolgono fattori di trascrizione (ARF e MADS-box) e componenti della via di segnalazione dell'auxina (Aux/IAA), responsabili della modulazione dei geni auxino-responsivi. Solo in seguito all'aumento dei livelli di auxina e gibberelline derivante dalla fecondazione tale repressione viene rimossa, consentendo

l'attivazione dei processi di divisione ed espansione cellulare che determinano l'allegagione (Baral et al., 2025; Ezura et al., 2023; Mcatee et al., 2013; Osorio et al., 2013).

Parallelamente, il ruolo delle gibberelline nell'attivazione della crescita dell'ovario è ampiamente documentato: la biosintesi di GA bioattive (GA20ox, GA3ox) aumenta dopo l'impollinazione ed è funzionalmente connessa alla segnalazione auxinica, mentre l'attivazione della risposta alle GA contribuisce alla derepressione della crescita del frutto, ovvero alla transizione dall'iniziale stato di quiescenza dell'ovario a una fase di rapido accrescimento.

Anche le citochinine, i cui livelli aumentano dopo la fertilizzazione, promuovono la proliferazione cellulare nelle prime fasi di sviluppo del frutto e agiscono in sinergia con l'auxina. La loro attività è regolata dall'equilibrio tra biosintesi, mediata dall'enzima isopentenil transferasi (IPT), e degradazione, catalizzata dalla citochinina ossidasi (CKX); evidenze genetiche e fisiologiche indicano che la modulazione della segnalazione citochinica influenza direttamente l'iniziazione e il patterning del frutto.

La crescita del frutto è il risultato dell'interazione tra divisione ed espansione cellulare coordinate dai segnali ormonali. In questo processo, il metabolismo e il trasporto degli zuccheri svolgono un ruolo cruciale, poiché il frutto in sviluppo agisce come un forte sink metabolico; durante la maturazione si osservano infatti importanti cambiamenti nel metabolismo dei carboidrati e nella conversione degli zuccheri.

Nel complesso, le diverse fasi dello sviluppo del frutto, dalla germinazione del polline e l'allungamento del tubo pollinico fino alla fecondazione e all'allegagione, sono regolate da una complessa rete di geni coinvolti nella biosintesi, nel trasporto e nella percezione degli ormoni, nella regolazione trascrizionale, nell'espansione cellulare e nel metabolismo degli zuccheri (Figura 7). In questo contesto, i biostimolanti possono modulare diversi pathway molecolari coinvolti in queste fasi dello sviluppo e della maturazione del frutto.

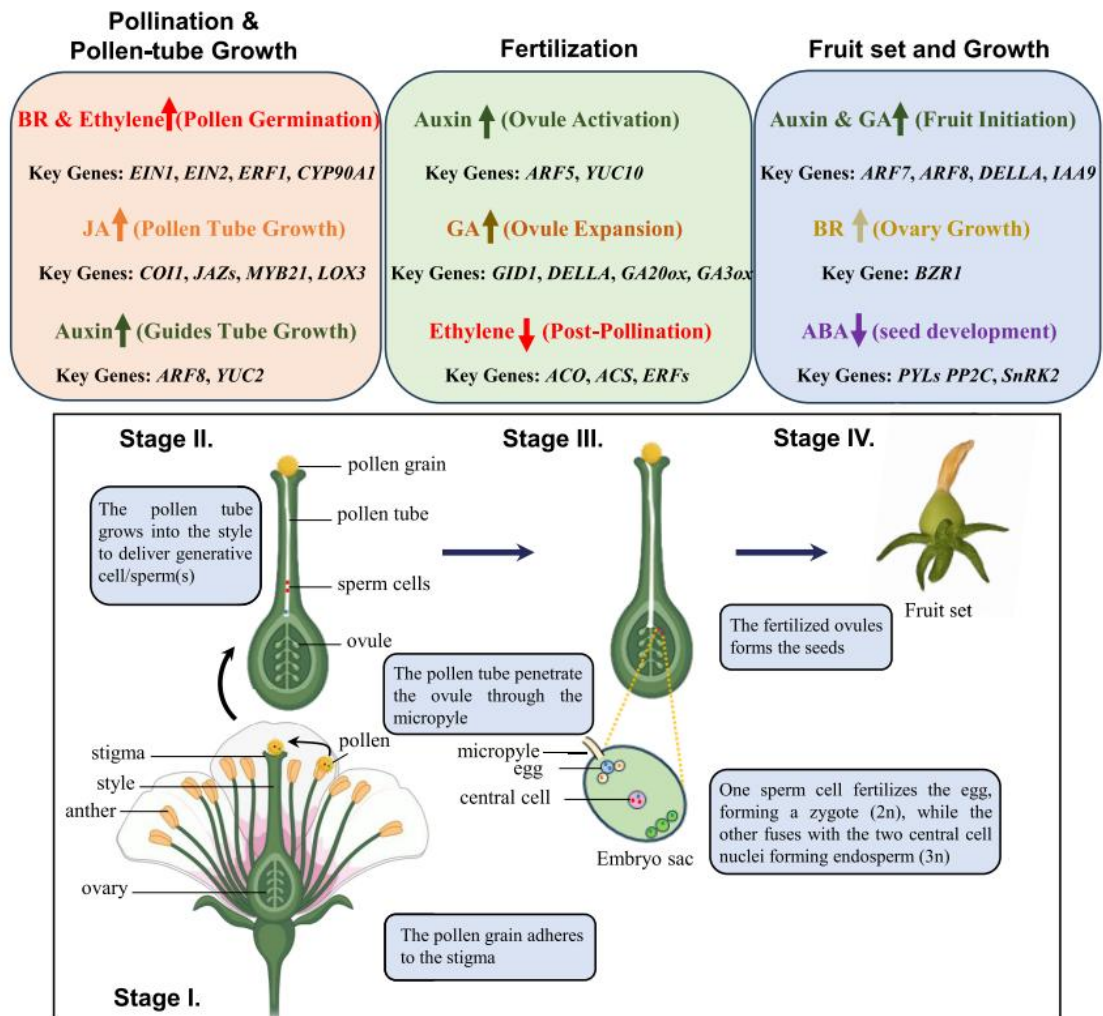


Figura 7. Rappresentazione schematica dei principali ormoni e dei relativi attori molecolari coinvolti nelle diverse fasi dello sviluppo del frutto: germinazione del polline (I), allungamento del tubo pollinico (II), fecondazione (III) e allegazione (IV). L'etilene partecipa alle fasi iniziali dell'impollinazione tramite i componenti di segnalazione *EIN1, EIN2 ed ERF1*, ma i suoi livelli diminuiscono dopo l'allegazione per effetto della down-regulation degli enzimi biosintetici *ACS* e *ACO*. I brassinosteroidi favoriscono la germinazione del polline e la crescita del tubo (*CYP90A1*) e regolano la maturazione dell'ovario attraverso *BZR1*. L'acido jasmonico contribuisce all'impollinazione e allo sviluppo dei semi tramite *LOX3* e il complesso *COI1-JAZ, MYC2* e *MYB21*. L'auxina promuove la crescita del tubo pollinico e l'inizio della fruttificazione attraverso *YUCCA, ARF7* e *ARF8*, con repressione di regolatori negativi come *IAA9*. Le gibberelline stimolano l'espansione dell'ovulo e l'allegazione mediante *GA20ox, GA3ox* e i componenti *GID1* e *DELLA*. L'acido abscissico regola lo sviluppo e la dormienza dei semi attraverso il modulo di segnalazione *PYR/PYL-PP2C-SnRK2*. Le frecce indicano attivazione (↑) o inibizione (↓) (Baral et al., 2025).

## 2. Scopo della tesi

In questo contesto, il presente lavoro di tesi si propone di valutare l'efficacia di un prototipo sperimentale di biostimolante ad azione allegante nel peperone e di approfondirne la modalità d'azione attraverso un approccio integrato fisiologico, biochimico e molecolare. L'ipotesi di lavoro è che il trattamento del peperone con biostimolante possa modulare i processi chiave che regolano la transizione da fiore a frutto, influenzando sia la competenza riproduttiva sia la disponibilità metabolica necessaria al mantenimento dei frutticini nelle prime fasi di sviluppo. A tal fine, la prova sperimentale è stata strutturata in modo da integrare differenti livelli di analisi. A livello fisiologico, sono stati valutati parametri associati allo stato nutrizionale e funzionale della pianta, mediante determinazione del contenuto di pigmenti fotosintetici, al fine di verificare eventuali effetti del biostimolante sulla capacità fotosintetica e sulla potenziale produzione di foto-assimilati. Parallelamente, la quantificazione degli zuccheri totali nei tessuti vegetali ha consentito di analizzare possibili variazioni nella disponibilità di carbonio e nelle relazioni "source-sink", fattori determinanti per la stabilità dell'allegagione.

A livello riproduttivo, è stata valutata la vitalità del polline, parametro strettamente connesso al successo della fecondazione e potenzialmente sensibile a variazioni dello stato fisiologico della pianta.

Infine, l'analisi di espressione genica è stata volta ad approfondire i meccanismi molecolari sottesi alla risposta al trattamento. A questo scopo, la selezione dei geni candidati per lo studio molecolare dell'allegagione in peperone è stata guidata dalle evidenze riportate in letteratura circa il ruolo centrale dell'interazione tra fitormoni, regolatori trascrizionali e metabolismo primario nel controllo della transizione da fiore a frutto.

L'integrazione dei dati ottenuti dalle analisi fisiologiche, biochimiche e molecolari ha avuto l'obiettivo di fornire un quadro interpretativo complessivo sull'efficacia e sulla modalità d'azione del biostimolante, contribuendo alla comprensione dei meccanismi che governano la stabilità produttiva nel peperone e alla definizione di strategie innovative e sostenibili per il miglioramento dell'allegagione.

## 3. Materiali e metodi

### 3.1. Materiale vegetale, biostimolante e condizioni sperimentali

La prova sperimentale è stata condotta su piante di peperone (*Capsicum annuum* L.), varietà Vulpix, appartenente alla tipologia “snack” e caratterizzata da frutti di piccole dimensioni, forma conica e colorazione arancione a maturazione completa. La varietà in studio presenta un ciclo colturale relativamente breve, dimensioni contenute e crescita indeterminata; tale caratteristica consente lo sviluppo di più palchi fiorali nel corso del ciclo colturale, rendendola particolarmente adatta a studi sull'allegagione.

La prova è stata strutturata secondo un disegno sperimentale comprendente due tesi. Per ciascuna tesi sono state considerate cinque repliche biologiche, corrispondenti a cinque gruppi indipendenti di piante sottoposte al medesimo trattamento. Ogni replica biologica era a sua volta costituita da cinque repliche tecniche, rappresentate da singole piante coltivate in vasi distinti (una pianta per vaso). Pertanto, ciascuna tesi comprendeva complessivamente 25 piante sperimentali (5 repliche biologiche × 5 repliche tecniche).

I semi utilizzati sono stati forniti dalla Blumen Vegetable Seeds e distribuiti da Agricola Albese S.r.l. (Alba, CN). La semina è stata inizialmente effettuata in contenitori di piccole dimensioni (13 × 13 cm di lato; volume pari a 1,7 L). Successivamente, una volta raggiunto un adeguato stadio di sviluppo vegetativo, le piantine sono state trapiantate in vasi di dimensioni maggiori (diametro superiore pari a 25 cm; volume pari a 7,5 L). I contenitori sono stati riempiti con un substrato commerciale a base di torba (A.M.), predisponendo sul fondo uno strato di argilla espansa (E.), al fine di favorire un adeguato drenaggio e una corretta aerazione dell'apparato radicale. Le piante sono state coltivate in serra in condizioni controllate. Durante il periodo sperimentale, la serra è stata impostata con un fotoperiodo di 15 ore di luce e 9 ore di buio. L'illuminazione è stata fornita sia dalla luce solare naturale sia da un sistema di lampade LED a spettro variabile, utilizzate per integrare la radiazione luminosa disponibile. Durante il periodo di coltivazione delle piante, l'intensità luminosa minima registrata è stata pari a  $370 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , espressa come densità di flusso di fotoni fotosinteticamente attivi (PPFD, Photosynthetic Photon Flux Density), garantendo condizioni luminose adeguate e riproducibili per l'intero ciclo sperimentale. La temperatura è stata regolata in modo differenziato tra fase diurna e notturna: 14 e 19 °C di notte e 19 e 25 °C di giorno. L'umidità relativa media è stata mantenuta intorno al 60%. L'irrigazione è stata gestita in modo controllato al fine di coltivare le piante in condizioni ottimali.

Nel corso della prova è stata mantenuta la normale architettura della pianta, evitando interventi di potatura. In condizioni di crescita libera, ciascun nodo termina con la formazione di un palco florale, mentre due rami simpodiali proseguono la crescita vegetativa, determinando una biforcazione regolare della chioma. Questa modalità di gestione ha consentito di ottenere piante caratterizzate da uno sviluppo uniforme, evitando alterazioni architetture che avrebbero potuto influenzare il numero e la distribuzione di gemme, fiori e frutti.

