



Università degli Studi della Tuscia di Viterbo

Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali

(DAFNE)

Corso di Dottorato di Ricerca in

Scienze e Tecnologie per la gestione forestale ed ambientale-XVIII ciclo

Curriculum: Vivaistica forestale e conservazione delle biodiversità

Studio delle variazioni morfometriche e biochimiche di alcune specie forestali mediterranee sottoposte a differenti tipologie di diodi ad emissione luminosa

(s.s.d. AGR/05)

Dottoranda:

Maria Raffaella Ortolani

Tutor:

Prof. Bartolomeo Schirone

Coordinatore del corso:

Prof. Bartolomeo Schirone

Co-tutor:

Prof.ssa Stefania Astolfi

28 Giugno 2016

Sommario

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 La biodiversità	1
1.2 La biodiversità forestale	4
1.3 Gli ecosistemi mediterranei	7
1.4 La vivaistica forestale	8
1.4.1 La storia della vivaistica forestale italiana	8
1.4.2 Le finalità del vivaismo forestale	10
1.4.3 Inquadramento legislativo	12
1.5 Influenza dei diodi ad emissione luminosa (LED) sulle specie vegetali	15
1.6 I Progetti di Ricerca Europei <i>Regen Forest</i> e <i>Zephyr</i>	18
1.7 Le specie botaniche oggetto di studio	21
1.7.1 <i>Arbutus unedo</i> L.	21
1.7.2 <i>Quercus ilex</i> L.	23
1.7.3 <i>Myrtus communis</i> L.	24
1.7.4 <i>Punica granatum</i> L.	25
1.7.5 <i>Fagus sylvatica</i> L.	26
1.8 Scopo della tesi	28
2. MATERIALI E MOTODI	31
2.1 Preparazione dei semi	31
2.1.1 <i>Arbutus unedo</i> L.	31
2.1.2 <i>Quercus ilex</i> L.	32
2.1.3 <i>Myrtus communis</i> L.	33
2.1.4 <i>Punica granatum</i> L.	33
2.1.5 <i>Fagus sylvatica</i> L.	34
2.2 Contenitori e substrato di crescita	35
2.3 Condizioni di allevamento	36
2.3.1 <i>Regen forest</i>	36
2.3.2 <i>Il Prototipo</i>	38
2.3.2 <i>Zephyr</i>	39
2.4 Analisi morfometriche	42
2.5 Analisi biochimiche	43
2.5.1 Estrazione degli enzimi	43
2.5.2 Determinazione del contenuto di clorofilla totale e carotenoidi nelle foglie	43
2.5.3 Determinazione del contenuto di proteine	44
2.5.4 Determinazione dell'attività dell'enzima Nitrato Riduttasi	44

2.5.5 Determinazione della Glutammina Sintetasi (GS)	45
2.5.6 Determinazione del contenuto di malondialdeide (MDA)	45
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	47
3.1 <i>Arbutus unedo</i> L.....	47
3.1.1 Allevamento in camere di crescita tradizionali.....	47
3.1.2 Allevamento all'interno del Prototipo	54
3.1.3 Allevamento in serra.....	62
3.2 <i>Quercus ilex</i> L.....	71
3.2.1 Allevamento in ambiente controllato	71
3.2.2 Allevamento in serra.....	80
3.3 <i>Myrtus communis</i> L.....	84
3.3.1 Allevamento in ambiente controllato	84
3.3.2 Allevamento in serra.....	93
3.4 <i>Punica granatum</i> L.....	97
3.4.1 Allevamento in ambiente controllato	97
3.4.2 Allevamento in serra.....	106
3.5 <i>Fagus sylvatica</i> L.	110
3.5.1 Allevamento in ambiente controllato	110
3.5.2 Allevamento in serra.....	119
3.6 Trasferimento in campo aperto.....	123
3.7 Discussione	126
4. CONCLUSIONI.....	134
5. BIBLIOGRAFIA.....	137

Riassunto

La necessità di garantire il successo dei programmi di restauro ambientale e di rimboschimento contribuisce a incrementare la richiesta di piante di alta qualità necessarie per la riuscita degli interventi effettuati. A tal fine, obiettivo principale della vivaistica forestale è la produzione di piante in grado di offrire le maggiori garanzie d'attecchimento, di adattamento e di rapido accrescimento. Pertanto, nuove metodologie di allevamento e l'impiego di nuove tecnologie potrebbero contribuire al miglioramento della qualità e quantità delle piantine forestali.

Recentemente nel settore della vivaistica forestale è stata introdotta la fase di pre-coltivazione, che prevede la produzione sostenibile di piantine forestali in camere di crescita dotate di luci artificiali, per un periodo piuttosto breve ma sufficiente a garantire un'ottima germinabilità dei semi e il successivo sviluppo delle specie coltivate. Fino ad oggi come fonte luminosa sono state utilizzate le luci fluorescenti. Tuttavia, diodi ad emissione luminosa (LED) sono stati recentemente proposti come un interessante tecnologia alternativa a basso costo per la crescita delle piante in ambiente controllato. Il vantaggio principale dei LED è la possibilità di impostare una specifica lunghezza d'onda in modo da regolare lo spettro luminoso a seconda delle esigenze della pianta.

Obiettivo della presente ricerca è stato quello di analizzare le risposte morfometriche e fisiologiche di piante di *Arbutus unedo* L., *Quercus ilex* L., *Myrtus communis* L., *Punica granatum* L. e *Fagus sylvatica* L. allevate in camere di crescita e sottoposte a differenti diodi ad emissione luminosa, confrontando i risultati con quelli ottenuti dalle stesse specie allevate con tradizionale luce fluorescente. Durante il periodo di allevamento sono stati valutati alcuni parametri morfometrici quali: altezza fusto, diametro fusto, peso fresco e secco di fusto radici e foglie e area fogliare. Inoltre, sono stati analizzati il contenuto totale di clorofilla e di β -carotene, l'attività di due enzimi chiave coinvolti nell'assimilazione dell'azoto (nitrato reductasi e glutammina sintetasi) e, infine, la risposta delle piante al fotodanneggiamento valutando il livello di concentrazione della malondialdeide (MDA).

Al termine del periodo di pre-coltivazione le piante sono state trasferite in serra per una stagione vegetativa per valutare i meccanismi di risposta delle piante quando esposte alla luce naturale. Infine, al termine del periodo trascorso in serra le piante di *Quercus ilex* L., sono state trapiantate in campo aperto per verificarne l'effettiva capacità di attecchimento.

I risultati della ricerca hanno mostrato l'efficacia delle luci LED nel sostenere lo sviluppo delle piante in ambiente artificiale. Nel successivo passaggio in serra e in pieno campo, le specie forestali allevate con i diodi ad emissione luminosa hanno mostrato una buona ripresa vegetativa indicando, quindi, che le condizioni adottate durante la fase di pre-coltivazione sono state idonee. I risultati ottenuti

suggeriscono che l'introduzione dei LED nella fase di pre-coltivazione si presenta come una valida alternativa alle lampade fluorescenti.

Inoltre, durante il periodo della ricerca è stato sviluppato un nuovo modello di camera di crescita (prototipo) che possa conciliare la necessità di un'alta produzione di piantine con un basso consumo energetico.

Il prototipo è costituito da dieci ripiani in movimento rotatorio e si avvale per l'illuminazione di tre lampade a luci LED con spettro luminoso di nuova generazione. Un computer PLC è utilizzato per impostare le condizioni di allevamento (temperatura, fotoperiodo e intensità luminosa) e controllare l'irrigazione automatica. Questo lavoro ha proposto di confrontare l'applicazione di tradizionali camere di crescita con illuminazione a LED con l'innovativa camera di crescita, utilizzando il corbezzolo come pianta modello. Per valutare gli effetti della crescita delle piante all'interno del prototipo, rispetto ad una tradizionale camera di crescita, sono stati valutati gli stessi parametri di crescita precedentemente descritti. Successivamente le piantine sono state trasferite in serra per una stagione vegetativa.

I risultati hanno mostrato che sia il contenuto di clorofilla che di β -carotene era superiore nelle piante allevate nel prototipo rispetto al contenuto dei due pigmenti osservati nel corbezzolo allevato nella camera di crescita tradizionale. Inoltre, i livelli di MDA erano inferiori nelle piante di corbezzolo coltivate nel prototipo, suggerendo che la luce pulsata generata dalla rotazione degli scaffali molto probabilmente riduce il fotodanneggiamento.

In conclusione, l'alto numero di piante ottenute, equivalente a quello di cinque tradizionali camere di crescita, il risparmio energetico e l'elevata meccanizzazione del prototipo lo fanno ritenere una tecnologia innovativa (o innovazione tecnologica) promettente per il miglioramento qualitativo e quantitativo della produzione vivaistica forestale.

Abstract

The need to ensure the success of environmental restoration and reforestation programs contributes to increase the request for high quality plants. To this end, the purpose of the forest nursery is the production of plants with higher capability of engraftment, adaptation and rapid growth. Therefore, new breeding methods and new technologies could surely improve the quality and quantity of the forest seedlings.

Recently, it has been introduced the pre-cultivation phase which provides a sustainable production of forest seedlings in growth chambers with artificial lights for a short period, but sufficient to guarantee a high seed germination and development of the species.

Fluorescent light is typically used as light source in plant growth chambers. However, light emitting diodes (LEDs) have been recently proposed as an attractive low-cost alternative technology for plant growth in controlled environment. Major advantage of LEDs is wavelength specificity, that allows to adequately adjust the spectra according to plant needs.

Aim of this research was to analyse the morphometric and physiological responses of *Arbutus unedo* L., *Quercus ilex* L., *Myrtus communis* L., *Punica granatum* L. and *Fagus sylvatica* L. plants cultivated in growth chambers and exposed to different LED lights, comparing the results with those obtained from the same species grown under fluorescent lamps. During the period in growth chamber were evaluated morphometric parameters such as: stem height, stem diameter, stem, roots, leaves fresh and dry weight, and leaves area. In addition, were analysed the total content of chlorophyll and β -carotene, the activity of two enzymes involved in the assimilation of N (nitrate reductase and glutamine synthetase) and, finally, the plant response to photodamage evaluating the concentration of malondialdehyde (MDA).

At the end of the pre-cultivation period, the plants were transferred in the greenhouse for one season, to evaluate the response mechanisms of the plants when exposed to natural light. Finally, at the end of the period in the greenhouse *Quercus ilex* L plants were transplanted in the open field to verify the capacity of engraftment.

The research showed the effectiveness of LED lights to support the growth and the development of plants in artificial environment. The next step in the greenhouse and in the open field showed good results for the plants cultivated under light emitting diodes, suggesting that the conditions adopted during the pre-cultivation have been appropriate. The results indicate that the introduction of LEDs in the pre-cultivation phase could be good alternative to fluorescent lamps.

Furthermore, during the research period it has developed an experimental growth chamber (prototype) able to reconcile the need of seedlings high production with a low energy

consumption. The prototype consists of 10 shelves running under three LED lamps. A PLC control is used to set the experimental conditions (temperature, photoperiod and light intensity) and to control the automatic irrigation. The aim was to compare the application of traditional growth chambers with LED lighting with innovative growth chamber (prototype) using strawberry tree as model plant. To evaluate the effects of the growth of forest seedlings in the Prototype, compared to a traditional growth chamber, it has been evaluated the same growth parameters previously described. Thereafter, the seedlings were transferred to the greenhouse for one growing season.

Results showed that both chlorophyll and β -carotene contents were higher in plants grown in the prototype than in the traditional growth chamber. Furthermore, the MDA levels were lower in myrtle plants cultured in the prototype, suggesting that pulsed light due to the shelves' rotation most likely reduces photodamage. Finally, the prototype performance, in terms of number of plants obtained (equivalent to five traditional growth chambers), energy saving and high mechanization seems to point out such a technology as a promising innovation for the quali-quantitative improvement of plants production in forest nursery.

1. INTRODUZIONE

1.1 La biodiversità

Il termine diversità biologica, o biodiversità, esprime l'insieme delle varietà di specie vegetali ed animali e degli ecosistemi presenti nel nostro pianeta, ed è frutto delle interazioni tra gli esseri viventi nonché dell'evoluzione naturale dei complessi ecologici. Sebbene l'estinzione delle specie sia un fenomeno naturale l'intervento dell'uomo con deforestazioni, urbanizzazione, incendi, eccessivo sfruttamento del territorio, inquinamento ambientale e introduzione di specie invasive non autoctone ha amplificato enormemente questo fenomeno. Come conseguenza di ciò, si assiste ad una riduzione delle risorse naturali concetto di fondamentale importanza se si considera che la diversità biologica non è una risorsa rinnovabile. I risultati di queste forme di perdita di biodiversità sono certamente molto gravi considerando che le numerose specie di piante, animali e di microrganismi sono fonte potenziale di ricchezza poiché forniscono all'uomo prodotti di importanza sociale ed economica fondamentali per il nostro benessere (Bonalberti, 2003). La biodiversità fornisce, infatti, all'economia e alla nostra società dei veri e propri servizi indispensabili, i cosiddetti servizi ecosistemici, senza i quali verrebbero compromessi la qualità della vita, la competitività economica, l'occupazione e la sicurezza.

Un'importante svolta nella diffusione del concetto di diversità biologica avviene a seguito della Conferenza di Rio de Janeiro del 1992, convocata dalle Organizzazioni delle Nazioni Unite (ONU), finalizzata ad anticipare, prevenire e combattere le cause di significativa riduzione o perdita della biodiversità. Nel corso di tale Conferenza, è stato redatto il testo della Convenzione sulla Diversità Biologica (o Biodiversità) che il nostro Paese ha sottoscritto nel 1993 e a cui hanno aderito finora circa 170 Paesi. L'iniziativa presa dall'ONU di organizzare la Conferenza mondiale di Rio scaturiva dalla sempre più ferma consapevolezza che le risorse biologiche, come sopra detto, rivestono un ruolo fondamentale nello sviluppo sociale ed economico dell'umanità (Bonalberti, 2003).

Oltre alla Convenzione sulla Biodiversità, alla Conferenza di Rio sono stati redatti altri importanti accordi, fra cui:

- l'*Agenda 21*: piano di azione per il ventunesimo secolo, il cui scopo è far sì che i piani di sviluppo industriale, agricolo, energetico, dei trasporti, del turismo, della pesca e dell'uso del territorio vengano redatti mettendo in primo piano gli aspetti ambientali.
- L'istituzione della "*Commissione per lo sviluppo sostenibile*" con il compito di controllo sulla conservazione dell'ambiente a livello mondiale. La Commissione ha istituito al suo interno un "*Comitato internazionale per le Foreste*" avente il compito di incoraggiare una convenzione mondiale per la conservazione delle foreste.

- La “*Convenzione sul cambiamento climatico*” che vincola i Paesi firmatari a redigere programmi nazionali per il contenimento delle emissioni gassose responsabili del cambiamento climatico.
- La “*Convenzione per la lotta alla desertificazione*” per contrastare il processo di desertificazione che riguarda molti Paesi tra le cui cause, sicuramente, vi sono le attività umane e le variazioni climatiche.

Per il nostro Paese la Conferenza di Rio ha rappresentato il trampolino di lancio per lo sviluppo di un’ampia serie di norme nazionali e regionali che tutelano il vasto patrimonio di biodiversità che va a caratterizzare il territorio italiano. Queste nuove disposizioni rappresentano un’evoluzione del criterio di conservazione della biodiversità che non si limita solamente ad elencare le specie da proteggere, ma richiede anche l’elaborazione di strategie per la conservazione della diversità biologica e lo sviluppo sostenibile. Tra queste prescrizioni alcune delle più significative sono state:

- Legge 23 marzo 2001, n. 93 “*Disposizioni in campo ambientale*;
- Legge 7 febbraio 1992, n. 150 che rappresenta la disciplina applicativa in Italia della Convenzione sul commercio internazionale delle specie animali e vegetali in via di estinzione e del Regolamento (CEE) n. 3626/82 e s.m.i., nonché delle norme per la commercializzazione e la detenzione di esemplari vivi di mammiferi e rettili che possono costituire pericolo per la salute e l’incolumità pubblica;
- Legge 11 febbraio 1992, n. 157 e s.m.i. che detta le norme per la protezione della fauna selvatica omeoterma e per il prelievo venatorio. La Legge recepisce anche la Direttiva Uccelli (79/409/CEE) sulla protezione degli uccelli selvatici.
- Decreto del Presidente della Repubblica 8 settembre 1997 n. 357, successivamente modificato e integrato dal DPR 12 marzo 2003, n.120 che rappresentano il recepimento della Direttiva Habitat (43/92/CEE) con la quale la conservazione della biodiversità nel territorio dell’Unione Europea viene garantita attraverso un sistema di aree protette denominata Rete Natura 2000, destinate alla tutela degli habitat naturali e seminaturali e delle specie animali e vegetali indicati negli allegati I e II della Direttiva Habitat e delle specie di cui all’allegato I della Direttiva Uccelli.
- Decreto del Ministero dell’Ambiente e della Tutela del Territorio del 3 settembre 2002: “*Linee guida per la gestione dei siti Natura 2000*”.

Nel corso del 2010, dichiarato dall’Assemblea Generale delle Nazioni Unite “*Anno Internazionale della Biodiversità*”, è stata avviata a livello internazionale la revisione degli strumenti che consentiranno di arrestare la perdita di biodiversità e dei servizi ecosistemici che da essa derivano portando alla formulazione di un Piano Strategico per il decennio 2011-2020.

Il Piano Strategico ha come scopo fondamentale l'avvio di azioni urgenti e efficaci per contrastare la perdita di biodiversità sostenendo gli ecosistemi in modo da recuperare i danni subiti.

Ulteriore passo in avanti viene fatto con la Comunicazione del maggio 2011 *“La nostra assicurazione sulla vita, il nostro capitale naturale: una Strategia europea per la biodiversità verso il 2020”* (Bruxelles, 03 maggio 2011), con la quale la Commissione Europea lanciò la nuova Strategia per proteggere e migliorare lo stato della biodiversità in Europa nel decennio successivo. Tale Strategia prevede il raggiungimento di sei obiettivi incentrati sui fattori principali considerati responsabili della perdita di biodiversità in modo da ridurre la pressione che questi esercitano sulla natura e sui servizi ecosistemici. Entro il 2050, con lo scopo di evitare catastrofici mutamenti legati alla perdita di diversità ecologica, il patrimonio di biodiversità e i servizi ecosistemici da essa offerti saranno protetti, valutati e opportunamente ripristinati (Commissione Europea 2011).

I sei Obiettivi prioritari sono:

1. favorire l'attuazione della normativa in materia ambientale;
2. ripristinare gli ecosistemi;
3. incentivare l'agricoltura e la forestazione sostenibili;
4. incentivare la pesca sostenibile;
5. combattere le specie aliene invasive;
6. contribuire a bloccare la perdita di biodiversità a livello globale.

In questo contesto internazionale, l'Italia si è organizzata in modo da garantire un'integrazione fra gli obiettivi di sviluppo del Paese e la tutela degli ecosistemi nazionali, formulando una Strategia Nazionale per la Biodiversità. La Struttura della Strategia è articolata attorno a tre tematiche principali:

1. biodiversità e servizi ecosistemici: la diversità biologica, oltre al suo valore intrinseco, è importante anche perché fonte per l'uomo di beni, risorse e dei cosiddetti servizi ecosistemici indispensabili per la sopravvivenza e fondamentali per la costruzione dell'economia delle nazioni. Tali servizi ecosistemici devono essere gestiti in modo da garantirne la funzionalità nel medio-lungo periodo, in un'ottica di conservazione e valorizzazione.
2. biodiversità e cambiamenti climatici: per contrastare gli effetti delle alterazioni climatiche sulla biologia, fenologia, crescita e distribuzione delle specie e sulla composizione degli ecosistemi in Italia, sia naturali che semi-naturali e agricoli (Maracchi *et al.*, 2005; Thuiller, 2007).
3. biodiversità e politiche economiche: come precedentemente detto, gli attuali modelli di produzione e di consumo globali dipendono in larga parte dalla biodiversità e dai servizi ecosistemici da essa derivanti. Le differenti politiche di sviluppo possono avere influenze

negative sulla resistenza degli ecosistemi naturali e semi-naturali per cui, risulta necessario intraprendere azioni che tengano conto di un'adeguata conservazione della biodiversità e dei conseguenziali servizi ecosistemici.

L'attuazione della Strategia Nazionale per la Biodiversità richiede un approccio multidisciplinare. Per tale motivo è necessaria una collaborazione tra i gruppi politici e le amministrazioni centrali e regionali con il supporto del mondo accademico, raccogliendo le richieste dei portatori di interesse.

1.2 La biodiversità forestale

Gli ecosistemi forestali sono sistemi dinamici e complessi in cui gli individui mantengono elevata la variabilità intra-specifica sia attraverso l'impollinazione incrociata che garantisce l'eterogeneità genetica, sia attraverso una efficiente dispersione di polline e semi (Ducci, 1999). Questi meccanismi hanno contribuito a rendere le piante forestali gli organismi viventi a più alta variabilità genetica tra tutti quelli esistenti (APAT, 2003).

La tutela della biodiversità vegetale è disciplinata da trattati e convenzioni internazionali, da direttive e regolamenti comunitari e da leggi a carattere nazionale e regionale. Tra queste troviamo:

- Convenzione di Washington-CITES (1973) *“sul commercio internazionale delle specie minacciate di estinzione”*, adottata con il Reg. (CE) n. 338/1997 dall'Unione Europea e ratificata in Italia con legge 19 dicembre 1975, n. 874. Nella convenzione vengono elencate le specie in pericolo di estinzione che sono o possono essere danneggiate dal commercio e le specie che pur non essendo attualmente in pericolo di estinzione, potrebbero esserlo in futuro qualora il commercio di esse non sia sottoposta a regolamentazione.
- Convenzione di Berna *“sulla protezione della vita selvatica e dell'ambiente naturale in Europa”*, firmata dagli stati membri nel 1979 e ratificata dall'Italia nel 1981 (Legge n. 503/81). La Convenzione di Berna riporta l'elenco delle specie di flora selvatiche protette, per le quali è vietata la raccolta, la collezione, il taglio e lo sradicamento intenzionale.
- Prima Conferenza Interministeriale per la Protezione dei Boschi in Europa (Strasburgo 1990), che ha affrontato il tema della conservazione delle risorse genetiche forestali ed ha sollecitato la nascita di strategie comuni a livello europeo, tenendo conto del carattere transfrontaliero delle risorse genetiche.
- Direttiva 92/43/CEE relativa alla conservazione degli habitat naturali e seminaturali della flora e della fauna selvatica. Rappresenta il principale strumento per la protezione delle specie di interesse comunitario. La Direttiva è stata recepita in Italia con il DPR 357/92.

- Direttiva 1999/105/CE relativa alla commercializzazione dei materiali forestali di moltiplicazione. Recepita in Italia con il Decreto Legislativo n. 386, approvato alla fine del 2003.
- DM 22 dicembre 1992 “*Metodi ufficiali di analisi per le sementi*”. I metodi ufficiali di analisi per le sementi (Ministero Agricoltura e Foreste, 1993) costituiscono le norme con cui in Italia si determina la qualità dei semi di specie erbacee, arboree, arbustive, floricole e officinali, siano esse coltivate o meno. Nell'allegato al decreto sono illustrati i metodi di campionamento, l'analisi della purezza, il test di germinabilità (con la specifica delle condizioni a cui devono essere condotte le prove a seconda delle specie), la determinazione della vitalità con saggio colorimetrico, il calcolo dell'umidità dei semi, la determinazione del peso di 1000 semi e varie altre prove.

A livello nazionale, in Italia, manca una legge organica di tutela della flora, poiché lo Stato ha demandato alle Regioni le funzioni relative alla protezione del patrimonio naturale e le funzioni amministrative riguardanti gli interventi per la protezione della natura. Le uniche norme a livello nazionale per la difesa della flora sono il Regio Decreto n. 3267 del 1923 di riordino e riforma della legislazione dei boschi e terreni montani detta anche “*Legge Forestale*”, la legge a tutela dell'olivo (Legge 144/51 e DPR 10/06/1955) e la legge 06/01/1931 per la “*Disciplina della coltivazione, raccolta e commercio delle piante officinali*”.

Il concetto di biodiversità può essere inteso a più livelli: diversità all'interno di popolazione, di singola specie, di ecosistema e di paesaggio. In generale, la percentuale di variabilità genetica definisce il grado di adattabilità di una specie nei confronti delle variazioni climatiche ed ambientali. Anche per le specie forestali, poiché individui continuamente sottoposti a fattori di stress, un'ampia diversità genetica è indispensabile. Infatti, la comparsa di un nuovo fitofago oppure i cambiamenti climatici potrebbero avere effetti negativi sulle piante se tutti gli individui appartenenti ad una popolazioni risultassero omogenei (APAT, 2003).

Il progressivo deterioramento degli ecosistemi forestali costituisce una minaccia alla loro sopravvivenza e, soprattutto, il fenomeno di erosione genetica rappresenta uno dei rischi più imminenti per la sopravvivenza delle foreste. La continua distruzione degli habitat naturali in seguito ad interventi antropici minaccia la biodiversità forestale biologica. Inoltre, da tenere in considerazione è la continua perdita di popolazioni autoctone a seguito di inquinamento genetico causato dall'introduzione di germoplasma di specie aliene (APAT, 2003). Appare quindi fondamentale salvaguardare la biodiversità degli ecosistemi forestali, cercando di analizzare i processi che la influenzano negativamente e le conseguenze di una sua eventuale riduzione.

Le tecniche che possono essere impiegate per la conservazione delle risorse genetiche forestali sono principalmente la conservazione *in situ* (ossia nel luogo di origine) ed *ex situ* (ossia fuori dal luogo di origine). E' ormai certo che le due tecniche non possono avere efficacia se non prevedono di essere utilizzate in maniera correlata (Ducci, 1999). Infatti, la conservazione *ex situ* (banche genetiche, collezioni, orti botanici, ecc.) si rende indispensabile in quei casi in cui la conservazione *in situ* (riserve integrali, ecc.), è di difficile realizzazione.

La conservazione *ex situ* viene attuata principalmente attraverso banche del germoplasma che ad oggi hanno provveduto a conservare per lo più specie di interesse alimentare. Recentemente, tuttavia, si sta assistendo alla diffusione di banche del germoplasma dedicate alla conservazione della flora rara, minacciata, endemica e protetta, e di tutte quelle entità considerate fondamentali per la salvaguardia della biodiversità (ISPRA, 2010). Lo scopo è anche quello di rendere disponibile materiale vegetale di provenienza certificata per interventi di restauro del territorio, oltre che di preservare la diversità genetica in sé. Tuttavia, per fornire soluzioni concrete che coniughino le esigenze di tutela e conservazione del patrimonio forestale con quelle di tipo produttivo è necessaria la collaborazione delle politiche di protezione ambientale con quelle economiche, industriali ed agricole.

Nel nostro Paese è ancora possibile assistere ad una diffusa e limitata considerazione del valore delle risorse genetiche e di una loro corretta gestione, soprattutto, nell'ambito della vivaistica forestale. Infatti si sta acquisendo sempre più coscienza del fatto che anche la filiera produttiva del vivaismo forestale influisce sulla biodiversità, in quanto la scelta dei popolamenti da cui raccogliere il seme andrà a determinare la ricchezza genetica intraspecifica che si intende salvaguardare. Inoltre, anche le stesse tecniche utilizzate nell'ambito della produzione vivaistica sono determinanti per stabilire la qualità genetica e morfologica delle piantine prodotte.

Tuttavia, nonostante l'incremento della domanda di materiale vegetale autoctono e di provenienza certificata, ancora oggi in Italia si osserva l'insufficienza di una produzione vivaistica che possa soddisfare le richieste di tale materiale vegetale per le operazioni di restauro ambientale (ERSAF).

È necessario, invece, che l'attività della vivaistica forestale assuma un ruolo sempre più fondamentale per la conservazione *ex situ*, in quanto appare ormai affermato il concetto per il quale la vivaistica forestale e la gestione della biodiversità forestale debbano essere fortemente connesse (Behm *et al.*, 1997; Tessier Du Cros, 2001). Infatti, si va riconoscendo al vivaismo forestale un ruolo importante per la tutela e la gestione della biodiversità genetica forestale poiché può essere utilizzata come strumento necessario ed utile a migliorare la sostenibilità ecologica ed economica degli ecosistemi. Le tecniche di coltura in vivaio permettono, infatti, non soltanto di aumentare la produzione di piante, ma di fornire materiale che sia più resistente e geneticamente compatibile con l'area di utilizzo dello stesso contribuendo alla conservazione del patrimonio forestale. Le tecniche di vivaistica presentano

la loro utilità anche di fronte ai sempre più crescenti problemi legati ai cambiamenti climatici. Soprattutto in ambiente mediterraneo, infatti, l'aumento delle temperature si presenta come una evidente fonte di stress per le piante principalmente nelle loro fase giovanile.

1.3 Gli ecosistemi mediterranei

Gli ecosistemi mediterranei sono considerati una grande riserva di biodiversità vegetale in quanto costituiti da ambienti eterogenei e differenziati fra loro (Schönfelder *et al.*, 1996).

Nella regione mediterranea esistono aree di eccezionale concentrazione di biodiversità ed elevata densità di specie endemiche chiamate hot spots (Médail *et al.*, 1997). In Italia queste aree si ritrovano in Sicilia e Sardegna (Schirone *et al.*, 2001).

L'Italia meridionale rappresenta l'estremo limite meridionale di molte specie a larga diffusione europea, come il faggio, la rovere, l'abete bianco. Si ritiene che in epoca glaciale le regioni del sud Italia abbiano rappresentato delle "aree rifugio" da cui queste specie si sono poi nuovamente diffuse nel resto d'Europa (Schirone *et al.*, 2001). Per questi motivi l'Italia meridionale è una grande riserva di variabilità genetica la cui importanza è oggi universalmente riconosciuta. Tuttavia, l'ecosistema mediterraneo presenta numerosi aspetti che ne minacciano l'integrità e, tra questi, il fuoco è sicuramente uno dei maggiori pericoli per la vegetazione. Anche se le piante di questi ambienti presentano numerosi adattamenti per contrastare i continui incendi che attraversano le aree mediterranee, spesso le strategie di recupero della vegetazione non risultano sufficienti. Anche i frequenti cambiamenti di uso del suolo rappresentano un'altra minaccia per gli ecosistemi mediterranei, in quanto ne provocano la frammentazione riducendone la possibilità di comunicazione (Schirone *et al.*, 2001).

Dal momento che la vegetazione mediterranea è adattata alle condizioni naturali di stress e presenta una notevole resilienza ecologica, molti studiosi non ritengono rilevanti e preoccupanti gli effetti che i cambiamenti climatici potrebbero avere su di essa (Moreno *et al.*, 1995). Tuttavia, occorre considerare le interazioni fra cambiamenti climatici e attività dei parassiti. L'attività di questi ultimi può venire, infatti, favorita da condizioni di stress idrico delle piante favorito da climi ormai sempre più aridi (Luisi *et al.*, 1992). Inoltre, l'aumento delle temperature a cui stiamo assistendo negli ultimi anni genera un aumento del rischio incendi nelle aree mediterranee già per loro natura, come sopra menzionato, suscettibili a questi fenomeni. Sempre più evidente è, anche, l'effetto dell'inquinamento marino da tensioattivi. Infatti, tali sostanze che si ritrovano in grande quantità nelle acque reflue scaricate a mare dalle aree metropolitane, mescolate con il sale marino sono in grado di provocare gravi deterioramenti alle formazioni vegetali costiere (Schirone *et al.*, 2001).

Attualmente l'importanza economica della vegetazione mediterranea è considerata soprattutto dal punto di vista protettivo (lotta contro l'erosione e la desertificazione) e turistico. La produzione

legnosa è molto limitata a causa dei lenti accrescimenti e, in genere, viene ricavata soltanto legna da ardere (Schirone *et al.*, 2001). Tuttavia, le potenzialità economiche derivanti dalla vegetazione mediterranea sono molto ampie e devono essere attentamente valutate (Bernetti, 1995).

L'azione combinata dei fattori legati alle variazioni d'uso e di gestione del territorio ha profondamente trasformato la vegetazione degli ecosistemi mediterranei. In particolare, nel corso degli ultimi decenni si è verificato un impoverimento della composizione floristica e una frammentazione delle formazioni forestali (Damiani, 2001). Inoltre, in accordo con le ipotesi dei più attendibili modelli di previsione dei cambiamenti climatici, nei prossimi anni si verificherà un aumento delle aree aride e semi-aride, con consistenti effetti sulla crescita e sulla produttività delle foreste mediterranee (Damiani, 2001).

Tuttavia, negli ultimi anni si è registrato un crescente interesse verso questo fragile e prezioso ecosistema grazie al quale è maturata la consapevolezza della necessità di avviare un processo di recupero e valorizzazione delle aree degradate. Infatti, si sta assistendo ad una ripresa delle attività di rimboschimento, di ricostituzione boschiva, di recupero ambientale e di costituzione di impianti finalizzati alla conservazione delle specie mediterranee da cui è scaturita una crescita della richiesta di materiale vivaistico. Tali cambiamenti richiedono, quindi, un adeguamento della produzione in termini di offerta. In passato, molti vivaisti hanno focalizzato la loro attenzione su poche specie mediterranee facili da produrre e aventi un redditizio mercato. Da qualche anno, invece, ai vivaisti viene richiesto di allevare una larga varietà di specie arboree ed arbustive native o tipiche della vegetazione mediterranea non solo per finalità produttive legnose ma anche, e soprattutto, per fini paesaggistici, ricreativi, conservativi, ornamentali e culturali (Damiani, 2001). Questo pone le ricerche relative all'ambito della vivaistica forestale in primo piano, risultando necessario incentivare la realizzazione di nuovi impianti sperimentali con l'impiego di materiale selezionato per la resistenza ad avversità biotiche o per la maggiore capacità di adattamento in funzione dei cambiamenti climatici in atto.

1.4 La vivaistica forestale

1.4.1 La storia della vivaistica forestale italiana

Scopo principale della vivaistica forestale è la produzione di piante destinate principalmente alle attività di restauro forestale piuttosto che piante ornamentali, per l'orticoltura e la frutticoltura. Infatti, all'interno di un vivaio forestale vengono prodotte le stesse essenze che formano i boschi ed i popolamenti che spontaneamente si trovano negli ambienti naturali.

Negli ultimi anni l'attività della vivaistica forestale si è dovuta rapidamente adeguare alle nuove esigenze di mercato e alla sempre più crescente consapevolezza di conservazione della biodiversità,

adottando modalità di produzione e coltivazione delle piante più attuali e nel rispetto del valore genetico delle specie legnose autoctone. A tal fine, si è operato in modo da evitare di immettere sul mercato piante forestali non originarie del luogo attraverso una produzione effettuata a partire da sementi o talee raccolte unicamente entro popolamenti naturali della regione di provenienza. Per cui, risulta evidente che l'attività vivaistica svolge una funzione di garanzia nei confronti della biodiversità forestale adottando, inoltre, scelte tecniche rivolte all'innovazione per ottenere materiale qualitativamente e quantitativamente migliore (Veneto Agricoltura, 2011).

In Italia i primi due vivai forestali furono costituiti nel 1873 a Vallombrosa (provincia di Firenze) su iniziativa di Adolfo di Bérenger (Sala, 1943), il quale a proposito dei due vivai scrive *“ebbero sede uno a Vallombrosa per la moltiplicazione di piantine di clima freddo con osservatorio meteorologico; l'altro presso la fattoria di Paterno per quelle di clima più temperato, con orto dendrologico per la coltivazione di specie esotiche”* (Di Bérenger, 1880). Sin da subito fu possibile osservare che nei vivai si ebbero esiti positivi poiché si cominciava a produrre un quantitativo elevato di piante, di cui alcune anche esotiche. Il successo ottenuto interessò i selvicoltori abituati agli insuccessi dei rimboschimenti poiché effettuati prelevando giovani piante nate da rinnovazione naturale. Fu subito chiaro, quindi, che per effettuare rimboschimenti su larga scala si doveva necessariamente ricorrere ai vivai. Ciò determinò l'espansione della superficie dei vivai che raggiunsero i 35 ettari nel 1886 (con una produzione di 2,5 milioni di piantine all'anno), gli 83 ettari nel 1910 e i 328 ettari nel 1911 (con una produzione di 16 milioni di piantine) (Sala, 1943).

Inizialmente il vivaio forestale venne suddiviso in semenzaio, ossia il luogo dove si fanno nascere le piantine dette semenzali, e il piantonaio ossia dove si trapiantano i semenzali per permettere un loro maggiore sviluppo prima di qualsiasi operazione. Ancora oggi, tale suddivisione rappresenta lo schema di ripartizione della gran parte dei vivai forestali.

Poiché la propagazione delle piante forestali avviene per mezzo di semi, sin dalla nascita dei vivai risultava necessario conoscere la percentuale di germinabilità dei semi stessi, ossia la percentuale in grado di germinare in condizioni ottimali e di produrre un semenzale con elevate caratteristiche qualitative. Ovviamente, tale percentuale è variabile da specie a specie (Piotto *et al.*, 2001). Inizialmente, ci si serviva di un numero precisato di semi posti sul fondo di comuni vasi porosi che venivano posti in locali sotterranei al buio e a temperatura costante. Inoltre, poiché occorreva tenere i semi costantemente inumiditi, i vasi venivano poggiati su dei contenitori nei quali si versava l'acqua (Piotto *et al.*, 2001). Successivamente si contavano quanti semi erano germinati e, in base al risultato, si poteva dedurre se quel dato seme avesse una buona o meno percentuale di germinabilità (Sala, 1943). Attualmente, si ricorre a tecniche più moderne quali la prova di germinazione che rappresenta il test più diffuso per misurare la facoltà germinativa dei semi (Wang, 1999). La prova si basa sul

conteggio dei semi che germinano in celle climatiche (con temperatura e fotoperiodo controllati), nelle quali vengono impostate le condizioni ottimali per ogni singola specie. Per la maggior parte delle specie forestali viene consigliato un ciclo di temperature giornaliere alternate che prevede 16 ore al buio a 20°C, seguite da 8 ore alla luce a 30°C. Ovviamente, la valutazione del risultato della prova di germinazione prevede il calcolo della percentuale dei semi germinati e dei semi non germinati (Piotto *et al.*, 2001).

Sin dai primi esperimenti di allevamento di piantine in vaso fu evidente che se fosse stato danneggiato loro l'apparato radicale durante il trapianto, in seguito si sarebbero riscontrati effetti negativi fino all'impossibilità di attecchimento con conseguenziale perdita di materiale vegetale. Per fare fronte a questo problema si cominciò trapiantare le piante con il loro pane di terra al fine di ridurre i danni meccanici derivanti da probabili rotture o lesioni di radici. Tale pratica, ancora oggi, rappresenta una tecnica ampiamente utilizzata. (Sala, 1943).

Oggi l'attività vivaistica ha subito notevoli mutazioni. Soprattutto in paesi come la Svezia e la Francia, molto è stato fatto per introdurre moderne tecnologie di allevamento e conservazione del materiale prodotto. Negli ultimi anni, anche l'Italia sta lavorando per aumentare gli standard delle piante allevate.

Tra le diverse ricerche svolte in ambito di vivaistica forestale, alcuni autori (Mattsson *et al.*, 2010; Astolfi *et al.*, 2012) hanno riportato un nuovo sistema di coltivazione di piantine forestali, denominato pre-coltivazione. Le piantine vengono allevate per un periodo piuttosto breve (solitamente non oltre i 30-60 giorni) in mini-contenitori (con un volume anche inferiore ai 33 cm³, in base alle specie) che inducono l'air-pruning dell'apice radicale. Attualmente anche l'allevamento in ambienti con condizioni di temperatura e umidità controllate quali camere di crescita, sta assumendo un sempre maggiore interesse. Infatti, poiché si ritiene che le primissime fasi di sviluppo delle piante siano quelle che condizioneranno in modo significativo la loro successiva crescita, questo sistema di coltivazione si presenta come uno dei più adatti per tutelare il più possibile questa fase.

1.4.2 Le finalità del vivaismo forestale

Lo scopo principale del vivaismo forestale è quello di produrre piante che, per caratteristiche genetiche, morfologiche, fisiologiche e sanitarie, siano in grado di offrire le maggiori garanzie d'adattabilità, d'attecchimento e di rapido accrescimento (Moraldi, 2004). Per il raggiungimento di questi obiettivi è necessario che le produzioni vivaistiche, al termine del periodo d'allevamento, presentino determinati requisiti i quali sono il risultato d'insieme di una serie di condizionamenti:

1: *condizionamento genetico*, in relazione alla specie ed all'eventuale entità subspecifica prescelta (provenienza, ecotipo o clone);

2: *condizionamento ambientale*, esercitato dalle caratteristiche climatiche e pedologiche sulla morfologia e sullo stato generale delle piante;

3: *condizionamento colturale*, esercitato, prevalentemente, dai metodi e dalle tecniche di coltivazione adottate (allevamento a radice nuda od in contenitore, in serra od all'aperto).

Inoltre, è necessario rilevare la provenienza delle sementi forestali al fine di poter comparare le caratteristiche ambientali della loro zona d'origine con quelle della stazione da imboschire. Infatti, da diverso tempo si ritrovano sul mercato semi e piante di provenienza sconosciuta. L'introduzione di questo materiale di propagazione è da menzionare tra le cause di insuccesso di gran parte degli imboschimenti (Moraldi, 2004).

Le coltivazioni vivaistiche vengono divise in due principali sistemi d'allevamento: a radice nuda ed in contenitore (Moraldi, 2004). Fin dalle prime esperienze d'allevamento di piante forestali in vivaio si è sempre pensato di utilizzare quasi esclusivamente piante coltivate a radice nuda. Attualmente, tale metodo rimane valido soprattutto per alcune specie a lento accrescimento nello stadio giovanile (Moraldi, 2004). Il sistema di allevamento a radice nuda consente notevoli risparmi sia sui costi di produzione in vivaio, sia sulla movimentazione ed il trasporto delle piantine. Tuttavia, se non si opera in ambienti pedoclimatici favorevoli, se non si dispone di personale specializzato e di strutture adeguate per la conservazione ed il trasferimento delle piante, si rischia di andare incontro a diversi insuccessi. Tali problematiche hanno comportato un crescente interesse a favore del postime in contenitore. L'importanza del pane di terra risiede nel fatto che consente alle piante di poter beneficiare, anche dopo il trapianto, di condizioni ad essa favorevoli. Infatti, la presenza per la pianta del proprio substrato di allevamento comporta una diminuzione dello stress sia durante le fasi di trasporto, sia in quelle di realizzazione della piantagione. Inoltre, il pane di terra permette alla pianta di migliorare la propria capacità di sopravvivenza a seguito della messa a dimora poiché permette una migliore nutrizione durante l'avvio dell'espansione delle radici in profondità (Moraldi, 2004). Come precedentemente detto, oltre a proteggere le piantine dagli stress idrici, il pane di terra le preserva anche dai danni meccanici durante le fasi di confezionamento, trasporto e messa a dimora consentendo di ottenere percentuali d'attecchimento decisamente superiori a quelle ottenibili con postime a radice nuda. Inoltre, tale metodo d'allevamento consente anche di allungare il tempo utile per eseguire la piantagione, permettendo una maggiore flessibilità di lavoro e un impiego meglio distribuito nel tempo della manodopera addetta alle operazioni di imboschimento.

L'attività vivaistica forestale è regolata da un complesso corpus di leggi che riguardano tematiche quali la produzione il commercio delle piante forestali, la difesa fitosanitaria e la sicurezza dei lavoratori. Come precedentemente detto, si va riconoscendo alla vivaistica forestale un ruolo

fondamentale per la tutela e la gestione della biodiversità forestale. Inoltre, il ri-orientamento delle linee di politica forestali comunitarie hanno determinato una ripresa degli interventi forestali con molteplici finalità e, conseguentemente, un aumento della richiesta di materiale vivaistico forestale sempre più selezionato sia in termini quantitativi che qualitativi. Ai vivaisti forestali è richiesta la produzione di specie arboree ed arbustive, latifoglie invece di conifere, specie indigene invece di specie esotiche, per usi che vanno dall'arboricoltura da legno agli interventi di ricostituzione del bosco, dal recupero ambientale di ambienti degradati, alla costituzione di piantagioni finalizzate alla conservazione di specie minacciate, alla realizzazione di interventi di aree verdi nei centri urbani (Landis *et al.*, 1993; Dumroese *et al.*, 1997; Rose e Haase 1998). Tuttavia, soprattutto nel nostro Paese, i vivaisti trovano difficoltà nel reperire materiale idoneo per gli usi sopra menzionati e, in secondo luogo, nel mercato italiano l'introduzione di materiale proveniente da altri Paesi è un fenomeno ormai largamente diffuso. A questo, inoltre, si somma la necessità di una meccanizzazione all'avanguardia in grado di produrre notevoli quantità di materiale in grado di soddisfare la domanda, difficile da ottenere.

1.4.3 Inquadramento legislativo

La normativa europea sul controllo dei materiali di propagazione forestale si basa sull'esigenza da parte dei Paesi dell'Unione Europea di accertare alla fonte i materiali di propagazione e di renderne possibile l'identificazione nelle diverse fasi (dalla raccolta fino al trapianto). Inoltre, la regolamentazione considera la necessità di favorire l'uso di materiali provenienti da popolamenti di elevata qualità genetica poiché, come precedentemente detto, in grado di offrire maggiori garanzie di sviluppo della piantagione e di riuscita dell'impianto (APAT, 2003).

Nel corso degli anni '60 la Comunità Europea ha emanato una serie di normative per la certificazione del materiale di propagazione. Il primo atto legislativo organico della CEE, ancora oggi in vigore, è rappresentato dalla Direttiva del Consiglio n° 66/404/CEE (CEE, 1966) che stabilisce le norme di riferimento che gli Stati membri sono chiamati a rispettare per il commercio del materiale di propagazione. La Direttiva 66/404/CEE (e i successivi emendamenti CEE, 1969; CEE, 1975) prevedono che il materiale di propagazione provenga da boschi da seme o da arboreti da seme. Per il materiale propagato vegetativamente la Direttiva prevede che vengano raccolti presso popolamenti clonali registrati nel Libro Nazionale dei Boschi da Seme che ogni Paese membro deve compilare e mantenere aggiornato (APAT, 2003). Per boschi da seme o da arboreti da seme si intendono i popolamenti di alberi con caratteristiche fenotipiche di norma superiori a quelle di altri popolamenti in condizioni simili, impiegati per la raccolta di materiale di propagazione. La registrazione nel Libro Nazionale dei Boschi da Seme avviene soltanto se le fonti di materiale di raccolta per cui è richiesta la registrazione, rispondono a determinati requisiti definiti dalla Direttiva stessa. (APAT, 2003).

Nel 1976 l'Organizzazione per il Commercio e lo Sviluppo Economico (OCSE), al fine di estendere al settore forestale quanto già stabilito per il seme di specie agricole, formalizzò un sistema di controllo del materiale forestale di propagazione destinato al commercio internazionale (OCSE, 1974; OCSE, 1976). Lo schema OCSE, attualmente applicato in 14 Paesi tra cui l'Italia, è aperto a qualsiasi specie o altra entità genetica. Inoltre, il rispetto dello schema OCSE è su base volontaria e considera 4 categorie di materiali forestali di propagazione. Infine, lo schema OCSE non richiede l'analisi dei semi prima della commercializzazione (APAT, 2003). Attualmente lo schema OCSE è in fase di revisione, anche per acquisire gli sviluppi dei nuovi schemi prodotti dell'UE.

Nel corso degli anni sono state emanate altre normative relative alla commercializzazione dei materiali forestali di propagazione di cui una delle ultime è la 1999/105/CE (CEE, 1999) che sostituisce la Direttiva 66/404/CEE.

Con la Direttiva 1999/105/CE i materiali di propagazione sono suddivisi in quattro categorie:

- identificati alla fonte;
- selezionati;
- qualificati;
- controllati.

Per i materiali identificati alla fonte e controllati possono essere definite delle regioni di provenienza, ossia delle aree geografiche omogenee per parametri pedologici e climatici.

Grazie alla Direttiva per tutti i materiali di base devono essere istituiti dei registri nazionali e creato un elenco comunitario. Infine, tutti i materiali di propagazione vanno identificati secondo procedure che garantiscano l'informazione sulla loro natura durante il processo di produzione e successiva commercializzazione (APAT, 2003).

Nel nostro Paese a partire dagli anni Sessanta si sviluppò una particolare attenzione nella scelta e classificazione dei popolamenti da seme di alcune specie di alberi importanti per la selvicoltura dell'epoca, da cui effettuare la raccolta del materiale di propagazione. Solamente, però, negli anni Settanta con la Legge 22 maggio 1973, n° 269 *“Disciplina della produzione e del commercio di sementi e piante da rimboschimento”*, il nostro Paese si è dotato di una normativa per il controllo della qualità del materiale usato nelle piantagioni forestali. Con tale legge l'Italia ha disciplinato il funzionamento delle attività produttive del settore vivaistico forestale, in base ai principi contenuti nella Direttiva del Consiglio 66/404/CEE e s.m.i. La Legge 269/73 stabilisce, all'art. 2, che *“la produzione a scopo di vendita e la vendita di materiali forestali di propagazione è consentita solo ai possessori di una licenza rilasciata dalla Camera di Commercio, Industria e Artigianato competente per territorio, supportata da un parere favorevole di un'apposita Commissione”* (APAT, 2003). I boschi e gli arboreti da seme idonei alla raccolta sono elencati nell'Allegato A della Legge e sono,

inoltre, iscritti nel LNBS. Tuttavia, nonostante il testo della Legge 269 risulti ancor oggi valido si può dire la scarsa attività di controllo ha fatto sì che la legge venisse in larga parte disattesa rendendo possibile produrre e commercializzare legalmente materiale che presenta ridotti requisiti (ERSAF). E' solo con il Decreto Legislativo 227 del 18 Maggio 2001, *“Orientamento e modernizzazione del settore forestale a norma dell'art 7 della legge 5 Marzo 2001, n°57”* che si ottiene un miglioramento del panorama legislativo. Infatti all'interno del Decreto, all'art. 9, vengono stabilite direttive per materiale forestale di propagazione e precisamente viene stabilito che: *“Le Regioni istituiscono il libro dei boschi da seme per il territorio di propria competenza, in cui sono iscritti i boschi, gli arboreti, gli alberi e le piantagioni di alberi da seme per la produzione di materiale forestale di moltiplicazione. Le Regioni inviano al Ministero delle Politiche Agricole e Forestali i dati degli elenchi suddetti al fine di costituire il Registro nazionale del materiale forestale di moltiplicazione”*. Attualmente la normativa di riferimento in materia di attività del settore vivaistico forestale è il D.Lgs. 386 del 10/11/2003 che recepisce la Direttiva comunitaria 1999/105/CE., e sostituisce la precedente legge 269 del 1973. Il D.Lgs. 386/2003 individua le foreste con determinate caratteristiche dalle quali prelevare il materiale da utilizzare in rimboschimenti ed interventi di riqualificazione delle superfici boscate. Inoltre, definisce all'art. 2 i concetti di:

- *Provenienza*: definita come l'area in cui si trovano una popolazione di alberi o arbusti; All'art. 16 del D.Lgs. 386/2003 viene posto il divieto di commercializzare materiale destinato ai rimboschimenti per i quali non sia possibile dichiarare la provenienza.
- *Regione di provenienza*: ossia il territorio sui quali si trovano fonti di semi conformi dal punto di vista fenotipico e dal punto di vista genotipico.
- *Origine*: se riferita a semi autoctoni, l'origine è il luogo dove si si trova il popolamento forestale madre. Invece, se viene riferita a semi non autoctoni, l'origine è il luogo da cui i semi o le piante sono state originariamente introdotti.

Nonostante il panorama legislativo presentato, l'attività della vivaistica forestale presenta ancora numerose difficoltà come ad esempio l'impossibilità di disporre di una normativa unitaria. Nel corso degli anni, infatti, al fine di regolare i vari aspetti di un'attività in continua evoluzione numerose normative si sono sovrapposte, con ordinamenti che riguardano temi tra loro molto differenziati che vanno dagli standard di qualità del materiale prodotto al rispetto dei vincoli ambientali (APAT, 2003). Inoltre, l'attuale sistema vivaistico italiano è caratterizzato da una notevole frammentazione territoriale e da una scarsa specializzazione produttiva. Infatti, nonostante molti paesi dell'Europa risultano già attivi nell'incremento delle ricerche in materia di vivaistica forestale, l'Italia si presenta con un leggero ritardo. Tuttavia a seguito dei recenti fenomeni di dissesto idrogeologico che hanno colpito il nostro paese, legati al sempre più vivo interesse di rinaturalizzazione delle aree degradate e

ai progetti di conservazione della biodiversità forestale, si è assistito ad uno sviluppo della ricerca in campo vivaistico, che stanno portando l'Italia al passo con il resto dell'Europa. Fulcro di tale ricerca è la necessità di enfatizzare gli aspetti morfologici, genetici e fisiologici delle piante coltivate, obiettivo che può raggiunto attraverso una razionale gestione della fase di pre-coltivazione delle specie allevate. Sarà necessario compiere notevoli progressi nella messa a punto di macchine per l'allevamento di specie forestali sempre più efficienti e complesse, come ad esempio camere di crescita altamente specializzate e nell'impiego di nuove tecnologie come l'elettronica e la robotica. La ricerca in materia di vivaistica deve, inoltre, considerare diversi aspetti per migliorare la produzione di materiale vegetale. Tra questi aspetti uno dei più importanti è quello dell'illuminazione delle piantine allevate.

1.5 Influenza dei diodi ad emissione luminosa (LED) sulle specie vegetali

L'allevamento delle piante in camere climatiche, è oggi una delle tecniche maggiormente utilizzate in campo vivaistico in quanto permette di ottenere materiale che qualitativamente e quantitativamente risponda ai requisiti richiesti in campo forestale. Come è noto, la luce è necessaria alle piante per lo svolgimento di molti fondamentali processi, primo tra tutti la fotosintesi, per cui per l'allevamento delle specie forestali in ambiente controllato è necessario riprodurre la presenza di luce in maniera corretta, soprattutto con la giusta intensità e qualità spettrale. Tra le metodologie di illuminazione artificiale fino ad oggi più utilizzate troviamo le lampade fluorescenti, che tuttavia a causa dell'impossibilità di variazione dello spettro di luce emesso e della loro breve durata stanno progressivamente cedendo il loro posto a nuove metodologie. Tra le alternative proposte i diodi ad emissione luminosa, o LED (Light Emitting Diodes), rispondono alla maggior parte dei requisiti richiesti in materia. Infatti oltre a presentare dimensioni ridotte, una più lunga durata di esercizio e un basso consumo, i LED possono emettere luce monocromatica che di conseguenza (a differenza delle lampade fluorescenti) può essere variata a seconda delle esigenze richieste dalla coltura. Altro notevole vantaggio dei diodi ad emissione luminosa risiede nel loro basso impatto ambientale. Infatti, oltre al risparmio energetico che è possibile ottenere con queste lampade a differenza di altre tecnologie di illuminazione non contengono gas pericolosi (come ad esempio i vapori di Hg), potenzialmente tossici soprattutto per il suolo. Inoltre anche in fase di smaltimento, i materiali di cui sono composti i LED e le loro minime dimensioni fanno sì che le operazioni di disaggregazione del prodotto risultino più agevolate.

I LED sono un particolare tipo di diodi, formati da un sottile strato di materiale semiconduttore quali l'arseniuro di gallio, il fosfuro di gallio, il fosfuro arseniuro di gallio, il carburo di silicio e il nitruro di gallio e indio (Engbers *et al.*, 2007). I primi LED realizzati erano disponibili solo nel colore rosso

ma in breve tempo vennero sviluppati anche LED che emettevano luce gialla, verde e blu. Successivamente, vennero realizzati dispositivi che integravano nello stesso contenitore LED di colori diversi (rosso, verde e blu) con risultato finale la possibilità di generare qualsiasi colore.

L'applicazione dei LED come fonte luminosa per l'orto-floro-vivaismo in serra si prospetta di notevole interesse sia economico che colturale ed energetico. Infatti, lo sviluppo di questa nuova tecnologia facilmente si presta per l'accrescimento di piante in ambiente controllato. La dimostrazione di ciò lo è la grande importanza che i diodi ad emissione luminosa stanno assumendo per le ricerche mirate allo sviluppo di sistemi vegetali alimentari per lo Spazio (ENEA, 2009).

La luce visibile è un fattore ambientale determinante per l'accrescimento e lo sviluppo delle piante. Ad esempio, la luce rossa (650-700 nm) e la luce blu (460-480 nm) costituiscono le lunghezze d'onda più efficienti per il processo di fotosintesi. Inoltre, per le colture la luce svolge anche un'importante funzione per i processi fotomorfogenetici che si verificano nei diversi stadi della crescita della pianta. Di questi processi più importanti sono il fotoperiodo, l'intensità luminosa e la qualità della luce.

Per fotoperiodo si intende il tempo di esposizione alla luce delle piante che risulta fondamentale per le diverse attività delle piante (ENEA, 2009). Per intensità luminosa si intende la quantità di energia luminosa che raggiunge la coltura. Tale quantità di energia intercettata viene definita irradianza e si esprime come $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. In generale, maggiore è l'irradianza migliore è lo sviluppo dei germogli. Tuttavia, è noto che oltre una certa quantità di luce fornita i germogli subiscono una diminuzione della crescita con segni di invecchiamento e ingiallimento fogliare (Lercari, 1990).

Come riferito in precedenza, l'importanza della luce per le colture riguarda anche l'effetto che essa comporta sulle risposte fotomorfogeniche delle piante per le quali l'intervallo dei valori di lunghezza d'onda della luce presenta un range di valori molto ampio, che varia da 200 nm a 800 nm.