La prova sperimentale ha previsto l'applicazione di trattamenti fogliari con un biostimolante allegante. Il prodotto utilizzato è un prototipo sperimentale a base di matrici organiche di derivazione vegetale ed estratti derivanti da alghe brune e lieviti selezionati, sviluppato con una formulazione proprietaria. Il biostimolante è stato progettato con l'obiettivo di esercitare effetti positivi sul processo di allegazione.

Prima dell'avvio dei trattamenti è stata effettuata una fase preliminare di randomizzazione delle piante e di calibrazione dello strumento di distribuzione, al fine di garantire un'erogazione accurata e standardizzata del volume di soluzione. Questa prova è stata impostata su un dosaggio di campo 600 l/ha.

- TESI 1: controllo in bianco;
- TESI 2: biostimolante GHI\_24\_Elegant\_P10 a 2 ml/l per 5 applicazioni (ABCDE).

I trattamenti sono stati effettuati disponendo le piante a una distanza tale da garantire un'adeguata bagnatura fogliare, limitando il contatto tra le foglie e riducendo l'utilizzo eccessivo di prodotto (Tabella 1). I trattamenti sono stati effettuati disponendo le piante a una distanza tale da garantire un'adeguata bagnatura fogliare, limitando il contatto tra le foglie e riducendo l'utilizzo eccessivo di prodotto (Tabella 1). Per ciascun trattamento è stato inoltre registrato lo stadio fenologico della pianta secondo la scala BBCH (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical industry), un sistema standardizzato di codifica decimale utilizzato per descrivere le fasi di sviluppo delle piante. L'indicazione dello stadio BBCH ha consentito di correlare ogni applicazione al corrispondente stadio vegetativo e allo sviluppo dei palchi fogliari, permettendo successivamente di determinare il numero di trattamenti ricevuti da ciascun palco e di definire i palchi di interesse per il campionamento e per l'analisi della produttività. Al termine del terzo trattamento fogliare, e in presenza di un incremento della percentuale di allegazione nelle piante trattate rispetto ai controlli, è stato effettuato il campionamento del materiale vegetale destinato allo studio della modalità d'azione del trattamento. In particolare, sono stati raccolti abbozzi floreali, fiori aperti, frutticini allegati, frutti in accrescimento e foglie limitrofe ai palchi floreali.

Tabella 1. Descrizione dei trattamenti fogliari.

<b>CODICE APPLICAZIONE</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
<b>Data applicazioni:</b>	01.04.2025	07.04.2025	17.04.2025	24.04.2025	06.05.2025
<b>Ora inizio applicazione:</b>	11:00	10:00	16:00	09:30	10:30
<b>Ora fine applicazione:</b>	11:45	12:00	17:00	10:40	11:45
<b>Metodo applicazione:</b>	Spray fogliare	Spray fogliare	Spray fogliare	Spray fogliare	Spray fogliare
<b>Temperatura dell'aria (°C):</b>	24.9	24.7	25.4	23.7	21.9
<b>% Umidità relativa:</b>	54.8	55.6	58.4	58.4	68.1
<b>DESCRIZIONE COLTURA</b>					
<b>Scala di misura fenologica:</b>	BBCH	BBCH	BBCH	BBCH	BBCH
<b>Stadio fenologico:</b>	62	63	65	66	68
<b>ATTREZZURA D'APPLICAZIONE</b>					
<b>Strumento utilizzato:</b>	Spruzzione elettrico manuale	Spruzzione elettrico manuale	Spruzzione elettrico manuale	Spruzzione elettrico manuale	Spruzzione elettrico manuale
<b>Pressione d'utilizzo:</b>	2 bar	2 bar	2 bar	2 bar	2 bar
<b>Tipologia ugello:</b>	Cono cavo	Cono cavo	Cono cavo	Cono cavo	Cono cavo
<b>Vettore:</b>	Acqua	Acqua	Acqua	Acqua	Acqua
<b>Volume d'applicazione:</b>	600 l/ha	600 l/ha	600 l/ha	600 l/ha	600 l/ha

### 3.2. Parametri biometrici e fisiologici

Nel corso della prova sperimentale sono stati valutati parametri biometrici e fisiologici al fine di caratterizzare la risposta delle piante ai trattamenti e verificare l'assenza di condizioni di stress tali da interferire con l'interpretazione dei risultati agronomici e molecolari.

A partire dal secondo trattamento, il giorno precedente ciascuna applicazione è stato effettuato il conteggio dei fiori prodotti da ciascuna pianta, registrando i dati sia per singolo palco florale sia come valore complessivo per pianta. Durante i rilievi è stata inoltre valutata la cascola florale, definita come la caduta del fiore prima dell'allegazione e riconoscibile dalla presenza di una cicatrice sul peduncolo. Per ciascuna pianta sono stati quindi registrati il numero totale di fiori prodotti, il numero di fiori caduti, il numero di fiori allegati e il numero di frutti, intesi come fiori che hanno completato il processo di allegazione. Il numero reale di fiori prodotti è stato determinato considerando il valore massimo di fiori osservato nel corso dei rilievi, definito come "numero di fiori teorici", utilizzato per il calcolo della percentuale di allegazione.

Dalla settimana successiva all'ultimo trattamento sono stati effettuati rilievi settimanali e la raccolta dei frutti, distinguendo tra frutti commerciabili e non commerciabili, al fine di

determinare la percentuale di allegagione. Sono stati considerati commerciabili i frutti conformi agli standard qualitativi di mercato (dimensioni adeguate, forma regolare e assenza di difetti), mentre sono stati classificati come non commerciabili quelli che presentavano dimensioni insufficienti, deformazioni o danni. Parallelamente alle valutazioni biometriche, lo stato fisiologico delle piante è stato monitorato settimanalmente mediante misure del contenuto relativo di pigmenti fogliari e composti fenolici, a partire da un tempo zero antecedente al primo trattamento. Le misurazioni sono state effettuate con rilievi non distruttivi mediante il sensore ottico Dualex (MPM-100), che consente di stimare in vivo il contenuto di clorofille, flavonoli e antociani. Le rilevazioni sono state eseguite su foglie rappresentative di differenti stadi di sviluppo, selezionando una foglia completamente sviluppata, una intermedia e la foglia più giovane completamente espansa per ciascun palco florale.

Infine, è stata valutata la vitalità del polline mediante il test al 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TTC) (Liu et al., 2023). Il polline, prelevato da fiori in piena antesi, è stato incubato in una soluzione di TTC allo 0,5% (p/v) in saccarosio al 10% (p/v) e successivamente osservato al microscopio ottico. La percentuale di vitalità è stata calcolata come rapporto tra il numero di granuli pollinici vitali e il numero totale di granuli osservati.

### 3.3. Parametri biochimici

Al fine di integrare le informazioni ottenute dalle valutazioni fisiologiche e biometriche, sono state condotte analisi biochimiche volte alla determinazione del contenuto di pigmenti fotosintetici e di zuccheri totali nei tessuti vegetali.

Il contenuto di clorofille e carotenoidi è stato determinato mediante estrazione in etanolo 96% (v/v) e successiva lettura spettrofotometrica alle lunghezze d'onda specifiche. Le concentrazioni dei pigmenti sono state calcolate secondo le equazioni di Lichtenthaler, (1987) ed espresse in funzione del peso fresco del campione.

Il contenuto di zuccheri totali è stato determinato mediante il saggio colorimetrico all'anthrone (Reis et al., 2025). Il reagente all'anthrone è stato preparato sciogliendo anthrone allo 0,1% (p/v) in acido solforico concentrato. La quantificazione è stata effettuata mediante una curva di taratura ottenuta con soluzioni standard di glucosio a concentrazioni crescenti comprese tra 6,25 e 100 mg L<sup>-1</sup>.

Campioni solidi di tessuto vegetale essiccato (circa 0,1 g) sono stati estratti in acqua distillata mediante incubazione a 70 °C, seguita da centrifugazione; i surnatanti sono stati eventualmente diluiti per rientrare nel range lineare della curva standard. Aliquote di campione o di standard sono state fatte reagire con il reagente all'anthrone e incubate a 100 °C. Dopo raffreddamento

a temperatura ambiente, l'assorbanza è stata misurata a 620 nm mediante spettrofotometro. Il contenuto di zuccheri è stato espresso come mg di equivalenti di glucosio per grammo di sostanza secca ( $\text{mg g}^{-1}$  DW), mediante interpolazione con la curva di taratura.

### 3.4. Analisi trascrittomica

#### 3.4.1. Estrazione dell'RNA totale e sintesi del cDNA

L'estrazione dell'RNA totale è stata effettuata su diversi organi vegetali selezionati in quanto rilevanti per il processo di allegazione, prelevati circa 24 ore dopo il terzo trattamento fogliare. I campioni sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a  $-80$  °C fino all'estrazione.

L'RNA è stato isolato secondo il protocollo descritto da Wang et al., (2009), opportunamente modificato mediante l'aggiunta di 50 mM DTT e 5% (p/v) di PVPP nella fase estrattiva iniziale per migliorare la rimozione di composti interferenti. La concentrazione e la qualità dell'RNA sono state valutate rispettivamente mediante nanospettrofotometro ed elettroforesi su gel di agarosio. Successivamente, 1  $\mu\text{g}$  di RNA totale è stato retrotrascritto in cDNA utilizzando un kit commerciale (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Thermo Fisher Scientific), caratterizzato da un intervallo di sensibilità compreso tra 500 ng e 2  $\mu\text{g}$  di RNA totale.

#### 3.4.2. Analisi di espressione genica mediante RT-qPCR

Sulla base dei geni selezionati (Tabella 2), sono stati disegnati primers specifici utilizzando il software Primer3Plus. L'efficienza di amplificazione delle coppie di primers è stata valutata mediante curve di taratura ottenute da diluizioni seriali di cDNA.

Tabella 2. Elenco dei geni selezionati.

Species	Gene name	Gene ID	Primers sequence (5'-3')		Product size (bp)	Length (bp)	Tm (°C)	GC%
<i>Capsicum annuum</i>	<i>CaARF7</i>	107878007	FOR	GTTTGGGAATTGAGGGACAGC	125	20	56,98	50
			REV	GAACACAGCTCACAACTCC		20	56,95	50
<i>Capsicum annuum</i>	<i>CaARF8</i>	107868273	FOR	GCTAAAACGGCCTTGGTATC	112	20	56,87	50
			REV	CAAATGTGGTCCTTGCTCAC		20	57,29	50
<i>Capsicum annuum</i>	<i>CaARF2a</i>	107862124	FOR	CAGAGTAAGAGTTGGCTGGT	129	20	56,86	50
			REV	CTGCACCTCCTCTTTCGTAT		20	57,03	50
<i>Capsicum annuum</i>	<i>CaPIN1</i>	107862230	FOR	CTGGCATGTTCTCACCTAGT	122	20	56,93	50
			REV	ATCAGAAACAGGAGAGGCAC		20	57,22	50
<i>Capsicum annuum</i>	<i>CaPIN2</i>	107860554	FOR	GATGGAGGACTAGGAATGGC	134	20	57,15	55
			REV	GCCATGAGAACAGGTCCTAG		20	57,39	55
<i>Capsicum annuum</i>	<i>CaPIN6</i>	107874932	FOR	TGGAGAGAGACAAGGGTACA	100	20	57,01	50
			REV	TTCTGAATCTGCACCTCCTC		20	56,93	50
<i>Capsicum annuum</i>	<i>CaTIR1</i>	107863980	FOR	GTCTGGGTTTTGGGATGTTG	110	20	56,89	50
			REV	CAAGCTCAGGGTTTTGACAG		20	56,93	50
<i>Capsicum annuum</i>	<i>CaYUCCA4</i>	107874836	FOR	AGGTTGCGGAGTATGATGAG	104	20	57,10	50
			REV	CTCTGCATTTTCCCCTGTTG		20	56,98	50
<i>Capsicum annuum</i>	<i>CaGA3ox</i>	107874814	FOR	GAGAGTTTCACCTTGTCGA	142	20	57,19	50
			REV	ACTTAGAGGGACACAAAGCC		20	57,14	50
<i>Capsicum annuum</i>	<i>CaGA20ox</i>	107863364	FOR	ACTACTATCCACCATGCCAG	100	20	56,40	50
			REV	CCTCCAACGCAATCTTGATG		20	57,16	50
<i>Capsicum annuum</i>	<i>CaGID1b</i>	107873705	FOR	CAAGGCTGTTGTTGTCTCTG	110	20	56,95	50
			REV	GCCACGACCTTGATTTTACC		20	57,09	50
<i>Capsicum annuum</i>	<i>CaIPT</i>	107846900	FOR	CGCCACTCGTTATTTCCAG	130	20	57,19	50
			REV	CTCCCCGAGTAAATGATGCA		20	57,38	50
<i>Capsicum annuum</i>	<i>CaCKX5</i>	107866953	FOR	CTGCATGGAAAACCAGCTTC	148	20	57,64	50
			REV	ATACACCTCCCTCAGCCTTA		20	57,13	50
<i>Capsicum annuum</i>	<i>CaCKX6</i>	107854914	FOR	GCCCTGTTCTTGCTATCCA	129	20	56,92	50