Al contrario, l'intervallo di valori di lunghezza d'onda della luce nel campo del visibile dell'occhio umano varia da 400 nm a 800 nm, (Lercari 1990). Questa differenza è dovuta alla presenza nelle piante di particolari molecole definite fotorecettori in grado di catturare la radiazione luminosa a lunghezze d'onda diverse rispetto al campo del visibile. I fotorecettori riconosciuti fino ad oggi sono:

- fitocromo: capace di assorbire lunghezze d'onda comprese tra 280 nm e 800 nm;
- fotorecettori Blu/UV-A: che assorbono radiazioni inferiori a 500 nm;
- fotorecettori UV-B: in grado di assorbire nell'ultravioletto ma insensibili a lunghezze d'onda superiori a 350 nm.

I primi studi che ipotizzarono l'esistenza del fitocromo quale recettore della luce risalgono a Borthwich e Hendricks nel 1952. Infatti, gli esperimenti condotti su semi di lattuga evidenziarono che la germinazione era stimolata, oltre che al buio, da trattamenti luminosi a diverse lunghezze

d'onda ed in particolare dalla luce rossa. Inoltre, Borthwich e Hendricks osservarono che gli stessi semi una volta irradiati con luce rossa, se successivamente irradiati un fascio di luce rosso-lontano subivano l'inibizione della germinazione (ENEA, 2009).

Tuttavia, non è sempre possibile associare una determinata risposta ad un fotorecettore specifico. A volte alcune risposte potrebbero essere determinata dall'azione di più fotorecettori (Tamulaitis *et al.*, 2005). In generale, è possibile affermare che gli spettri di emissioni della luce ai quali si hanno le maggiori risposte sono la luce rossa, la luce blu, UV-A, UV-B e luce rosso lontana (Tamulaitis *et al.*, 2005). Come dimostrato da Hoenecke *et al.*, nel 1989 le luci UV-A e UV-B possono avere degli effetti sull'incremento di concentrazione dei carotenoidi e della clorofilla sulla lattuga a foglie verdi e dei decrementi sulla lattuga a foglie rosse.

L'influenza della radiazione ultravioletta sulle piante è oggetto di studio da diversi anni. Tali ricerche hanno evidenziato che le risposte indotte nelle piante possono essere la riduzione nelle dimensioni; la riduzione della superficie fogliare; il decremento della concentrazione dei carotenoidi; l'aumento di spessore della lamina fogliare; l'aumento di brillantezza dei colori e un maggiore accumulo di antociani nei tessuti (Mohr, 1986; Gaba *et al.*, 1987; Sbrana *et al.*, 1989; Tamulaitis *et al.*, 2005).

Risulta evidente, quindi, come luci di diverse qualità possano influenzare le diverse risposte fisiologiche e morfologiche in piante allevate in camera di crescita. Ad esempio, la luce blu e rossa sbilanciando il rapporto citochinine/auxine favoriscono l'apertura delle gemme ascellari e, quindi, la moltiplicazione dei germogli con una forte riduzione della dominanza apicale (Lercari, 1990).

Le principali ricerche svolte nel campo dell'allevamento con diodi ad emissione luminosa sono state effettuate su piante erbacee, e la maggior parte di queste hanno dimostrato che la luce rossa prodotta dai LED stimola nelle piante l'allungamento dello stelo, l'allungamento degli internodi e le modificazioni anatomiche. Mentre la luce blu risulta determinante per la biosintesi della clorofilla, l'apertura stomatica, lo sviluppo dei cloroplasti e il processo fotosintetico (Brazaitytė *et al.*, 2009). Alcune ricerche effettuate su diverse varietà di vite hanno riscontrato che l'uso di luci LED che combinano rosso e blu sono in grado di determinare nel frutto un incremento del contenuto di zucchero e dell'accumulo di amido. Inoltre si è riscontrato un incremento di peso secco e fresco delle foglie nelle piante di vite illuminate con sola luce rossa o con un insieme di luce rossa e blu (Puspa *et al.*, 2008).

Oltre alla luce rossa e blu vi sono risposte fotomorfogeniche che possono essere indotte da altre qualità di luce come ad esempio quella gialla e verde. La luce gialla (580-600 nm) sembra arrestare l'accrescimento della lattuga (Hoenecke *et al.*, 1989) impedendo la formazione della clorofilla o dei cloroplasti. Invece i risultati degli studi sulla luce verde (500-580 nm) sono tuttora controversi poiché considerati in alcuni come inibitori, in altri come stimolanti per la crescita (Morini *et al.*, 2012).

Solo il colore emesso dai LED non risulta però sufficiente, vi sono anche altre caratteristiche da osservare. Tra queste troviamo la qualità (lunghezze d'onda differenti), la quantità (valori diversi di densità di flusso fotonico) e la durata (o fotoperiodo).

I LED sono dieci volte più efficienti di una lampada a incandescenza e due volte più di una fluorescente. In generale, i vantaggi dei LED dal punto di vista illuminotecnico sono:

- lunga durata di esercizio;
- assenza di costi di manutenzione;
- elevato rendimento (quando paragonato a lampade ad incandescenza e alogene);
- luce pulita poiché priva di componenti IR e UV;
- colori saturi;
- funzionamento in sicurezza perché a bassissima tensione;
- accensione a freddo;
- insensibilità a umidità e vibrazioni;
- assenza di mercurio;
- durata non influenzata dal numero di accensioni/spegnimenti.

La risposta delle piante ai diodi ad emissione luminosa è ovviamente variabile, e come sopra menzionato, la maggior parte degli studi sull'illuminazione con i diodi ad emissione luminosa è stata effettuata su piante erbacee di interesse agricolo od ornamentale. In quest'ottica lo sviluppo di progetti di ricerca concentrati sulla crescita di piante forestali sottoposte ad illuminazione LED potrebbero certamente apportare miglioramenti nella coltivazione del materiale ottenuto nella filiera vivaistica.

1.6 I Progetti di Ricerca Europei *Regen Forest* e *Zephyr*

Poiché si ritiene che la rinnovazione artificiale aumenti la possibilità di recupero dell'integrità dell'ecosistema rispetto alla rinnovazione naturale o alla semina diretta, nuove tecnologie per il miglioramento della qualità e quantità delle piantine forestali potrebbero contribuire più efficacemente al successo degli imboschimenti. Questo ha determinato lo svilupparsi di progetti di ricerca aventi lo scopo di introdurre nuove tecnologie per la coltivazione di materiale forestale basata su una produzione economicamente e ambientalmente sostenibile, utilizzando camere di crescita altamente specializzate (dove l'ambiente di allevamento controllato non è influenzato dalle condizioni climatiche esterne), illuminate con luci LED. In questo modo si cerca di portare la produzione non solo al massimo dell'efficienza dal punto di vista dei costi e del risparmio energetico, ma anche di migliorare notevolmente gli standard qualitativi e quantitativi delle produzioni vivaistiche forestali che nel nostro Paese sono ancora estremamente deficitarie.

Pionieri di tale ricerca sono i progetti europei *Regen-Forest* e *Zephyr*. I due progetti si prefiggono il raggiungimento di diversi risultati:

- identificazione dello spettro di luce LED ottimale per la crescita di diverse specie forestali in ambiente controllato;
- sviluppo di protocolli per l'allevamento di specie forestali e non;
- sviluppo di camere climatiche altamente specializzate adatte alla crescita di piante forestali da immettere sul mercato vivaistico nazionale ed europeo. Le camere di crescita sono unità mobili e, nel caso della camera sviluppata durante il progetto Zephyr, anche energeticamente autosufficienti in quanto dotata di pannelli solari.

La scelta di utilizzare i LED come nuova tecnologia d'illuminazione per la produzione vivaistica forestale odierna risiede nel fatto che oltre a migliorare economicamente la gestione della produzione forestale, i LED contribuiscono anche a tutelare l'ambiente, tramite un minor consumo di energia con una conseguente riduzione delle emissioni di gas serra.

Le camere di crescita attualmente in commercio hanno diverse misure di grandezza (da unità portatili a vere e proprie stanze) in modo da soddisfare le esigenze di crescita delle specie. Come precedentemente descritto, i parametri che possono influenzare la crescita e lo sviluppo delle piante sono soprattutto la temperatura e la luce oltre, naturalmente, alla presenza di acqua e delle sostanze nutritive (Zuchi e Astolfi, 2012). Le camere climatiche, grazie ad un preciso e costante controllo dei parametri di temperatura, umidità relativa e fotoperiodo sono in grado di riprodurre le condizioni climatiche adatte per lo sviluppo di specie vegetali. Tuttavia, vi è ancora la necessità di migliorare ulteriormente la struttura delle camere di crescita attualmente disponibili, soprattutto per quanto riguarda il loro sistema di illuminazione. Infatti, fino ad oggi non era possibile variare lo spettro luminoso, al pari di tutti gli altri parametri, secondo le esigenze della specie allevata. Ora, con l'introduzione delle luci LED come nuova fonte di illuminazione per l'allevamento di piante in ambiente controllato, è possibile scegliere lo spettro luminoso che meglio risponde alle richieste della specie che si intende coltivare.

Come precedentemente detto, lo scopo principale dei due progetti di ricerca è stato quello di sviluppare camere climatiche altamente specializzate adatte alla crescita di piante forestali. In entrambe i casi, ovviamente, utilizzando come fonte di illuminazione lampade LED.

Il Prototipo, sviluppato nell'ambito del progetto di ricerca Regen-Forest, è un sistema automatico composto da 10 ripiani in continuo movimento esposti all'illuminazione di solo tre lampade LED. All'interno del Prototipo è possibile garantire omogenee condizioni ambientali di temperatura e umidità idonee alla crescita di piantine forestali.



Figura 1.1 Il Prototipo realizzato nell'ambito del progetto di ricerca RegenForest.

Infine, un sistema di irrigazione automatizzato consente di fornire la corretta quantità di acqua secondo le esigenze delle piantine. Il numero delle piantine prodotte nel prototipo in un solo ciclo colturale, che varia in base al tipo di specie e alla densità dei contenitori alveolari, può arrivare sino ad un massimo di 17.000 piantine pari ad una superficie di 5 metri quadri. La tecnologia, rispetto alle precedenti, si è rivelata estremamente interessante sia per il risparmio energetico che per la risposta delle piante. Le tradizionali camere di crescita prevedono l'uso di apparecchiature luminose convenzionali o fluorescenti e l'unità di produzione è progettata per un uso "statico" in un determinato sito, il che comporta limitazioni nell'uso flessibile della stessa unità in diversi vivai forestali o direttamente in una determinata area di riforestazione. Il prototipo, per le sue contenute dimensioni, è stato, invece, realizzato per essere facilmente trasportato nei luoghi di produzione, dove più unità modulari possono essere assemblate insieme e per il cui funzionamento sarebbe necessario un apporto energetico piuttosto contenuto proprio grazie all'impiego delle luci LED.

Il Prototipo sviluppato dal progetto Zephyr, si basa sugli stessi principi del precedente. Tuttavia, rispetto al precedente, vuole presentarsi come una unità completamente automatizzata e indipendente. Per raggiungere questo obiettivo, il sistema è alimentato principalmente da energia solare e ricicla l'acqua utilizzata. Le dimensioni sono state progettate per permettere al Prototipo Zephyr di essere facilmente installato in qualsiasi area di produzione (dai vivai forestali al pieno campo). Inoltre, è dotato di dispositivi quali un braccio robotico per le operazioni all'interno dell'ambiente controllato sul quale è montata una camera ottica stereoscopica. Questa fornisce continue informazioni ed immagini agli operatori essenziali per verificare lo stato di salute delle piantine che crescono all'interno del Prototipo, per stimare le curve di crescita e l'efficacia del sistema di allevamento delle piante. Sensori wireless sono collocati all'interno del Prototipo per il monitoraggio dei principali parametri ambientali (ad esempio, umidità e sostanze nutritive del suolo, temperatura e l'umidità dell'aria) e collegati in remoto ad un supervisore, che in tal modo potrà seguire la crescita delle piante

dalla camera ottica ed, eventualmente, personalizzare e regolare i parametri ambientali all'interno del Prototipo secondo le informazioni fornite dai sensori, utilizzando solo una connessione internet. Un computer collegato direttamente al Prototipo è programmato per fornire i protocolli di allevamento delle specie. In questo modo, qualsiasi operatore, anche non specializzato potrebbe essere in grado di inizializzare la procedura di coltivazione e accendere il Prototipo. Infine, lampade LED sono utilizzate al posto di apparecchi a fluorescenza per migliorare il processo di coltivazione, ridurre il consumo di energia e diminuire il costo complessivo grazie alla loro elevata efficienza, lunga durata e bassa manutenzione. Ulteriore vantaggio del prototipo Zephyr è che può essere considerato come l'unità base un nuovo tipo di fabbrica specializzata nella coltivazione di piante forestali, in quanto, è possibile allineare più unità Zephyr in parallelo.



Figura 1.2 Il Prototipo realizzato nell'ambito del progetto di ricerca Zephyr e particolare del braccio robotico.

1.7 Le specie botaniche oggetto di studio

1.7.1 *Arbutus unedo* L.

Il corbezzolo appartiene della famiglia delle Ericaceae che si caratterizza per la presenza di piante dicotiledoni erbacee, arbustive o arboree. Il corbezzolo è una pianta dalle dimensioni variabili con chioma densa e irregolare con il tronco corto, eretto, sinuoso e densamente ramificato. I rami più giovani sono giallastri e tomentosi, mentre gli altri rami e il fusto sono ricoperti con una corteccia di un colore bruno-rossiccio, rugosa e fessurata, che si sfalda negli organi legnosi più vecchi in sottili strisce longitudinali (Pignatti, 1982). Le foglie, alterne, semplici, brevemente picciolate e glabre, hanno lamina obovato-lanceolata, lucide e di colore verde scuro sulla superficie superiore e verdi più chiare nella superficie inferiore. I fiori, ermafroditi e attinomorfi presenti da ottobre a marzo nella parte terminale dei rami, sono riuniti in piccoli racemi penduli di colore bianco crema o rosato. Ogni fiore è formato da una corolla ristretta all'orlo e rigonfia nel mezzo che termina con cinque piccoli denti volti verso l'esterno (Pignatti, 1982). I frutti sono bacche rotonde lungamente picciolate,

sferiche carnose e con la superficie di colore rosso-arancio che contengono al loro interno numerosi piccoli semi.

La corteccia contiene una notevole quantità di tannino impiegata per la produzione di coloranti e per la concia delle pelli. Il legno di alburno giallo-rosato e durame rosso-bruno, è duro e può essere impiegato per piccoli lavori di artigianato e come combustibile.

E' specie che dimostra di avere una buona reazione agli incendi poiché riprende a vegetare velocemente. Inoltre, trova facilmente impiego nei rimboschimenti e nel consolidamento delle dune. Il corbezzolo è un elemento stenomediterraneo, originario del bacino del Mediterraneo che in epoche interglaciali colonizzò zone distanti dall'attuale areale di diffusione. Per tale motivo oggi è possibile rinvenirlo in Francia sulla costa atlantica, in Irlanda sud-occidentale ed in Italia nella valle dell'Adige e sui colli Euganei, aree dove si sono mantenute come relitti. Attualmente è presente in tutto il bacino del Mediterraneo, ma gravita soprattutto nel settore occidentale. Specie termofila, caratteristica della macchia mediterranea, ove costituisce complessi puri o vive in consociazione con altri elementi termofili in macchie o leccete, su terreno siliceo. In Italia è una specie autoctona ubiquitaria su tutto il territorio da 0 a 800 metri (Pignatti, 1982). Il corbezzolo predilige i terreni leggermente acidi e non tollera i terreni calcarei. Specie eliofila, vegeta preferibilmente in stazioni riparate dai venti freddi e a clima temperato. Come precedentemente detto, si trova abbondante nel sottobosco di pinete litoranee e leccete insieme con altri arbusti quali il lentisco, il leccio, la phillirea, l'erica arborea e il mirto ossia la tipica vegetazione di macchia mediterranea. La sua diffusione è stata agevolata anche dall'uomo che spesso la coltiva sia per i suoi frutti eduli, sia per il suo valore decorativo.

Per quanto riguarda l'allevamento in vivaio, le bacche di corbezzolo rappresentano un problema. Infatti, sono molto difficili da conservare sia perché i frutti carnosì interi sono soggetti ad attacchi fungini sia perché la maggior parte dei semi in essi contenuti possono germinare simultaneamente anche in uno spazio ridotto, con conseguente forte competizione. La propagazione per seme implica, dunque, la lavorazione dei semi a partire dalla macerazione dei frutti maturi (per rimuoverne la polpa), e se i semi germinano contemporaneamente in uno spazio limitato, il diradamento dei semenzali. Le bacche raccolte si immergono in acqua per alcune ore, si sciacquano in un setaccio per rimuovere i residui e, infine, sempre in acqua, si mettono in un mortaio e si schiacciano. Successivamente le bacche si immergono in acqua per altre 24 ore e si lavorano ulteriormente per liberare i semi trattenuti dalla polpa. I semi si passano poi in un frullatore, alla velocità più bassa possibile. In seguito si fanno passare attraverso una batteria di setacci con l'impiego coadiuvante di getti d'acqua a pressione. I semi così lavorati si possono conservare per brevi periodi (1-3 mesi) in sacchi di juta. Anche se non è sempre indispensabile, la stratificazione fredda delle sementi per 20-60 giorni consente una germinazione più completa e simultanea. La semina in semenzaio può essere autunnale oppure

primaverile con seme stratificato al freddo, ma i semenzali devono essere successivamente trapiantati con cura e ombreggiati accuratamente durante i mesi caldi. Per evitare lo stress da trapianto in molti casi si effettua la semina diretta in contenitori. Date le piccole dimensioni dei semi, è consigliabile coprirli con uno strato molto sottile di substrato poroso e leggero che consentirà, inoltre, l'azione positiva della luce sulla germinazione. E' possibile la propagazione vegetativa per talea (ANPA, 2001).

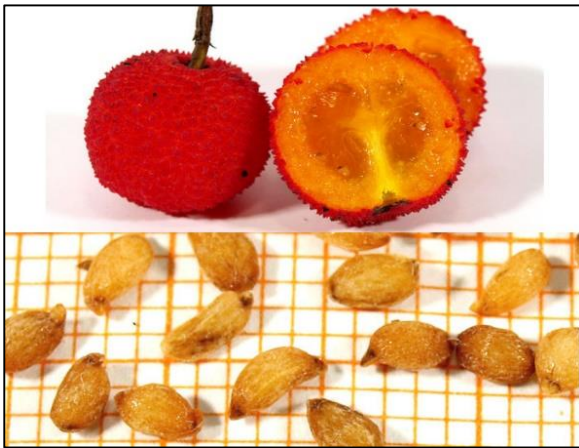


Figura 1.6 Frutti e semi di *Arbutus unedo* L.

1.7.2 *Quercus ilex* L.

Il leccio è un albero sempreverde molto importante nei Paesi del bacino mediterraneo (Barbero *et al.*, 1992), appartenente alla famiglia delle Fagaceae. È un albero molto longevo (500-1000 anni) e può raggiungere 25 metri di altezza e un diametro superiore al metro. Il tronco non è dritto e si ramifica molto presto con una chioma densa, verde scura, di forma subsferica o emisferica. Il frutto matura nello stesso anno della fioritura della pianta. L'antesi avviene nella tarda primavera mentre il frutto matura nell'autunno inoltrato. Le foglie sono persistenti e durano mediamente 2-3 anni, coriacee e con un breve picciolo tomentoso si presentano verde scuro e lucide nella pagina superiore e grigie e con una forte pubescenza nella pagina inferiore. La pianta è dotata di una spiccata eterofillia e, di conseguenza, la lamina fogliare può avere sulla stessa pianta diverse dimensioni e forme (Gellini, 1997).

I semi di questa specie sono definiti recalcitranti, ossia semi che non riescono a sopravvivere al congelamento e all'essiccazione e che, non essendo in grado di sopravvivere alla fase di disidratazione, devono necessariamente germinare in tempi brevi. Per tale motivo, per gli usi in vivaistica la loro conservazione è abbastanza difficile. Dato che il loro tasso di umidità deve rimanere intorno al 15-35%, i semi possono essere conservati, per un periodo non maggiore a un anno, in contenitori semi-aperti a basse temperature. La conservazione di semi recalcitranti è oggi considerata una delle più difficili sfide nell'ambito della vivaistica forestale e della gestione delle risorse genetiche (ANPA, 2001). Il leccio è una sclerofilla mediterranea che cresce nell'aerale circummediterraneo mancando

solo in Egitto. Si estende longitudinalmente per 6.000 chilometri dal Portogallo alla Siria e latitudinale per 1500 km dal Marocco alla Francia, dove forma boschi puri anche molto vasti nella regione occidentale, e boschi misti con altre specie in regioni che garantiscono una certa umidità, nel settore orientale (Valladares *et al.*, 2000). In Italia è maggiormente diffuso nelle isole e nelle regioni costiere del Mar Tirreno e Mar Ionio e si adatta a una vasta gamma di terreni, evitando solamente suoli abbastanza argillosi o con ristagno idrico. È una specie moderatamente igrofila ed è relativamente termofila dimostrandosi resistente al freddo, alle basse intensità luminose e alle brusche variazioni di temperatura (Gellini, 1997).

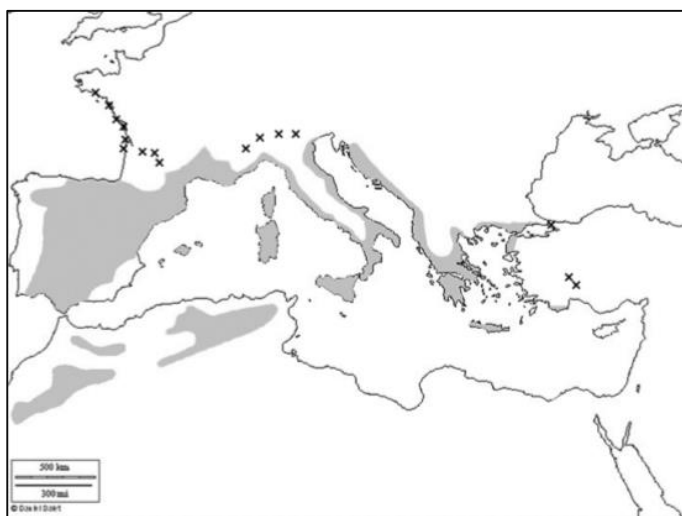


Figura 1.3 Areale di distribuzione del leccio.

1.7.3 *Myrtus communis* L.

Il mirto è una pianta della famiglia delle Myrtaceae. Il mirto è uno dei principali componenti della macchia mediterranea bassa, frequente sui litorali, dune fisse, garighe e macchie, dove vive in consociazione con altri elementi caratteristici della macchia, quali il lentisco, rosmarino ed i cisti. Forma densi cespugli resistenti al vento nelle aree a clima mite e vegeta dal livello del mare sino a 500 m s.l.m. Il mirto è una pianta rustica, si adatta ai terreni poveri e siccitosi ma trae vantaggio sia dagli apporti idrici estivi sia dalla disponibilità d'azoto, manifestando in condizioni favorevoli uno spiccato rigoglio vegetativo e un'abbondante produzione di fiori e frutti. Vegeta preferibilmente nei suoli a reazione acida o neutra, in particolare quelli a matrice granitica, mentre soffre i terreni a matrice calcarea ((Pignatti, 1982). Il mirto ha bisogno del pieno sole per lo sviluppo ottimale, anche se si adatta all'ombra del sottobosco. La corteccia è rossiccia nei rami giovani e assume un colore grigiastro nel tempo. Ha foglie opposte, persistenti, ovali-acute, coriacee, glabre e lucide, di colore verde-scuro superiormente con molti punti traslucidi in corrispondenza delle glandole aromatiche. I fiori sono solitari e ascellari, lungamente peduncolati, di colore bianco o roseo (Pignatti, 1982). La fioritura, abbondante, ha luogo nella tarda primavera e all'inizio dell'estate, da maggio a luglio. Un evento piuttosto frequente è la seconda fioritura che si può verificare in tarda estate e con autunni

caldi in ottobre. I frutti sono bacche globoso-ovoidali di colore nero-azzurastro con all'interno numerosi semi reniformi. La propagazione del mirto prevede delle tecniche di coltivazione in vitro, tramite talee oppure tramite seme. I frutti devono essere raccolti a piena maturazione. Subito dopo la raccolta è consigliato rimuovere la polpa per liberare i semi. I semi, portati a bassi livelli di umidità e sistemati in contenitori ermetici, possono essere conservati per qualche mese. La stratificazione a freddo dei semi favorisce una germinazione più completa e simultanea. La semina è generalmente tardo autunnale, subito dopo la raccolta. In alternativa, può avvenire in primavera con seme vernalizzato. La propagazione vegetativa per talea è possibile ed è da effettuare in estate utilizzando apici vegetativi o parti legnose sotterranee (ANPA, 2001).



Figura 1.4 Areale di distribuzione del mirto.

1.7.4 *Punica granatum* L.

Il melograno, specie appartenente alla famiglia delle Punicaceae, è un medio arbusto dal portamento arrotondato che produce numerosi polloni basali. Le varietà più grandi raggiungono i 5 metri di altezza. In condizioni ottimali è tra i fruttiferi più longevi poiché può superare anche i 200 anni di vita. Le foglie sono intere, glabre opposte o sub opposte, lucide, strette ed allungate. Ha foglie caduche che nei giovani germogli sono rosse diventando poi di color verde chiaro e, successivamente, aranciate prima di cadere in autunno. Ha fusto nodoso con corteccia ruvida e rugosa e rami esili, talvolta spinescenti e di colore chiaro. Il melograno è specie termo-eliofila e il suo ciclo produttivo è tipicamente primaverile-estivo (Pignatti, 1982). I fiori di un vivo colore rosso e forma tubulare si sviluppano principalmente all'apice dei rametti, presentano dimensioni di circa 3 cm di diametro con tre-quattro petali (molti di più nelle varietà ornamentali). Il frutto è una falsa bacca carnosa (detta Balausta), matura tra la fine dell'estate e l'inizio dell'autunno al cui interno sono presenti innumerevoli piccoli semi carnosì con tegumento legnoso, racchiusi in sottili membrane gialle ricche in tannini (Pignatti, 1982). Il melograno è una pianta resistente all'arido estivo ed alle temperature invernali tipiche del Mediterraneo. In ambiente ben drenato resiste agevolmente a -10 °C. Il

melograno può essere propagato per semina con una vernalizzazione del seme di circa 4-8 settimane, ma in tal caso non sono assicurate le caratteristiche della pianta madre. Più frequentemente si moltiplica in primavera per talea semilegnosa o per margotta, in quanto nelle moltiplicazioni vegetative le caratteristiche varietali sono conservate. Esistono oltre 300 ibridi di melograno e il centro israeliano dell'Università Ebraica di Gerusalemme è il maggior centro mondiale per la ricerca e l'ibridazione della specie (ANPA, 2001).

Il melograno è una delle piante da frutto coltivata da più tempo nell'area mediterranea. Ha origini asiatiche ma già in passato se ne diffuse la coltivazione nelle aree più calde ed aride del mediterraneo, dove le caratteristiche favorevoli ne permisero un eccellente sviluppo.

Originario dell'Afghanistan e della Persia, cresce spontaneo dal sud del Caucaso fino al Punjab ed è diffuso in Estremo Oriente, oltre che nei paesi del Mediterraneo. In Italia è diffuso da tempi antichissimi per uso alimentare e terapeutico nell'areale di coltivazione della vite ed è prevalentemente coltivato per i frutti o per il suo valore ornamentale. Tuttavia, dato le condizioni climatiche favorevoli alla specie è ormai inselvaticata nei giardini delle aree meridionali e centrali del nostro Paese.



Figura 1.5 Frutti e semi di *Punica granatum* L.

1.7.5 *Fagus sylvatica* L.

Il faggio, a differenza delle specie sopra descritte, è una specie centroeuropea. Le specie tipiche della macchia vengono, invece, definite stenomediterranee che in ecologia vegetale, è detto di piante con areale limitato alle coste mediterranee. Tuttavia, il faggio è una pianta che occupa una posizione importante nel bacino del mediterraneo presentando, comunque, delle esigenze ecologiche completamente diverse rispetto alle piante mediterranee in senso stretto.

Il faggio è una delle latifoglie più importanti in Italia e in Europa per l'estensione dei suoi boschi (copre circa 17 milioni di ettari), per l'impatto paesaggistico e, a livello economico, per la produzione di legna da ardere e per l'utilizzo nell'industria del mobile. Il faggio è caratterizzato da fogliame denso di forma ovale e da un fusto slanciato e dritto. La plantula ha cotiledoni grandi, semicircolari e auricolati alla base con una colorazione verde scuro sulla pagina superiore e bianco argenteo nella pagina inferiore. Le foglie primarie sono opposte, omomorfe ma più piccole e pubescenti con il margine dentato o ondulato. La corteccia, caratteristica di questa pianta, presenta un colore grigio chiaro con striature orizzontali spesso incrostata da licheni biancastri. Il frutto, la cosiddetta faggiola, è una noce con pericarpo duro, coriaceo, di colore bruno che matura verso settembre-ottobre.

I semi sono dormienti e per germinare hanno bisogno di un periodo di vernalizzazione piuttosto lungo, che può andare dai 45 giorni fino a 5 mesi. I semi di faggio vengono definiti ortodossi, ossia in grado di mantenere per lunghi periodi la facoltà germinativa se portato a un ridotto contenuto di umidità e conservato a basse temperature in contenitori ermetici, tuttavia non è facile reidratarli (APAT, 2009). L'areale di distribuzione del faggio interessa quasi l'intera Europa occidentale, dalla Scandinavia meridionale alla Sicilia settentrionale e alla Grecia. Il faggio è una pianta che resiste bene alle stazioni esposte grazie alla caducità delle foglie e alla capacità di rinnovarsi agamicamente. Inoltre, la sua distribuzione è condizionata dalla ripartizione annuale della piovosità poiché necessita di un tasso di umidità atmosferica sempre elevata. Predilige suoli freschi, profondi e drenati ma si adatta bene anche a suoli meno fertili purché non eccessivamente umidi o compatti (Gellini, 1997).

In Italia caratterizza la fascia montana, equivalente alla fascia subatlantica o al *Fagetum*, mentre è praticamente assente nella regione Sardegna e nella Pianura Padana. La distribuzione ottimale è fra 600 e 1300 metri sulle Alpi e fra i 1000 e 1700 metri sui rilievi peninsulari e delle isole. Tuttavia le faggete depresse eterotopiche del Gargano, del Lazio e della Toscana scendono a 400-500 metri (Pignatti, 1982).



Figura 1.7 Areale di distribuzione del faggio.

1.8 Scopo della tesi

Molti sono i processi responsabili della perdita di biodiversità e tra essi possiamo trovare la frammentazione o la trasformazione di habitat, l'inquinamento e i cambiamenti climatici.

Altro processo responsabile della perdita di diversità biologica è l'introduzione e la diffusione di specie alloctone. Soprattutto in ambito forestale si sono svolte numerose pratiche che hanno visto utilizzare specie vegetali non originarie del luogo, poiché ritenute più resistenti e a più rapido accrescimento. Come conseguenza di ciò si è assistito alla graduale scomparsa di alcune specie autoctone a favore delle specie introdotte. Tuttavia, il sempre più crescente interesse del nostro paese nei confronti della conservazione del patrimonio forestale, ha determinato un cambiamento nella politica dell'utilizzo di specie esotiche. In questo senso l'attività della vivaistica forestale assume un ruolo di fondamentale rilievo. Suo compito principale è quello di produrre specie che per caratteristiche genetiche, morfologiche e fisiologiche siano in grado di garantire la più alta probabilità di attecchimento. Inoltre, per favorire la tutela della specie forestali autoctone, l'attività della vivaistica forestale propone l'utilizzo di specie arboree ed arbustive che provengano da aree limitrofe alle zone di intervento. In questo modo si evita che il patrimonio forestale venga inquinato con specie alloctone, in quanto si fa uso solo di materiale di provenienza locale.

Le tecniche di vivaistica presentano la loro utilità anche di fronte ai sempre più crescenti problemi legati ai cambiamenti climatici. Soprattutto in ambiente mediterraneo, infatti, l'aumento delle temperature si presenta come una evidente fonte di stress per le piante principalmente nelle loro fase giovanile. Questo pone le ricerche relative all'ambito della vivaistica forestale in primo piano, risultando necessario un ampliamento delle tecniche di coltura in vivaio per consentire alle plantule di passare la stagione vegetativa avversa in ambienti controllati sia a livello climatico che nutritivo. Nonostante, però, molti paesi dell'Europa risultino già attivi nell'incremento delle ricerche in materia di vivaistica forestale, l'Italia si presenta con un leggero ritardo. Tuttavia a seguito dei recenti fenomeni di dissesto idrogeologico che hanno colpito il nostro paese, legati al sempre più vivo interesse di rinaturalizzazione delle aree degradate e ai progetti di conservazione della biodiversità forestale, si sta assistendo ad uno sviluppo della ricerca in campo vivaistico, che sta portando l'Italia al passo con il resto dell'Europa.

La ricerca in materia di vivaistica deve considerare diversi aspetti per permettere la produzione di materiale vegetale che possa rispondere ai requisiti richiesti in campo forestale. Tra questi aspetti uno dei più affrontati è quello dell'illuminazione delle piantine allevate. Come è noto la luce è necessaria alle piante per lo svolgimento di molti fondamentali processi, primo tra tutti la fotosintesi. Per l'allevamento delle piante in camere climatiche, è necessario riprodurre la presenza di luce in maniera corretta, soprattutto con la giusta intensità e qualità spettrale. Tra le metodologie di illuminazione

artificiale fino ad oggi più utilizzate troviamo le lampade fluorescenti, che tuttavia a causa dell'impossibilità di variazione dello spettro di luce emesso e della loro breve durata stanno progressivamente cedendo il loro posto a nuove metodologie. Tra le alternative proposte i diodi ad emissione luminosa, o LED, rispondono alla maggior parte dei requisiti richiesti in materia.

I progetti europei Regen-Forest e Zephyr hanno come obiettivo quello di sperimentare l'efficacia di lampade LED di nuova generazione durante le primissime fasi di vita della pianta (pre-coltivazione). Scopo finale è quello di ottenere una produzione economicamente e ambientalmente sostenibile di materiale forestale. A tal fine i due progetti prevedono di sviluppare un prototipo di camera di crescita da utilizzare durante la fase di pre-coltivazione, che impieghi lampade LED come fonte luminosa e dove sia possibile controllare temperatura, fotoperiodo e intensità luminosa in modo da soddisfare le esigenze di crescita delle piante.

In quest'ottica è stata sviluppata la presente tesi di dottorato, focalizzandosi sullo studio delle risposte morfometriche e metaboliche delle piante forestali alle diverse radiazioni luminose e al nuovo sistema di produzione vivaistica. Pertanto, è stata analizzata l'efficacia di diverse luci a LED durante la pre-coltivazione in ambiente controllato di alcune specie forestali tipiche dell'area mediterranea quali il leccio (*Quercus ilex* L.), il corbezzolo (*Arbutus unedo* L.), il mirto (*Myrtus communis* L.), il melograno (*Punica granatum* L.) e il faggio (*Fagus sylvatica* L.).

Le piantine sono state allevate con il nuovo metodo di coltivazione in camere di crescita, in contenitori di ridotte dimensioni e per un brevissimo periodo di coltura (Mattson *et al.*, 2010). L'efficacia dell'illuminazione a LED è stata testata in rapporto alle lampade fluorescenti in termini di crescita delle piante (variazioni in altezza, diametro, area fogliare, numero foglie e biomassa fresca e secca). Inoltre è stato analizzato il contenuto di clorofilla, dei pigmenti accessori e delle proteine. Ulteriormente, sono state analizzate le variazioni dell'attività di enzimi coinvolti nel meccanismo di assimilazione dell'azoto (Nitrato Riduttasi e Glutammina Sintetasi). Tale tipo di approccio è giustificato dal fatto che una pianta è caratterizzata da una diversa capacità fotosintetica in funzione delle condizioni ambientali di luce. Inoltre, l'azoto è fondamentale per la pianta poiché entra nella costituzione di molti composti organici ad elevato valore biologico, come per esempio gli amminoacidi, acidi nucleici, pigmenti e coenzimi partecipando alla catalisi enzimatica. Da tempo è ormai consolidata l'idea dell'esistenza di uno stretto legame tra l'attività fotosintetica e il metabolismo dell'azoto e in particolare di come i flussi di nitrato e ammonio siano integrati con il metabolismo degli acidi organici. Infatti, l'incorporazione dell'ammonio per la sintesi degli amminoacidi richiede la disponibilità di scheletri carboniosi provenienti dal processo fotosintetico. Un importante fattore per la regolazione dell'assorbimento dell'azoto è perciò la produzione di carboidrati e la loro traslocazione a livello radicale

Nonostante la luce sia necessaria per il processo fotosintetico, questa può comportare il fotodanneggiamento se le piante si trovano esposte ad una intensità luminosa che eccede la loro capacità fotosintetica. L'entità del danno viene generalmente misurata in termini di contenuto di malondialdeide (MDA) prodotto finale della perossidazione degli acidi grassi polinsaturi e dei relativi esteri. Per verificare se l'esposizione ad illuminazione LED è in grado di generare fotodanneggiamento è stato, quindi, analizzato il contenuto di MDA nelle piante allevate.

La seconda fase di questo lavoro è stata quella di valutare la risposta delle piante pre-coltivate con illuminazione a LED o fluorescente, dopo una stagione vegetativa trascorsa in serra con lo scopo di verificare la capacità di adattamento delle piante quando volta esposte ad un ambiente non più controllato. Al termine del periodo di allevamento in serra le piante sono state sottoposte ad analisi di laboratorio, valutando esclusivamente i parametri morfometrici.

Infine, trascorsa la stagione vegetativa in serra piante di *Quercus ilex* L. sono state trapiantate in pieno campo con lo scopo di verificare la capacità di sopravvivenza delle stesse una volta eseguito l'impianto e quindi poste in ambiente naturale. A tale scopo, durante il periodo di allevamento le piante sono state interessate da misurazioni di altezza e diametro.

Come previsto dal progetto europeo Regen-Forest, è stata costruita una camera di crescita sperimentale chiamata Prototipo. Di conseguenza, sono stati studiati gli effetti di questo nuovo metodo colturale sulle piantine forestali esposte ad uno dei quattro spettri LED precedentemente utilizzati nelle tradizionali camere di crescita, il quale era risultato il più adatto a sostenere lo sviluppo della gran parte delle specie forestali sperimentate nell'ambito del progetto.

2. MATERIALI E MOTODI

2.1 Preparazione dei semi

2.1.1 *Arbutus unedo* L.

I semi di corbezzolo sono stati raccolti nel mese di novembre 2013 presso il vivaio forestale del dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia (DAFNE) dell'Università degli Studi della Toscana. I semi, una volta raccolti sono stati selezionati e sottoposti al test di vitalità secondo le norme internazionali ISTA (2003) immergendo gli stessi in una soluzione all' 1% di sali di tetrazolio (bromuro di 2,3,5-trifeniltetrazolo) per 24 ore al buio e a temperatura ambiente. Il 100% dei semi ha presentato gli embrioni colorati di rosso, mostrando in questo modo la vitalità del tessuto. Dopo la raccolta, i semi di corbezzolo sono stati estratti dai frutti e fatti asciugare su carta bibula per circa 48 ore. Successivamente, i semi sono stati selezionati e posti in barattoli di vetro sterili e conservati in frigorifero alla temperatura di 4-5°C sino al momento del loro uso.

Prima della semina, i semi sono stati immersi in acqua distillata per 24 ore a 5°C. Trascorso tale periodo sono stati sterilizzati per 20 minuti in una soluzione al 20% di ipoclorito di sodio e risciacquati con acqua distillata sterile. I semi di *Arbutus unedo* L. sono dormienti pertanto hanno bisogno di essere stratificati per poter germinare. La vernalizzazione dei semi di corbezzolo prevede che gli stessi vengano disposti su di uno strato di tessuto non tessuto (TNT) posto, a sua volta, sopra un letto di perlite sostenuto da un ponte di rete metallica dalla quale dei cordoncini di cotone pescano l'acqua sterile sottostante. Oltre ai cordoncini appena menzionati, per mantenere il giusto livello di umidità dei semi, è stato aggiunto un ulteriore strato di TNT e perlite sulla sommità (Figura 2.1). La vernalizzazione, durata circa 40 giorni, è stata condotta in camera fredda alla temperatura di 4°C.

Durante la vernalizzazione è stato controllato lo stato di rigonfiamento del seme, il trattamento è stato interrotto quando i primi semi hanno iniziato il processo di germinazione, che normalmente avviene anche a basse temperature. Negli ultimi dieci giorni del processo di vernalizzazione, i semi sono stati posti al buio a 22°C, per stimolarne la contemporanea germinazione. La vernalizzazione, durata circa 40 giorni, è stata condotta in camera fredda alla temperatura di 4°C. È stato raggiunto un 90% di germinazione.



Figura 2.1 Vernalizzazione dei semi di corbezzolo.

2.1.2 *Quercus ilex* L.

I semi di leccio sono stati raccolti nell'autunno 2014 presso Villa Lante sita a Bagnaia (in provincia di Viterbo). A seguito della raccolta, il materiale è stato immediatamente selezionato scartando i semi eccessivamente disidratati, infestati da insetti o con lesioni evidenti. Come precedentemente descritto, i semi di leccio sono recalcitranti e per la loro conservazione è stato utilizzato il metodo Suszka (2000). Tale metodo prevede l'utilizzo di un contenitore chiuso non ermeticamente e dotato al suo interno di un tubo perforato per lo scambio di aria (Figura 2.2). Al fine di evitare una eccessiva disidratazione del seme, nel contenitore è stata aggiunta della perlite. Prima di cominciare la sperimentazione i semi sono stati immersi in acqua per 24 ore sia per consentirne la loro totale imbibizione sia per separare i semi vani, i quali al termine del periodo di immersione galleggeranno. Le ghiande utilizzate per la sperimentazione sono state private di un terzo dei cotiledoni (come raccomandato dalle norme internazionali ISTA) e fatte germinare in un contenitore (contenente perlite sterile) al buio, a 20° C e per circa 5-7 giorni o comunque fino a quando le radici non avessero raggiunto una lunghezza di 2-3 mm. È stato raggiunto un 90% di germinazione.



Figura 2.2 Ghiande conservate con il metodo Suszka.

2.1.3 *Myrtus communis* L.

I semi di mirto sono stati raccolti nel mese di ottobre 2013 presso il vivaio forestale del dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia (DAFNE) dell'Università degli Studi della Toscana. I semi, una volta raccolti sono stati selezionati e sottoposti al test di vitalità secondo le norme internazionali ISTA (2003), immergendo gli stessi in una soluzione all' 1% di sali di tetrazolio (bromuro di 2,3,5-trifeniltetrazolo) per 24 ore al buio e a temperatura ambiente. Gli enzimi deidrogenasi, che sono attivi solamente nei semi vitali, rendono il tetrazolio solubile di colore rosso che, a sua volta, colora gli embrioni vitali. Il 100% dei semi ha presentato gli embrioni colorati di rosso, mostrando in questo modo la vitalità del tessuto. Dopo la raccolta, i frutti di mirto sono stati selezionati e fatti asciugare su carta bibula per circa 48 ore. Successivamente, i frutti sono stati posti in barattoli di vetro sterili e conservati in frigorifero alla temperatura di 4-5°C, sino al momento del loro uso.

Prima della semina, i semi estratti dalle bacche sono stati immersi in acqua distillata per 24 ore a 5°C. Trascorso tale periodo sono stati sterilizzati per 20 minuti in una soluzione al 20% di ipoclorito di sodio e risciacquati con acqua distillata sterile. I semi di *Myrtus communis* L. sono dormienti pertanto hanno bisogno di essere stratificati per poter germinare. La vernalizzazione dei semi di mirto viene effettuata utilizzando le stesse metodologie già descritte per il corbezzolo nel paragrafo precedenti (Figura 2.3). Anche in questo caso, la vernalizzazione, durata circa 40 giorni, è stata condotta in camera fredda alla temperatura di 4°C. È stato raggiunto un 90% di germinazione.



Figura 2.3 Vernalizzazione dei semi di mirto.

2.1.4 *Punica granatum* L.

I semi di melograno sono stati raccolti nel mese di novembre 2014 presso alberature presenti a Viterbo. Anche per il melograno, come per il mirto, i semi una volta raccolti sono stati selezionati e sottoposti al test di vitalità secondo le norme internazionali ISTA (2003) immergendo gli stessi in una soluzione all' 1% di sali di tetrazolio (bromuro di 2,3,5-trifeniltetrazolo) per 24 ore al buio e a

temperatura ambiente. L'80% dei semi ha presentato gli embrioni colorati di rosso, mostrando in questo modo la vitalità del tessuto. Successivamente, i semi estratti dal frutto sono stati separati dalla loro parte carnosa utilizzando una centrifuga. Dopo la pulizia, i frutti di melograno sono stati selezionati e fatti asciugare su carta bibula per circa 24 ore. Trascorso tale periodo sono stati sterilizzati per 20 minuti in una soluzione al 20% di ipoclorito di sodio e risciacquati con acqua distillata sterile. I semi di *Punica granatum* L. sono dormienti pertanto hanno bisogno di essere stratificati per poter germinare. La vernalizzazione dei semi di melograno viene effettuata utilizzando le stesse metodologie già descritte per il mirto nel paragrafo precedente (Figura 2.4). Per il *Punica granatum* L. è stato raggiunto un 80% di germinazione.



Figura 2.4 Vernalizzazione dei semi di melograno.

2.1.5 *Fagus sylvatica* L.

I semi di faggio sono stati raccolti nell'autunno 2013 nella faggeta vetusta situata sui Monti Cimini (Viterbo). I semi, una volta raccolti sono stati selezionati e sottoposti al test di vitalità secondo le norme internazionali ISTA (2003) immergendo gli stessi in una soluzione all'1% di sali di tetrazolio (bromuro di 2,3,5-trifeniltetrazolo) per 24 ore al buio e a temperatura ambiente. Il 75% dei semi ha presentato gli embrioni colorati di rosso, mostrando in questo modo la vitalità del tessuto. Successivamente, i semi da utilizzare nelle prove sperimentali sono stati immersi in acqua per 24 ore sia per consentirne la loro totale imbibizione sia per separare i semi vani, i quali al termine del periodo di immersione galleggeranno. I semi di faggio sono dormienti pertanto hanno bisogno di essere vernalizzati a 4°C per 3-5 mesi per poter germinare, per cui i semi sono stati immersi per 24 ore in acqua corrente e successivamente sono stati trattati con una soluzione al 18% NaClO (6% di Cl attivo, candeggina commerciale) per 20 minuti e infine risciacquati con acqua distillata. La vernalizzazione del faggio prevede che i semi vengano sistemati su agriperlite disposta su tessuto non tessuto, poggiato a sua volta su un ponte di rete metallica. L'umidità dei semi è stata assicurata da cordoncini di cotone che pescano nell'acqua sterile sottostante (Figura 2.5). La stratificazione a freddo è stata

condotta a +4° C per 4 mesi, o fino a quando non è iniziata la germinazione. Inoltre, durante la vernalizzazione lo stato dei semi è stato controllato periodicamente ogni 5 giorni per ispezionare il rigonfiamento del seme o l'insorgenza di eventuali muffe. Quando i semi hanno mostrato una radichetta di 0.5-1 cm sono stati utilizzati per la semina.



Figura 2.5 Vernalizzazione dei semi di faggio.

2.2 Contenitori e substrato di crescita

In tutte le condizioni di allevamento in ambiente controllato testate, i contenitori utilizzati per la crescita sono contenitori alveolari QPD144 QuickPot (HerkuPlast-Kubern, Germania) aventi dimensioni 310x530 mm, con una densità di produzione di 870 piante per m², con un'altezza di 60 mm e un volume di substrato di 28 cc (Figura 3.6). Tali contenitori consentono di promuovere l'*air pruning* dell'apparato radicale, stimolando le piantine a produrre numerose radici laterali lungo l'asse principale aumentando, in questo modo, la superficie di assorbimento radicale e favorendo un migliore attecchimento dopo il trapianto. I contenitori sono stati posti su dei vassoi di plastica (Herkuplast-Kubern, Germania) e collocate all'interno delle camere di crescita.

Successivamente, le piante sono state rimosse dai contenitori e trapiantate in contenitori più grandi per l'allevamento in serra. I contenitori utilizzati per la fase di sperimentazione in serra sono contenitori alveolati QPD 40T/18 QuickPot (HerkuPlast-Kubern, Germania) (Figura 3.7) aventi dimensioni 396x296 mm con un'altezza di 185 mm.

Come substrato di crescita, sia per l'allevamento in ambiente controllato che in serra, è stato utilizzato il terreno denominato DAFNE prodotto dal dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia dell'Università degli Studi della Tuscia. Il terreno DAFNE contiene 65% di terriccio commerciale, 30% di agriperlite, 5% di sabbia e presenta un pH pari a 6.0. Prima della semina il terreno è stato trattato con una soluzione fungicida 1.5% (w/v) Teldor (Bayer) per evitare la comparsa di muffe.



Figura 2.6 Contenitori alveolari QPD144 QuickPot.

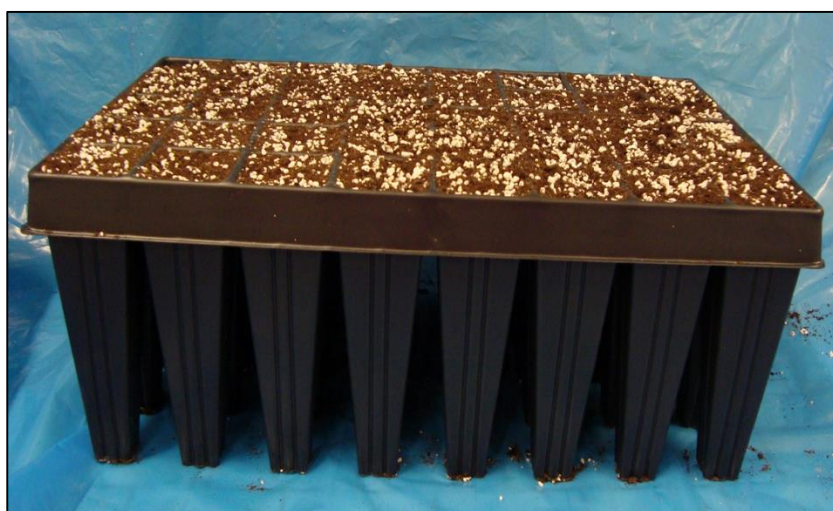


Figura 2.7 Contenitori alveolari QPD 40T/18 QuickPot.

2.3 Condizioni di allevamento

2.3.1 *Regen forest*

Nell'ambito del progetto europeo Regen Forest sono state valutate le risposte alle diverse luci di *Arbutus unedo* L.

Come previsto dal progetto di ricerca, sono state testate nelle tradizionali camere di crescita quattro diverse lampade LED di nuova generazione (Figura 3.8), fornite dalla ditta Valoya partner del progetto. I risultati ottenuti sono stati valutati in rapporto alle lampade fluorescenti OSRAM (L 36W/77 Fluora). Le lampade LED utilizzate sono basate sulla nuova tecnologia Valoya che produce uno spettro ampio e continuo grazie a una miscela di LED blu (photosynthetic photon flux PPF 400-500 nm), verde (PPF 500-600 nm), rosso (PPF 600-700 nm) e rosso lontano (PPF 700-800 nm), mentre i LED attualmente in commercio hanno una combinazione di diodi rossi e blu, tralasciando le

altre lunghezze d'onda della luce. Le caratteristiche delle lampade LED utilizzate sono riportate nella tabella seguente:

%380-829	AP67	AP67-ARCH	NS2	G2
380/400	0	0	1,8	0
400/500	12,7	15,7	22,3	7,6
500/600	15,8	25,2	40,6	2,4
600/700	52,7	44,8	33,1	63,6
700/750	13,9	10,6	1,6	19,5
751/829	4,7	3,6	0,5	6,8
R:FR ratio	3,3	3,7	26,0	2,7

Tabella 1 Caratteristiche delle lampade LED utilizzate per il progetto Regen Forest.

Nello specifico:

LED AP67: luce composta per la maggior parte dallo spettro rosso, con percentuali di verde, blu e rosso lontano. Questo spettro è stato utilizzato con successo per la crescita di specie orticole e di fiori.

LED AP67-ARCH: luce composta per la maggior parte dallo spettro rosso, con percentuali di verde e blu. La luce prodotta da queste lampade è percepita dall'occhio umano di colore bianco ed è stata scelta per la sua alta affinità con le lunghezze d'onda assorbite dalle piante superiori. Rispetto alla lampada AP67 ha una maggiore quantità di luce verde e una minore di rosso lontano.

LED NS2: spettro costituito principalmente dalla luce verde, rossa e blu. Questa lampada ad alta intensità luminosa è lo spettro che più si avvicina alla luce solare. Questo LED ha la caratteristica di impedire alla pianta di subire uno stress quando trapiantata in campo aperto o esposta ai raggi solari.

LED G2: si differenzia dagli altri spettri per la massiccia presenza di rosso e rosso lontano e le basse percentuali di luce blu e verde. Infatti, è caratterizzata da un colore rosso-viola molto intenso. La lampada è stata scelta in base ad alcuni risultati positivi di uno studio pilota effettuato su piante di abete rosso.



Figura 2.8 Camere di crescita con, a partire da in alto a sinistra, lampade AP67, G2; AP67-ARCH e NS2. L'ultima foto mostra la camera di crescita utilizzata con le tradizionali lampade fluorescenti.

Nelle camere di crescita sono stati impostati i seguenti parametri: fotoperiodo di 14 h di luce, umidità relativa (RH) del $70\pm 10\%$, temperatura giorno/notte 22 ± 1 °C e intensità luminosa pari a $120 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ (l'intensità luminosa è stata misurata manualmente, sulla parte superiore della pianta, tramite un fotoradiometro HD 2302.0 LightMeter Delta Ohm).

Il periodo di allevamento per la specie oggetto di studio è stato di 52 giorni. L'annaffiatura è stata effettuata ogni due giorni. Durante il periodo di pre-coltivazione non sono stati utilizzati pesticidi, fungicidi e fertilizzanti.

Al termine del periodo di pre-coltivazione, le piante sono state trapiantate in contenitori QPD 40T/18 QuickPot e allevate nella serra sita nel vivaio forestale del DAFNE, per un periodo culturale di circa 164 giorni, per l'ambientamento alle condizioni naturali. L'annaffiatura in serra è stata effettuata ogni giorno.

2.3.2 Il Prototipo

Come precedentemente detto, il progetto Regent-Forest prevedeva la produzione di una camera di crescita innovativa e altamente specializzata definita Prototipo. E' stato valutato l'effetto di questa camera di crescita sullo sviluppo di *Arbutus unedo* L. in rapporto alle camere di crescita tradizionali montanti le lampade LED AP67.

Il prototipo è basato su un'unità di produzione multi-livello con una tecnologia che automatizza il movimento rotatorio di vassoi rimovibili in ambiente controllato garantendo condizioni climatiche uniformi per tutte le piantine, un notevole risparmio di spazio e un ridottissimo consumo energetico e la possibilità di sviluppare protocolli standard di crescita per la produzione certificata del materiale pre-coltivato per la rigenerazione forestale (Ortolani *et al.*, 2014).

Il Prototipo è composto da 10 ripiani in continuo movimento rotatorio e illuminati da solo tre lampade LED fisse AP67. I ripiani compiono un giro completo nell'arco di 136 secondi ed ognuno di essi può contenere 3 contenitori alveolari QPD144 QuickPot.



Figura 2.9 Particolare delle tre lampade LED AP67 utilizzate nel Prototipo. Nella foto è possibile notare la possibilità di riporre per ogni ripiano tre contenitori alveolari QPD144 QuickPot.

Poiché il Prototipo si presenta come una unità automatizzata, al fine di impostare le condizioni ambientali idonee all'allevamento delle specie, viene utilizzato un computer esterno (PLC) che può essere programmato in modo da ottenere i parametri desiderati. Inoltre, il computer permette di gestire l'accensione e lo spegnimento delle lampade per determinare uno specifico fotoperiodo. Ulteriormente, il PLC consente di programmare l'impianto di irrigazione di cui il Prototipo è dotato. In tal modo, non soltanto è possibile impostare il momento di attivazione dell'impianto di irrigazione, ma anche la durata e l'eventuale ripetizione dell'annaffiatura.



Figura 2.10 Particolare del PLC e dell'impianto di irrigazione.

Nel caso di studio, all'interno del Prototipo sono stati impostati i seguenti parametri: fotoperiodo di 16 h di luce, umidità relativa (RH) del $75 \pm 10\%$, temperatura giorno/notte 25 ± 1 °C e intensità luminosa pari a $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Il periodo di allevamento per *Arbutus unedo* L. è stato di 52 giorni. L'irrigazione è stata effettuata ogni due giorni. Anche in questo caso, durante il periodo di pre-coltivazione non sono stati utilizzati pesticidi, fungicidi e fertilizzanti.

Come per le precedenti, anche le piante allevate nel prototipo al termine del periodo di pre-coltivazione sono state trapiantate in contenitori QPD 40T/18 QuickPot per il periodo di allevamento in serra per un ciclo colturale di circa 164 giorni. L'annaffiatura in serra è stata effettuata ogni giorno.

2.3.2 Zephyr

Nell'ambito del progetto europeo Zephyr sono state valutate le risposte alle diverse luci di *Myrtus communis* L., *Punica granatum* L., *Quercus ilex* L. e *Fagus sylvatica* L. Come previsto dal progetto di ricerca, sono state testate cinque diverse lampade LED fornite dalla ditta Valoya (partner del progetto). I risultati ottenuti sono stati valutati in rapporto alle lampade fluorescenti OSRAM (L

36W/77 Fluora). Nel caso del progetto Zephyr si è scelto di creare un ambiente climatizzato all'interno di una stanza, con diversi scaffali ognuno montante una lampada diversa, piuttosto che utilizzare le tradizionali camere di crescita (Figura 3.9). Il motivo di questa scelta è da ricercare nel fatto che il progetto nasce per rivolgersi alle piccole e medie imprese, per le quali la spesa di una camera di crescita potrebbe risultare piuttosto onerosa.



Figura 2.11 La stanza climatizzata Zephyr.