Species	Gene name	Gene ID	Primers sequence (5'-3')		Product size (bp)	Length (bp)	Tm (°C)	GC%
			REV	FOR				
			REV	CAGCTCCATTTGATGAGGGA		20	57,28	50
<i>Capsicum annuum</i>	CaEXPA15	107878205	FOR	CACATTGCCCAATACAGAGC	137	20	57,14	50
			REV	GCACCACCAACATTAGTCAC		20	57,01	50
<i>Capsicum annuum</i>	CaEXPA1	107862253	FOR	GACCTCTCTCAGCCTGTTTT	103	20	57,15	50
			REV	ATCTGATGCCTCCCCTTTTC		20	57,26	50
<i>Capsicum annuum</i>	CaEXPA2	107875026	FOR	TCTGCCCTCAAAATCCATCC	122	20	57,56	50
			REV	GACAATTCCGGCTCTGTACT		20	57,33	50
<i>Capsicum annuum</i>	CaEXPA3	107843478	FOR	GCATCGTCCCTGTTACCTAT	136	20	56,8	50
			REV	TGAACTTGCTGGATGTCACC		20	58,1	50
<i>Capsicum annuum</i>	CaEXPA7	107852456	FOR	GTTCTGTTTCGTATCGCAG	115	20	56,93	50
			REV	CTCCACTTCCACCAACATTC		20	56,33	50
<i>Capsicum annuum</i>	CaNSGT1	107864612	FOR	AGGGAGATTGAGGGGAAGTA	129	20	56,73	50
			REV	CCATGATTGAATTGCCACCC		20	57,39	50
<i>Capsicum annuum</i>	CaXTH5	107843860	FOR	AGATTGGGCTACTTCAGGTG	102	20	56,91	50
			REV	GGGTCCATTGCACATCCATT		20	58,51	50
<i>Capsicum annuum</i>	CaSnRK1	107858759	FOR	CTTGGTTCAGGCTCATTTG	109	20	56,98	50
			REV	CCCATCTTAACCACCTCCTG		20	57,28	55
<i>Capsicum annuum</i>	CaFUL2	107845304	FOR	GCAGATGAAGGAAAGGGAGA	108	20	56,91	50
			REV	TTAAAGGGATGTGGCAGACC		20	57,49	50
<i>Capsicum annuum</i>	CaAGL1	107878477	FOR	CATTGGTAGAGTCCGTTCCA	138	20	56,95	50
			REV	TGCTCTTGCTCTCTCTAC		20	56,69	50
<i>Capsicum annuum</i>	CaSEPS	107845303	FOR	CTACCACGAGTATCTGAGGC	106	20	56,93	55
			REV	CTCCAGGTCCTTTGTGCTTA		20	57,14	50
<i>Capsicum annuum</i>	CaACT1	GQ339766	FOR	GTCCTTTCCAACCATCCAT	231	20	60	
			REV	TACTTTCTCTGTTGGTGGC		20	60	
<i>Capsicum annuum</i>	CaEF1 $\alpha$	AY496125	FOR	TGAAGAATGGTGATGCTGGC	132	20	60	
			REV	GACAACACCAACAGCAACAG		20	60	

Le analisi dell'espressione genica sono state effettuate mediante Real-Time PCR (RT-qPCR), utilizzando un intercalante fluorescente aspecifico (Luna® Universal qPCR Master Mix), che consente la rilevazione in tempo reale dell'amplificazione del DNA, eseguita secondo il protocollo mostrato in Tabella 3.

Tabella 3. Programma termico della Real-Time PCR (qPCR) utilizzato per le analisi di espressione genica.

Fase	Temperatura (°C)	Tempo	Note
Attivazione iniziale	95	10 min	Attivazione della miscela di reazione
Denaturazione	95	15 s	
Annealing	60	20 s	
Estensione	72	30 s	Acquisizione del segnale fluorescente
<b>Numero di cicli</b>	–	<b>40</b>	I tre passaggi precedenti
Denaturazione (melting)	95	1 min	
Annealing (melting)	55	30 s	
Denaturazione finale	95	30 s	Curva di dissociazione

Per la normalizzazione dei dati sono stati utilizzati geni di riferimento (housekeeping) selezionati in base alla loro espressione costitutiva e stabile nei diversi campioni analizzati, indipendentemente dal trattamento e dallo stadio di sviluppo. Per *Capsicum annuum*, la scelta si è orientata verso l'elongation factor 1-alpha (*EF-1 $\alpha$* ) e l'actina (*Act1*), identificati come geni di riferimento affidabili per studi di espressione genica mediante RT-qPCR (Bin et al., 2012).

### 3.5 Analisi statistica

Tutti i dati ottenuti nel corso della prova sperimentale sono stati sottoposti ad analisi statistica al fine di valutare l'effetto dei trattamenti applicati.

Il confronto tra le due tesi sperimentali è stato effettuato mediante test t di Student, per confrontare i valori medi delle variabili considerate. Le differenze tra i trattamenti sono state considerate statisticamente significative per un livello di probabilità  $p < 0,05$ .

## 4. Risultati

### 4.1. Andamento della percentuale di allegagione in risposta al trattamento biostimolante

La percentuale di allegagione è stata calcolata, per ciascuna replica biologica, come rapporto tra il numero di frutti prodotti e il numero totale di fiori, moltiplicato per 100. I valori medi ottenuti per le piante di controllo e trattate con biostimolante sono riportati in

Tabella 4.

Tabella 4. Percentuale di allegagione nelle piante di controllo e trattate con biostimolante coltivate in condizioni controllate. I valori sono espressi come media  $\pm$  errore standard di cinque repliche biologiche, ciascuna composta da cinque piante. Non sono rilevate differenze significative con t-test ( $p < 0.05$ ).

TESI	REPLICA BIOLOGICA	% ALLEGAGIONE	% ALLEGAGIONE MEDIA
Controllo	I	35,70	39,9 $\pm$ 2,3
	II	46,95	
	III	42,55	
	IV	39,93	
	V	34,35	
Biostimolante	I	40,98	40,5 $\pm$ 0,6
	II	40,25	
	III	41,02	
	IV	41,83	
	V	38,55	

Nel complesso, il campione trattamento ha mostrato valori medi di percentuale di allegagione superiori rispetto al controllo, con una variazione percentuale relativa pari a +1,5%. Tale valore rappresenta la variazione percentuale (%UTC) tra i due valori medi e indica l'incremento relativo del trattamento rispetto al controllo, calcolato come rapporto tra la differenza dei due valori e il valore iniziale, moltiplicato per 100. Tuttavia, l'analisi statistica condotta mediante t-test di Student non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra le due tesi ( $p < 0,05$ ).

L'andamento della percentuale di allegagione osservato a fine prova risulta coerente con il numero di frutti rilevato nel corso dei diversi rilievi. In particolare, come mostrato in Figura 8, il numero di frutti rilevato nelle piante trattate è risultato generalmente superiore rispetto al controllo durante l'intero periodo di osservazione.

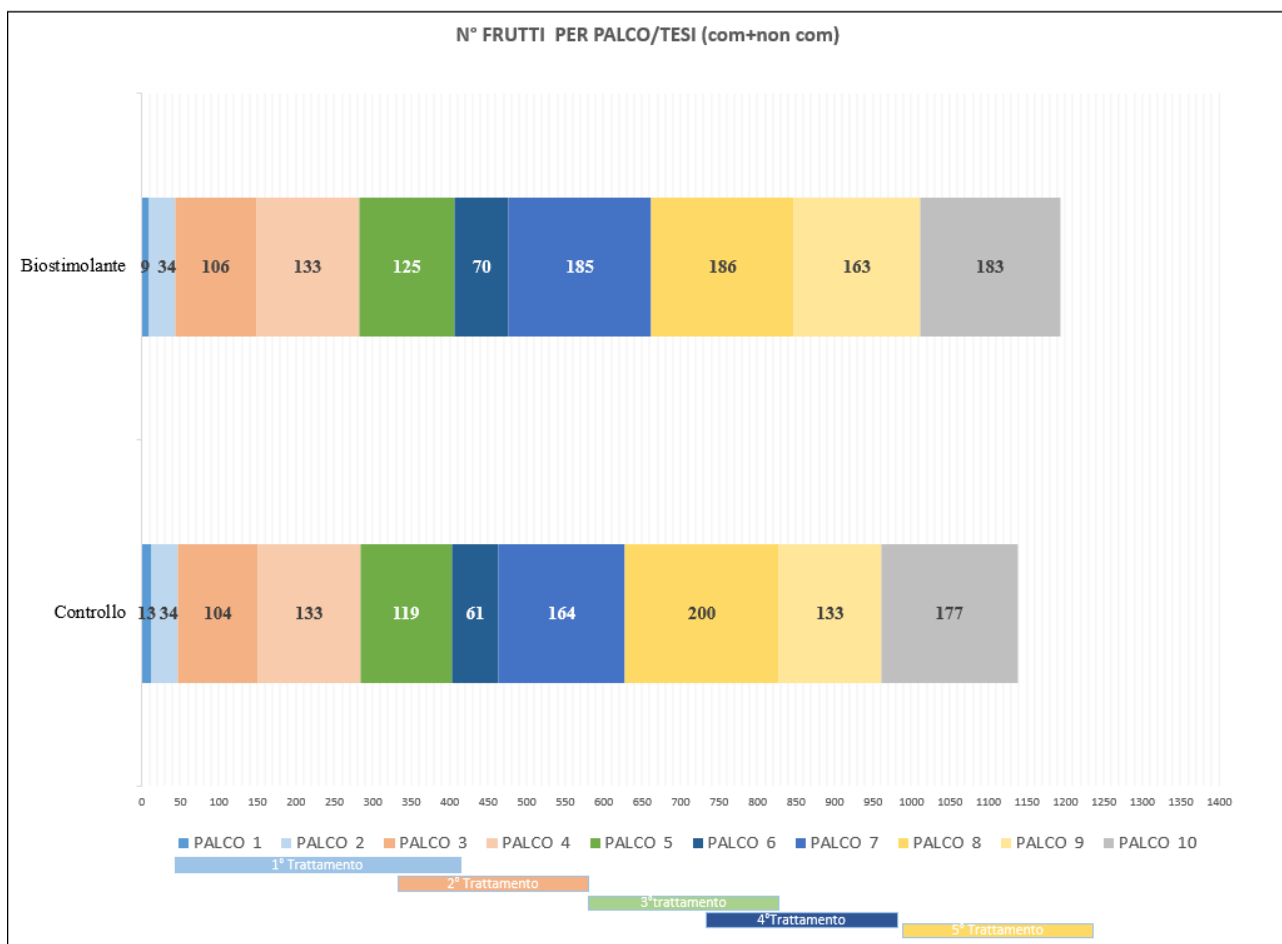


Figura 8. Numero di frutti commerciabili (com) e non commerciabili (non com) rilevato nelle diverse raccolte nelle piante di controllo e trattate con biostimolante.

Poiché il numero totale di fiori era stato determinato in precedenza, il maggior numero di frutti rilevato nei diversi rilievi si riflette in valori più elevati di percentuale di allegagione cumulativa nelle piante trattate rispetto al controllo, come riportato in Figura 9.

Nel complesso, l'andamento dei dati relativi alla percentuale di allegagione e al numero di frutti rilevato nel corso delle diverse raccolte evidenzia una risposta coerente e costante delle piante trattate con biostimolante. Sebbene le differenze osservate non abbiano raggiunto la significatività statistica, la ridotta variabilità tra le repliche e la tendenza positiva riscontrata lungo l'intero periodo di osservazione suggeriscono un effetto del trattamento sui processi di allegagione.