Le caratteristiche delle lampade LED utilizzate sono riportate nella tabella seguente:

%400-800	AP673L	AP67 BARs	AP67 TUBEs	NS1	G2
400/500	11,9	13,8	10,5	20,2	7,7
500/600	19,3	15,1	26,2	38,9	2,4
600/700	60,5	53	48,9	35,7	64,4
700/800	8,3	18,1	14,4	5,2	25,5

Tabella 2 Caratteristiche delle lampade LED utilizzate per il progetto Zephyr.

Nello dettaglio:

LED AP67 3L: emette luce composta per la maggior parte dallo spettro rosso, con percentuali di verde, blu e giallo. Presenta una piccola percentuale anche di rosso lontano ed è assente la componente UV. Questo spettro è utilizzato prevalentemente per la crescita di specie di orticole. Lo spettro AP67 3L fornisce ottimi risultati in termini di biomassa fresca e secca.

LED AP67 BARs: presenta le caratteristiche della serie AP67 delle lampade prodotte dalla ditta Valoya (luce composta per la maggior parte dallo spettro rosso, con percentuali di verde, blu e rosso lontano) rispetto ad esse, tuttavia, appartiene alla categoria denominata *B-series*. Le luci della *B-series* presentano i LED di forma tubulare adatti, quindi, per l'installazione dove è richiesta omogeneità

nell'illuminazione. La forma di queste lampade permette un loro ottimale utilizzo in serre, camere di crescita e per la coltivazione in idroponica.

LED AP67 TUBEs: come la precedente presenta la caratteristiche della serie AP67, tuttavia presenta una maggiore percentuale di verde. Questo spettro è stato utilizzato per la crescita di specie orticole e di fiori.

LED NS1: spettro costituito principalmente dalla luce verde, rossa e blu. Come precedentemente detto, la serie NS delle lampade Valoya è la serie dove gli spettri più si avvicinano alla luce solare. Per tale motivo, NS1 può essere impiegato in camere di crescita dove è necessario riprodurre la luce presente in campo aperto. La luce prodotta dalla lampada NS1 viene percepita dall'occhio umano di colore bianco.

LED G2: come precedentemente detto, si differenzia dagli altri spettri per la massiccia presenza di rosso e rosso lontano e le basse percentuali di luce blu e verde. Lo spettro G2 ha dato ottimi risultati nel ridurre i tempi di vernalizzazione dei semi.

All'interno della stanza climatizzata i parametri venivano costantemente monitorati al fine di garantire l'uniformità dei valori impostati. Durante il periodo di pre-coltivazione sono stati impostati i seguenti parametri: fotoperiodo di 12 h di luce, umidità relativa (RH) del $60\pm 70\%$, temperatura giorno/notte 22 ± 1 °C e intensità luminosa pari a $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (l'intensità luminosa è stata misurata manualmente, sulla parte superiore della pianta, tramite un fotoradiometro HD 2302.0 LightMeter Delta Ohm).

Il periodo di allevamento per *Myrtus communis* L. e *Punica granatum* L. è stato di 52 giorni, mentre per *Quercus ilex* L. e *Fagus sylvatica* L. è stato di 30 giorni. L'annaffiatura è stata effettuata ogni tre giorni. Durante il periodo di pre-coltivazione non sono stati utilizzati pesticidi, fungicidi e fertilizzanti.

Al termine del periodo di pre-coltivazione, le piante sono state trapiantate in contenitori QPD 40T/18 QuickPot e trasportate nella serra del dipartimento DAFNE, per verificare le capacità di ambientamento alle condizioni naturali per un periodo colturale di circa 164 giorni. L'annaffiatura in serra è stata effettuata ogni giorno.

Al termine della stagione vegetativa trascorsa in serra, piante di *Quercus ilex* L. allevate sia con luci LED che con lampade fluorescenti sono state trasferite in pieno campo. Una volta prelevati dalla serra limitrofa al campo sperimentale, le piante sono state estratte delicatamente dai contenitori QuickPot cercando di lasciare il più integro possibile il pane di terra e, quindi, trasferite in campo. Precedentemente, nell'area di impianto è stato disposto un telo pacciamante (per ridurre la presenza di piante infestanti) e un sistema di irrigazione a goccia automatizzato che ha fornito acqua alle piante

due volte al giorno. L'impianto è stato strutturato prevedendo per ogni spettro una disposizione casuale di cinque ripetizioni di 12 piante ciascuna.

2.4 Analisi morfometriche

Al fine di testare l'efficacia delle luci LED previste dai progetti Regen Forest e Zephyr, nonché per verificare la validità del Prototipo Regen Forest, lo studio morfometrico è stato applicato egualmente a tutte le tesi sperimentali e su tutte le specie oggetto di studio. Le stesse analisi, e nelle stesse modalità, sono state effettuate al termine del periodo di allevamento in serra per verificare l'adattabilità delle piante studiate nei due progetti di ricerca.

Durante il periodo di pre-coltivazioni le piante di tutte le condizioni di allevamento in ambiente controllato testate, sono state osservate due volte e ne sono state misurate le variazioni in termini di altezza e numero di foglie fino al termine del trattamento. Per quanto riguarda l'allevamento in serra l'osservazione è stata svolta ogni 15 giorni.

Al termine dell'allevamento in ambiente controllato ed in serra su tutte le piante ottenute e per ciascuna condizione sperimentale, sono state misurate:

- altezza finale dell'epicotile;
- altezza finale dell'ipocotile (per mirto, melograno e faggio);
- numero delle foglie.

Inoltre, un campione casuale è stato sottoposto ad analisi distruttive per determinare la biomassa fresca di radici, fusti e foglie a seguito di valutazione ottenuta con pesatura su bilancia di precisione (Explorer).

Successivamente, tutte le foglie prelevate dai campioni sono state scansionate per il calcolo dell'area fogliare attraverso il sistema operativo Digimizer.

In seguito le foglie, i fusti e le radici sono stati posti in stufa (Heraeus CPM Scientifica Roma) a 105°C per 24 ore. Al termine di tale periodo, i campioni sono stati pesati su bilancia di precisione al fine di stimare la biomassa secca.

I risultati ottenuti dalle piante allevate in ambiente controllato ed in serra sono stati confrontati con quelli ottenuti dai semenzali cresciuti utilizzando le tradizionali lampade fluorescenti. Per quanto riguarda i risultati ottenuti dalle piante allevate nel Prototipo Regen Forest, questi sono stati confrontati con quelli ottenuti dalle piante allevate sotto il medesimo spettro luminoso nella camera di crescita tradizionale (AP67). La stessa modalità di confronto è stata effettuata per le piante allevate nel Prototipo e trasferite in serra al termine del periodo di pre-coltivazione.

Infine, le piante di leccio utilizzate per la fase sperimentale in pieno campo sono state interessate da misurazioni di altezza con cadenza settimanale e da osservazioni in termini di accrescimento

diametrico effettuate a 7 e a 56 giorni dopo l'impianto. I risultati ottenuti sono stati confrontati con piante di *Quercus ilex* L. allevate con lampade fluorescenti.



Figura 2.12 Piante di *Quercus ilex* L. a seguito dell'impianto a terra.

2.5 Analisi biochimiche

Al fine di testare ulteriormente l'efficacia delle luci LED previste dai progetti Regen Forest e Zephyr, nonché per verificare la validità del Prototipo Regen Forest, è stata analizzata la risposta fisiologica all'esposizione a diversi tipi di luce delle specie oggetto di studio. Tale approccio è stato applicato a tutte le tesi sperimentali. Poiché le condizioni di allevamento in serra non presentavano più alcuna differenza che potesse influenzare i meccanismi di risposta metabolici delle piante, non sono state effettuate analisi di tipo biochimico al termine del ciclo colturale in serra.

2.5.1 Estrazione degli enzimi

L'estrazione degli enzimi è stata effettuata sul tessuto fogliare (circa 1,0 g di peso fresco). I tessuti sono stati polverizzati in un mortaio in N₂ liquido e omogeneizzati con un tampone di estrazione a pH 7.4 contenente HEPES-KOH 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, glicerolo 10% (v/v), Triton X-100 0.1% (v/v), DTT 5 mM, PMSF 1 mM e PVPP 1% (w/v) e aggiunto in un rapporto 1:7 (g.p.f: ml di tampone). L'omogenato è stato quindi filtrato attraverso 4 strati di garza e centrifugato a 1000 g per 5 min a 4°C. Il surnatante è stato recuperato e nuovamente centrifugato a 15000 g per 5 min ed il risultante surnatante è stato suddiviso in aliquote da 0,3 ml, successivamente congelate in N₂ liquido e conservate a -80 °C fino al momento dell'uso. Tutte le fasi dell'estrazione sono state condotte alla temperatura di circa 4 °C, al fine di minimizzare il danneggiamento delle attività enzimatiche da saggiare.

2.5.2 Determinazione del contenuto di clorofilla totale e carotenoidi nelle foglie

Per la determinazione del contenuto di clorofilla e di carotenoidi è stato utilizzato il metodo descritto da Winterman e De Mots (1965). A 0,1 ml di omogenato, ottenuto come descritto in precedenza, è

stato aggiunto etanolo per un volume finale di 1,0 ml. Dopo una centrifugazione a 13000 g per 5 min. l'assorbanza dei campioni è stata letta a 649 nm e 665 nm per la clorofilla e a 470 nm per i carotenoidi. I valori di clorofilla totale e carotenoidi totali sono stati calcolati utilizzando le seguenti espressioni:

$$\begin{array}{ll}
 \text{Contenuto di clorofilla a (Chla)} & (13.7 \times A_{665}) - (5.76 \times A_{649}) \\
 \text{Contenuto di clorofilla b (Chlb)} & (25.8 \times A_{649}) - (7.6 \times A_{665}) \\
 \text{Contenuto di clorofilla totale} & (6.1 \times A_{665}) + (20.04 \times A_{649}) \\
 \text{Contenuto di carotenoidi} & \frac{(1000 \times A_{470}) - (2.13 \times \text{Chla}) - (97.64 \times \text{Chlb})}{209}
 \end{array}$$

I valori sono espressi come mg g⁻¹ di peso fresco.

2.5.3 Determinazione del contenuto di proteine

La determinazione del contenuto di proteine negli estratti ottenuti utilizzando la metodica descritta nel paragrafo 2.5.1, è stata effettuata seguendo il metodo descritto da Bradford (1976). Tale metodo si basa sull'utilizzo di una sonda colorimetrica, il cromoforo Coomassie Brilliant Blue G 250, caratterizzata dal modificare il proprio spettro di assorbimento in seguito al suo legame con le proteine. Quando il cromoforo si lega alle proteine in un ambiente mediamente acido si osserva infatti lo spostamento del suo picco di assorbimento da 465 nm a 595 nm, con conseguente cambiamento del colore da rosso a blu. Aliquote variabili di estratto sono state diluite in H₂O deionizzata in un volume finale di 1 ml. Ai campioni è stato poi aggiunto 1 ml di Coomassie Protein Assay Reagent e dopo 10 min è stata effettuata la lettura dell'assorbanza a 595 nm. Il contenuto proteico dei vari estratti è stato determinato confrontando i relativi valori d'assorbanza registrati con una retta di taratura ricavata utilizzando una serie di concentrazioni note di albumina di siero bovina (BSA) (da 0 a 20 µg di BSA). Il contenuto di proteine è espresso come mg g⁻¹ di peso fresco.

2.5.4 Determinazione dell'attività dell'enzima Nitrato Riduttasi

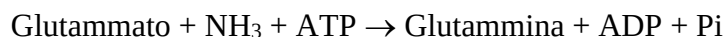
L'azoto è il più importante macronutriente per le piante poiché implicato nella produzione di composti organici ad alto valore biologico come amminoacidi, proteine e acidi nucleici. Inoltre è noto che l'attività fotosintetica è strettamente legata al metabolismo dell'azoto. Infatti, l'incorporazione di ammoniaca per la sintesi degli aminoacidi richiede la disponibilità di scheletri carboniosi derivanti dal processo fotosintetico.

L'enzima nitrato riduttasi (NR) catalizza la riduzione dei nitrati a nitriti, e l'attività di tale enzima nelle piante oggetto di studio, è stata determinata come descritto da Faleiros e Cazetta (1996). In particolare, 300 mg di foglie sono state incubati in 10 ml di un mezzo contenente 200 mM KH₂PO₄-NaOH (pH 7,4), 60 mM KNO₃, 1% (v / v) di Isopropanolo e 0,1% (v / v) Triton X-100 ed incubato al buio per 60 minuti. L'NO₂⁻ prodotto dall'azione dell'enzima NR è stato determinato miscelando di 500 µl di mezzo di incubazione a 500 µl di sulfanilamide 1% e 500 µl di NED 0,02%. Dopo 20

minuti, la soluzione è stata diluita con 3 ml di acqua deionizzata, e l'assorbanza è stata misurata mediante spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 540 nm. Per calcolare la quantità di NO₂ contenuta nel campione, una curva standard è stata preparata nello stesso modo del campione, ma con aliquote di 500 µl di soluzioni standard di NaNO₂ (contenenti da 0 a 200 µl NO₂⁻ 0,1 mM). L'attività della NR è stata espressa come µmol h⁻¹ g⁻¹ peso fresco.

2.5.5 Determinazione della Glutammina Sintetasi (GS)

L'enzima GS (E.C.6.3.1.2.), è l'enzima responsabile dell'assimilazione dell'NH₃ nelle piante.



Il saggio è stato condotto in un volume finale di 500 µL. A 100 µl di estratto sono stati aggiunti Tris 100 mM (pH 7,8), MgSO₄ 20 mM, Na₂EDTA 1 mM, DTT 2 mM, Na Glutammato 50 mM, HONH₃Cl 37,5 mM e KOH 37,5 mM. La reazione enzimatica veniva innescata mediante l'aggiunta di ATP 16 mM ed è stata condotta alla temperatura di 30°C in agitazione costante (Astolfi *et al*, 2004).

Dopo 30 min. la reazione è stata bloccata mediante l'aggiunta di 0,7 ml di una soluzione contenente FeCl₃ 0,65 M; HCl 0,37 M e TCA al 20% (w/v). I campioni sono stati sottoposti a centrifugazione e successivamente sono state effettuate le letture dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 540 nm (Astolfi *et al.*, 2004). L'attività della GS è stata determinata usando una curva standard ottenuta con quantità crescenti di γ-glutamyl-idrossammato 3mM. L'attività enzimatica della GS è espressa come µmol mg⁻¹ proteina min⁻¹.

2.5.6 Determinazione del contenuto di malondialdeide (MDA)

Il livello di perossidazione dei lipidi è stato determinato utilizzando come indice la concentrazione di malondialdeide (MDA), come descritto da Astolfi e Zuchi (2012). La determinazione della concentrazione di malondialdeide (MDA) rappresenta una stima del processo di perossidazione dei lipidi causato da stress endogeno o esogeno. L'aumento dei livelli di malondialdeide è considerato un indice di stress ossidativo a carico di componenti fondamentali dell'integrità cellulare, quali i fosfolipidi delle membrane biologiche. Per la determinazione del contenuto di MDA nei tessuti vegetali è stata sfruttata la reazione con l'acido tiobarbiturico (TBA) con la conseguente formazione di due molecole d'acqua e di un complesso MDA-TBA di colore rosso, che presenta un picco di massimo assorbimento a 532-535 nm. In breve, il tessuto fogliare (circa 0.5 g di peso fresco) delle piante è stato polverizzato in un mortaio con N₂ liquido e omogeneizzato in 5,0 ml di tampone di estrazione contenente TBA 0,25% (w/v) (acido tiobarbiturico) in TCA (acido tricloroacetico) 10%. L'omogenato è stato quindi incubato in un termo blocco preriscaldato a 95°C per 30 minuti. Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati raffreddati rapidamente in ghiaccio. L'omogenato è stato filtrato attraverso due strati di garza e centrifugato a 10000 g per 10 minuti a 2° C. L'assorbanza del surnatante è stata misurata a 532 nm e la correzione della torbidità non specifica è stata ottenuta

sottraendo il valore di assorbanza determinato a 600 nm. Il livello di perossidazione lipidica è stato espresso come nmol MDA g⁻¹ peso fresco utilizzando un coefficiente di estinzione di 155 mM cm⁻¹.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 *Arbutus unedo* L.

Vengono di seguito riportati i risultati e la discussione relativa agli esperimenti condotti sulle piante di corbezzolo coltivate sia in ambiente controllato (camere di crescita e Prototipo) sia in seguito al periodo di adattamento in serra.

3.1.1 *Allevamento in camere di crescita tradizionali*

Dopo un periodo di allevamento di 52 giorni in camere di crescita tradizionali, le plantule di corbezzolo sono stati valutati diversi parametri morfometrici e biochimici al fine di valutare gli effetti di diverse luci LED rispetto alla luce fluorescente.

L'andamento dell'incremento in termini di altezza rilevato sul corbezzolo durante il periodo di allevamento, inizialmente ha evidenziato NS2 come la lampada con migliori risultati. A partire dal 35° giorno, tuttavia, la lampada AP67 si è dimostrata la più efficace (Figura 3.1). Tale risultato si è manifestato anche nei rilievi dei parametri finali di altezza del fusto e numero delle foglie. Infatti, le piante allevate sotto AP67 presentavano valori di 1,40 cm in altezza contro gli 0,98 cm delle piante allevate con luce fluorescente (Figura 3.2). Per quanto riguarda il numero di foglie le prime presentavano una media di 3,95 contro i 3,58 presentati dalle piante controllo (Figura 3.3). In generale, tutte le piante allevate sotto luce LED (tranne quelle allevate sotto AP67-ARCH), presentavano valori di altezza e numero di foglie superiori rispetto alle piante allevate con luce fluorescente.

Gli esperimenti condotti hanno evidenziato un effetto negativo delle luci LED sull'incremento in termini diametrici del fusto (Figura 3.4). Questo parametro era indipendente dalla luce LED utilizzata. Analizzando i valori ottenuti riguardo alla biomassa fresca e secca, significativi risultati si sono osservati soprattutto a livello della biomassa radicale. Infatti, in questo caso tutte le luci LED utilizzate hanno comportato un incremento della biomassa radicale sia fresca che secca, rispetto alle piante controllo. Specialmente la lampada AP67 (come possibile notare in figura 3.5) ha determinato una media di 0,049 g per la biomassa fresca e 0,010 g per la biomassa secca. Le piante allevate sotto fluorescenza presentavano, invece, valori di 0,016 g per la biomassa fresca e 0,005 g per la biomassa secca. Valutando i risultati ottenuti per la biomassa del fusto (Figura 3.6) e delle foglie (Figura 3.7), solamente la lampada AP67 ha determinato incrementi statisticamente significativi rispetto alle piante controllo.

Ulteriore analisi è stata effettuata valutando l'area media fogliare. Anche in questo caso la lampada AP67 si è manifestata come la luce determinante incrementi statisticamente significativi ($0,96 \text{ cm}^2$) rispetto alla tradizionale luce fluorescente ($0,79 \text{ cm}^2$) (Figura 3.8).

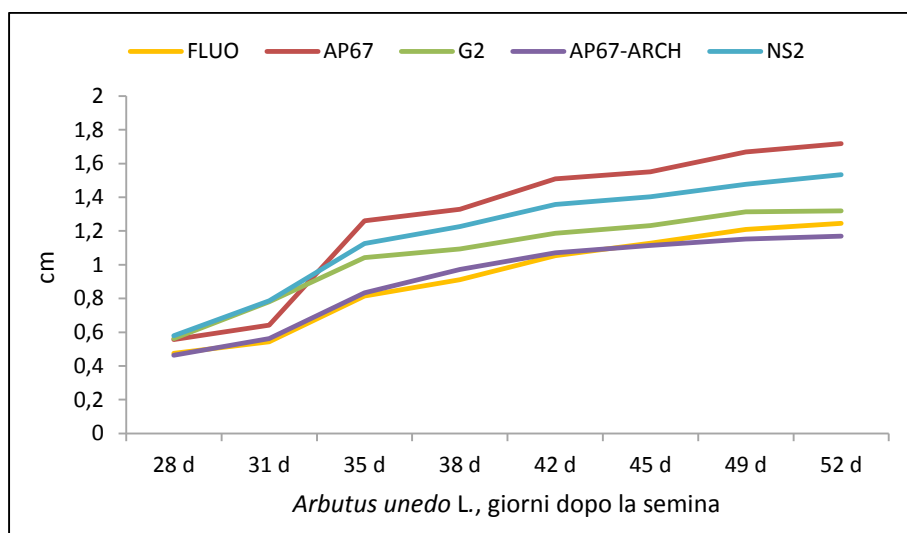


Figura 3.1 Curva di crescita di *Arbutus unedo* L. allevato in tradizionali camere di crescita.

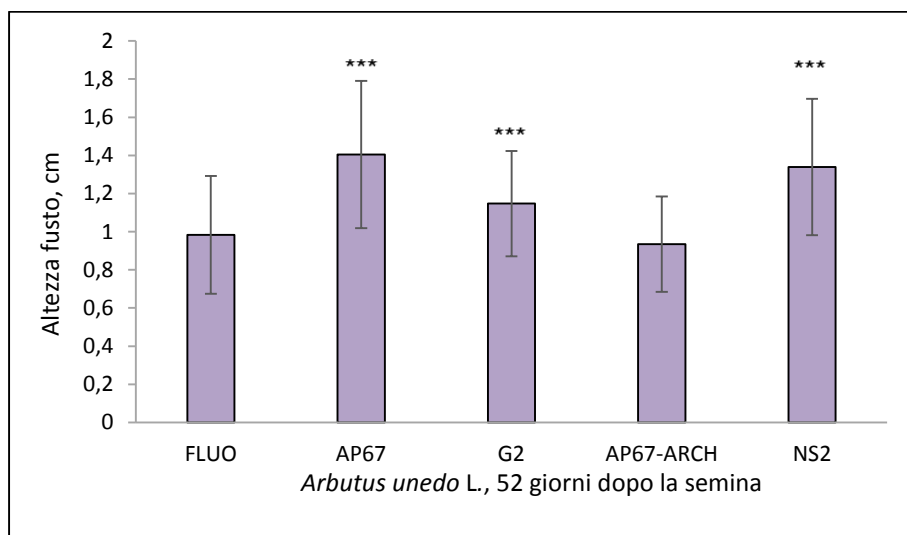


Figura 3.2 Altezza del fusto di *Arbutus unedo* L. al termine dell'allevamento in tradizionali camere di crescita. Le barre indicano la deviazione standard. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il metodo T di Student per un livello di significatività $\alpha < 0,05$ ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).

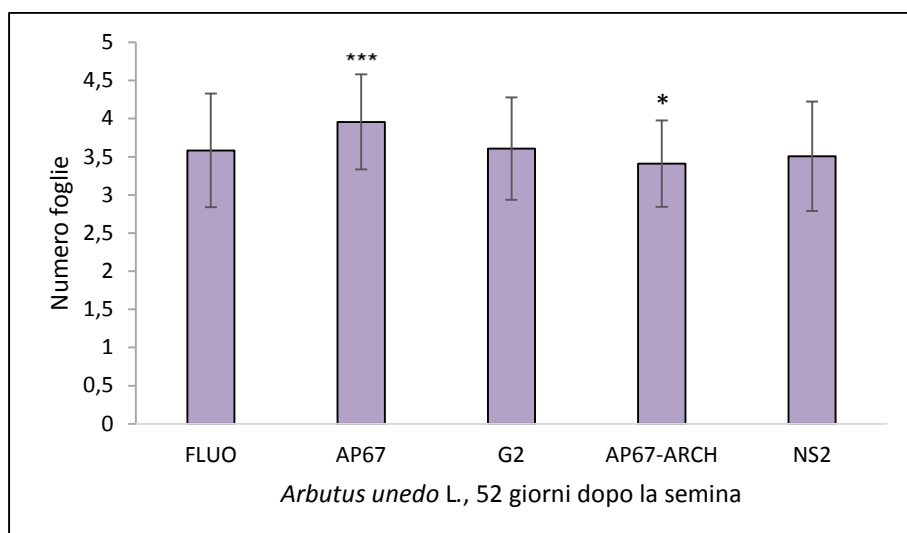


Figura 3.3 Numero foglie di *Arbutus unedo* L. al termine dell'allevamento in tradizionali camere di crescita. Statistica come in Fig. 3.2.

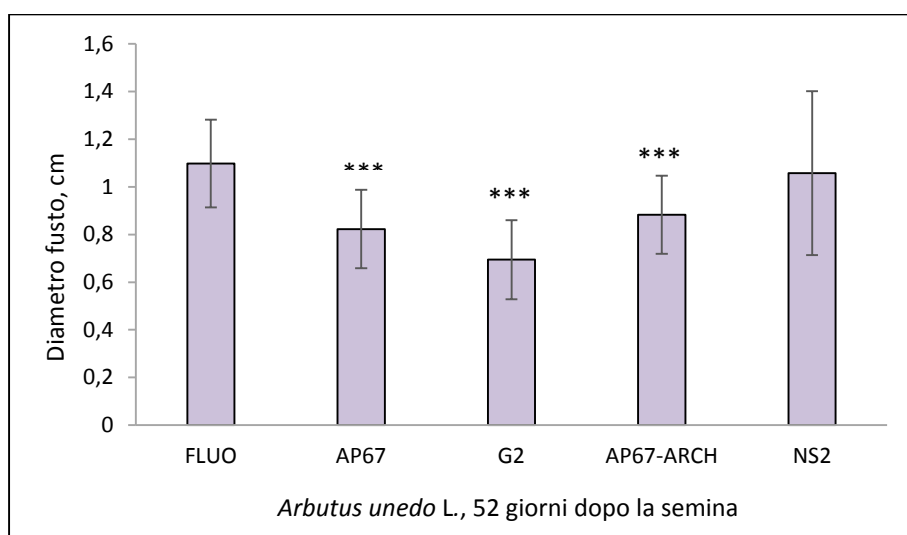


Figura 3.4 Diametro del fusto di *Arbutus unedo* L. al termine dell'allevamento in tradizionali camere di crescita. Statistica come in Fig. 3.2.

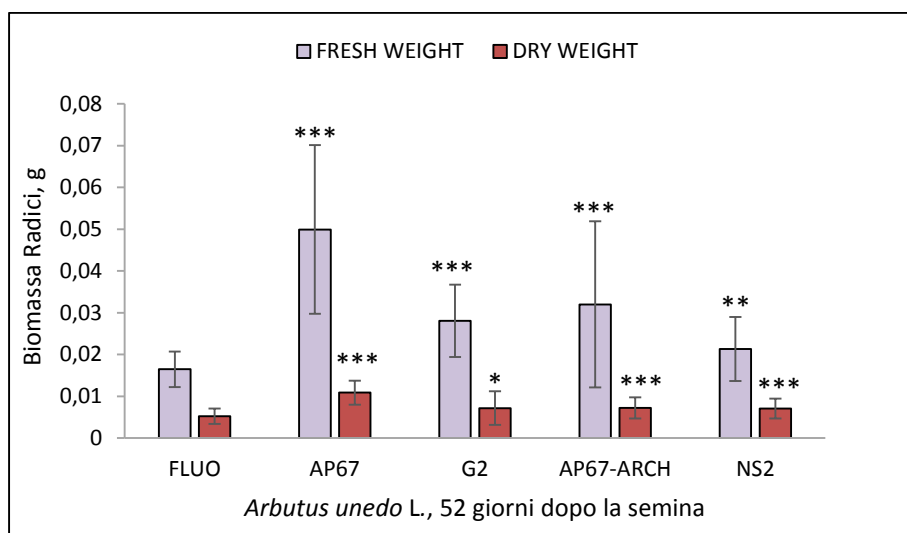


Figura 3.5 Biomassa fresca e secca delle radici di *Arbutus unedo* L. al termine dell'allevamento in tradizionali camere di crescita. Statistica come in Fig. 3.2.

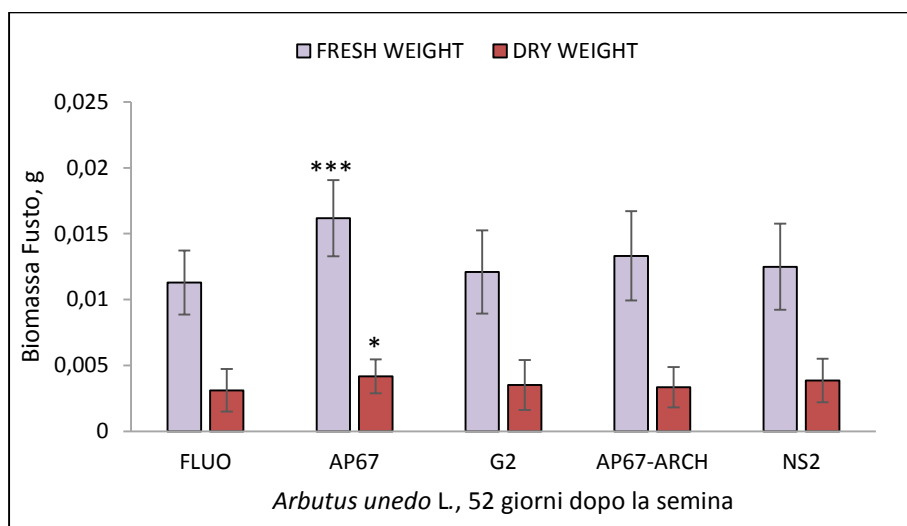


Figura 3.6 Biomassa fresca e secca del fusto di *Arbutus unedo* L. al termine dell'allevamento in tradizionali camere di crescita. Statistica come in Fig. 3.2.

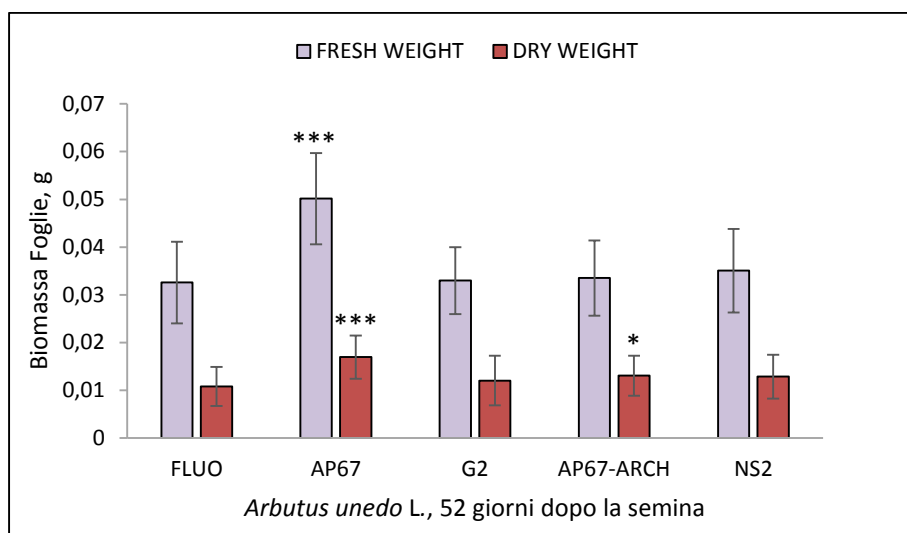


Figura 3.7 Biomassa fresca e secca delle foglie di *Arbutus unedo* L. al termine dell'allevamento in tradizionali camere di crescita. Statistica come in Fig. 3.2.

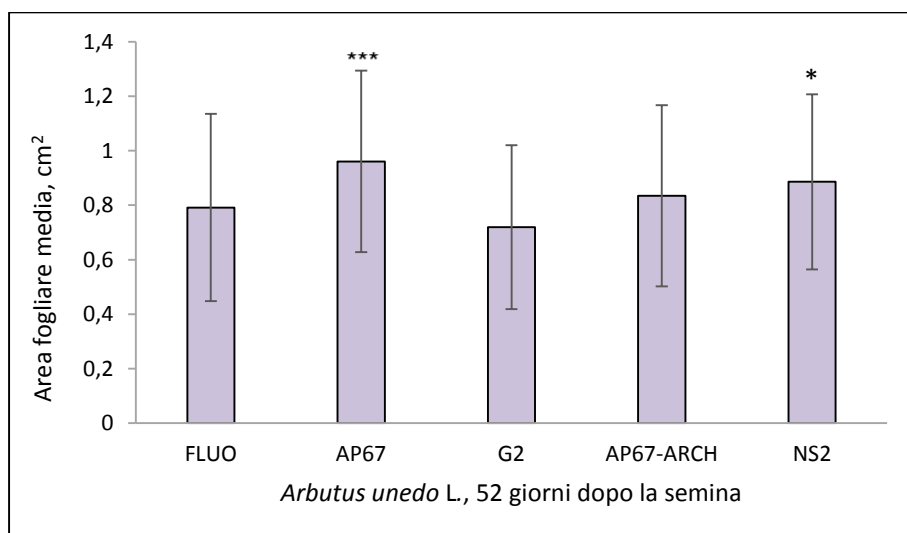


Figura 3.7 Area fogliare media di *Arbutus unedo* L. al termine dell'allevamento in tradizionali camere di crescita. Statistica come in Fig. 3.2.

Come precedentemente detto, sono stati analizzati alcuni parametri biochimici per verificare le risposte fisiologiche delle piante di corbezzolo alle diverse luci LED, rispetto alle piante allevate con luce fluorescente.

Il corbezzolo allevato con le lampade LED ha mostrato una diminuzione, con valori compresi fra il 10% (NS2) e il 35% (AP67-ARCH), del contenuto di clorofilla totale rispetto al controllo fluorescente (Figura 3.8). Allo stesso modo, anche il contenuto di carotenoidi totali è diminuito nelle piante cresciute con gli spettri LED in relazione al corbezzolo cresciuto con lo spettro fluorescente. Il valore massimo di riduzione si è osservato per le piante allevate sotto G2 (-52%) (Figura 3.9).

La crescita con le lampade a LED ha influenzato anche il contenuto proteico nelle piante rispetto al controllo. Solo per le piante allevate sotto G2 si è riscontrato un decremento del contenuto di proteine pari al 12% (Figura 3.10). Successivamente, sono stati studiati i cambiamenti dell'attività di enzimi

chiave coinvolti nel metabolismo dell'azoto. L'attività dell'enzima NR ha mostrato un decremento nelle piante allevate con i LED rispetto alla luce fluorescente (Figura 3.11). In particolare, l'attività è risultata fortemente inibita nelle piante allevate con i LED AP67 (-28%) e NS2 (-25%). Allo stesso modo, anche l'attività della GS risultava inibita nelle piante cresciute sotto luci LED specialmente nelle piante allevate con la lampada NS2 (-64%). Al contrario, risultava stimolata (+28%) nelle piante allevate con G2 rispetto al controllo fluorescente (Figura 3.12). Lo stress ossidativo causato dalle differenti fonti di illuminazione durante la fase di pre-coltivazione è stato valutato attraverso la determinazione della concentrazione della malondialdeide (MDA). Nelle piantine di corbezzolo allevate con le luci LED non sono state notate differenze significative con le piante controllo (Figura 3.13).

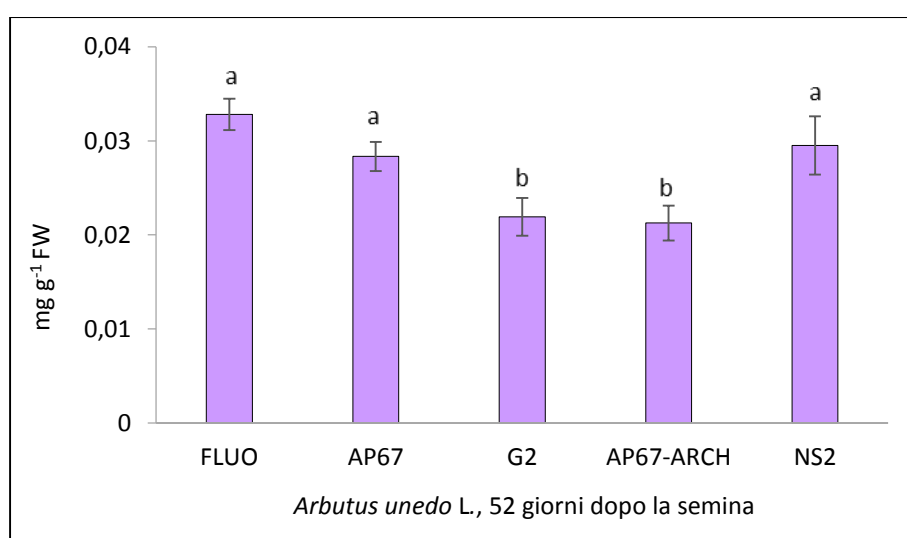


Figura 3.8 Contenuto di clorofilla totale nelle foglie di *Arbutus unedo* L. al termine dell'allevamento in tradizionali camere di crescita. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano la deviazione standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra i diversi trattamenti ($P < 0.01$) (Tukey test).

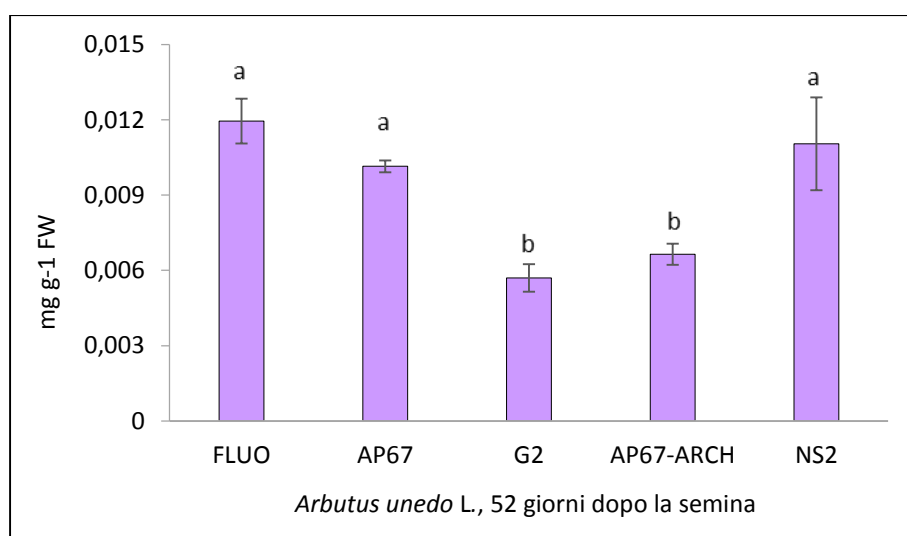


Figura 3.9 Contenuto di β -carotene nelle foglie di *Arbutus unedo* L. al termine dell'allevamento in tradizionali camere di crescita. Statistica come in Fig. 3.8.

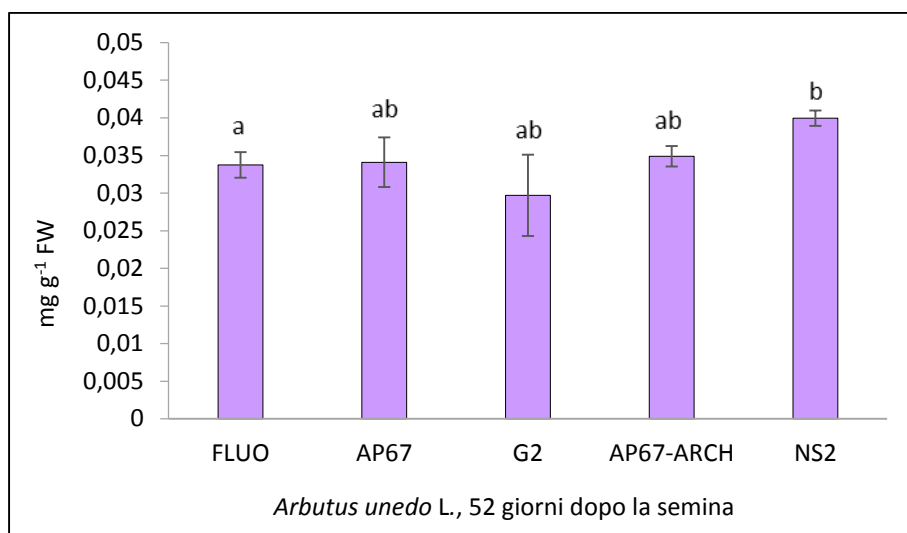


Figura 3.10 Contenuto di proteine nelle foglie di *Arbutus unedo* L. al termine dell'allevamento in tradizionali camere di crescita. Statistica come in Fig. 3.8.

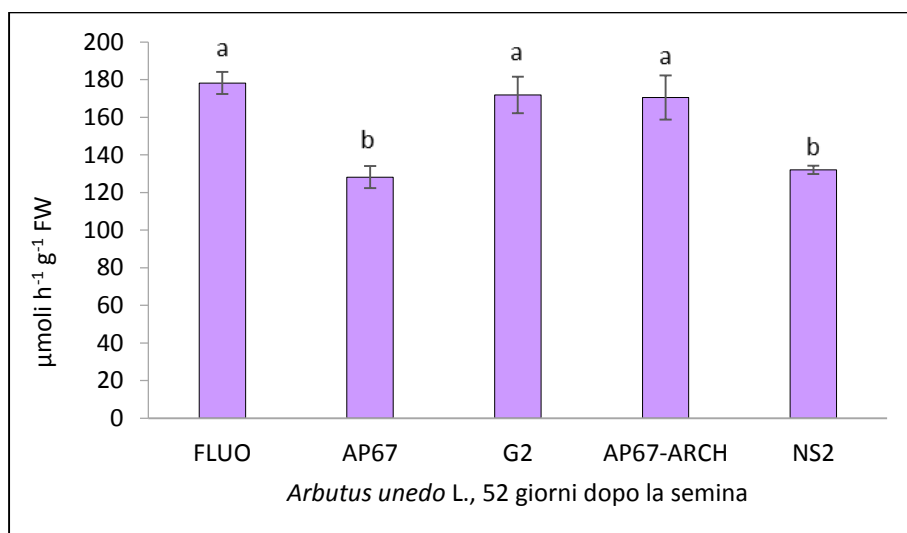


Figura 3.11 Variazioni dell'attività dell'enzima NR nelle foglie di *Arbutus unedo* L. al termine dell'allevamento in tradizionali camere di crescita. Statistica come in Fig. 3.8.

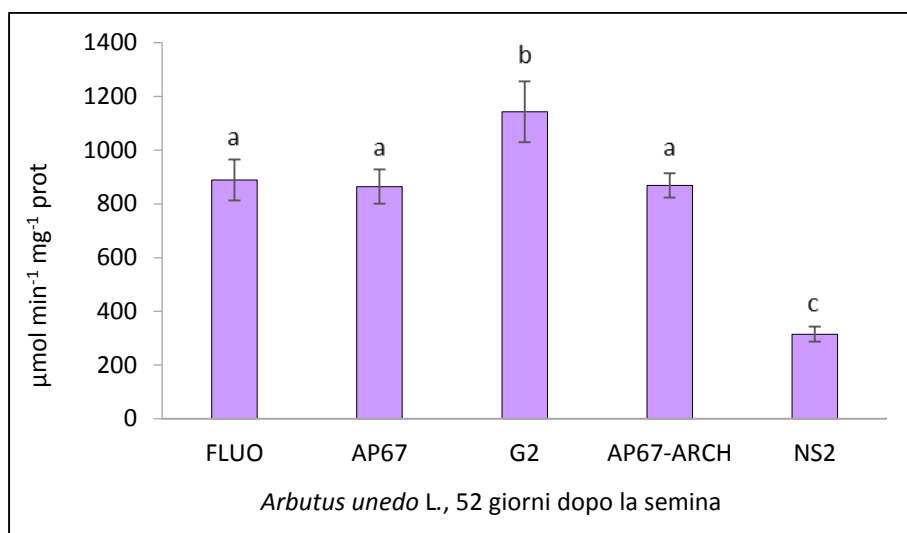


Figura 3.12 Variazioni dell'attività dell'enzima GS nelle foglie di *Arbutus unedo* L. al termine dell'allevamento in tradizionali camere di crescita. Statistica come in Fig. 3.8.

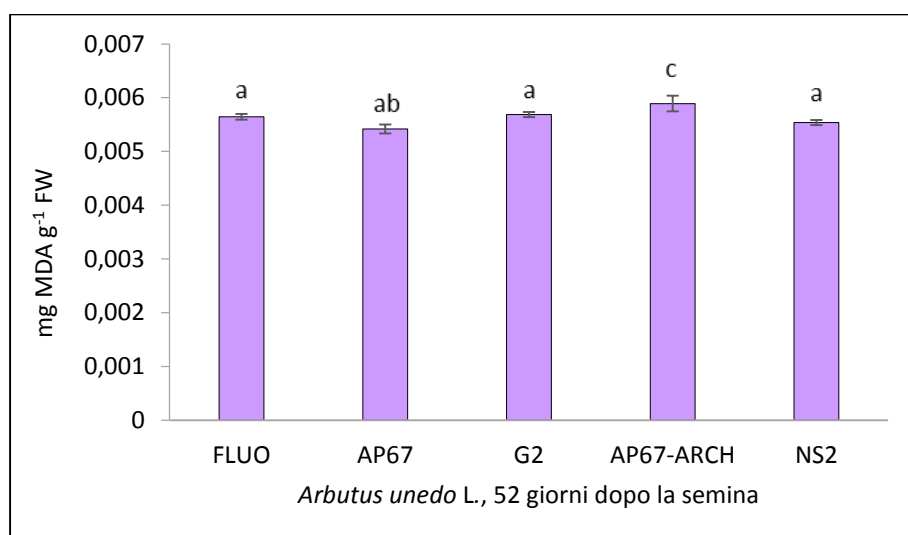


Figura 3.13 Contenuto di MDA nelle foglie di *Arbutus unedo* L. al termine dell'allevamento in tradizionali camere di crescita. Statistica come in Fig. 3.8.

3.1.2 Allevamento all'interno del Prototipo

Come per le precedenti, anche per le piante di corbezzolo allevate all'interno del Prototipo per un periodo di 52 giorni, sono stati valutati diversi parametri morfometrici e biochimici al fine di valutare gli effetti dell'innovativa camera di crescita combinata alla lampada AP67. In questo caso, come controllo sono stati considerati i risultati ottenuti dalle plantule allevate con la lampada AP67 in tradizionale camera di crescita.

L'andamento dell'incremento in termini di altezza rilevato sul corbezzolo durante il periodo di allevamento, ha evidenziato scarsi risultati per le piante allevate all'interno del Prototipo (Figura 3.14). Tale risultato si è manifestato anche nei rilievi dei parametri finali di altezza del fusto e numero delle foglie. Infatti, le piante allevate in camera di crescita tradizionale presentavano valori di 1,40 cm in altezza contro gli 0,82 cm delle piante allevate all'interno del Prototipo (Figura 3.15). Per

quanto riguarda il numero di foglie le piante controllo presentavano una media di 3,95 contro i 3,75 presentati dalle piante cresciute nel Prototipo (Figura 3.16).

Gli esperimenti condotti hanno evidenziato un effetto negativo del Prototipo anche sull'incremento in termini diametrici del fusto (Figura 3.17).

Analizzando i valori ottenuti riguardo alla biomassa fresca e secca, non si sono osservati incrementi significativi per le piante allevate nel Prototipo, rispetto alle piante controllo. Nello specifico, a livello radicale il Prototipo (come possibile notare in figura 3.18) ha determinato un decremento pari all'87% nella biomassa fresca e pari all'81% per la biomassa secca. Valutando i risultati ottenuti per la biomassa del fusto (Figura 3.19) e delle foglie (Figura 3.20) le piante di corbezzolo allevate nel Prototipo presentavano decrementi compresi tra il 57% e il 55% per la biomassa fresca e tra il 64% e il 66% per la biomassa secca.

Ulteriore analisi è stata effettuata valutando l'area media fogliare. Anche in questo caso le piante allevate nel Prototipo hanno mostrato decrementi statisticamente significativi ($0,52 \text{ cm}^2$), rispetto alle piante allevate in tradizionale camera di crescita ($0,96 \text{ cm}^2$) (Figura 3.21).

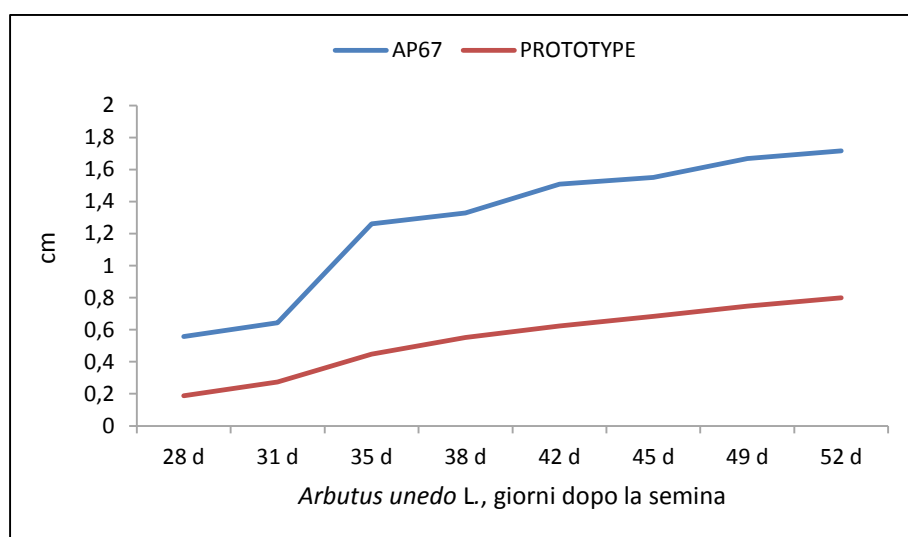


Figura 3.14 Curva di crescita di *Arbutus unedo* L. allevato nel Prototipo e in tradizionali camere di crescita.

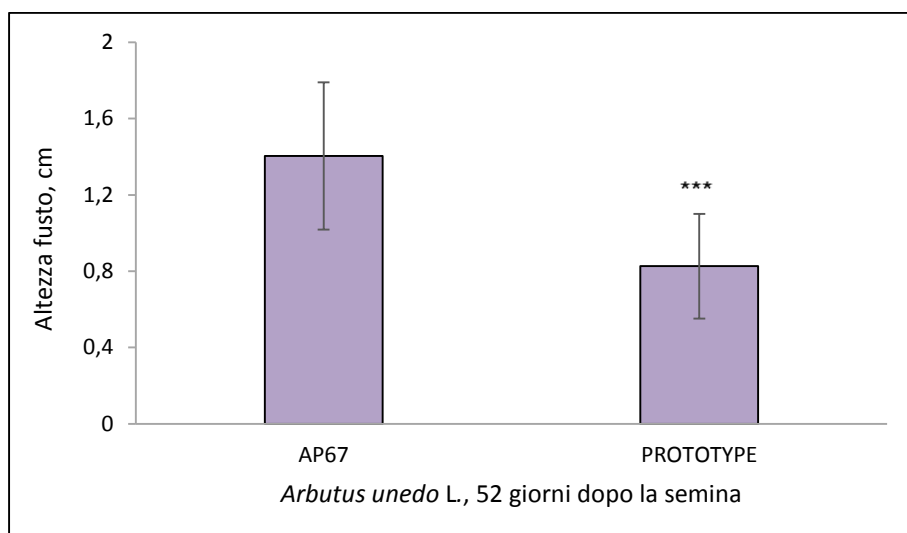


Figura 3.15 Altezza del fusto di *Arbutus unedo* L. allevato nel Prototipo e in tradizionali camere di crescita. Le barre indicano la deviazione standard. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il metodo T di Student per un livello di significatività $\alpha < 0,05$ ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).

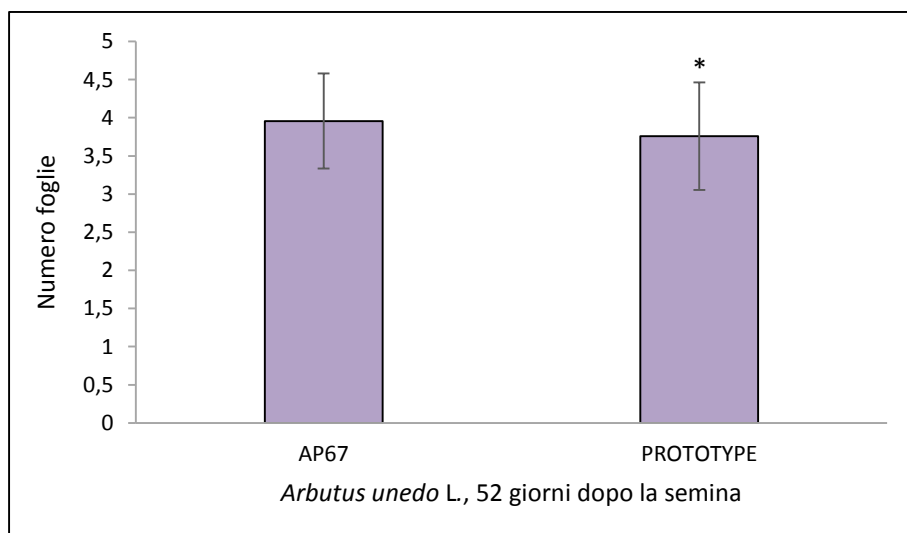


Figura 3.16 Numero foglie di *Arbutus unedo* L. allevato nel Prototipo e in tradizionali camere di crescita. Statistica come in Fig. 3.15.

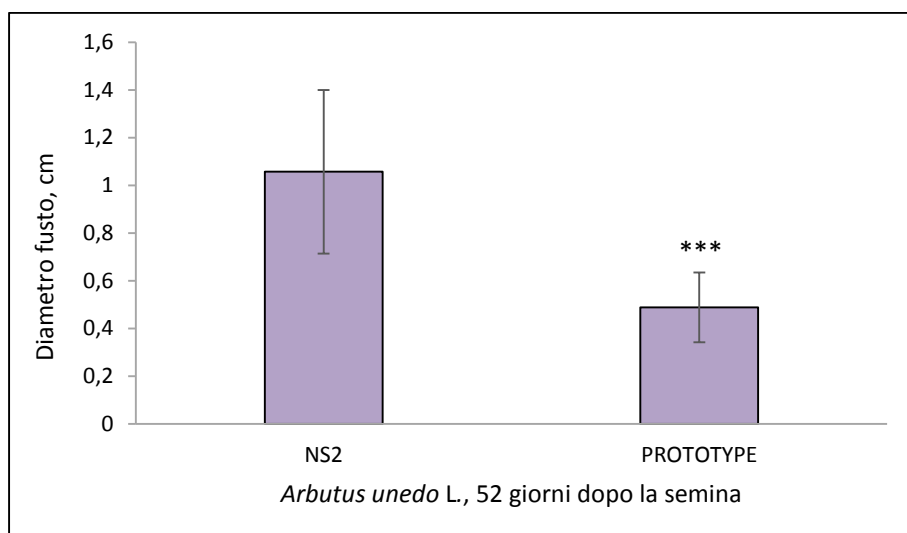


Figura 3.17 Diametro del fusto di *Arbutus unedo* L. allevato nel Prototipo e in tradizionali camere di crescita. Statistica come in Fig. 3.15.

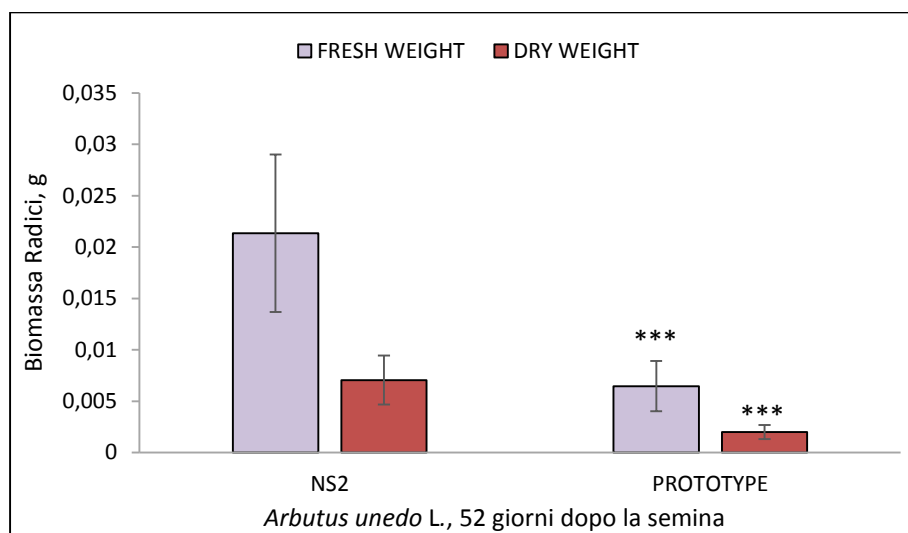


Figura 3.18 Biomassa fresca e secca delle radici di *Arbutus unedo* L. allevato nel Prototipo e in tradizionali camere di crescita. Statistica come in Fig. 3.15.

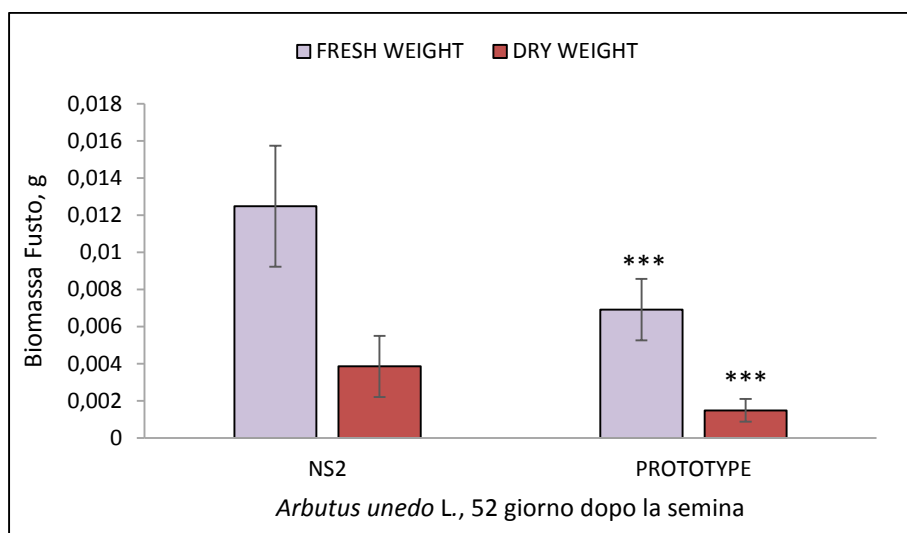


Figura 3.19 Biomassa fresca e secca del fusto di *Arbutus unedo* L. allevato nel Prototipo e in tradizionali camere di crescita. Statistica come in Fig. 3.15.