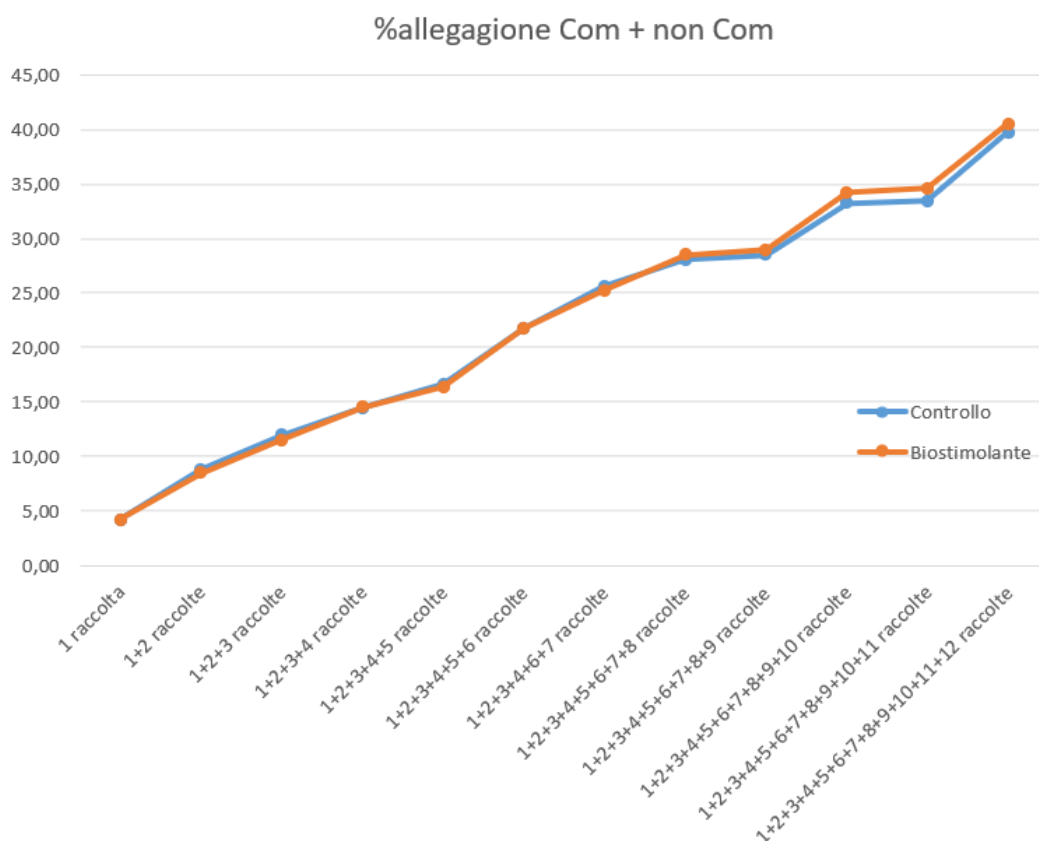


Figura 9. Andamento cumulativo della percentuale di allegagione di frutti commerciabili (com) e non commerciabili (non com) nel corso delle diverse raccolte nelle piante di controllo e trattate con biostimolante.

## 4.2. Stato fisiologico delle piante e vitalità del polline

Lo stato fisiologico delle piante di controllo e trattate con biostimolante è stato valutato mediante misure non distruttive di contenuto di pigmenti effettuate con sensore ottico fogliare Dualex. Sono stati determinati l'indice di clorofilla (CCI), l'indice SPAD, l'indice dei flavonoli epidermici (Flav) e l'indice degli antociani epidermici (Anth).

I rilievi sono stati eseguiti in tre differenti date nel corso del mese di maggio 2025 sull'intero set di piante per ciascuna tesi. Al fine di ottenere un valore rappresentativo dello stato fisiologico delle piante durante il periodo di prova, per ciascuna replica biologica i valori ottenuti nei tre rilievi sono stati mediati. I dati sono quindi espressi come media  $\pm$  errore standard per ciascun parametro fisiologico e per ciascuna tesi (I parametri fisiologici analizzati non hanno evidenziato differenze tra le piante trattate e quelle di controllo. In particolare, i valori medi di CCI e SPAD risultano comparabili tra le due tesi, indicando un profilo di pigmenti fotosintetici simile nelle piante trattate e non trattate. Analogamente, i parametri relativi agli antociani e ai flavonoli non hanno mostrato variazioni tra controllo e trattato, con

valori sovrapponibili tra le due tesi. Nel complesso, i risultati ottenuti mediante Dualex indicano che l'applicazione del biostimolante non ha determinato alterazioni dello stato fisiologico delle piante nel corso del periodo sperimentale.

Tabella 5).

I parametri fisiologici analizzati non hanno evidenziato differenze tra le piante trattate e quelle di controllo. In particolare, i valori medi di CCI e SPAD risultano comparabili tra le due tesi, indicando un profilo di pigmenti fotosintetici simile nelle piante trattate e non trattate. Analogamente, i parametri relativi agli antociani e ai flavonoli non hanno mostrato variazioni tra controllo e trattato, con valori sovrapponibili tra le due tesi. Nel complesso, i risultati ottenuti mediante Dualex indicano che l'applicazione del biostimolante non ha determinato alterazioni dello stato fisiologico delle piante nel corso del periodo sperimentale.

Tabella 5. Valori medi ( $\pm$  errore standard) dei parametri fisiologici rilevati mediante Dualex nelle piante di controllo e trattate con biostimolante. I dati (Flv, Anth, CCI e SPAD) sono ottenuti come media dei rilievi effettuati su foglie senescenti, intermedie e giovani nel corso del periodo sperimentale. Non sono rilevate differenze significative con t-test ( $p < 0.05$ ).

<b>Tesi</b>	<b>Flv</b>	<b>Anth</b>	<b>CCI</b>	<b>SPAD</b>
Controllo	0.50 $\pm$ 0.02	0.086 $\pm$ 0.004	9.28 $\pm$ 0.23	55.42 $\pm$ 0.73
Biostimolante	0.46 $\pm$ 0.01	0.085 $\pm$ 0.005	9.51 $\pm$ 0.06	56.06 $\pm$ 0.17

I dati ottenuti mediante il rilievo non distruttivo SPAD sono stati confermati dalle quantificazioni dei pigmenti fotosintetici mediante analisi distruttiva delle foglie per l'estrazione, seguita da analisi spettrofotometrica, quantificando clorofilla *a*, clorofilla *b*, clorofilla totale e carotenoidi totali nelle piante di controllo e trattate con biostimolante. Come mostrato in **Error! Reference source not found.**, le concentrazioni dei pigmenti fotosintetici non hanno evidenziato differenze significative tra le due tesi.

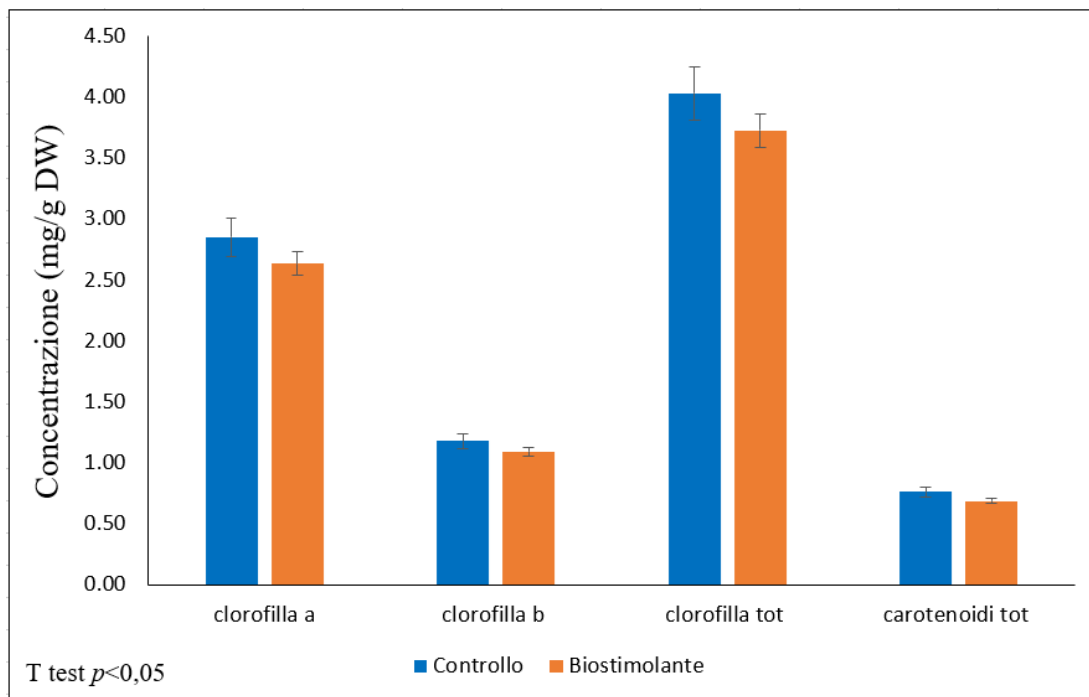


Figura 10. Contenuto dei principali pigmenti fotosintetici (clorofilla *a*, clorofilla *b*, clorofilla totale e carotenoidi totali), determinato mediante analisi spettrofotometrica degli estratti di pigmenti ottenuti da piante di controllo e trattate con biostimolante. I valori sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard. L'assenza di asterischi indica la mancanza di differenze statisticamente significative con t-test ( $p < 0,05$ ).

In particolare, i contenuti di clorofilla *a*, clorofilla *b* e clorofilla totale risultano comparabili tra piante trattate e di controllo, così come i livelli di carotenoidi totali. Questi risultati sono coerenti con quanto osservato mediante le misure fisiologiche non distruttive (Dualex) e indicano che il trattamento biostimolante non ha influenzato il contenuto dei principali pigmenti fotosintetici.

In accordo con i risultati fisiologici ottenuti mediante Dualex, anche il test di vitalità del polline (TTC) non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra le due tesi. Tuttavia, nelle piante trattate con biostimolante è stata osservata una tendenza positiva, con un aumento della vitalità del polline pari a circa +9% rispetto al controllo (Figura 11).

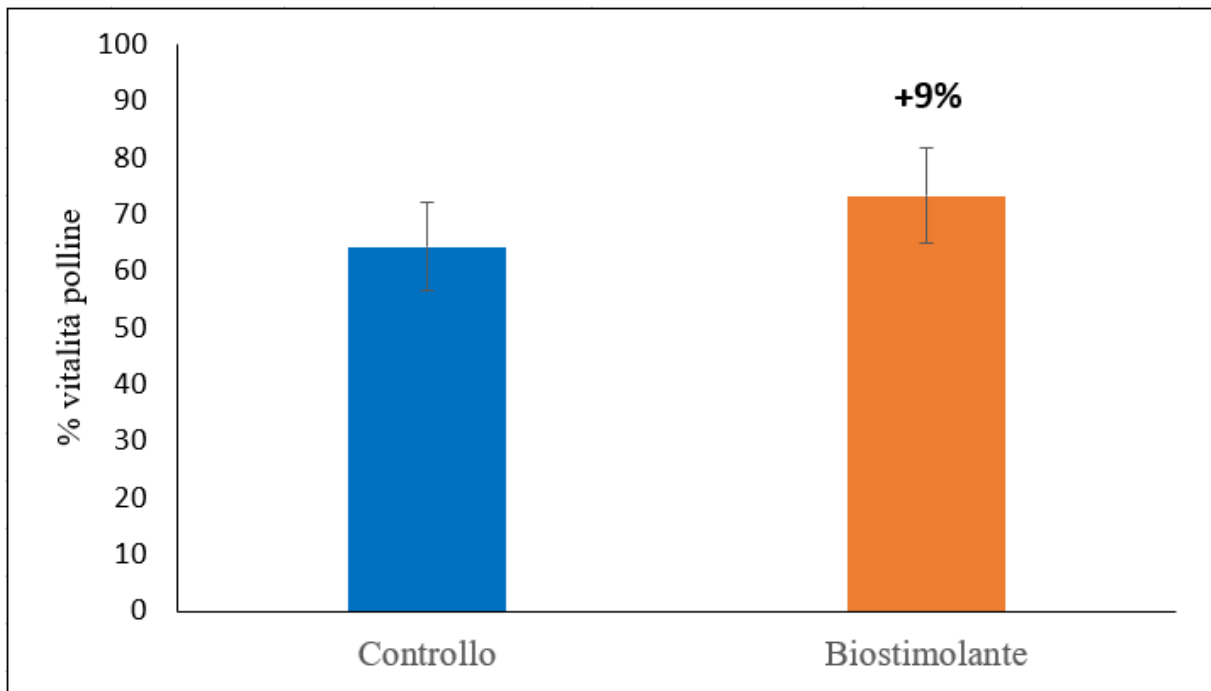


Figura 11. Vitalità del polline (%) nelle piante di controllo e trattate con biostimolante, determinata mediante test TTC. I dati sono espressi come media  $\pm$  errore standard delle repliche biologiche. L'assenza di asterischi indica la mancanza di differenze statisticamente significative con t-test ( $p < 0,05$ ).

Sebbene tale incremento non abbia raggiunto la significatività statistica, il dato risulta coerente con l'assenza di effetti negativi sullo stato fisiologico generale delle piante e suggerisce un possibile effetto del trattamento sui processi riproduttivi, senza alterare l'equilibrio fisiologico della pianta.

### 4.3. Contenuto di zuccheri solubili nelle piante

L'analisi del contenuto di zuccheri solubili ha evidenziato differenze tra le piante di controllo e quelle trattate in funzione dell'organo e dello stadio fenologico considerato (Figura 12). In particolare, nelle piante trattate è stato osservato un contenuto di zuccheri solubili significativamente più elevato nelle foglie, nel frutticino allegato e nel frutto in accrescimento rispetto al controllo ( $p < 0,05$ ).

Negli abbozzi fiorali non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra le due tesi, mentre nel fiore aperto il contenuto di zuccheri solubili è risultato significativamente maggiore nelle piante di controllo rispetto a quelle trattate. L'analisi è stata estesa anche al frutto maturo, nel quale le piante trattate presentano valori di zuccheri solubili superiori rispetto al controllo, sebbene in quest'ultimo si osservi un aumento dei valori rispetto agli stadi precedenti.

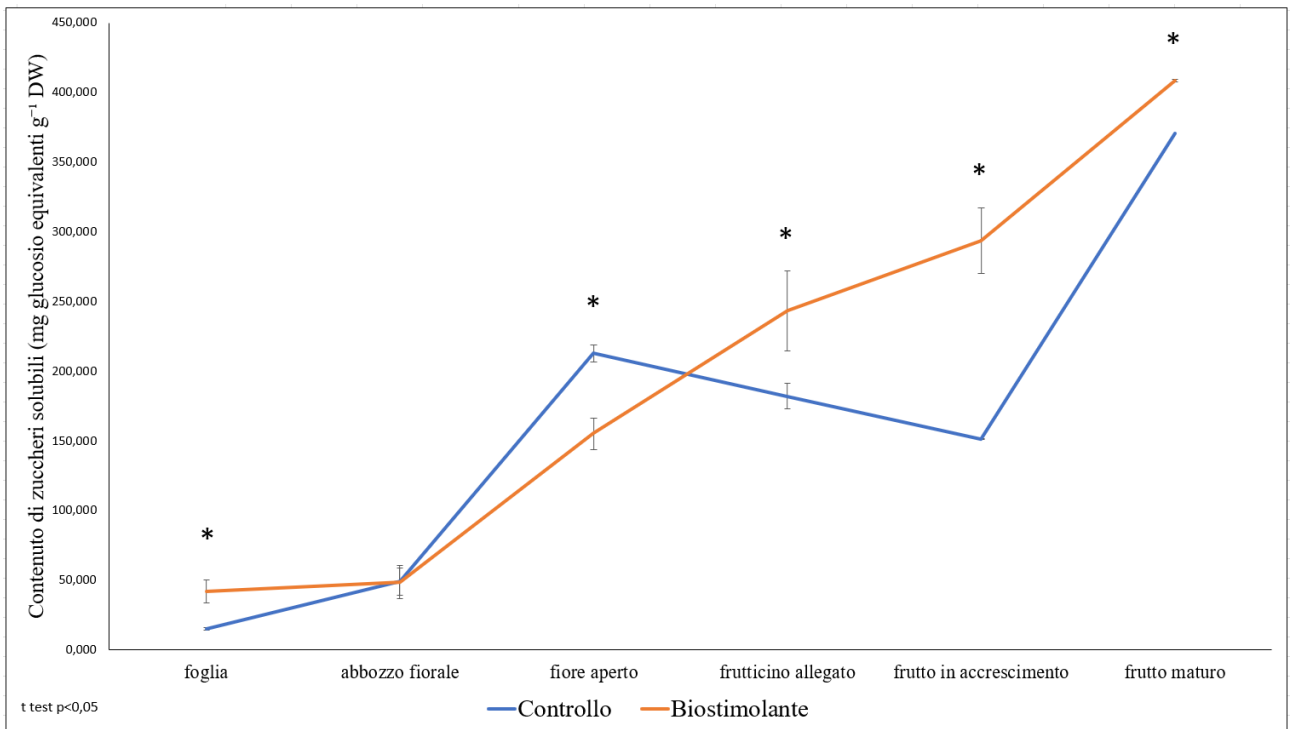


Figura 12. Contenuto di zuccheri solubili (mg glucosio equivalenti g<sup>-1</sup> DW) nelle piante di controllo e trattate con biostimolante in diversi organi e stadi fenologici. Andamento del contenuto di zuccheri solubili nel corso dello sviluppo riproduttivo. I dati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard. L'asterisco indica differenze statisticamente significative con t-test ( $p < 0,05$ ).

Considerando l'andamento complessivo lungo lo sviluppo riproduttivo, nelle piante trattate il contenuto di zuccheri solubili mostra una tendenza all'aumento piú regolare nel tempo, mentre nelle piante di controllo l'andamento risulta piú variabile tra i diversi stadi. Tali differenze suggeriscono una diversa distribuzione degli zuccheri tra gli organi analizzati, con un maggiore accumulo nei frutti rispetto alle strutture fiorali nelle piante trattate.

Ad un aumento del contenuto di zuccheri nelle foglie delle piante trattate non corrisponde un aumento nel contenuto di clorofille, come riportato in Figura 10. Questo dato indica che le differenze osservate nel contenuto di zuccheri non sono direttamente riconducibili a un incremento dei pigmenti fotosintetici.

Nel complesso, i risultati ottenuti evidenziano un effetto del trattamento sull'accumulo di zuccheri solubili nei frutti durante le diverse fasi di sviluppo, effetto che si mantiene anche allo stadio di maturazione.

#### 4.4. Modulazione dell'espressione genica associata ai processi di allegazione

L'analisi dell'espressione genica, ottenuta mediante RT-qPCR, è stata rappresentata mediante heatmap (Figura 13), che riporta i livelli di espressione relativa di diversi geni nei vari organi e

stadi fenologici analizzati. In particolare, sono stati analizzati geni coinvolti in differenti processi fisiologici e molecolari associati allo sviluppo riproduttivo e all'allegagione del frutto, al fine di valutare possibili modulazioni indotte dal biostimolante nei principali pathway regolatori.

Tra questi, sono stati considerati geni coinvolti nel metabolismo e nella segnalazione delle auxine, tra cui i trasportatori di auxina *PIN1*, *PIN2* e *PIN6*, il recettore dell'auxina *TIR1*, l'enzima chiave della biosintesi *YUCCA4*, e i fattori di trascrizione *ARF2A*, *ARF7* e *ARF8*, che mediano la risposta trascrizionale a questo ormone e regolano la distribuzione e la percezione del segnale auxinico.

Sono stati inoltre analizzati geni associati alla biosintesi e alla percezione delle gibberelline, quali *GA3ox*, coinvolto nella biosintesi dell'ormone, e *GID1b*, che codifica per un recettore delle gibberelline, per verificare un possibile coinvolgimento della via gibberellinica nella risposta al trattamento.

Per quanto riguarda il metabolismo delle citochinine, sono stati inclusi *CKX5* e *CKX6*, responsabili della degradazione delle citochinine, al fine di valutare eventuali effetti del trattamento sui processi di divisione cellulare nelle fasi iniziali dello sviluppo del frutto.

Un ulteriore gruppo di geni analizzati è associato ai processi di divisione ed espansione cellulare, tra cui diversi membri della famiglia delle expansine (*CaEXPA1*, *CaEXPA3* e *CaEXPA15*), proteine coinvolte nel rimodellamento della parete cellulare durante la crescita del frutto.

Sono stati inoltre considerati geni coinvolti nel metabolismo e nella segnalazione degli zuccheri, quali *NSGT1*, *XTH5* e *SnRK1*, per indagare il possibile coordinamento tra stato energetico, metabolismo del carbonio e segnali ormonali.

Infine, sono stati analizzati alcuni fattori di trascrizione della famiglia MADS-box, tra cui *FUL2*, *AGL1* e *SEP5*, noti per il loro ruolo nella regolazione dello sviluppo dei tessuti fiorali e della transizione da fiore a frutto.

Nell'heatmap i valori di espressione genica sono mostrati normalizzati come variazione relativa nel campione trattato rispetto al controllo, dove la colorazione rossa indica una up-regolazione del gene, la colorazione blu una down-regolazione, mentre il colore bianco indica l'assenza di variazioni significative nell'espressione genica. Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative tra piante trattate e di controllo ( $p < 0,05$ ).

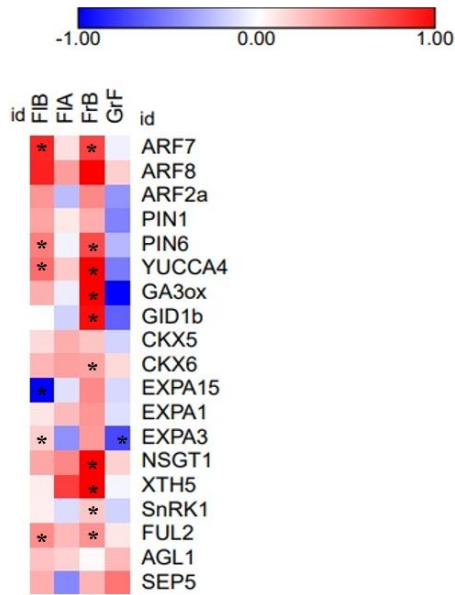


Figura 13. Heatmap della modulazione dell'espressione genica di geni coinvolti nei processi di allegazione nelle piante trattate con il biostimolante rispetto al controllo, in diversi stadi fenologici: abbozzo florale (FIB) fiore aperto (FIA), frutticino allegato (FrB) e frutto in accrescimento (GrF). I dati di espressione, ottenuti mediante RT-qPCR, sono rappresentati mediante scala cromatica dal blu (down-regolazione) al rosso (up-regolazione). Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative tra trattamento e controllo (t-test,  $p < 0,05$ ). La heatmap è stata generata utilizzando il software Morpheus.

Nel complesso, si osserva una marcata modulazione dell'espressione genica in risposta al trattamento, con una prevalente regolazione positiva dei geni coinvolti nei pathway ormonali dell'auxina e delle gibberelline, noti per il loro ruolo chiave nei processi di allegazione e nello sviluppo iniziale del frutto. In particolare, diversi geni appartenenti al pathway dell'auxina (*ARF7*, *PIN6* e *YUCCA4*) risultano up-regolati in specifici organi e stadi fenologici, principalmente nelle fasi comprese tra la fioritura e le prime fasi di sviluppo del frutto.

Anche i geni associati al metabolismo e alla segnalazione delle gibberelline, quali *GA3ox* e *GID1b*, mostrano una regolazione positiva in risposta al trattamento, in particolare nelle fasi successive all'allegazione. Complessivamente, tali pattern di espressione evidenziano una forte risposta dei principali regolatori ormonali coinvolti nella transizione fiore–frutto.

Tra i geni per fattori di trascrizione analizzati, *FUL2* mostra una regolazione positiva in specifici stadi dello sviluppo riproduttivo. Questo gene è noto per agire a valle delle cascate di segnalazione mediate da auxine e gibberelline ed è considerato uno dei principali regolatori della transizione da fiore a frutto.

Per quanto riguarda i processi di trasporto e metabolismo degli zuccheri, si osserva una regolazione positiva di geni associati a tali funzioni (*NSGT1*, *XTH5* e *SnRK1*), in accordo con i risultati ottenuti dalla quantificazione degli zuccheri solubili nei diversi organi (Figura 12). Al

contrario, i geni codificanti per espansine (*EXPA1*, *EXPA3* ed *EXPA15*), coinvolti nei processi di distensione della parete cellulare, risultano prevalentemente down-regolati nelle piante trattate rispetto al controllo. La down-regolazione dei geni per le espansine osservata nelle piante trattate potrebbe riflettere una modulazione temporale dei processi di distensione della parete cellulare nelle fasi iniziali dello sviluppo del frutto. Considerato il tempo di campionamento (24 h dopo il III trattamento), è possibile che il trattamento favorisca prioritariamente processi regolatori e metabolici piuttosto che l'espansione cellulare, che potrebbe avvenire in fasi successive.

## 5. Discussione

La presente discussione intende interpretare gli effetti del biostimolante sull'allegagione del peperone alla luce di un'analisi integrata dei risultati ottenuti a livello fenotipico, fisiologico e molecolare. Considerata la natura complessa del processo di allegagione, regolato dall'interazione tra segnali ormonali, disponibilità di carboidrati e stato fisiologico della pianta, l'approccio multidisciplinare adottato ha permesso di valutare non solo eventuali variazioni produttive, ma anche i meccanismi regolatori sottostanti. Nel complesso, il trattamento non ha determinato modificazioni macroscopiche evidenti né alterazioni dello stato fisiologico generale della pianta. Tuttavia, ha indotto una marcata modulazione dell'espressione genica e del metabolismo degli zuccheri, suggerendo un'azione prevalentemente regolativa piuttosto che strutturale. Tali evidenze indicano che il biostimolante potrebbe agire potenziando i network molecolari e metabolici coinvolti nella transizione fiore-frutto, predisponendo la pianta a una maggiore efficienza nei processi di allegagione.