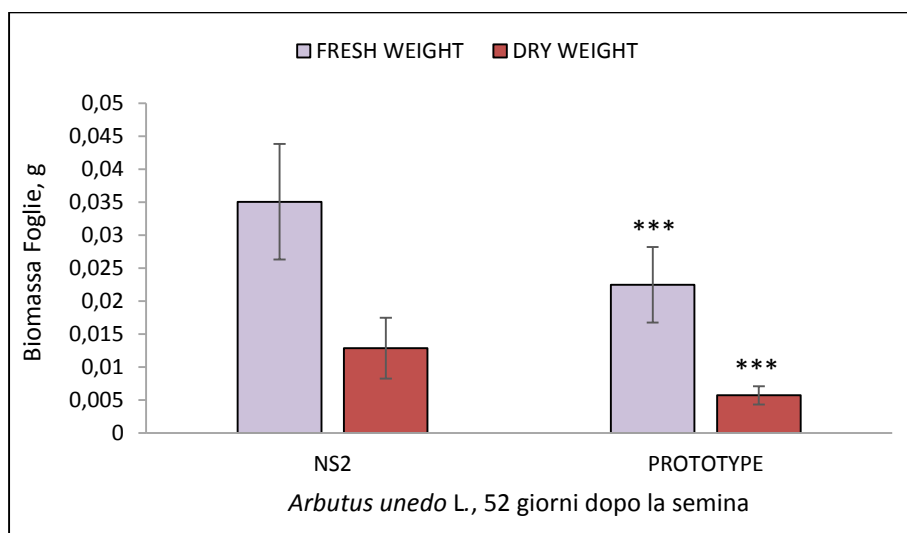


Figura 3.20 Biomassa fresca e secca delle foglie di *Arbutus unedo* L. allevato nel Prototipo e in tradizionali camere di crescita. Statistica come in Fig. 3.15.

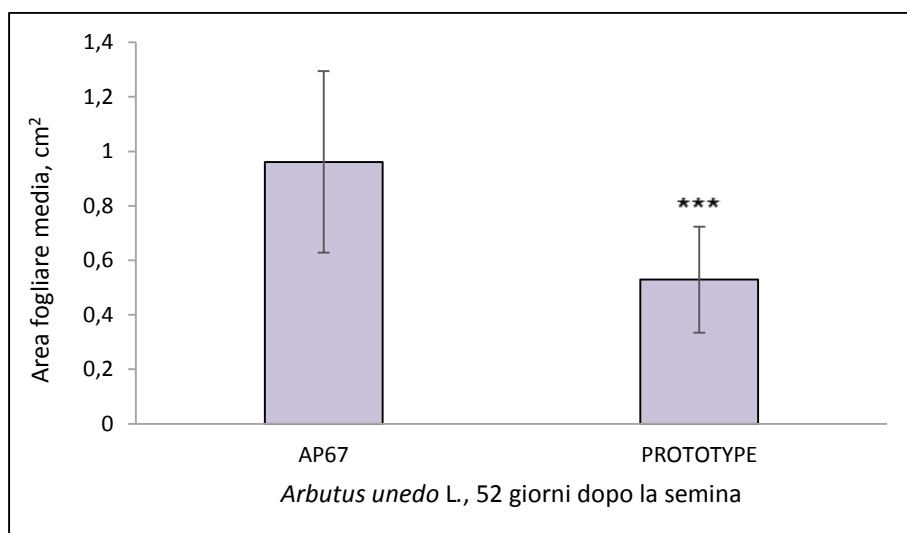


Figura 3.21 Area fogliare media di *Arbutus unedo* L. allevato nel Prototipo e in tradizionali camere di crescita. Statistica come in Fig. 3.15.

Come precedentemente detto, al fine di verificare le risposte delle piante di corbezzolo alle due condizioni di allevamento sono state analizzate le variazioni di alcuni parametri fisiologici.

Il corbezzolo allevato all'interno del Prototipo ha mostrato un incremento (+54%) del contenuto di clorofilla totale rispetto al controllo fluorescente (Figura 3.22). Allo stesso modo, anche il contenuto di carotenoidi totali è aumentato nelle piante cresciute con l'innovativa camera di crescita (+36%) in relazione al corbezzolo cresciuto con lo spettro fluorescente. L'allevamento all'interno del Prototipo ha influenzato positivamente anche il contenuto proteico nelle piante rispetto al controllo. In particolare, è stato osservato un incremento del contenuto di proteine totali pari al 113% (Figura 3.23). L'attività dell'enzima NR è stata influenzata positivamente (+28%) nelle piante allevate nel Prototipo rispetto alla luce fluorescente (Figura 3.24). Al contrario, l'attività della GS risultava inibita nelle piante cresciute utilizzando la camera di crescita innovativa (-44%) (Figura 3.25). Lo stress ossidativo causato dalle differenti condizioni di allevamento durante la fase di pre-coltivazione è stato valutato attraverso la determinazione della concentrazione della malondialdeide (MDA). I livelli di MDA erano leggermente, ma significativamente, più bassi (-16%) nelle foglie delle piantine di corbezzolo allevate con nel Prototipo, rispetto alle piante controllo (Figura 3.26).

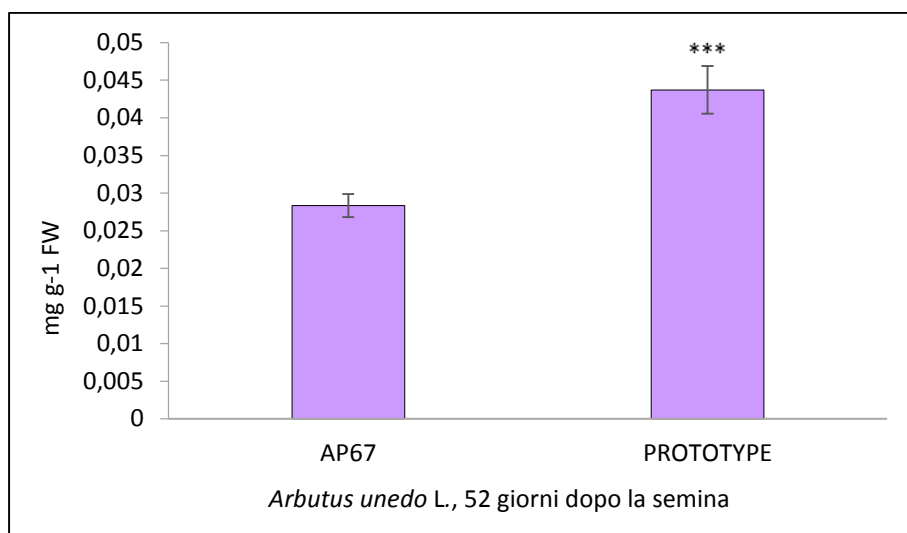


Figura 3.22 Contenuto di clorofilla totale nelle foglie *Arbutus unedo* L. al termine dell'allevamento nel Prototipo e in tradizionali camere di crescita. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano la deviazione standard. Gli asterischi indicano differenze significative tra i diversi trattamenti ($P < 0.01$) (Tukey test).

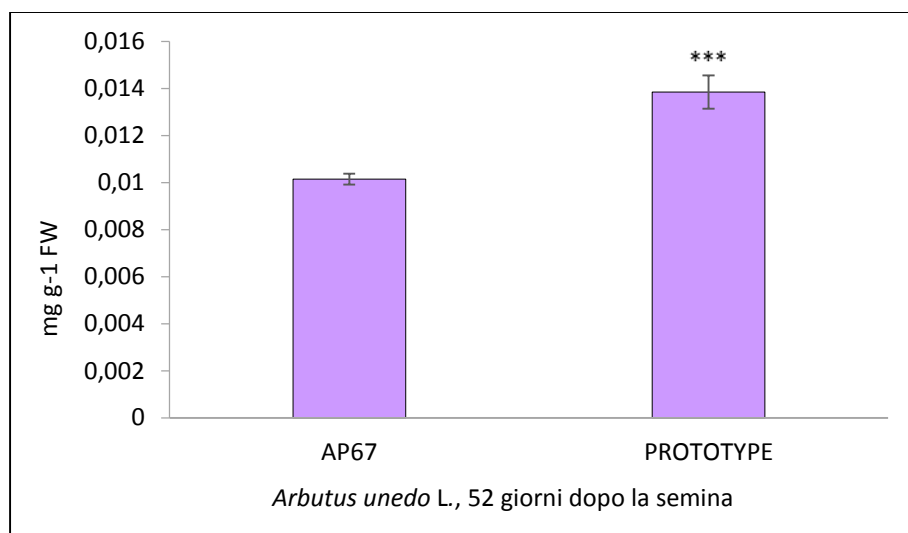


Figura 3.23 Contenuto di β -carotene nelle foglie di *Arbutus unedo* L. al termine dell'allevamento nel Prototipo e in tradizionali camere di crescita. Statistica come in Fig. 3.22.

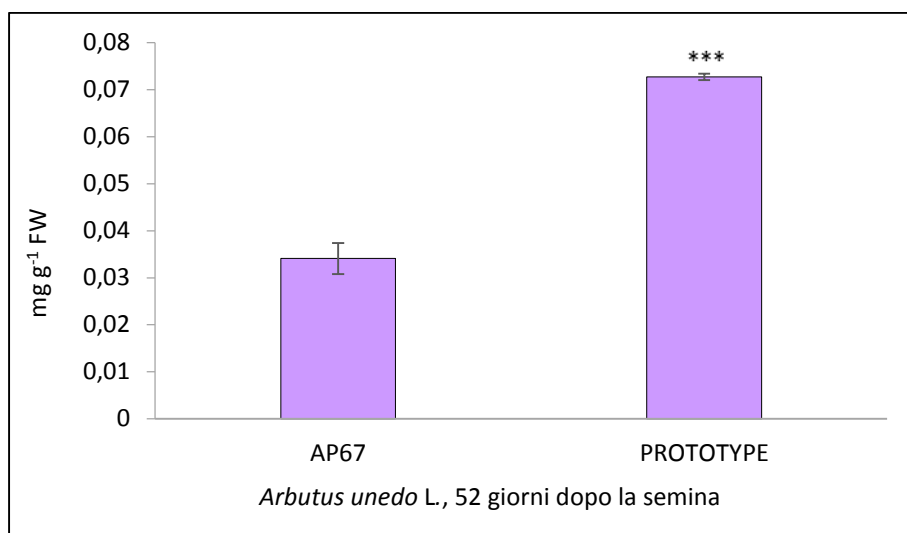


Figura 3.24 Contenuto di proteine nelle foglie di *Arbutus unedo* L. al termine dell'allevamento nel Prototipo e in tradizionali camere di crescita. Statistica come in Fig. 3.22.

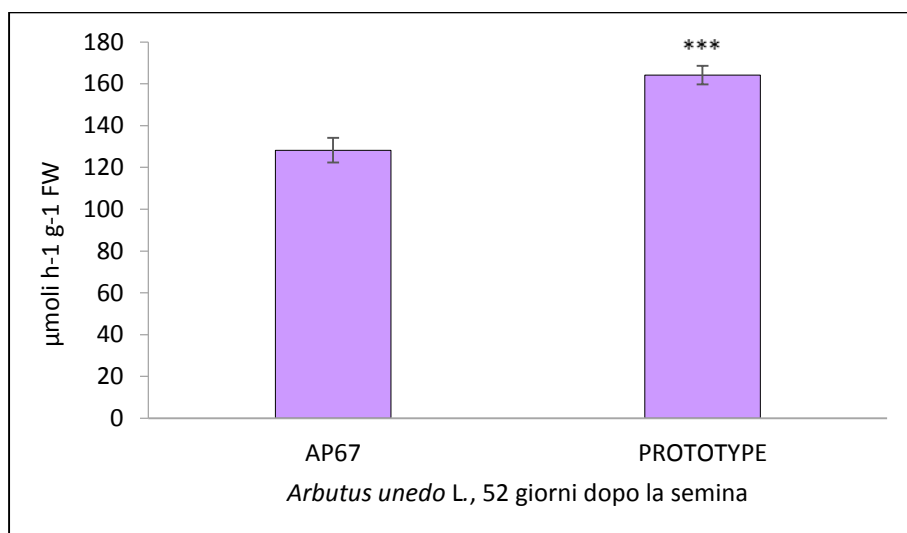


Figura 3.25 Variazioni dell'attività dell'enzima NR nelle foglie di *Arbutus unedo* L. al termine dell'allevamento nel Prototipo e in tradizionali camere di crescita. Statistica come in Fig. 3.22.

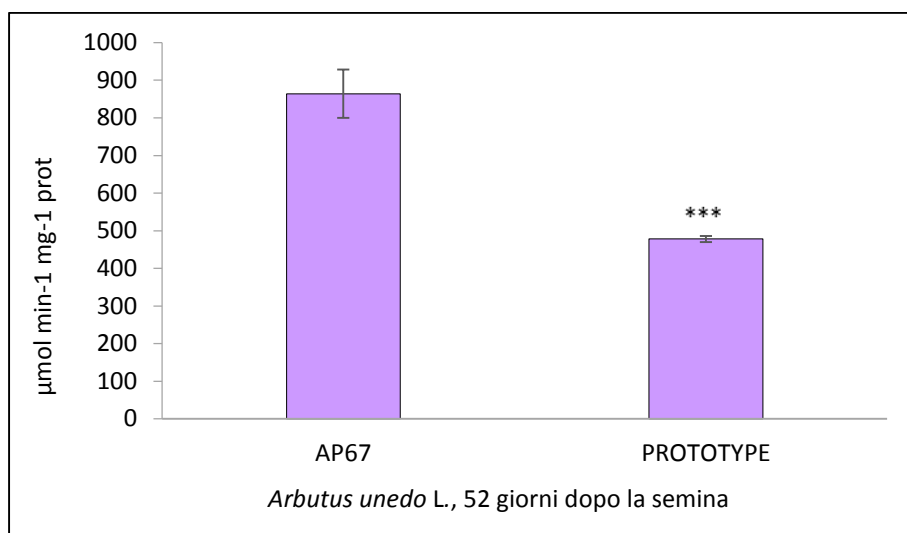


Figura 3.26 Variazioni dell'attività dell'enzima GS nelle foglie di *Arbutus unedo* L. al termine dell'allevamento nel Prototipo e in tradizionali camere di crescita. Statistica come in Fig. 3.22.

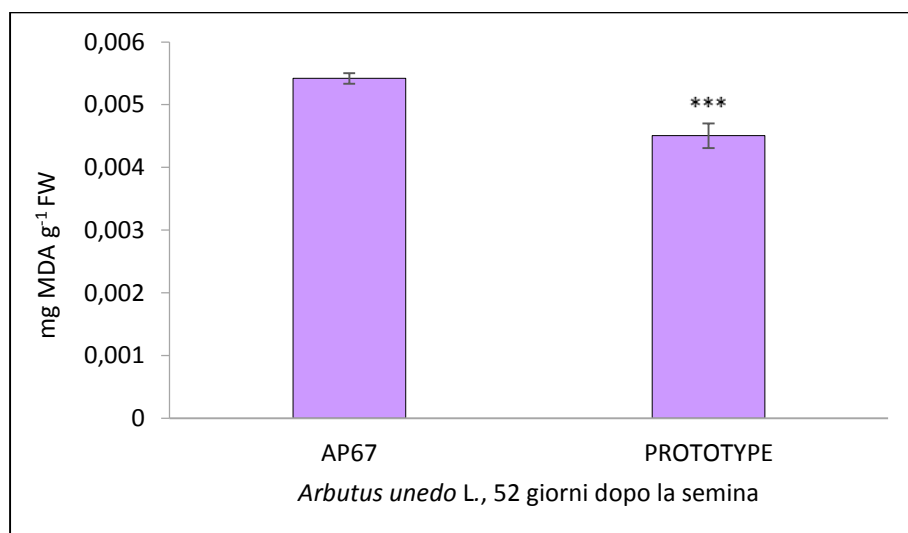


Figura 3.26 Contenuto di MDA nelle foglie di *Arbutus unedo* L. al termine dell'allevamento nel Prototipo e in tradizionali camere di crescita. Statistica come in Fig. 3.22.

3.1.3 Allevamento in serra

Terminata la fase di sperimentazione nelle camere di crescita tradizionali sotto le quattro lampade LED e fluorescente, le piante di corbezzolo pre-coltivate sotto i diversi spettri luminosi sono state trapiantate in contenitori più grandi e trasferite in serra, al fine di valutare l'adattamento delle piante a seguito della pre-coltivazione in ambiente controllato.

L'andamento dell'incremento in termini di altezza rilevato sul corbezzolo durante il periodo di adattamento in serra ha evidenziato la lampada AP67 e la lampada NS2 si sono dimostrate le lampade più efficaci (Figura 3.27). Tale risultato si è manifestato anche nei rilievi dei parametri finali di altezza del fusto e numero delle foglie, dove i risultati ottenuti sono stati gli unici a presentarsi come statisticamente significativi. Infatti, le piante allevate sotto AP67 presentavano valori di 4,5 cm in altezza contro i 3,23 cm delle piante allevate con luce fluorescente (Figura 3.28). Per quanto riguarda

il numero di foglie le piante allevate con luce AP67 presentavano una media di 10,77 contro i 7,8 presentati dalle piante controllo (Figura 3.29).

Gli esperimenti condotti hanno evidenziato incrementi in termini di diametro del fusto per le piante allevate con luci LED al termine del periodo di allevamento in serra (Figura 3.30). Soprattutto, nelle piante allevate sotto AP67 il diametro presentava valori di 1,37 cm rispetto ai 0,98 cm mostrati dalle piante allevate con luce fluorescente.

Analizzando i valori ottenuti riguardo alla biomassa fresca e secca di radici (Figura 3.31), fusto (Figura 3.32) e foglie (Figura 3.33) significativi incrementi si sono osservati per le piante allevate sotto tutte le luci LED, rispetto alle piante controllo.

Ulteriore analisi è stata effettuata valutando l'area media fogliare. Anche in questo caso le piante di corbezzolo allevate sotto tutte le luci LED testate hanno mostrato, al termine del periodo di adattamento, incrementi statisticamente significativi rispetto alle piante allevate con luce fluorescente (Figura 3.34).

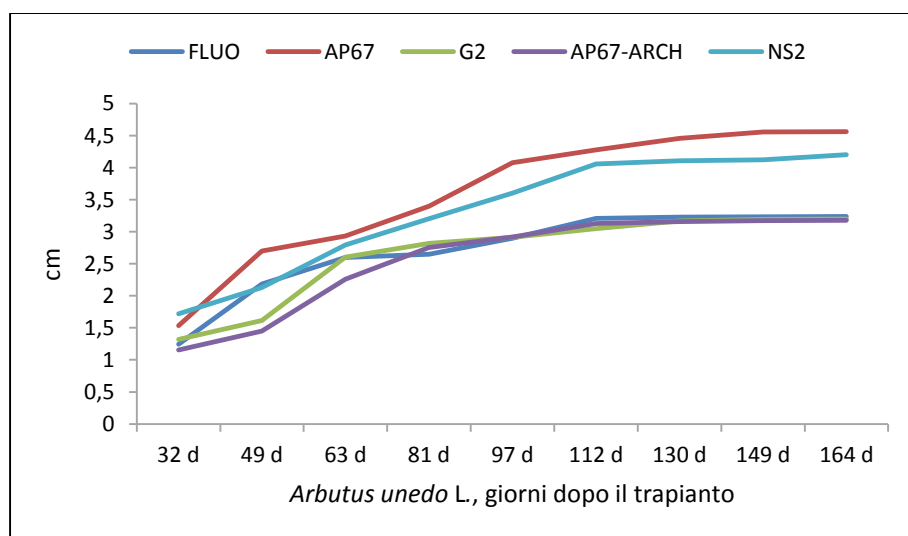


Figura 3.27 Curva di crescita di *Arbutus unedo* L. allevato in tradizionali camere di crescita, dopo il periodo di adattamento in serra.

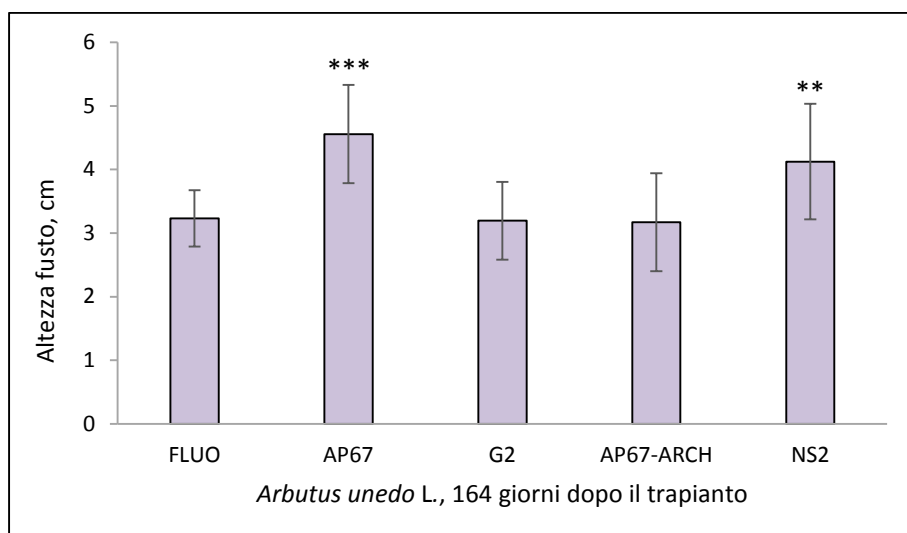


Figura 3.28 Altezza del fusto di *Arbutus unedo* L. allevato in tradizionali camere di crescita, dopo il periodo di adattamento in serra. Le barre indicano la deviazione standard. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il metodo T di Student per un livello di significatività $\alpha < 0,05$ ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).

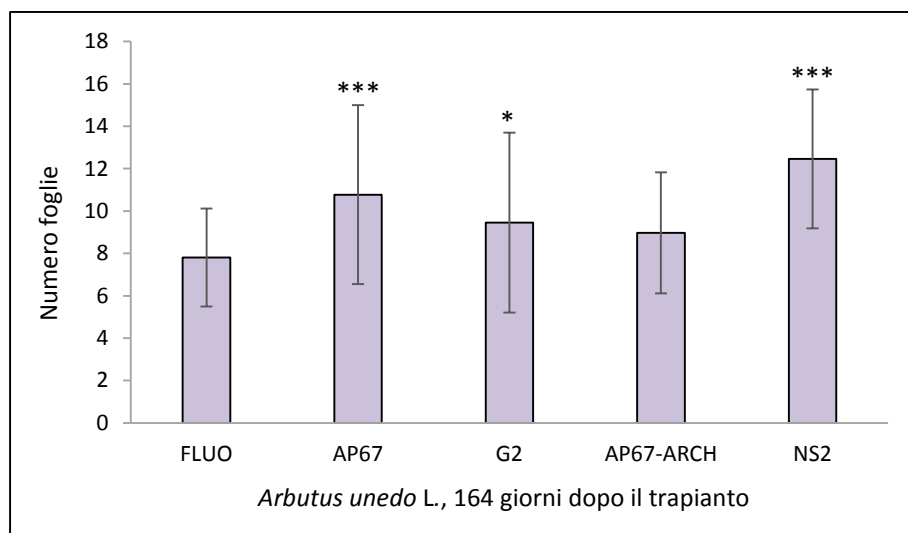


Figura 3.29 Numero foglie di *Arbutus unedo* L. allevato in tradizionali camere di crescita, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.28.

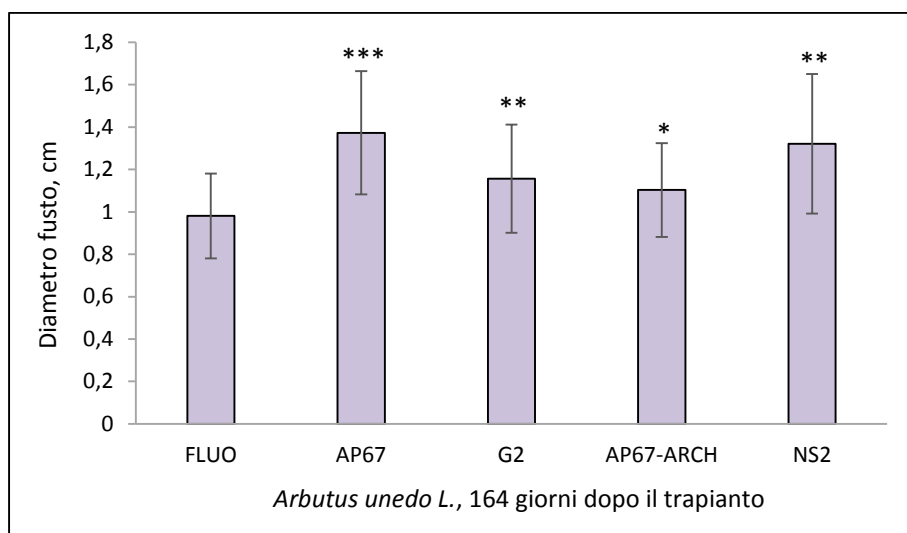


Figura 3.30 Diametro del fusto di *Arbutus unedo* L. allevato in tradizionali camere di crescita, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.28.

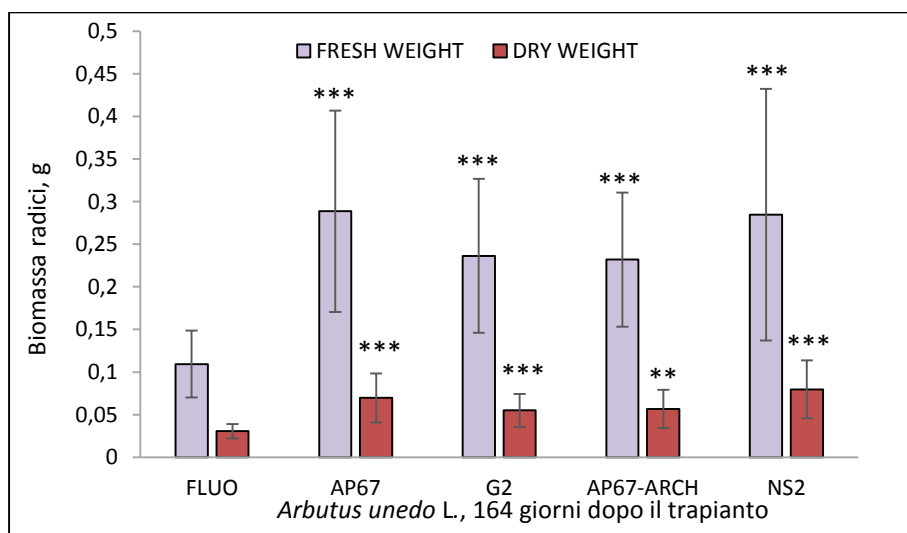


Figura 3.31 Biomassa fresca e secca delle radici di *Arbutus unedo* L. allevato in tradizionali camere di crescita, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.28.

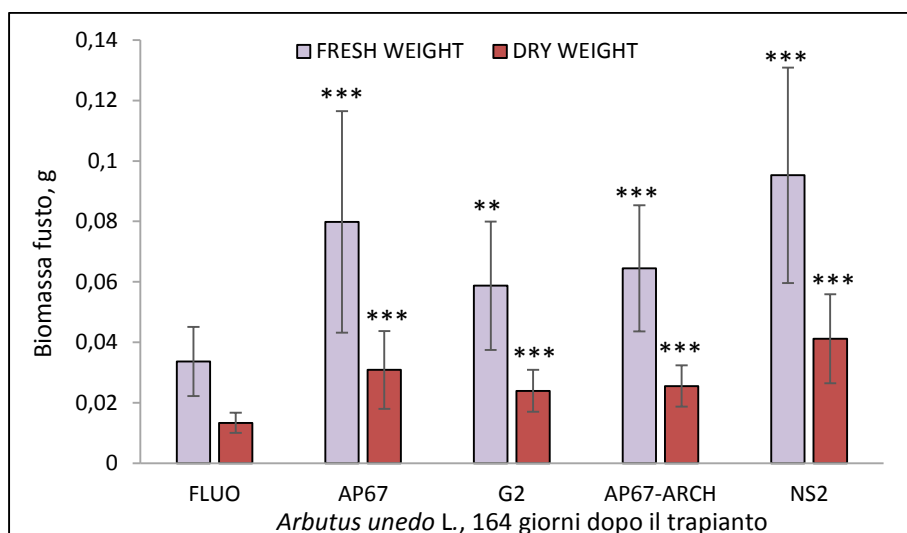


Figura 3.32 Biomassa fresca e secca del fusto di *Arbutus unedo* L. allevato in tradizionali camere di crescita, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.28.

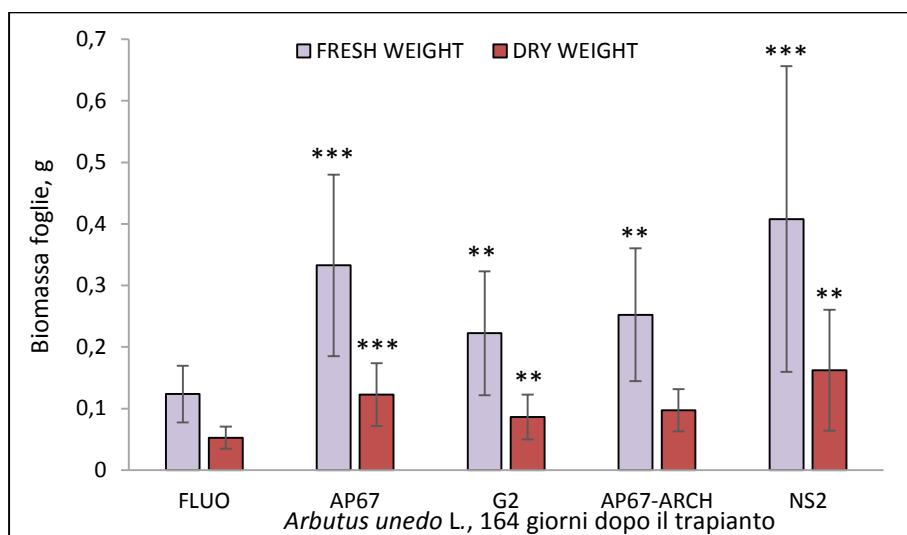


Figura 3.33 Biomassa fresca e secca delle foglie di *Arbutus unedo* L. allevato in tradizionali camere di crescita, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.28.

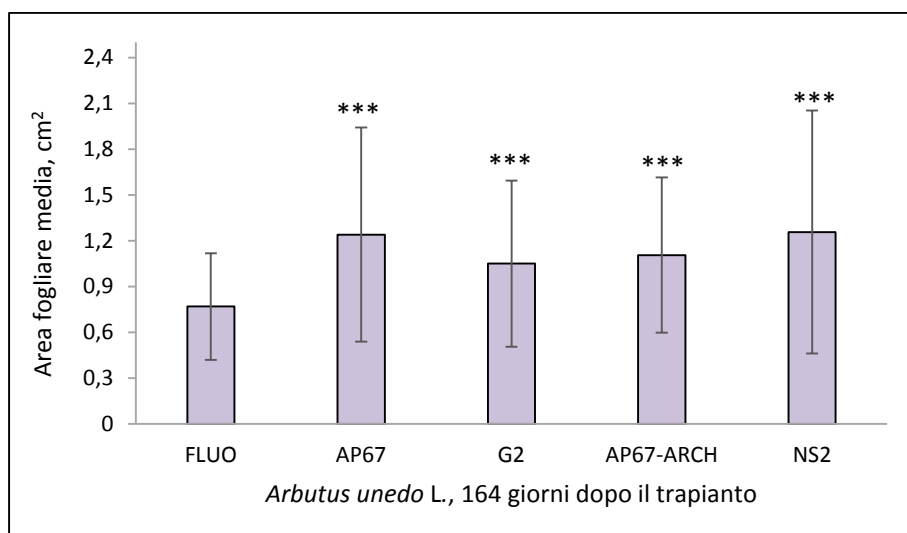


Figura 3.34 Area fogliare media di *Arbutus unedo* L. allevato in tradizionali camere di crescita, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.28.

Come per le precedenti, anche le piante di corbezzolo cresciute all'interno del Prototipo al termine del periodo di allevamento sono state trapiantate in contenitori più grandi e trasferite in serra.

L'andamento dell'incremento in termini di altezza rilevato sul corbezzolo durante il periodo di adattamento in serra, ha evidenziato un minore accrescimento per le piante allevate all'interno del Prototipo (Figura 3.35). Tuttavia, il decremento si presentava in termini ridotti (-10%), rispetto alle piante controllo. Analizzando il parametro finali di altezza del fusto è stato possibile notare lo stesso risultato, con un decremento rispetto alle piante allevate in tradizionale camera di crescita, pari al 12% (Figura 3.36). Esaminando il numero delle foglie (Figura 3.37) e il diametro del fusto (Figura 3.38) al termine del periodo di adattamento in serra, non sono emerse differenze statisticamente significative tra le piante allevate nel Prototipo e le piante controllo. Allo stesso modo, anche i valori ottenuti riguardo alla biomassa fresca e secca di radici (Figura 3.39), fusto (Figura 3.40) e foglie (Figura 3.41) non hanno evidenziato differenze statisticamente significative per le piante allevate nel Prototipo, rispetto alle piante controllo.

Ulteriore analisi è stata effettuata valutando l'area media fogliare. Anche in questo caso le piante allevate nel Prototipo non hanno mostrato differenze statisticamente significative, rispetto alle piante allevate in tradizionale camera di crescita (Figura 3.42).

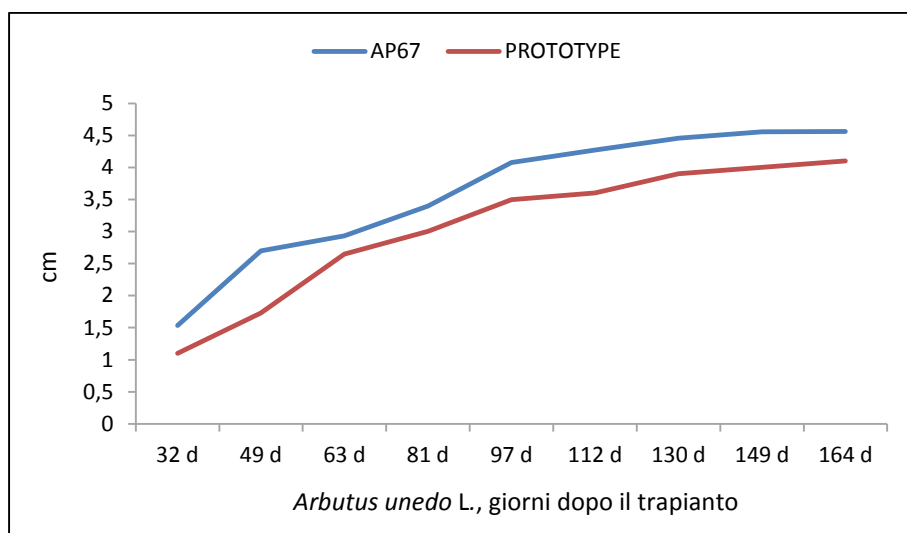


Figura 3.35 Curva di crescita di *Arbutus unedo* L. allevato nel Prototipo e in tradizionali camere di crescita, dopo il periodo di adattamento in serra.

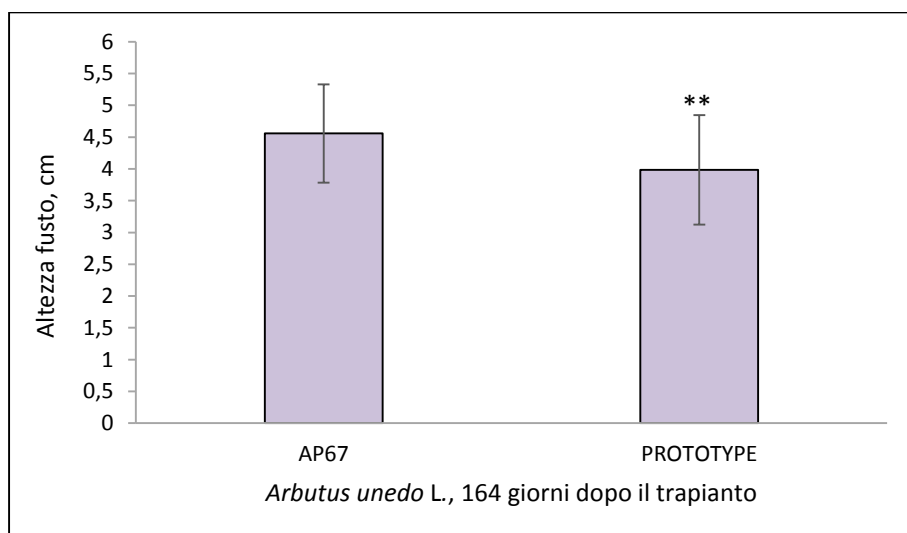


Figura 3.36 Altezza del fusto di *Arbutus unedo* L. allevato nel Prototipo e in tradizionali camere di crescita, dopo il periodo di adattamento in serra. Le barre indicano la deviazione standard. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il metodo T di Student per un livello di significatività $\alpha < 0,05$ ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).

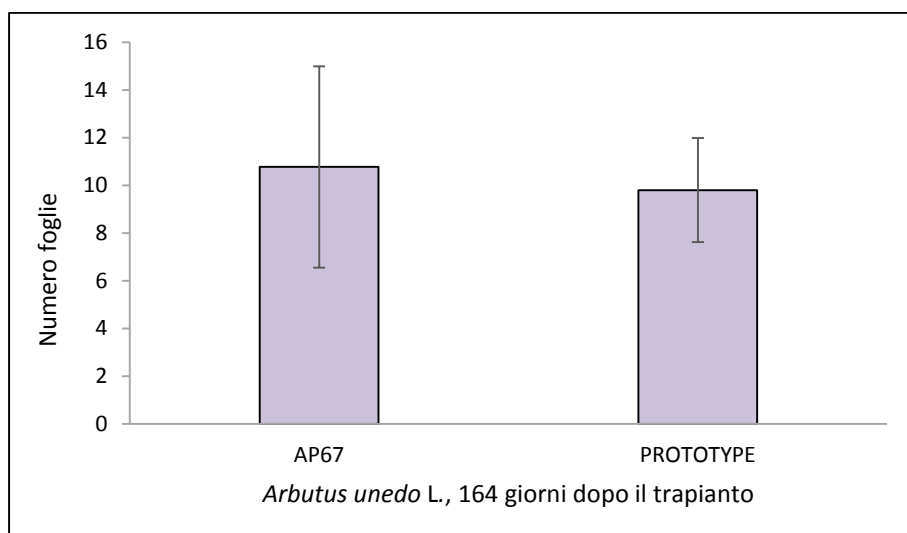


Figura 3.37 Numero foglie di *Arbutus unedo* L. allevato nel Prototipo e in tradizionali camere di crescita, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.36.

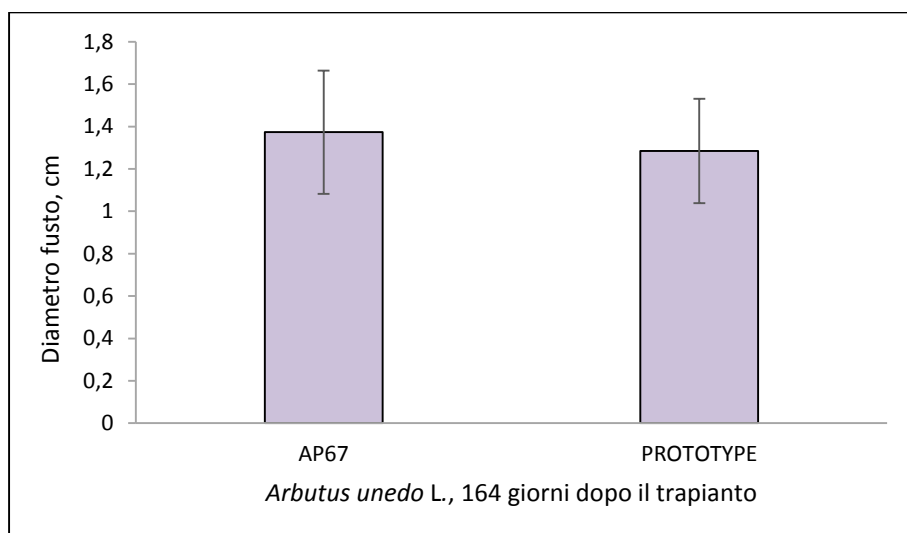


Figura 3.38 Diametro del fusto di *Arbutus unedo* L. allevato nel Prototipo e in tradizionali camere di crescita, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.36.

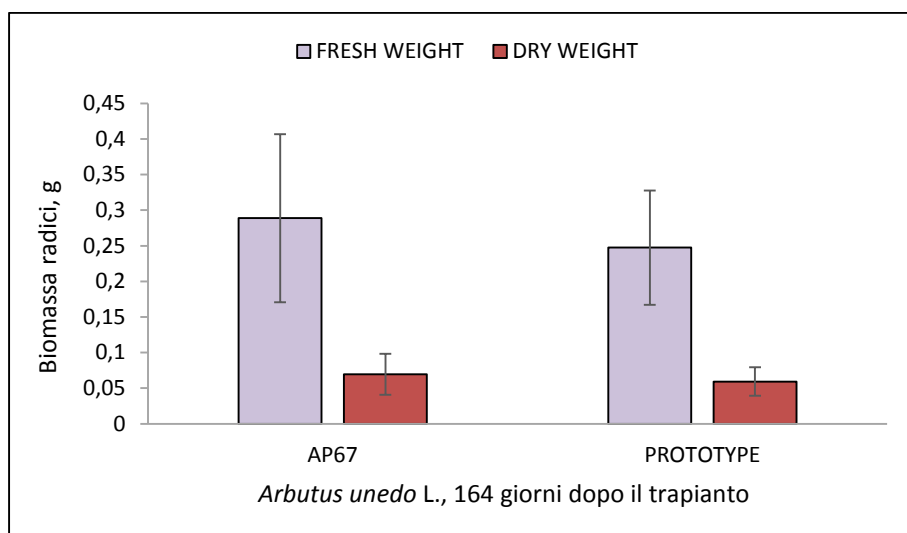


Figura 3.39 Biomassa fresca e secca delle radici di *Arbutus unedo* L. allevato nel Prototipo e in tradizionali camere di crescita, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.36.

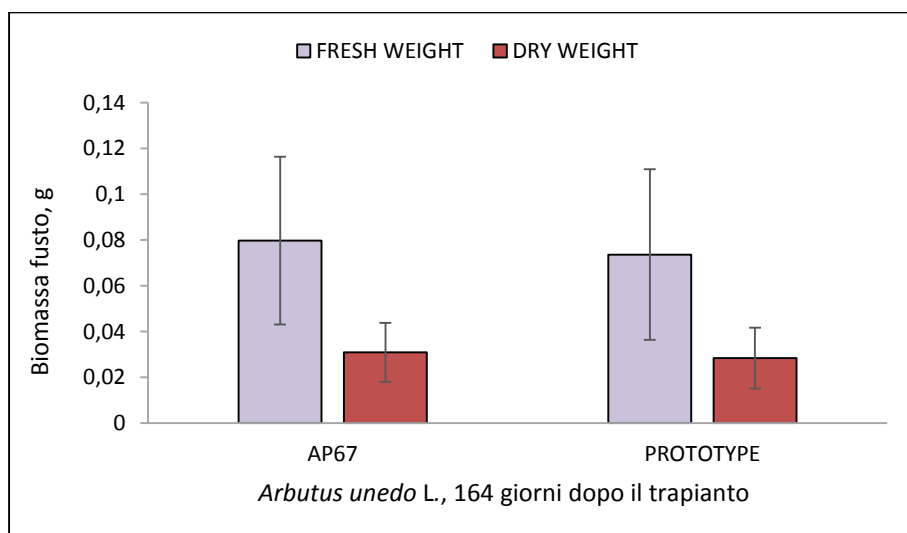


Figura 3.40 Biomassa fresca e secca del fusto di *Arbutus unedo* L. allevato nel Prototipo e in tradizionali camere di crescita, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.36.

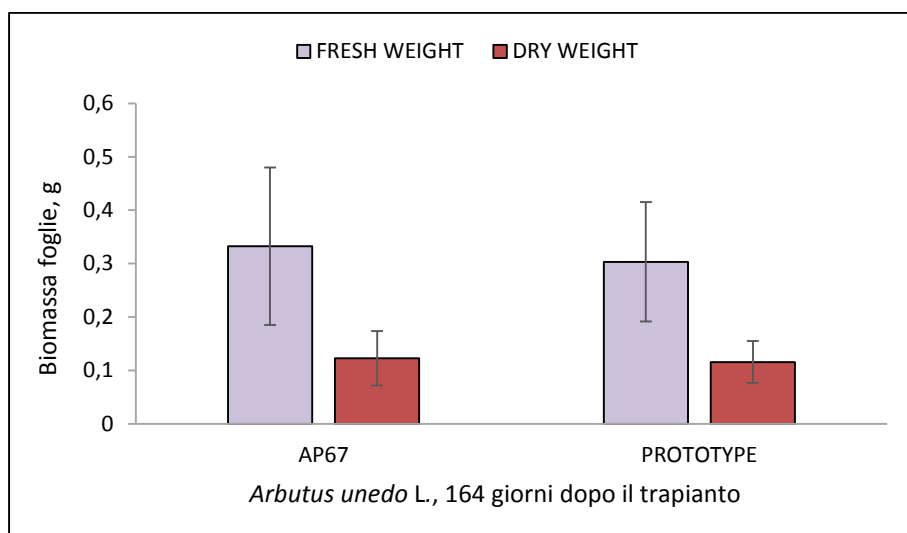


Figura 3.41 Biomassa fresca e secca delle foglie di *Arbutus unedo* L. allevato nel Prototipo e in tradizionali camere di crescita, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.36.

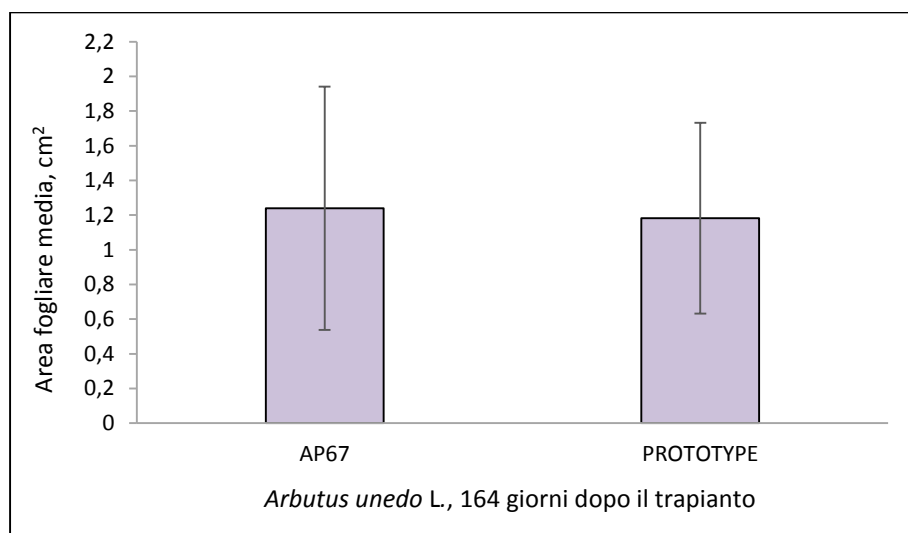


Figura 3.42 Area fogliare media di *Arbutus unedo* L. allevato nel Prototipo e in tradizionali camere di crescita, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.36.

3.2 *Quercus ilex* L.

Vengono di seguito riportati i risultati e la discussione relativa agli esperimenti condotti sulle piante di leccio coltivate sia in ambiente controllato sia in seguito al periodo di adattamento in serra.

3.2.1 Allevamento in ambiente controllato

Dopo un periodo di allevamento di 30 giorni in ambiente controllato, sono stati valutati diversi parametri morfometrici e biochimici al fine di valutare gli effetti di diverse luci LED utilizzate su plantule di leccio rispetto alla luce fluorescente.

L'andamento dell'incremento in termini di altezza rilevato sul leccio durante il periodo di allevamento, ha indicato le lampade AP67 3L e G2 come le luci che maggiormente hanno influenzato l'accrescimento delle piante (Figura 3.43). Al contrario, le piante accresciute utilizzando la lampada fluorescente hanno mostrato (insieme a quelle allevate con AP67-TUBEs) il minore accrescimento.

Analogamente, l'analisi dell'altezza finale del fusto (Figura 3.44) ha mostrato ottimi risultati per le piante allevate con la lampada AP67 3L rispetto alle piante cresciute con la luce fluorescente. Infatti, le prime presentavano un'altezza finale di 10 cm mentre le seconde di 6,9 cm. In generale, tutte le piante allevate sotto luce LED presentavano valori di altezza superiori rispetto alle piante allevate con luce fluorescente.

L'analisi del numero finale di foglie non ha evidenziato risultati particolarmente significativi, solamente la lampada G2 ha comportato un lieve incremento (+9%) del parametro rispetto alle piante controllo (Figura 3.45).

Gli esperimenti condotti hanno evidenziato un effetto positivo delle luci LED testate sull'incremento in termini diametrici del fusto (Figura 3.46), soprattutto per le piante allevate con la lampada AP67 TUBEs (2,16 cm) e AP67 3L (2,08 cm), rispetto alle piante controllo (1,84 cm).

Analizzando i valori ottenuti riguardo alla biomassa fresca e secca, significativi risultati si sono osservati soprattutto a livello della biomassa radicale. Infatti, in questo caso tutte le luci LED utilizzate hanno comportato un incremento della biomassa radicale sia fresca che secca, rispetto alle piante controllo. Specialmente la lampada AP67 3L (come possibile notare in figura 3.47) ha determinato una media di 0,061 g per la biomassa fresca e 0,014 g per la biomassa secca. Le piante allevate sotto fluorescenza presentavano, invece, valori di 0,041 g per la biomassa fresca e 0,010 g per la biomassa secca. Valutando i risultati ottenuti per la biomassa fresca e secca del fusto (Figura 3.48), solamente le piante accresciute sotto AP67 3L e G2 hanno determinato incrementi statisticamente significativi rispetto alle piante allevate con luce fluorescente. L'analisi della biomassa fresca e secca delle foglie (Figura 3.49), non ha evidenziato particolari risultati.

Ulteriore analisi è stata effettuata valutando l'area media fogliare. Anche in questo caso la lampada AP67 3L si è manifestata come la luce determinante gli incrementi maggiormente significativi (6,96 cm²) rispetto alla tradizionale luce fluorescente (4,75 cm²) (Figura 3.50). In generale, tutte le piante allevate sotto luce LED presentavano valori di area fogliare media superiori rispetto alle piante allevate con luce fluorescente. Solamente la luce AP67 BARs non ha mostrato particolari incrementi.

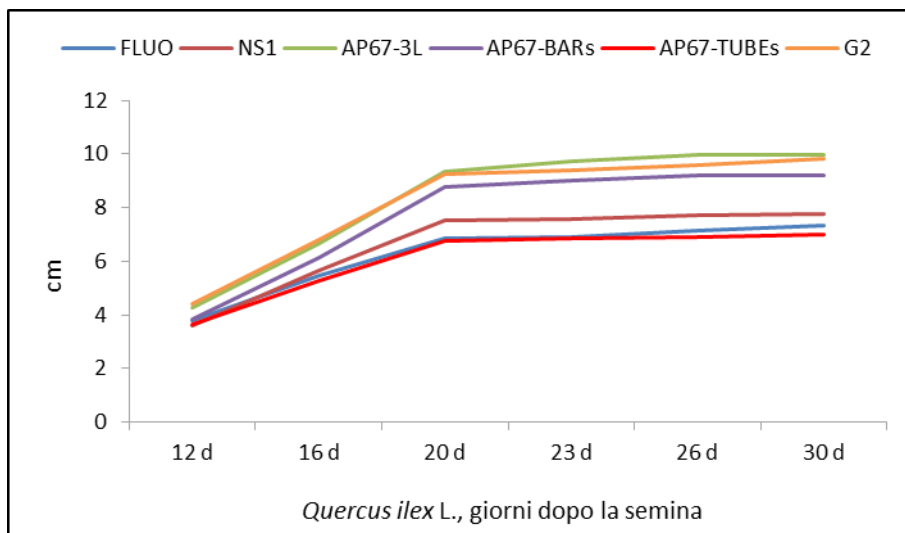


Figura 3.43 Curva di crescita di *Quercus ilex* L. allevato in ambiente controllato.

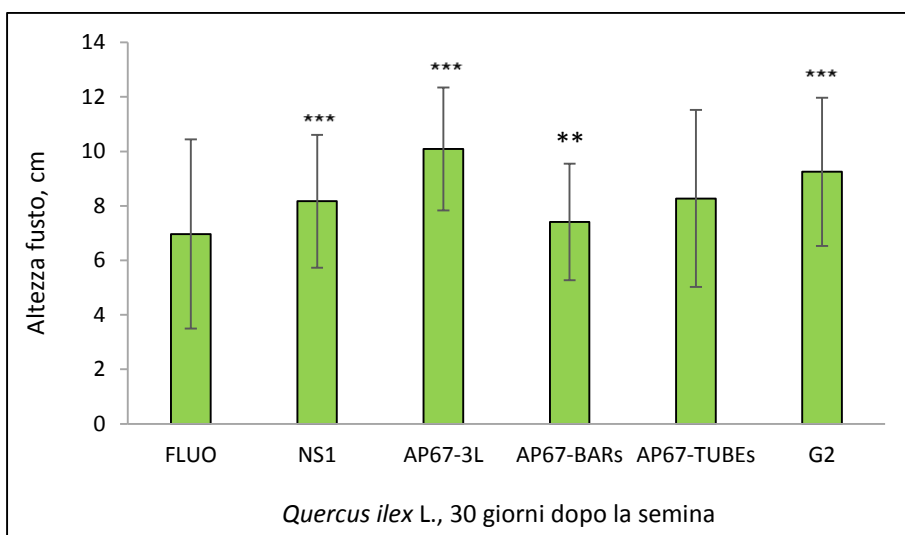


Figura 3.44 Altezza del fusto di *Quercus ilex* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Le barre indicano la deviazione standard. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il metodo T di Student per un livello di significatività $\alpha < 0,05$ ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).

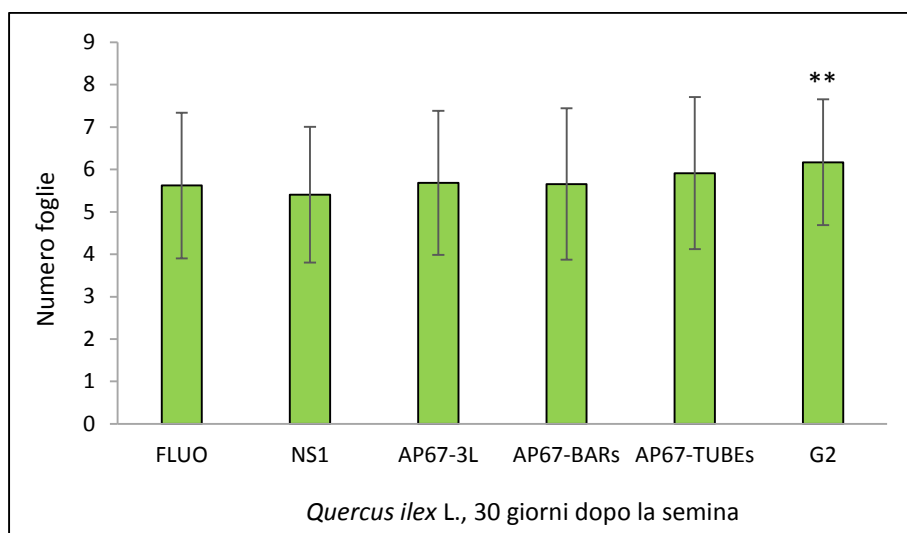


Figura 3.45 Numero foglie di *Quercus ilex* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.44.

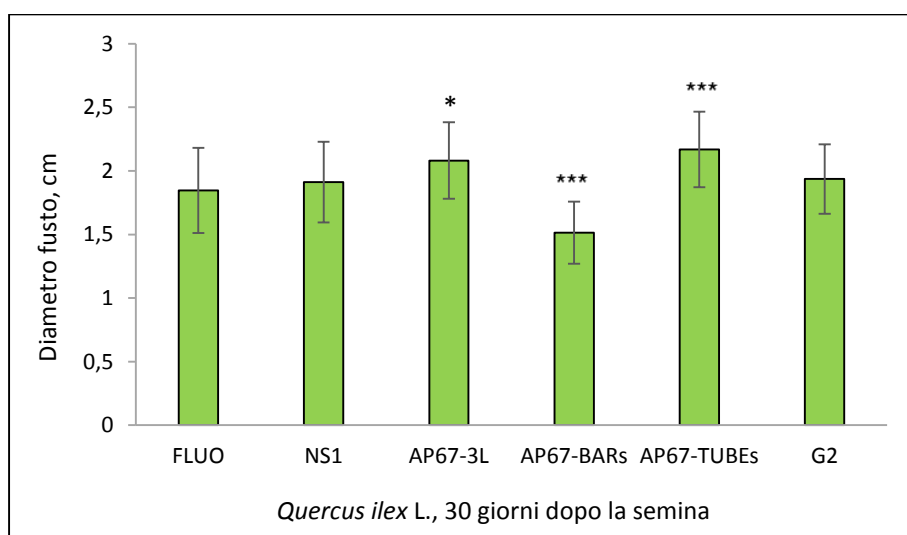


Figura 3.46 Diametro del fusto di *Quercus ilex* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.44.

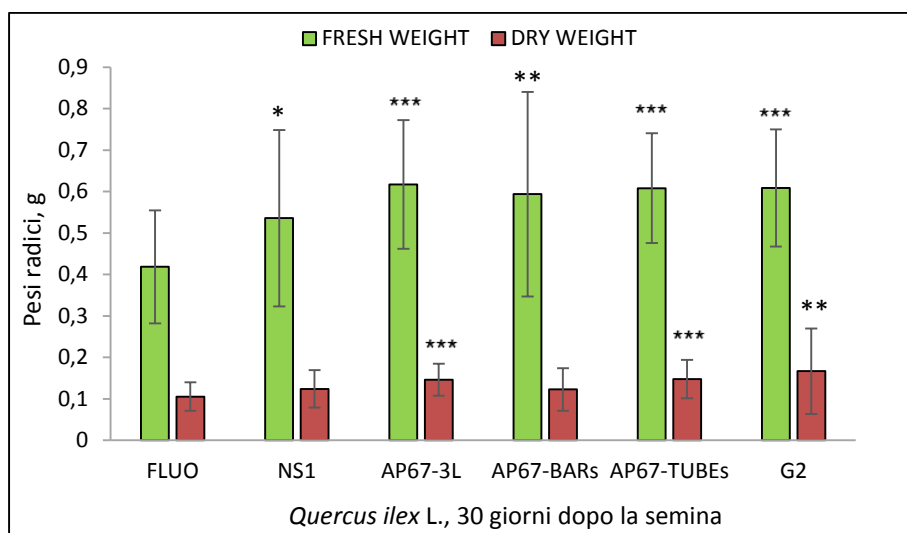


Figura 3.47 Biomassa fresca e secca delle radici di *Quercus ilex* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.44.

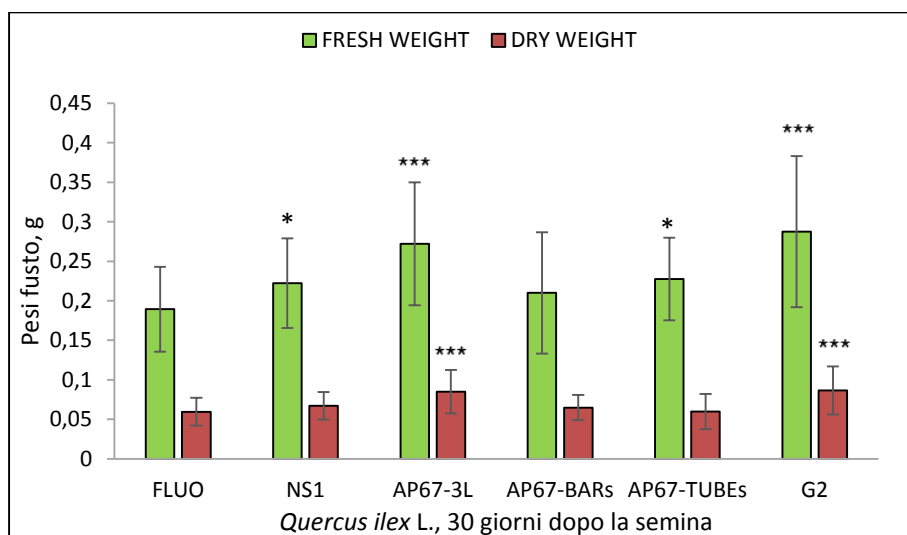


Figura 3.48 Biomassa fresca e secca del fusto di *Quercus ilex* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.44.

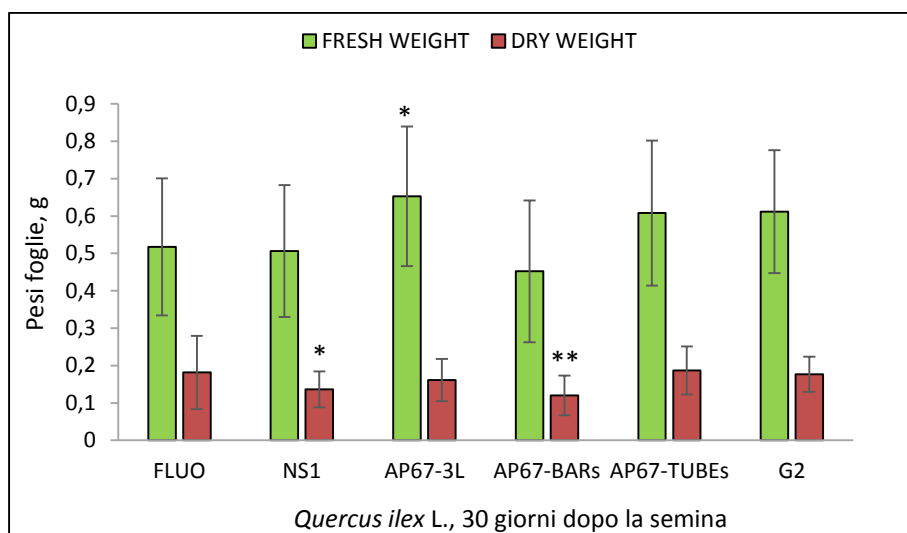


Figura 3.49 Biomassa fresca e secca delle foglie di *Quercus ilex* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.44.

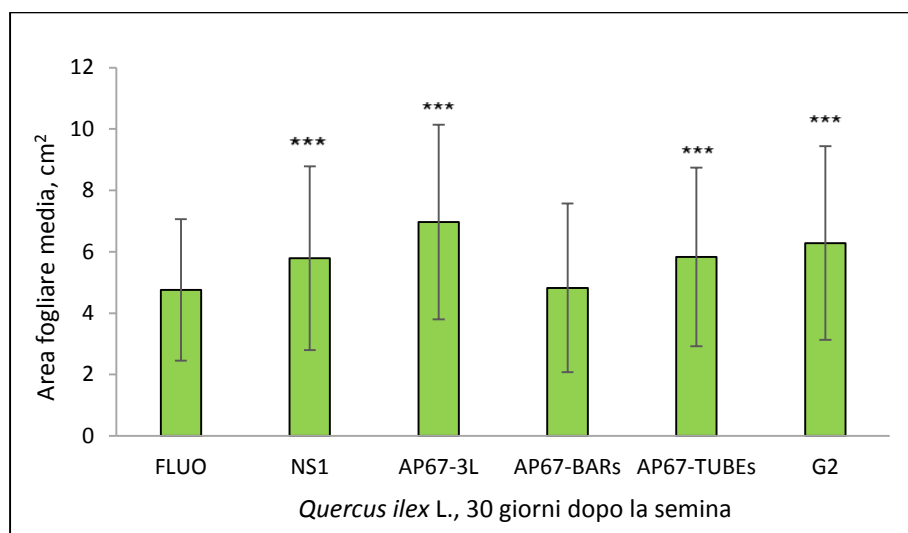


Figura 3.50 Area fogliare media di *Quercus ilex* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.44.

Al fine di verificare le risposte delle piante di leccio alle diverse luci LED testate, rispetto alle piante allevate con luce fluorescente, sono stati analizzati alcuni parametri fisiologici.

Nelle foglie delle piante di leccio allevato con le lampade LED sono stati osservati incrementi significativi, compresi fra il 58% (AP67 BARs) e il 14% (NS1), del contenuto di clorofilla totale rispetto al controllo fluorescente (Figura 3.51). E' interessante notare che G2 determinava invece lo sviluppo di una risposta diversa, cioè un lieve decremento, pari all'8%, di tale parametro. Allo stesso modo, anche il contenuto di carotenoidi totali aumentava nelle piante cresciute con gli spettri LED rispetto al leccio cresciuto con lo spettro fluorescente. Questo parametro risultava però indipendente dal tipo di LED utilizzato (Figura 3.52).

La crescita con le lampade a LED influenzava anche il contenuto proteico nelle piante. In particolare, è stato osservato un incremento del contenuto di proteine totali nelle foglie delle piante cresciute sotto

AP67 3L e G2 Al contrario, il contenuto di proteine diminuiva nelle piante allevate utilizzando i rimanenti spettri con valori compresi tra il 14% (NS1 e AP67 TUBEs) e il 19% (AP67 BARs) (Figura 3.53). Successivamente, sono stati studiati i cambiamenti dell'attività di due enzimi chiave coinvolti nel metabolismo dell'azoto. L'attività dell'enzima NR mostrava una significativa diminuzione nelle piante allevate con i LED rispetto alla luce fluorescente (Figura 3.54). In particolare, l'attività è risultata fortemente inibita nelle piante allevate con i LED G2 (-20%) e AP67 3L (-17%). Solamente, AP67 BARs ha determinato un lieve incremento dell'attività. D'altra parte, l'attività della GS risultava inibita nelle piante cresciute sotto luci LED, specialmente nelle piante allevate con le lampade denominate G2 (-53%) e AP67 3L (-45%) rispetto al controllo fluorescente (Figura 3.55). Lo stress ossidativo causato dalle differenti fonti di illuminazione durante la fase di pre-coltivazione è stato valutato attraverso la determinazione della concentrazione della malondialdeide (MDA). Solamente le piante allevate con G2 presentavano un aumento della concentrazione di MDA rispetto alle piante controllo. Nelle piantine di leccio allevate con le altre luci LED testate è stato possibile osservare un generale decremento del contenuto di MDA con valori compresi tra il 33% (AP67 3L) e il 27% (NS1) (Figura 3.56).

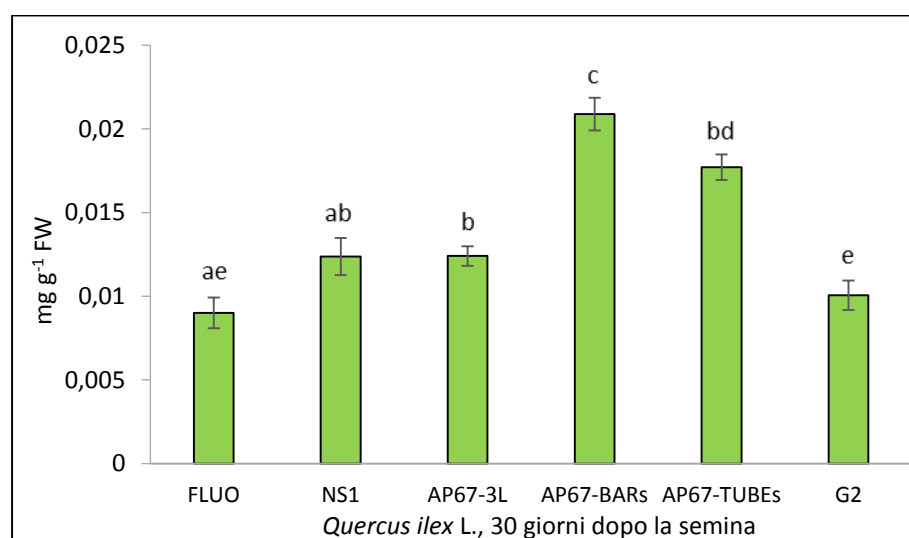


Figura 3.51 Contenuto di clorofilla totale nelle foglie di *Quercus ilex* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano la deviazione standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra i diversi trattamenti ($P < 0.01$) (Tukey test).

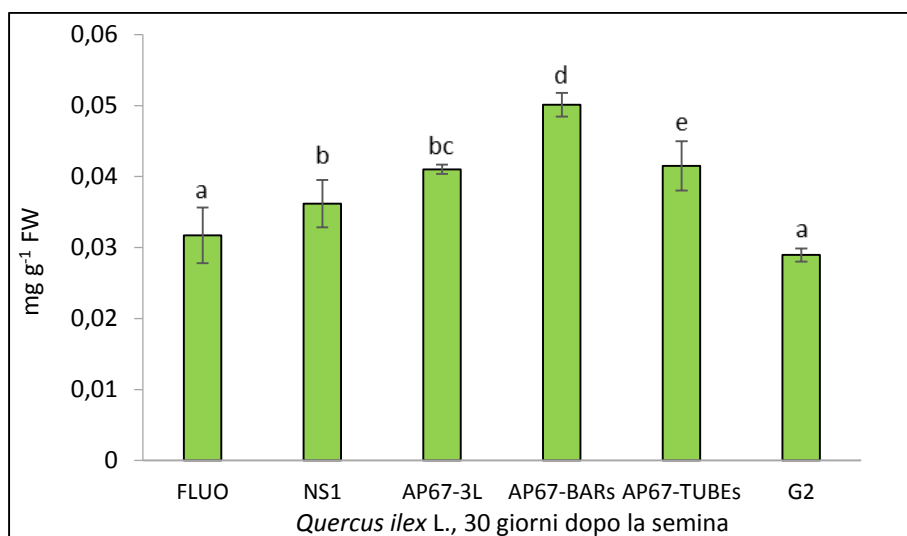


Figura 3.52 Contenuto di β -carotene nelle foglie di *Quercus ilex* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.51.

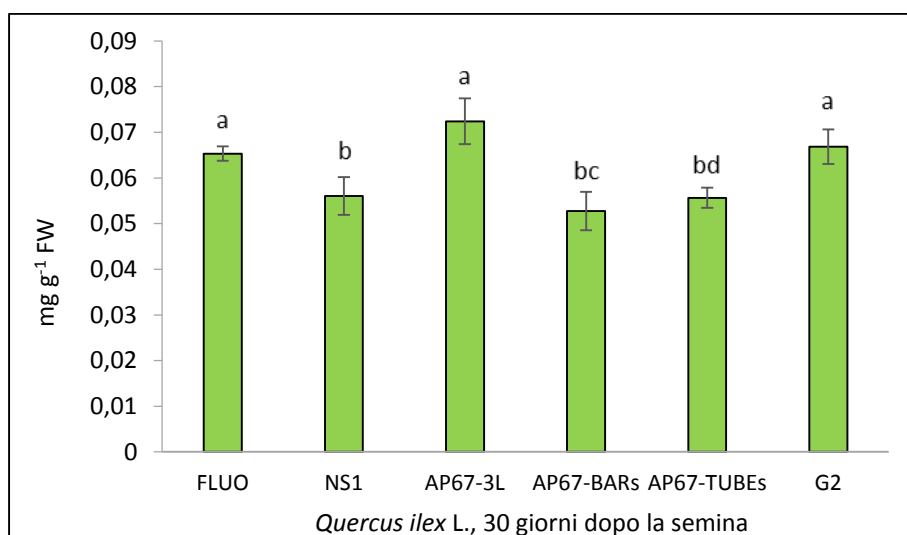


Figura 3.53 Contenuto di proteine nelle foglie di *Quercus ilex* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.51.

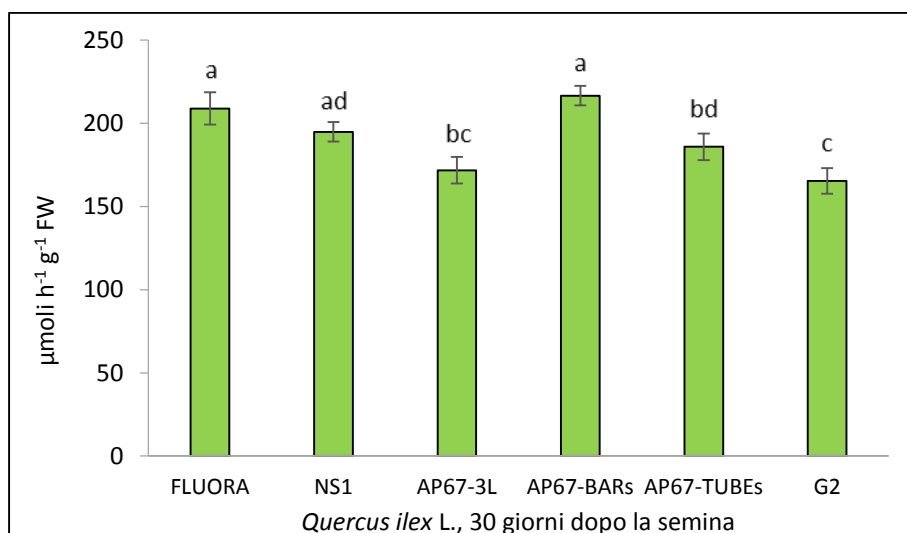


Figura 3.54 Variazioni dell'attività dell'enzima NR nelle foglie di *Quercus ilex* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.51.

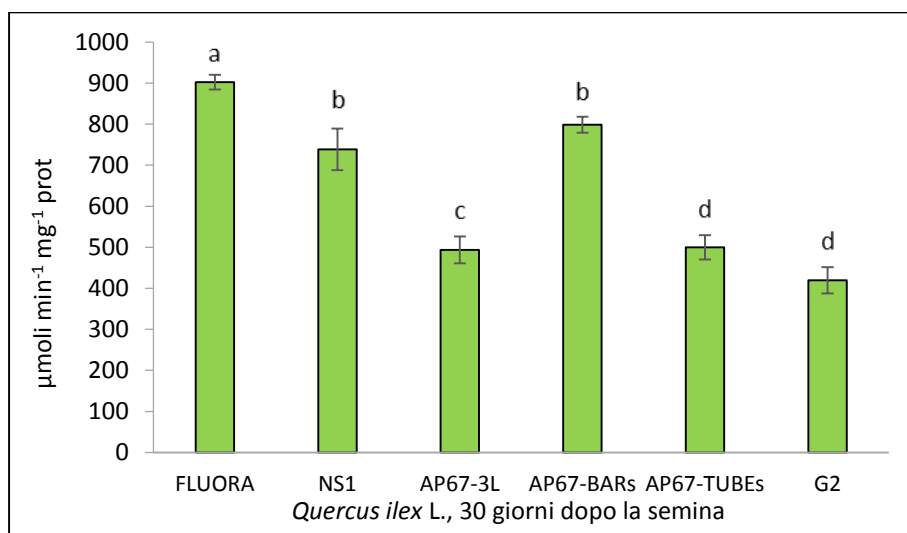


Figura 3.55 Variazioni dell'attività dell'enzima GS nelle foglie di *Quercus ilex* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.51.

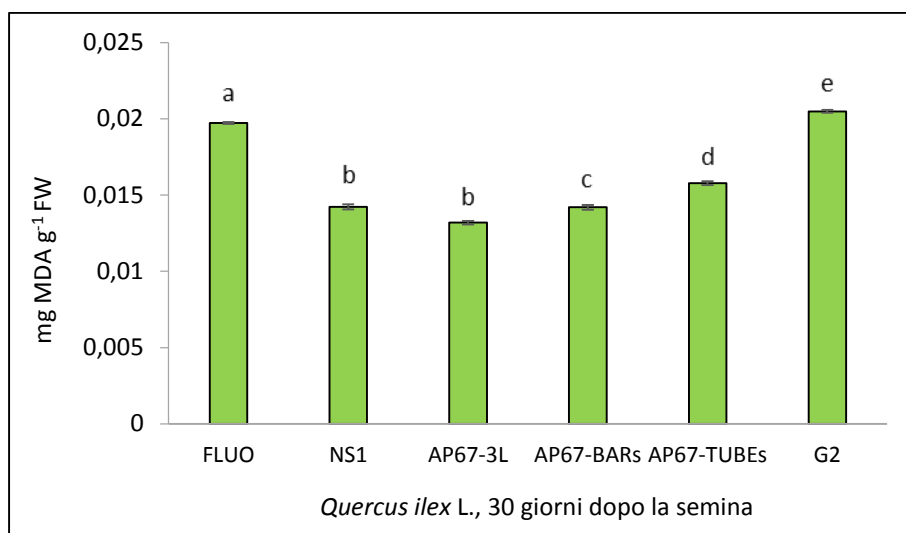


Figura 3.56 Contenuto di MDA nelle foglie di *Quercus ilex* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.51.

3.2.2 Allevamento in serra

Terminato il periodo di allevamento in ambiente controllato, le piante di leccio sono state trapiantate in contenitori più grandi e trasferite in serra.

L'andamento dell'incremento in termini di altezza rilevato sul leccio durante il periodo di adattamento in serra, inizialmente ha evidenziato un maggiore accrescimento per le piante allevate utilizzando la lampada AP67 BARs (Figura 3.57). Tuttavia, a partire dal 97° giorno tra le piante cresciute utilizzando le lampade AP67 BARs, G2 e NS1 non erano più visibili sostanziali differenze. Al contrario, al termine del periodo di adattamento in serra le piante allevate utilizzando la lampada AP67 TUBEs, insieme alle piante controllo, mostravano un ridotto accrescimento rispetto alle precedenti. Analizzando i parametri finali di altezza del fusto (Figura 3.58), numero delle foglie (Figura 3.59) e diametro (Figura 3.60), non sono emersi risultati statisticamente significativi tra le piante allevate con luci LED e le piante allevate con luce fluorescente. Allo stesso modo, anche i valori ottenuti riguardo alla biomassa fresca e secca di radici (Figura 3.61), fusto (Figura 3.62) e foglie (Figura 3.63) non hanno evidenziato differenze statisticamente significative per le piante allevate con luci LED, rispetto alle piante controllo.

Ulteriore analisi è stata effettuata valutando l'area media fogliare. Anche in questo caso le piante allevate con luci LED non hanno mostrato differenze statisticamente significative, rispetto alle piante allevate con luce fluorescente (Figura 3.64).

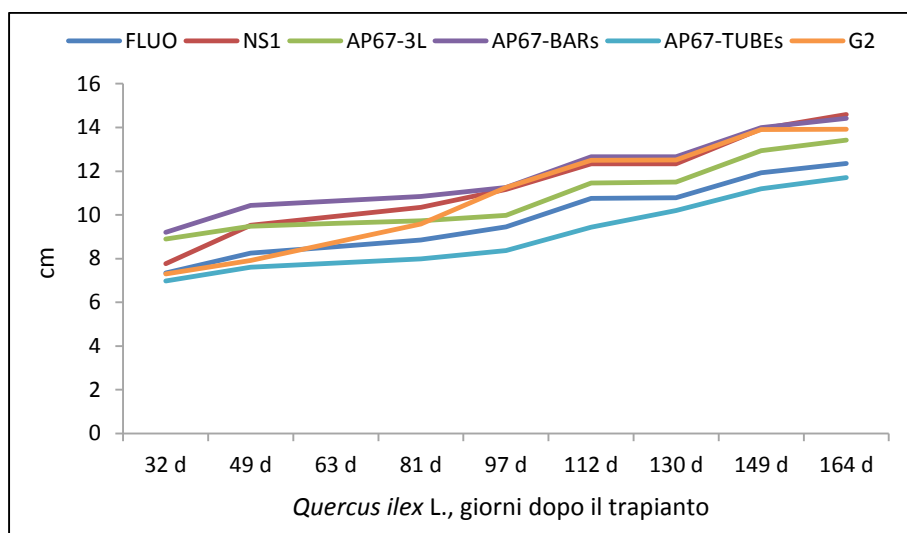


Figura 3.57 Curva di crescita di *Quercus ilex* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra.

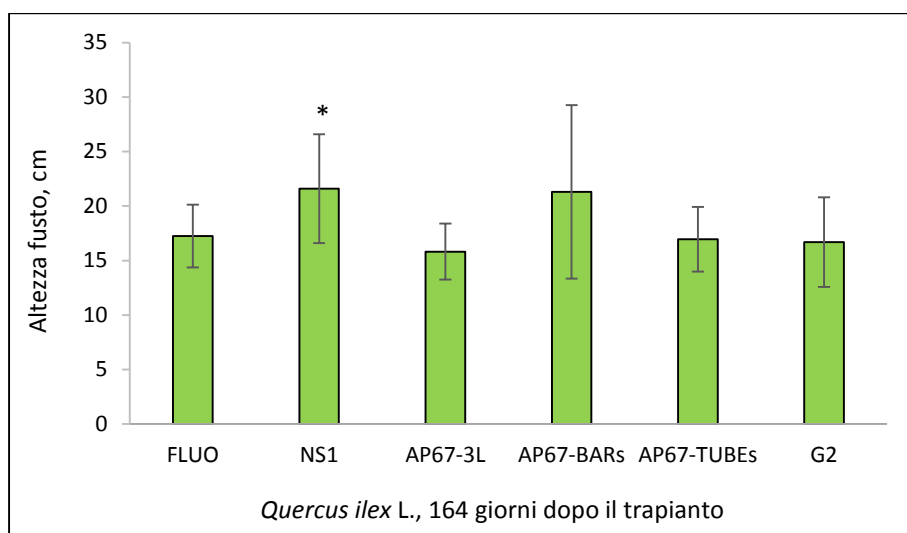


Figura 3.58 Altezza del fusto di *Quercus ilex* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Le barre indicano la deviazione standard. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il metodo T di Student per un livello di significatività $\alpha < 0,05$ ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).

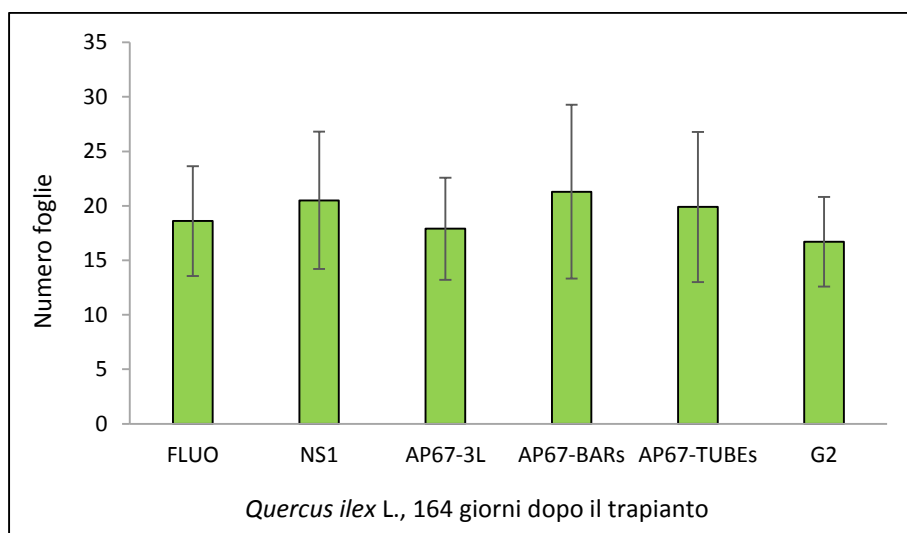


Figura 3.59 Numero foglie di *Quercus ilex* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.58.

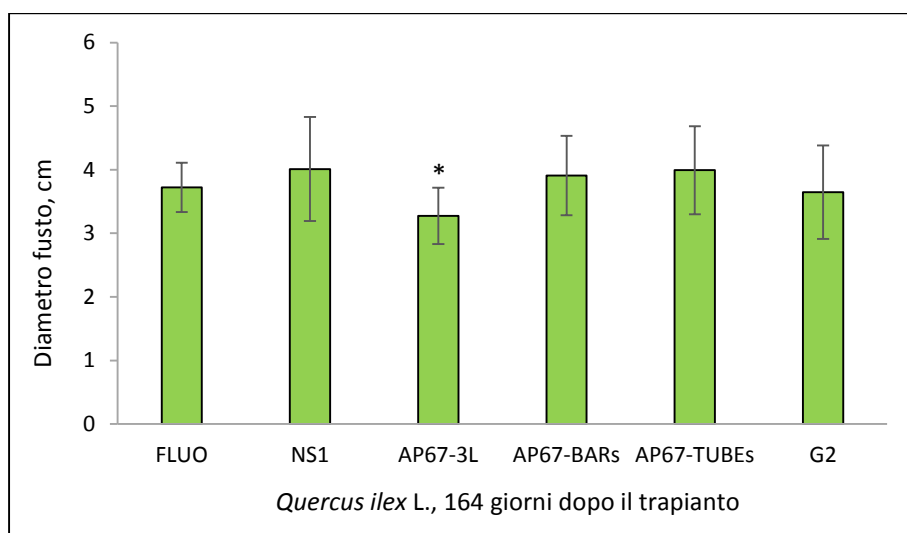


Figura 3.60 Diametro del fusto *Quercus ilex* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.58.

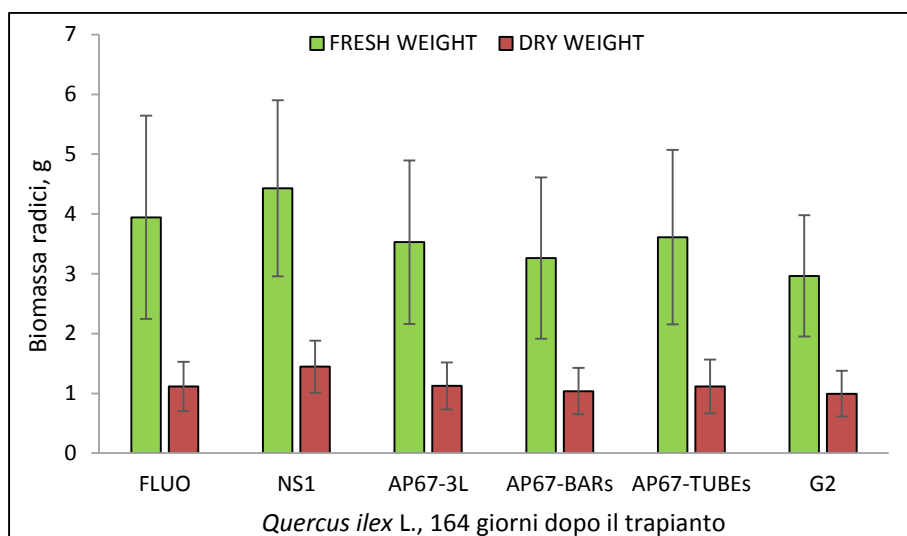


Figura 3.61 Biomassa fresca e secca delle radici di *Quercus ilex* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.58.

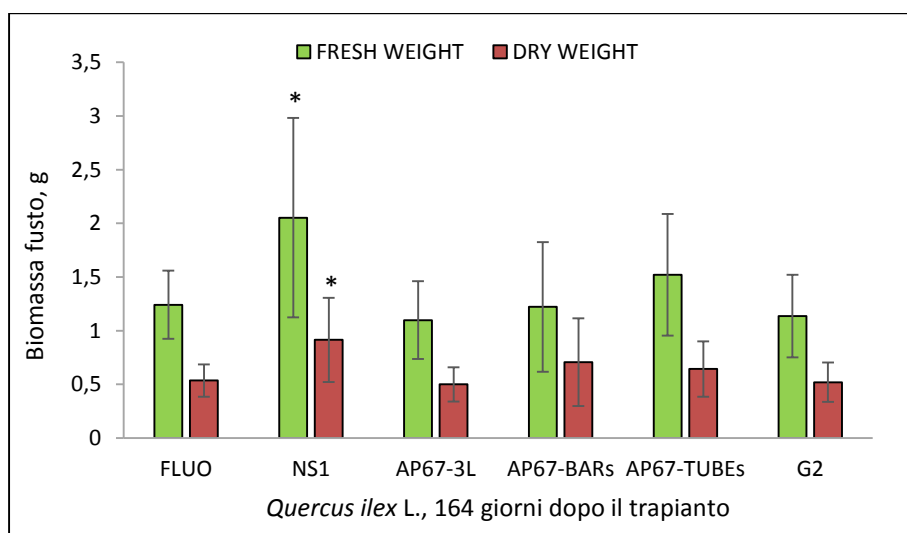


Figura 3.62 Biomassa fresca e secca del fusto di *Quercus ilex* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.58.

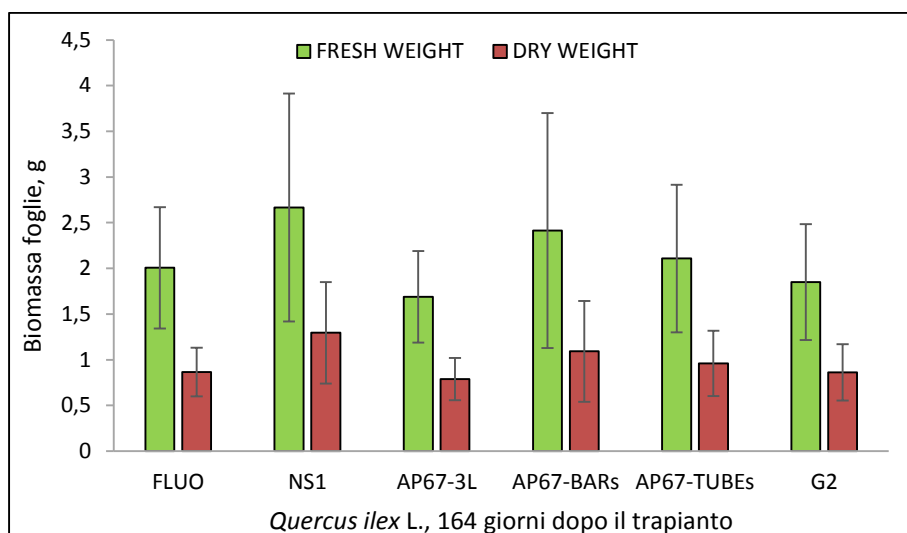


Figura 3.63 Biomassa fresca e secca delle foglie di *Quercus ilex* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.58.

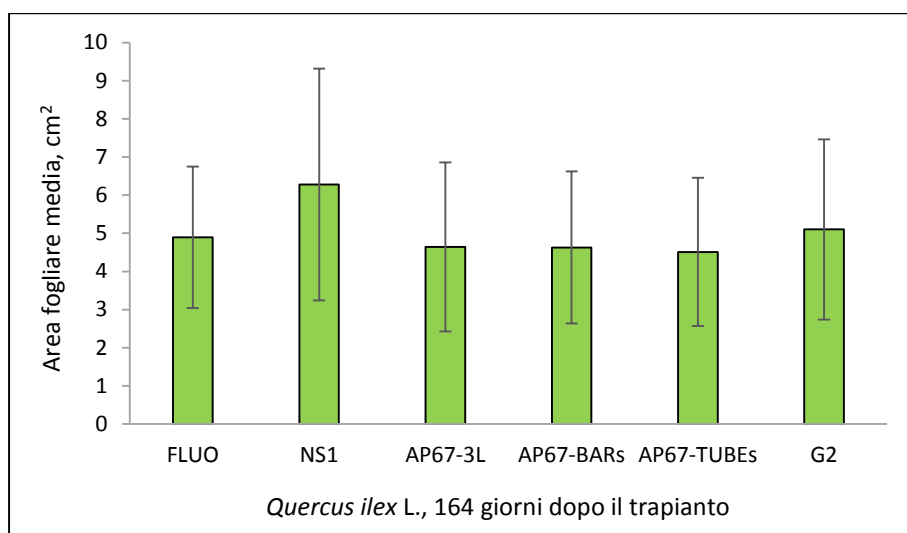


Figura 3.64 Area fogliare media di *Quercus ilex* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.58.

3.3 *Myrtus communis* L.

Vengono di seguito riportati i risultati e la discussione relativa agli esperimenti condotti sulle piante di mirto coltivate sia in ambiente controllato utilizzando diverse luci LED, sia in seguito al periodo di adattamento in serra.

3.3.1 Allevamento in ambiente controllato

Dopo un periodo di allevamento di 52 giorni in ambiente controllato, sono stati valutati diversi parametri morfometrici e biochimici al fine di valutare gli effetti di diverse luci LED su plantule di mirto rispetto alla luce fluorescente.

L'andamento dell'incremento in termini di altezza rilevato sul mirto durante il periodo di allevamento, ha indicato le lampade AP67 3L e G2 come le luci che maggiormente hanno influenzato

l'accrescimento delle piante (Figura 3.65). Al contrario, le piante accresciute utilizzando la lampada fluorescente hanno mostrato il minore accrescimento. Analogamente, l'analisi dell'altezza finale del fusto (Figura 3.66) ha mostrato ottimi risultati per le piante allevate con la lampada AP67 3L rispetto alle piante cresciute con la luce fluorescente. Infatti, le prime presentavano un'altezza finale di 3,2 cm mentre le seconde di 1,68 cm. In generale, tutte le piante allevate sotto luce LED presentavano valori di altezza superiori rispetto alle piante allevate con luce fluorescente.

Al contrario, l'analisi del numero finale di foglie ha mostrato decrementi statisticamente significativi per le piante allevate con luce LED rispetto alle piante controllo, con valori compresi tra il -25% (NS1) e -1% (AP67 TUBEs) (Figura 3.67). Gli esperimenti condotti hanno evidenziato un effetto negativo delle luci LED testate anche sull'incremento in termini diametrici del fusto (Figura 3.68). Nello specifico, i termini del decremento rispetto alle piante controllo presentavano valori compresi tra il -14% (AP67 3L) e il -50% (G2).

Analizzando i valori ottenuti riguardo alla biomassa fresca e secca, significativi risultati si sono osservati soprattutto a livello della biomassa radicale. Infatti, in questo caso tutte le luci LED utilizzate hanno comportato un decremento della biomassa radicale sia fresca che secca, rispetto alle piante controllo. Tuttavia, la lampada AP67 3L (come possibile notare in figura 3.68) ha determinato nelle piante un incremento dei livelli di biomassa fresca e secca delle radici, rispetto alle piante allevate con luce fluorescente. Nello specifico, le prime presentavano una media di 0,033 g per la biomassa fresca e 0,007 g per la biomassa secca. Le piante allevate sotto fluorescenza presentavano, invece, valori di 0,028 g per la biomassa fresca e 0,006 g per la biomassa secca. Valutando i risultati ottenuti per la biomassa fresca e secca del fusto (Figura 3.67), solamente le piante accresciute sotto AP67 3L e AP67 BARs hanno determinato incrementi statisticamente significativi rispetto alle piante allevate con luce fluorescente, della biomassa secca. Al contrario, l'analisi della biomassa fresca e secca delle foglie (Figura 3.68) ha evidenziato decrementi rispetto alle piante controllo, per tutte le luci LED testate.

Ulteriore analisi è stata effettuata valutando l'area media fogliare. Anche in questo caso la lampada AP67 3L si è manifestata come la luce determinante gli incrementi maggiormente significativi (0,50 cm²) rispetto alla tradizionale luce fluorescente (0,39 cm²) (Figura 3.69). Anche le lampade AP67 TUBEs (0,47 cm²) e G2 (0,44 cm²) hanno mostrato incrementi statisticamente significativi, rispetto alle piante controllo.

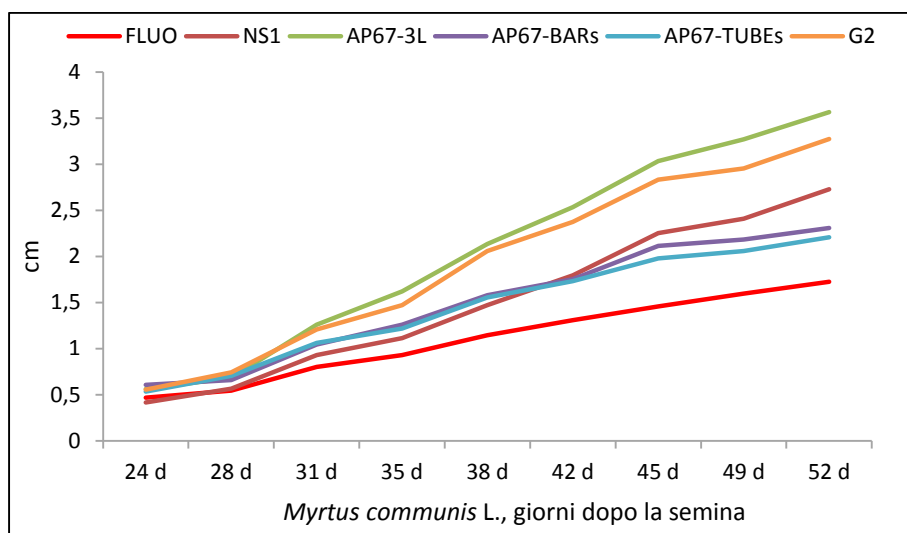


Figura 3.65 Curva di crescita di *Myrtus communis* L. allevato in ambiente controllato.

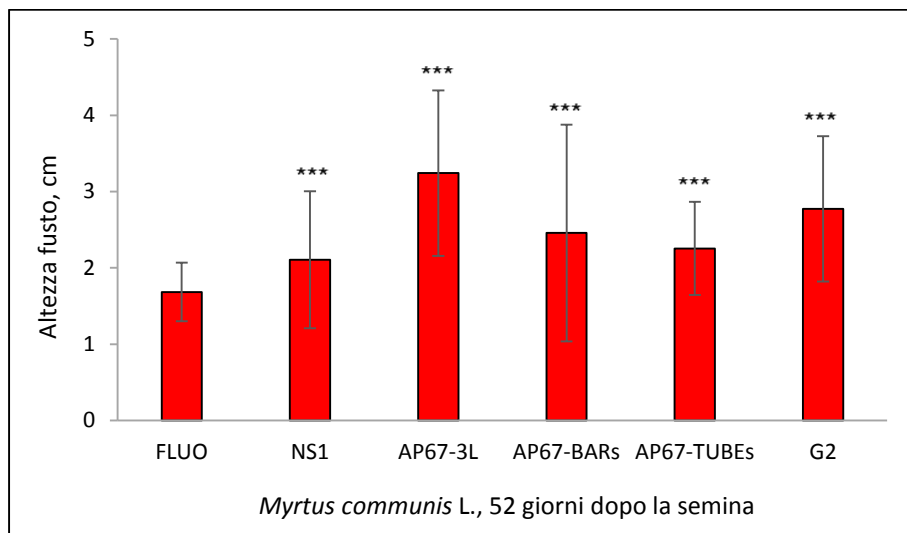


Figura 3.66 Altezza del fusto di *Myrtus communis* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Le barre indicano la deviazione standard. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il metodo T di Student per un livello di significatività $\alpha < 0,05$ ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).

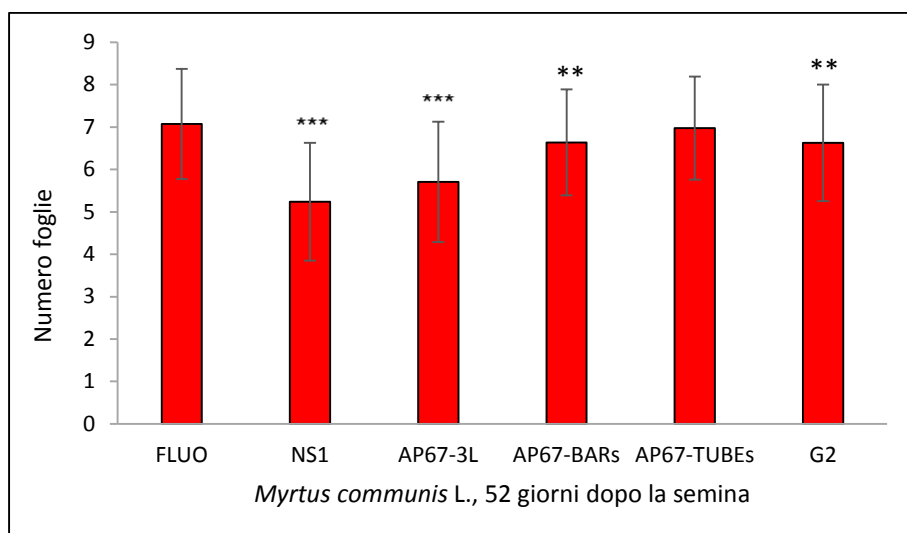


Figura 3.67 Numero foglie di *Myrtus communis* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.66.

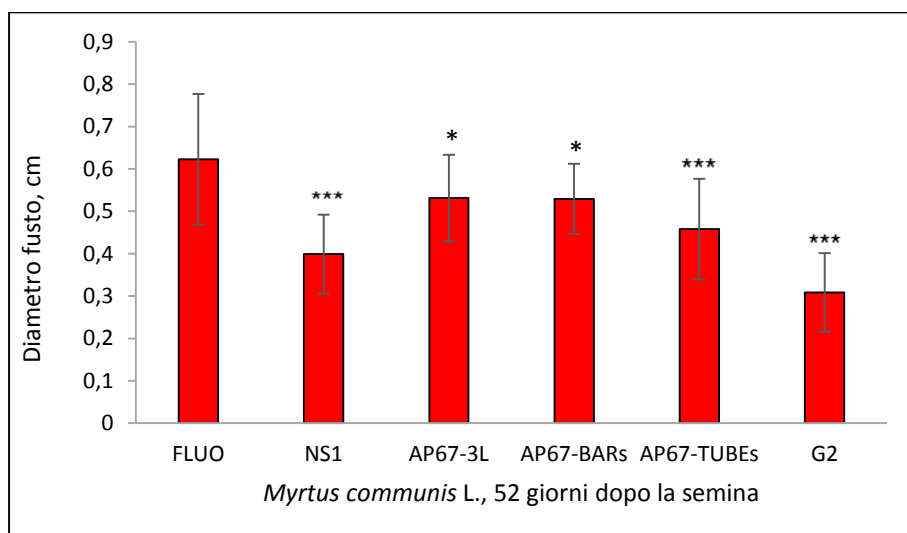


Figura 3.68 Diametro del fusto di *Myrtus communis* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.66.

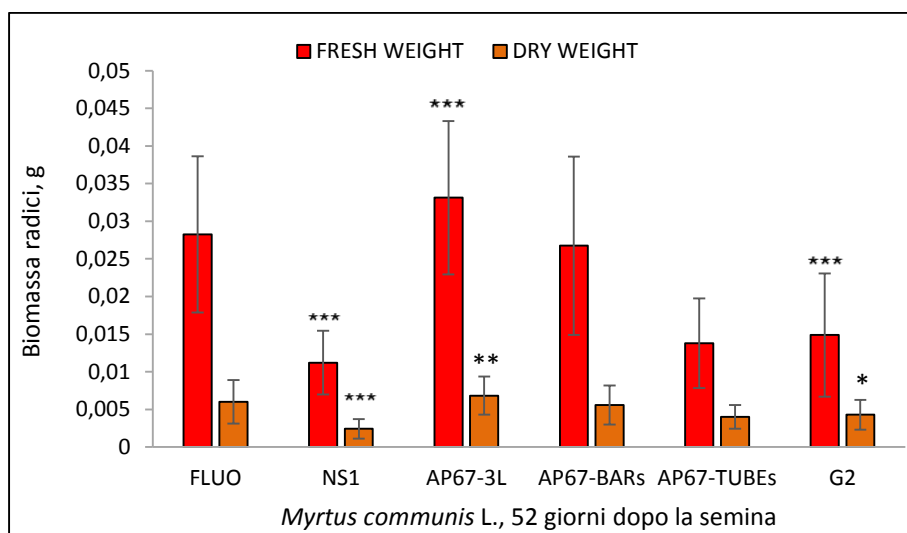


Figura 3.69 Biomassa fresca e secca delle radici di *Myrtus communis* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.66.

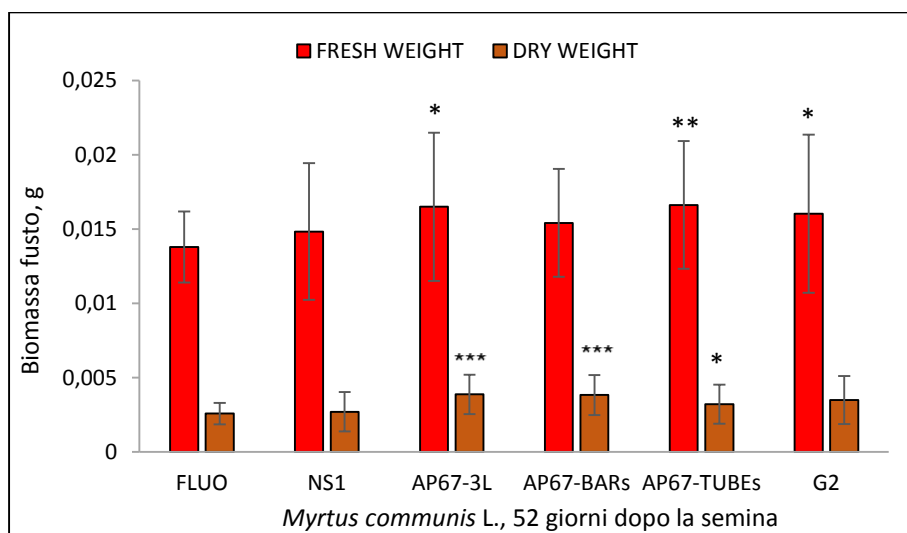


Figura 3.70 Biomassa fresca e secca del fusto di *Myrtus communis* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.66.

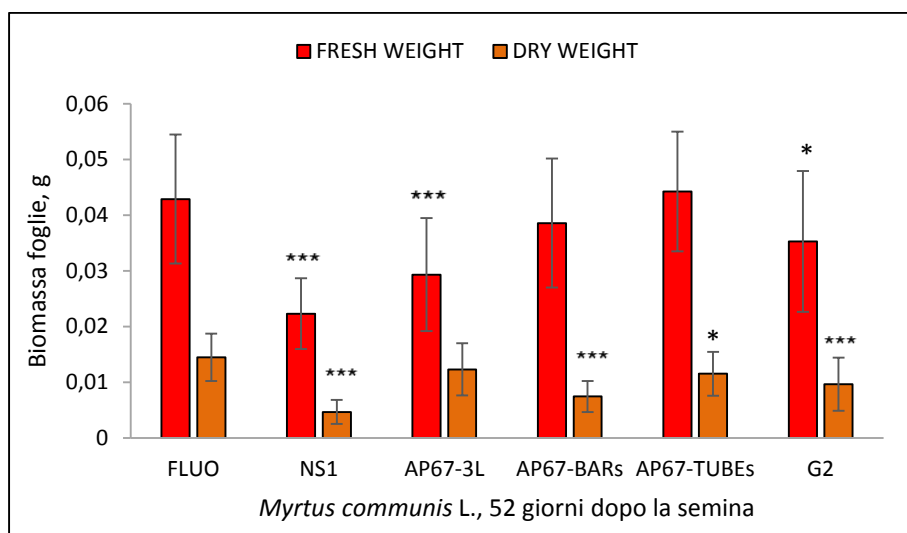


Figura 3.71 Biomassa fresca e secca delle foglie di *Myrtus communis* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.66.

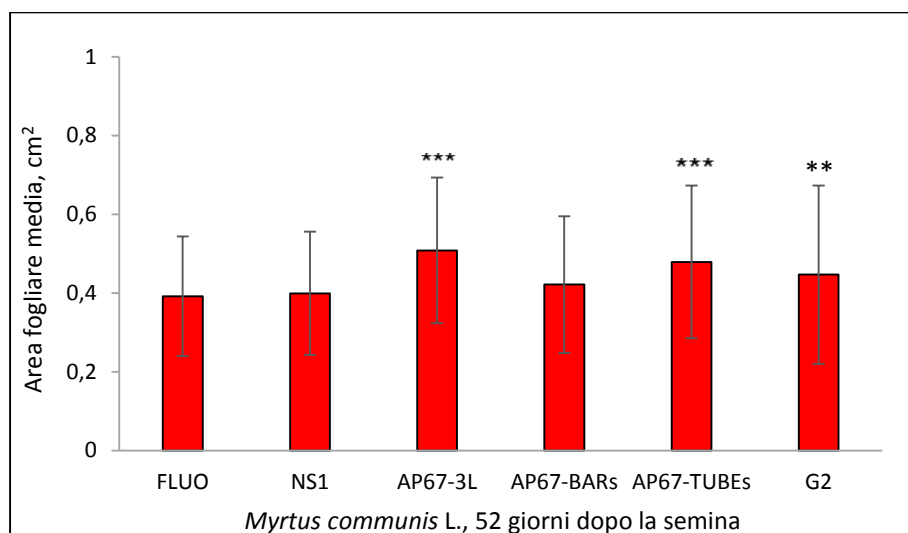


Figura 3.72 Area fogliare media di *Myrtus communis* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.66.

Come per le specie precedentemente studiate, anche per il *Myrtus communis* L. sono state analizzate le variazioni indotte dalla diversa fonte luminosa su alcuni parametri fisiologici, quali contenuto totale di clorofilla e carotenoidi, attività degli enzimi NR e GS e contenuto di MDA.

Il contenuto di clorofilla totale non risultava influenzato positivamente nelle piante allevate con le luci LED, ad eccezione delle piante cresciute utilizzando la lampada AP67 3L. Infatti, in questo caso si osservava un incremento di questo parametro pari al 95%, rispetto alle piante controllo (Figura 3.73). D'altra parte, il contenuto dei carotenoidi era influenzato positivamente nelle piante allevate con la lampada AP67 3L, mentre si mostrava ridotto nelle piante allevate con G2 (-87%) (Figura 3.74). L'analisi del contenuto di proteine ha evidenziato un effetto positivo, rispetto alle piante allevate con le luci fluorescenti, nelle piante allevate con le luci LED (Figura 3.75). In particolare, le piante allevate utilizzando NS1, AP67 3L e AP67 TUBEs presentavano circa due volte il contenuto

di proteine rispetto alle piante controllo, mentre nelle piante di mirto cresciute sotto G2 tale parametro raggiungeva valori pari a circa tre volte quello delle piante allevate sotto fluorescenza.

L'attività della NR risultava aumentata in seguito all'esposizione alle luci LED (Figura 3.76), specialmente per il mirto allevato usando AP67 3L dove l'attività risultava circa 2 volte più alta rispetto all'attività mostrata dalle piante controllo. Al contrario, l'attività della GS risultava fortemente inibita nelle piante di mirto allevate con i LED e tali riduzioni erano comprese tra il -33% (NS1) e il -71% (AP67 BARs) (Figura 3.77).

Il contenuto di MDA presentava un decremento, rispetto alle piante controllo, nelle piante allevate utilizzando le lampade AP67 3L (-20%), G2(-3%) e NS1 (-2%). Al contrario, le piante allevate con le lampade AP67 BARs e AP67 TUBEs, quando paragonate alle piante controllo, presentavano un incremento del contenuto di MDA rispettivamente pari a +48% e +3% (Figura 3.78).

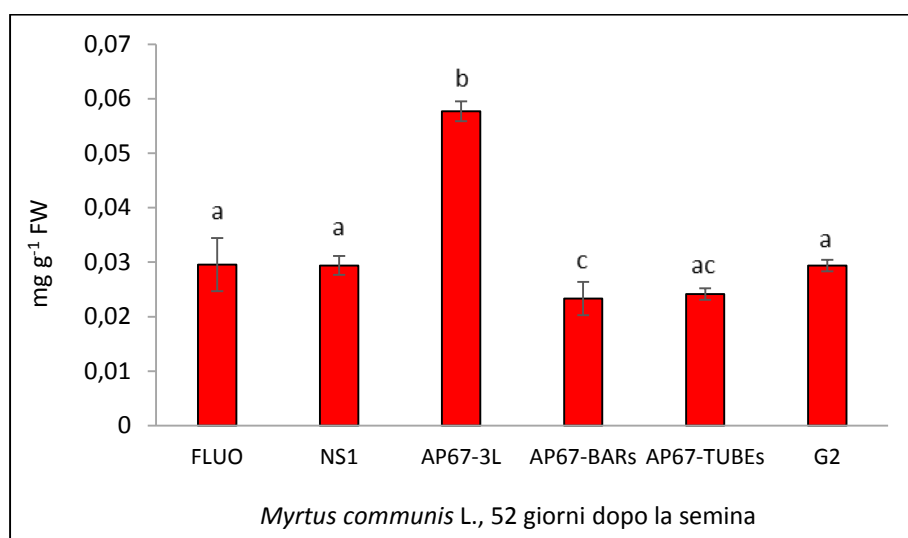


Figura 3.73 Contenuto di clorofilla totale nelle foglie di *Myrtus communis* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano la deviazione standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra i diversi trattamenti ($P < 0.01$) (Tukey test).

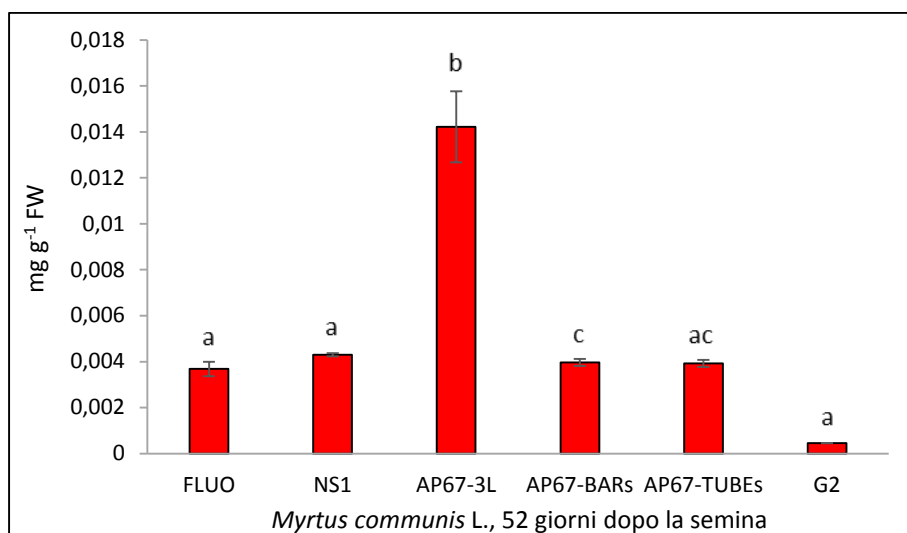


Figura 3.74 Contenuto di β -carotene nelle foglie di *Myrtus communis* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.73.

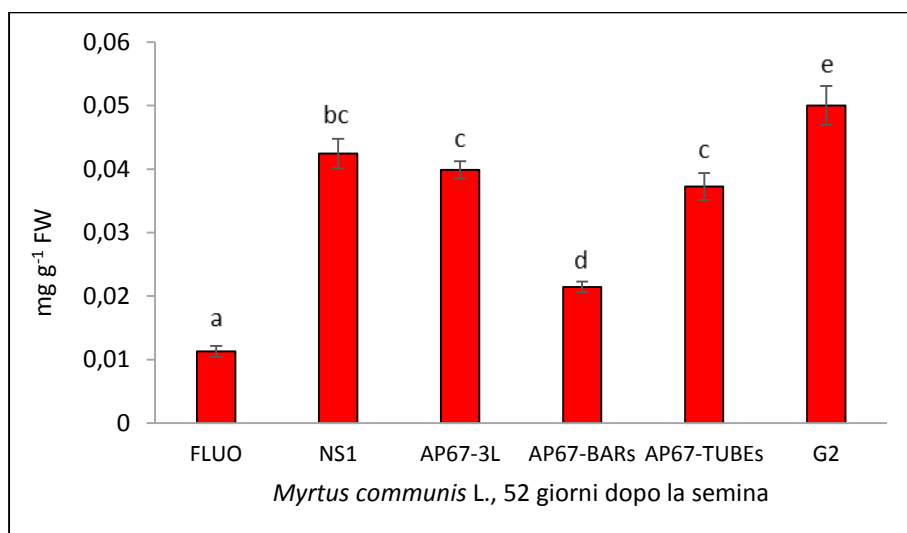


Figura 3.75 Contenuto di proteine nelle foglie di *Myrtus communis* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.73.