### 5.1. Effetto del biostimolante sull'allegagione

In piante di peperone trattate con biostimolante si è osservata una tendenza ad un aumento della percentuale di allegagione, seppur questo aumento non sia statisticamente significativo (Figura 9). La mancata significatività statistica potrebbe essere ricondotta alla naturale variabilità biologica che caratterizza il processo di allegagione. Come riportato da Wubs et al., (2009), nel peperone la formazione dei frutti è soggetta a fluttuazioni temporali determinate da dinamiche fisiologiche interne, in particolare dalla competizione tra frutti in accrescimento e dall'equilibrio "source-sink." Tali oscillazioni, riscontrabili anche in condizioni ambientali controllate, contribuiscono ad amplificare la variabilità sperimentale e possono attenuare la capacità di evidenziare differenze statisticamente significative tra trattamenti. In accordo con questa interpretazione, la review di Ezura et al., (2023) evidenzia come l'allegagione sia regolata da una complessa rete ormonale e metabolica, comprendente auxine, gibberelline e segnali zuccherini, caratterizzata da elevata plasticità e sensibilità a stimoli endogeni ed esogeni, elementi che possono accentuare la variabilità inter-pianta nella risposta al trattamento. Dal punto di vista metodologico, la rilevabilità statistica di un effetto dipende dalla potenza sperimentale, strettamente correlata al numero di repliche biologiche, all'ampiezza dell'effetto e al momento di applicazione del trattamento rispetto alle fasi critiche del processo. In fasi fenologiche altamente dinamiche come l'allegagione, una limitata replicazione del trattamento o un disallineamento temporale dell'intervento rispetto agli stadi fenologici sensibili del fiore (come l'antesi) e ai processi riproduttivi ad essi associati (vitalità del polline, fecondazione e

avvio dello sviluppo dell'ovario) possono ridurre la probabilità di rilevare miglioramenti statisticamente significativi nella percentuale di allegagione, pur in presenza di un effetto biologicamente coerente (Lazic, 2018).

## 5.2. Effetto del biostimolante sullo stato fisiologico della pianta e sulla vitalità del polline

L'assenza di differenze nei parametri rilevati con Dualex (I parametri fisiologici analizzati non hanno evidenziato differenze tra le piante trattate e quelle di controllo. In particolare, i valori medi di CCI e SPAD risultano comparabili tra le due tesi, indicando un profilo di pigmenti fotosintetici simile nelle piante trattate e non trattate. Analogamente, i parametri relativi agli antociani e ai flavonoli non hanno mostrato variazioni tra controllo e trattato, con valori sovrapponibili tra le due tesi. Nel complesso, i risultati ottenuti mediante Dualex indicano che l'applicazione del biostimolante non ha determinato alterazioni dello stato fisiologico delle piante nel corso del periodo sperimentale.

Tabella 5) e nel contenuto di pigmenti fotosintetici (Figura 10) tra piante trattate e piante di controllo indica che il trattamento non ha alterato lo stato fisiologico generale della pianta, suggerendo che gli effetti osservati non siano riconducibili a modificazioni dello status nutrizionale o fotosintetico di base. Questo risultato è in linea con quanto riportato in letteratura per i biostimolanti a base di matrici organiche ed estratti di alghe brune, i cui effetti non si traducono necessariamente in incrementi dei parametri fotosintetici primari, ma si esplicano principalmente attraverso una modulazione metabolica e ormonale (Calvo et al., 2014). In particolare, gli estratti di alghe sono noti per contenere composti con attività auxino- e citochinino-simile, capaci di influenzare processi di sviluppo e riproduzione senza alterare in modo marcato la fisiologia fogliare (Craigie, 2011).

In piante trattate con biostimolante rispetto al controllo, la vitalità del polline ha mostrato un incremento del 9% (Figura 11), suggerendo un possibile effetto positivo lieve, sebbene questo aumento non sia statisticamente significativo, probabilmente a causa dell'elevata variabilità biologica. La fase riproduttiva è altamente sensibile a variazioni anche minime dell'assetto ormonale e del metabolismo energetico e ossidativo, che controllano lo sviluppo e la funzionalità del polline, manifestando risposte eterogenee tra individui anche in condizioni controllate (Ezura et al., 2023). Inoltre, gli effetti dei biostimolanti su parametri riproduttivi, quali fertilità e allegagione, risultano spesso dipendenti dal contesto fisiologico e ambientale, con ampiezza dell'effetto variabile (Rouphael & Colla, 2020).

In questo quadro, l'incremento osservato, pur non raggiungendo la soglia di significatività statistica, potrebbe rappresentare un segnale biologicamente coerente con il meccanismo d'azione ipotizzato per il biostimolante, la cui espressione potrebbe risultare amplificata in condizioni di maggiore pressione ambientale o con un disegno sperimentale caratterizzato da più elevata potenza statistica.

### 5.3. Effetto del biostimolante sul contenuto di zuccheri solubili e sulla sink strenght

I risultati mostrati in Figura 12 indicano che il trattamento con biostimolante ha determinato un incremento significativo del contenuto di zuccheri solubili in diversi organi e stadi fenologici nella pianta trattata rispetto al controllo. In particolare, aumenti significativi sono stati osservati in: foglia, frutticino allegato, frutto in accrescimento, frutto maturo e, evidenziando una chiara modulazione del metabolismo carbonioso in risposta al biostimolante. Tale risultato assume particolare rilevanza fisiologica in quanto la disponibilità di carboidrati rappresenta un fattore determinante per la regolazione della crescita e per il successo dell'allegagione. Secondo la definizione classica di "sink strength" (Marcelis, 1996), la capacità di un organo di attrarre assimilati dipende sia dalle sue dimensioni sia dalla sua attività metabolica; un incremento del contenuto zuccherino può pertanto riflettere un potenziamento dell'attività di sink, in particolare a livello dell'ovario nelle fasi immediatamente precedenti e successive all'antesi. La letteratura evidenzia come disponibilità e metabolismo del saccarosio siano strettamente associati al mantenimento dell'ovario e alla progressione del frutto (ossia il processo che porta dal fiore alla formazione del frutto maturo) in specie della famiglia *Solanaceae*, mentre limitazioni nel suo trasporto o nella sua idrolisi possono compromettere l'allegagione (Bertin, 1995). Studi più recenti indicano inoltre che l'attivazione del metabolismo del saccarosio e dei processi di traslocazione degli assimilati rappresenta un passaggio chiave nella transizione da ovario a frutto, fornendo energia e metaboliti necessari alla rapida crescita iniziale del frutto. Inoltre, gli zuccheri non svolgono esclusivamente una funzione energetica, ma agiscono anche come molecole segnale capaci di modulare l'espressione genica e l'attività enzimatica coinvolta nei processi di sviluppo; in particolare, il saccarosio e i suoi prodotti di idrolisi (glucosio e fruttosio) possono regolare direttamente numerosi processi metabolici e di sviluppo attraverso specifiche vie di segnalazione degli zuccheri (Ruan, 2014).

È interessante osservare che nello stadio di abbozzo florale non siano emerse differenze significative nel contenuto di zuccheri solubili tra piante di controllo e trattate con biostimolante (Figura 12). Tale evidenza può essere interpretata considerando la natura stadio-dipendente

della “sink strength”, che aumenta progressivamente durante lo sviluppo dell’organo (Marcelis, 1996). Nelle fasi precoci di differenziazione, l’abbozzo rappresenta infatti un “sink” ancora metabolicamente poco attivo e con limitata capacità di attrazione degli assimilati; l’attivazione del metabolismo del saccarosio e dei sistemi di trasporto zuccherino si intensifica prevalentemente in prossimità dell’antesi e nelle fasi successive all’allegagione (Ruan, 2014). Pertanto, l’assenza di differenze in questo stadio potrebbe riflettere una risposta del trattamento che si manifesta principalmente durante l’attivazione metabolica dell’ovario, piuttosto che nelle fasi iniziali della differenziazione morfologica. Nel complesso, questi risultati suggeriscono che il biostimolante possa favorire l’allegagione attraverso una modulazione dello stato carbonioso e della capacità di *sink* degli organi riproduttivi, coerentemente con il ruolo degli zuccheri e degli enzimi del metabolismo del saccarosio nel sostenere la crescita dell’ovario e la transizione ovario-frutto (Pott et al., 2020).

#### 5.4. Effetto del biostimolante su espressione genica e regolazione ormonale

L’up-regolazione di *ARF7*, *PIN6* e *YUCCA4* sia nell’abbozzo fiorale sia nel frutticino allegato (Figura 13) indica un’attivazione precoce e persistente del pathway auxinico nei tessuti riproduttivi. In particolare, l’aumento dell’espressione di *YUCCA4*, enzima chiave della via biosintetica dell’auxina, suggerisce un’intensificazione della produzione locale dell’ormone. Parallelamente, l’induzione di *PIN6*, coinvolto nel trasporto polare dell’auxina, è compatibile con un rafforzamento del flusso auxinico verso i tessuti dell’ovario, processo noto per essere essenziale nella regolazione dello sviluppo fiorale e dell’avvio della fruttificazione nelle *Solanaceae* (Zhang et al., 2018). L’incremento di *ARF7* riflette inoltre una maggiore attivazione della risposta trascrizionale a valle del segnale auxinico, in accordo con il ruolo degli Auxin Response Factor nella regolazione degli eventi molecolari che accompagnano la transizione fiore–frutto (Zhang et al., 2017).

Questo quadro è coerente con la composizione del biostimolante utilizzato, contenente estratti di alghe brune e matrici organiche di origine vegetale, noti per la presenza di composti con attività auxino-simile e per la loro capacità di modulare i pathway ormonali coinvolti nei processi di sviluppo e riproduzione vegetale (Calvo et al., 2014; Craigie, 2011; Khan et al., 2009). La modulazione osservata già nello stadio di abbozzo fiorale suggerisce inoltre un possibile effetto di priming ormonale, che potrebbe aumentare la competenza dell’ovario alla successiva fruttificazione, in linea con il modello fisiologico secondo cui l’auxina rappresenta il segnale iniziale che innesca lo sviluppo del frutto dopo la fecondazione.

Coerentemente con il ruolo centrale delle gibberelline nelle prime fasi di sviluppo del frutto nel genere *Capsicum*, l'up-regolazione di *GA3ox* e *GID1b* osservata sia nel frutticino allegato (Figura 13) suggerisce un potenziamento coordinato sia della biosintesi sia della percezione del segnale gibberellinico nelle fasi immediatamente successive all'allegagione. *GA3ox* codifica, infatti, per un enzima responsabile della conversione dei precursori inattivi nelle forme bioattive di gibberelline e rappresenta uno degli ultimi passaggi limitanti della via biosintetica. La maggiore espressione di *GA3ox* suggerisce quindi un incremento locale dei livelli di GA attive nel giovane frutto, in linea con quanto descritto per le prime fasi di crescita in *Capsicum*, in cui le gibberelline sostengono i processi di divisione ed espansione cellulare del pericarpo. Questo risultato è coerente con il modello fisiologico secondo cui l'auxina prodotta in seguito alla fecondazione agisce a monte stimolando la biosintesi di gibberelline, che a loro volta promuovono la progressione dello sviluppo dell'ovario verso il frutto.

Parallelamente, l'up-regolazione di *GID1b*, gene codificante per un recettore delle gibberelline, suggerisce un aumento della capacità del tessuto di percepire e trasdurre il segnale ormonale. Studi di espressione in *Capsicum* hanno evidenziato che *CaGID1b* presenta picchi espressivi in prossimità dell'antesi e nelle fasi immediatamente successive all'impollinazione, indicando un ruolo diretto nella regolazione precoce dello sviluppo del frutto. Nel complesso, la concomitante up-regolazione di *GA3ox* e *GID1b* supporta l'ipotesi che il trattamento favorisca un ambiente ormonale pro-crescita, aumentando sia la disponibilità di gibberelline bioattive sia l'efficienza della loro percezione e promuovendo così le prime fasi di accrescimento del frutto, in sinergia con l'attivazione del pathway auxinico precedentemente osservata (Kumar et al., 2021).

Oltre alla modulazione dei pathway ormonali, il trattamento sembra influenzare anche regolatori trascrizionali chiave dello sviluppo riproduttivo, ovvero proteine che controllano l'espressione di specifici geni e ne modulano l'attività nei tessuti o stadi fenologici appropriati. In questo contesto, l'up-regolazione di *FUL2* sia nell'abbozzo fiorale sia nel frutticino allegato suggerisce il coinvolgimento dei network genetici che controllano la transizione da organo fiorale a frutto in accrescimento. *FUL2* codifica, infatti, per un fattore di trascrizione della famiglia MADS-box, ortologo funzionale del gene *FRUITFULL* nel pomodoro, noto per il suo ruolo nella regolazione dello sviluppo dell'ovario, della crescita del frutto e dei processi di differenziamento tissutale (Bemer et al., 2012).