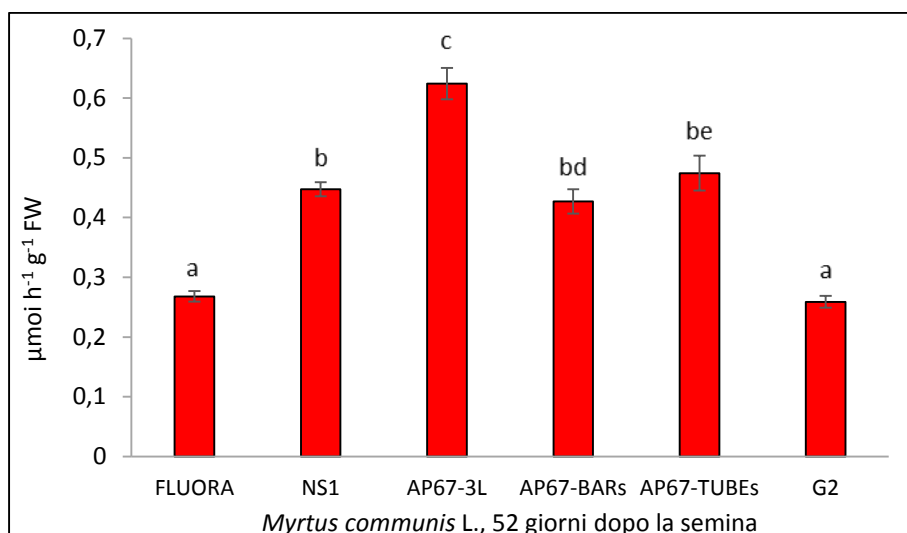


Figura 3.76 Variazioni dell'attività dell'enzima NR nelle foglie di *Myrtus communis* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.73.

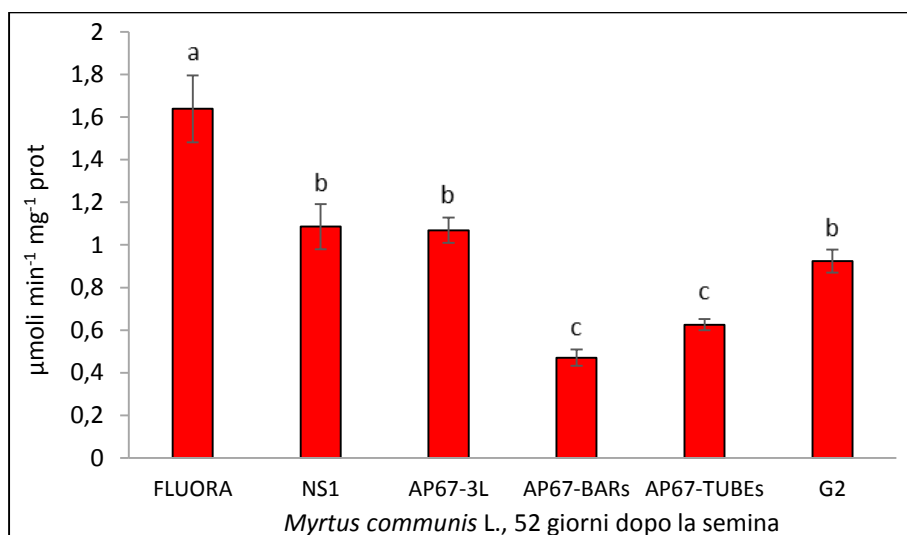


Figura 3.77 Variazioni dell'attività dell'enzima GS nelle foglie di *Myrtus communis* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.73.

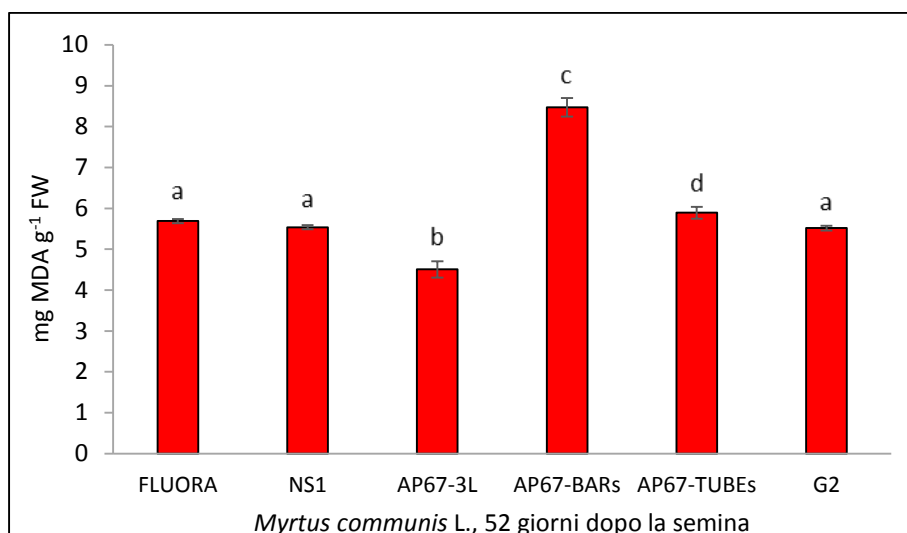


Figura 3.78 Contenuto di MDA nelle foglie di *Myrtus communis* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.73.

3.3.2 Allevamento in serra

Terminato il periodo di allevamento in ambiente controllato, le piante di mirto sono state trapiantate in contenitori più grandi e trasferite in serra.

L'andamento dell'incremento in termini di altezza rilevato sul mirto durante il periodo di adattamento in serra, inizialmente ha evidenziato un maggiore accrescimento per le piante allevate utilizzando la lampada AP67 3L e G2 (Figura 3.79). Tuttavia, a partire dal 63° giorno le piante allevate con AP67 3L presentavano il maggior livello di accrescimento tra tutte le condizioni sperimentali testate. Al contrario, al termine del periodo di adattamento in serra le piante allevate utilizzando la lampada AP67 BARs mostravano un accrescimento inferiore rispetto a tutte le condizioni testate. Analizzando i parametri finali di altezza del fusto (Figura 3.80), numero delle foglie (Figura 3.81) e diametro (Figura 3.82), non sono emersi risultati statisticamente significativi tra le piante allevate con luci LED e le piante allevate con luce fluorescente. Tuttavia, è comunque possibile notare che, per i parametri appena elencati, le piante allevate con luci LED presentavano sempre valori inferiori rispetto alle piante allevate con la fluorescenza tranne che per le piante allevate con AP67 3L. Infatti, in questo caso è possibile notare incrementi di altezza fusto, numero foglie e diametro rispetto alle piante controllo.

Analizzando i valori ottenuti riguardo alla biomassa fresca e secca, significativi risultati si sono osservati soprattutto a livello della biomassa fogliare. Infatti, in questo caso per alcune delle luci LED utilizzate è stato possibile notare un decremento della biomassa fogliare sia fresca che secca, rispetto alle piante controllo. Tuttavia, la lampada AP67 3L (come possibile notare in Figura 3.83) ha determinato nelle piante un incremento dei livelli di biomassa fresca delle foglie, rispetto alle piante allevate con luce fluorescente. Valutando i risultati ottenuti per la biomassa del fusto (Figura 3.84) solamente le piante accresciute sotto AP67 3L e G2 hanno determinato incrementi statisticamente

significativi della biomassa secca, rispetto alle piante allevate con luce fluorescente. Decrementi statisticamente significativi si sono osservati, invece, solamente nella sostanza secca del fusto delle piante allevate con la lampada NS1. Al contrario, l'analisi della biomassa fresca e secca delle radici (Figura 3.85) ha evidenziato decrementi rispetto alle piante controllo per tutte le luci LED testate, specialmente per le piante cresciute sotto NS1.

Ulteriore analisi è stata effettuata valutando l'area media fogliare. In questo caso, solamente le piante allevate con le lampade NS1 e AP67 BARs hanno mostrato decrementi statisticamente significativi, rispetto alle piante allevate con luce fluorescente (Figura 3.86).

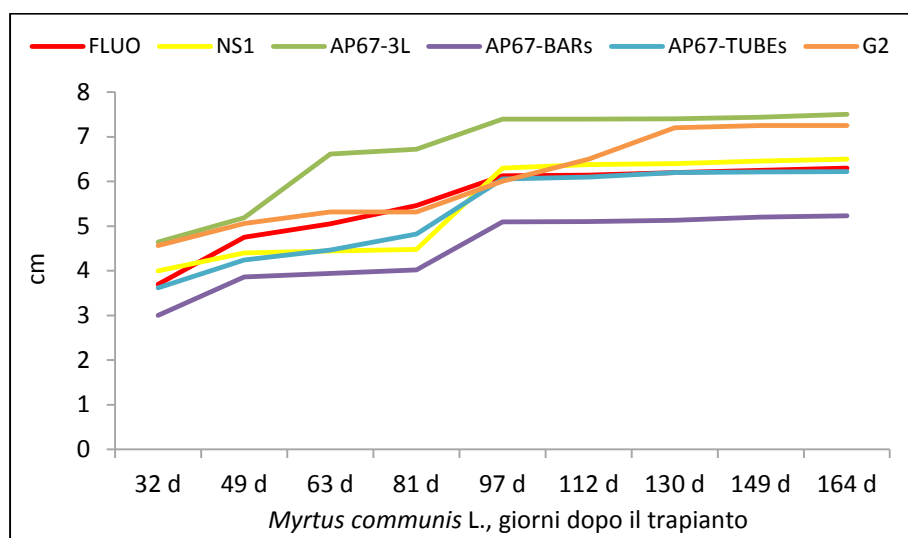


Figura 3.79 Curva di crescita di *Myrtus communis* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra.

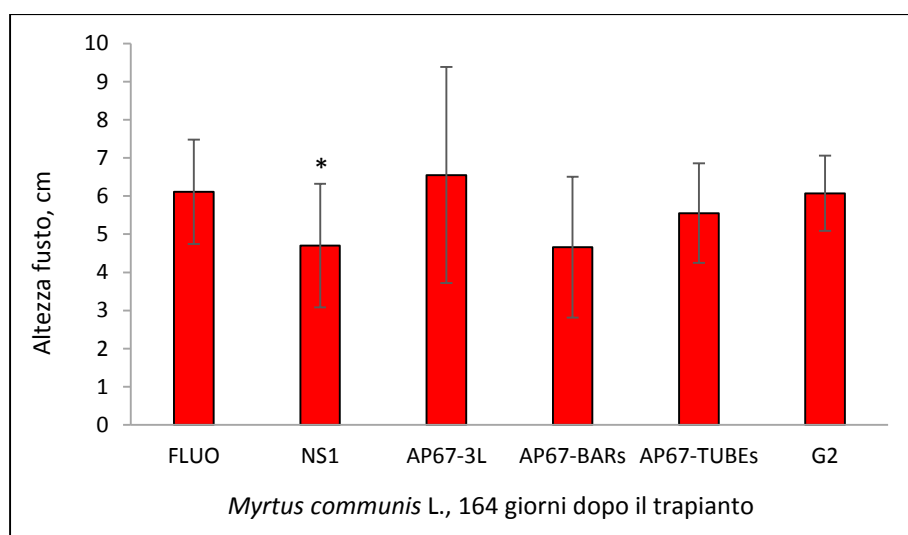


Figura 3.80 Altezza del fusto di *Myrtus communis* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Le barre indicano la deviazione standard. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il metodo T di Student per un livello di significatività $\alpha < 0,05$ ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).

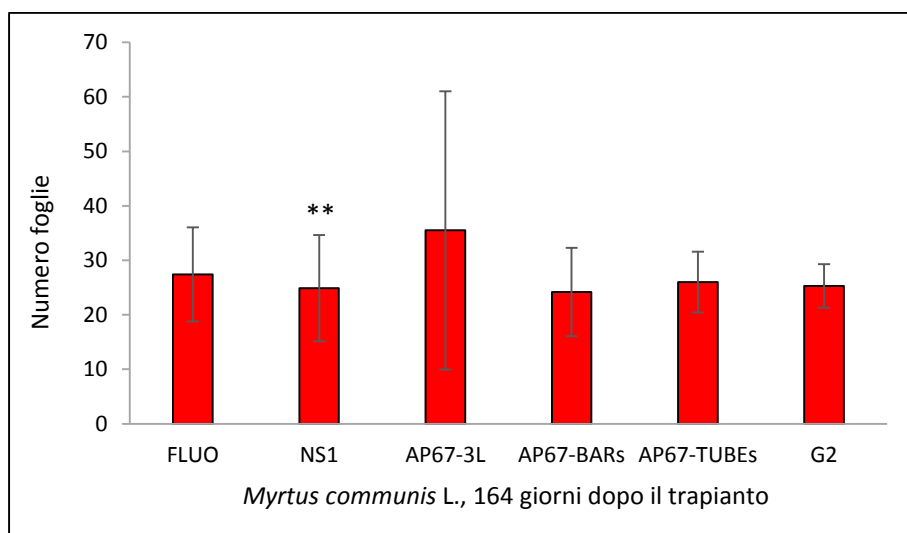


Figura 3.81 Numero foglie di *Myrtus communis* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.80.

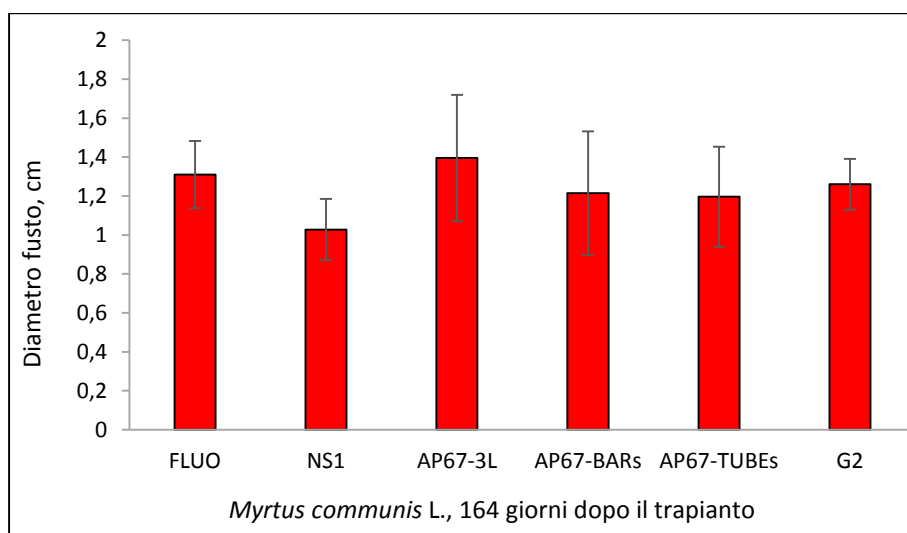


Figura 3.82 Diametro del fusto *Myrtus communis* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.80.

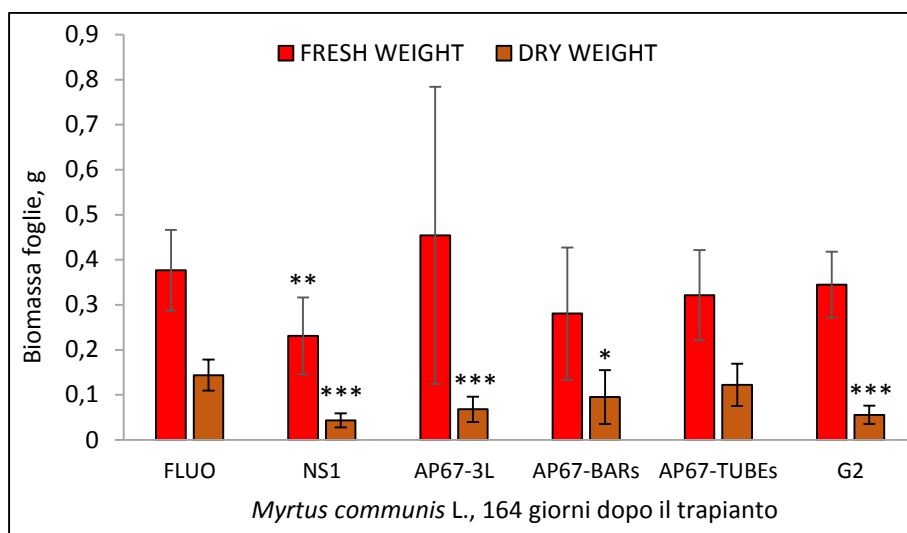


Figura 3.83 Biomassa fresca e secca delle foglie di *Myrtus communis* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.80.

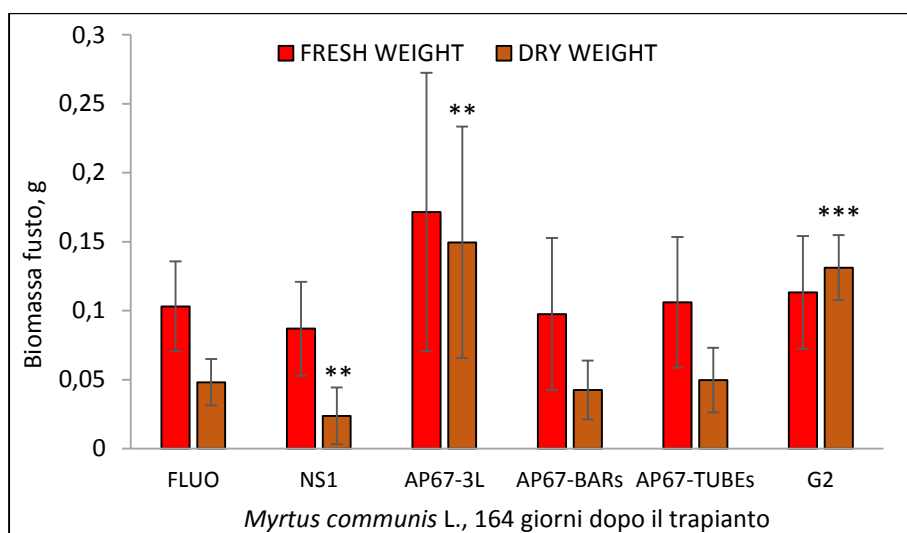


Figura 3.84 Biomassa fresca e secca del fusto di *Myrtus communis* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.80.

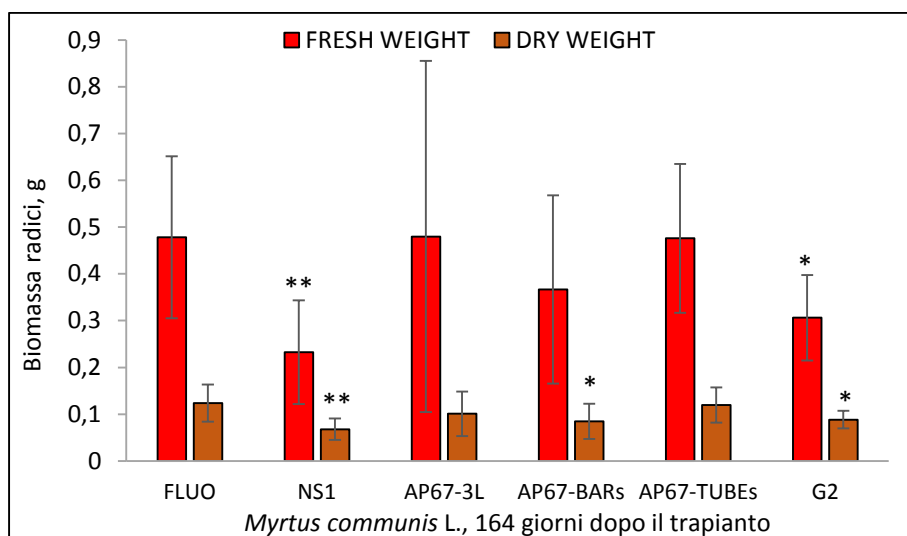


Figura 3.85 Biomassa fresca e secca delle radici di *Myrtus communis* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.80.

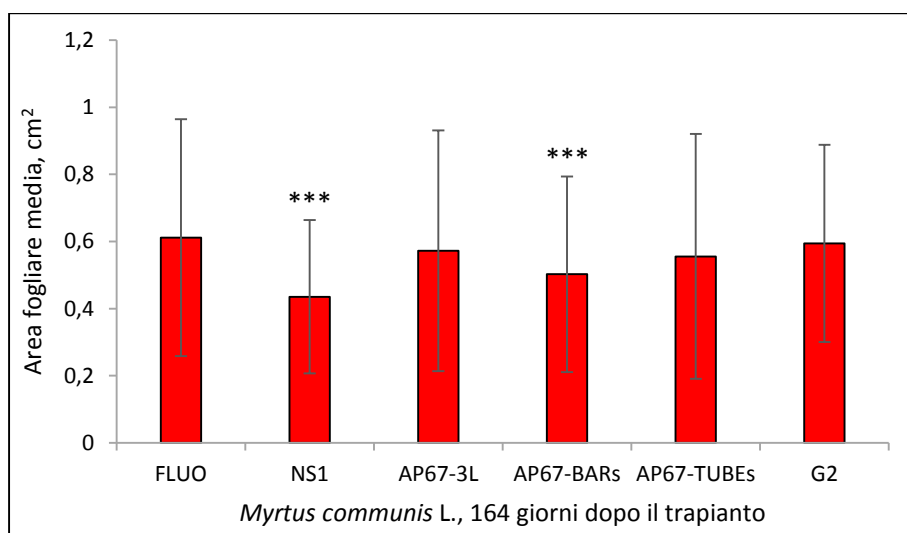


Figura 3.86 Area fogliare media di *Myrtus communis* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.80.

3.4 *Punica granatum* L.

Vengono di seguito riportati i risultati e la discussione relativa agli esperimenti condotti sulle piante di melograno coltivate sia in ambiente controllato testando diverse luci LED che sia in serra.

3.4.1 Allevamento in ambiente controllato

Dopo un periodo di allevamento di 30 giorni in ambiente controllato, sono stati valutati gli effetti sulle plantule di melograno delle diverse luci LED testate rispetto alla luce fluorescente, attraverso l'analisi di diversi parametri morfometrici e biochimici.

L'andamento dell'incremento in termini di altezza rilevato sul melograno durante il periodo di allevamento, ha indicato già dai primi giorni la lampade AP67 3L come la luce che maggiormente influenzava l'accrescimento delle piante (Figura 3.87). Al contrario, le piante accresciute utilizzando

la lampada AP67 TUBEs hanno mostrato il minore accrescimento rispetto agli individui cresciuti utilizzando tutte le altre fonti luminose. Analogamente, l'analisi dell'altezza finale del fusto (Figura 3.88) ha mostrato ottimi risultati per le piante allevate con la lampada AP67 3L rispetto alle piante cresciute con la luce fluorescente. Infatti, le prime presentavano un'altezza finale di 5,04 cm mentre le seconde di 2,92 cm. In generale, tutte le piante allevate sotto luce LED presentavano valori di altezza inferiori rispetto alle piante allevate con luce fluorescente, specialmente le piante allevate con la lampada AP67 TUBEs le quali presentavano un'altezza media di 1,76 cm.

Al contrario, l'analisi del numero finale di foglie ha mostrato decrementi statisticamente significativi per le piante allevate con luce LED rispetto alle piante controllo, con valori compresi tra il -8% (AP67 3L) e -39% (AP67 TUBEs) (Figura 3.89). Gli esperimenti condotti hanno evidenziato un effetto negativo delle luci LED testate anche sull'incremento in termini diametrici del fusto (Figura 3.90). Nello specifico, i termini del decremento rispetto alle piante controllo presentavano valori compresi tra il -13% (AP67 BARs) e il -32% (NS1).

Analizzando i valori ottenuti riguardo alla biomassa fresca e secca di radici (Figura 3.91), fusto (Figura 3.92) e radici (Figura 3.93) non si sono osservati risultati significativi per le piante allevate con le luci LED. Infatti, è stato possibile osservare un generale decremento della biomassa sia fresca che secca, rispetto alle piante controllo. Solamente la lampada AP67 3L ha determinato nelle piante un incremento statisticamente significativo dei livelli di biomassa fresca delle radici, rispetto alle piante allevate con luce fluorescente. Nello specifico, le prime presentavano una media di 0,035 g per la biomassa fresca mentre le piante allevate sotto fluorescenza presentavano valori di 0,029 g.

Ulteriore analisi è stata effettuata valutando l'area media fogliare. Anche in questo caso le piante allevate utilizzando le luci LED hanno mostrato un generale decremento dell'area fogliare media rispetto alle piante controllo, ciò nonostante nella maggior parte dei casi tali decrementi non si presentavano statisticamente significativi. Tuttavia, la lampada AP67 3L ha determinato nelle piante un decremento statisticamente significativo ($0,88 \text{ cm}^2$) rispetto alla tradizionale luce fluorescente ($1,10 \text{ cm}^2$) (Figura 3.94).

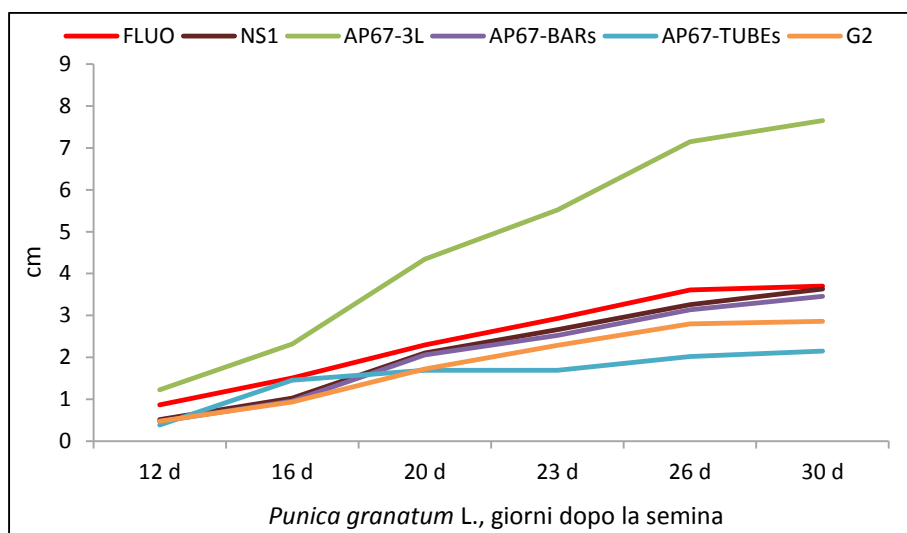


Figura 3.87 Curva di crescita di *Punica granatum* L. allevato in ambiente controllato.

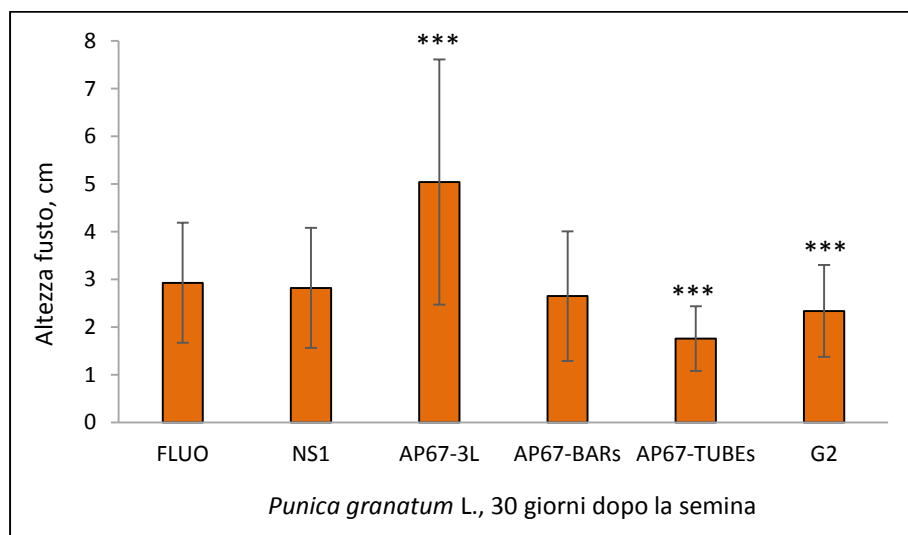


Figura 3.88 Altezza del fusto di *Punica granatum* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Le barre indicano la deviazione standard. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il metodo T di Student per un livello di significatività $\alpha < 0,05$ ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).

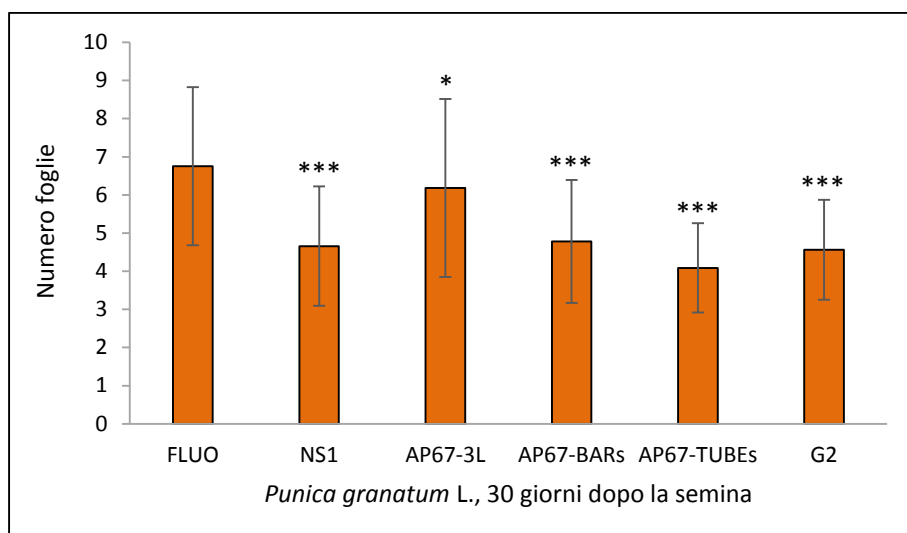


Figura 3.89 Numero foglie di *Punica granatum* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.88.

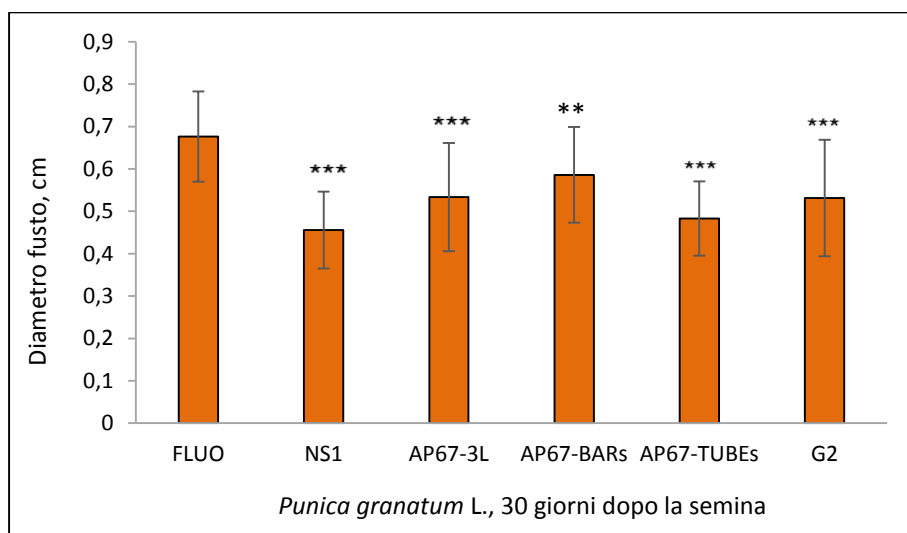


Figura 3.90 Diametro del fusto di *Punica granatum* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.88.

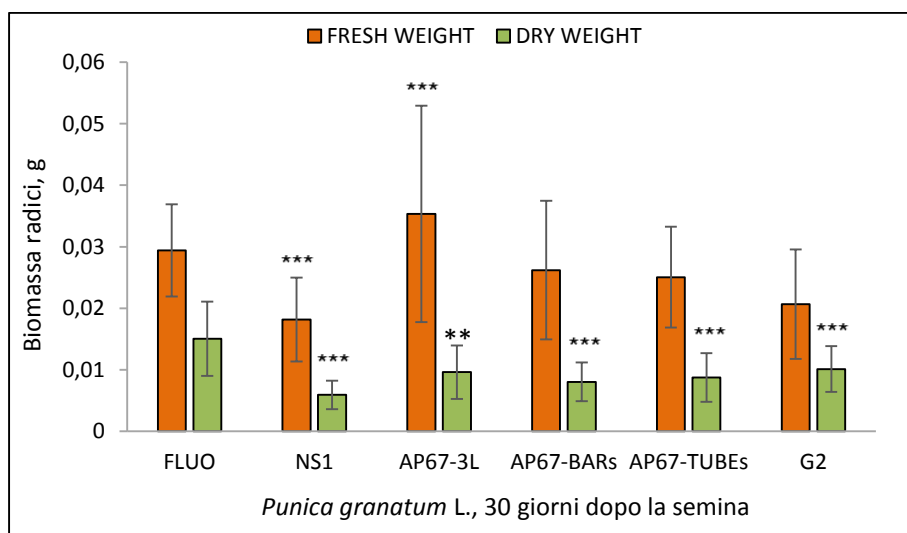


Figura 3.91 Biomassa fresca e secca delle radici di *Punica granatum* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.88.

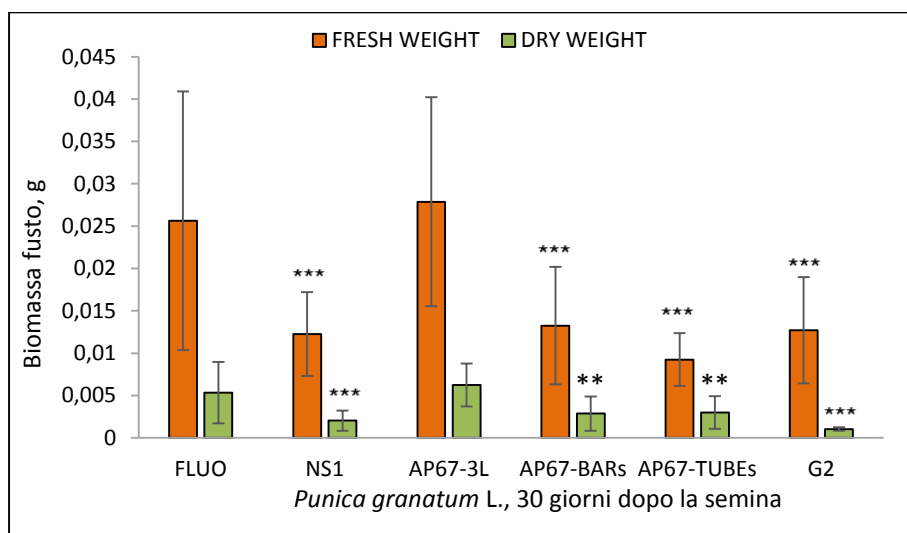


Figura 3.92 Biomassa fresca e secca del fusto di *Punica granatum* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.88.

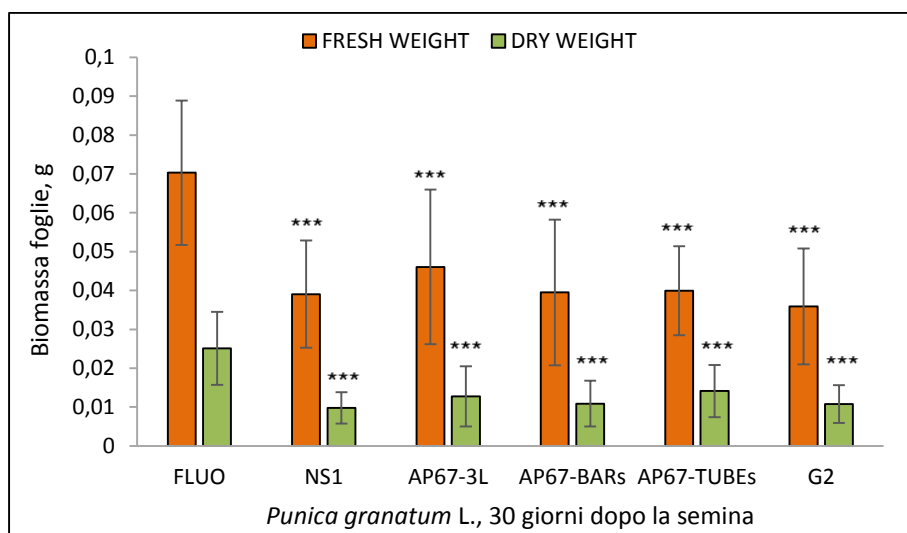


Figura 3.93 Biomassa fresca e secca delle foglie di *Punica granatum* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.88.

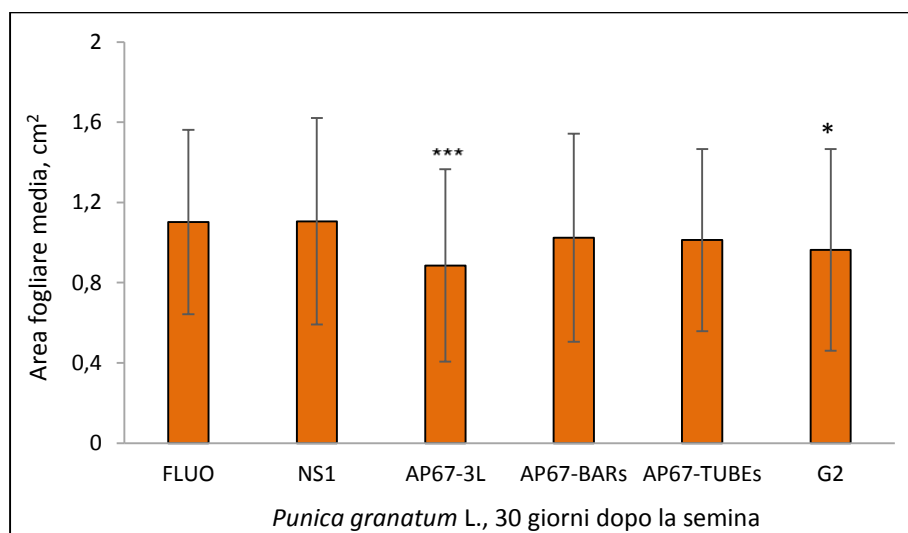


Figura 3.94 Area fogliare media di *Punica granatum* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.88.

Al fine di verificare l'effetto delle diverse luci LED testate rispetto alla luce fluorescente sulle piante di melograno, sono stati analizzati alcuni parametri fisiologici quali contenuto totale di clorofilla e carotenoidi, attività degli enzimi NR e GS e contenuto di MDA.

Il contenuto di clorofilla totale non risultava influenzato positivamente nelle piante allevate con le luci LED. Come mostrato in Figura 3.95, le piante di melograno allevate con luci LED presentavano un decremento del contenuto di clorofilla, rispetto alle piante controllo, con valori compresi tra il -4% (AP67 TUBEs) e il -81% (G2). Anche il contenuto di carotenoidi era influenzato negativamente dall'esposizione delle piante alle luci LED, e presentava riduzioni con valori compresi tra il -9% (AP67 TUBEs) e il -93% (G2) rispetto alle piante controllo (Figura 3.96).

Le luci LED determinavano invece un effetto positivo sul contenuto di proteine, rispetto alle luci fluorescenti (Figura 3.97). L'unica eccezione era rappresentata dalla lampada G2 che determinava un

significativo decremento del contenuto in proteine, pari al -13%, rispetto alle piante allevate sotto fluorescenza.

L'attività della NR risultava influenzata positivamente in tutte le piante allevate sotto luci LED (Figura 3.98). Specialmente nel melograno allevato usando G2, è stato possibile notare un incremento dell'attività pari al +68% rispetto alle piante controllo. Analogamente, l'attività della GS risultava condizionata positivamente nelle piante di melograno allevate con le nuove fonti luminose, specialmente nelle piante allevate con G2 (+57%) e AP67 TUBEs (+27%). Al contrario, risultava fortemente inibita rispetto alle piante controllo nel melograno allevato utilizzando la lampada AP67BARs (-28) (Figura 3.99).

In quasi tutte le condizioni di allevamento testate, è stato possibile osservare un generale incremento del contenuto di MDA, rispetto alle piante controllo, con valori compresi tra il -46% (NS1) e -5% (G2) (Figura 3.100). Al contrario, nelle piante allevate utilizzando la lampada AP67 3L il contenuto di MDA presentava un decremento, rispetto alle piante controllo, pari al -19%.

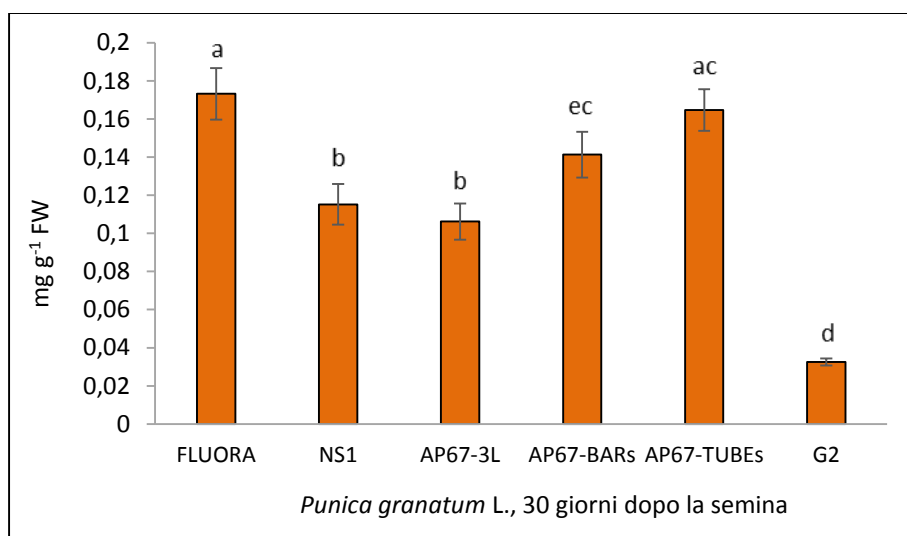


Figura 3.95 Contenuto di clorofilla totale nelle foglie di *Punica granatum* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano la deviazione standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra i diversi trattamenti ($P < 0.01$) (Tukey test).

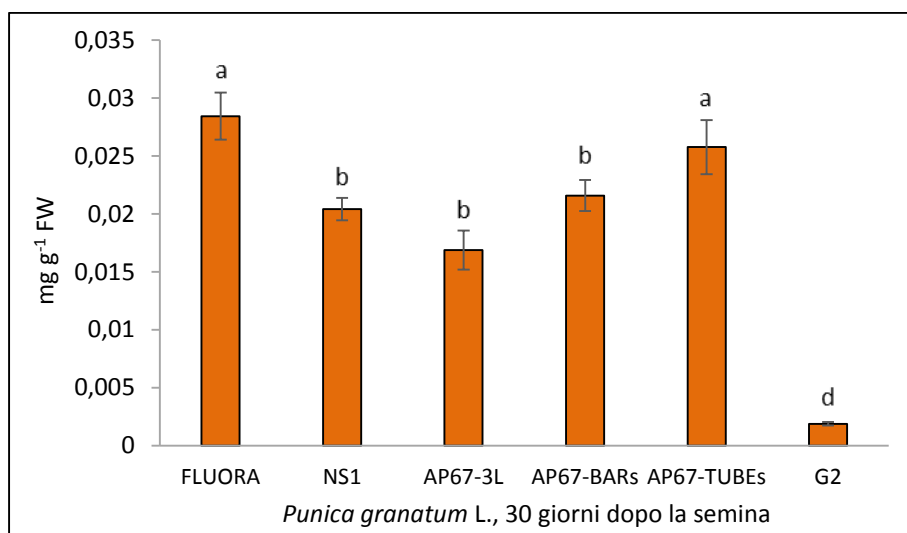


Figura 3.96 Contenuto di β -carotene nelle foglie di *Punica granatum L.* al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.95.

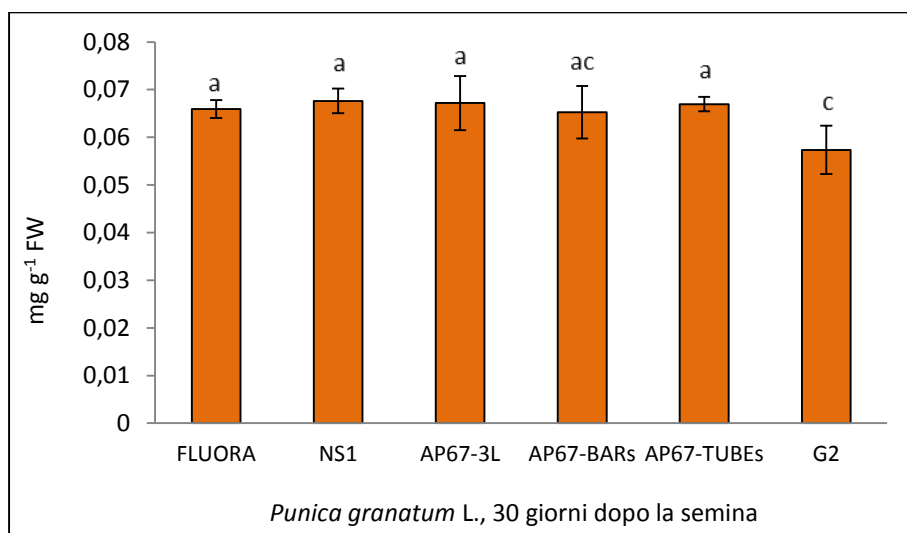


Figura 3.97 Contenuto di proteine nelle foglie di *Punica granatum L.* al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.95.

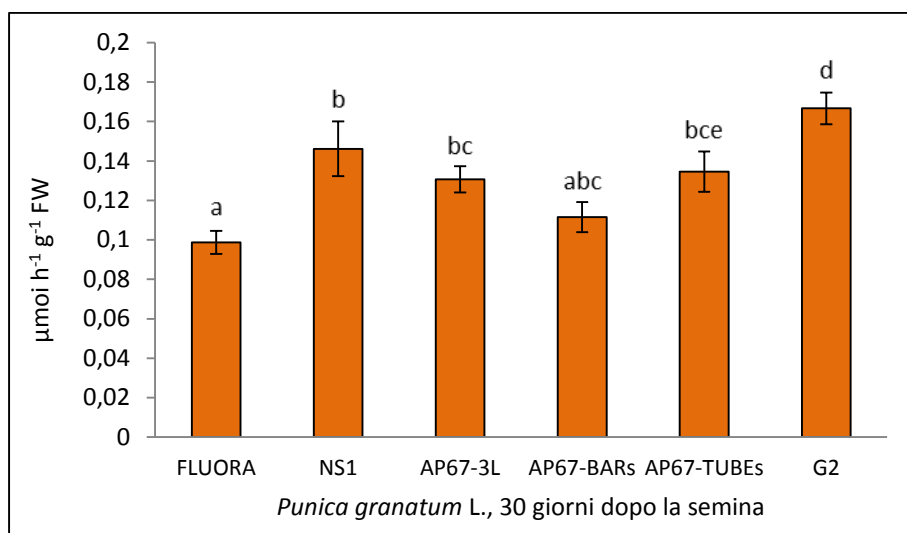


Figura 3.98 Variazioni dell'attività dell'enzima NR nelle foglie di *Punica granatum* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.95.

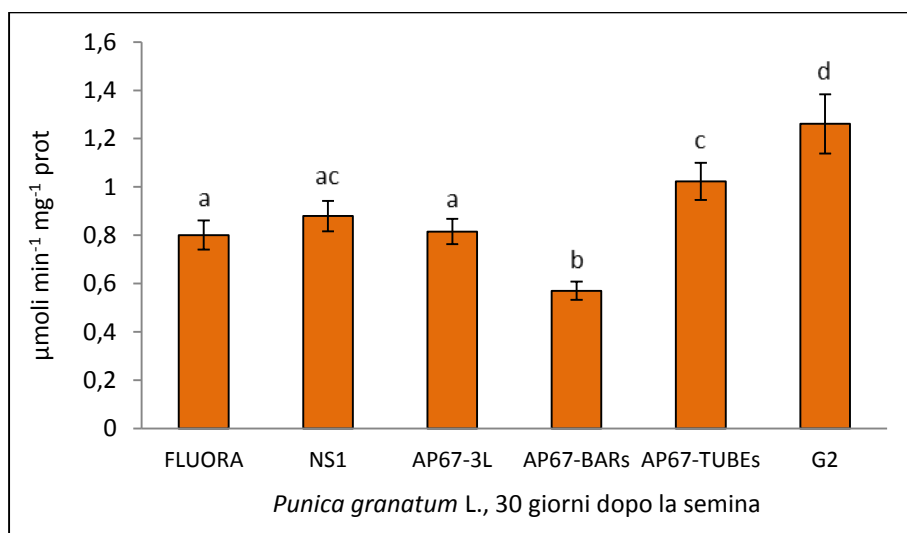


Figura 3.99 Variazioni dell'attività dell'enzima GS nelle foglie di *Punica granatum* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.95.

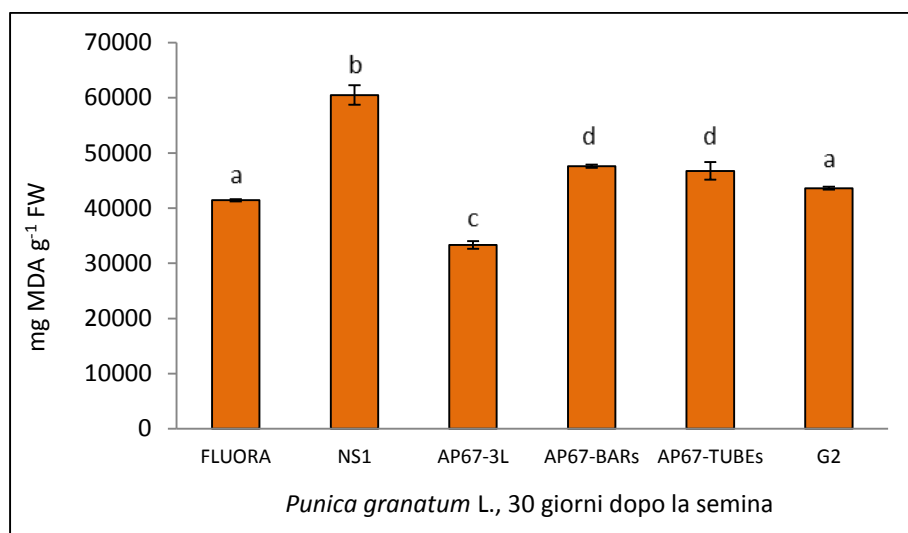


Figura 3.100 Contenuto di MDA nelle foglie di *Punica granatum* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.95.

3.4.2 Allevamento in serra

Terminato il periodo di allevamento in ambiente controllato, le piante di melograno sono state trapiantate in contenitori più grandi e trasferite in serra. Trascorsi 164 giorni, le piante sono state prelevate con lo scopo di effettuare analisi di tipo morfometrico.

Durante il periodo di adattamento in serra è stato rilevato sul melograno l'incremento in termini di altezza, il quale ha mantenuto lo stesso andamento già presentato nelle piante allevate in ambiente controllato. Infatti, come è possibile notare in Figura 3.101, si è evidenziato un maggiore accrescimento per le piante allevate utilizzando la lampada AP67 3L, mentre le piante allevate utilizzando tutte le altre fonti luminose presentavano un minore sviluppo.

Analizzando i parametri finali di altezza del fusto (Figura 3.102) e diametro (Figura 3.103), non sono emersi risultati statisticamente significativi tra le piante allevate con luci LED e le piante allevate con luce fluorescente. Tuttavia, le piante allevate con AP67 3L presentavano incrementi di altezza del fusto e diametro rispetto alle piante controllo. L'analisi del numero medio delle foglie non ha mostrato risultati statisticamente significativi (Figura 3.104), ad eccezione dei risultati ottenuti per le piante allevate con NS1. Infatti, in questo caso si è osservato una diminuzione pari al -57% del numero delle foglie, rispetto alle piante controllo.

Analizzando i valori ottenuti riguardo alla biomassa fresca e secca di radici (Figura 3.105), fusto (Figura 3.106) e foglie (Figura 3.107) non si sono osservati risultati significativi per le piante allevate con le luci LED. Tuttavia, è interessante notare che la lampada AP67 3L ha influenzato positivamente le piante comportando un incremento dei livelli di biomassa sia fresca che secca delle radici e del fusto, rispetto alle piante allevate con luce fluorescente. Nello specifico, le prime presentavano una media di 1,78 g per la biomassa fresca delle radici e 0,42 per la biomassa secca mentre le piante allevate sotto fluorescenza presentavano valori di 0,80 g per la biomassa fresca e 0,20 g per la

biomassa secca. Per il fusto, invece, le piante allevate sotto AP67 3L presentavano una media di 0,61 g per la biomassa fresca e 0,27 per la biomassa secca, mentre le piante allevate sotto fluorescenza presentavano valori di 0,34 g per la biomassa fresca e 0,15 g per la biomassa secca.

L'analisi dell'area media fogliare non ha mostrato risultati statisticamente significativi per le piante allevate con luci LED, rispetto alle piante allevate con luce fluorescente (Figura 3.108).

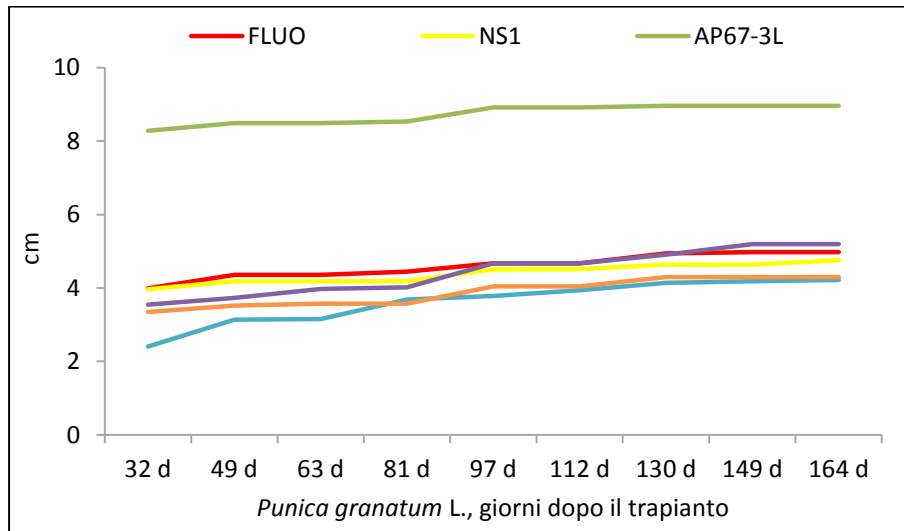


Figura 3.101 Curva di crescita di *Punica granatum* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra.

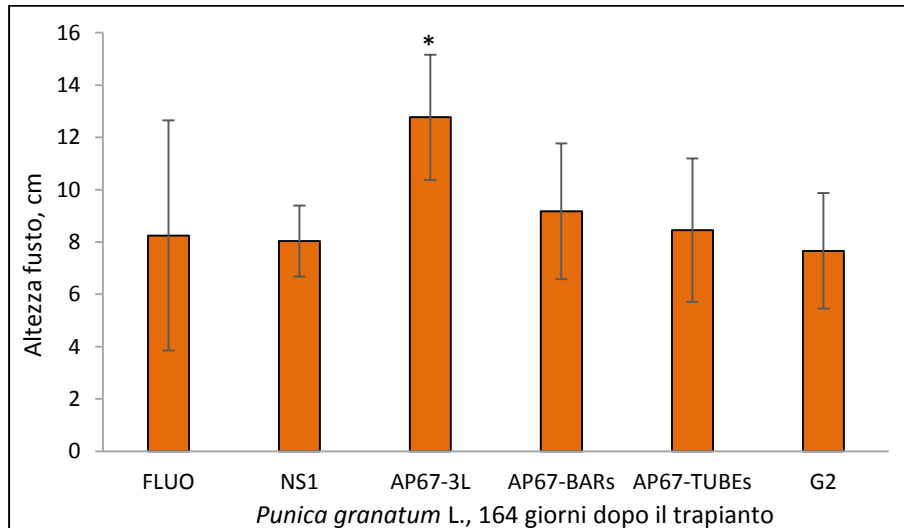


Figura 3.102 Altezza del fusto di *Punica granatum* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Le barre indicano la deviazione standard. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il metodo T di Student per un livello di significatività $\alpha < 0,05$ ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).

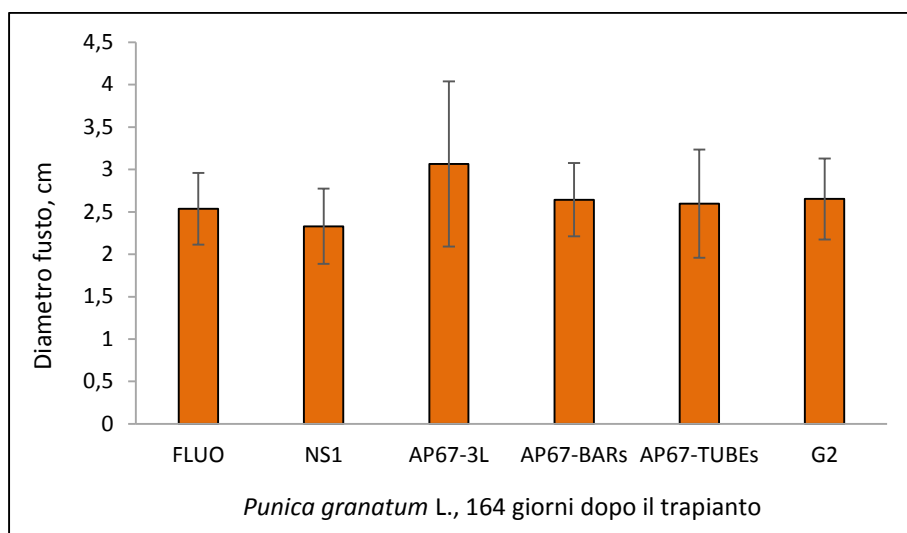


Figura 3.103 Diametro del fusto *Punica granatum* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.102.

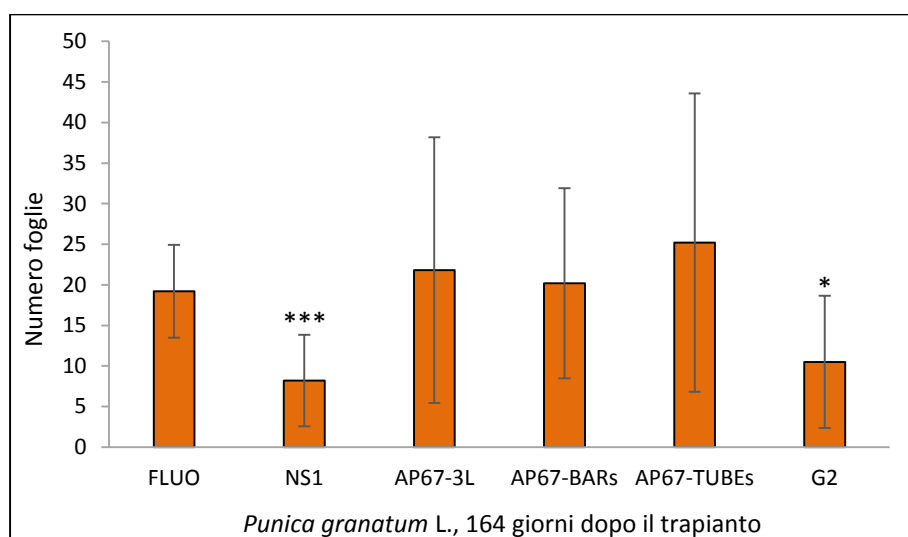


Figura 3.104 Numero foglie di *Punica granatum* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.102.

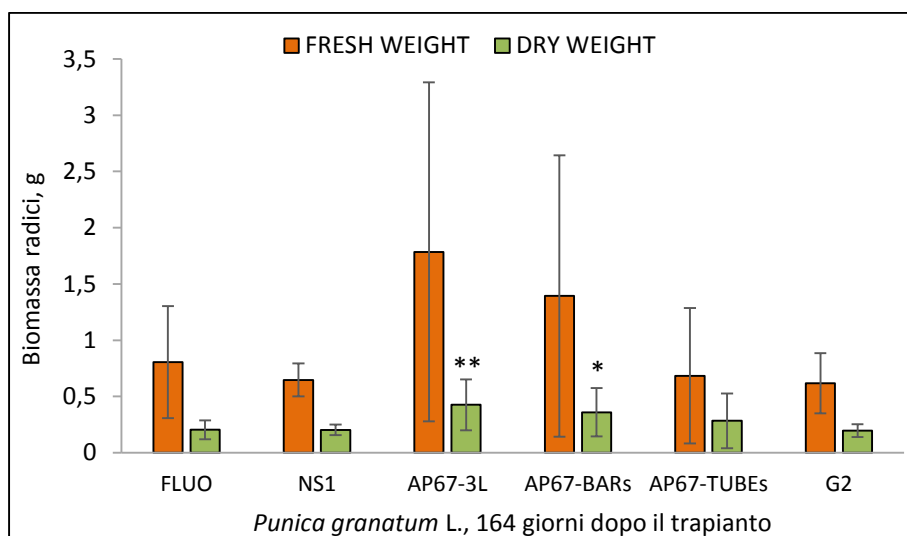


Figura 3.105 Biomassa fresca e secca delle radici di *Punica granatum* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.102.

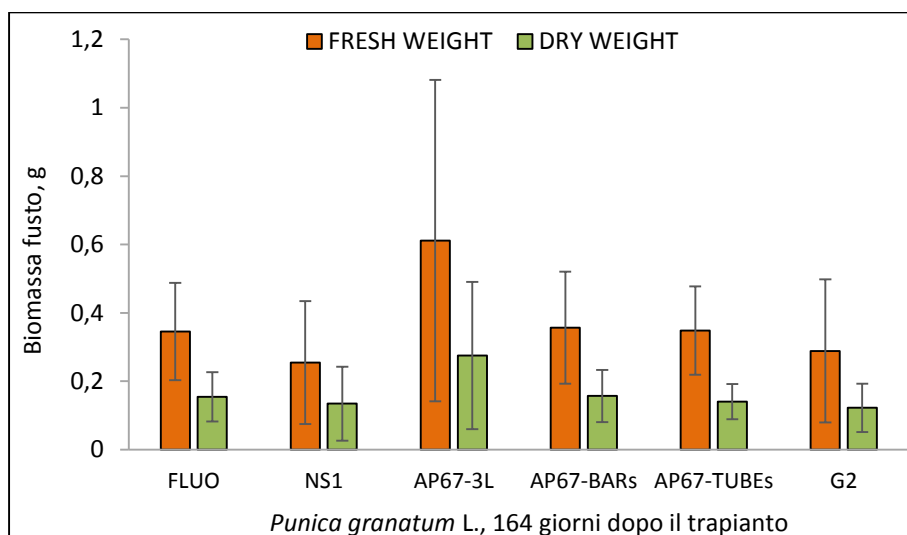


Figura 3.106 Biomassa fresca e secca del fusto di *Punica granatum* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.102.

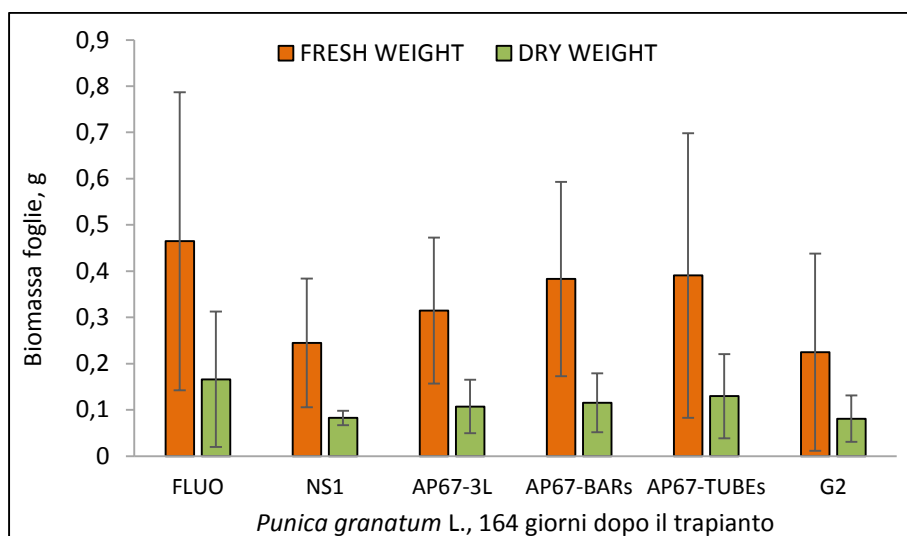


Figura 3.107 Biomassa fresca e secca delle foglie di *Punica granatum* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.102.

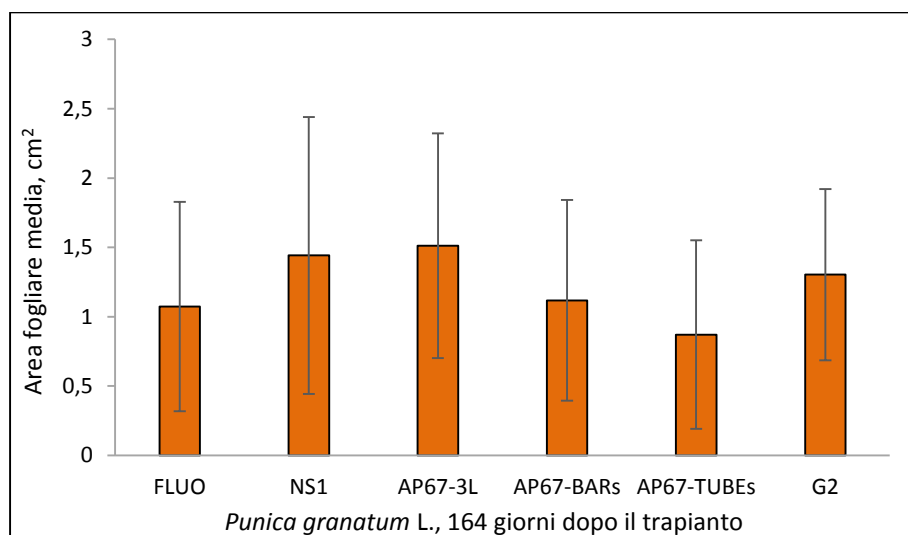


Figura 3.108 Area fogliare media di *Punica granatum* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.102.

3.5 *Fagus sylvatica* L.

Vengono di seguito riportati i risultati e la discussione relativa agli esperimenti condotti sulle piante di faggio coltivate sia in ambiente controllato sia in seguito al periodo di adattamento in serra.

3.5.1 Allevamento in ambiente controllato

Dopo un periodo di allevamento di 30 giorni in ambiente controllato, sono stati valutati gli effetti delle diverse luci LED testate su plantule di faggio rispetto alla luce fluorescente, attraverso l'analisi di diversi parametri morfometrici e biochimici.

L'andamento dell'incremento in termini di altezza rilevato sul faggio durante il periodo di allevamento, ha inizialmente indicato la lampada G2 come la luce che maggiormente ha influenzato l'accrescimento delle piante (Figura 3.109). Tuttavia, al termine del periodo di allevamento solamente le lampade NS1 e AP67 3L hanno mostrato un minore incremento di altezza per le piante di faggio.

L'analisi dell'altezza finale del fusto (Figura 3.110) ha mostrato risultati positivi soprattutto per le piante allevate con la lampada AP67 BARs, rispetto alle piante cresciute con la luce fluorescente. Infatti, le prime presentavano un'altezza finale di 6,3 cm mentre le seconde di 5,7 cm. Inoltre, anche in questo caso sono stati osservati decrementi statisticamente significativi di altezza per il faggio allevato con NS1(-15%) e AP67 3L (-10%), rispetto alle piante allevate con luce fluorescente.

L'analisi del numero finale di foglie non ha evidenziato risultati statisticamente significativi per le piante allevate con la lampada AP67 BARs (Figura 3.111) Al contrario, si sono osservati decrementi statisticamente significativi del numero di foglie per tutte le altre condizioni di allevamento, con valori compresi tra il -13% (G2) e -24% (NS1).

Gli esperimenti condotti hanno evidenziato un effetto negativo delle luci LED sull'incremento in termini diametrici del fusto (Figura 3.112), rispetto alle piante controllo. Tale risultato era indipendente dalle luci LED testate.

L'analisi dei valori ottenuti riguardo alla biomassa fresca e secca delle radici (Figura 3.113), hanno evidenziato decrementi statisticamente significativi, rispetto alle piante controllo, per il faggio allevato in ognuna delle condizioni sperimentali. Specialmente la lampada NS1 ha determinato una media di 0,10 g per la biomassa fresca e 0,02 g per la biomassa secca. Le piante allevate sotto fluorescenza presentavano, invece, valori di 0,21 g per la biomassa fresca e 0,051 g per la biomassa secca. Valutando i risultati ottenuti per la biomassa del fusto (Figura 3.114), solamente le piante accresciute sotto AP67 BARs mostravano incrementi dei valori di biomassa sia fresca che secca, rispetto alle piante allevate con luce fluorescente. Tuttavia, tali incrementi non risultavano statisticamente significativi. Al contrario, rispetto alle piante controllo, per tutte le altre condizioni di illuminazione testate si notavano decrementi della biomassa con valori compresi tra il -12% (G2) e -37% (AP67 3L) per la biomassa fresca e con valori compresi tra il -17% (G2) e il -45% (AP67 3L) per la biomassa secca. Analogamente, l'analisi della biomassa fresca e secca delle foglie (Figura 3.115) ha mostrato un incremento del 15%, rispetto alle piante controllo, per la biomassa fresca del faggio cresciuto utilizzando la luce AP67 BARs. Anche in questo caso tale incremento non risultava statisticamente significativo. Per tutte le altre condizioni di illuminazione testate si notavano decrementi della biomassa con valori compresi tra il -2% (G2) e -14% (NS1) per la biomassa fresca e con valori compresi tra il -2% (AP67 BARs) e il -30% (NS1) per la biomassa secca.

Ulteriore analisi è stata effettuata valutando l'area media fogliare, la quale non ha evidenziato risultati statisticamente significativi per nessuna delle condizioni sperimentali (Figura 3.116).

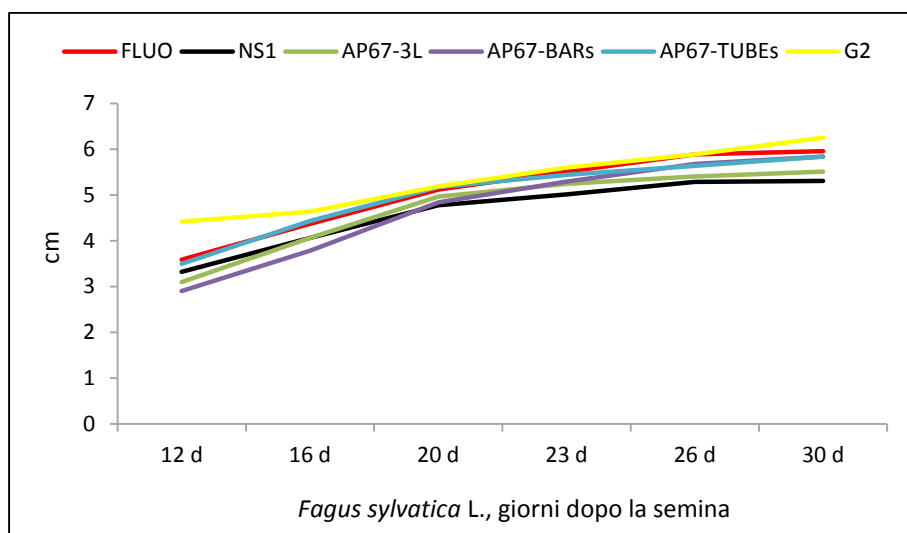


Figura 3.109 Curva di crescita di *Fagus sylvatica* L. allevato in ambiente controllato.

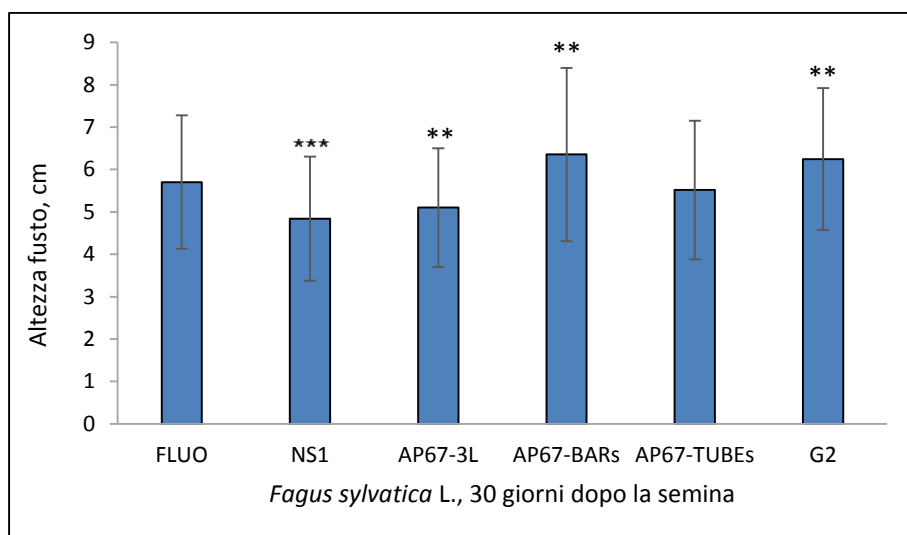


Figura 3.110 Altezza del fusto di *Fagus sylvatica* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Le barre indicano la deviazione standard. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il metodo T di Student per un livello di significatività $\alpha < 0,05$ ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).

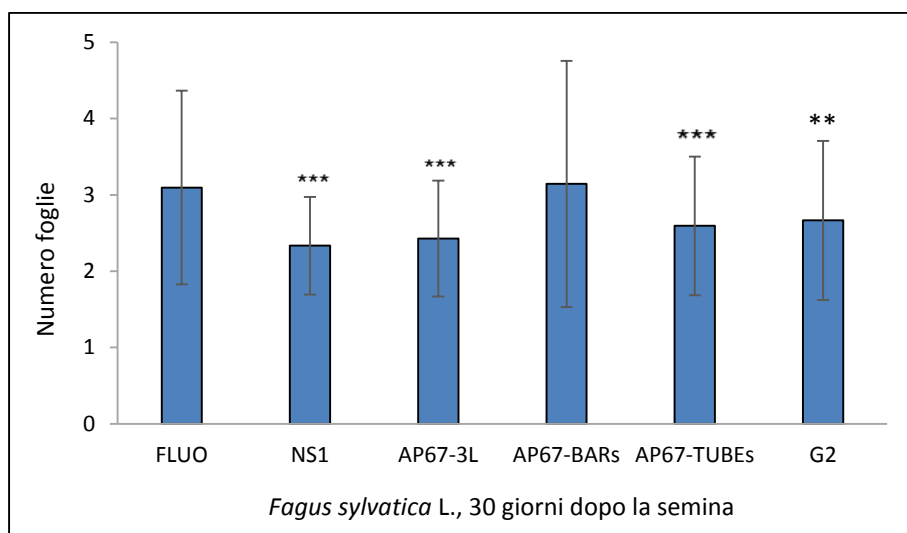


Figura 3.111 Numero foglie di *Fagus sylvatica* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.110.

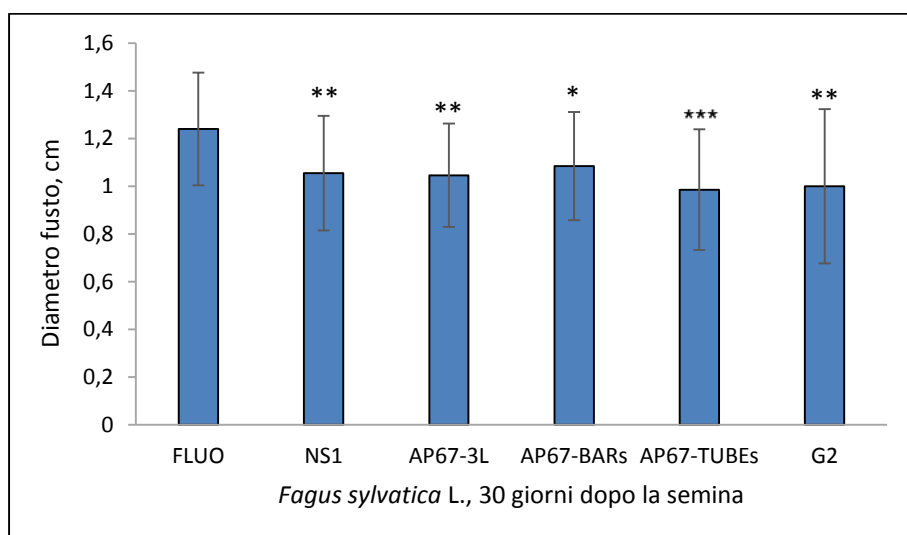


Figura 3.112 Diametro del fusto di *Fagus sylvatica* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.110.

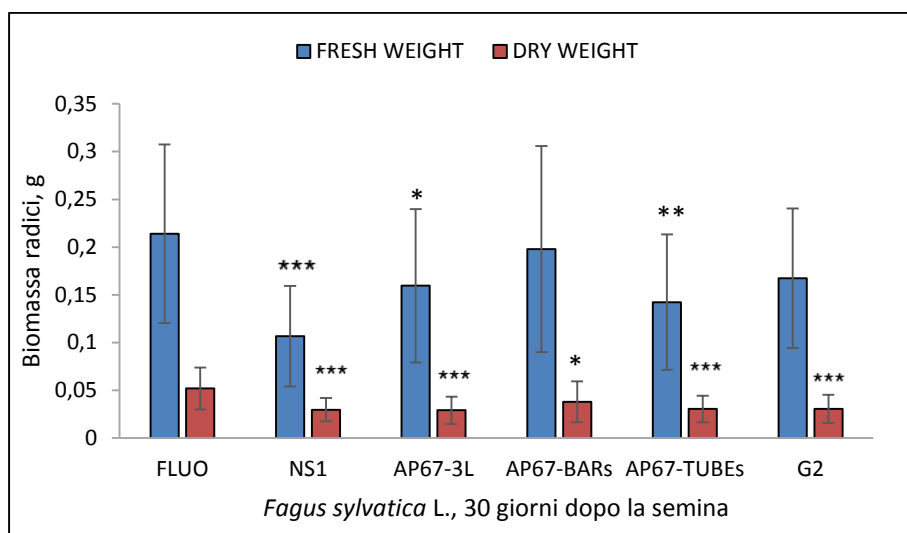


Figura 3.113 Biomassa fresca e secca delle radici di *Fagus sylvatica* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.110.

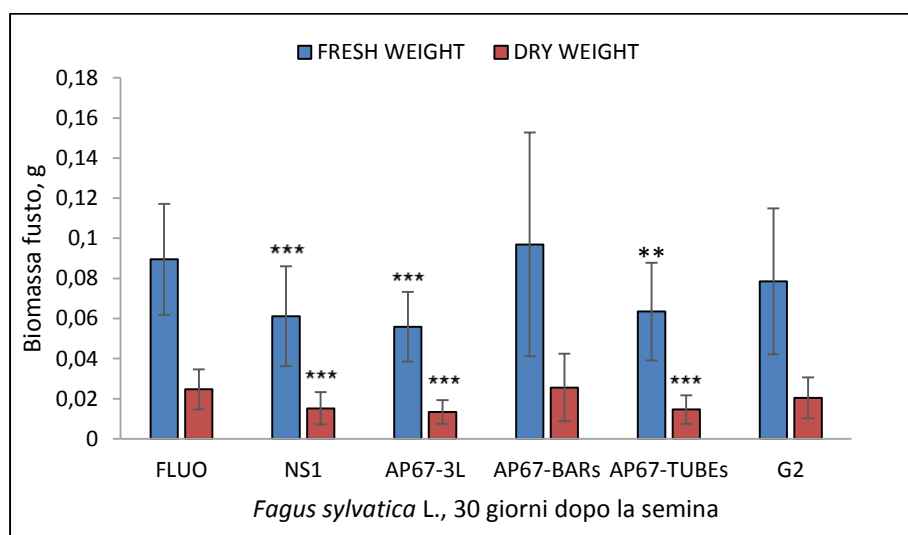


Figura 3.114 Biomassa fresca e secca del fusto di *Fagus sylvatica* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.110.

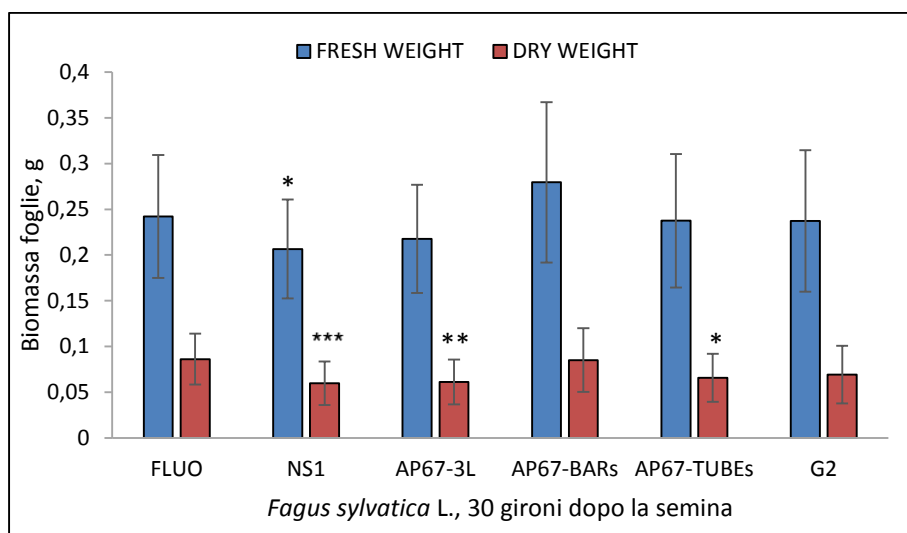


Figura 3.115 Biomassa fresca e secca delle foglie di *Fagus sylvatica* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.110.

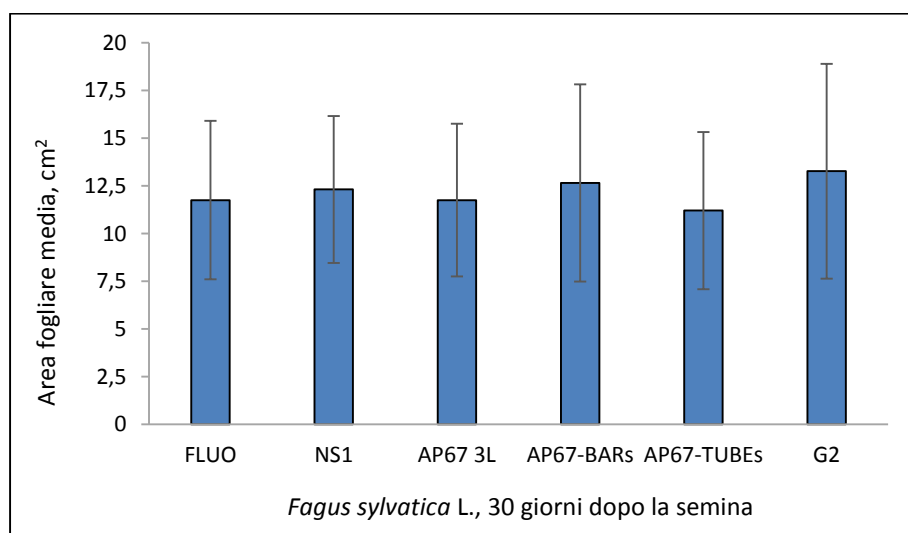


Figura 3.116 Area fogliare media di *Fagus sylvatica* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.110.

Come per le specie precedentemente studiate, anche per il *Fagus sylvatica* L. sono stati analizzati alcuni parametri fisiologici quali contenuto totale di clorofilla e carotenoidi, attività degli enzimi NR e GS e contenuto di MDA al fine di monitorare gli effetti delle diverse fonti luminose.

Il contenuto di clorofilla totale risultava positivamente influenzato nelle piante allevate con le luci LED specialmente per il faggio allevato con la luce AP67 BARs, che determinava un aumento nel livello di questo parametro di circa 4 volte il contenuto di clorofilla mostrato dalle piante controllo (Figura 3.117). Anche il contenuto dei carotenoidi era influenzato positivamente nelle piante allevate con luci LED. I risultati migliori si sono osservati, anche in questo caso, nelle piante di faggio allevate con la lampada AP67 BARs, dove si notava un incremento fino a 10 volte del contenuto di β -carotene, rispetto alle piante allevate con luce fluorescente (Figura 3.118).

Le luci LED hanno determinato un effetto positivo sul contenuto di proteine dei tessuti fogliari (Figura 3.119). In particolare, in tutte le condizioni sperimentali testate il contenuto di proteine mostrava incrementi pari a circa 2 volte il contenuto proteico delle piante controllo.

L'attività della NR risultava influenzata positivamente nelle piante allevate con la lampada AP67 3L (+65%), rispetto alle piante allevate con tradizionale luce fluorescente (Figura 3.120). Al contrario risultava fortemente inibita in tutte le altre condizioni sperimentali, dove si notavano decrementi di attività con valori compresi tra -34% (AP67 BARs) e -5% (G2). L'attività della GS risultava influenzata positivamente nelle piante di faggio allevate con le nuove fonti luminose con valori compresi tra il +27% AP67 3L) e il +53% (AP67 TUBEs) (Figura 3.121). Tra tutte le condizioni sperimentali, l'attività della GS risultava fortemente stimolata nelle piante allevate con la lampada AP67 BARs. Infatti, in questo caso era possibile osservare un aumento dell'attività con valori pari a circa il doppio quelli presentati dalle piante controllo.

L'analisi dei livelli di MDA evidenziavano un decremento del contenuto, rispetto alle piante controllo, nel faggio allevato utilizzando le luci LED con valori compresi tra il -4% (G2) e il -28% (AP67 BARs) (Figura 3.122).

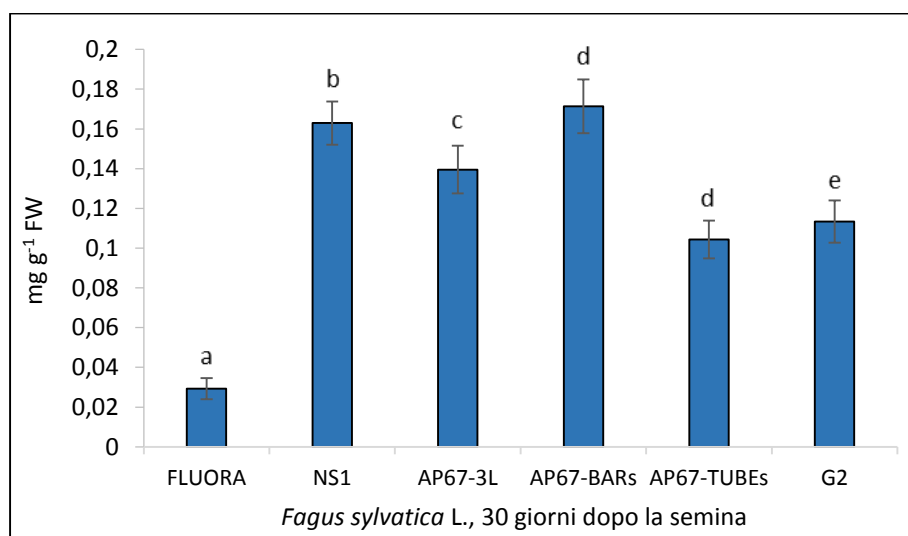


Figura 3.117 Contenuto di clorofilla totale nelle foglie di *Fagus sylvatica* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. I dati riportati rappresentano la media di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato. Le barre indicano la deviazione standard. Lettere diverse indicano differenze significative tra i diversi trattamenti ($P < 0.01$) (Tukey test).

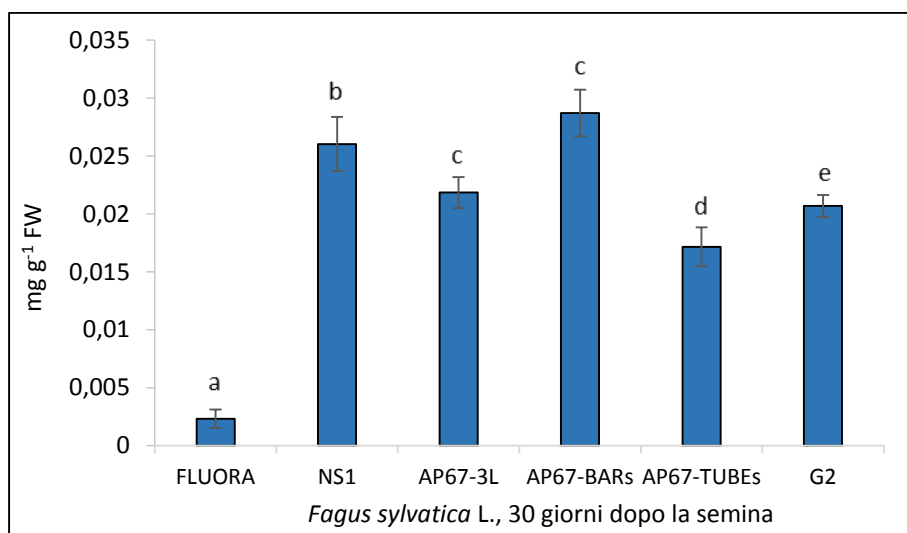


Figura 3.118 Contenuto di β -carotene nelle foglie di *Fagus sylvatica* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.117.

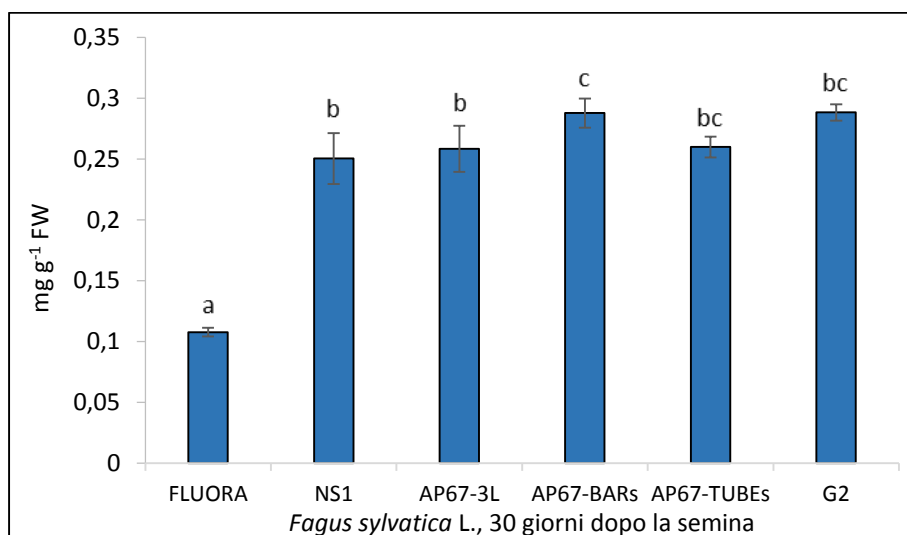


Figura 3.119 Contenuto di proteine nelle foglie di *Fagus sylvatica* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.117.

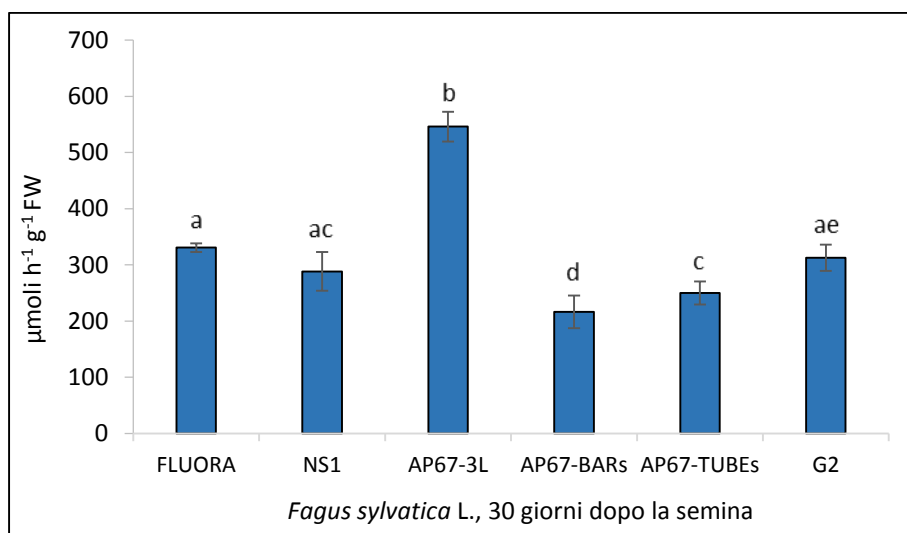


Figura 3.120 Variazioni dell'attività dell'enzima NR nelle foglie di *Fagus sylvatica* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.117.

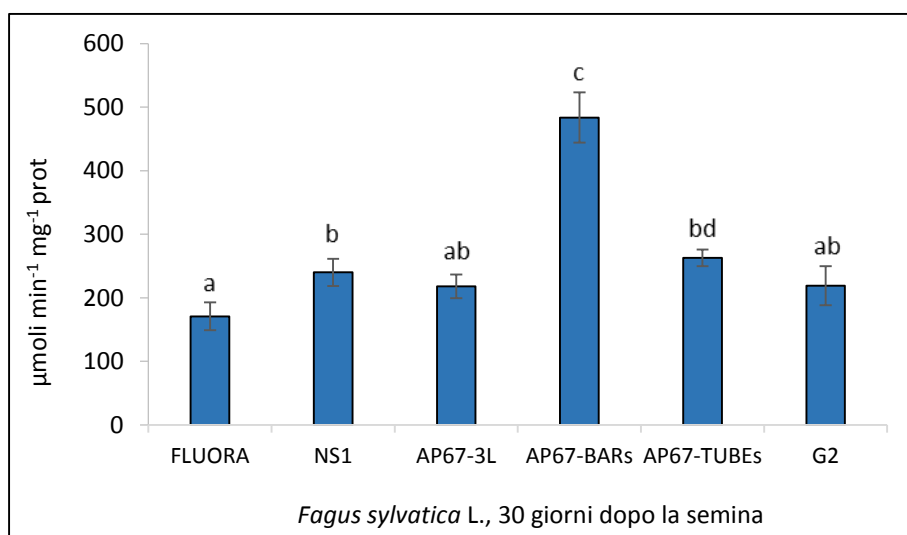


Figura 3.121 Variazioni dell'attività dell'enzima GS nelle foglie di *Fagus sylvatica* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.117.

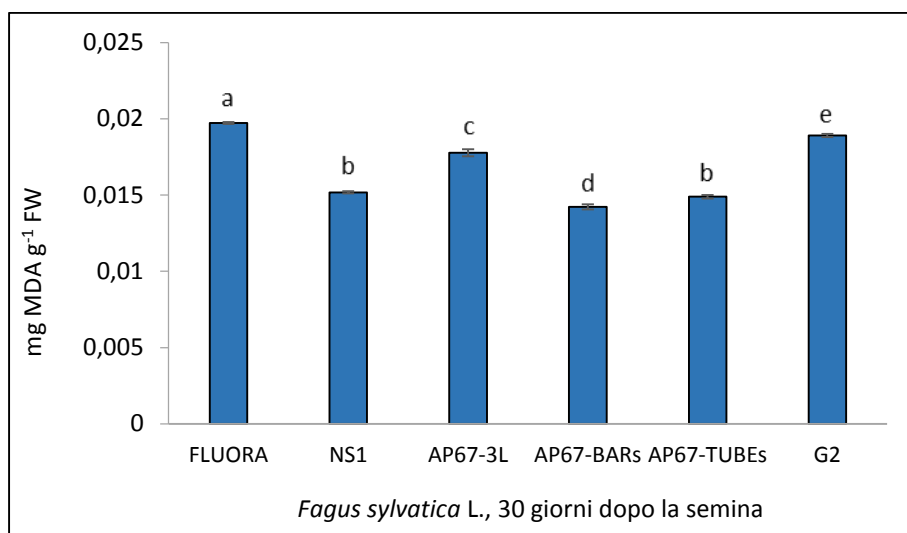


Figura 3.122 Contenuto di MDA nelle foglie di *Fagus sylvatica* L. al termine dell'allevamento in ambiente controllato. Statistica come in Fig. 3.117.

3.5.2 Allevamento in serra

Terminato il periodo di allevamento in ambiente controllato, le piante di faggio sono state trapiantate in contenitori più grandi e trasferite in serra. Trascorsi 164 giorni, le piante sono state prelevate con lo scopo di effettuare analisi di tipo morfometrico, al fine di verificare la capacità di adattamento delle piante dopo il periodo di pre-coltivazione in ambiente controllato.

Durante il periodo di adattamento in serra è stato rilevato sul faggio l'incremento in termini di altezza, il quale ha mostrato, a partire dal 49° giorno, un maggiore accrescimento per le piante allevate utilizzando la lampada G2 (Figura 3.123). Al contrario, al termine del periodo di adattamento in serra le piante allevate utilizzando la lampada AP67 TUBEs mostravano un minore sviluppo rispetto a tutte le condizioni sperimentali testate.

Analizzando i parametri finali di altezza del fusto (Figura 3.124) e diametro (Figura 3.125), non sono emersi risultati statisticamente significativi tra le piante allevate con luci LED e le piante allevate con luce fluorescente. Tuttavia, le piante allevate con AP67 TUBEs presentavano un decremento in termini di altezza del fusto pari al -19%, rispetto alle piante controllo. L'analisi del numero medio delle foglie non ha mostrato risultati statisticamente significativi per il faggio allevato con le nuove fonti luminose, rispetto alle piante allevate con tradizionali luci fluorescenti (Figura 3.126).

Analogamente, analizzando i valori ottenuti riguardo alla biomassa fresca e secca di radici (Figura 3.127), fusto (Figura 3.128) e foglie (Figura 3.129) non si sono osservati risultati significativi per le piante allevate con le luci LED.

L'analisi dell'area media fogliare non ha mostrato risultati statisticamente significativi per le piante allevate con luci LED, rispetto alle piante controllo (Figura 3.130).

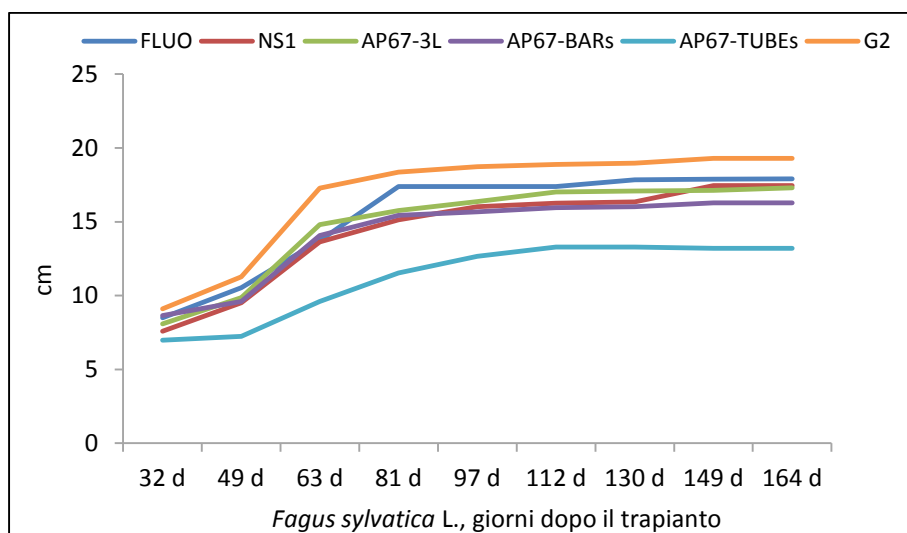


Figura 3.123 Curva di crescita di *Fagus sylvatica* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra.

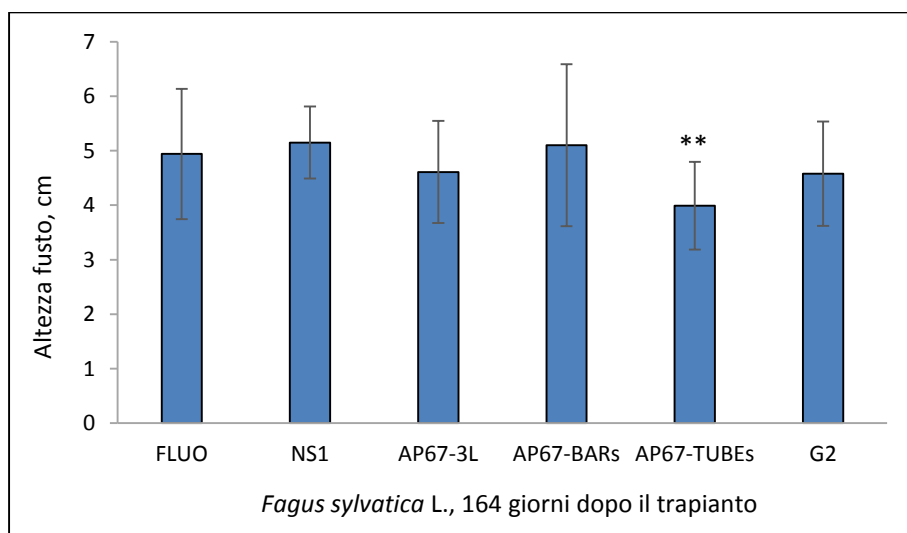


Figura 3.124 Altezza del fusto di *Fagus sylvatica* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Le barre indicano la deviazione standard. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il metodo T di Student per un livello di significatività $\alpha < 0,05$ ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).

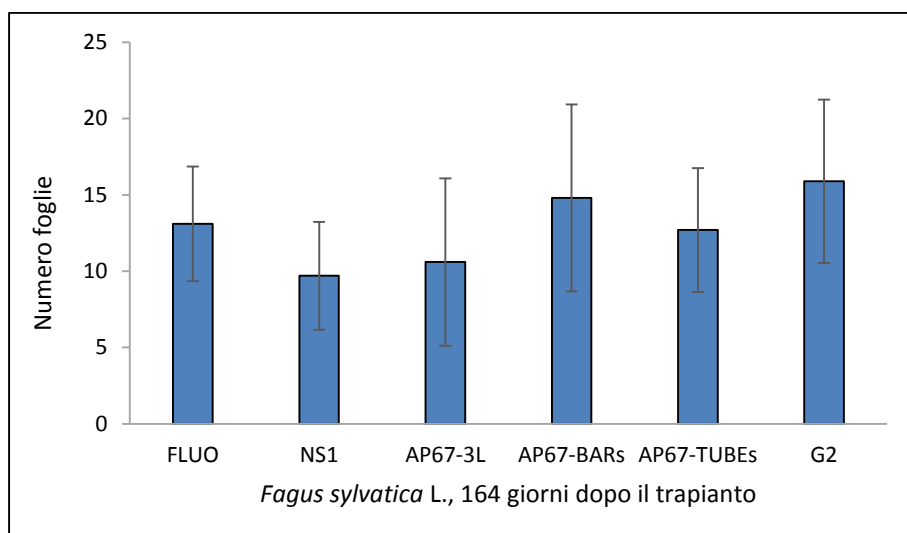


Figura 3.125 Numero foglie di *Fagus sylvatica* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.124.

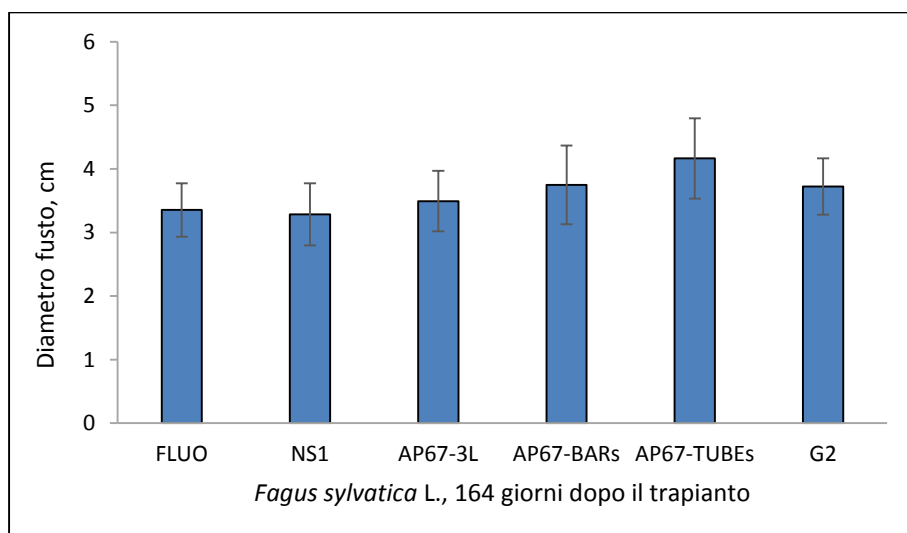


Figura 3.126 Diametro del fusto *Fagus sylvatica* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.124.

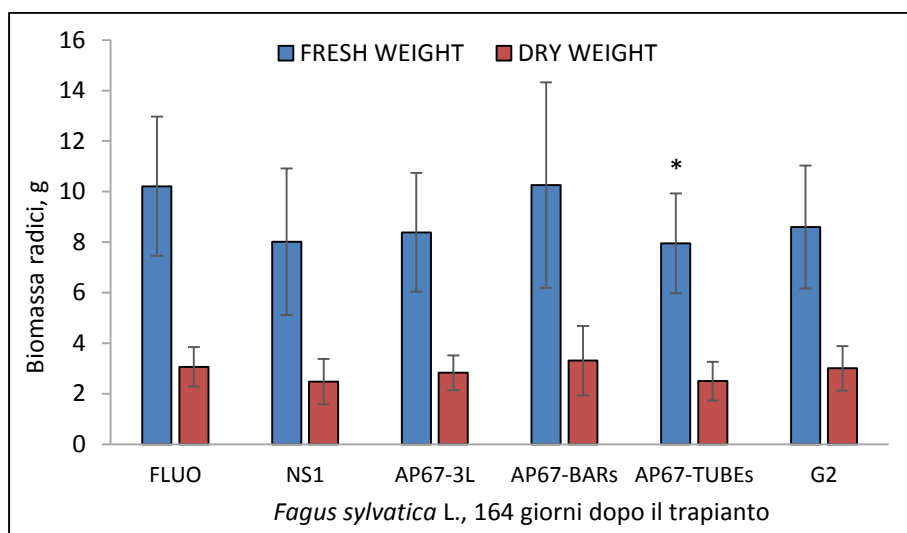


Figura 3.127 Biomassa fresca e secca delle radici di *Fagus sylvatica* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.124.

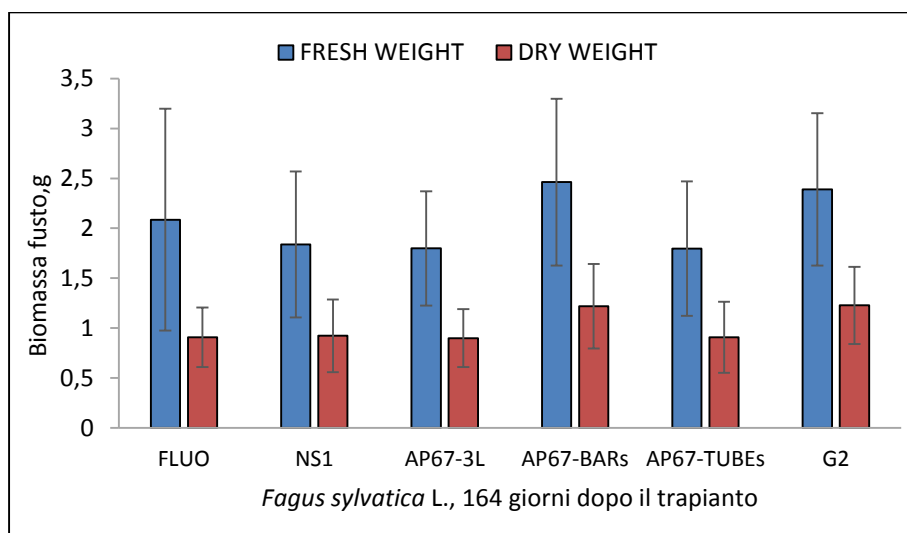


Figura 3.128 Biomassa fresca e secca del fusto di *Fagus sylvatica* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.124.

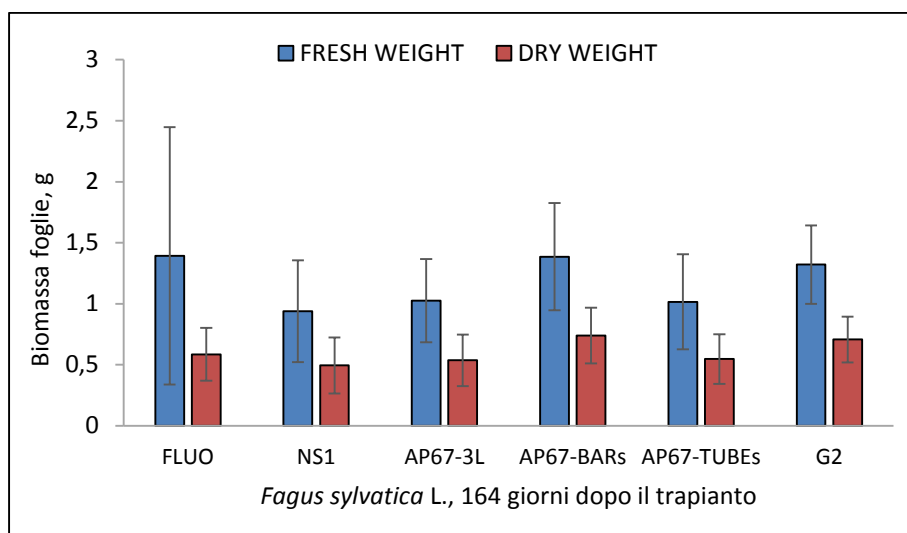


Figura 3.129 Biomassa fresca e secca delle foglie di *Fagus sylvatica* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.124.

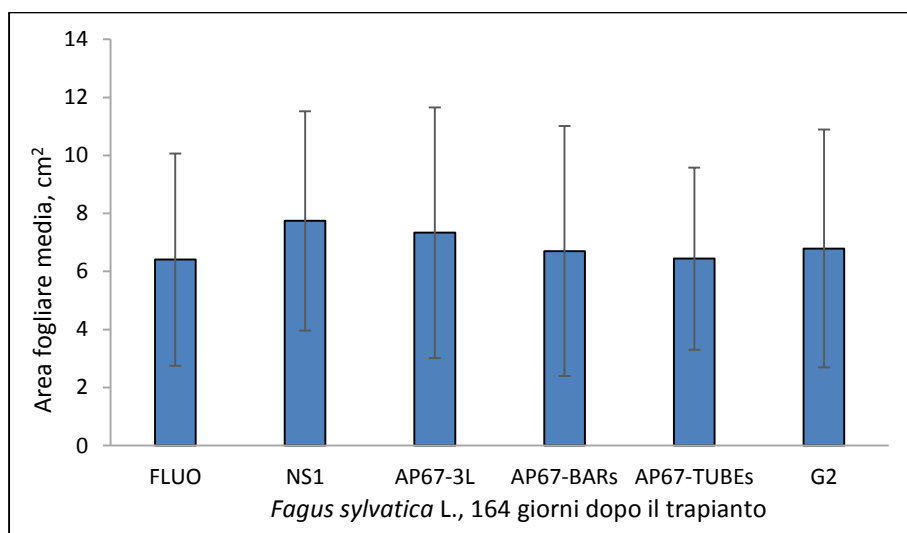


Figura 3.130 Area fogliare media di *Fagus sylvatica* L. allevato in ambiente controllato, dopo il periodo di adattamento in serra. Statistica come in Fig. 3.124.

3.6 Trasferimento in campo aperto

Come precedentemente detto, le piante di leccio al termine della stagione vegetativa trascorsa in serra sono state trasferite in campo aperto per verificare la risposte delle piante allevate con luci LED e fluorescenti al trapianto in terra.

A seguito del trapianto è stato rilevato sul leccio l'incremento in termini di altezza che, già a partire dal 7°, giorno non ha mostrato differenze nell'accrescimento (Figura 3.131).

Analizzando i parametri finali di altezza del fusto (Figura 3.132) e diametro (Figura 3.133), non sono emersi risultati statisticamente significativi tra le piante allevate con luci LED e le piante allevate con luce fluorescente.

Infine, dopo un anno dall'impianto sono stati nuovamente misurati i valori di altezza (Figura 3.134) e diametro (Figura 3.135). Anche in questo caso non sono emersi risultati statisticamente significativi per le piante di leccio allevate con luci LED quando confrontati con le piante controllo.

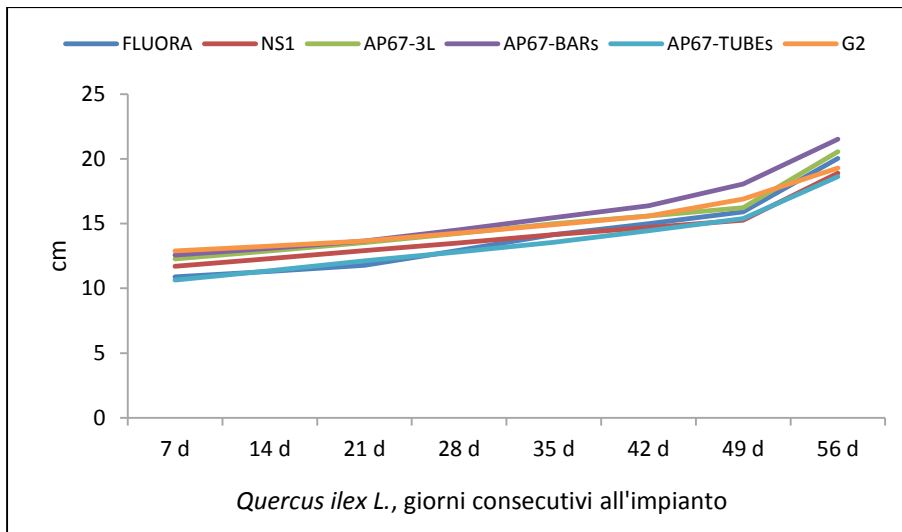


Figura 3.131 Curva di crescita di *Quercus ilex* L. allevato in ambiente controllato, dopo il trapianto.

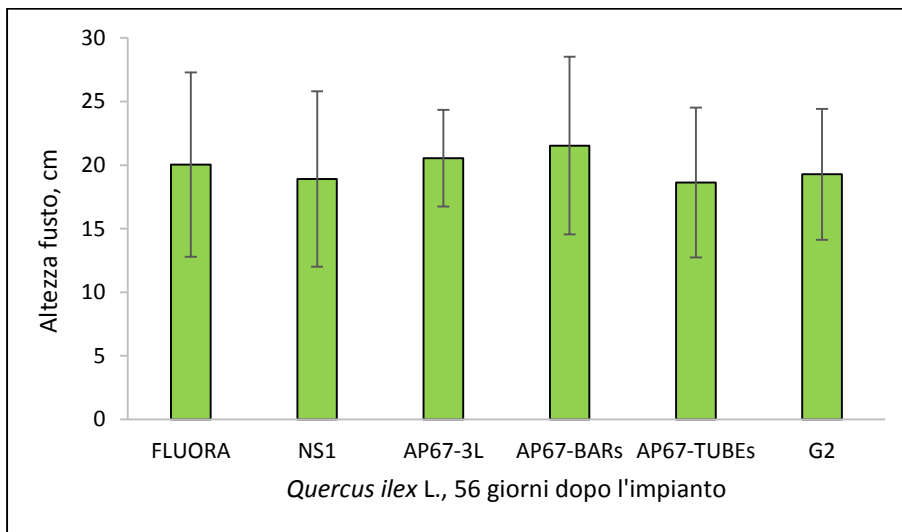


Figura 3.132 Altezza del fusto di *Quercus ilex* L. allevato in ambiente controllato, 56 giorni dopo il trapianto. Le barre indicano la deviazione standard. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il metodo T di Student per un livello di significatività $\alpha < 0,05$ ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).