Analisi genomiche e trascrittomiche in *Capsicum* hanno evidenziato che *FUL2* è espresso prevalentemente nei tessuti riproduttivi e nelle prime fasi di sviluppo del frutto (Dubey et al., 2019). L'induzione osservata già nello stadio di abbozzo fiorale suggerisce pertanto

un'attivazione precoce dei programmi genetici che predispongono l'ovario alla crescita post-fecondazione. Considerata la concomitante attivazione dei pathway auxinico e gibberellinico, l'induzione di *FUL2* può essere interpretata come il risultato dell'integrazione tra segnali ormonali e controllo trascrizionale, poiché i fattori MADS-box agiscono come nodi centrali nella rete regolativa dello sviluppo riproduttivo traducendo gli stimoli ormonali in programmi morfogenetici specifici.

Un ulteriore elemento emerge dalla modulazione dei geni associati al metabolismo e al trasporto dei carboidrati. L'up-regolazione di *NSGT1*, *XTH5* e *SnRK1* sia nell'abbozzo florale sia nel frutticino allegato (Figura 13) indica, infatti, una precoce riprogrammazione metabolica dei tessuti riproduttivi in risposta al trattamento, coerentemente con l'aumento degli zuccheri solubili osservato a livello biochimico (Figura 12). In particolare, *SnRK1* (SNF1-related protein kinase 1) è una chinasi conservata che funge da sensore centrale dello stato energetico cellulare e regola il metabolismo del carbonio, coordinando l'allocazione delle risorse verso i tessuti "sink" in condizioni di elevata richiesta metabolica. L'up-regolazione del gene *SnRK1* suggerisce quindi un rafforzamento della "sink strength" dell'ovario e del giovane frutto, in accordo con quanto riportato in letteratura (Hanson & Baena-Gonzalez, 2017).

L'up-regolazione di *NSGT1*, che codifica per una UDP-glycosyltransferase coinvolta nei processi di glicosilazione di metaboliti secondari, descritto in *Capsicum* come altamente espresso nei tessuti floreali e nelle prime fasi di sviluppo del frutto, suggerisce una modulazione dei processi di glicosilazione delle proteine e del metabolismo secondario, con possibili implicazioni nella regolazione dell'omeostasi glucidica e nella stabilizzazione di metaboliti bioattivi. Per quanto riguarda *XTH5*, enzima appartenente alla famiglia delle xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase, la maggiore espressione del gene che lo codifica indica l'attivazione precoce dei meccanismi di rimodellamento della parete cellulare, necessari per predisporre i tessuti alle successive fasi di espansione (Dubey et al., 2019).

Tuttavia, la contemporanea down-regolazione dei geni codificanti per le espansine (*EXPA1*, *EXPA3* ed *EXPA15*) osservata nelle piante trattate con biostimolante a 24 ore dal terzo trattamento (Figura 13) indica che, nella finestra temporale analizzata, l'espansione cellulare non rappresenta ancora il processo dominante. Poiché le espansine sono direttamente coinvolte nella distensione irreversibile della parete cellulare, la loro ridotta espressione, a fronte dell'induzione di geni metabolici e regolatori, suggerisce uno sfasamento temporale tra la fase iniziale di attivazione metabolica e regolativa e la successiva fase di espansione strutturale del tessuto.

Nel complesso, questi risultati supportano un modello in cui il trattamento con biostimolante nella pianta induce, nelle prime 24 ore dopo il terzo trattamento, una fase di “preparazione fisiologica” del tessuto riproduttivo, caratterizzata da rafforzamento della “sink strength”, riorganizzazione del metabolismo glucidico e rimodellamento controllato della parete cellulare. In una fase successiva, tali processi potrebbero tradursi in un incremento più marcato dell’espansione cellulare e della crescita macroscopica del frutto.

## 6. Conclusioni

Nel complesso, i risultati ottenuti da questo studio sperimentale suggeriscono che il trattamento del peperone con biostimolante, applicato a diversi stadi fenologici indicati nella scala BBCH (Tabella 1), non ha alterato la fisiologia di base della pianta, poiché non sono state osservate modificazioni significative nei parametri fisiologici misurati (ad esempio contenuto di clorofilla, indici di flavonoli e antociani, contenuto zuccherino) né nello stato generale dell'apparato vegeto-riproduttivo. Piuttosto, l'effetto osservato è apparso circoscritto ai tessuti riproduttivi e alle prime fasi della transizione fiore–frutto, senza influenzare la crescita vegetativa o la fisiologia fogliare. A livello molecolare, il trattamento ha indotto una modulazione precoce e coordinata dei pathway auxinico e gibberellinico, evidenziata dall'up-regolazione di geni chiave coinvolti nella biosintesi, nel trasporto, nella percezione e nella trasduzione del segnale ormonale. Tale attivazione risulta coerente con i meccanismi noti che regolano l'allegagione in *Capsicum*, nei quali auxine e gibberelline rappresentano i principali promotori della transizione dell'ovario in frutto in accrescimento. Parallelamente, l'incremento dell'espressione di geni associati al metabolismo e alla regolazione degli zuccheri, unitamente all'aumento degli zuccheri solubili rilevato a livello biochimico, indica una maggiore disponibilità e un più efficiente trasporto dei carboidrati verso gli organi riproduttivi. L'aumento di espressione di *SnRK1* suggerisce inoltre un potenziamento della “sink strength” dell'ovario, configurando il giovane frutto come un centro metabolico prioritario per l'allocazione delle risorse.

Nel loro insieme, questi eventi delineano un modello in cui il biostimolante agisce sulla pianta primariamente a livello molecolare e metabolico, predisponendo il tessuto riproduttivo a condizioni favorevoli per la crescita e lo sviluppo del frutto. Il lieve incremento dell'allegagione osservato, seppur non statisticamente significativo, appare coerente con tale assetto fisiologico, suggerendo che l'effetto del trattamento si manifesti inizialmente come una modulazione fine dei circuiti regolatori che governano l'avvio dello sviluppo fruttifero. In conclusione, i dati supportano un modello interpretativo integrato secondo cui il trattamento non agisce come stimolo diretto di crescita macroscopica, ma come modulatore precoce dei network ormonali, trascrizionali e metabolici che controllano l'allegagione nel peperone, ponendo le basi molecolari per un potenziale miglioramento dell'efficienza della transizione fiore–frutto. Questo meccanismo appare compatibile con la natura del biostimolante utilizzato, a base di matrici organiche vegetali ed estratti di alghe brune e lieviti, componenti che la letteratura associa alla presenza di molecole bioattive in grado di modulare segnali ormonali, metabolismo del carbonio e processi di sviluppo riproduttivo nelle piante (Shukla et al., 2019).

## 7. Limiti di studio e prospettive future

Nonostante i risultati ottenuti forniscano indicazioni interessanti sui possibili meccanismi di azione del biostimolante, lo studio presenta alcuni limiti che devono essere considerati nell'interpretazione complessiva dei dati. In primo luogo, l'effetto positivo osservato sull'allegagione non ha raggiunto la significatività statistica. Questo risultato potrebbe essere attribuito alla variabilità biologica tipica dei sistemi vegetali, al numero limitato di repliche sperimentali o alla specifica tempistica dei trattamenti adottati.

Un ulteriore limite è rappresentato dalla scelta di un singolo tempo di campionamento (24 h dopo il terzo trattamento), che ha consentito di osservare una fotografia puntuale della risposta molecolare della pianta, ma non di seguire la dinamica temporale delle modificazioni trascrizionali e metaboliche indotte dal biostimolante. Inoltre, nel presente lavoro non è stata effettuata una quantificazione diretta dei livelli ormonali, che avrebbe permesso di confermare in modo più diretto il coinvolgimento dei pathway dell'auxina e delle gibberelline suggerito dai dati di espressione genica.

Alla luce di questi aspetti, ulteriori studi potrebbero includere analisi time-course, al fine di monitorare nel tempo l'attivazione dei pathway ormonali e metabolici coinvolti nell'allegagione. Parallelamente, l'integrazione di analisi ormonali dirette e di approfondimenti istologici consentirebbe di chiarire più nel dettaglio le modificazioni a livello cellulare, come i processi di divisione ed espansione cellulare dell'ovario nelle prime fasi di sviluppo del frutto. Sarebbe inoltre utile estendere le valutazioni fino alla quantificazione del carico produttivo finale, per verificare se le modulazioni molecolari osservate nelle fasi precoci si traducano in effetti agronomici misurabili.

In questa direzione, il progetto di ricerca è stato successivamente esteso ad altre varietà di peperone, nelle quali sono state testate diverse tempistiche e modalità di trattamento. I risultati preliminari ottenuti in queste prove successive hanno evidenziato effetti significativi anche sull'allegagione, suggerendo che l'efficacia del biostimolante possa dipendere in maniera rilevante dal genotipo e dal momento di applicazione. In questo contesto, i risultati emersi dalla presente sperimentazione hanno fornito indicazioni utili per orientare le scelte sperimentali successive, contribuendo alla definizione di strategie di applicazione più mirate e potenzialmente più efficaci.

## 6. Bibliografia

- Abdalla, M. M. (2013). The potential of *Moringa oleifera* extract as a biostimulant in enhancing the growth , biochemical and hormonal contents in rocket ( *Eruca vesicaria* subsp . *sativa* ) plants. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 5(3), 42–49.
- Ahmad, P., & Wani, M. R. (2013). *Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants Under Changing Environment* (Vol. 1).
- Ahmed, M., Babayola, M., & Bake, I. D. (2024). Role of Horticultural Crops in Food and Nutritional Security : A Review. *Journal of Nutrition and Food Processing*, 7(8).
- Arshad, M., Shaharoon, B., & Mahmood, T. (2008). Inoculation with *Pseudomonas* spp . Containing ACC-Deaminase Partially Eliminates the Effects of Drought Stress on Growth , Yield , and Ripening of Pea ( *Pisum sativum* L . ) \* 1. *Pedosphere: An International Journal*, 18(5), 611–620.
- Asli, S., & Neumann, P. M. (2010). Rhizosphere humic acid interacts with root cell walls to reduce hydraulic conductivity and plant development. *Plant Soil*, 336, 313–322.
- Baltazar, M., Correia, S., Guinan, K. J., Sujeeth, N., Bragança, R., & Gonçalves, B. (2021). Recent Advances in the Molecular Effects of Biostimulants in Plants : An Overview. *Biomolecules*, 11(1096).
- Banjare, R., Nidhi, N., & Sood, A. (2023). Physiological Aspects of Flowering , Fruit Setting , Fruit Development and Fruit Drop , Regulation and their Manipulation : A Review. *Nternational Journal of Environment and Climate Change*, 13(12), 205–224.
- Bano, S., Ashraf, M., & Akram, N. A. (2012). Regulation in some vital physiological attributes and antioxidative defense system in carrot ( *Daucus carota* L . ) under saline stress. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 85(1), 105–115.
- Baral, R., Vainer, A., Melzer, S., Hause, B., & Panda, S. (2025). ‘ Bud to fruit ’— hormonal interactions governing early fruit development. *Journal of Experimental Botany*, 76(22), 6657–6673.
- Bemer, M., Karlova, R., Ballester, A. R., Tikunov, Y. M., Bovy, A. G., Wolters-Arts, M., ... & de Maagd, R. A. (2012). The Tomato FRUITFULL Homologs TDR4 / FUL1 and Aspects of Fruit Ripening. *The Plant Cell*, 24, 4437–4451.
- Benitez-Alfonso, Y., Soanes, B. K., Zimba, S., Sinanaj, B., German, L., Sharma, V., ... & Foyer, C. H. (2023). Enhancing climate change resilience in agricultural crops. *Current Biology*, 33(23).
- Bertin, N. (1995). Competition for Assimilates and Fruit Position Affect Fruit Set in Indeterminate. *Annals of Botany*, 75, 55–65.
- Bin, W. S., Wei, L. K., Ping, D. W., Li, Z., Wei, G., Bing, L. J., Gui, P. B., Jian, W. H., & Feng, C. J. (2012). Evaluation of appropriate reference genes for gene expression studies in pepper by quantitative real-time PCR. *Molecular Breeding*, 30(3), 1393–1400. <https://doi.org/10.1007/s11032-012-9726-7>
- Bons, H. K., & Kaur, M. (2020). Role of plant growth regulators in improving fruit set ,

- quality and yield of fruit crops : a review. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 95(2), 137–146.
- Brown, P., & Saa, S. (2015). Biostimulants in agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 6(671). <https://doi.org/10.1111/mec.12571>
- Bulgari, R., Cocetta, G., Trivellini, A., Vernieri, P., & Ferrante, A. (2015). Biostimulants and crop responses : a review. *An International Journal for Sustainable Production Systems*, 31(1), 1–17.
- Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil*, 383, 3–41.
- Cerdán, M., Sánchez-Sánchez, A., Jordá, J. D., Juárez, M., & Sánchez-Andreu, J. (2013). Effect of commercial amino acids on iron nutrition of tomato plants grown under lime-induced iron deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176(6), 859–866.
- Chaplin, M. H., & Westwood, M. N. (2008). Relationship of nutritional factors to fruit set. *Journal of Plant Nutrition*, 2(4), 477–505.
- Chaves, M. M., Maroco, J. P., & Pereira, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought — from genes to whole plant . *Func Plant Biol Review : Functional Plant Biology*, 30(3), 239–264.
- Colla, G., Roupshael, Y., Canaguier, R., Svecova, E., & Cardarelli, M. (2014). Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. *Frontiers in Plant Science*, 5(448).
- Craigie, J. S. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 371–393.
- Dubey, M., Jaiswal, V., Rawoof, A., Kumar, A., Nitin, M., Satish, S., Kumar, N., Ahmad, I., Islam, K., & Brahma, V. (2019). Genomics Identification of genes involved in fruit development / ripening in Capsicum and development of functional markers. *Genomics*, 111(6), 1913–1922. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.01.002>
- Europeo, D. E. L. P., & Consiglio, D. E. L. (2019). REGOLAMENTO (UE) 2019/1009 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO. *Gazzetta Ufficiale Dell'Unione Europea*, 1–114.
- Ezura, K., Nomura, Y., & Ariizumi, T. (2023). Molecular , hormonal , and metabolic mechanisms of fruit set , the ovary-to-fruit transition , in horticultural crops. *Journal of Experimental Botany*, 74(20), 6254–6268.
- Fernandez-Stark, K., Bamber, P., & Gereffi, G. (2011). The Fruit and Vegetables Global Value Chain ECONOMIC UPGRADING AND WORKFORCE DEVELOPMENT. In *Durham, NC: Duke CGGC*.
- Franzoni, G. (2020). *Mechanisms of action of biostimulants in crops. PhD thesis, University of Bologna*.
- Gao, L., Hao, N., Wu, T., & Cao, J. (2022). Advances in Understanding and Harnessing the Molecular Regulatory Mechanisms of Vegetable Quality. *Frontiers in Plant Science*,

13(836515).

- Hernández-Pérez, T., Gómez-García, M. D. R., Valverde, M. E., & Paredes-López, O. (2020). Capsicum annuum ( hot pepper ): An ancient Latin-American crop with outstanding bioactive compounds and nutraceutical potential . A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 2972–2993.
- Howlett, F. S. (1931). *Factors affecting fruit setting in the Stayman Winesap*. West Virginia Agricultural Experiment Station.
- Karapanos, I. C., Mahmood, S., & Thanopoulos, C. (2008). Fruit Set in Solanaceous Vegetable Crops as Affected by Floral and Environmental Factors. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 2(1), 88–105.
- Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D. M., ... & Prithiviraj, B. (2009). Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(4), 386–399.
- Kulkarni, M. G., Rengasamy, K. R., Pendota, S. C., Gruz, J., Plačková, L., Novák, O., ... & Van Staden, J. (2019). Bioactive molecules derived from smoke and seaweed *Ecklonia maxima* showing phytohormone-like activity in *Spinacia oleracea* L . *New Biotechnology*, 48, 83–89.
- Kumar, A., Kumar, S., Anju, T., & Ramchiary, N. (2021). GENETIC , EPIGENETIC , AND HORMONAL REGULATION OF FRUIT DEVELOPMENT AND RIPENING IN CAPSICUM L . SPECIES. *Annual Plant Reviews*, 4, 295–356.
- Kumar, R., Khurana, A., & Sharma, A. K. (2014). Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *Journal of Experimental Botany*, 65(16), 4561–4575.
- Marcelis. L.F.M. (1996). Sink strength as a determinant of dry matter partitioning in the whole plant. *Journal of Experimental Botany*, 47(Special Issue), 1281–1291.
- Lazic, S. E. (2018). Four simple ways to increase power without increasing the sample size. *Laboratory Animals*, 52(6), 621–629.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes*, 148, 350–382.
- Liu, Q., Yang, J., Wang, X., & Zhao, Y. (2023). Studies on Pollen Morphology , Pollen Vitality and Preservation Methods of *Gleditsia sinensis* Lam . ( Fabaceae ). *Forests*, 14(2), 243.
- Lobell, D. B., Schlenker, W., & Costa-roberts, J. (2011). Climate Trends and Global Crop Production Since 1980. *Science*, 333(6042), 616–620.
- Lucini, L., Roupahel, Y., Cardarelli, M., Canaguier, R., Kumar, P., & Colla, G. (2015). Scientia Horticulturae The effect of a plant-derived biostimulant on metabolic profiling and crop performance of lettuce grown under saline conditions. *Scientia Horticulturae*, 182, 124–133. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.022>
- Marino, S. (2021). Horticultural Crop Response to Different Environmental and

Nutritional Stress. *Horticulturae*, 7(8), 240.

- Mattner, S. W., Wite, D., Riches, D. A., Porter, I. J., Arioli, T., Wite, D., Riches, D. A., Porter, I. J., & The, T. A. (2013). The effect of kelp extract on seedling establishment of broccoli on contrasting soil types in southern Victoria , Australia. *Biological Agriculture & Horticulture*, 29(4), 258–270. <http://dx.doi.org/jnlDOI>
- Mayak, S., Tirosh, T., & Glick, B. R. (2004). Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science*, 166, 525–530.
- Mcatee, P., Karim, S., Schaffer, R., & David, K. (2013). A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development , maturation , and ripening. *Frontiers in Plant Science*, 4, 79.
- Osorio, S., Scossa, F., & Fernie, A. R. (2013). Molecular regulation of fruit ripening. *Frontiers in Plant Science*, 4, 198.
- Petrozza, A., Santaniello, A., Summerer, S., Di, G., Di, D., Paparelli, E., Piaggese, A., Perata, P., & Cellini, F. (2014). Scientia Horticulturae Physiological responses to Megafol ® treatments in tomato plants under drought stress : A phenomic and molecular approach. *Scientia Horticulturae*, 174, 185–192.
- Pott, D. M., Osorio, S., & Dura, S. (2020). Sugar Signaling During Fruit Ripening. *Frontiers in Plant Science*, 11(564917).
- Rajani, J. S., & Shourabh, J. (2017). The Role of Horticultural Crops in Enhancing Nutrient Security. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 6(9), 311–316.
- Reis, A.; Passos, C. P. ., Brandão, E.; Teixeira, N.; Alves, T. ., & Mateus, N.; de Freitas, V. (2025). Revisiting Spectrophotometric Methods in the FoodOmics Era : The Influence of Phytochemicals in the Quantification of Soluble Sugars in Plant-Based Beverages , Drinks , and Extracts. *Foods*, 14, 2889.
- Rouphael, Y., & Colla, G. (2020). Editorial : Biostimulants in Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 11(40).
- Ruan, Y. (2014). Sucrose Metabolism : Gateway to Diverse Carbon Use and Sugar Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 65, 33–67.
- Samuels, J. (2015). Biodiversity of Food Species of the Solanaceae Family: A Preliminary Taxonomic Inventory of Subfamily Solanoideae. *Resources*, 4, 277–322.
- Schiavon, M., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vaccaro, S., Francioso, O., & Nardi, S. (2010). High Molecular Size Humic Substances Enhance Phenylpropanoid Metabolism in Maize ( *Zea mays* L .). *Journal of Chemical Ecology*, 36(6), 662–669.
- Serrani, J. C., Ruiz-Rivero, O., Fos, M., & García-Martínez, J. L. (2008). Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins. *The Plant Journal*, 56, 922–934.
- Sharma, S. S., & Dietz, K. J. (2006). The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, 57(4), 711–726.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571–586.

- Wang, H., Yin, W., Wang, C., & To, K. (2009). Isolation of functional RNA from different tissues of tomato suitable for developmental profiling by microarray analysis. *Botanical Studies*, *50*, 115–125.
- Wani, I. A., Bhat, M. Y., Lone, A. A., & Mir, M. Y. (2010). Unfruitfulness in fruit crops : Causes and remedies. *African Journal of Agricultural Research*, *5*(25), 3581–3589.
- Wubs, A. M., Ma, Y., Supply, H., Group, C., Box, P. O., Hemerik, L., Box, P. O., & Wageningen, A. C. (2009). Fruit Set and Yield Patterns in Six Capsicum Cultivars. *HortScience*, *44*(5), 1296–1301.
- Yeshiwas, Y., Tadele, E., Mohammed, A., & Hu, X. (2026). Impacts of climate change on horticultural systems with focus on socio - economic implications , production and postharvest challenges , and adaptive pathways. *Discover Environment*, *4*(1), 55.
- Yu W, Peng F, Xiao Y, W. G. and, & J, L. (2017). Shaping plant development through the SnRK1 – TOR metabolic regulators. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1856.
- Zhang, H., Ning, C. A. O., Chunjuan, D. O. N. G., & Shang, Q. (2017). Genome-wide Identification and Expression of ARF Gene Family during Adventitious Root Development in Hot Pepper ( *Capsicum annuum* ). *Horticultural Plant Journal*, *3*(4), 151–164. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2017.07.001>
- Zhang, C., Dong, W., Huang, Z., Cho, M., Yu, Q., Wu, C., Yu, C., Vocational, W., & Science, H. (2018). Genome-wide identification and expression analysis of CaLAX and CaPIN gene families in pepper (*Capsicum annuum* L.) under various abiotic stresses and hormones treatments. *Genome*, *61*(2), 121–130.
- Zinn, K. E., Tunc-ozdemir, M., & Harper, J. F. (2010). Temperature stress and plant sexual reproduction : uncovering the weakest links. *Journal of Experimental Botany*, *61*(7), 1959–1968.

## Ringraziamenti

Desidero innanzitutto esprimere la mia più sincera gratitudine alla Prof.ssa Cristina Pagliano per la disponibilità, la guida e i preziosi consigli che mi ha offerto durante lo sviluppo di questo lavoro. È sempre stata estremamente disponibile e puntuale nelle sue risposte, rappresentando per me un importante punto di riferimento lungo questo percorso.

Un sentito ringraziamento va anche al centro di ricerca Green Has Italia S.p.A. per avermi dato l'opportunità di svolgere questo progetto e per il supporto ricevuto durante tutta l'esperienza. In particolare, desidero ringraziare Cristina Campobenedetto: lavorare al suo fianco è stata una vera fortuna. Con competenza e dedizione mi ha guidata e supportata in modo ammirevole, diventando per me un punto di riferimento scientifico e umano. Grazie a lei ho potuto avvicinarmi e appassionarmi al mondo della Fisiologia vegetale, vivendo questa esperienza non solo come un progetto di ricerca, ma anche come un'occasione di crescita personale.

Ringrazio anche tutto il gruppo di ricerca del centro Green Has Italia S.p.A. per la disponibilità e il supporto dimostrati: Valeria, Chiara, Ivano, Alessandro, Adele e Gianluca. Ognuno di loro ha contribuito, con consigli e incoraggiamenti, a rendere questa esperienza ancora più significativa.

Il ringraziamento più grande va ai miei nipoti Edoardo e Camilla, ai quali dedico questa tesi. Sono stati sempre presenti durante il mio percorso e, nei momenti più difficili, bastava un loro sorriso o una risata per ridarmi energia e forza. A loro voglio lasciare un insegnamento: la vita è una montagna russa fatta di salite e discese. Per godere dei momenti più belli, bisogna affrontare con determinazione e fiducia anche le sfide e le difficoltà. Solo così si dà vero valore ai traguardi conquistati.

Vorrei poi ringraziare la mia famiglia, fonte inesauribile di amore e valori. In primo luogo, il mio compagno, Nicola, otto anni insieme di crescita, comprensione e affetto; i miei genitori, per avermi sempre trasmesso determinazione e passione per la vita; mia nonna, che mi ha cresciuta come un'altra figlia, insegnandomi con il suo esempio; mia sorella Veronica e mio fratello Andrea, per la complicità e l'affetto; mia cognata Marilena, che considero una sorella per scelta; e la mia adorata nipote Noemi, portatrice di luce e gioia. Un ringraziamento particolare va anche a mia zia, per il sostegno e la fiducia reciproca in questi anni.

Infine, desidero ringraziare i miei amici più cari, senza nominarli: loro sanno quanto sia grata di averli nella mia vita. La propria persona è, in parte, lo specchio delle frequentazioni e degli affetti che coltiviamo, e io ho avuto la fortuna di circondarmi di persone meravigliose. Così come la mia famiglia, anche loro fanno parte di questo percorso di vita e contribuiscono ogni giorno a renderlo più ricco e significativo.

Ringraziare tutte queste persone è, in fondo, come ringraziare me stessa: sono chi sono anche grazie a loro. Ogni sostegno, incoraggiamento e insegnamento ricevuto ha contribuito a far nascere la mia determinazione e a rendermi la persona che sono oggi. A tutti loro va la mia più profonda riconoscenza.