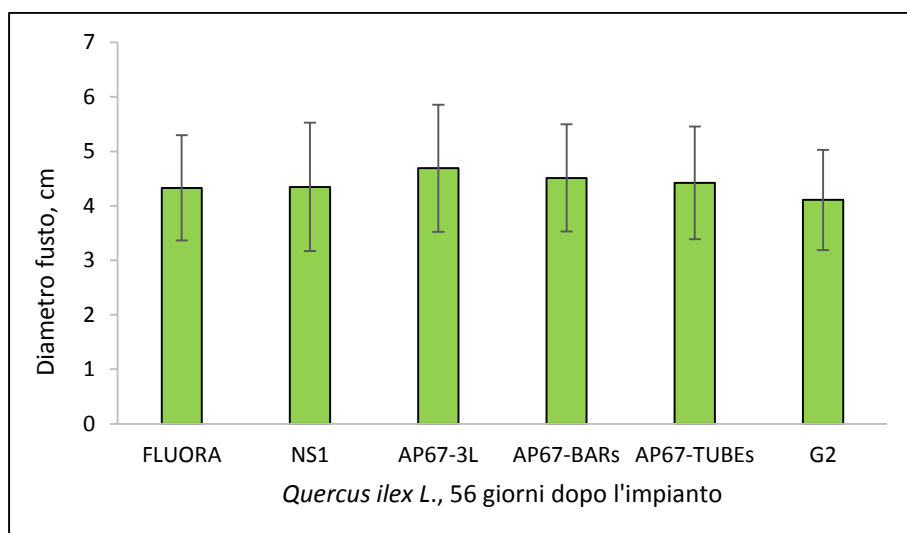


Figura 3.133 Diametro del fusto di *Quercus ilex* L. allevato in ambiente controllato, 56 giorni dopo il trapianto. Statistica come in Fig. 3.132.

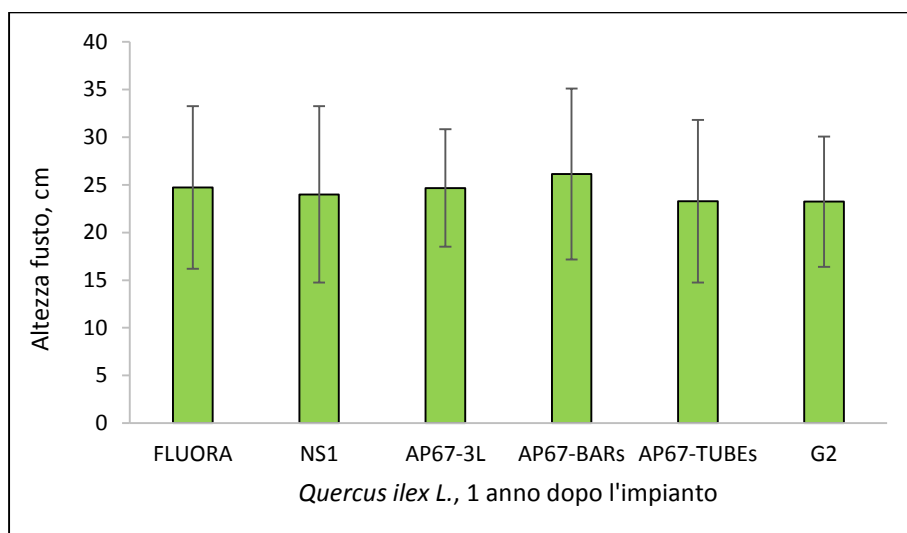


Figura 3.134 Altezza del fusto di *Quercus ilex* L. allevato in ambiente controllato, 1 anno dopo il trapianto. Statistica come in Fig. 3.132.

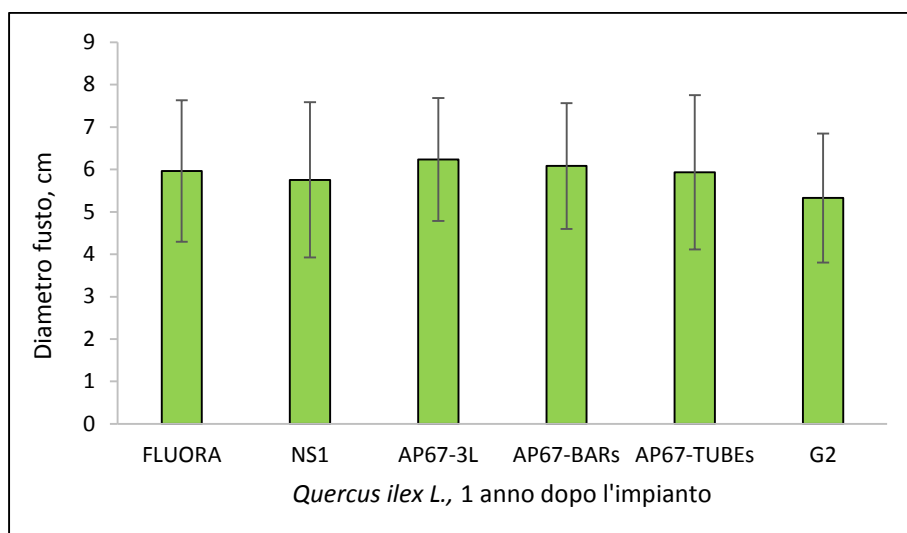


Figura 3.135 Diametro del fusto di *Quercus ilex* L. allevato in ambiente controllato, 1 anno dopo il trapianto. Statistica come in Fig. 3.132.

3.7 Discussione

La luce è uno importante stimolo per lo sviluppo delle piante e un fattore chiave nella loro morfogenesi (Okamoto *et al.*, 1997). Le risposte delle piante alla luce dipendono dalla quantità, qualità e durata della sorgente luminosa (Taiz *et al.*, 1991). Fino ad oggi le lampade fluorescenti sono state la fonte luminosa più comunemente usata per la coltivazione in ambiente controllato, hanno però il limite dell'impossibilità di controllo della qualità della luce che, come precedentemente detto, ha invece significativa influenza sulla morfogenesi delle piante. Come fonte di luce alternativa alle lampade tradizionali, i LED consentono di impostare una specifica lunghezza d'onda, di regolare l'intensità luminosa, non emettono calore e presentano una lunga durata di esercizio (Bula *et al.*, 1991; Hoenecke *et al.*, 1992; Okamoto *et al.*, 1997). I risultati di numerosi studi hanno mostrato importanti miglioramenti nella crescita delle piante quando esposte alla luce emessa da LED. Gli effetti dei diodi ad emissione luminosa sulla morfogenesi delle colture, come la banana (Nhut *et al.*, 2002), la lattuga (Okamoto *et al.*, 1996), il pepe (Brown *et al.*, 1995), la patata (Jao *et al.*, 2004), gli spinaci (Yanagi *et al.*, 1997) e il grano (Goins *et al.*, 1997) sono stati ben documentati. Anche se la ricerca ha dimostrato che in particolare le luci rosse e blu hanno una rilevante influenza sulla morfologia delle piante, le risposte variano a seconda delle specie vegetali il che determina indecisione nella scelta di un unico spettro che possa risultare ottimale per l'allevamento in ambiente controllato. Inoltre, come precedentemente accennato la maggior parte degli studi riguardano specie di interesse agrario. Le indagini su specie forestali allevate sotto luci LED sono assenti, ciò rende problematico prevedere quale potrebbe essere la risposta delle piante quando allevate con diodi ad emissione luminosa. Tuttavia, nelle specie studiate per la presente tesi di Dottorato è stato possibile notare alcune similitudini con i dati presenti in letteratura.

Come è noto, i LED rossi e blu vengono generalmente utilizzati per la crescita delle piante, soprattutto perché la clorofilla a e b vengono efficacemente assorbite nelle lunghezze d'onda del blu (con picco di assorbimento massimo a 430 nm e 453 nm) e rosso (con picco di assorbimento massimo a 663 nm e 642 nm) (Hopkins *et al.*, 2004). E' stato dimostrato che la luce rossa influenza positivamente la crescita delle piante incrementandone la biomassa fresca e secca, l'altezza del germoglio e l'area fogliare (Heo *et al.*, 2012; Johkan *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2007). La luce blu, invece, influenzerebbe l'attività fotosintetica, la formazione di clorofilla e lo sviluppo del cloroplasto piuttosto che avere un effetto diretto sull'accumulo di biomassa (Johkan *et al.*, 2010; Savvides *et al.*, 2012). Altro dato acquisito è che la luce blu è responsabile del controllo dell'espressione del gene *chs* in foglie di *Arabidopsis*, dalla quale trae origine la sintesi dei fondamentali pigmenti responsabili della colorazione dovuta ad antociani (Zhou *et al.*, 2005). Tuttavia, è stato recentemente osservato in *Lactuca sativa* L. che un insieme di luce blu e rossa migliora ulteriormente l'accrescimento delle piante piuttosto che se illuminate da sola luce rossa (Savvides *et al.*, 2012). Anche altre qualità di luce diverse da quella rossa e quella blu mostrerebbero di avere effetti positivi nell'allevamento indoor. Ad esempio, la luce gialla applicata a colture in vitro di susino ha mostrato di ridurre la dominanza apicale (Loreti *et al.*, 1990); anche in portainnesto di melo questa qualità di luce ha indotto una produzione di germogli ascellari maggiore rispetto a quella rilevata sotto luce blu e rosso-lontana (Morini *et al.*, 2012). Risposte simili sono state osservate anche con la luce verde che ha influito positivamente sul tasso di proliferazione in susino coltivato in vitro (Muleo *et al.*, 2001).

Analogamente a quanto detto, le specie oggetto di studio del presente elaborato hanno mostrato una risposta migliore in termini di accrescimento rispetto alle piante testimone quando allevate con luci LED che presentavano una combinazione di lunghezze d'onda principalmente nel rosso e nel blu, ma anche con una moderata presenza di giallo e verde. Tale risultato suggerisce l'ipotesi di individuare una luce dalla composizione spettrale in grado di coadiuvare la crescita delle specie vegetali, piuttosto che utilizzare un LED che presenti luce monocromatica. Infatti, soprattutto per le specie forestali probabilmente è necessario identificare uno spettro in grado di riprodurre, per l'allevamento in ambiente controllato, la qualità della luce tipica dell'areale di accrescimento come già viene fatto per altri parametri ambientali (p.e. la temperatura) e per la tipologia di terreno utilizzato.

Paragonando i risultati morfometrici ottenuti con *Arbutus unedo* L. allevato nelle tradizionali camere di crescita utilizzando luci LED con quelli ottenuti con luce fluorescente, in generale si è osservato una risposta positiva per le piante allevate con diodi ad emissione luminosa nelle tradizionali camere di crescita. La lampada che ha fornito i migliori risultati in termini di altezza, numero foglie, biomassa fresca e secca ed area fogliare è stata la lampada denominata AP67 che presenta una percentuale pari al 54% di rosso, 14% di blu, 15% di verde e giallo e 17% di far-red. Tale risultato, molto

probabilmente, è ascrivibile al fatto che tra tutte le lampade studiate all'interno del progetto europeo Regen Forest, la lampada AP67 presentava lo spettro più consono alla crescita del corbezzolo. Infatti, tutte le altre condizioni di luce testate presentavano o una elevata presenza di R (come ad esempio la lampada G2 con un 64% di rosso) o di B (come ad esempio la lampada NS2 con un 23% di blu). Un'errata composizione della luce può essere dannosa per la crescita delle piante. Ad esempio, una preponderanza della luce blu-violetta può ritardare lo sviluppo in altezza mentre un'irradiazione prevalentemente basata sul rosso e sull'infrarosso stimola un eccessivo accrescimento longitudinale generando piante filate (Savvides *et al.*, 2012).

I risultati delle analisi biochimiche sul corbezzolo allevato in camere di crescita tradizionali sotto luci LED non risultano essere positivi quando paragonati con quelli delle piante allevate sotto fluorescenza. Soprattutto i livelli di clorofilla e carotenoidi si presentavano ridotti in tutte le condizioni di luce testate, quando rapportati alle piante testimone. E' stato dimostrato che un eccesso di luce R riduce il contenuto di clorofilla in piante di *Cymbidium* (Tanaka *et al.*, 1998) mentre la luce B stimola la biosintesi di clorofilla e carotenoidi (Senger, 1982). Le lampade LED utilizzate nelle camere di crescita, invece, presentano una percentuale relativamente bassa di luce B rispetto alle altre lunghezze d'onda, e questo potrebbe quindi influenzare negativamente il contenuto di carotenoidi nelle piante.

L'attività fotosintetica delle piante è strettamente correlata con il metabolismo dell'azoto (Krapp e Truong, 2005; Wickert *et al.*, 2007) in quanto la sintesi di amminoacidi richiede la disponibilità di scheletri carboniosi provenienti dal processo fotosintetico. Di conseguenza per valutare l'influenza delle diverse fonti luminose sul processo di assorbimento dell'azoto, sono state indagate l'attività di due enzimi (NR e GS) coinvolti nel metabolismo di esso. Nello specifico, la pianta assorbe lo ione nitrato dal terreno e tramite la reazione catalizzata dalla NR lo riduce a ione nitrito che verrà quindi ridotto in ione ammonio. Tuttavia, essendo lo ione NH_4^+ tossico verrà rapidamente organicato per formare amminoacidi, come ad esempio la glutammina da parte dell'enzima GS (Chaillou *et al.*, 1994).

La NR svolge un ruolo fondamentale nella regolazione del meccanismo di assimilazione dell'azoto (Campbell, 1999) e la sua attività, in alcune specie vegetali, è regolata dalla luce (Travis *et al.*, 1970; Merlo *et al.*, 1995; Figueroa, 1996; Lillo, 2004).

L'enzima GS viene attivato da alte concentrazioni di ATP e ioni Mg_2^+ , condizioni che si verificano nello stroma dei cloroplasti quando si ha illuminazione. Pertanto risulta ovvio che la qualità della luce influenzi l'attività dell'enzima GS, dato che si trova per l'80% nei cloroplasti (McNally *et al.*, 1983; Marqués *et al.*, 1992; Oliveira *et al.*, 2002). Inoltre, la sua attività è assicurata da un sufficiente apporto di energia (ferrodossina e ATP) proveniente dal processo fotosintetico (Lea *et al.*, 1990).

Studi precedenti hanno dimostrato che l'attività della NR è stimolata nelle foglie di riso quando alla luce rossa era aggiunta una piccola percentuale di luce blu (Ohashi-Kaneko *et al.*, 2006). Questo dimostrerebbe che anche per la NR e la GS, la combinazione di luce rossa e blu presente nei LED potrebbe risultare ottimale per stimolare l'attività enzimatica. Sebbene i risultati osservati in *Arbutus unedo* L. non abbiano mostrato risposte significative per le piante allevate in alcune delle condizioni di illuminazione testate, è stato osservato un decremento effettivo dell'attività dei due enzimi per le piante cresciute sotto la lampada NS2. Questo risultato potrebbe essere imputabile al fatto che in tale lampada è presente una percentuale eccessiva di luce blu che, di conseguenza, non consentirebbe un corretto rapporto con la luce rossa.

E' interessante notare che il contenuto di MDA si mostrava ridotto nelle piante allevate con luci LED, ad esclusione dello spettro AP67-Arch. Il contenuto di MDA nei tessuti delle piante è considerato un marker biochimico della perossidazione lipidica e del danneggiamento delle membrane cellulari (Taulavuori *et al.*, 2001; Bacelar *et al.*, 2006; Sochor *et al.*, 2012), essendo uno dei prodotti finali della perossidazione degli acidi grassi insaturi in fosfolipidi. La riduzione del contenuto di MDA nelle piante allevate con luci LED potrebbe indicare, quindi, che i diodi ad emissione luminosa non incrementano il danno ossidativo alle membrane causato dalla perossidazione lipidica. Nel caso del corbezzolo soprattutto lo spettro AP67 determinava nelle piante i valori di MDA più bassi. Questo potrebbe suggerire che, anche per ridurre i livelli di stress ossidativo, tale luce presenta la migliore composizione spettrale per questa specie.

Osservando i risultati ottenuti con *Arbutus unedo* L. allevato all'interno del Prototipo, si è riscontrato un suo minore accrescimento quando confrontato con il corbezzolo allevato in tradizionale camera di crescita con luce LED AP67 fissa. Molto probabilmente, tale risultato è imputabile al meccanismo di rotazione del Prototipo che, seppure funzionale all'ottenimento di una produzione quantitativamente superiore ai metodi tradizionali, tuttavia è legato ad un periodo di illuminazione piuttosto breve e alla presenza di sole tre lampade poste alla sommità del Prototipo che verosimilmente non consentono alle piante di ricevere il quantitativo di luce necessario al loro sviluppo. Ciò nonostante, sebbene da un punto di vista morfometrico le piante abbiano risposto negativamente, si è riscontrato un aumento del contenuto di clorofilla e carotenoidi nel corbezzolo allevato nell'innovativa camera di crescita. Tale risposta potrebbe indicare lo sviluppo di meccanismi di adattamento nelle piante dovuti ai continui cambiamenti dell'intensità dell'irradianza (Lichtenthaler *et al.*, 1982). Infatti, secondo Leong *et al.* (1984) il fotoadattamento di una pianta in funzione della quantità di luce è correlato a cambiamenti nella composizione, nella struttura e nelle funzioni del cloroplasto, tra cui anche il contenuto di clorofilla. In questo senso, le piante di corbezzolo potrebbero aumentare il contenuto dei

pigmenti fotosintetici al fine di catturare la luce più efficacemente con lo scopo di mantenere un'adeguata velocità del processo fotosintetico.

Infine, è interessante notare che il contenuto di malondialdeide era più basso nelle piante di *Arbutus unedo* L. coltivate nel Prototipo rispetto alle piante testimone. Tale risultato suggerisce che la luce pulsata generata dalla rotazione dei vassoi molto probabilmente riduce il fotodanneggiamento indicando quindi che l'esposizione delle piante a una continua e variabile intensità luminosa rallenterebbe la formazione di radicali liberi, riducendo il rischio derivante dalla perossidazione lipidica.

Al termine del periodo di pre-coltivazione in ambiente controllato, le piante di corbezzolo sono state trasferite in serra con lo scopo di verificare la capacità di adattamento delle stesse alla luce naturale. Le piante allevate nelle tradizionali camere di crescita dopo circa 160 giorni di esposizione alla luce solare, hanno mostrato risultati statisticamente significativi in termini di altezza e numero di foglie solo per il corbezzolo allevato con la luce AP67 e NS2. Tuttavia, è interessante notare che i valori di diametro, biomassa fresca e secca e area fogliare hanno mostrato incrementi statisticamente significativi, rispetto alle piante testimone, per tutte le condizioni di luce LED testate. Tale risultato potrebbe comprovare la capacità delle piante pre-coltivate in ambiente indoor con diodi ad emissione luminosa di adattarsi rapidamente alla luce naturale.

Osservando i risultati ottenuti con *Arbutus unedo* L., pre-coltivato in Prototipo, dopo il periodo di adattamento in serra, ad eccezione di una lieve differenza in termini di altezza, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative con le piante testimone per nessuno dei parametri morfometrici analizzati. Di conseguenza, nonostante l'iniziale differenza mostrata dalle piante allevate con l'innovativa camera di crescita rispetto al corbezzolo allevato con luce LED fissa, i risultati dimostrano che tale differenza viene facilmente colmata a seguito del periodo di adattamento in serra, fino ad ottenere piante di uguali caratteristiche a quelle allevate nelle tradizionali camere di crescita. Ciò permette di ritenere il Prototipo una innovazione tecnologia promettente per il miglioramento qualitativo e quantitativo della produzione vivaistica forestale (Ortolani *et al.*, 2014).

Anche per le specie allevate utilizzando le lampade proposte dal progetto europeo *Zephyr*, i LED hanno mostrato risultati positivi quando paragonati con le piante allevate con le luci fluorescenti. In generale, osservando i risultati morfometrici ottenuti con il leccio, il mirto e il melograno è stato possibile notare una migliore risposta in termini di altezza, biomassa fresca e secca e area fogliare nelle piante allevate con la lampada denominata AP67 3L. Diversamente, il *Fagus sylvatica* L. ha mostrato una migliore reazione alla lampada denominata AP67 BARs. Anche in questi casi, la soluzione è molto probabilmente da ricercare nella composizione spettrale delle due lampade e,

soprattutto, nel rapporto tra luce rossa e blu in esse presenti. Infatti, la lampada AP67 3L presentava uno spettro composto per 60,5% di rosso, 12% di blu, 19% di verde e giallo e 8% di far-red. Invece, lo spettro della lampada AP67 BARs si presentava composto da un 53% di rosso, 14% di blu, 15% di verde e giallo e 18% di far-red. Al contrario, analogamente a quanto descritto per il corbezzolo, le altre lampade LED presentavano o un eccesso di luce rossa (G2 con il 64,4%), o di luce blu (NS1 con il 20,2%) o di luce giallo-verde (AP67 TUBEs con un 26,2%), suggerendo anche in questo caso la necessità di individuare una luce dalla qualità spettrale in grado di calibrare adeguatamente la presenza di tutte le lunghezze al fine di garantire un corretto accrescimento delle piante.

Si sono avute risposte positive dalle analisi biochimiche relative a leccio, mirto, melograno e faggio per le piante allevate utilizzando come fonte di illuminazione le luci LED.

Nello specifico il contenuto di clorofilla totale di carotenoidi risultava aumentato in quasi tutte le condizioni di allevamento testate, quando confrontate con le piante allevate sotto la tradizionale luce fluorescente. E' interessante notare che per il contenuto di clorofilla e carotenoidi i migliori risultati si sono ottenuti nelle piante allevate utilizzando luci ad adeguata percentuale di blu rispetto alle altre lunghezze d'onda. Ad esempio, il mirto ha mostrato un aumento del contenuto dei due pigmenti quando allevato con luce AP67 3L contenente un 12% di blu. Per il faggio la lampada NS1, caratterizzata dalla presenza di un 20,2% di lunghezza d'onda nel blu, ha determinato un incremento di clorofilla rispetto alle piante testimone. Tuttavia, nel faggio il contenuto di carotenoidi è risultato stimolato dalla lampada AP67 BARs la quale, tra tutte le luci testate, presentava dopo NS1 la più alta percentuale di luce blu (14%). La lampada AP67 BARs ha determinato l'incremento del contenuto dei pigmenti anche in *Quercus ilex* L.. Al contrario, come confermato dalla letteratura esistente (Tanaka *et al.*, 1998), la presenza di luce rossa inibiva il contenuto di clorofilla e carotenoidi. Infatti, osservando i risultati ottenuti è stato possibile notare un decremento di essi nelle piante di leccio e melograno quando allevate con la lampada G2 la quale presenta il 65 % di lunghezza d'onda nel rosso. La lampada G2 ha determinato un decremento del contenuto di carotenoidi anche in *Myrtus communis* L.. Al contrario, nel faggio è stato riscontrato una riduzione nel contenuto dei pigmenti nelle piante allevate con la lampada AP67 TUBEs. Tale risultato molto probabilmente è imputabile al fatto che, insieme alla G2, AP67 TUBEs è la lampada che presenta la più bassa percentuale di blu (10,5%).

La scarsa percentuale di luce blu contenuta in alcune delle lampade LED utilizzate è, molto probabilmente, responsabile dell'inibizione dell'attività enzimatica della NR e della GS riscontrata nelle specie oggetto di studio. Nello specifico, la luce G2 ha determinato decrementi dell'attività dei due enzimi in *Quercus ilex* L. e dell'attività della NR in *Myrtus communis* L.. La luce AP67 BARs è

risultata responsabile del decremento dell'attività della GS in mirto e di entrambi gli enzimi coinvolti nell'assimilazione dell'azoto in *Punica granatum* L.. Anche in *Fagus sylvatica* L. la lampada AP67 BARs ha influenzato negativamente l'attività della NR mentre l'attività della GS risultava inibita nelle piante allevate con luce AP67 3L. Come già detto, studi recenti hanno dimostrato la necessità di luce rossa con un'aggiunta di una piccola percentuale di blu per stimolare l'attività della NR e della GS (Ohashi-Kaneko *et al.*, 2006). Di conseguenza, i risultati ottenuti, sono probabilmente imputabili al fatto che il 7,7% di luce blu contenuta nella lampada G2, il 12% nella 3L e il 13% contenuto nella AP67 BARs non risulta sufficiente per conseguire un'adeguata attività degli enzimi coinvolti nell'assorbimento dell'azoto.

Ad esclusione del *Punica granatum* L., i diodi ad emissione luminosa non hanno determinato incrementi dei livelli di MDA nelle piante oggetto di studio. Tuttavia, è interessante notare che nel mirto e nel leccio la lampada che ha determinato il più basso contenuto di MDA nelle piante allevate è stata la AP67 3L. Nel melograno tutte le condizioni di illuminazione testate hanno comportato livelli di MDA superiori a quelli delle piante allevate con fluorescenza ad esclusione della lampada AP67 3L. Nel faggio i differenti LED utilizzati hanno influenzato positivamente il contenuto di MDA determinando livelli inferiori a quelli mostrati dalle piante testimone. Tra tutte le condizioni di illuminazione testate sul *Fagus sylvatica* L. la lampada AP67 BARs si è dimostrata la luce migliore per ridurre gli effetti dello stress ossidativo.

E' interessante notare la correlazione tra i LED che hanno determinato i migliori risultati morfometrici e quelli che hanno comportato i più bassi livelli di MDA. Questo risultato, confermerebbe le lampade AP67 3L e AP67 BARs come le potenziali fonti luminose per l'allevamento indoor delle piante oggetto di studio vista la loro composizione spettrale, già illustrata in precedenza.

Come si è visto, al termine del periodo di pre-coltivazione in ambiente controllato le piante, allevate utilizzando i diodi ad emissione luminosa proposti dal progetto europeo *Zephyr*, sono state trasferite in serra con lo scopo di verificare la capacità di adattamento delle stesse alla luce naturale. I risultati ottenuti per *Quercus ilex* L. non hanno mostrato differenze statisticamente significative tra le piante allevate con luce LED e le piante testimone. Analogamente a quanto descritto per il corbezzolo tale risultato dimostrerebbe la capacità delle piante pre-coltivate in ambiente indoor con diodi ad emissione luminosa, di adattarsi rapidamente alla luce naturale.

Le piante di *Myrtus communis* L. hanno mostrato differenze statisticamente significative dalle le piante testimone in termini di biomassa fresca e secca. Infatti, il livello di biomassa fresca delle foglie, ad eccezione delle piante allevate con la luce AP67 3L, si mostrava ridotto, rispetto alle piante

testimone, nel mirto allevato con gli altri spettri luminosi. Inoltre, osservando i risultati ottenuti dall'analisi della biomassa secca delle foglie nessuna luce LED utilizzata comportava risultati positivi nelle piante di mirto. Tuttavia, a livello di biomassa fresca e secca di fusto e radici, sebbene alcuni diodi ad emissione luminosa abbiano comportato decrementi statisticamente significativi rispetto alle piante testimone, il mirto allevato con AP67 3L non ha mostrato differenze con le piante allevate sotto luce fluorescente. Tale risultato quindi, confermerebbe la lampada AP67 3L come la luce LED ottimale per l'allevamento indoor del mirto, non avendo comportato risultati negativi a seguito del periodo di adattamento in serra.

Osservando i risultati ottenuti con il *Punica granatum* L., a seguito dei 160 giorni trascorsi in serra, è stato possibile notare una differenza statisticamente significativa nel numero di foglie per il melograno allevato con luci LED, rispetto alle piante testimone. Tuttavia, tale risultato è sicuramente da imputare ad un attacco parassitario di cui sono state oggetto le piante di melograno durante il periodo trascorso all'interno della serra.

Nel *Fagus sylvatica* L. a seguito del periodo di adattamento in serra è stato possibile osservare una lieve differenza statisticamente significativa, rispetto alle piante allevate con la tradizionale luce fluorescente, in termini di altezza del fusto per le piante di faggio allevate con la luce LED AP67 TUBEs.

I risultati ottenuti con le piantine di leccio trasferite in pieno campo, non mostravano differenze statisticamente significative in termini di altezza e diametro già a partire dal 7° giorno di osservazione. Tuttavia, un dato interessante emerso in questa fase sperimentale, è l'assenza di fallanze dopo il trapianto. Osservando, quindi, le risposte vegetative ottenute si può affermare che l'illuminazione a LED può essere utilizzata nella fase di pre-coltivazione di piante forestali nelle camere di crescita.

In conclusione, l'analisi dei risultati delle piante allevate indoor con luci LED, successivamente trasferite in serra e, in seguito in campo aperto, ha dato conferma dell'efficacia dei diodi ad emissione luminosa nel sostenere lo sviluppo delle piantine anche dopo il loro cambiamento d'ambiente.

Precedenti studi su leccio e mirto (Marianello *et al.*, 2014), hanno confermato i LED come una valida alternativa alle luci fluorescenti nella fase di pre-coltivazione in ambiente controllato. Marianello *et al.* (2014), inoltre, hanno dimostrato che le piante di entrambe le specie allevate con luci LED e con tradizionale luce fluorescente mostravano un andamento simile quando esposte alla luce naturale in serra confermando, quindi, i risultati ottenuti per il presente elaborato.

4. CONCLUSIONI

La tutela della biodiversità forestale si consegue, oltre che con la protezione dell'ambiente nel quale le piante vivono, anche attraverso l'individuazione, selezione e controllo del materiale di propagazione forestale, per ottenere una produzione vivaistica certificata in grado di supportare le richieste di specie arboree e arbustive che provengano da aree limitrofe alle zone di intervento. Inoltre, compito della vivaistica forestale è anche quello di produrre piante in grado di garantire la più alta probabilità di attecchimento e di sviluppo, da utilizzare negli imboschimenti protettivi e produttivi al fine di ridurre la pressione antropica sulle foreste naturali preservandone la biodiversità (Marianello *et al.*, 2014).

Le tecniche di vivaistica presentano la loro utilità anche in considerazione dei cambiamenti climatici ed in particolare degli evidenti incrementi di temperatura, condizioni ambientali che potrebbero influenzare la distribuzione e la crescita di importanti specie arboree andando ad influenzare i servizi forniti dalle foreste all'uomo (Lindner *et al.*, 2010). Soprattutto in ambiente mediterraneo, infatti, l'aumento delle temperature si presenta come una evidente fonte di stress per le piante. Questo pone le ricerche nell'ambito della vivaistica forestale in primo piano avente come scopo un costante e continuo aggiornamento delle metodologie di produzione forestale (Calvo, 2007).

Negli ultimi anni, nel nostro Paese si sta osservando un crescente interesse per la rinaturalizzazione delle aree degradate e per i progetti di conservazione della biodiversità forestale con conseguente stimolo di sempre maggiori innovazioni in campo vivaistico. Come precedentemente detto, alcuni autori (Mattsson *et al.*, 2010; Astolfi *et al.*, 2012) hanno riportato un nuovo sistema di coltivazione di piantine forestali denominato pre-coltivazione dove le piante vengono allevate per un periodo piuttosto breve in mini-contenitori e in ambienti con condizioni di temperatura e umidità controllate. Tuttavia, come è noto, per l'allevamento delle piante in camere climatiche fino ad oggi sono state utilizzate lampade fluorescenti, ad incandescenza o ai vapori di sodio che presentano diversi svantaggi. Attualmente, si stanno sperimentando nuove fonti luminose come i diodi ad emissione luminosa, o LED, che oltre a presentare dimensioni ridotte, una più lunga durata di vita, un basso consumo energetico e una ridotta emissione di calore (con conseguente minor dispendio di energia per il condizionamento termico) possono emettere luce monocromatica e di conseguenza (a differenza delle lampade fluorescenti) può essere realizzato uno spettro luminoso che meglio soddisfi le esigenze fotosintetiche delle piante (Astolfi *et al.*, 2012).

In quest'ottica si inseriscono i progetti europei Regen-Forest e Zephyr i quali come obiettivo quello di sperimentare l'efficacia di lampade LED di nuova generazione durante la fase di pre-coltivazione della pianta. Scopo finale è sviluppare un prototipo di camera di crescita, impiegando i LED come

fonte luminosa, dove è possibile controllare temperatura, umidità e intensità luminosa in modo da soddisfare le esigenze di crescita delle piante.

In questo studio sono stati valutati gli effetti di diverse luci LED su specie di interesse forestale tipiche dell'area mediterranea, analizzando le risposte morfometriche e fisiologiche delle piante e confrontando i risultati ottenuti con piante delle stesse specie allevate utilizzando lampade fluorescenti.

In generale, le specie oggetto di studio hanno mostrato una risposta positiva all'illuminazione effettuata con diodi ad emissione luminosa quando allevate nelle tradizionali camere di crescita. Soprattutto è stato osservato un incremento in termini di accrescimento, rispetto alle piante testimone, per gli individui allevati con luci LED che presentavano una combinazione di lunghezze d'onda principalmente nel rosso e nel blu, e con una limitata presenza di giallo e verde. Analogamente, le stesse fonti luminose hanno determinato un decremento dei livelli di MDA rispetto al controllo indicando la mancata induzione di fenomeni di stress fotossidativo.

Successivamente, le piante sono state trasferite in serra per l'ambientamento alle condizioni di luce naturale e allevate per una stagione vegetativa. Al termine di tale periodo piante di *Quercus ilex* L. sono state trasferite in campo aperto.

I risultati ottenuti hanno evidenziato un comportamento simile per le piante di tutte le specie allevate sia con luci LED che fluorescente, quando trasferite in ambiente semi-naturale della serra e naturale del campo aperto. Tali risultati testimonierebbero la capacità delle piante pre-coltivate in ambiente indoor con diodi ad emissione luminosa di adattarsi rapidamente alla luce naturale.

I risultati ottenuti dimostrano, quindi, l'efficacia delle luci LED per la pre-coltivazione di specie forestali in ambiente controllato. Una loro più diffusa applicazione consentirebbe di ridurre considerevolmente i costi energetici nella fase di pre-coltivazione grazie alle loro caratteristiche legate soprattutto al basso consumo energetico, ad un alto numero di ore di funzionamento e ad una bassa emissione di calore (Marianello *et al.*, 2014). Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per comprendere le complesse relazioni tra il tipo di radiazione luminosa e lo sviluppo degli individui vegetali. In particolare, è auspicabile identificare una luce LED in grado di emettere uno spettro che possa riprodurre la qualità della luce tipica dell'areale di accrescimento, rendendola un parametro definibile nell'allevamento indoor di specie forestali così come già viene fatto per gli altri parametri ambientali (p.e. la temperatura) e per la tipologia di terreno utilizzato. In questo modo si potrebbe ulteriormente migliorare le caratteristiche del materiale ottenuto e la capacità di attecchimento delle piante nella successiva fase di impianto.

La necessità di garantire il successo dei programmi di restauro ambientale e di rimboschimento contribuisce a sostenere la crescente esigenza di produrre piantine di alta qualità necessarie per la riuscita degli interventi effettuati. Pertanto, nuove tecnologie potrebbero contribuire al miglioramento della qualità e quantità delle piantine forestali. In quest'ottica il progetto europeo Regen-Forest ha sviluppato un nuovo modello di camera di crescita che possa conciliare la necessità di un'alta produzione di piantine con un basso consumo energetico. Il prototipo è costituito da dieci ripiani in movimento rotatorio e si avvale per l'illuminazione di tre lampade a luci LED con spettro luminoso di nuova generazione. L'allevamento delle piantine nel prototipo (con termoperiodo e fotoperiodo controllati da un sistema computerizzato) si protrae per un tempo limitato (pre-coltivazione) ma sufficiente a garantire un'alta germinabilità dei semi e a condizionare positivamente il successivo sviluppo delle piantine. Per il presente elaborato, piante di *Arbutus unedo* L. sono state allevate all'interno del prototipo al fine di verificarne l'efficacia. Al termine del periodo di pre-coltivazione è stato osservato un decremento in termini di accrescimento per le piante allevate con l'innovativa camera di crescita rispetto a quelle allevate con luce fissa. Tuttavia, è stato osservato un incremento della concentrazione di clorofilla e β -carotene ed una riduzione del contenuto di MDA, suggerendo che il meccanismo rotatorio del prototipo influenza positivamente l'attività fotosintetica della pianta e la riduzione degli effetti del fotodanneggiamento. Inoltre, una volta trasferite all'aperto le piante di corbezzolo allevate all'interno del prototipo hanno mostrato ottime capacità di risposta vegetativa alle condizioni esterne, colmando velocemente le differenze morfometriche presentate con le piante allevate con luce LED fissa.

In conclusione, l'alto numero di piante ottenute, il risparmio energetico pari a 1/5 di quello delle tradizionali camere di crescita a fluorescenza e l'elevata meccanizzazione del prototipo lo fanno ritenere una innovazione tecnologia promettente per il miglioramento qualitativo e quantitativo della produzione vivaistica forestale (Ortolani *et al.*, 2014).

5. BIBLIOGRAFIA

- 1) Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile, AA.VV. (2009). Accrescimento delle piante con luci LED. Dipartimento Biotecnologie, Agroindustria e protezione della Salute Centro Ricerche Casaccia, Roma;
- 2) Agenzia Nazionale Protezione Ambiente, AA.VV. (2001). Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea. Comitato per la Lotta alla Siccità e alla Desertificazione, Roma (DPCM 26.9.97, GU n.43 del 21.2.98);
- 3) Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici, AA. VV. (2003). Biodiversità e vivaistica forestale. Aspetti normativi e scientifici. Manuali e linee guida 18/2003;
- 4) Astolfi S., Marianello C., Grego S., Bellarosa R. (2012). Preliminary Investigation of LED Lighting as Growth Light for Seedlings from Different Tree Species in Growth Chambers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40 (2): 3138;
- 5) Astolfi S., Zuchi S., Passera C. (2004). Effects of cadmium on the metabolic activity of *Avena sativa* plants grown in soil or hydroponic culture. *Biol. Plant.*, 48 (3): 413-418;
- 6) Bacelar E.A., Santos D.L., Moutinho-Pereira J.M., Gonçalves B.C., Ferreira H.F., Correia C.M. (2006). Immediate responses and adaptative strategies of three olive cultivars under contrasting water availability regimes: Changes on structure and chemical composition of foliage and oxidative damage. *Plant Sci.*, 170: 596-605,
- 7) Barbero M., Loisel R., Quzel P. (1992). Biogeography, ecology and history of Mediterranean *Quercus ilex* ecosystems. *Vegetatio*, 99–100: 19-34;
- 8) Behm A., Beecker A., Doerflinger A., Franke A., Kleinschmit J., Melchior G.H., Muhs H.J., Schmitt H.P., Stephan B.R., Tabel U., Weisgerber H., Widmaier T.H. (1997). Concept for the Conservation of Forest Genetic resources in the Federal Republic of Germany. *Silvae Genetica*, 46 (1): 24-34;
- 9) Bernetti G. (1995). *Selvicoltura speciale*. Edizioni UTET, Torino;
- 10) Bonalberti E. (1997). Linee guida per il rilancio della vivaistica forestale in Italia e per il riordino della normativa comunitaria e nazionale nel campo della produzione e dell'utilizzo. In: Atti della giornata di studio "Vivaistica forestale e conservazione della biodiversità", Collana *Sicilia Foreste*, 1: 57-65;
- 11) Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254;
- 12) Brazaitytė A., Duchovskis P., Urbonavičiūtė A. (2009). After-effect of light-emitting diodes lighting on tomato growth and yield in greenhouse. *Sodininkystė ir daržininkystė*, 28 (1): 115–126;

- 13) Bula R.J., Morrow R.C., Tibbitts T.W., Barta D.J., Ignatius R.W., Martin T.S. (1991). Light emitting diodes as a radiation source for plants. *HortScience*, 26: 203205;
- 14) Calvo E. (2007). La vivaistica per un migliore futuro del nostro ambiente. Ersaf Lombardia. *Alberi e Territorio* n.12;
- 15) Campbell W.H. (1999). Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. mol. Biol.*, 50: 277-303;
- 16) Chaillou S., Rideout J.W., Raper C.D., Morot-Gaudry J.F. (1994). Responses of soybean to ammonium and nitrate supplied in combination to the whole root system or separately in a split-root system. *Physiol. Plant.*, 90: 259-268;
- 17) Commissione Europea 2011. Comunicazione della Commissione al Parlamento Europeo, al Consiglio, al Comitato Economico e Sociale Europeo e al Comitato delle Regioni: *La nostra assicurazione sulla vita, il nostro capitale naturale: strategia dell'UE sulla biodiversità fino al 2020* {SEC(2011) 540 definitivo} {SEC(2011) 541 definitivo}. Bruxelles 03.05.2011 COM(2011) 244 definitivo;
- 18) Damiani G. (2001). Presentazione in: la vegetazione mediterranea. Manuale ANPA. Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea;
- 19) Di Berenger A. (1880). Guida per il coltivatore di vivai boschivi. Firenze: Tipografia Bencini;
- 20) Ducci F. (1999). Conservazione ed utilizzazione delle risorse genetiche forestali in Italia. *Notiziario Risorse genetiche Vegetali*. MIPAF, Ist. Sper. Frutticoltura, Roma: 2-7;
- 21) Dumroese R.K., Hutton K.M., Wenny D.L., (1997). Propagating woody riparian plants in nurseries. *National Proceedings of Forest and Conservation Nursery Associations*, p. 71-76;
- 22) Engbers G.J., Harbinson J., Ieperen W. (2007). Plant physiological acclimation to irradiation by light emitting diodes (LEDs). *Acta Hort.* 761:183-192;
- 23) Ente Regionale per i Servizi all'Agricoltura e alle Foreste, AA.VV. Guida per la scelta delle piante forestali in vivaio;
- 24) Faleiros R.R.S., Cazetta J.O. (1996). Optimization of the in vivo assay for nitrate reductase activity determination in pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp] leaves. *Cientifica*, 24: 385-396;
- 25) Figueroa F.L., (1996). Effects of light quality on nitrate reductase and glutamine synthetase activities in the red alga *Porphyra leucosticta* Thur. in le Jol. and other macroalgae. *Sci. Mar.*, 60 (1): 163-170;
- 26) Gellini R., Grossoni P. (1997). Botanica Forestale. II Angiosperme. Edizione Cedam, Milano;
- 27) Goins G.D., Yorio N.C., Sanwo M.M., Brown C.S. (1997). Photomorphogenesis, photosynthesis, and seed yield of wheat plants grown under red light-emitting diodes (LEDs) with and without supplemental blue lighting. *J. Expt. Bot.* 48:1407-1413;

- 28) Heo J.W., Kang D.H., Bang H.S., Hong S.G., Chun C., Kang K.K. (2012). Early growth, pigmentation, protein content, and phenylalanine ammonia-lyase activity of red curled lettuces grown under different lighting conditions. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 30:6-12;
- 29) Hoenecke M.E., Bula R.J., Tibbitts T.W. (1992). Importance of blue photon levels for lettuce seedlings grown under red-light-emitting diodes. *HortScience*, 27: 427-430;
- 30) Hoenecke M.E., Bula R.J., Tibbitts T.W. (1989). Lettuce seedling response to red light emitting diodes supplemented with varying levels of blue photons. *ASGSB Bull.* 3-1,9;
- 31) Hopkins W.G., Huner N.P.A. (2004). Introduction to plant physiology. 3rd Ed. John Wiley and Sons, Hoboken, NJ;
- 32) ISPRA (2010). Alla scoperta della biodiversità. Strumento didattico del progetto di educazione ambientale "Orientarsi nella biodiversità";
- 33) Johkan M., Shoji K., Goto F., Hashida S., Yoshihara T. (2010). Blue Light-emitting Diode Light Irradiation of Seedlings Improves Seedling Quality and Growth after Transplanting in Red Leaf Lettuce. *HortScience*, 45(12): 1809-1814;
- 34) Kang J.H., Krishnkumar S., Sua Atulba S.L., Jeong B.R., Hwang S.J. (2013). Light intensity and photoperiod influence the growth and development of hydroponically grown leaf lettuce in a closed-type plant factory system. *Hort. Environ. Biotechnol.*, 54: 501-509;
- 35) Kang J.H., Krishnkumar S., Sua Atulba S.L., Jeong B.R., Hwang S.J. (2013). Light intensity and photoperiod influence the growth and development of hydroponically grown leaf lettuce in a closed-type plant factory system. *Hort. Environ. Biotechnol.*, 54: 501-509;
- 36) Kim K., Kook H.S., Jang Y.J., Lee W.H., Kamala Kannan S., Chae J.C., Lee K.J. (2013). The effect of blue-light-emitting diodes on antioxidant properties and resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. *Plant Pathol. Microbiol.*, 4:49;
- 37) Krapp A., Truong H.N. (2005). Regulation of C/N interaction in model plant species. *J. Crop. Improv.*, 15: 127-173;
- 38) Landis T.D., Lippitt L.A., Evans J.M. (1993). Biodiversity and Ecosystem management: the role of forest and conservation nurseries. Proceedings Western Forest of Nursery Association. September 14-18; 1-17;
- 39) Lea P.J., Robinson S.A., Stewart G.R. (1990). The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine. In: Mifflin B. J., Lea P. J. (eds) The biochemistry of plants, vol 16 Intermediary nitrogen metabolism. Academy Press, New York: 147-152;
- 40) Leong T.Y., Anderson J.M. (1984). Adaptation of the thylakoid membranes of pea chloroplasts to light intensities. I. Study on the distribution of chlorophyll protein complexes. *Photosynth. Res.*, 5: 105-115;

- 41) Lercari B., (1990). Quantità e qualità della luce nell'ambiente protetto. *Colture protette*, 19 (1): 27-33;
- 42) Lichtenthaler H.K., Kuhn G., Prenzel U., Buschmann C., Meier D. (1982). Adaptation of Chloroplast-Ultrastructure and of Chlorophyll- Protein Levels to High-Light and Low-Light Growth Conditions. *Z. Naturforschung C.*, 37: 464-475;
- 43) Lillo C. (2004). Light regulation of nitrate uptake, assimilation and metabolism. Chapter 6, In *Plant Ecophysiology, Vol 3 Nitrogen Acquisition and Assimilation in Higher Plants*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht; 149-184;
- 44) Lindner M., Gardiner B.A., Blennow K., Carnus J.M., Fleischer P., Ingermarson F., Landmann G., Marzano M., Nicoll B., Orazio C., Peyron J.L., Reviron M. P., Schelhaas M. J., Schuck A., Spielmann M., Usbeck T. (2010). Destructive Storms in European Forests: Past and Forthcoming Impacts. Final report to European Commission – DG Environment. Bordeaux, EFI Atlantic: 138;
- 45) Loreti F., Muleo R., Morini S. (1990). Effect of light quality on growth of in vitro cultured organs and tissues. *Proc. Inter. Plant Prop. Soc.* 40: 615-623;
- 46) Luisi N., Lerario P., Vannini A. (1992). Recent Advances in Studies on Oak Decline. Proceedings of an International Congress, Selva di Fasano (Brindisi), Italy, 13-18 September. Università degli Studi, Dipartimento di Patologia Vegetale, Bari;
- 47) Maracchi G., Sirotenko, O., Bindi M. (2005). Impacts of present and future climate variability on agriculture and forestry in the temperate regions: *Europe. Climatic Change*, 70(1-2): 117-135;
- 48) Marianello C., Mechilli M., Ortolani M.R., Bellarosa R. (2014). Influenza delle luci LED sulla crescita di piantine di *Quercus ilex* L. e *Myrtus communis* L. II Congresso Internazionale di Selvicoltura, Firenze 26-29 Novembre 2014;
- 49) Marqués S., Mérida A., Candau P., Florencio F.J. (1992). Light-mediated regulation of glutamine synthetase activity in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 6301. *Planta*, 187: 247-253;
- 50) Matsuda R., Ohashi-Kaneko K., Fujiwara K., Goto E., Kurata K. (2004). Photosynthetic characteristics of rice leaves grown under red light with or without supplemental blue light. *Plant Cell Physiol.*, 45: 1870–1874;
- 51) Matsuda R., Ohashi-Kaneko K., Fujiwara K., Goto E., Kurata K. (2004). Photosynthetic characteristics of rice leaves grown under red light with or without supplemental blue light. *Plant Cell Physiol.*, 45: 1870-1874;
- 52) Mattsson A., Radoglou K., Kostopoulou P., Bellarosa R., Simeone M.C., Schirone B. (2010). Use of innovative technology for the production of high-quality forest regeneration materials. *Scand. J. For. Res.*, 25 (8): 3-9;

- 53) McNally S.F., Hirel B., Gadal P., Mann A.F., Stewart G.R. (1983). Glutamine synthetases of higher plants. *Plant Physiol.*, 72: 22-25;
- 54) Médail F., Quézel P. (1997). Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean basin. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84: 112-127;
- 55) Merlo L., Ferretti M., Passera C, Ghisi R. (1995). Light-modulation of nitrate reductase activity in leaves and roots of maize. *Physiol. Plant.*, 94: 305-311;
- 56) Moraldi M. (2004). Organizzazione e gestione dei vivai forestali. Dispense per lezioni di vivaistica rivolta agli studenti del IV° anno dell'Istituto Professionale di Stato Agricoltura e Ambiente;
- 57) Moreno J.M., Oechel W.C. (1995). Global change and Mediterranean - Type ecosystems. *Ecological Studies* 117. Springer, New York;
- 58) Morini S. Muleo R. (2012). Il ruolo della qualità della luce nei processi di sviluppo e differenziazione delle colture in vitro. *Italus Hortus* 19 (1): 37-49;
- 59) Muleo R., Morini S., Casano S. (2001). Photoregulation of growth and branching of plum shoots: physiological action of two photosystems. *Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37: 609617;
- 60) Nhut D.T., Takamura T., Watanabe H., Okamoto,K., Tanaka M. (2004). Responses of strawberry plantlets cultured in vitro under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). *PlantCell Tissue Organ Cult.* 73:43-52;
- 61) Ohashi-Kaneko K., Goji, K., Matsuda, R., Fujiwara, K. and Kurata, K. (2006). Effect of Blue light supplementation to Red Light on Nitrate Reductase activity in leaves of rice seedlings. *Acta Hort.*, 711: 351-356;
- 62) Okamoto K., Yanagi T., Kondo S. (1997). Growth and morphogenesis of lettuce seedlings raised under different combinations of red and blue light. *Acta Hort.* 435:149-157;
- 63) Oliveira I.C., Brears T., Knight T.J., Clark A., Coruzzi G.M. (2002). Overexpression of Cytosolic Glutamine Synthetase. Relation to Nitrogen, Light, and Photorespiration. *Plant Physiol.*, 129: 1170-1180;
- 64) Olle M., Virsile A. (2013). The effects of light emitting diode on greenhouse plant growth and quality. *Agric. Food Sci.*, 22: 223-234;
- 65) Ortolani M.R., Mechilli M., Marianello C., Bellarosa R. (2014). Innovazione tecnologica nella produzione di piantine di *Myrtus communis* L. e *Quercus ilex* L. II Congresso Internazionale di Selvicoltura, Firenze 26-29 Novembre 2014;
- 66) Pignatti S. (1984). Flora d'Italia. Edagricole, Bologna;
- 67) Piotto B., Di Noi A. (2001). Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea. ANPA, Roma. p 212;

- 68) Puspa R.P., Ikuo K., Ryosuke M. (2008). Effect of red-and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. *Plant. Cell. Tiss Organ. Cult.*, 92:147-153;
- 69) Rose R., Haase D.L. (1998). Native Plants: Propagating and Planting. Proceedings of Dec. 9-10 Conference. Corvallis, Oregon State University, Nursery Technology Cooperative;
- 70) Sala G. (1943). *Vivai Forestali*. Roma: Ramo editoriale degli agricoltori;
- 71) Savvides A., Fanourakis D., Van Ieperen W. (2012). Co-ordination of hydraulic and stomatal conductances across light qualities in cucumber leaves. *J. Expt. Bot.* 63:1135-1143;
- 72) Schirone B., Bussotti F. (2001). La vegetazione mediterranea. Manuale ANPA. Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea. 17-23;
- 73) Schönfelder I., Schönfelder P. (1996). La flora mediterranea. De Agostini, Novara;
- 74) Senger H. (1982). The effect of blue light on plants and microorganisms. *Photochem. Photobiol.*, 35: 911-920;
- 75) Sochor J., Ruttkay-Nedecky B., Babula P., Adam V., Hubalek J., Kizek R. (2012). Automation of methods for determination of lipid peroxidation, lipid peroxidation. In: Catala A (ed), ISBN: 978-953-51-0716-3, InTech, DOI: 10.5772/45945;
- 76) Suszka B., Muller C., Bonnet-Masimbert M. (1994): Seeds of Forest Broadleaves from Harvest to Sowing. Warszawa-Poznan, Wydawnictwo naukowe PWN: 299;
- 77) Taiz L., Zeiger E. (1991). Plant physiology. 3rd Ed. Benjamin/Cummings Publishing Co., New York, NY. p. 179-264;
- 78) Tamulaitis G., Duchovskis P., Bliznikas Z. (2005). High-power light-emitting diode based facility for plant cultivation. *Journal of Physics. D: Applied Physics.*, 38: 3182-3187;
- 79) Tanaka M., Takamura T., Watanabe H., Endo M., Yanagi T., Okamoto K. (1998). In vitro growth of Cymbidium plantlets cultured under superbright red and blue lightemitting diodes (LEDs). *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 73:39-44;
- 80) Taulavuori E., Hellström E.K., Taulavuori K., Laine K. (2001). Comparison of two methods used to analyse lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillus* (L.) during snow removal, reacclimation and cold acclimation. *J. Exp. Bot.*, 52: 2375– 2380;
- 81) Teissier Du Cros E. (2001). Forest Genetic Resources Management and conservation: France as a case study. Ministry of Agriculture and Fisher, Bureau of Genetic Resources, INRA DIC, Paris: 60;
- 82) Terashima I., Fujita T. Inoue T., Chow W.S., Oguchi R. (2009). Green light drives leaf photosynthesis more efficiently than red light in strong white light: Revisiting the enigmatic question of why leaves are green. *Plant Cell Physiol.*, 50: 684-697;
- 83) Thuiller W. (2007). Climate change and the ecologist. *Nature* 448: 550-552. Nature Publishing;

- 84) Travis R.L. Huffaker R.C., Key L.J. (1970). Light-induced Development of Polyribosomes and the Induction of Nitrate Reductase in Corn Leaves. *Plant Physiol.*, 46: 800-805;
- 85) Valladares F., Martinez-Ferri E., Balaguer L., Perez-Corona E., Manrique E. (2000). Low leaf-level response to light and nutrients in Mediterranean evergreen oaks: a conservative resource-use strategy? *New Phytol.*, 148: 79-91;
- 86) Veneto Agricoltura (2011). Centro Vivaistico e per l'A.F.F. di Montecchio Prec.-ALLEGATO 2;
- 87) Wang B. (1999). Testing of Tree Seeds for Germination. News Bulletin, Canadian Tree Improvement Association 30, May, 9-14;
- 88) Wang, H., Gu M., Cui J., Shi K., Zhou T., Yu J. (2009). Effects of light quality on CO₂ assimilation, chlorophyll-fluorescence quenching, expression of Calvin cycle genes and carbohydrate accumulation in *Cucumis sativus*. *J. Photochem. Photobiol. B* 96:30-37;
- 89) Wickert E., Marcondes J., Lemos M. V., Lemos E.G.M. (2007). Nitrogen assimilation in Citrus based on CitEST data mining. *Genet. Mol. Biol.*, 30(3): 810818;
- 90) Winterman J.F., De Mots A. (1965). Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. *Biochim. Biophys. Acta*, 109: 448-453;
- 91) Wu M.C., Hou C.Y., Jiang C.M., Wang Y.T., Wang C.Y., Chen H.H., Chang H.M. (2007). A novel approach of LED light radiation improves the antioxidant activity of pea seedlings. *Food Chem.*, 101: 1753-1758;
- 92) Yanagi T. Okamoto K. (1997). Utilization of super-bright light emitting diodes as an artificial light source for plant growth. *Acta Hort.* 418:223-228;
- 93) Yorio N.C., Goins G.D., Kagie H.R., Wheeler R.M., Sager J.C. (2001). Improving spinach, radish, and lettuce growth under red light-emitting diodes (LEDs) with blue light supplementation. *Hort. Sci.*, 36: 380–383;
- 94) Zhou W. (2005). Advanced Astroculture plant growth unit: Capabilities and performances. *SAE Technical Paper* 2005-01- 2840;
- 95) Zuchi S., Astolfi S. (2012). Changes in growth irradiance are reflected on H⁺ATPase activity of plasma membrane enriched vesicles from maize (*Zea mays* L.) root. *J. Plant Physiol.*, 169: 50-54.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare il prof. Bartolemo Schirone, la Prof.ssa Stefania Astolfi e la Prof.ssa Rosanna Bellarosa per gli insegnamenti e la pazienza dimostrata in questi anni.

Inoltre, vorrei ringraziare la Dott.ssa Avra Schirone, la Sig.ra Giulia Sandoletti, il Sig. Luigi Sandoletti e la Dott.ssa Manuela Mechilli per essere stata la mia famiglia adottiva.

Un ringraziamento speciale va al Dott. Federeico Vessella per essere stato la mia colonna portante e il compagno di tante risate.

Ringrazio la mia famiglia, senza la quale non avrei portato a termine nessuno dei miei progetti.

Infine il ringraziamento più grande di tutti va a Giorgio, che non si è mai reso conto di quanto sia stato importante il suo supporto e la sua presenza e per cui nessuna frase può aiutarmi a descrivere l'infinito amore nei suoi confronti.